# รายการอ้างอิง


**ภาษาไทย**

ปวิชชุดา ลิชผล. 2544. "การโคลนยีนซัลไฟต์รีดักเตสจาก *Arabidopsis thaliana*" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,. หน้า 31-32.

สินีนาฏ สายบาง. 2543. "การโคลนยีนเอพีเอสรีดักเตสจาก *Arabidopsis thaliana* เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 " วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,.หน้า 90.

**ภาษาอังกฤษ**

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

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

Bick, J., Aslund, F., and Leustek, T. 1998. Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95(14):8404-8409.

Bick, J., and Leustek, T.1998. Plant sulfur metabolism the reduction of sulfate to sulfite. Current Opinion in Plant Biology. 1:240-244.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 22:248.

Brunold, C., and Schmidt, A.1976. Regulation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotrans ferase activity by $H_2S$ in *Lemna minor* L. Planta. 133:85-88.

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.

Goldschmidt, E.E., Tsang, M.L.S., and Schiff, J.A. 1975. Studies of sulfate utilization by algae. 13. Adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate to acid volatile radioactivity. Plant Sci. Lett. 4:293-300.

Gutierrez-Marcos, J.F., Roberts, M.A., Campbell, E.I., and Wray, J.L. 1996. Three member of a novel small gene family from *Arabidopsis thaliana* able to complement functionally an *Escherichia coli* mutant defective in PAPS reductase activity encode proteins with a thioredoxin like domain and APS reductase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:13377-13382.

Heiss, S., Schafer, J.H., Hagg-Kerwer, A.,and Rausch, T.1999.Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L. : cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. Plant Mol. Biol. 39 (4):847-857.

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

Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T., a nd 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.

Jenni, B.E., Brunold, Chr., Zryd, J.P., and Lavanchy, P. 1980. Properties and regulation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase from suspension cultures of *Nicotiana sylvestris*. Planta. 150:140-143.

Kanno, N., Nagahisa, E., Sato, M., and Sato, Y.1993.Nonradioactive assay for adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. Biochem. Mol. Biol. Int. 29 (1):47-55.

KimuraT., Takeda, S., Kyozuka, J., Asahi, T., Shimamoto, K., and Kakamura, 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 β-glucuronidase (GUS) into mitochondria of tobacco, rice and yeast cells. Plant Cell Physio. 34(2):345-355.

Koncz, C., Chua, N-H., and Schell, J.1993. Methods in *Arabidopsis* Research.Singapore :Continental Press.pp: 224-225.

Kopriva, S., and others. 1 999. Light regulation of assimilatory sulfate reduction in *Arabidopsis thaliana*. The Plant J. 20(1):37-44.

Koprivova, S., Suter, M., Camp, R.O., Brunold, C., and Kopriva, S. 2000. Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. Plant Physilo. 122:737-746.

Lee, S., and Leustek, T. 1999. The affect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. Plant Sci. 141:201-207.

Murashige, T., and Shoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473.

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. Anal. Biochem. 264:98-110.

Rotte, C., and Leustek, T. 2000. Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of *Arabidopsis* leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. Plant Physiol. 124:715-724.

Saito, K., Takahashi, H., Noji, M., Inoue, K., and Hatzfeld, Y. 2000. Molecular regulation of sulfur assimilation and cysteine synthesis. Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. 59-72.

Schmidt, A. 1975. A sulfotransferase from spinach leaves using adenosine-5'-phospho sulfate. Planta (Berl). 124:267-275.

Schmidt, A. 1976. The adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase from spinach (*Spinacea oleracea* L.) stabilization, partial purification, and properties. Planta (Berl). 130:257-263.

Schmidt, A., and Jager, K. 1992. Open question about sulfur metabolism in plant. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:325-349.

Setya, A., Murillo, M., and Leustek, T. 1996. Sulfate reduction in higher plants: molecular evidence of a novel 5'-adenylylphosphosulfate reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:13383-13388.

Suter, M., and others.2000.Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. J. Biol. Chem. 275(2) : 930-936.

Takahashi, H., Yamazaki, M., Sasakura, N., Watanabe, A., Leustek, T., Engler, J.A., Engler, G., Momtagu, M.V., and Saito, K.1997. Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 11102-11107.

Walden, R., Reiss, B., Koncz, C., and Schell, J.1997. The impact of Ti-plasmid-derived gene vectors on the study of the mechanism of action of phytohormones. Annu. Rev. Phytopathol. 35:45-66.

Yamaguchi, Y., Nakamura, T., Harada, E., Koizumi, N., and Sano, H. 1999. Differential accumulation of transcripts encoding sulfur assimilation enzymes upon sulfur and/or nitrogen deprivation in *Arabidopsis thaliana*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(4) : 762-766.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YEP

| | | |
|---|---|---|
| แบคโต-เปปโตน | 10 | กรัม |
| สารสกัดจากยีสต์ | 10 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 5 | กรัม |
| วุ้นผง (สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง) | 15 | กรัม |

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

2. อาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

ธาตุอาหารหลัก :

| | | |
|---|---|---|
| แอมโมเนียมไนเตรท | 0.825 | กรัม |
| โปแตสเซียมไนเตรท | 0.950 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท | 0.185 | กรัม |
| แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท | 0.220 | กรัม |
| โปแตสเซียมฟอสเฟส | 0.085 | กรัม |
| ไอออน II ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท | 0.0139 | กรัม |

ธาตุอาหารรอง :

| | | |
|---|---|---|
| โซเดียมอีดีทีเอ | 18.65 | มิลลิกรัม |
| แมงกานีสซัลเฟตเพนตะไฮเดรท | 11.15 | มิลลิกรัม |
| ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท | 4.3 | มิลลิกรัม |
| โซเดียมโมลิบเดท | 0.125 | มิลลิกรัม |
| กรดบอริก | 3.1 | มิลลิกรัม |
| โพแทสเซียมไอโอไดด์ | 0.415 | มิลลิกรัม |
| โคบอลท์คลอไรด์เฮกสะไฮเดรท | 0.0125 | มิลลิกรัม |
| คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท | 0.0125 | มิลลิกรัม |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องค์ประกอบวิตามิน :

| | | |
|---|---|---|
| อินโนซิทอล | 100 | มิลลิกรัม |
| ไกลซีน | 2.0 | มิลลิกรัม |
| ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์ | 0.5 | มิลลิกรัม |
| กรดนิโคตินิก | 0.5 | มิลลิกรัม |
| ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ | 0.4 | มิลลิกรัม |
| น้ำตาลซูโครส | 30 | กรัม |
| วุ้นผง (ไฟตาเจล : Sigma., USA) | 3.5 | กรัม |

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

3. อาหาร MMS (Murashige and Skoog, 1962)

ธาตุอาหารหลัก :

| | | |
|---|---|---|
| แอมโมเนียมไนเตรท | 0.825 | กรัม |
| โปแตสเซียมไนเตรท | 0.950 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท | 0.185 | กรัม |
| แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท | 0.220 | กรัม |
| โปแตสเซียมฟอสเฟส | 0.085 | กรัม |
| ไอออน II ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท | 0.0139 | กรัม |

ธาตุอาหารรอง :

| | | |
|---|---|---|
| โซเดียมอีดีทีเอ | 18.65 | มิลลิกรัม |
| แมงกานีสซัลเฟตเพนตะไฮเดรท | 11.15 | มิลลิกรัม |
| ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท | 4.3 | มิลลิกรัม |
| โซเดียมโมลิบเดท | 0.125 | มิลลิกรัม |
| กรดบอริก | 3.1 | มิลลิกรัม |
| โพแทสเซียมไอโอไดด์ | 0.415 | มิลลิกรัม |
| โคบอลท์คลอไรด์เฮกสะไฮเดรท | 0.0125 | มิลลิกรัม |
| คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท | 0.0125 | มิลลิกรัม |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องค์ประกอบวิตามิน :

| | | |
|---|---|---|
| อินโนซิทอล | 100 | มิลลิกรัม |
| กรดนิโคตินิก | 0.5 | มิลลิกรัม |
| ไธอะมิลไฮโดรคลอไรด์ | 0.4 | มิลลิกรัม |
| กรดโฟลิก | 5.0 | มิลลิกรัม |
| น้ำตาลซูโครส | 30 | กรัม |
| วุ้นผง (ไฟตาเจล : Sigma., USA) | 3.5 | กรัม |

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ข

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

2. สารละลายอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
   ละลาย3',5'-ไดเมธอกซี-4'-ไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน 250 มิลลิกรัมในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3. สารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
   ละลายเซฟโฟแทคซีม (ในรูปเกลือโซเดียม) 250 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

4. สารละลายไธเดียซูรอนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
   ละลายไธเดียซูรอน 22 มิลลิกรัม ในไดเมธิลฟอร์มามีด 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

5. สารละลายสำหรับสกัดพลาสมิด

   5.1 สารละลาย I

| | ความเข้มข้นสุดท้าย | |
|---|---|---|
| สารละลายกลูโคส | 50 | มิลลิโมลาร์ |
| สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8 | 5 | มิลลิโมลาร์ |
| สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดด่าง 8 | 10 | มิลลิโมลาร์ |

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

   5.2 สารละลาย II

| | | |
|---|---|---|
| สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มอล | 0.2 | มิลลิลิตร |
| สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) | 1.0 | มิลลิลิตร |

| | | |
|---|---|---|
| น้ำกลั่น | 8.8 | มิลลิลิตร |

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

5.3 สารละลาย III

| | | |
|---|---|---|
| สารละลายโปแตสเซียมอะซิเตตเข้มข้น 5 โมลาร์ | 50 | มิลลิลิตร |
| กรดอะซิติกเข้มข้น | 11.5 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 28.5 | มิลลิลิตร |

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

6. สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม

นำฟีนอลที่ผ่านการทำให้สมดุล (equilibrate) ด้วยทริส-เบส ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 ซึ่งเติมไฮดรอกซีควิโนลีน (8-Hydroxyquinoline) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมตร) มาผสมกับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลอัลกอออลล์ ในอัตราส่วน 25:24:1

7. สารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0

| | ความเข้มข้นสุดท้าย | |
|---|---|---|
| สารละลายทริส-เบส | 10 | มิลลิโมลาร์ |
| สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 | 1 | มิลลิโมลาร์ |

ผสมองค์ประกอบทั้งสองเข้าด้วยกัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ /ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นจากผักบุ้ง ; สารละลายเอกแทรกชั่นบัฟเฟอร์

| | ความเข้มข้นสุดท้าย | |
|---|---|---|
| สารละลายทริสคลอไรด์บัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 | 200 | มิลลิโมลาร์ |
| สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 | 25 | มิลลิโมลาร์ |

เอสดีเอส 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่าง 7.2

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันโดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. สารละลายดีเนเจอร์บัฟเฟอร์

| | | |
|---|---|---|
| โซเดียมคลอไรด์ | 87.66 | กรัม |
| โซเดียมไฮดรอกไซด์ | 20 | กรัม |

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

10. สารละลายนิวทรอลไลส์เซชั่น

| | | |
|---|---|---|
| ทริสเบส | 60.57 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 175.32 | กรัม |

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

11. สารละลาย 20X SSC

| | | |
|---|---|---|
| โซเดียมคลอไรด์ | 175.32 | กรัม |
| ไตรโซเดียมซิเตรทไดไฮเดรต | 88.22 | กรัม |

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. สารละลายวอชชิ่งบัฟเฟอร์

| | | |
|---|---|---|
| 20X SSC | 10 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 89 | มิลลิลิตร |
| สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/ปริมาตร) | 1 | มิลลิลิตร |

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเรียงตามลำดับ เพื่อป้องกันการตกตะกอนของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และเตรียมทันทีก่อนนำไปใช้

13. สารละลายมาลิอิคบัฟเฟอร์

| | | |
|---|---|---|
| กรดมาลิอิค | 11.61 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 8.77 | กรัม |

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.5 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรโดยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็น

เวลา 15 นาที

14. สารละลายบล็อกกิ้ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

| | | |
|---|---|---|
| 10X สารละลายบล็อกกิ้ง | 10 | มิลลิลิตร |
| สารละลายมาลิอิคบัฟเฟอร์ | 90 | มิลลิลิตร |

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันโดยวิธีปราศจากเชื้อ และเตรียมทันทีก่อนนำไปใช้

15. สารละลายแอนติบอดี้

| | | |
|---|---|---|
| สารละลาย Anti-Digoxigenin-AP | 4 | ไมโครลิตร |
| สารละลายบล็อกกิ้ง | 20 | มิลลิลิตร |

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันโดยวิธีปราศจากเชื้อ และเตรียมทันทีก่อนนำไปใช้

16. สารละลายดีเทคชั่นบัฟเฟอร์

| | | |
|---|---|---|
| ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ | 12.11 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 5.84 | กรัม |

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 9.5ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

17. สารละลายคัลเลอร์สับสเตรท

| | | |
|---|---|---|
| NBT/BCIP | 200 | ไมโครลิตร |
| สารรละลายดีเทคชั่นบัฟเฟอร์ | 10 | มิลลิลิตร |

ผสมองค์ประกอบเข้าด้วยกันโดยวิธีปราศจากเชื้อ และเก็บไว้ในที่มืด ควรเตรียมทันทีก่อนนำไปใช้

18. สารละลายเอกแทรคชั่นบัฟเฟอร์ (สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีน)

| | ความเข้มข้นสุดท้าย | |
|---|---|---|
| สารละลายกรดไฮโดรคลอริก | 0.1 | นอร์มอล |
| สารละลายอีดีทีเอค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 | 1 | มิลลิโมลาร์ |

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

19. สารละลายไดไธโอทรีอิทอล

| | | |
|---|---|---|
| ไดไธโอทรีอิทอล | 3.09 | กรัม |
| สารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.2 | 20 | มิลลิลิตร |

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

20. สารละลายเอ็น-ไซโคลเฮกซิล-2-อะมิโนอีเทนซัลโฟนิคแอซิด

ละลายเอ็น-ไซโคลเฮกซิล-2-อะมิโนอีเทนซัลโฟนิคแอซิด 10.365 กรัมในน้ำกลั่นปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 9.3 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

21. สารละลายโมโนโบรโมบิเมน

| | | |
|---|---|---|
| โมโนโบรโมบิเมน | 0.00813 | กรัม |
| อะซิโตไนไทร์ล | 1 | มิลลิลิตร |

ละลายโมโนโบรโมบิเมนในอะซิโตไนไทร์ล เก็บสารละลายไว้ในที่มืด และควรเตรียมทันทีก่อนนำไปใช้

22. สารละลายบัฟเฟอร์ (สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส)

สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 โมลาร์

| | | |
|---|---|---|
| ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 | 250 | มิลลิลิตร |
| สารละลายอีดีทีเอเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 | 10 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย 2-เมอร์แคปโทเอธานอลเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ | 5 | มิลลิลิตร |

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

23. สารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์

ละลายไกลซีน 0.0075 กรัมในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 9.5 และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

24. สารละลายอะดีโนซีน 5'-ฟอสโฟซัลเฟต

ละลายอะดีโนซีน 5'-ฟอสโฟซัลเฟต 0.0427 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ไมโครโมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

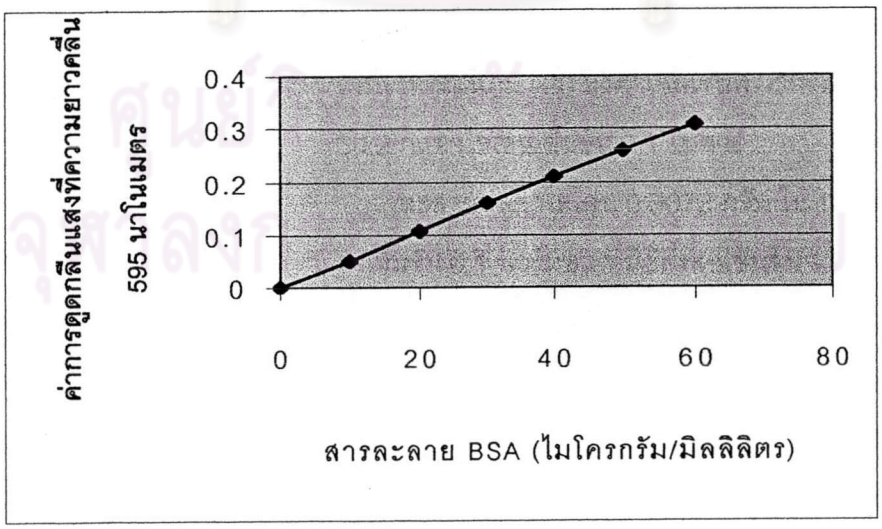
25. สารละลายโซเดียมซัลเฟต

ละลายโซเดียมซัลเฟต 0.0142 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

26. สารละลายแบรดฟอร์ด

| | | |
|---|---|---|
| เอธานอล เข้มข้น 95%(ปริมาตร/ปริมาตร) | 5 | มิลลิลิตร |
| กรดฟอสโฟริกเข้มข้น 85% (ปริมาตร/ปริมาตร) | 10 | มิลลิลิตร |
| สีคูแมสซีบริลเลียนท์บลู | 10 | มิลลิกรัม |

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง




ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

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

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

ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

28. สีติดตาม (tracking dye)

| | | |
|---|---|---|
| กลีเซอรอล | 10 | มิลลิลิตร |
| 2-เมอร์แคปโตเอธานอล | 5 | มิลลิลิตร |
| โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) | 10 | มิลลิลิตร |
| สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 | 12.5 | มิลลิลิตร |
| บรอมฟีนอลบลูเข้มข้น 1%(น้ำหนัก/ปริมาตร) | 0.1 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่นปลอดเชื้อ | 12.5 | มิลลิลิตร |

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส

29. สารละลายมาตรฐานผสมของกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอน

29.1 กรดอะมิโนซีสเตอีนเข้มข้น 0.1 โมลาร์

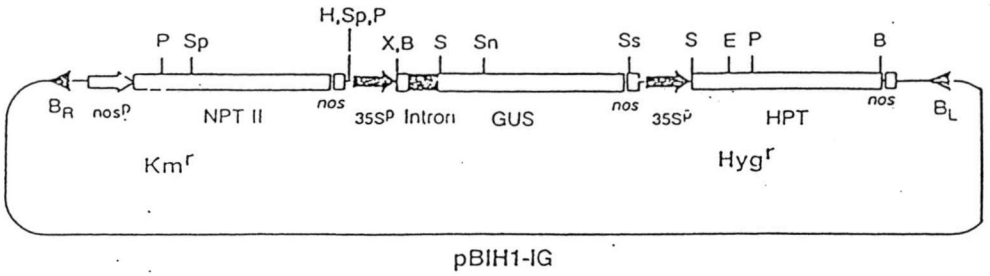
ละลายกรดอะมิโนซีสเตอีน 0.1756 กรัม ใน 10 มิลลิลิตรของสารละลายผสมของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่มีอีดีทีเอเข้มข้น1 มิลลิโมลาร์ (0.1N HCl + 1mM EDTA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

30.2 กลูตาไธโอนเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายกลูตาไธโอน 0.3073 กรัม ใน 10 มิลลิลิตรของสารละลายผสมของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่มีอีดีทีเอเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (0.1N HCl + 1mM EDTA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

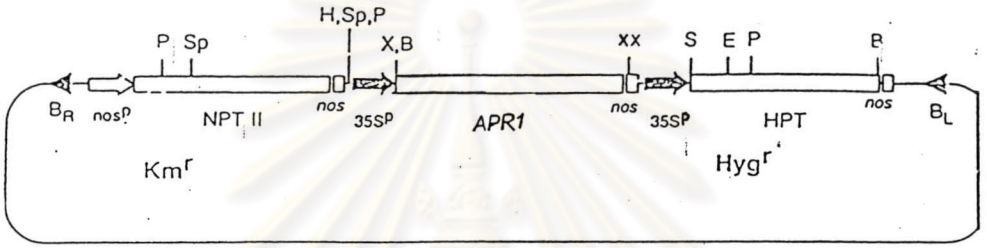
ผสมสารละลายข้อ 31.1 และข้อ 31.2 อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ใน 9 มิลลิลิตรของสารละลายผสมของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่มีอีดีทีเอเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (0.1N HCl + 1mM EDTA) จะได้สารละลายมาตรฐานผสมของกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนเข้มข้นชนิดละ 5 มิลลิโมลาร์

# ภาคผนวก ค




pBIH1-IG

ค.1




pBIH1-IG(SX)

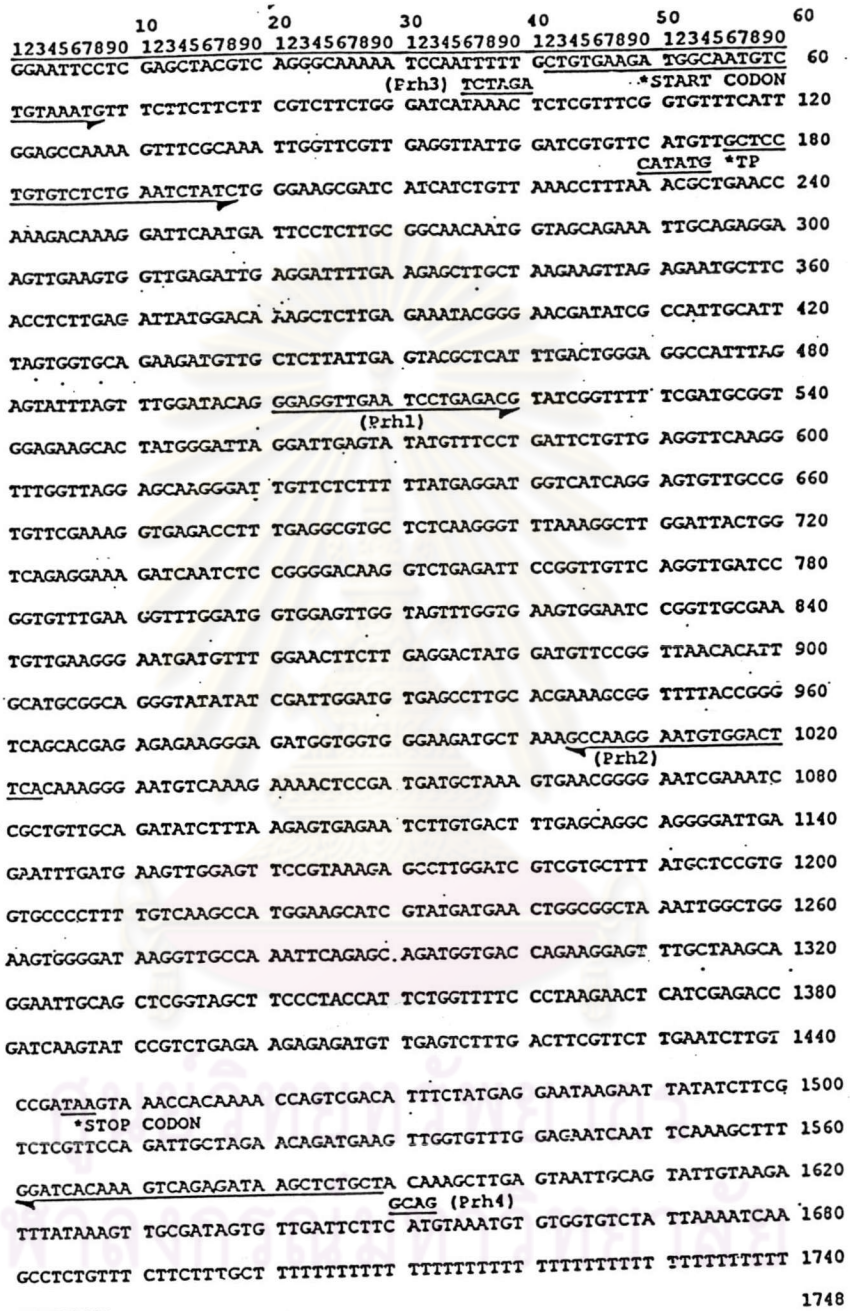
ค.2

ภาพที่ ค.1 แผนที่เรสทริกชั่นของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG ขนาด 17 กิโลเบส แสดงตำแหน่งยีน *gus* ยีนต้านสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (ยีน *npt*II) ยีนต้านสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (ยีน *hpt*) และตำแหน่งจดจำของเรสทริกชั่นเอนไซม์ (Kimura และคณะ, 1993)

ภาพที่ ค.2 พลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) เป็นพลาสมิดดัดแปลงจากพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG โดยเปลี่ยนลำดับเบสด้านปลาย 3' บริเวณช่วงท้าย (downsteam) ของยีน *gus* ซึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sac*I เป็นตำแหน่งจดจำของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xho*I นำพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) มาตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xba*I และ *Xho*I จะทำให้พลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) ปราศจากยีน *gus* และแทนที่ด้วยยีน *APR1* พลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) นี้มีขนาด 15 กิโลเบส และพลาสมิด pBIH1-IG(SX) เป็นพลาสมิดที่ต้องอยู่ร่วมกับพลาสมิด pEHA101 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน *vir* ใน *A. tumefaciens* EHA101 จึงจะสามารถถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA ให้แก่โครโมโซมพืชได้ พลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งใน *E. coli* และ *A. tumefaciens* EHA101

อักษรที่ใช้: P, *Pst*I; Sp, *Spn*I; H, *Hind*III; X, *Xba*I; B, *Bam*HI; S, *Sal*I; Sn, *Sna*BI; Ss, *Sac*I; E, *Eco*RI; XX, *Xho*I

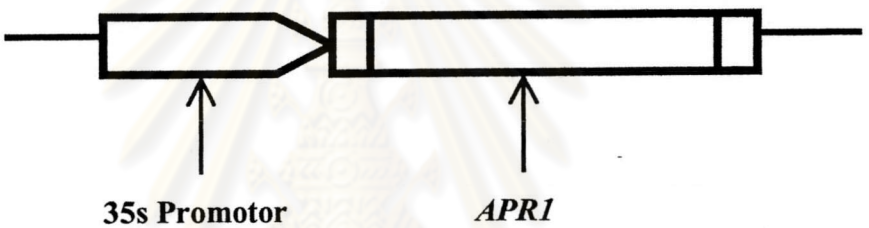
# ภาคผนวก ง




ภาพที่ ง.1 แสดงตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่บนลำดับเบสของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *prh19*) ของ *A. thaliana* (สินีนาฏ สายบาง, 2543)

- ATG start codon หมายถึง จุดเริ่มต้นของการถอดรหัสโปรตีน
- TAA stop codon หมายถึง จุดสิ้นสุดของการถอดรหัสโปรตีน
- GCT TP หมายถึง จุดตัดของสายเปปไทด์ขนส่ง (transit peptide cleavage site)
- TCTAGA หมายถึง บริเวณจดจำของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xba*I
- CATATG หมายถึง บริเวณจดจำของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Nde*I
- CTCGAG หมายถึง บริเวณจดจำของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xho*I

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ CaMV จะเกาะบริเวณยีนส่วนโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s ตำแหน่งเบสลำดับที่ 699-719ดังแสดงในภาพที่ ง.3 ซึ่งเชื่อมต่อกับยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส โดยอยู่ที่ตำแหน่งหน้ายีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *APR1*) ดังแสดงในภาพที่ ง.2




ภาพที่ ง.2 แสดงบริเวณยีนส่วนโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s ซึ่งเชื่อมต่อกับยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (*APR1*) โดยที่ยีน *APR1* สอดแทรกแทนที่ยีน *gus* บนพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

50 AGATTAGCCT TTTCAATTTC AGAAAGAATG CTAACCCACA GATGGTTAGA

100 GAGGCTTACG CAGCAGGTCT CATCAAGACG ATCTACCCGA GCAATAATCT

150 CCAGGAAATC AAATACCTTC CCAAGAAGGT TAAAGATGCA GTCAAAAGAT

200 TCAGGACTAA CTGCATCAAG AACACAGAGA AAGATATATT TCTCAAGATC

250 AGAAGTACTA TTCCAGTATG GACGATTCAA GGCTTGCTTC ACAAACCAAG

300 GCAAGTAATA GAGATTGGAG TCTCTAAAAA GGTAGTTCCC ACTGAATCAA

350 AGGCCATGGA GTCAAAGATT CAAATAGAGG ACCTAACAGA ACTCGCCGTA

400 AAGACTGGCG AACAGTTCAT ACAGAGTCTC TTACGACTCA ATGACAAGAA

450 GAAAATCTTC GTCAACATGG TGGAGCACGA CACACTTGTC TACTCCAAAA

500 ATATCAAAGA TACAGTCTCA GAAGACCAAA GGGCAATTGA GACTTTTCAA

550 CAAAGGGTAA TATCCGGAAA CCTCCTCGGA TTCCATTGCC CAGCTATCTG

600 TCACTTTATT GTGAAGATAG TGGAAAAGGA AGGTGGCTCC TACAAATGCC

650 ATCATTGCGA TAAAGGAAAG GCCATCGTTG AAGATGCCTC TGCCGACAGT

700 GGTCCCAAAG ATGGACCCCC ACCCACGAGG AGCATCGTGG AAAAAGAAGA

750 **CGTTCCAACC ACGTCTTC**AA AGCAAGTGGA TTGATGTGAT ATCTCCACTG

(CaMV)

800 ACGTAAGGGA TGACGCACAA TCCCACTATC CTTCGCAAGA CCCTTCTCTT

835 ATATAAGGAA GTTCATTTCA TTTGGAGAGA ACACG

ภาพที่ ง.3 แสดงตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ CaMV บนลำดับเบสของยีนโปรโมเตอร์ชนิด Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35s

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก จ

การหาปริมาณการติดฉลากของดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) โดยใช้สารปลอดรังสีชุด DIG High Prime

1. นำ DIG-labeled control DNA (vial 2) และดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากแล้วมาเจือจางด้วยสารละลายดีเอ็นเอไดลูชั่นบัฟเฟอร์ (DNA dilution buffer; vial 3) ดังแสดงในตารางที่ จ.1

ตารางที่ จ.1 การเจือจางดีเอ็นเอติดตาม

| หลอด | ดีเอ็นเอ (ไมโครลิตร) | จากหลอดที่ | สารละลายดีเอ็นเอไดลูชั่นบัฟเฟอร์ (vial 3) | ระดับความเจือจาง | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | original | | | 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร |
| 2 | 2 | 1 | 198 | 1:100 | 10 พิโคกรัม/ไมโครลิตร |
| 3 | 15 | 2 | 35 | 1:3.3 | 3 พิโคกรัม/ไมโครลิตร |
| 4 | 5 | 2 | 45 | 1:10 | 1 พิโคกรัม/ไมโครลิตร |
| 5 | 5 | 3 | 45 | 1:10 | 0.3 พิโคกรัม/ไมโครลิตร |
| 6 | 5 | 4 | 45 | 1:10 | 0.1 พิโคกรัม/ไมโครลิตร |
| 7 | 5 | 5 | 45 | 1:10 | 0.03 พิโคกรัม/ไมโครลิตร |
| 8 | 5 | 6 | 45 | 1:10 | 0.01 พิโคกรัม/ไมโครลิตร |
| 9 | 0 | - | 50 | - | 0 |

2. หยดสารละลายดีเอ็นเอติดตามที่เจือจางแล้วลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน

3. ตรึงดีเอ็นเอติดตามด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หรืออบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที

4. แช่แผ่นไนลอนเมมเบรนในสารละลายมาลิอิคบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 13) 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส 2 นาที

5. เทสารละลายมาลิอิคบัฟเฟอร์ทิ้ง เติมสารละลายบล็อกกิ้ง (ภาคผนวก ข ข้อ 14) 10 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 30 นาที

6. เทสารละลายบล็อกกิ้งทิ้ง เติมสารละลายแอนติบอดี้ (ภาคผนวก ข ข้อ 15) 10 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 30 นาที

7. เทสารละลายแอนติบอดี้ทิ้ง ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลายวอชชิ้งบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 11) 10 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง

8. เทสารละลายวอชชิ้งบัฟเฟอร์ทิ้ง เติมสารละลายดีเทคชั่นบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 16) 10 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 5 นาที

9. แช่แผ่นไนลอนเมมเบรนในสารละลายคัลเลอร์สับสเตรท (ภาคผนวก ข ข้อ 17) 2 มิลลิลิตร ในที่มืด ห้ามเขย่า จนปรากฏสี

10. หยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที

11. เปรียบเทียบความเข้มของสีที่ได้ จากดีเอ็นเอติดตามและจาก DIG-labeled control DNA เช่น ความเข้มของสีที่เกิดจากดีเอ็นเอติดตามหลอดที่ 6 (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 พิโคกรัม/ไมโครลิตร) เท่ากับ DIG-labeled control DNA หลอดที่ 2 (ความเข้มข้นสุดท้าย 10 พิโคกรัม/ไมโครลิตร) หรือดีเอ็นเอติดตามที่เจือจาง 10,000 เท่า (จาก 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร มาเป็น 0.1 พิโคกรัม/ไมโครลิตร) มีความเข้มข้นเท่ากับ DIG-labeled control DNA 10 พิโคกรัม/ไมโครลิตร นั่นคือดีเอ็นเอติดตามมีความเข้มข้น 10,000 X 10 พิโคกรัม/ไมโครลิตร หรือ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ฉ

1. ตัวอย่างการคำนวณปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีน(รากของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2)

นำพื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างไปเทียบหาปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอน และพื้นที่ใต้กราฟ (ภาพที่ ฉ.1) ได้ปริมาณของกรดอะมิโนซีสเตอีนเท่ากับ 27.08 ไมโครโมลาร์

ใน reaction mixture 20 ไมโครลิตร มีกรดอะมิโนซีสเตอีน = 27.08 ไมโครโมลาร์

ใน reaction mixture 1,140 ไมโครลิตร มีกรดอะมิโนซีสเตอีน = $\frac{27.08 \times 1,140}{20}$

= 1,543.79 ไมโครโมลาร์

ในน้ำสกัดจากราก 200 ไมโครลิตร มีกรดอะมิโนซีสเตอีน = 1,543.79 ไมโครโมลาร์

ในน้ำสกัดจากราก 600 ไมโครลิตร มีกรดอะมิโนซีสเตอีน = $\frac{1,543.79 \times 600}{200}$

= 4,631.37 ไมโครโมลาร์

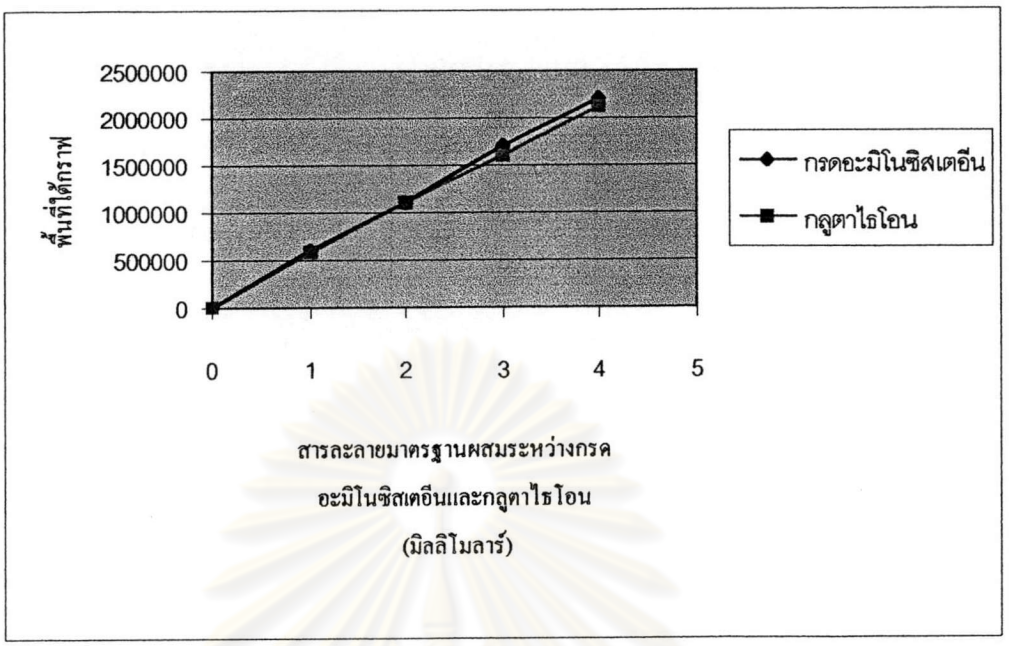
น้ำหนักแห้งของราก 0.0143 กรัม มีกรดอะมิโนซีสเตอีน = 4,631.37 ไมโครโมลาร์

น้ำหนักแห้งของราก 0.0010 กรัม มีกรดอะมิโนซีสเตอีน = $\frac{4,631.37 \times 0.001}{0.0143}$

= 323.87 ไมโครโมลาร์

*การคำนวณหาปริมาณกลูตาไธโอนก็มีหลักการเช่นเดียวกับกรดอะมิโนซีสเตอีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




ภาพที่ ฉ.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอน และพื้นที่ใต้กราฟ

2. ตัวอย่างการคำนวณกิจกรรมจำเพาะของเอพีเอสรีดักเตส (รากของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2)

นิยาม 1 หน่วยเอนไซม์คือ ปริมาณของเอพีเอสรีดักเตสที่ก่อให้เกิด 5'-AMP 1 ไมโครโมลใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 9.5

นำพื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างไปเทียบหาปริมาณ5'-AMPจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะดีโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต และพื้นที่ใต้กราฟ (ภาพที่ ฉ.2) แต่เนื่องจากปริมาณของตัวอย่างที่นำไปฉีดเท่ากับ 40 ไมโครลิตร (พื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 585,867) จึงต้องคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟเมื่อฉีดตัวอย่างเพียง 1 ไมโครลิตร เท่ากับสารละลายมาตรฐาน 5'-AMP พื้นที่ใต้กราฟที่คำนวณได้เมื่อฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร เท่ากับ 14,646.68 ได้ปริมาณของ 5'-AMP เท่ากับ 0.224 มิลลิโมลาร์ หรือ 0.224 X $10^3$ ไมโครโมลาร์ นำค่าที่ได้นี้มาคำนวณตามขั้นตอนดังนี้

ในเวลา 5 นาทีมี 5'-AMP = 0.224 X $10^3$ ไมโครโมลาร์

ในเวลา 1 นาทีมี 5'-AMP = $\frac{0.224 \text{ X } 10^3 \text{ X } 1}{5}$

= 44.8 ไมโครโมลาร์

ใน reaction mixture 1,000 มิลลิลิตรมี 5'-AMP = 44.8ไมโครโมล

ใน reaction mixture 0.6 มิลลิลิตรมี 5'-AMP = 44.8 X 0.6

1,000

= 0.0269 ไมโครโมล

ส่วนน้ำใส 0.34 มิลลิลิตรมี 5'-AMP = 0.0269 ไมโครโมล

ส่วนน้ำใส 1 มิลลิลิตรมี 5'-AMP = 0.0269 X 1

0.34

= 0.0791 ไมโครโมล

เมื่อส่วนน้ำใส (crude enzyme) ทั้งหมดที่สกัดได้เท่ากับ 20 มิลลิลิตร

กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด = 0.0791 X 20

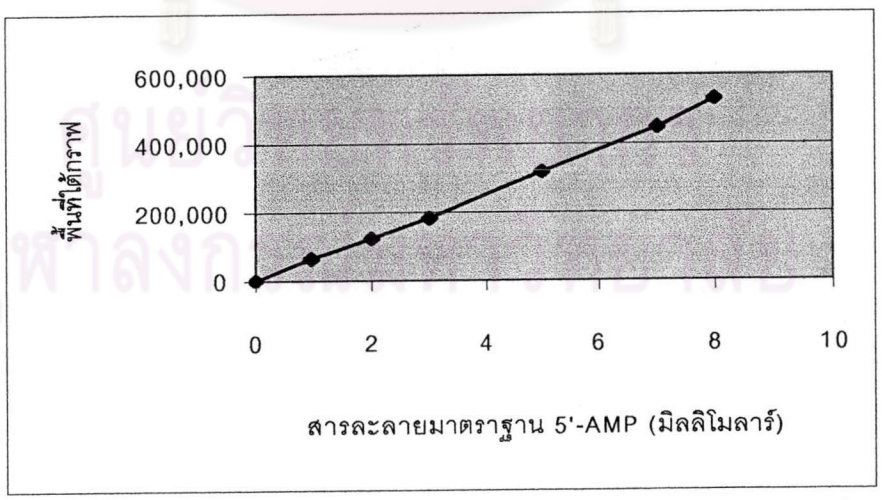
= 1.582 หน่วยเอนไซม์

ปริมาณโปรตีนทั้งหมด = 2.14 มิลลิกรัม

ดังนั้นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ = 1.582

2.14

=0.739หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน




ภาพที่ฉ.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะดีโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (5'-AMP) และพื้นที่ใต้กราฟ

# ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายนิรุตติ์ สกุลคู เกิดวันที่ 6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2519 จ.หนองคาย สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ในปีการศึกษา 2542

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย