ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย

LB broth **ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C และปราศจากเชื้อ**

- Tryptone 5 กรัม
- Yeast extract 2.5 กรัม
- NaCl 2.5 กรัม
- Distilled water 500 มิลลิลิตร

แล้วนำไป autoclave

LB agar **ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C และปราศจากเชื้อ**

- Tryptone 1 กรัม
- Yeast extract 0.5 กรัม
- NaCl 0.5 กรัม
- Agar 1.5 กรัม
- Distilled water 100 มิลลิลิตร

แล้วนำไป autoclave รอให้อุ่น จากนั้นเติมยาปฏิชีวนะ (ถ้ามี) ในอัตราส่วนที่ต้องการ แล้วเทใส่จากเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อให้วุ้นแข็งตัว

สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

SOC media **ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C**

- Tryptone 2 กรัม
- Yeast extract 0.5 กรัม
- NaCl 1 กรัม
- KCl 0.75 กรัม
- Distilled water 100 มิลลิลิตร

แล้วนำไป autoclave

สารเคมีที่ใช้ในการทำ Western blot

RIPA buffer **ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C และห้ามโดนแสง**

— 1 M Tris-HCl (pH 8.8)	25	มิลลิลิตร
— 1 M NaCl	75	มิลลิลิตร
— 100% Nonidet-P40	5	มิลลิลิตร
— 10% Sodium Deoxycholate	25	มิลลิลิตร
— 10% SDS	5	มิลลิลิตร
— Distilled water	365	มิลลิลิตร

1 M Tris-HCl buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

— Tris base	12.11	กรัม

ละลายใน Distilled water ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ด้วย HCl ให้ได้ค่าที่ต้องการ เสร็จแล้วปรับปริมาตรด้วย Distilled water ให้ครบ 100 มิลลิลิตร

Separating gel 12% **ปริมาตร 10 มิลลิลิตร**

— 1 M Tris–HCl buffer (pH 8.8)	2.5	มิลลิลิตร
— 10% SDS	100	ไมโครลิตร
— 40% Bis/Acrylamide	3	มิลลิลิตร
— Distilled water	4.4	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติม

— 10% APS	100	ไมโครลิตร
— Temed	10	ไมโครลิตร

Stacking gel 4% **ปริมาตร 5 มิลลิลิตร**

— 1 M Tris–HCl buffer (pH 6.8)	500	ไมโครลิตร
— 10% SDS	50	ไมโครลิตร
— 40% Bis/Acrylamide	500	ไมโครลิตร
— Distilled water	3.95	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติม

— 10% APS	50	ไมโครลิตร
— Temed	5	ไมโครลิตร

10X Tris-Glycine buffer **ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง**

- Tris base 30.3 กรัม
- Glycine 187.7 กรัม

ละลายใน Distilled water ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วปรับค่า pH ด้วย HCl ให้เป็น 8.3 จากนั้นปรับปริมาตรด้วย Distilled water ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

1X Running buffer **ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร**

- 10% SDS 10 มิลลิลิตร
- 10X Tris-Glycine buffer 100 มิลลิลิตร
- Distilled water 890 มิลลิลิตร

1X Transfer buffer **ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร**

- 100% Methanol 200 มิลลิลิตร
- 10X Tris-Glycine buffer 100 มิลลิลิตร
- Distilled water 700 มิลลิลิตร

10X TBS (Tris Buffer Saline) **ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง**

- NaCl 40 กรัม
- KCl 1 กรัม
- Tris base 15 กรัม

ละลายใน Distilled water ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วปรับค่า pH ด้วย HCl ให้เป็น 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรด้วย Distilled water ให้ครบ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave

1X TBS-T **ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง**

- 10X TBS 50 มิลลิลิตร
- 100% Tween 20 250 ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วย Distilled water ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

5% Blocking milk **ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

- Non-fat dry milk 2.5 กรัม
- TBS-T 50 มิลลิลิตร

10X PBS (Phosphate Buffer Saline) **ปริมาตร 500 มิลลิลิตร** **เก็บที่อุณหภูมิห้อง**

- NaCl 40 กรัม
- KCl 1 กรัม
- Na_2HPO_4 7.2 กรัม
- KH_2PO_4 1.2 กรัม

ละลายใน Distilled water ปริมาตร 400 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ด้วย HCl ให้เป็น 7.4 เสร็จแล้วปรับปริมาตรด้วย Distilled water ให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไป autoclave

3X Loading buffer **ปริมาตร 10 มิลลิลิตร** **เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C**

- 1 M Tris-HCl (pH 6.8) 2.4 มิลลิลิตร
- 20% SDS 3 มิลลิลิตร
- 100% Glycerol 3 มิลลิลิตร
- β-Mercaptoethanol 1.6 มิลลิลิตร
- Bromphenol Blue 6 มิลลิกรัม

10% SDS **ปริมาตร 200 มิลลิลิตร** **เก็บที่อุณหภูมิห้อง**

- SDS 20 กรัม
- Distilled water 200 มิลลิลิตร

10% Ammoniumpersulphate (APS) **ปริมาตร 10 มิลลิลิตร** **เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C**

- APS 1 กรัม
- Distilled water 10 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT (Enzyme activity)

สารละลายสำหรับเก็บตัวอย่างโปรตีน **ปริมาตร 1 มิลลิลิตร** **เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C**

- 10 mM Pyridoxal phosphate 10 ไมโครลิตร
- 1 M Potassium phosphate buffer (pH 8.0) 100 ไมโครลิตร
- 1 M Sucrose 240 ไมโครลิตร
- Distilled water 650 ไมโครลิตร

1 M Potassium phosphate buffer (pH 8.0) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

— 1 M K_2HPO_4 37.6 มิลลิลิตร

— 1 M KH_2PO_4 2.4 มิลลิลิตร

แล้วปรับค่า pH ด้วย HCl ให้เป็น 8.0

1 M Sucrose ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

— Sucrose 3.42 กรัม

ละลายใน Distilled water ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1 M L-alanine ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

— L-alanine 0.89 กรัม

ละลายใน Distilled water ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

0.1 M Sodium glyoxylate ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

— Sodium glyoxylate 0.057 กรัม

ละลายใน Distilled water ให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

10 M Pyridoxal phosphate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

— Pyridoxal phosphate 0.0247 กรัม

— 1 M HCl 10 มิลลิลิตร

0.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

— Tris base 6.06 กรัม

ละลายใน Distilled water ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ด้วย HCl ให้เป็น 8.0 เสร็จแล้วปรับปริมาตรด้วย Distilled water ให้ครบ 100 มิลลิลิตร

0.25 mM NADH ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C และห้ามโดนแสง

— NADH 0.0045 กรัม

— 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 25 มิลลิลิตร

1 M Potassium phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

— 1 M K_2HPO_4 20 มิลลิลิตร

— 1 M KH_2PO_4 5 มิลลิลิตร

แล้วปรับค่า pH ด้วย HCl ให้เป็น 7.4

1 M K_2HPO_4 **ปริมาตร 500 มิลลิลิตร**

— $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$ 114.1 กรัม

ละลายใน Distilled water ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1 M KH_2PO_4 **ปริมาตร 40 มิลลิลิตร**

— KH_2PO_4 5.44 กรัม

ละลายใน Distilled water ให้ได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

3 M TCA **ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง**

— 6.1 M TCA 49 มิลลิลิตร

— Distilled water 51 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการทำ Immunofluorescence (IF)

0.1% Triton-X **ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง**

— 10% Triton-X 0.5 มิลลิลิตร

— 1X PBS 49.5 มิลลิลิตร

10X PBS **ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง**

— 10X PBS 5 มิลลิลิตร

— Distilled water ที่ autoclaved แล้ว 45 มิลลิลิตร

1% BSA **ปริมาตร 17 มิลลิลิตร (สำหรับ 4 หลุม)**

— 10% BSA 1.7 มิลลิลิตร

— 1X PBS 15.3 มิลลิลิตร

สารละลายสำหรับ Block เซลล์ (5% BSA, 0.1% Triton-X in PBS) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

— 10% BSA 2.5 มิลลิลิตร

— 10% Triton-X 50 ไมโครลิตร

— 1X PBS 2.45 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT จำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 17 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ครั้งที่ 1

ชนิดเซลล์	ชนิดหลอด	ครั้งที่	A1	A2	A1 – A2	ค่าเฉลี่ย A1 – A2	$\Delta A = \Delta A_s - \Delta A_b$	ปริมาณไพรูเวท (µmol/h/mg)
COS7	Blank	1	0.228	0.224	0.004	0.002	0.007	0.13
		2	0.226	0.225	0.001			
		3	0.224	0.222	0.002			
	Sample	1	0.219	0.211	0.008	0.009		
		2	0.223	0.212	0.011			
		3	0.227	0.218	0.009			
Hep-G2	Blank	1	0.221	0.207	0.014	0.010	0.019	0.35
		2	0.220	0.209	0.011			
		3	0.209	0.205	0.004			
	Sample	1	0.229	0.201	0.028	0.029		
		2	0.226	0.201	0.025			
		3	0.225	0.192	0.033			
Empty vector	Blank	1	0.227	0.225	0.002	0.004	0.004	0.07
		2	0.232	0.226	0.006			
		3	0.230	0.227	0.003			
	Sample	1	0.234	0.226	0.008	0.008		
		2	0.226	0.222	0.004			
		3	0.231	0.218	0.013			
Wild type	Blank	1	0.232	0.230	0.002	0.005	0.189	3.51
		2	0.223	0.219	0.004			
		3	0.227	0.218	0.009			
	Sample	1	0.222	0.021	0.201	0.194		
		2	0.223	0.038	0.185			
		3	0.222	0.025	0.197			
Pro11Arg	Blank	1	0.222	0.221	0.001	0.001	0.063	1.17
		2	0.228	0.228	0			
		3	0.223	0.222	0.001			
	Sample	1	0.238	0.167	0.071	0.064		
		2	0.239	0.171	0.068			
		3	0.224	0.170	0.054			

ตารางที่ 18 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ครั้งที่ 2

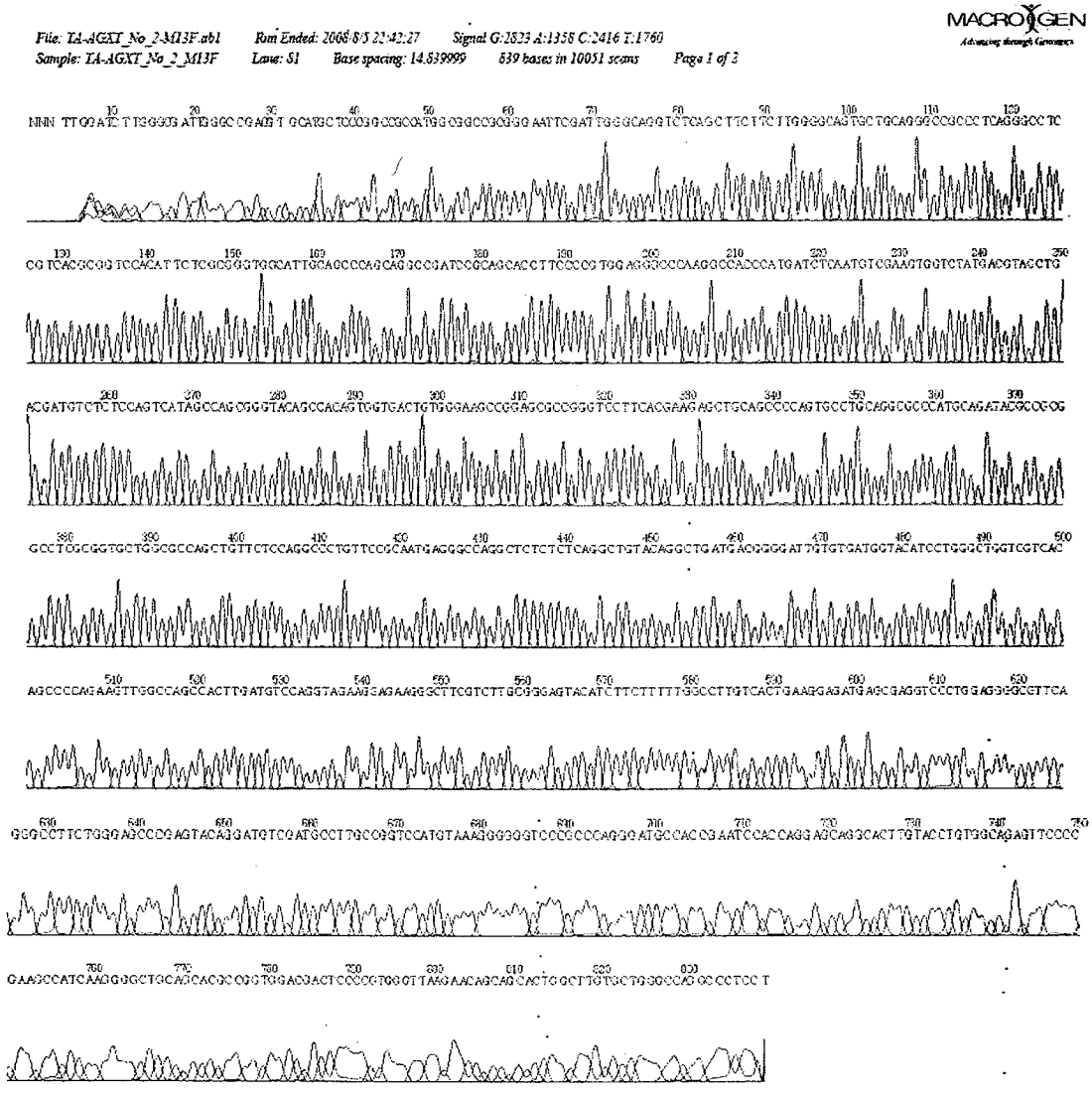
ชนิดเซลล์	ชนิดหลอด	ครั้งที่	A1	A2	A1 – A2	ค่าเฉลี่ย A1 – A2	$\Delta A = \Delta As - \Delta Ab$	ปริมาณไพรูเวท (µmol/h/mg)
COS7	Blank	1	0.232	0.230	0.002	0.001	0.003	0.06
		2	0.230	0.228	0.002			
		3	0.229	0.229	0			
	Sample	1	0.234	0.229	0.005	0.004		
		2	0.226	0.223	0.003			
		3	0.233	0.228	0.005			
Hep-G2	Blank	1	0.234	0.233	0.001	0.003	0.016	0.30
		2	0.234	0.230	0.004			
		3	0.235	0.231	0.004			
	Sample	1	0.231	0.213	0.018	0.019		
		2	0.234	0.211	0.023			
		3	0.228	0.211	0.017			
Empty vector	Blank	1	0.228	0.226	0.002	0.002	0.003	0.06
		2	0.229	0.228	0.001			
		3	0.234	0.230	0.004			
	Sample	1	0.225	0.220	0.005	0.005		
		2	0.225	0.220	0.005			
		3	0.230	0.226	0.004			
Wild type	Blank	1	0.230	0.226	0.004	0.003	0.163	3.03
		2	0.223	0.221	0.002			
		3	0.226	0.222	0.004			
	Sample	1	0.231	0.067	0.164	0.166		
		2	0.236	0.068	0.168			
		3	0.232	0.067	0.165			
Pro11Arg	Blank	1	0.238	0.237	0.001	0.004	0.039	0.72
		2	0.238	0.231	0.007			
		3	0.235	0.230	0.005			
	Sample	1	0.232	0.189	0.043	0.043		
		2	0.235	0.191	0.044			
		3	0.230	0.189	0.041			

ตารางที่ 19 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ครั้งที่ 3

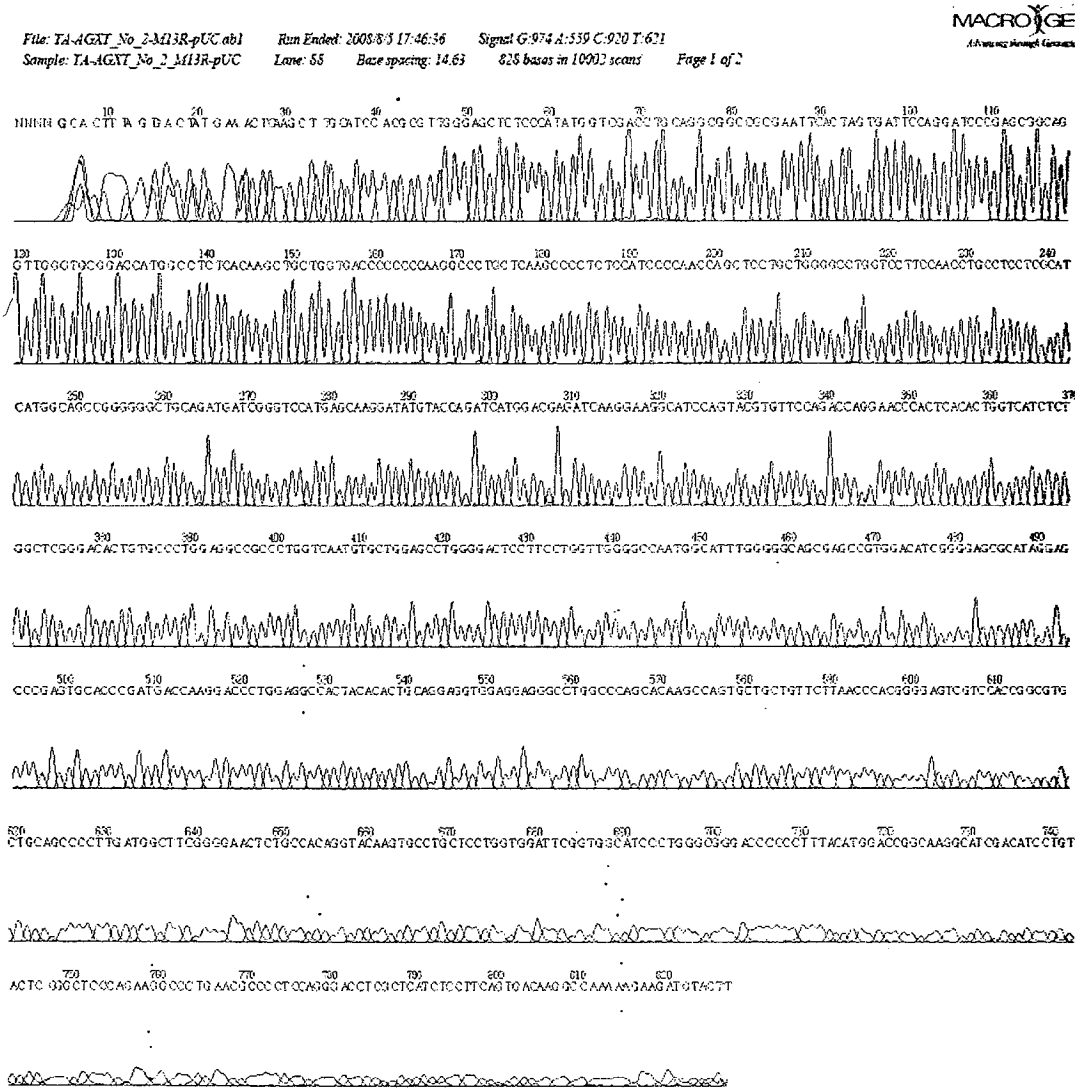
ชนิดเซลล์	ชนิดหลอด	ครั้งที่	A1	A2	A1 – A2	ค่าเฉลี่ย A1 – A2	$\Delta A = \Delta As - \Delta Ab$	ปริมาณไพรูเวท (µmol/h/mg)
COS7	Blank	1	0.264	0.260	0.004	0.004	0.004	0.07
		2	0.261	0.256	0.005			
		3	0.261	0.259	0.002			
	Sample	1	0.260	0.255	0.005	0.008		
		2	0.260	0.248	0.012			
		3	0.261	0.254	0.007			
Hep-G2	Blank	1	0.261	0.260	0.001	0.001	0.016	0.30
		2	0.260	0.259	0.001			
		3	0.261	0.260	0.001			
	Sample	1	0.260	0.239	0.021	0.017		
		2	0.259	0.245	0.014			
		3	0.259	0.243	0.016			
Empty vector	Blank	1	0.262	0.260	0.002	0.002	0.005	0.09
		2	0.265	0.262	0.003			
		3	0.262	0.261	0.001			
	Sample	1	0.262	0.254	0.008	0.007		
		2	0.259	0.252	0.007			
		3	0.259	0.254	0.005			
Wild type	Blank	1	0.259	0.257	0.002	0.003	0.167	3.10
		2	0.261	0.258	0.003			
		3	0.259	0.256	0.003			
	Sample	1	0.259	0.089	0.170	0.170		
		2	0.262	0.090	0.172			
		3	0.257	0.090	0.167			
Pro11Arg	Blank	1	0.260	0.259	0.001	0.001	0.061	1.13
		2	0.257	0.255	0.002			
		3	0.259	0.258	0.001			
	Sample	1	0.256	0.198	0.058	0.062		
		2	0.262	0.196	0.066			
		3	0.262	0.201	0.061			

ภาคผนวก ค

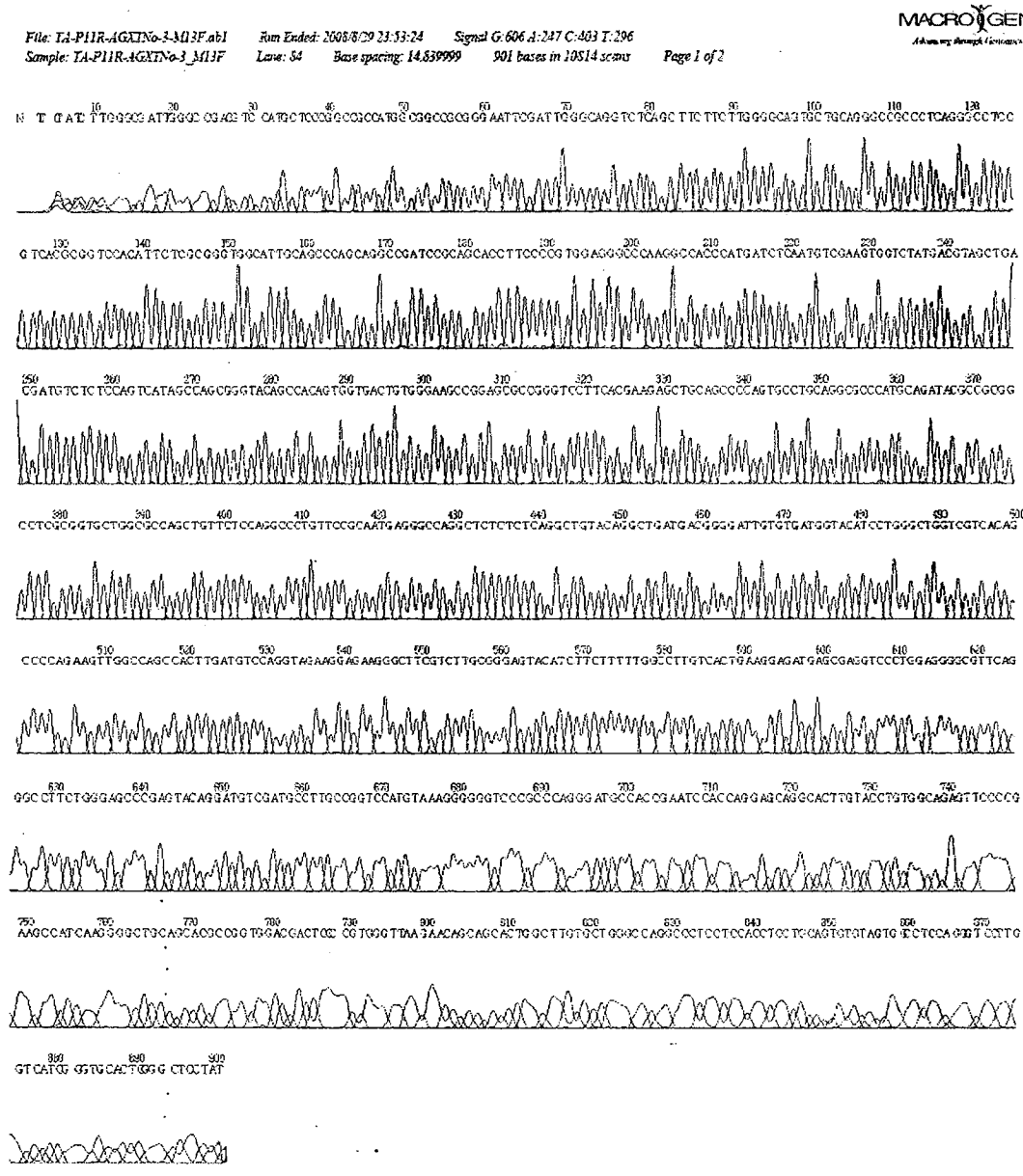
ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนการสังเคราะห์ยีน AGXT ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์



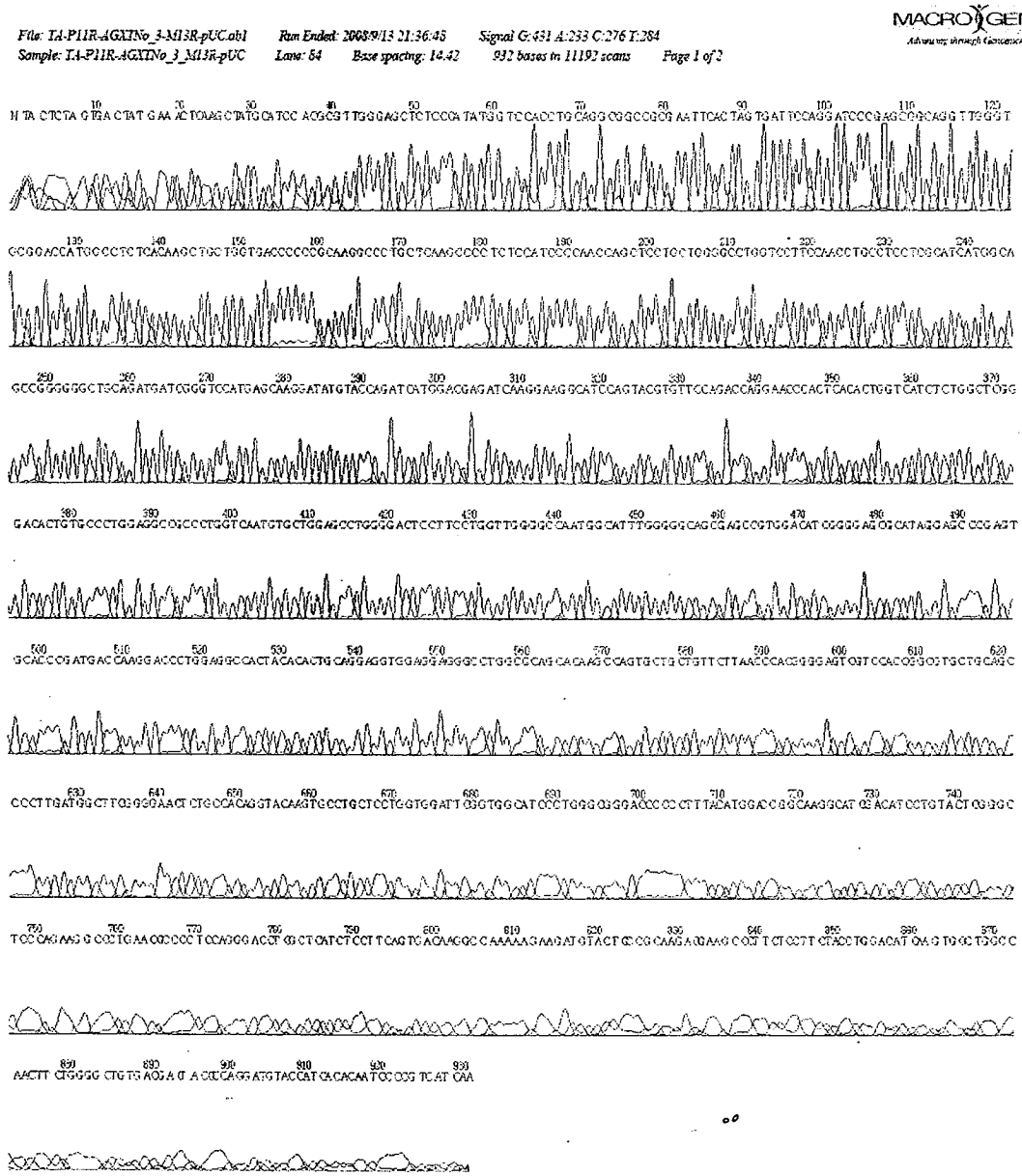
ภาพที่ 28 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ปกติซึ่งเชื่อมกับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 2 โดยใช้ pUC/M13 Forward เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบ



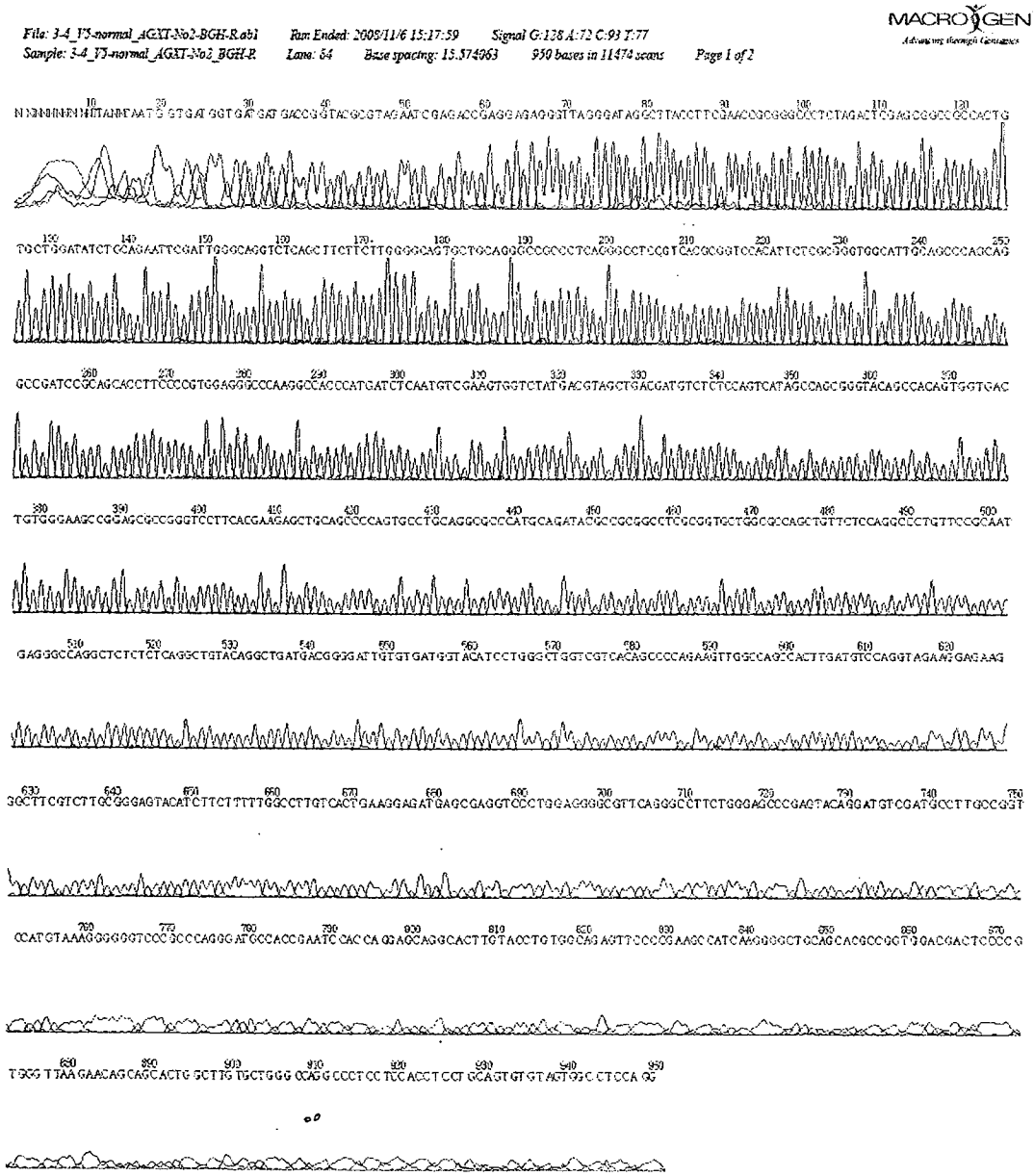
ภาพที่ 29 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ปกติซึ่งเชื่อมกับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 2 โดยใช้ pUC/M13 Reverse เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบ



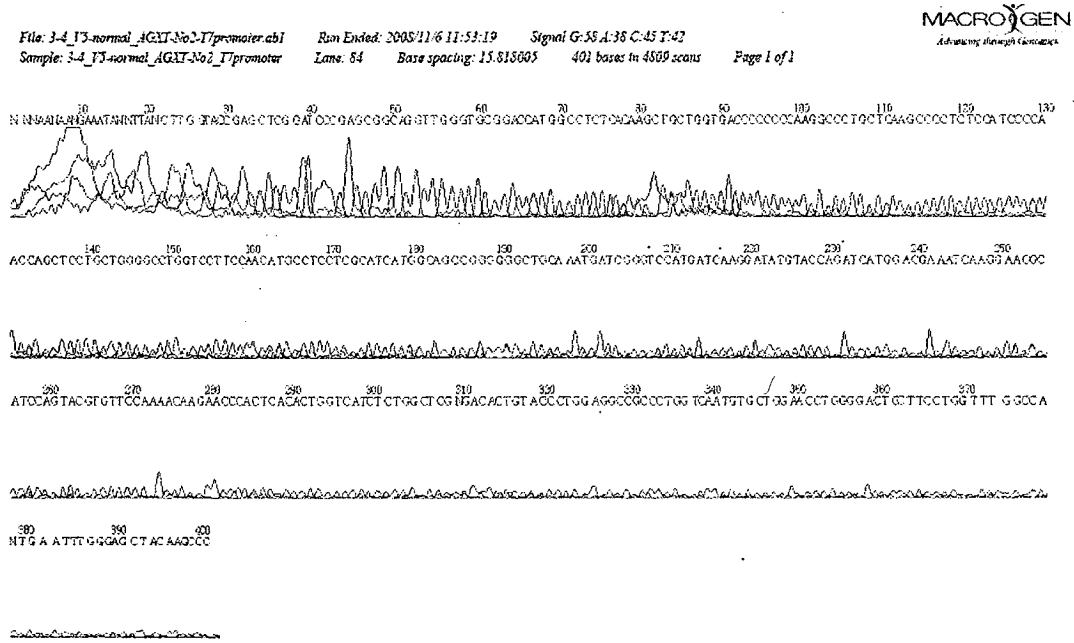
ภาพที่ 30 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมกับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 3 โดยใช้ pUC/M13 Forward เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบ



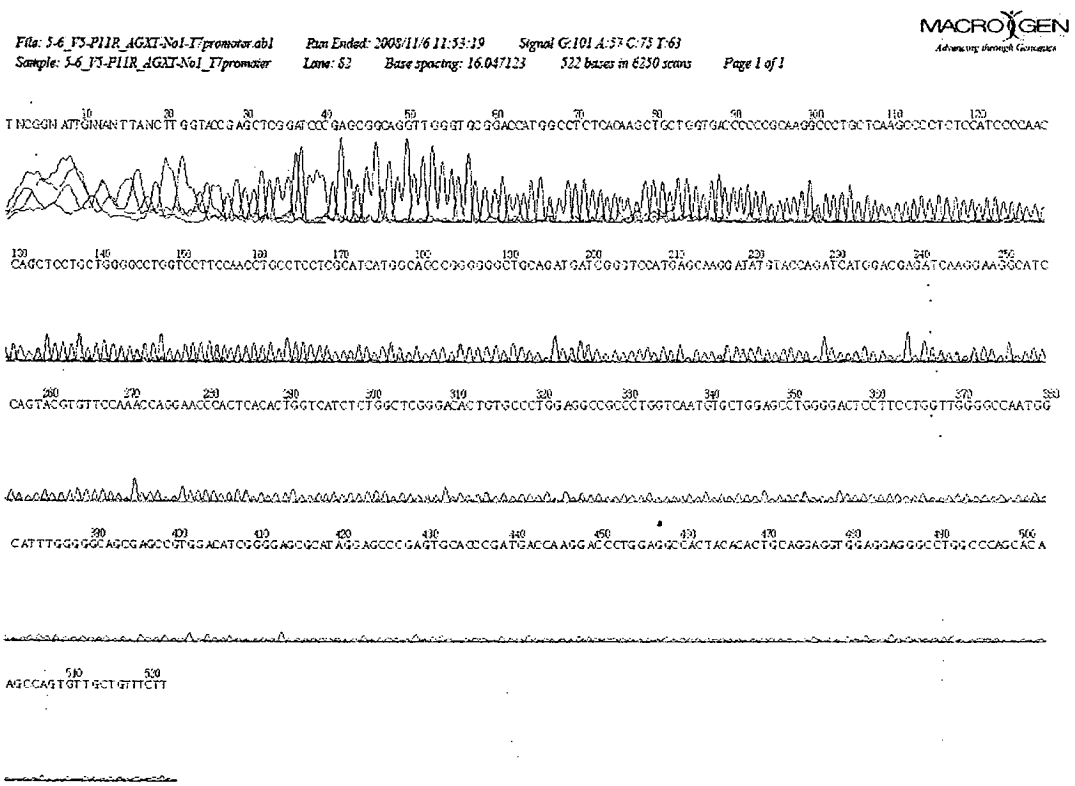
ภาพที่ 31 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมกับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 3 โดยใช้ pUC/M13 Reverse เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบ



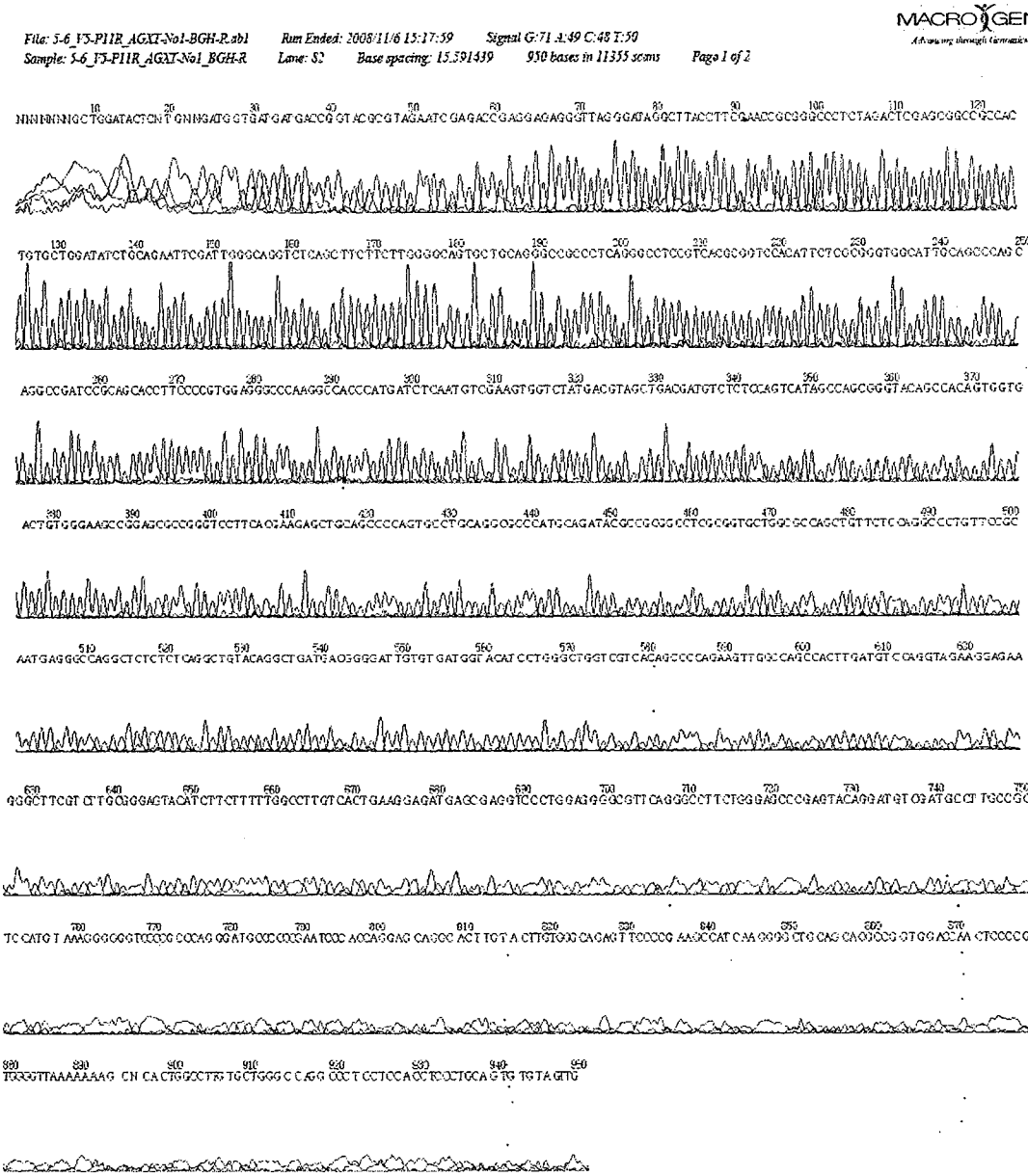
ภาพที่ 32 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ปกติที่เชื่อมอยู่กับ expression vectorของโคโลนีที่ 2 โดยใช้ BGH Reverse เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบ



ภาพที่ 33 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ปกติที่เชื่อมอยู่กับ expression vectorของโคโลนีที่ 2 โดยใช้ T7 Promoter เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบ



ภาพที่ 34 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 1 โดยใช้ T7 Promoter เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบ



ภาพที่ 35 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 1 โดยใช้ BGH Reverse เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบ