

การวิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน AGXT แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg)
ในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค PH1

นายเนลวัฒน์ กิ่งสุวรรณพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

FUNCTIONAL ANALYSIS OF A NOVEL AGXT MUTATION, c.32C>G (p.Pro11Arg),
IN A THAI FAMILY WITH PH1

MR. NELAWAT KINGSUWANNAPONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน AGXT แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg) ในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค PH1
โดย	นายเนลวัฒน์ กิ่งสุวรรณพงษ์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์นัยจิต)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. ทพ.นครินทร์ กิตกำจร)

เนลวิวัฒน์ กิ่งสุวรรณพงษ์ : การวิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน AGXT แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg) ในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค PH1. (Functional analysis of a novel AGXT mutation, c.32C>G (p.Pro11Arg), in a Thai family with PH1) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 93 หน้า.

โรค Primary hyperoxaluria type1 (PH1) เป็นโรคทางพันธุกรรมถูกควบคุมด้วยยีนด้อยบนออโตโซม โดยเกิดจากความผิดปกติของยีน AGXT ซึ่งผลิตเอนไซม์ alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT) ทำหน้าที่สลายไกลออกซิเลท โดยพบมากในเพอร์ออกซิโซมของเซลล์ตับ โรค PH1 เกิดจากการหลั่งออกซาเลทและสะสมในรูปผลึกของแคลเซียมออกซาเลทในไต ต่อมาผู้ป่วยจะสูญเสียการทำงานของไตและเสียชีวิตในที่สุด ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้ตรวจพบผู้ป่วยชาวไทยรายหนึ่งเป็นโรค PH1 ซึ่งมีสาเหตุความผิดปกติแบบดิสชัน และมีมิวเทชันในยีน AGXT โดยพบว่านิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 มีการเปลี่ยนจาก cytosine เป็น guanine (c.32C>G) ส่งผลให้กรดอะมิโนลำดับที่ 11 เปลี่ยนจาก proline เป็น argenine (p.Pro11Arg) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ในกรณีวิจัยนี้ได้วิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg โดยเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีนนี้จากเซลล์ HepG-2 และ transfect เข้าสู่เซลล์ COS7 โดยผลจากการทำ western blot แสดงให้เห็นว่ายีนกลายพันธุ์สามารถผลิตโปรตีนได้ตามปกติ สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวิธี semiautomated spectrophotometric บ่งชี้ว่า เอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีนกลายพันธุ์มีความสามารถในการทำงานลดลงประมาณ 69% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีนปกติ ส่วนการตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ โดยวิธี immunofluorescence พบว่าเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ประมาณ 20% นั้นถูกส่งไปยังออร์แกเนลล์อื่นที่ผิดตำแหน่ง ไม่ได้ถูกส่งไปยังเพอร์ออกซิโซมตามปกติ สรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงชนิด p.Pro11Arg นี้เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ก่อให้เกิดโรค PH1 โดยการลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ และทำให้ตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป

ภาควิชา..... พฤษศาสตร์.....	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา..... พันธุศาสตร์.....	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา..... 2554.....	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072636423 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS : PH1 / NOVEL MUTATION / AGXT / p.Pro11Arg / c.32C>G / AGT

NELAWAT KINGSUWANNAPONG : FUNCTIONAL ANALYSIS OF A NOVEL
AGXT MUTATION, c.32C>G (p.Pro11Arg), IN A THAI FAMILY WITH PH1.

ADVISOR : RACHANEEKORN TAMMACHOTE, Ph.D.,

CO-ADVISOR : PROF. VORASUK SHOTELERSUK, M.D. 93 pp.

Primary hyperoxaluria type1 (PH1) is a lethal autosomal recessive disorder of glyoxylate metabolism caused by deficiency of the liver-specific peroxisomal enzyme alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT). PH1 is presented by excretion of oxalate and accumulation of insoluble calcium oxalate in the kidney and eventually leads to renal failure and death. The Center of Excellence for Medical Genetic, Chulalongkorn University, recently identified a Thai patient with PH1 caused by a deletion and a missense mutation in the *AGXT* gene, c.32C>G (p.Pro11Arg), which is a novel mutation. In this study, we analyzed the effects of this novel *AGXT* mutation. We have cloned the entire coding region of *AGXT* from Hep-G2 cells and transfected into COS7 cells. Western blot analysis of AGT results indicated that the p.Pro11Arg mutation did not affect the level of protein expression. The AGT catalytic activity, measured by semiautomated spectrophotometric assay, indicated that the mutant AGT activity decreased about 69%, compared to that of the wild type. Immunofluorescence microscope was used to analyze the sub-cellular localization of the mutant AGT and demonstrated that about 20% of the enzyme was mis-localized from peroxisomes. In conclusion, the p.Pro11Arg mutation cause pathogenicity by reduced the enzyme activity and mis-localize the ATG enzyme.

Department : Botany Student's Signature

Field of Study : Genetics Advisor's Signature

Academic Year : 2011 Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์ ช่วยตรวจสอบ-แก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้โอกาสได้เข้ามาทำวิจัยในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ รวมทั้งอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นต่าง ๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนกรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์สำหรับการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี ประธานกรรมการ, อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ยิจิต กรรมการภายในสาขาพันธุศาสตร์ และอาจารย์ ดร. ทพ.นครินทร์ กิตกัธร อาจารย์ประจำคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับสูตรคำนวณในการทำงานของเอนไซม์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ.นิพัฏจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่, นิสิตป.โทและป.เอกทุกคนในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณศิริประภา ทองกอบเพชร ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคุณครูกรรณิการ์ คำพุ่ม อดีตหัวหน้ากลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ โรงเรียนพิบูลวิทยาลัย จังหวัดลพบุรี ที่ให้โอกาสในการลาศึกษาต่อในระดับปริญญาโท

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อจรัสพัฒน์ กิ่งสุวรรณพงษ์ และคุณแม่นิรมล พานเทียน ที่สนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท รวมทั้งความรักและกำลังใจที่ยิ่งใหญ่สำหรับการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุน 90 ปี (กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนการศึกษาโครงการ สควค. ระดับปริญญาโท (สสวท.)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
สาเหตุการเกิดโรค PH1.....	7
กลไกการทำงานของเอนไซม์ AGT.....	8
โครงสร้างของเอนไซม์ AGT.....	10
กลไกการส่งเอนไซม์ AGT สู่ตำแหน่งเป้าหมาย.....	11
ตัวอย่างการกลายพันธุ์ที่พบในยีน AGXT.....	12
อุบัติการณ์เกิดโรค PH1.....	14
อาการของผู้ป่วยโรค PH1.....	14
แนวทางการรักษาผู้ป่วยโรค PH1.....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	18
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	20

	หน้า
วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
1. การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพื่อผลิตเอนไซม์ AGT.....	23
1.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	24
1.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	26
1.4 การสังเคราะห์ยีน AGXT ปกติ.....	27
1.5 การสร้างและเพิ่มปริมาณพลาสมิด (pGEM-T vector) สำหรับ mutagenesis.....	30
1.6 การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg.....	34
1.7 การสร้างและเพิ่มปริมาณพลาสมิด (expression vector) สำหรับการทำให้ transfection.....	36
1.8 การถ่าย expression vector เข้าสู่ COS7 cells (Transfection).....	40
1.9 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด.....	42
2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT.....	43
2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT.....	43
2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT.....	44
2.3 การตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์.....	46
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	48
1. การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg	48
1.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน.....	48
1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน.....	50
1.3 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเจล.....	51
1.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector).....	51
1.5 ผลการสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg.....	52
1.6 ผลการสร้างพลาสมิด (expression vector) สำหรับการทำให้ transfection.	53

	หน้า
1.7 ผลการทำ Transfection.....	55
2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT.....	57
2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์.....	57
2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT.....	58
2.3 การตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์.....	64
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	67
สรุปผลการวิจัย.....	67
อภิปรายผลการวิจัย.....	68
ข้อเสนอแนะ.....	70
รายการอ้างอิง.....	72
ภาคผนวก.....	76
ภาคผนวก ก.....	77
ภาคผนวก ข.....	83
ภาคผนวก ค.....	86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	93

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ PCR.....	28
2 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR.....	28
3 สภาวะในการทำ Gradient PCR.....	29
4 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Ligation ระหว่างยีน AGXT กับ pGEM-T vector.....	32
5 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	34
6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ สำหรับทำ mutagenesis.....	35
7 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Mutant Strand Synthesis Reaction.....	35
8 สภาวะในการทำ PCR.....	36
9 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับเตรียมตัดต่อยีน AGXT กับ expression vector.....	38
10 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Ligation ระหว่างยีน AGXT กับ expression vector...	39
11 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	42
12 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนแรกของการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT.....	45
13 ข้อมูลของผลการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT.....	59
14 ค่าทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA.....	61
15 สรุปผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD.....	62
16 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD โดยการเปรียบเทียบทีละคู่.....	63
17 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ครั้งที่ 1.....	83
18 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ครั้งที่ 2.....	84
19 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ครั้งที่ 3.....	85

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการวิจัย.....	6
2 ตำแหน่งของยีน AGXT (ลูกศรชี้) บนโครโมโซมหมายเลข 2.....	8
3 ปฏิกริยาทางเคมีที่ใช้เอนไซม์ AGT เป็นตัวเร่งปฏิกริยา.....	9
4 กลไกการทำงานของเอนไซม์ AGT.....	9
5 กระบวนการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่ผิดปกติซึ่งส่งผลให้เกิดโรค PH1.....	9
6 โครงสร้างของเอนไซม์ AGT.....	11
7 กลไกการส่งเอนไซม์ AGT สู่อำเภอเป้าหมาย.....	11
8 ตำแหน่งในโครงสร้างของเอนไซม์ AGT ที่มักพบการกลายพันธุ์.....	13
9 ภาพการสะสมผลึกแคลเซียมออกซาเลท ในอวัยวะต่าง ๆ ของผู้ป่วยโรค PH1.....	15
10 ลักษณะผลึกแคลเซียมออกซาเลท.....	16
11 โครงสร้างของ pGEM-T vector.....	31
12 โครงสร้างของ pcDNA3.1/V5-HisB ซึ่งในงานวิจัยใช้เป็น expression vector.....	37
13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน.....	49
14 ผลการสังเคราะห์ยีน AGXT จาก cDNA ของเซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2 และเซลล์ COS 7 ด้วยการทำอเล็กโทรโพรเซส จาก PCR products ของ Gradient PCR.....	50
15 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเจลด้วยการทำอเล็กโทรโพรเซส.....	51
16 ผลการตรวจสอบพลาสมิโดลูกผสมที่มียีน AGXT ปกติ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอเล็กโทรโพรเซส.....	52
17 ผลการตรวจสอบพลาสมิโดลูกผสมที่มียีน AGXT กลายพันธุ์ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอเล็กโทรโพรเซส.....	53
18 ผลการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วทำอเล็กโทรโพรเซส เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอจากเจลเฉพาะบริเวณ 1.2 kb และ 5.5 kb.....	54
19 ผลการตรวจสอบการสกัดดีเอ็นเอจากเจล ด้วยการทำอเล็กโทรโพรเซส.....	54
20 ผลการตรวจสอบพลาสมิโดลูกผสม (expression vector).....	55
21 ตัวอย่างผลของการวัดปริมาณโปรตีนรวม สำหรับนำไปทำ Western blot.....	56
22 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี Western blot.....	57

ภาพที่	หน้า
23	58
24	60
25	61
26	65
27	66
28	86
29	87
30	88
31	89
32	90
33	91
34	91
35	92

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โรค Primary hyperoxaluria type1 (PH1; OMIM 2599000) เป็นโรคทางพันธุกรรมถูกควบคุมด้วยยีนด้อยบนอโทโซม โดยเกิดจากความผิดปกติของยีน AGXT ซึ่งผลิตเอนไซม์ alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT; EC 2.6.1.44) ทำหน้าที่สลายไกลออกซิเลท ให้เป็นไกลซีน ในเพอร์ออกซิโซมของเซลล์ตับ (Danpure and Jennings, 1986) หากยีน AGXT มีความผิดปกติจะทำให้เอนไซม์ AGT ทำงานผิดปกติด้วย ส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการสลายไกลออกซิเลท เกิดการสะสมของไกลออกซิเลทขึ้น ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นออกซาเลทในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับ (Danpure and Rumsby, 2004) หลังจากนั้นออกซาเลทที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปที่ไตและสะสมในรูปผลึกของแคลเซียมออกซาเลทในไตและท่อทางเดินปัสสาวะ ส่งผลให้เกิดนิ่วในไต ต่อมาผู้ป่วยจะสูญเสียการทำงานของไตในที่สุด (Danpure and Jennings, 1986) ส่วนใหญ่โรค PH1 พบในเด็ก และผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคจะเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังน้อย

ยีน AGXT แบ่งเป็น 2 แอลลีล คือ แอลลีลหลัก (major allele) และแอลลีลรอง (minor allele) โดยที่แอลลีลรองต่างจากแอลลีลหลัก 3 ตำแหน่ง คือ มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 ในเอ็กซอน 1 จาก cytosine เป็น thymine (c.32C>T) ส่งผลให้กรดอะมิโนลำดับที่ 11 เปลี่ยนจาก proline เป็น leucine (p.Pro11Leu) นอกจากนี้ยังมี c.1020A>G (p.Ile340Met) ในเอ็กซอน 10 และ 74 bp duplication ในอินทรอน 1 (Purdue, Takada and Danpure, 1990) อย่างไรก็ตามพอลิมอร์ฟิซึมแบบ p.Ile340Met และ 74 bp duplication ไม่มีผลต่อการแสดงออก ในขณะที่พอลิมอร์ฟิซึมแบบ p.Pro11Leu มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ AGT

เอนไซม์ AGT ประกอบด้วยการจับตัวกันของสายพอลิเพปไทด์ 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน (homodimeric protein) แต่ละหน่วยมีกรดอะมิโน 392 ตัว และมีขนาด 43 กิโลดาลตัน (Takada *et al.*, 1990) แบ่งเป็น 3 โดเมน คือ โดเมนปลายด้านอะมิโน มีกรดอะมิโน 20 ตัว เป็นส่วนที่มีผลต่อการจับตัวกันของ 2 หน่วยย่อย (dimerization) (Zhang *et al.*, 2003), โดเมนที่อยู่ตรงกลาง มีกรดอะมิโน 260 ตัว เป็นบริเวณ active site และบริเวณที่สัมผัสกันของ 2 หน่วยย่อย และท้ายสุดเป็นโดเมนปลายด้านคาร์บอกซี มีกรดอะมิโน 110 ตัว มี peroxisomal targeting sequence (PTS) อยู่ส่วนปลาย มีลำดับจำเพาะเป็นกรดอะมิโน 3 ตัว คือ (Lysine-Lysine-Leucine) เป็นสัญญาณสำคัญที่นำเอนไซม์ AGT ไปยังเพอร์ออกซิโซม (Motley *et al.*, 1995)

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ภายใต้การควบคุมของ ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ ได้ตรวจพบผู้ป่วยชาวไทยรายหนึ่ง อายุ 10 ปี เริ่มมีผลึกของแคลเซียมออกซาเลทในไต อีกทั้งพี่สาวของผู้ป่วยรายนี้เสียชีวิตด้วยอาการนี้ในไต ตอนอายุ 7 ปี จึงวินิจฉัยว่า ผู้ป่วยรายนี้มีแนวโน้มเป็นโรค PH1 จากนั้นได้ตรวจสอบหาสาเหตุความผิดปกติในยีน AGXT พบว่า นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 มีการเปลี่ยนจาก cytosine เป็น guanine (c.32C>G) ส่งผลให้กรดอะมิโนลำดับที่ 11 เปลี่ยนจาก proline (Pro) เป็น argenine (Arg) (p.Pro11Arg) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน (novel mutation) และเกิดขึ้นในตำแหน่งสำคัญที่บ่งชี้ว่ายีนนี้เป็นแบบแอลลีลหลักหรือแอลลีลรอง

การศึกษาครั้งนี้จะตรวจสอบการทำงานของยีน AGXT ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ซึ่งส่งผลต่อความผิดปกติในส่วนของโดเมนปลายด้านอะมิโนที่มีส่วนสำคัญต่อการจับกันของ 2 หน่วยย่อย และเป็นการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่มีผลต่อ MTS โดยตรง ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจทำให้เอนไซม์ AGT มีการทำงานลดลง หรือถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน หรือเปลี่ยนตำแหน่งเป้าหมายจากเพอร์อกซิโซม เป็นไมโทคอนเดรียมากขึ้น

แม้ว่าโรคนี้จะไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่ถ้าได้รับการวินิจฉัยและดูแลรักษาอย่างถูกวิธี ก็จะทำให้ผู้ป่วยสามารถใช้ชีวิตได้ตามปกติและมีชีวิตยาวนานขึ้น ดังนั้นการวิเคราะห์การทำงานของยีนการกลายพันธุ์ที่พบใหม่ในยีน AGXT ชนิด p.Pro11Arg ของผู้ป่วยรายนี้จะทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ AGT ซึ่งผลิตจากยีน AGXT ที่เปลี่ยนแปลงในตำแหน่ง Pro11Arg จะทำให้ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการกลายพันธุ์ชนิดนี้ในโรค PH1 ของครอบครัวนี้ รวมทั้งสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการทำงานของยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ ทำให้แพทย์สามารถนำไปประยุกต์ในการให้การวินิจฉัย ดูแลรักษา และให้คำปรึกษาแก่ผู้ป่วยและครอบครัวได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อวิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg ในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค PH1

ขอบเขตของการวิจัย

สังเคราะห์ยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg แล้ว transfect เข้าสู่เซลล์ Hep-G2 เพื่อกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ AGT หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์ AGT ปกติ แบ่งเป็นตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT โดยวิธี western blot ตรวจสอบความสามารถ

ในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวิธี semiautomated spectrophotometric (Rumsby, Weir and Samuell, 1997) และตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์ โดยวิธี immunofluorescence (Masyuk *et al.*, 2003)

ข้อจำกัดในการวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ซึ่งพบในผู้ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่และเอนไซม์ชนิดนี้ทำงานเฉพาะในเซลล์ตับเท่านั้น จึงไม่สามารถนำเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยมาสกัดเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ได้ ผู้วิจัยจึงต้องทำการสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ลักษณะนี้ p.Pro11Arg ในห้องปฏิบัติการ โดยการทำ mutagenesis จากต้นแบบซึ่งเป็น cDNA ของยีน AGXT ปกติที่ได้มาจาก Human hepatocellular liver carcinoma cell lines (Hep-G2 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ตับของมนุษย์

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Primary hyperoxaluria type1 หรือ PH1 คือ โรคทางพันธุกรรมถูกควบคุมด้วยยีนด้อยบนออโทโซม โดยเกิดจากความผิดปกติของยีน AGXT ส่งผลให้เกิดนิ่วในไต ส่วนใหญ่โรคนี้พบในเด็ก และผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคจะเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังน้อย
- AGXT คือ ยีนซึ่งผลิตเอนไซม์ AGT
- Alanine:glyoxylate aminotransferase หรือ AGT คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลายไกลออกซิเลท ให้เป็นไกลซีน ในเพอร์ออกซิโซม
- c.32C>G คือ การเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) โดยนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 มีการเปลี่ยนชนิดของเบสจาก cytosine (C) เป็น guanine (G)
- p.Pro11Arg คือ การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน โดยภายในสายพอลิเพปไทด์มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 11 จาก proline (Pro) เป็น arginine (Arg)
- Novel mutation คือ การกลายพันธุ์ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนในวงวิชาการ
- Semiautomated spectrophotometric คือ วิธีวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ซึ่งเปลี่ยนไกลออกซิเลท เป็นไพรูเวท โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทั้งก่อนใส่และหลังใส่เอนไซม์ LDH ของ NADH ซึ่งเป็น cofactor ของเอนไซม์ LDH ซึ่งเปลี่ยนไพรูเวท เป็นแลคเตท เมื่อเอนไซม์ LDH ทำงาน NADH จะถูกเปลี่ยนเป็น NAD⁺ ซึ่งไม่สามารถดูดกลืนแสงได้ จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงหลังใส่ลดลง ดังนั้นถ้าเอนไซม์ AGT ทำงานได้มากจะเกิดไพรูเวทมากตามไปด้วย ส่งผลให้เอนไซม์ LDH ทำงานมาก

และ NADH มีปริมาณลดลง จึงทำให้ค่าก่อนใส่และหลังใส่แตกต่างกันมาก ส่วนถ้าค่าก่อนใส่และหลังใส่แตกต่างกันน้อย แสดงว่าเอนไซม์ AGT ทำงานได้น้อย

- Immunofluorescence คือ วิธีการตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายของเอนไซม์ภายในเซลล์ โดยใช้ secondary antibody ที่ติดสารเรืองแสง ไปจับกับ primary antibody ซึ่งจับอยู่กับเอนไซม์เป้าหมาย แล้วตรวจสอบตำแหน่งของเอนไซม์เป้าหมายภายในเซลล์จากการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Macro Confocal

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลไกการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่ผิดปกติ ซึ่งผลิตจากยีน AGXT ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg
2. สามารถนำผลการวิจัยไปร่วมใช้ในการวินิจฉัยโรค ดูแลรักษา และให้คำปรึกษาแก่ผู้ป่วยและครอบครัวได้

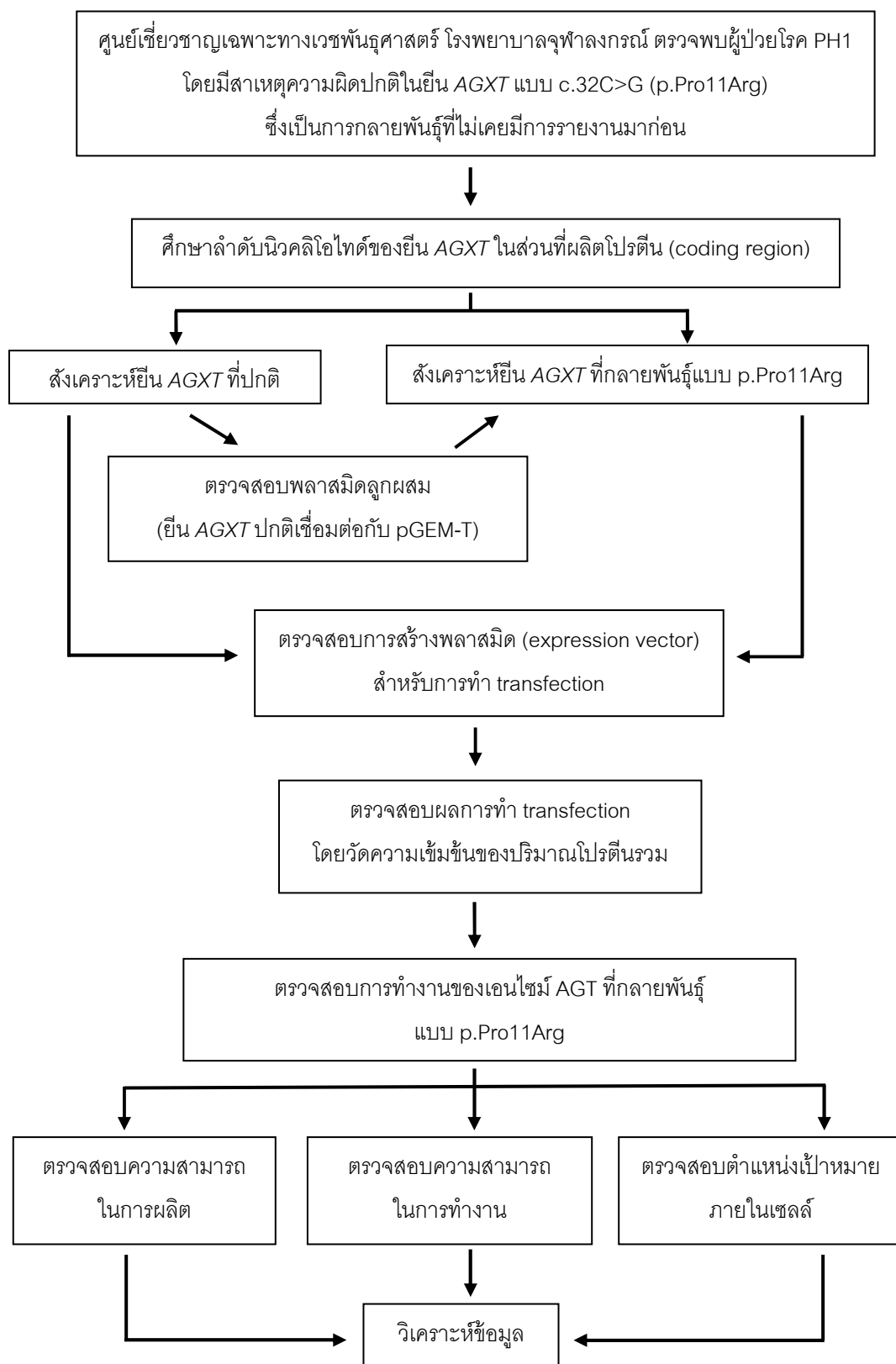
วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้ แบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

1. การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพื่อผลิตเอนไซม์ AGT
 - 1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ Hep-G2, EBV-transformed lymphoblastoid cell lines (EBV cells) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และ African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells (COS 7 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ไตของลิงชนิดหนึ่งที่พบในทวีปแอฟริกา
 - 1.2 สกัด RNA จากเซลล์ Hep-G2 เพื่อเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน AGXT ปกติและทำ reverse transcription
 - 1.3 เพิ่มปริมาณยีน AGXT ปกติในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) โดยใช้ cDNA จากเซลล์แต่ละชนิดเป็นต้นแบบ
 - 1.4 ทำ transformation
 - 1.5 ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณที่ต้องการ (site-directed mutagenesis) เพื่อสร้างยีน AGXT ที่มีการกลายพันธุ์แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg)
 - 1.6 ตัดต่อยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เข้ากับ expression vector (pcDNA3.1/V5-HisB)

- 1.7 ทำ lipotransfection เข้าสู่เซลล์ Hep-G2 แล้วเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 แบบ โดยผลิตทั้งเอนไซม์ AGT ปกติและเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg
2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์ AGT ปกติ
 - 2.1 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT โดยวิธี western blot เทียบกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเปล่าเป็นกลุ่มควบคุม
 - 2.2 ตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวิธี semiautomated spectrophotometric
 - 2.3 ตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์ โดยวิธี immunofluorescence

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย



ภาพที่ 1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการวิจัย

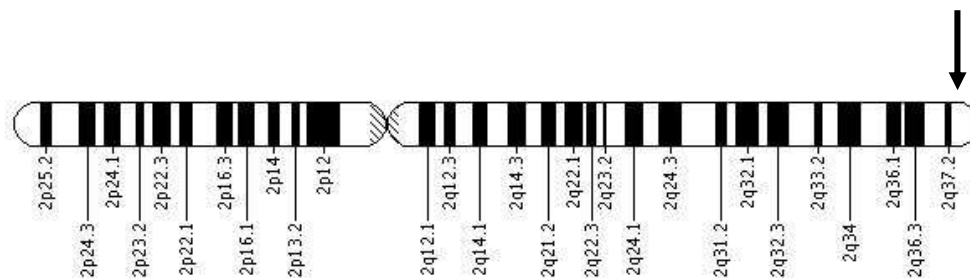
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาเหตุการเกิดโรค PH1

โรค PH1 เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติจากการทำงานของเอนไซม์ AGT ซึ่งผลิตจากยีน AGXT ที่ผิดปกติไป โดยปกติยีน AGXT อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 ตำแหน่ง 2q37.3 แสดงในภาพที่ 2 ประกอบด้วย 11 เอ็กซอน มีขนาด 10 กิโลเบส (Purdue *et al.*, 1991) ยีน AGXT แบ่งเป็น 2 แอลลีล คือ แอลลีลหลัก (major allele) และแอลลีลรอง (minor allele) โดยที่แอลลีลรองต่างจากแอลลีลหลัก 3 ตำแหน่ง คือ c.32C>T (p.Pro11Leu) ในเอ็กซอน 1 c.1020A>G (p.Ile340Met) ในเอ็กซอน 10 และ 74 bp duplication ในอินทรอน 1 (Purdue *et al.*, 1990) ความถี่ของแอลลีลรองที่พบในประชากรโลกมีการกระจายตัวต่างกัน ตัวอย่างเช่น ในแถบยุโรปและอเมริกาเหนือมีความถี่ประมาณ 15 - 20% แต่จะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 28% ในประชากรเผ่าซามี (Saami) ซึ่งอยู่ทางตอนเหนือของสวีเดน และลดลงเหลือเพียง 2 - 3% ในประชากรแถบเอเชียอาทิเช่น อินเดีย จีน และญี่ปุ่น (Caldwell *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์พีซีเอ็มแบบ p.Ile340Met และ 74 bp duplication ไม่มีผลต่อการแสดงออก ในขณะที่พอลิเมอร์พีซีเอ็มแบบ p.Pro11Leu มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ AGT ดังนี้ (Lumb and Danpure, 2000)

1. ลดความเสถียรของเอนไซม์ AGT ทำให้การจับตัวกันเองของ 2 หน่วยย่อย (dimerization) ลดลง โดยเฉพาะในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง การที่หน่วยย่อยของเอนไซม์ AGT อยู่เดี่ยว ๆ และไม่เกิดการจับกันเอง (dimerize) จะทำให้ถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ง่าย
2. ลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยทำให้กระบวนการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีในการสลายไกลอออกซาเลทเกิดได้น้อยลง
3. ทำให้เอนไซม์ AGT ประมาณ 5% เปลี่ยนตำแหน่งเป้าหมาย จากปกติส่งไปยังเพอร์ออกซิโซมเปลี่ยนเป็นไมโทคอนเดรีย เนื่องจากการเปลี่ยน proline เป็น leucine ทำให้เกิด mitochondrial targeting sequence (MTS) ที่แรงขึ้น
4. ส่งผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ AGT ร่วมกับการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ที่พบใน PH1 โดยมักเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หรือลดความเสถียรของเอนไซม์ลง

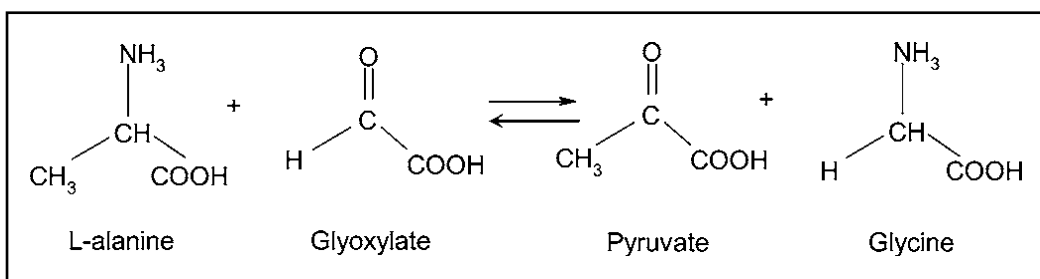


ภาพที่ 2 ตำแหน่งของยีน AGXT (ลูกศรชี้) บนโครโมโซมหมายเลข 2

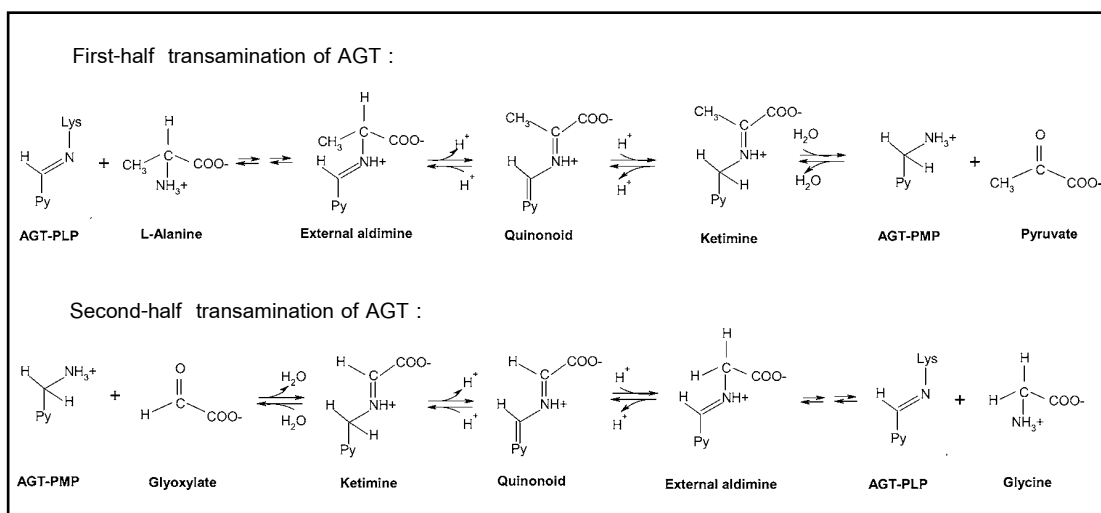
(<http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/2>)

กลไกการทำงานของเอนไซม์ AGT

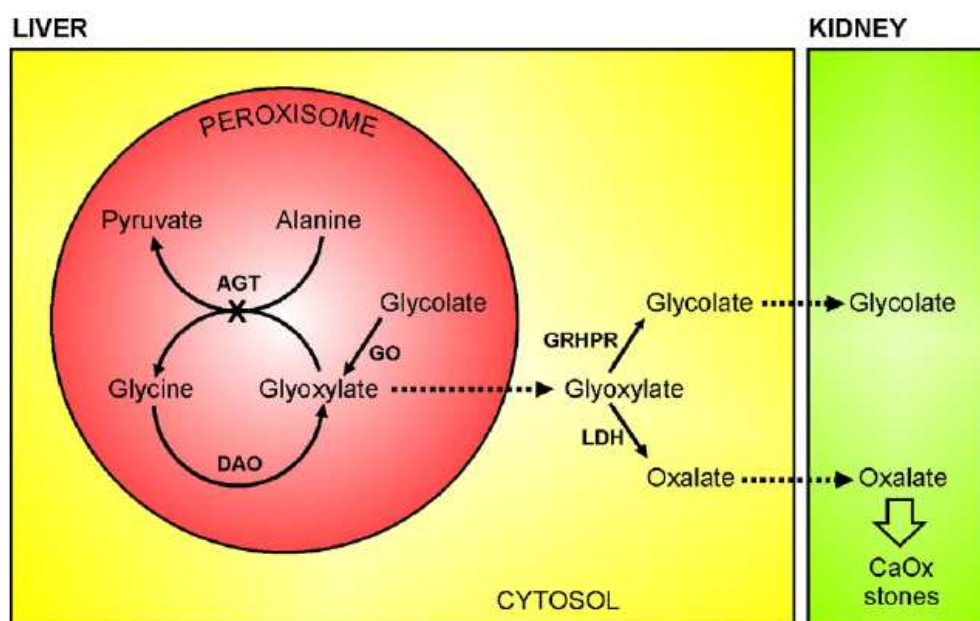
เอนไซม์ AGT ในมนุษย์ทำงานเฉพาะในเพอร์ออกซิโซมของเซลล์ตับเท่านั้น จากภาพที่ 3 แสดงให้เห็นถึงกระบวนการทำงานของเอนไซม์ AGT ซึ่งโดยปกติจะทำหน้าที่เปลี่ยนอะลานีน เป็น ไพรูเวท และเปลี่ยนไกลออกซิเลทให้เป็นไกลซีน จะเห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ต้องใช้สารตั้งต้น 2 ชนิด ปฏิริยาจึงจะเกิดขึ้นได้ ในความเป็นจริงนั้นปฏิริยานี้มีจุดประสงค์เพื่อกำจัด ไกลออกซิเลทซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ต้องมีการใช้อะลานีนเข้ามาร่วมในปฏิริยาจึงจะทำให้เอนไซม์ AGT ทำงานได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นปฏิริยานี้ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนย่อย ดังภาพที่ 4 โดยขั้นตอนย่อยแรกจะเป็นปฏิริยาการเปลี่ยนอะลานีน (L-alanine) เป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยใช้ตัวเร่งปฏิริยา คือ AGT-PLP ซึ่งเป็นเอนไซม์ AGT ที่มี pyridoxal 5'-phosphate (PLP) เป็นโคแฟกเตอร์ และส่งผลให้ AGT-PLP เปลี่ยนเป็น AGT-PMP ซึ่งก็คือเอนไซม์ AGT ตัวเดิมแต่เปลี่ยนโคแฟกเตอร์เป็น pyridoxamine 5'-phosphate (PMP) เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิริยาในขั้นตอนย่อยที่ 2 ซึ่งจะเปลี่ยนไกลออกซิเลท (glyoxylate) เป็นไกลซีน (glycine) ส่วน AGT-PMP ก็จะถูกเปลี่ยนกลับมาเป็น AGT-PLP ตามเดิม เพื่อวนกลับมาเร่งปฏิริยาในขั้นตอนย่อยแรกต่อไป (Cellini *et al.*, 2007) แต่ถ้าหากเอนไซม์ AGT เกิดการกลายพันธุ์ จะส่งผลให้กระบวนการทำงานของเอนไซม์ AGT ผิดปกติตามไปด้วย ดังภาพที่ 5 จะเห็นว่าไกลออกซิเลทไม่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นไกลซีนได้ตามปกติ จึงทำให้ไกลออกซิเลทในเพอร์ออกซิโซมถูกส่งออกมาที่ไซโทพลาสซึม หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นออกซาเลท (oxalate) โดยเอนไซม์แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase; LDH) ออกซาเลทที่เกิดขึ้นจะถูกกำจัดออกไปที่ไต แล้วเกิดการตกผลึกในรูปแคลเซียมออกซาเลท (CaOx stones) ทำให้เป็นนิ่วที่ไต และเกิดอาการไตวายในที่สุด (Danpure *et al.*, 2001)



ภาพที่ 3 ปฏิกริยาทางเคมีที่ใช้เอนไซม์ AGT เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Cellini *et al.*, 2007)



ภาพที่ 4 กลไกการทำงานของเอนไซม์ AGT (Cellini *et al.*, 2007)

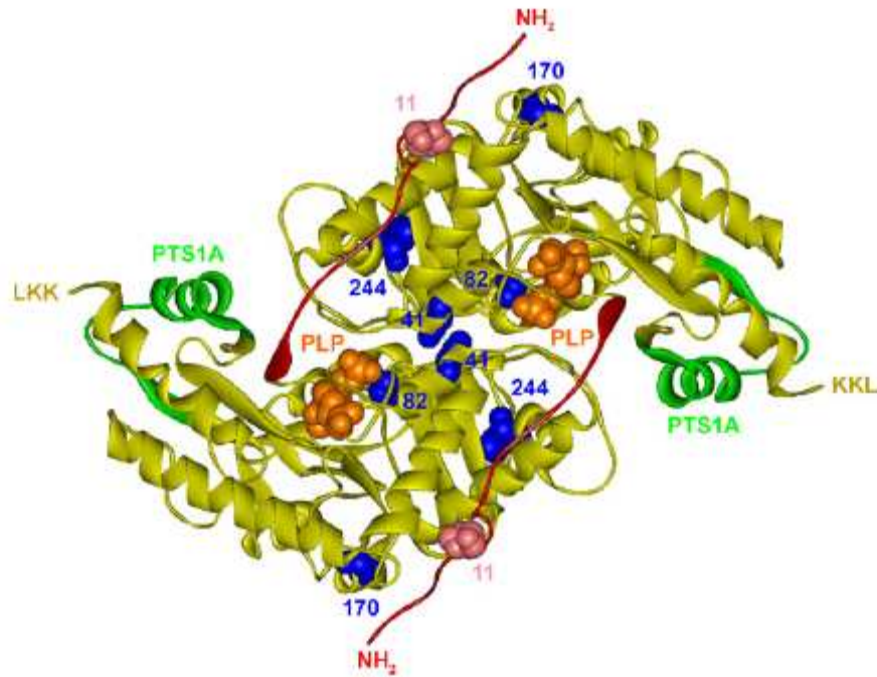


ภาพที่ 5 กระบวนการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่ผิดปกติซึ่งส่งผลให้เกิดโรค PH1 (Danpure, 2006)

โครงสร้างของเอนไซม์ AGT

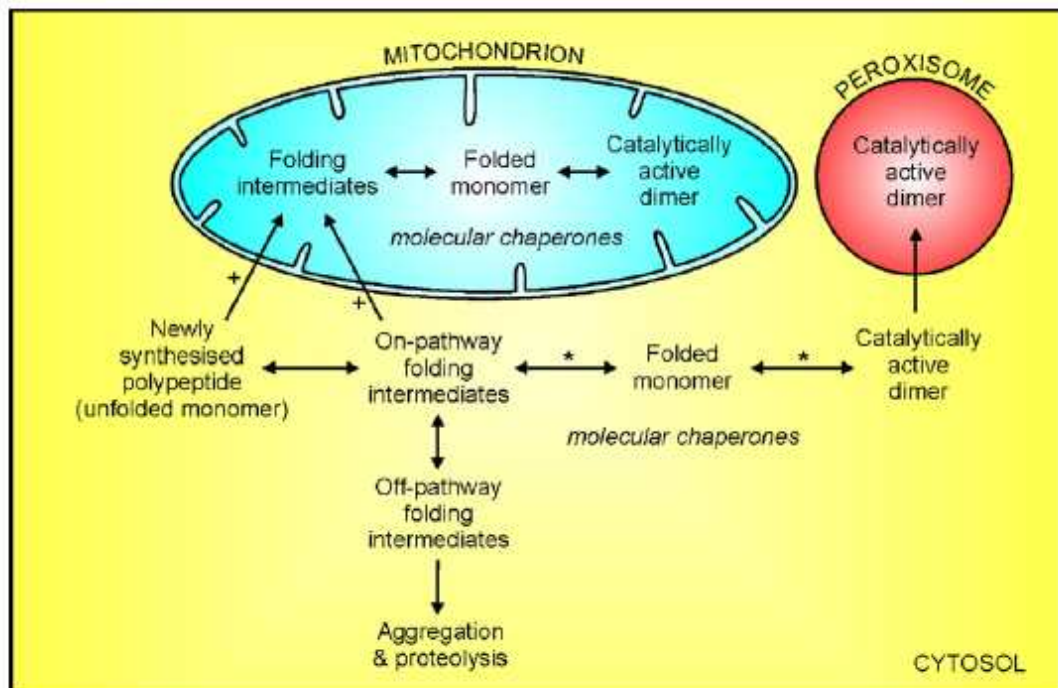
เอนไซม์ AGT ประกอบด้วยการจับตัวกันของสายพอลิเพปไทด์ 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน (homodimeric protein) แต่ละหน่วยมีกรดอะมิโน 392 ตัว และมีขนาด 43 กิโลดาลตัน (Takada *et al.*, 1990) แบ่งเป็น 3 โดเมน คือ

1. โดเมนปลายด้านอะมิโน (ภาพที่ 6 บริเวณสีแดง) มีกรดอะมิโน 20 ตัว เป็นส่วนที่มีผลต่อการจับตัวกันของ 2 หน่วยย่อย (dimerization) (Zhang *et al.*, 2003) โดยที่การจับตัวกันนี้มีความสำคัญมากต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT หากหน่วยย่อยแต่ละหน่วยไม่สามารถจับกันได้จะเกิดความไม่เสถียรและนำไปสู่การรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนหรือถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เอนไซม์ AGT ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ (Danpure *et al.*, 1993) ดังนั้นหากโดเมนส่วนนี้มีความผิดปกติก็จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผิดปกติด้วย นอกจากนี้การเปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 (ภาพที่ 6 ตำแหน่งสีชมพู) จาก proline เป็น leucine ที่พบในพอลิมอร์ฟิซึม แบบ p.Pro11Leu นั้นสามารถทำให้เกิด mitochondrial targeting sequence (MTS) ซึ่งเป็นสัญญาณสำคัญที่นำเอนไซม์ AGT ไปสู่ไมโทคอนเดรีย ส่งผลให้เอนไซม์ AGT ประมาณ 5% เปลี่ยนตำแหน่งเป้าหมาย จากปกติส่งไปยัง เพอร์ออกซิโซมเปลี่ยนเป็นไมโทคอนเดรีย (Purdue *et al.*, 1990)
2. โดเมนที่อยู่ตรงกลางซึ่งมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 6 บริเวณสีเหลือง) มีกรดอะมิโน 260 ตัว เป็นบริเวณ active site และบริเวณที่สัมผัสกันของ 2 หน่วยย่อย นอกจากนี้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 209 (ภาพที่ 6 ตำแหน่งสีส้ม) คือ Lysine ยังเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นบริเวณจับกับโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ AGT คือ Pyridoxal 5'-Phosphate (PLP) หากเกิดความผิดปกติขึ้นในบริเวณนี้จน PLP ไม่สามารถเข้ามาจับได้จะทำให้เอนไซม์ AGT ไม่สามารถทำงานได้ (Coulter-Mackie, Lian and Wong, 2005)
3. โดเมนปลายด้านคาร์บอกซี (ภาพที่ 6 บริเวณสีเขียว) มีกรดอะมิโน 110 ตัว มี peroxisomal targeting sequence (PTS) อยู่ส่วนปลาย มีลำดับจำเพาะเป็นกรดอะมิโน 3 ตัว คือ KKL (Lysine-Lysine-Leucine) เป็นสัญญาณสำคัญที่นำเอนไซม์ AGT ไปยังเพอร์ออกซิโซม (Motley *et al.*, 1995)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของเอนไซม์ AGT (Zhang *et al.*, 2003)

กลไกการส่งเอนไซม์ AGT สู่ตำแหน่งเป้าหมาย



ภาพที่ 7 กลไกการส่งเอนไซม์ AGT สู่ตำแหน่งเป้าหมาย (Danpure, 2006)

เอนไซม์ AGT มีกระบวนการจัดส่งอย่างเป็นระบบ ดังแสดงในภาพที่ 7 โดยหลังจากพอลิเปปไทด์ของแต่ละหน่วยย่อยของเอนไซม์ AGT ถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการแปลรหัส (translation) ที่ไรโบโซมในไซโทพลาสซึมเสร็จแล้ว จะเกิดการกระบวนการ folding ของสายพอลิเปปไทด์แต่ละสาย หากกระบวนการ folding ไม่เกิดขึ้นจะทำให้พอลิเปปไทด์แต่ละสายจับตัวรวมกันตกตะกอน แล้วถูกย่อยสลายไปในที่สุด โดยปกติกระบวนการ folding จะต้องผ่านช่วง intermediates ซึ่งท้ายสุดก็จะสามารถ folding ได้สำเร็จ หน่วยย่อยแต่ละหน่วยก็จะมาจับกันเป็น dimer ในไซโทพลาสซึม หลังจากนั้น dimer หรือเอนไซม์ AGT ที่พร้อมทำงานจะถูกส่งเข้าไปยังเพอร์อกซิโซม แต่ถ้าหากผ่านช่วง intermediates มาแล้วแต่ท้ายที่สุดเกิดการ folding ไม่สำเร็จ ก็จะทำให้กลุ่มของพอลิเปปไทด์ในช่วง intermediates ถูกส่งเข้าไปยังไมโทคอนเดรียแทน แล้วจึงเกิดการ folding จนสำเร็จ หลังจากนั้นหน่วยย่อยแต่ละหน่วยจึงมาจับกัน (dimerization) กลายเป็นเอนไซม์ AGT ที่พร้อมทำงานภายในไมโทคอนเดรีย จะเห็นได้ว่าหากกระบวนการ folding ในไซโทพลาสซึมไม่เกิดก็จะทำให้เอนไซม์ถูกย่อยสลายไป แต่ถ้าเกิดแล้วไม่สำเร็จก็จะทำให้เอนไซม์ถูกส่งเข้าไปยังไมโทคอนเดรียแทน ส่งผลให้เอนไซม์ AGT ที่จะเข้าไปทำงานภายในเพอร์อกซิโซมลดน้อยลง จึงเกิดการสะสมของสารพวกออกซิเลทมากขึ้น เนื่องจากขาดเอนไซม์ AGT เข้าไปสลายไกลออกซิเลท ดังนั้นหากมีการกลายพันธุ์ของยีน AGXT ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการ folding ของพอลิเปปไทด์ ก็จะทำให้การส่งเอนไซม์ไปยังเพอร์อกซิโซมเกิดความผิดปกติด้วย

ตัวอย่างการกลายพันธุ์ที่พบในยีน AGXT

ในปัจจุบันมีรายงานการกลายพันธุ์ของยีน AGXT ประมาณ 146 ชนิด ซึ่งพบว่าประมาณ 57% ของการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการแทนที่ของเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง แล้วส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีน หรือที่เรียกว่า missense mutation นั้นมีผลต่อการแสดงออกของยีน (Williams *et al.*, 2009) โดยส่วนใหญ่จะส่งผลร่วมกับพอลิมอร์ฟิซึมแบบ p.Pro11Leu ที่พบในแอลลีลรอง ทำให้ระดับความผิดปกติในการทำงานของเอนไซม์ AGT มีมากขึ้น ซึ่งการกลายพันธุ์แบบต่าง ๆ ที่พบในยีน AGXT และมักพบได้บ่อย ดังแสดงในภาพที่ 8 มีดังนี้

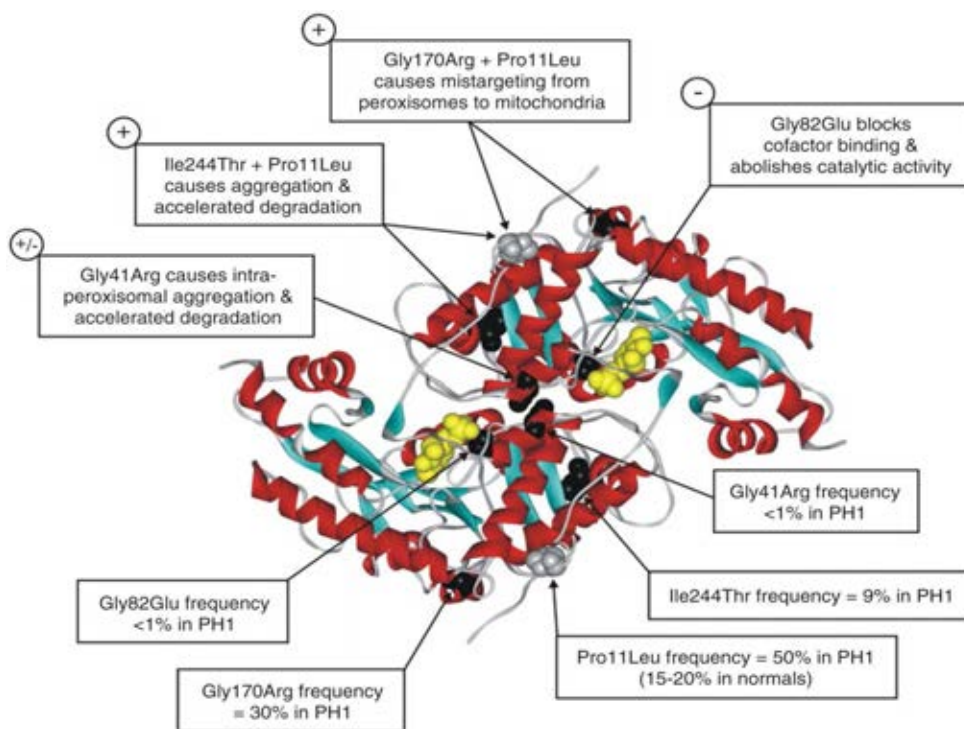
1. การกลายพันธุ์แบบ p.Gly82Gln (Purdue *et al.*, 1992)

เป็นการกลายพันธุ์ที่มักพบร่วมกับแอลลีลหลัก ส่งผลให้เอนไซม์ AGT สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา โดยไม่เกี่ยวข้องกับเรื่องความเสถียรของเอนไซม์, การจับกันของ 2 หน่วยย่อยหรือการส่งผิดเป้าหมายแต่อย่างใด สาเหตุเกิดจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 82 (ภาพที่ 6 ตำแหน่งสีน้ำเงิน) ที่อยู่ใกล้กับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 209 ซึ่งเป็นบริเวณจับของ PLP ที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ AGT โดยการเปลี่ยนจาก glycine เป็น glutamate

นั้นส่งผลให้รูปร่างบริเวณนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลง จึงทำให้ PLP ไม่สามารถเข้ามาจับได้ตามปกติ ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ AGT ที่มีกลายพันธุ์แบบนี้จึงไม่สามารถทำงานได้

2. การกลายพันธุ์แบบ p.Gly41Arg (Danpure *et al.* 1993)

เป็นการกลายพันธุ์ที่มักพบร่วมได้ทั้งกับแอลลีลหลักและแอลลีลรอง แต่การแสดงออกร่วมกับแอลลีลรอง คือ พอลิมอร์ฟิซึม แบบ p.Pro11Leu จะมีระดับความรุนแรงของโรคมากกว่าซึ่งส่งผลให้เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบนี้เกิดความไม่เสถียร เนื่องจากหน่วยย่อยทั้ง 2 หน่วยไม่สามารถจับกันได้ สาเหตุเกิดจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 41 (ภาพที่ 6 ตำแหน่งสีน้ำเงิน) ซึ่งอยู่ในโดเมนส่วนกลางและเป็นส่วนสำคัญของการจับกันของ 2 หน่วยย่อย โดยธรรมชาติ glycine เป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กสุด ดังนั้นการเปลี่ยนจาก glycine เป็น arginine ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 41 มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ช่องว่างสำหรับการจับกันมีขนาดจำกัดเหมาะสำหรับ glycine เท่านั้น เป็นผลให้หน่วยย่อยทั้ง 2 หน่วยของเอนไซม์ AGT ไม่สามารถจับกันได้ ด้วยเหตุนี้เองการกลายพันธุ์แบบนี้จึงส่งผลให้พบเอนไซม์ AGT ในผู้ป่วยได้น้อย เนื่องจากโดนย่อยสลายไปอย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 8 ตำแหน่งในโครงสร้างของเอนไซม์ AGT ที่มักพบการกลายพันธุ์ (Danpure, 2005)

3. การกลายพันธุ์แบบ p.Ile244Thr (Santana *et al.*, 2003)

เป็นการกลายพันธุ์ที่ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 224 เปลี่ยนจาก Isoleucine (Ile) เป็น Threonine (Thr) มักพบบ่อยเป็นอันดับสอง โดยพบประมาณ 6 – 9% จากผู้ป่วยโรค PH1 ที่ตรวจพบ แต่ในบางภูมิภาคของประเทศสเปนพบการกลายพันธุ์ชนิดนี้สูงกว่าปกติ ส่งผลให้เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบนี้เกิดความไม่เสถียรจึงค่อยๆสลายไปอย่างรวดเร็ว

4. การกลายพันธุ์แบบ p.Gly170Arg (Danpure *et al.*, 1989)

เป็นการกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดของผู้ป่วยโรค PH1 (Purdue *et al.*, 1990) โดยพบประมาณ 15 – 35% เป็นการกลายพันธุ์ที่ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 170 เปลี่ยนจาก glycine (Gly) เป็น arginine (Arg) มักพบร่วมกับแอลลีลสำรอง โดยเฉพาะพอลิมอร์ฟิซึมแบบ p.Pro11Leu ซึ่งทำให้เกิดสัญญาณ MTS อย่างอ่อน ประกอบกับการกลายพันธุ์แบบ p.Gly170Arg ยิ่งส่งผลให้สัญญาณ MTS แรงมากขึ้น (Lumb, Drake and Danpure, 1999) ทำให้เอนไซม์ AGT ที่เกิดกลายพันธุ์ชนิดนี้ 90 – 95% เปลี่ยนตำแหน่งเป้าหมายจากเพอร์ออกซิไซมเป็นไมโทคอนเดรีย

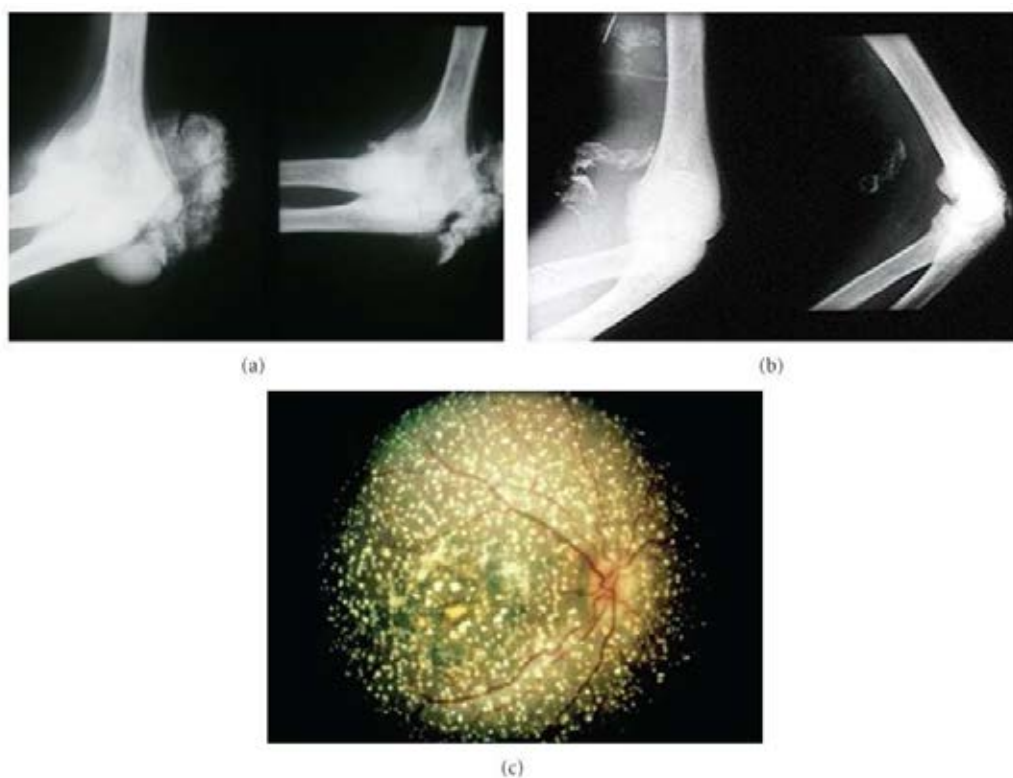
อุบัติการณ์เกิดโรค PH1

โรค PH1 เป็นโรคที่พบบได้น้อยมาก โดยสามารถพบคนที่เป็โรคนี้ 1 คนจากประชากรทั่วไป 5 – 15 ล้านคน หรือคิดเป็นอัตราเฉลี่ยเท่ากับ 0.15 ราย/ล้านคน/ปี (Hoppe and Langman, 2003; Woerden *et al.*, 2003) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบเด็กที่ป่วยเป็นโรค PH1 ตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 1988 – 2001 เพียง 2 รายที่โรงพยาบาลศิริราช (Wasant *et al.*, 2002) และรายงานล่าสุดในปี 2007 ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ได้ตรวจพบผู้ป่วยโรค PH1 ในเด็กหญิงอายุเพียง 5 เดือน ซึ่งสุดท้ายเสียชีวิตด้วยภาวะนิ่วในไตและไตวายในที่สุด แต่ไม่ได้มีการตรวจสอบหาสาเหตุการกลายพันธุ์ในยีน AGXT (Tantbirojn *et al.*, 2007)

อาการของผู้ป่วยโรค PH1

ร่างกายของผู้ป่วยโรค PH1 จะสร้างออกซาเลทเป็นจำนวนมากกว่า 200 มิลลิกรัม/วัน ซึ่งโดยปกติไม่ควรเกิน 45 มิลลิกรัม/วัน เนื่องจากขาดเอนไซม์ที่จะเร่งปฏิกิริยาสำหรับเปลี่ยนสารตั้งต้นกำเนิดของออกซาเลท อีกทั้งออกซาเลทเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ไม่มี ความจำเป็นต่อร่างกาย และในมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายออกซาเลทได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการขับทิ้งออกซาเลทออกมาในปัสสาวะสูงมาก ผู้ป่วยจะมีอาการท้อหนักมาก หากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม การรักษาด้วยการฟอกเลือดเพื่อรักษาภาวะไตวายตามปกติ นั้น อาจไม่เพียงพอที่จะขจัดออกซาเลทออกจากร่างกายได้หมด จึงทำให้เกิดผลึกของแคลเซียมออกซาเลทสะสมอยู่ในอวัยวะต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 9 โดยเฉพาะที่ไตและระบบทางเดินปัสสาวะ

(nephrocalcinosis) เกิดนิ่วในท่อไตและทำให้ไตวาย (renal failure) ในที่สุด (Walter and Dang, 1998) ผู้ป่วยจึงมักจะเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังไม่มากนัก ดังนั้นการตรวจปัสสาวะของผู้ป่วยจะพบผลึกแคลเซียมออกซาเลทเป็นรูปทรงปิรามิดเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 2547) ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 10 ซึ่งการตรวจผลึกในปัสสาวะเป็นสิ่งที่ง่ายและควรตรวจสอบเพราะง่ายต่อการวินิจฉัยโรคเบื้องต้น และเมื่อนำไปวิเคราะห์กรดอินทรีย์ในปัสสาวะจะพบ hyperoxaluria และ hyperglycolic aciduria สำหรับอาการแรกเริ่มของผู้ป่วยจะเป็นอาการทางไต เช่น ปัสสาวะเป็นเลือด หรือปวดท้องเป็นพัก ๆ (renal colic) มักเกิดก่อนอายุ 5 ขวบ ส่วนอาการไตวายจะพบได้ในช่วงอายุของผู้ป่วยที่กว้างมาก คือเริ่มพบตั้งแต่ในขวบปีแรกจนหลังอายุ 60 ปี (วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 2547)



ภาพที่ 9 ภาพการสะสมผลึกแคลเซียมออกซาเลท ในอวัยวะต่าง ๆ ของผู้ป่วยโรค PH1 โดย (a) คือ บริเวณข้อต่อ, (b) คือ กระดูก และ (c) คือ บริเวณเรตินาในดวงตา

(Harambat *et al.*, 2011)



ภาพที่ 10 ลักษณะผลึกแคลเซียมออกซาเลท (Harambat *et al.*, 2011)

โดย (a) คือ ก้อนผลึก และ (b) คือ ผลึกที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งมีรูปทรงปิระมิด

แนวทางการรักษาผู้ป่วยโรค PH1

การรักษาผู้ป่วยโรค PH1 ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เนื่องจากเป็นโรคทางพันธุกรรมทำได้เพียงการวินิจฉัยถึงสาเหตุของการเกิดโรคที่แท้จริงร่วมกับการรักษาตามอาการที่เกิดขึ้น โดยการใช้ยา ร่วมกับการผ่าตัด (Walter and Dang, 1998) อาทิเช่น

- การให้รับประทาน pyridoxine (วิตามิน B6), orthophosphate และ magnesium
- งดรับประทานอาหารที่มีปริมาณออกซาเลทสูง ได้แก่ ชา ผักโขม ผักกาด ถั่ว ช็อกโกแลต สตรอเบอร์รี่ เป็นต้น
- การกระตุ้นให้มีปัสสาวะออกมากขึ้นโดยการดื่มน้ำ เพื่อลดภาวะอิ่มตัวยวดยิ่ง (supersaturation) แล้วทำให้เกิดผลึกของสารออกซาเลทในปัสสาวะ ร่วมกับการให้ยา thiazides
- การให้ยาจำพวก glycosaminoglycans เพื่อลดการก่อตัวของผลึก
- การผ่าตัด เพื่อกำจัดก้อนนิ่ว ซึ่งในปัจจุบันมีหลายวิธี แต่วิธีที่ได้รับความนิยมมีดังนี้
 - 1) Percutaneous nephrolithotomy (PCNL) คือ การใช้กล้อง nephroscope ส่องผ่านผิวหนังบริเวณเอวเข้าสู่ไตโดยตรง แล้วจึงนำก้อนนิ่วออก
 - 2) Ureterorenoscopic stone removal (URS) คือ การใช้กล้อง ureteroscope ขนาดเล็กส่องผ่านทางกระเพาะปัสสาวะเข้าสู่ไต แล้วจึงนำก้อนนิ่วออก
 - 3) Open stone surgery (OSS) เป็นการผ่าตัดโดยเปิดชั้นผิวหนังโดยตรง มีหลายวิธี ขึ้นกับขนาดและตำแหน่งของก้อนนิ่ว
- การรักษาก้อนนิ่วด้วยวิธี Extracorporeal shockwave lithotripsy (SWL) ซึ่งจัดเป็นการรักษาแบบ non-invasive โดยการใช้คลื่นกระแทกพลังงานสูงจากเครื่องกำเนิดภายนอกผ่านชั้นผิวหนังลงไป เมื่อคลื่นไปกระทบกับวัตถุที่แข็งและเปราะ เช่น ก้อนนิ่ว ก็จะทำให้แตกได้ง่าย

- การฟอกไต (invasive dialysis) โดยทำการฟอกไตทุกวัน
- การปลูกถ่ายตับ (liver transplantation) เป็นการรักษาให้หายขาด
- การปลูกถ่ายไต (renal transplantation) ในรายที่การทำงานของไตบกพร่องรุนแรงอย่างถาวร

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

1.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (CDS) จากฐานข้อมูลใน NCBI พบว่า ยีนมีขนาด 1,231 base pairs โดยส่วนที่มีการแสดงออกเริ่มตั้งแต่ นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 123 ถึงนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,301 ดังแสดงในภาพที่ 13 ซึ่งแสดงเป็นช่วงของตัวอักษรหนา ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์ เพื่อผลิตยีน AGXT ที่ปกติ และเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg สุดท้ายยีนทั้ง 2 แบบจะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออก โดยผลิตเอนไซม์ AGT ตามปกติและมีการผลิตเอนไซม์ AGT ที่ผิดปกติไปจากเดิมตามลำดับ โดยออกแบบสาย forward ให้สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ในช่วงลำดับที่ 90 – 111 (ช่วงที่มีแถบสีในแถว 61) ซึ่งมีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในลำดับที่ 95 จาก T เป็น A (ตำแหน่งลูกศรชี้) เพื่อให้เป็นบริเวณจดจำสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI ในการตัดต่อเข้ากับ expression vector ในขั้นตอนต่อไปและออกแบบสาย reverse ให้สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ในช่วงลำดับที่ 1,293 – 1,320 (ช่วงที่มีแถบสีในแถว 1,261) ซึ่งมีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในลำดับที่ 1,314 จาก C เป็น A, ลำดับที่ 1,316 จาก C เป็น T และลำดับที่ 1,317 จาก A เป็น T (ตำแหน่งลูกศรชี้) เพื่อให้เป็นบริเวณจดจำสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI จะเห็นว่าการออกแบบในสาย Reverse มีการซ้อนทับกับนิวคลีโอไทด์ในส่วนท้ายของยีน เพื่อเปลี่ยนรหัสหยุด โดยเปลี่ยนจาก T เป็น A ในนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,299 (ตำแหน่งลูกศรชี้ในแถว 1,261) ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ AGT ยาวขึ้น สามารถสังเคราะห์ต่อไปยังส่วนโปรตีน V5 ใน expression vector ซึ่งใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกหรือติดตามเอนไซม์ AGT ได้ นอกจากนี้ยังสามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ mutagenesis โดยออกแบบทั้งสาย forward และสาย reverse ให้สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ในช่วงลำดับที่ 137 – 171 (ช่วงที่มีแถบสีในแถว 121) เพื่อผลิตยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg โดยเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น G ในลำดับที่ 154 (ตำแหน่งลูกศรชี้ในแถว 121) นับเป็นการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 ภายในยีนโดยเริ่มนับลำดับที่ 123 เป็นนิวคลีโอไทด์ตัวแรก เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่ผิดปกติ โดยมีกรดอะมิโนในลำดับที่ 11 เปลี่ยนไปจาก Proline เป็น Arginine

LOCUS NM_000030 1500 bp mRNA linear PRI 16-MAR-2008

DEFINITION Homo sapiens alanine-glyoxylate aminotransferase (*AGXT*), mRNA.

ACCESSION NM_000030 NM_016236 CDS 123..1301

1	ccggaagccc	atccaccaat	cctcacctct	cacctctgtg	tccgcctgc	tgggaaatat
61	tccaggcttt	ggccaaggcc	agtcagccc	cagggtccc	agcggcaggt	tgggtgcgga
121	ccatggcctc	tcacaagctg	ctggtgacct	cccccaaggc	cctgtcaag	ccctctcca
181	tcccaacca	gtcctctgtg	gggcctggtc	cttccaacct	gcctcctcgc	atcatggcag
241	ccggggggct	gcagatgata	gggtccatga	gcaaggatat	gtaccagata	atggacgaga
301	tcaaggaagg	catccagfac	gtgtccaga	ccaggaacct	actcacactg	gtcatctctg
361	gtcggggaca	ctgtgcctg	gaggccgccc	tggtcaatgt	gctggagcct	ggggactcct
421	tcctggttgg	ggccaatggc	atftgggggc	agcgagccgt	ggacatcggg	gagcgcatag
481	gagcccgagt	gcaccgatg	accaaggacc	ctggaggcca	ctacacactg	caggagggtg
541	aggagggcct	ggcccagcac	aagccagtgc	tgctgttctt	aaccacggg	gagtcgtcca
601	ccggcgtgct	gcagcccctt	gatggcttcg	gggaactctg	ccacaggtag	aagtgcctgc
661	tctgtgtgga	ttcgttgga	tcctggggc	ggaccccctt	ttacatggac	cggcaaggca
721	tegacatcct	gtactcgggc	tcccagaagg	ccctgaacgc	ccctccaggg	acctcgtcca
781	tctctctcag	tgacaaggcc	aaaaagaaga	tgactcccg	caagacgaag	ccctctcct
841	tctactgga	catcaagtgg	ctggccaact	tctggggctg	tgacgaccag	cccaggatgt
901	accatcacac	aatcccctgc	atcagcctgt	acagcctgag	agagagcctg	gcctcattg
961	cggaacaggg	cctggagaac	agctggcgcc	agcaccgcca	ggccgcggcg	tatctgcatg
1021	ggcgcctgca	ggcactgggg	ctgcagctct	tcgtgaaggga	cccggcgctc	cggttccca
1081	cagtaccac	tgtggctgta	cccgtggct	atgactggag	agacatcgtc	agctacgtea
1141	tagaccactt	cgacattgag	atcatgggtg	gccttggggc	ctccacgggg	aaggtgctgc
1201	ggatcggcct	gctgggctgc	aatcccacct	gcgagaatgt	ggaccgcgtg	acggaggccc
1261	tgagggcgcc	cctgcagcac	tgcccaga	agaagctgtg	acctgcccac	tggcacacag
1321	ctggcactgg	cacacacctg	tccatgccc	acctgaggg	atcaggagca	aacagacct
1381	gcaaggtcct	ccaggcctgg	ggacaggaaa	gccactgacc	cagccgggga	ggcagaacca
1441	ggcagcctcc	ctggccccag	gcagcccctt	tcctccagt	ggcacctcct	ggaaacagtc

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (NCBI, 2008)

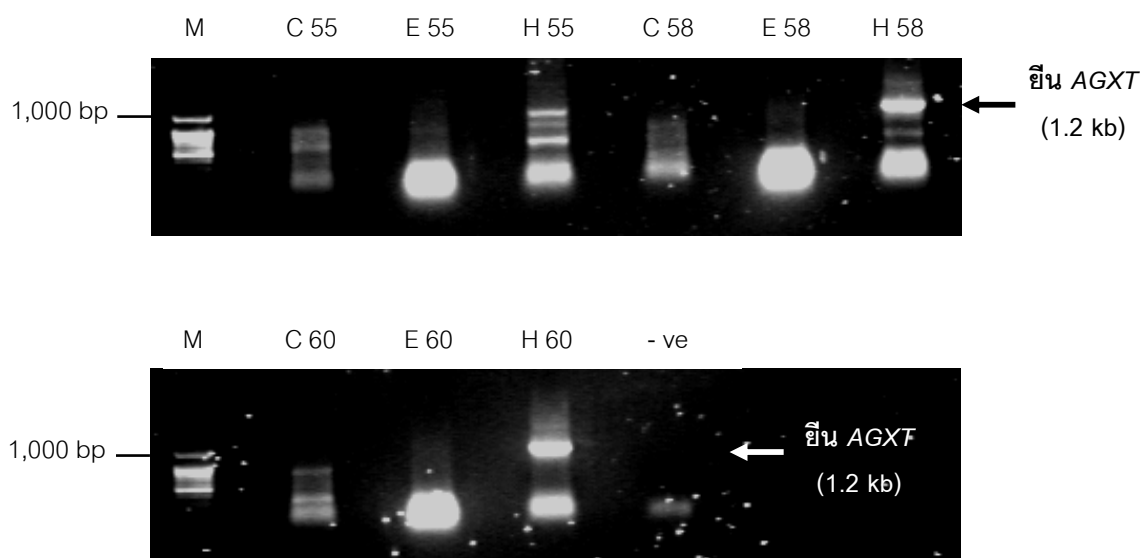
โดย ลูกศร แสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของนิวคลีโอไทด์

ตัวอักษรหนา แสดงตำแหน่งของบริเวณยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน

แถบสี แสดงตำแหน่งของบริเวณที่มีการออกแบบไพรเมอร์

1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region)

งานวิจัยนี้ใช้อาร์เอ็นเอเป็นแหล่งในการผลิตยีน AGXT เนื่องจากต้องการยีนเฉพาะในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) เท่านั้น จึงทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2 และเซลล์ COS 7 แล้วนำมาทำ RT-PCR เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอจากเซลล์แต่ละชนิดเป็นดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA) จากนั้นจึงใช้ cDNA ที่ได้เป็นต้นแบบในการทำ Gradient PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน ด้วยการใส่ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ แล้วนำ PCR products ที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลปรากฏว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน AGXT ได้จาก cDNA ของเซลล์ Hep-G2 เท่านั้น โดยเกิดแถบที่ชัดเจนตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) ที่อุณหภูมิ Annealing 2 ระดับ คือ 58 และ 60 องศาเซลเซียส แสดงในภาพที่ 14 เนื่องจากยีน AGXT ทำงานเฉพาะในเซลล์ตับ ยีนจึงมีการแสดงออกโดยถอดรหัสเป็น mRNA ได้ ส่วนยีนในเซลล์ EBV และเซลล์ COS 7 ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ไต ตามลำดับ ทำให้ไม่มีการแสดงออก จึงไม่สามารถสกัดอาร์เอ็นเอออกมาได้ เมื่อทำ PCR จึงไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT เกิดขึ้น



ภาพที่ 14 ผลการสังเคราะห์ยีน AGXT จาก cDNA ของเซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2

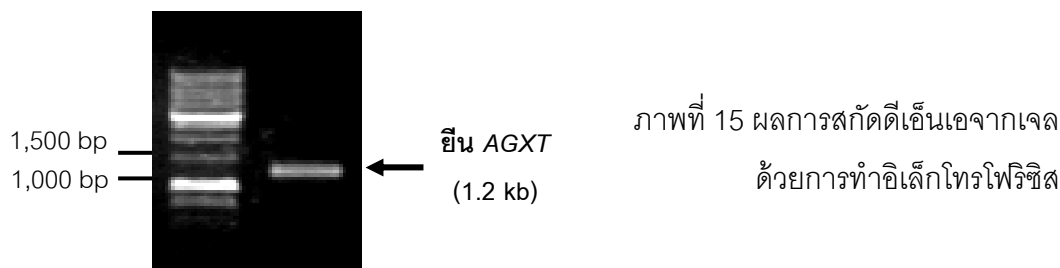
และเซลล์ COS 7 ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส จาก PCR products ของ Gradient PCR

โดย M คือ Marker, C คือ เซลล์ COS7, E คือ เซลล์ EBV, H คือ เซลล์ Hep-G2 และ

- ve คือ negative control ส่วนตัวเลขที่ระบุคู่ตัวอักษร คือ ระดับอุณหภูมิ Annealing

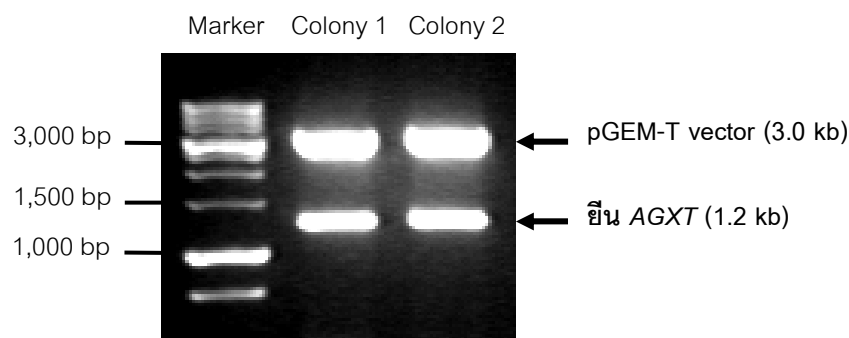
1.3 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเจล

ตัดเจลของภาพที่ 14 เฉพาะบริเวณแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1.2 kb ในช่อง H 58 และ H 60 ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีน AGXT โดยประมาณมารวมกัน แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอจากเจล จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลปรากฏว่า ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีน AGXT แสดงในภาพที่ 15 จึงสรุปว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเจลคือ ยีน AGXT นั่นเอง



1.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector)

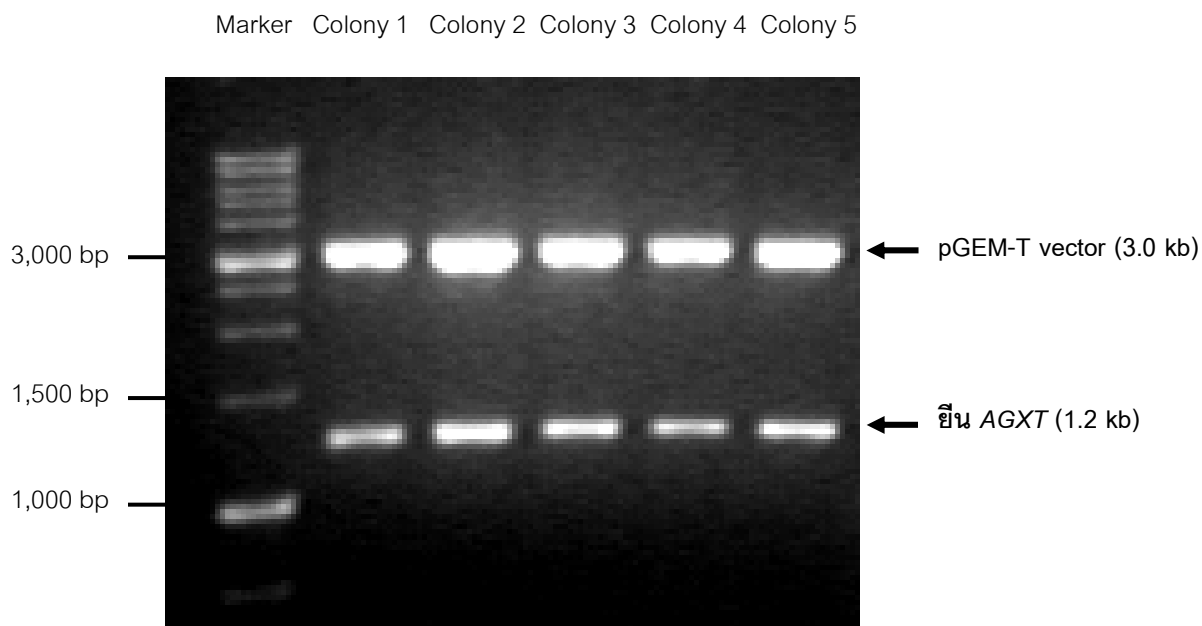
หลังจากที่นำยีน AGXT ปกติที่ได้จากการสกัดเจลมาเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector จนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม แล้วนำไปถ่ายเข้าสู่ competent cells เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด โดยอาศัยการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมี 2 โคโลนีที่สามารถเจริญบน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ได้ จากนั้นจึงสกัดพลาสมิดออกมา แล้วทำการตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam*HI กับ *Eco*RI แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบขนาดโดยประมาณของยีน AGXT ที่แทรกเข้าไปและขนาดของ pGEM-T vector ผลปรากฏว่า ทั้งสองโคโลนีมีพลาสมิดลูกผสมอยู่ในเซลล์จริง แสดงในภาพที่ 16 โดยแต่ละโคโลนีมี 2 แถบ คือ แถบบนซึ่งมีขนาด 3.0 kb เป็นแถบที่ตรงกับขนาดของ pGEM-T vector ส่วนแถบล่างเป็นแถบที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) แต่การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่สามารถตรวจสอบได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ถูกต้องหรือไม่ จึงต้องส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macro Gen โดยใช้ universal primer ในการตรวจสอบ คือ pUC/M13 Forward และ pUC/M13 Reverse ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 2 ถูกต้องทั้งหมด แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 28 และ 29) จึงใช้พลาสมิดลูกผสมจากโคโลนีที่ 2 เป็นแหล่งสำหรับทำ mutagenesis ต่อไป



ภาพที่ 16 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีน AGXT ปกติ
โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.5 ผลการสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

หลังจากนำพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector) จากโคโลนีที่ 2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ถูกต้อง มาทำ mutagenesis เพื่อสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ แล้วนำพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ Pro11Arg เชื่อมต่อกับ pGEM-T vector) ที่ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ผลปรากฏว่า มี 5 โคโลนีที่สามารถเจริญบน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ได้ จากนั้นจึงนำโคโลนีทั้งหมดมาสกัดพลาสมิด แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ต่อด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบเบื้องต้น พบว่า ทั้ง 5 โคโลนีมี พลาสมิดลูกผสมอยู่ในเซลล์จริง แสดงในภาพที่ 17 โดยแต่ละโคโลนีมี 2 แถบ คือ แถบบนซึ่งมีขนาด 3.0 kb เป็นแถบที่ตรงกับขนาดของ pGEM-T vector ส่วนแถบล่างเป็นแถบที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) หลังจากนั้นส่งทั้ง 5 โคโลนีไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macro Gen โดยใช้ universal primer คือ pUC/M13 Forward และ pUC/M13 Reverse ในการตรวจสอบ ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 3 ถูกต้องทั้งหมด ยกเว้นลำดับที่ 32 เปลี่ยนจาก C เป็น G ซึ่งได้ผลตามที่ต้องการเพื่อให้การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนในลำดับที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 30 และ 31) จึงใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีนกลายพันธุ์จากโคโลนีที่ 3 เป็นแหล่งสำหรับนำไปติดต่อเข้ากับ expression vector ต่อไป

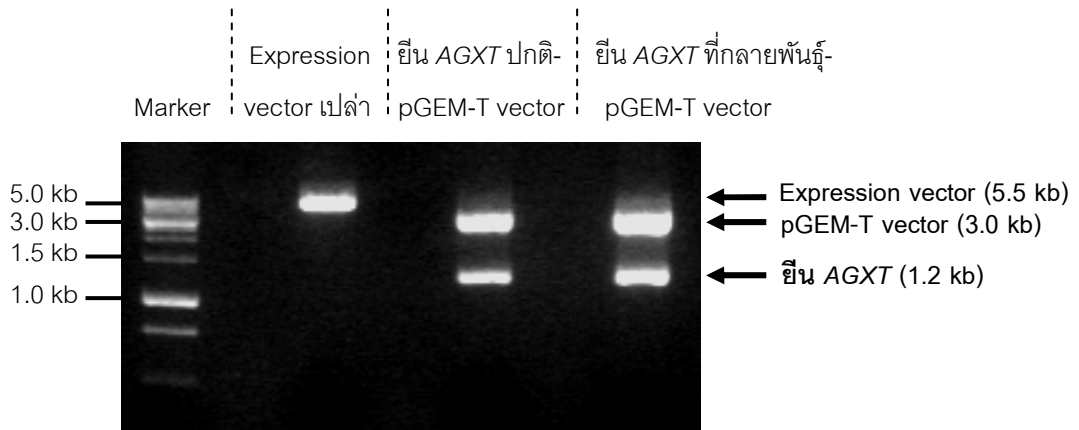


ภาพที่ 17 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีน AGXT กลายพันธุ์
โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

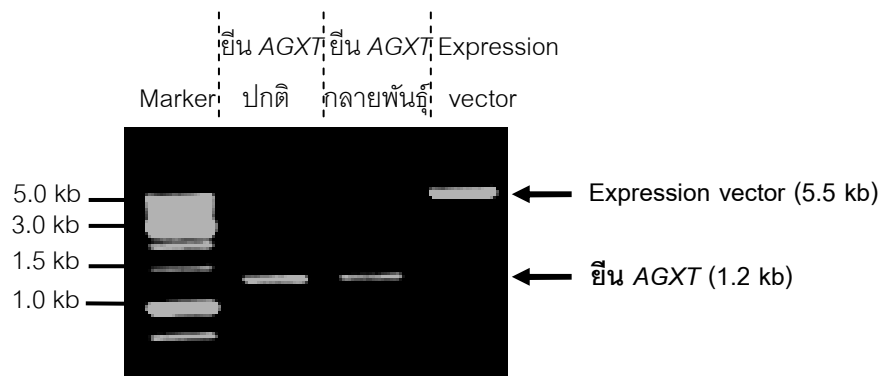
1.6 ผลการสร้างพลาสมิด (expression vector) สำหรับการทำ transfection

เป็นการนำยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ตัดต่อเข้ากับ expression vector (pcDNA3.1/V5-HisB) โดยนำ expression vector และพลาสมิดลูกผสมทั้ง 2 ชนิด คือ ยีน AGXT ที่ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ pGEM-T vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตัดให้มีปลายที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ระหว่างยีนที่ต้องการแทรกเข้าไปกับ expression vector แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงในภาพที่ 18 จากนั้นตัดเจลในแต่ละแถบ รวมทั้งหมด 3 แถบ คือ แถบ 1.2 kb 2 แถบ และ แถบ 5.5 kb ไปสกัดเจล แล้วตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงในภาพที่ 19 นำยีน AGXT แต่ละชนิดมาเชื่อมต่อกับ expression vector หลังจากนั้นจึงถ่ายพลาสมิดลูกผสมแต่ละชนิดที่ได้เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย แล้วเลือกโคโลนีจาก LB agar มาเพิ่มปริมาณใน LB broth ชนิดละ 2 โคโลนี ทำการสกัดพลาสมิด แล้วตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส ผลปรากฏว่า ทุกโคโลนีมีพลาสมิดลูกผสมอยู่ในเซลล์จริง แสดงในภาพที่ 20 โดยแต่ละโคโลนีมี 2 แถบ คือ แถบบนซึ่งมีขนาด 5.5 kb เป็นแถบที่ตรงกับขนาดของ expression vector ส่วนแถบล่างเป็นแถบที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) หลังจากนั้นส่ง ทั้ง 4 โคโลนีไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macro Gen โดยใช้ universal primer คือ BGH Reverse และ T7 Promoter ในการตรวจสอบ ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน

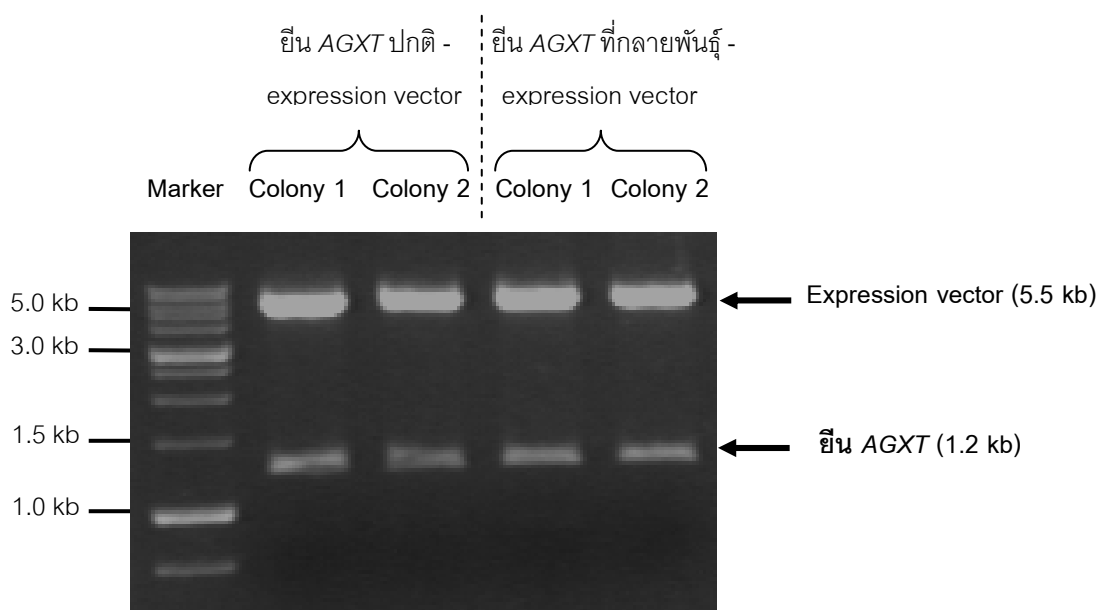
AGXT ปกติที่เชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 2 ถูกต้องทั้งหมด แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 32 และ 33) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 1 ถูกต้องตามที่ต้องการ แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 34 และ 35) หลังจากนั้นจึงนำพลาสมิดที่ได้ทั้ง 2 ชนิด transfect เข้าสู่เซลล์ COS7 ต่อไปเพื่อให้มีการผลิต เอนไซม์ AGT



ภาพที่ 18 ผลการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอจากเจลเฉพาะบริเวณ 1.2 kb และ 5.5 kb



ภาพที่ 19 ผลการตรวจสอบการสกัดดีเอ็นเอจากเจล ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพที่ 20 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ทั้ง 2 ชนิด
ชนิดละ 2 โคโลนี โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.7 ผลการทำ Transfection

หลังจาก transfect พลาสมิดทั้ง 3 ชนิด คือ expression vector เปล่า, ยีน AGXT ปกติซึ่งเชื่อมต่อกับ expression vector และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ซึ่งเชื่อมต่อกับ expression vector เข้าสู่เซลล์ COS7 แล้ว ยีนเหล่านี้จะมีการแสดงออกแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องวัดความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์แต่ละชนิดก่อนที่จะนำไปตรวจสอบการทำงานต่าง ๆ เพื่อให้ปริมาณโปรตีนรวมที่จะนำไปตรวจสอบเท่ากัน จะได้มั่นใจและยืนยันผลได้ว่า ความผิดปกติของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์นั้นเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน ซึ่งมีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์มีความบกพร่องในการทำงานจริง หากค่าที่ได้จากการตรวจสอบมีความแตกต่างกัน โดยใช้การวัดโปรตีนรวมด้วยวิธี BCA Protein ซึ่งเทียบจากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการวัดที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่งเป็นตัวอย่างผลของการวัดปริมาณโปรตีนรวมสำหรับนำไปทำ western blot โดยแต่ละหลุมต้องการโปรตีนรวม 2.5 ไมโครกรัมในปริมาณที่เท่ากัน จะเห็นว่าการเตรียมโปรตีนไปวิเคราะห์นั้นก็ใช้ปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเพื่อสุดท้ายโปรตีนรวมจากแต่ละเซลล์จะได้มีปริมาณเริ่มต้นเท่ากัน

Micro BCA Assay (AGXT ; PH1) 18/11/2552

Standard Curve

OD	0.022	0.039	0.075	0.104	0.136	0.195	0.244
Conc (mg/ml)	0.125	0.250	0.500	0.750	1.000	1.500	2.000

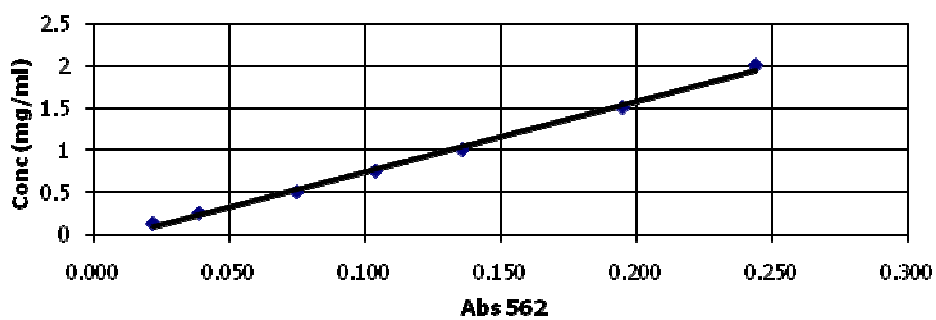
Total Volume 50 ul (3.5x loading buffer 14.3 ul + Protein + RIPA)

ID	OD	Concentration			2.5 ug	
		ug/ul	dilution factor	Total Protein (ug/ul)	Protein	RIPA
Wild type	0.088	0.637	5	3.19	0.8	34.9
Pro11Arg	0.09	0.654	5	3.27	0.8	34.9
Empty vector	0.098	0.721	5	3.60	0.7	35.0

Standard Curve

$$y = 8.365x - 0.098$$

$$R^2 = 0.996$$

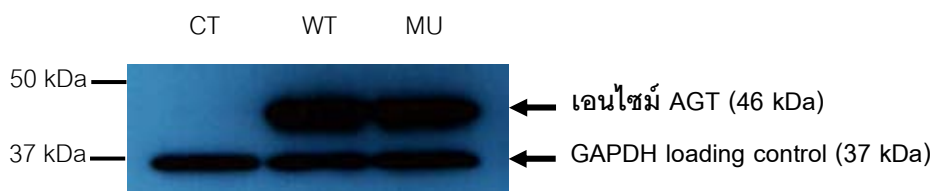


ภาพที่ 21 ตัวอย่างผลของการวัดปริมาณโปรตีนรวม สำหรับนำไปทำ Western blot ซึ่งแต่ละหลุมต้องการปริมาณโปรตีนรวมเท่ากันคือ 2.5 μ g

2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์

เป็นขั้นตอนเพื่อตรวจสอบความสามารถของยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ในการผลิตเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี western blot เทียบกับเซลล์ COS7 ที่ได้รับ expression vector เปล่าเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งผลจากการทำ western blot แสดงให้เห็นว่า ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ยังคงสามารถผลิตเอนไซม์ AGT ซึ่งมีขนาด 46 kDa ได้ตามปกติ เมื่อเทียบกับยีน AGXT ปกติ ดังภาพที่ 22 ส่วนเซลล์ COS7 ที่ได้รับ expression vector เปล่าไม่มีการผลิตเอนไซม์ AGT แสดงให้เห็นว่า โดยปกติยีน AGXT ไม่มีการแสดงออกในเซลล์ COS7 ซึ่งเป็นเซลล์ไต หรือถ้ามีการแสดงออกคงมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ สอดคล้องกับผลการสกัดอาร์เอ็นเอ (mRNA) ซึ่งต่อมาจะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอคู่ผสม (cDNA) แล้วใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน AGXT ปรากฏว่า การทำ PCR ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ เนื่องจากไม่มีต้นแบบ ด้วยเหตุนี้เองผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ COS7 เป็นเซลล์สำหรับถ่ายพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าไป หากยีน AGXT มีการแสดงออกโดยผลิตเอนไซม์ AGT แสดงว่าเป็นผลจากการทำงานของยีน AGXT ที่เชื่อมกับ expression vector เท่านั้น ไม่เกี่ยวข้องกับยีน AGXT ที่มีอยู่ก่อนแล้วภายในเซลล์ COS7



ภาพที่ 22 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี western blot

โดย CT คือ โปรตีนที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่มี vector เปล่า

WT คือ โปรตีนที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่มียีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ expression vector

และ MU คือ โปรตีนที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่มียีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

เชื่อมต่อกับ expression vector

2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

เป็นขั้นตอนเพื่อตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี Semiautomated spectrophotometric โดยนำโปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ 5 ชนิด คือ เซลล์ HEP-G2, เซลล์ COS7 เปล่า, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ปกติ, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg และเซลล์ COS7 ที่มี expression vector เปล่า มาวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ทั้งก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และหลังใส่เอนไซม์ LDH (A2) ซึ่งทำ 3 ซ้ำแล้วนำค่าเฉลี่ย A1 หักล้างด้วยค่าเฉลี่ย A2 (A1 – A2) เหตุที่ค่า A1 สูงกว่าค่า A2 เนื่องจาก NADH ซึ่งเป็น cofactor ของเอนไซม์ LDH สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เมื่อเอนไซม์ LDH ทำงาน NADH จะถูกเปลี่ยนเป็น NAD⁺ ซึ่งไม่สามารถดูดกลืนแสงได้ จึงทำให้ค่า A2 ลดลง สำหรับโปรตีนที่ได้จากแต่ละเซลล์ต้องเตรียม blank แยกจากกันชนิดละหลอดด้วย ซึ่งหลอด blank ต่างจากหลอดตัวอย่างตรงที่ไม่เติม Sodium glyoxylate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ AGT ลงไปตั้งแต่แรก แต่เติมหลังจากที่หยุดปฏิกิริยาด้วย TCA แล้ว ทำให้เอนไซม์ AGT ในหลอด blank ไม่มีการทำงาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่างหักล้างด้วยค่าการดูดกลืนแสงของหลอด blank จะได้ค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ AGT อย่างแท้จริง (ΔA) การวัดนี้ทำทั้งหมด 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย ดังข้อมูลในภาคผนวก ข จากนั้นนำค่าทั้งหมดที่ได้จากการวัดไปคำนวณปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น เพื่อวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT ตามสูตรในภาพที่ 23 ทำให้ได้ข้อมูลเป็นไปตามตารางที่ 13

$$\text{ปริมาณโปรตีน (}\mu\text{mol/h/mg)} = \frac{V \times D}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

โดยที่ V = ปริมาตรรวมทั้งหมดในหลอด = 0.78 ml

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm
= 6.3 l x mmol⁻¹ x cm⁻¹

d = ความกว้างของคิวเวตที่แสงผ่าน = 1 cm

v = ปริมาตรของตัวอย่างที่นำวัดค่าการดูดกลืนแสง = 0.06 ml

D = จำนวนเท่าของการเจือจาง (dilution factor) = 3

ภาพที่ 23 สูตรการคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น สำหรับวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

ตารางที่ 13 ข้อมูลของผลการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT

ชนิดเซลล์	ครั้งที่	ΔA_s	ΔA_b	ΔA	ปริมาณ โปรตีน ($\mu\text{mol/h/mg}$)	ปริมาณ โปรตีนเฉลี่ย ($\mu\text{mol/h/mg}$)	S.D.
COS7	1	0.009	0.002	0.007	0.13	0.087	0.038
	2	0.004	0.001	0.003	0.06		
	3	0.008	0.004	0.004	0.07		
Hep-G2	1	0.029	0.002	0.019	0.35	0.317	0.029
	2	0.019	0.003	0.016	0.30		
	3	0.017	0.001	0.016	0.30		
Empty vector	1	0.008	0.004	0.004	0.07	0.073	0.015
	2	0.005	0.002	0.003	0.06		
	3	0.007	0.002	0.005	0.09		
Wild type	1	0.194	0.005	0.189	3.51	3.213	0.259
	2	0.166	0.003	0.163	3.03		
	3	0.170	0.003	0.167	3.10		
Pro11Arg	1	0.064	0.001	0.063	1.17	1.007	0.249
	2	0.043	0.004	0.039	0.72		
	3	0.062	0.001	0.061	1.13		

หมายเหตุ COS7 คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 เปล่า

Hep-G2 คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ Hep-G2 เปล่า

Empty vector คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่ได้รับ expression vector เปล่า

Wild type คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่ได้รับยีน AGXT ปกติซึ่งเชื่อมต่อกับ
expression vector

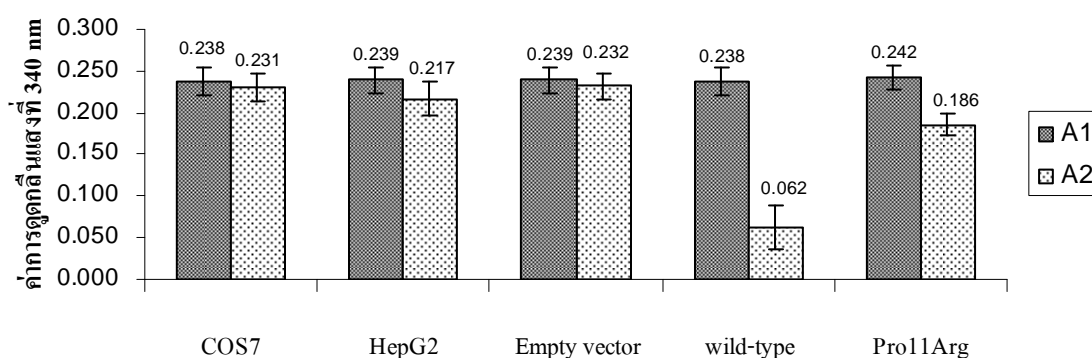
Pro11Arg คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่ได้รับยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ซึ่ง
เชื่อมต่อกับ expression vector

$\Delta A_s = A_1 - A_2$ ของหลอดตัวอย่าง (sample)

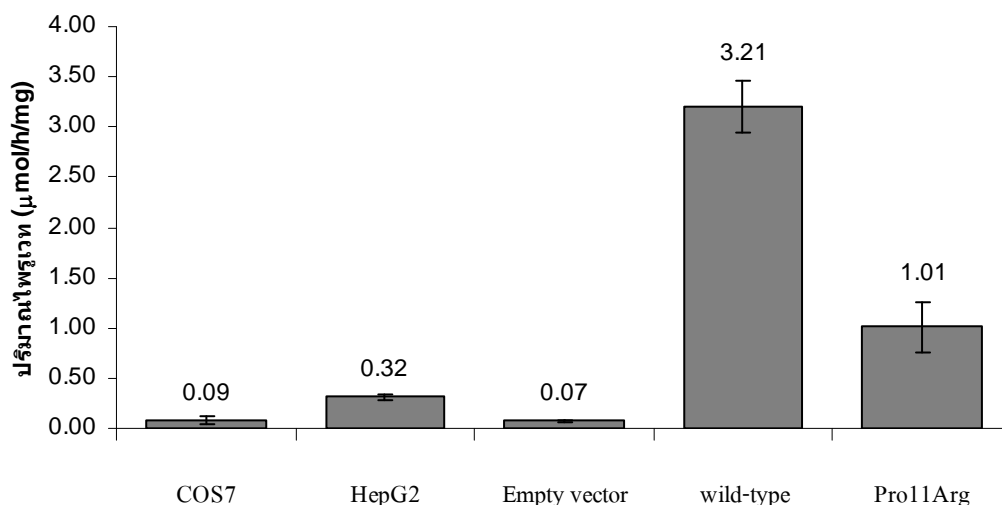
$\Delta A_b = A_1 - A_2$ ของหลอด blank

$\Delta A = \Delta A_s - \Delta A_b$

ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงเป็นกราฟดังภาพที่ 24 จะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) ของทุกชนิดตัวอย่างมีความใกล้เคียงกัน แต่หลังจากใส่เอนไซม์ LDH พบว่าค่าการดูดกลืนแสง (A2) ลดลงแตกต่างกัน โดยเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบปกติมีความแตกต่างระหว่างค่า A1 กับค่า A2 มากที่สุด รองลงมาคือ เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg ตามด้วยเซลล์ Hep-G2 เปลา่ แม้ว่าจะเป็นเซลล์ตับ แต่ระดับการแสดงออกของยีน (การผลิตเอนไซม์ AGT) ยังน้อยกว่าเซลล์ 2 ชนิดแรกซึ่งเป็น over expression ส่วนเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยพลาสมิดเปล่า (empty vector) และเซลล์ COS7 เปลา่ มีความแตกต่างระหว่างค่า A1 กับค่า A2 น้อยมาก ซึ่งแทบจะไม่แตกต่างกัน ที่เป็นเช่นนี้ เพราะโดยปกติเอนไซม์ AGT จะแสดงออกเฉพาะในเซลล์ตับ แต่เซลล์ COS7 เป็นเซลล์ไต ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ western blot ที่ไม่พบเอนไซม์ AGT ในเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วย พลาสมิดเปล่า (empty vector) สำหรับภาพที่ 25 แสดงให้เห็นถึงปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบในแต่ละชนิดตัวอย่าง โดยถ้ามีปริมาณโปรตีนมาก แสดงว่าเอนไซม์ AGT มีความสามารถในการทำงานได้ดีมากด้วย ซึ่งพบว่า เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบปกติ มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย $3.21 \pm 0.26 \mu\text{mol/h/mg}$ ในขณะที่เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg (Pro11Arg AGXT) มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย $1.01 \pm 0.25 \mu\text{mol/h/mg}$ ซึ่งน้อยกว่าประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีน AGXT ปกติ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีความสามารถในการทำงานเพียง 31% ซึ่งลดลง 69% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีน AGXT ปกติ



ภาพที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และหลังใส่เอนไซม์ LDH (A2)



ภาพที่ 25 กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ เพื่อดูความสัมพันธ์ในภาพรวมของปริมาณไซโตไคน์เฉลี่ยที่ได้จากเซลล์ทั้ง 5 ชนิด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS 17 ผลที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 14 สามารถสรุปได้ว่า ชนิดของตัวอย่างอย่างน้อย 1 ชนิดมีค่าเฉลี่ยปริมาณไซโตไคน์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 14 ค่าทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA

Oneway ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig. (P-value)
Between Groups	21.121	4	5.280	200.363	.000
Within Groups	.264	10	.026		
Total	21.384	14			

โดยที่สมมติฐาน คือ H_0 : ปริมาณเฉลี่ยของไซโตไคน์ในแต่ละชนิดตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างกัน

H_a : ปริมาณเฉลี่ยของไซโตไคน์อย่างน้อย 1 ชนิดตัวอย่างมีค่าแตกต่างกัน

จากตาราง ANOVA ได้ค่า P-value = 0 → ยอมรับ H_a

เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ด้วยวิธี One-way ANOVA แล้วพบว่า มีปริมาณเฉลี่ยของไฟรูเวทอย่างน้อย 1 ชนิดตัวอย่างมีค่าแตกต่างกัน แต่ไม่สามารถระบุได้ว่า ปริมาณเฉลี่ยของไฟรูเวทจากเซลล์คู่ใดที่แตกต่างกันบ้าง จึงต้องทำการเปรียบเทียบโดยการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ด้วยวิธี Post Hoc Tests ซึ่งเป็น Multiple Comparisons ทำให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลทีละคู่ได้ โดยเลือกการวิเคราะห์แบบ Tukey HSD ด้วยโปรแกรม SPSS 17 ข้อมูลที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 15 ซึ่งสรุปผลได้ว่า สามารถแบ่งชนิดตัวอย่าง เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก (COS7 HepG2 และ Empty vector) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณไฟรูเวทไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างทั้งกับ wild type และ Pro11Arg AGXT กลุ่มที่สอง (wild type AGXT) และกลุ่มที่สาม (Pro11Arg AGXT) โดยที่ wild type และ Pro11Arg AGXT มีค่าเฉลี่ยของปริมาณไฟรูเวทแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลที่แสดงถึงความแตกต่างระหว่างคู่ที่เปรียบเทียบกัน ดังตารางที่ 16 ซึ่งสามารถเปรียบเทียบชนิดตัวอย่างทีละคู่ได้จากค่า P-value (Sig) โดยถ้าคู่ใดมีค่า P-value \leq 0.01 แสดงว่า คู่นั้นมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 15 สรุปผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD

Tukey HSD^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
Empty vector	3	.0733		
COS7	3	.0867		
HepG2	3	.3167		
Pro11Arg AGXT	3		1.0067	
wild type AGXT	3			3.2133
Sig.		.406	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD
โดยการเปรียบเทียบทีละคู่

Post Hoc Tests (Multiple Comparisons)

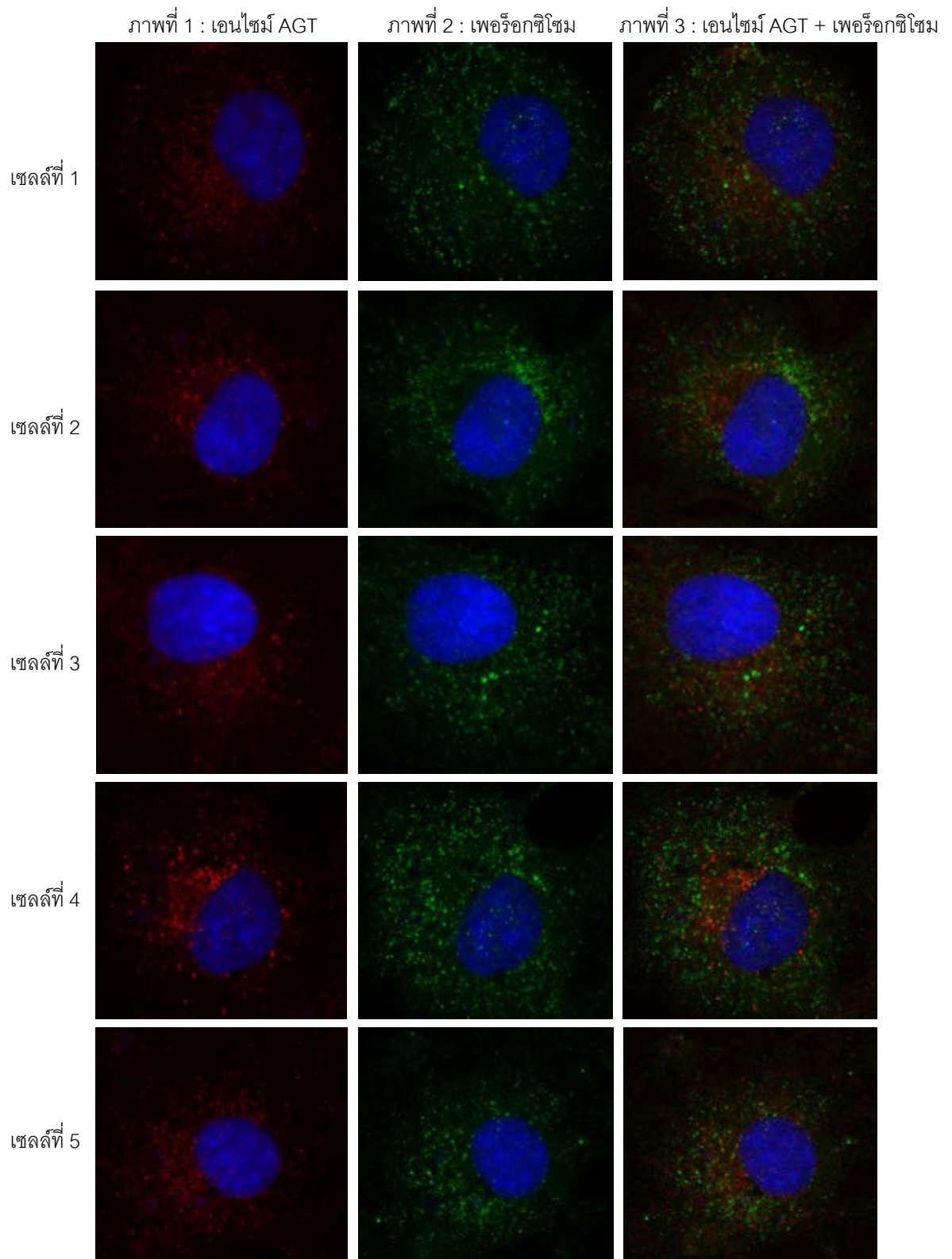
Data (Tukey HSD)

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. (P-value)	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
COS7	HepG2	-.23000	.13255	.457	-.8051	.3451
	Empty vector	.01333	.13255	1.000	-.5618	.5884
	wild type AGXT	-3.12667*	.13255	.000	-3.7018	-2.5516
	P11R AGXT	-.92000*	.13255	.000	-1.4951	-.3449
HepG2	COS7	.23000	.13255	.457	-.3451	.8051
	Empty vector	.24333	.13255	.406	-.3318	.8184
	wild type AGXT	-2.89667*	.13255	.000	-3.4718	-2.3216
	P11R AGXT	-.69000*	.13255	.003	-1.2651	-.1149
Empty vector	COS7	-.01333	.13255	1.000	-.5884	.5618
	HepG2	-.24333	.13255	.406	-.8184	.3318
	wild type AGXT	-3.14000*	.13255	.000	-3.7151	-2.5649
	P11R AGXT	-.93333*	.13255	.000	-1.5084	-.3582
wild type AGXT	COS7	3.12667*	.13255	.000	2.5516	3.7018
	HepG2	2.89667*	.13255	.000	2.3216	3.4718
	Empty vector	3.14000*	.13255	.000	2.5649	3.7151
	P11R AGXT	2.20667*	.13255	.000	1.6316	2.7818
P11R AGXT	COS7	.92000*	.13255	.000	.3449	1.4951
	HepG2	.69000*	.13255	.003	.1149	1.2651
	Empty vector	.93333*	.13255	.000	.3582	1.5084
	wild type AGXT	-2.20667*	.13255	.000	-2.7818	-1.6316

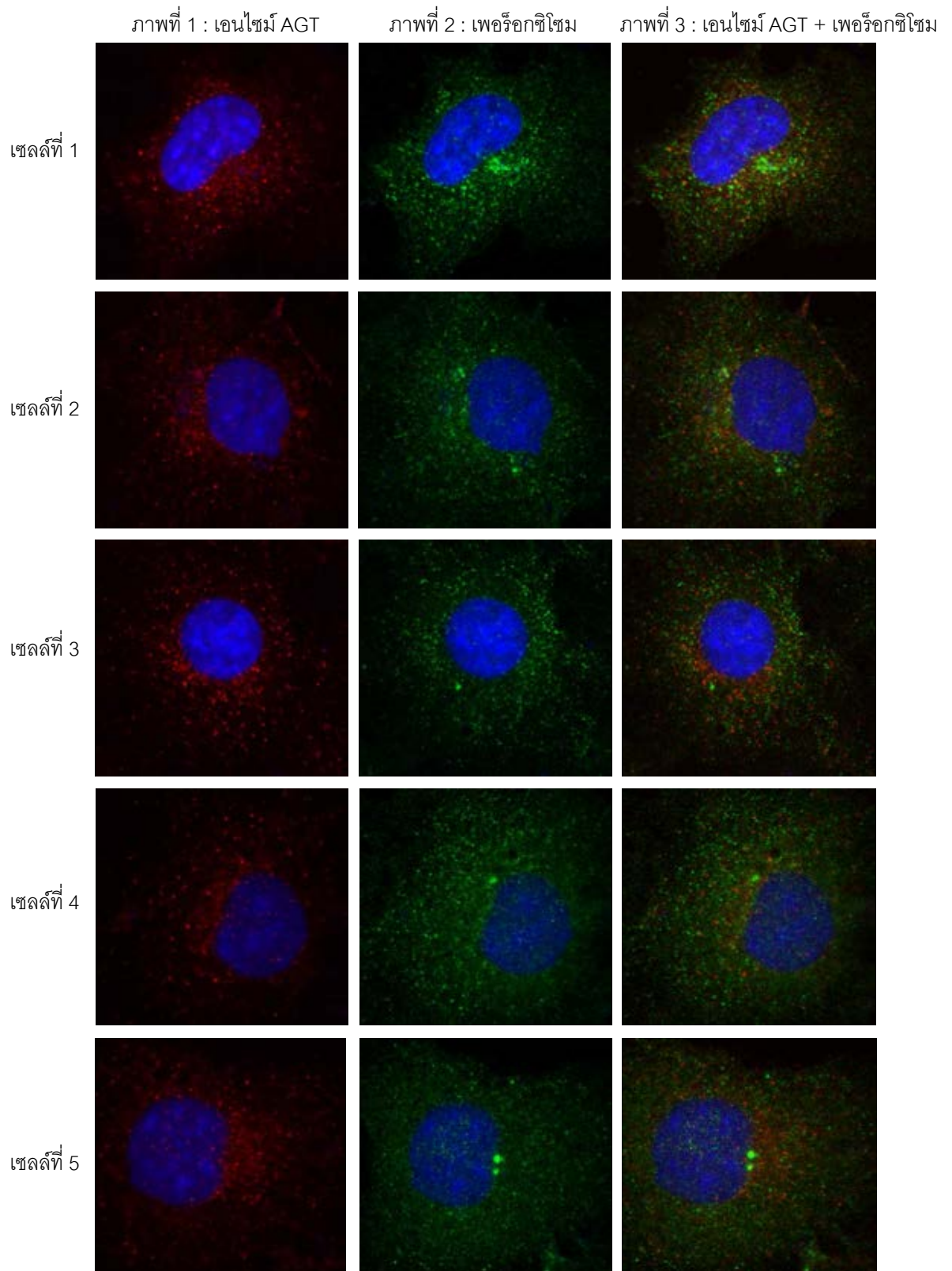
*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

2.3 การตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์

จากการตรวจสอบด้วยวิธี immunofluorescence พบว่า ในเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ ดังภาพที่ 26 มีรูปแบบการย้อมติดสีของเอนไซม์ AGT (สีแดง) โดยถูกทำให้เห็นด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน V5 ที่ผลิตจากยีนใน expression vector ซึ่งใช้เป็น marker ของเอนไซม์ AGT ไม่เหมือนกับรูปแบบของเพอร์อกซิโซม (สีเขียว) โดยถูกทำให้เห็นด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน catalase ซึ่งใช้เป็น marker ของเพอร์อกซิโซม เมื่อเทียบกับผลที่ได้จากเอนไซม์ AGT ปกติ ดังภาพที่ 27 พบว่ารูปแบบจะคล้ายคลึงกัน ทาบทับกันสนิท ทำให้เมื่อซ้อนทับสีกันในภาพที่ 3 ของแต่ละเซลล์ สีที่ได้จึงเปลี่ยนเป็นสีส้ม แต่ในบางบริเวณอาจเห็นเป็นสีแดงอยู่ เนื่องจากการติดสีของสีแดงเข้มมาก ส่วนสีเขียวติดแบบจาง ๆ ทำให้เมื่อซ้อนทับสีกันจึงปรากฏเป็นสีแดงแทนที่จะเป็นสีส้ม แต่ขณะที่ในเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์มีบางบริเวณที่สีแดงไม่ทับซ้อนกับสีเขียวประมาณ 20% แสดงว่า เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ประมาณ 20% นั้นถูกส่งไปยังออร์แกเนลล์อื่นที่ผิดตำแหน่งหรืออาจติดอยู่ที่เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม ไม่ได้ถูกส่งไปยังเพอร์อกซิโซมตามปกติ โดยผลการวิเคราะห์นั้นได้มาจากการเลือกจุดสีแดงในภาพที่ 1 ของแต่ละเซลล์ทั้งเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์และปกติ แล้วเปรียบเทียบกับตำแหน่งเดียวกันในภาพที่ 2 ของเซลล์เดียวกัน ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 เพื่อตรวจสอบว่าสีแดงในภาพที่ 1 ซ้อนทับกับสีเขียวในภาพที่ 2 หรือไม่ ภาพละ 20 จุด พบว่าในกลุ่มเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีค่าเฉลี่ยประมาณ 4 จุดที่สีแดงไม่ซ้อนทับกับสีเขียว



ภาพที่ 26 การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่สังเคราะห์จากเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg ด้วยวิธี immunofluorescence (60X) โดย สีแดง คือ เอนไซม์ AGT, สีเขียว คือ เพอร์ออกซิโซม, และ สีน้ำเงิน คือ นิวเคลียส



ภาพที่ 27 การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่สังเคราะห์จาก
 เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบปกติ ด้วยวิธี immunofluorescence (60X)
 โดย สีแดง คือ เอนไซม์ AGT สีเขียว คือ เพอร์ออกซิโซม และ สีนํ้าเงิน คือ นิวเคลียส

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ไมโครปิเปต : P2 (0.1-2 μ l), P10 (0.5-10 μ l), P20 (5-20 μ l), P100 (20-100 μ l), P1000 (0.1-1 ml) (Gilson, France)
2. ทิป : 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l (Elkay, USA)
3. ทิปแบบมีไส้กรอง : 10 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l (Elkay, USA)
4. หลอดชนิด Microcentrifuge : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (Bio-RAD, Elkay, USA)
5. หลอดชนิด Polypropylene conical : 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)
6. ปีกเกอร์ : 50 ml, 100 ml, 200ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
7. ขวดรูปชมพู่ : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
8. ขวดดูแรน : 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Duran, Germany)
9. กระบอกตวง : 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1,000 ml (Witeg, Germany)
10. แท่นวางหลอด (rack) (Autopack, USA)
11. เทอร์โมมิเตอร์ (Precision, Germany)
12. พาราฟิล์ม (American National Can, USA)
13. พลาสติกสำหรับห่อ (Diamond, USA)
14. กระดาษฟลอยด์ (Diamond, USA)
15. ปิเปต บอย (Tecnomara, Switzerland)
16. เครื่องวอร์เท็กซ์ (Scientific Industry, USA)
17. เครื่องวัดค่า pH (Eutech Instrument, USA)
18. Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
19. แท่งแม่เหล็ก (Agimatic-e, China)
20. เครื่องเซนทริฟิวจ์สำหรับหลอดชนิด Polypropylene conical (J.P.Selecta, Spain)
21. เครื่องเซนทริฟิวจ์สำหรับหลอดชนิด Microcentrifuge (Eppendorf, Germany)
22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Mastercycler personal) (Eppendorf, Germany)
23. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler) (Hybraid, USA)
24. ถาดสำหรับเตรียมเจล พร้อมหัว (Gibco BRL, Scotland)
25. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Bio-RAD, USA)

26. เครื่องให้ความร้อน (Heat block) (Bockel, UK)
27. เครื่องบ่มเพาะเชื้อ (Incubator) (Mettler, Germany)
28. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometers) รุ่น CE9500 (Super aquarius, UK)
29. คิวเวต (Starna, UK)
30. เครื่องความถี่สูง (Ultrasonic processors) รุ่น UP100H (Dr.Hielscher GmbH, Germany)
31. Gel doc XR (Bio-RAD, USA)
32. ตู้เย็น 4 °C (Mitsubishi, Japan)
33. ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C, -80 °C (Revco, Japan)
34. เครื่องทำให้น้ำบริสุทธิ์ (Water purification equipment) (Labconco, USA)
35. วอเตอร์ บาธ (J.P.Selecta, Spain)
36. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6-well plates) (Corning, New York)
37. ขวดเลี้ยงเซลล์ : T-25, T-75 (Corning, New York)
38. ปิเปตแบบฆ่าเชื้อ (Costar® Stirpipette) : 0.2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Corning, New York)
39. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer) (Wertheim, Germany)
40. หลอดสำหรับเก็บเซลล์เพื่อแช่แข็ง (Cryotube vial) 2.0 ml (Corning, New York)
41. กล่องลดอุณหภูมิ 1°C (Cryo 1°C Freezing container) (Nalgene® Labware, USA)
42. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Macro Confocal รุ่น EZ-C1 (Nikon, Thailand)
43. ตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator) (Shel lab, USA)
44. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ สำหรับส่องเซลล์ (Motic, China)
45. ตู้เขี่ยเชื้อ (Safety cabinet) (Nuair, USA)
46. ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (Kodak, Japan)
47. ชุดเตรียมเจลแบบตั้งและชุด 2-D อิเล็กโทรโฟรีซิส (Mini-Protean 3 Cell) (Bio-RAD, USA)
48. ชุดทรานส์เฟอร์เจล (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell) (Bio-RAD, USA).
49. เครื่องหมุนหลอด 360 องศา (Biosan, Latvia)

50. เครื่องนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclaved) (Hirayama, Japan)
51. เครื่องไมโครเวฟ (Sumsung, Kaorea)
52. เครื่องซังดิลิจิตอล (Bio active, Thailand)
53. ช้อนตักสาร
54. ตู้ดูดควัน (Fume hood) (Captair, China)
55. สไลด์ (Manufacturer, China)
56. กระจกปิดสไลด์ ขนาด 24x24 mm (Wiegand, Germany)
57. เครื่อง spectrophotometer (nano drop) (Thermo scientific, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป
 - 1.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)
 - 1.2 Agarose, molecular grade (Promega, USA)
 - 1.3 Glycerol (Merck, Germany)
 - 1.4 Sodium deoxycholate (Sigma, USA)
 - 1.5 Bromphenol blue (USB, USA)
 - 1.6 Sodium phosphate dibasic (Fluka, USA)
 - 1.7 Ethidium bromide (Gibco BRL, Scotland)
 - 1.8 Potassium chloride (BDH, UK)
 - 1.9 Hydrochloric acid (Merck, Germany)
 - 1.10 Potassium phosphate monobasic (Sigma, USA)
 - 1.11 Potassium phosphate dibasic (Sigma, USA)
 - 1.12 Glycine (USB, USA)
 - 1.13 Tween-20 (Bio-Rad, USA)
 - 1.14 Sodium chloride (Merck, Germany)
 - 1.15 Sodium hydroxide (Merck, Germany)
 - 1.16 Sucrose (BDH, UK)
 - 1.17 Tris base (USB, USA)
 - 1.18 100 base pair DNA ladder (Biolab, Thailand)
 - 1.19 1 K base pair DNA ladder (Biolab, Thailand)

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR
 - 2.1 10X PCR buffer
 - 2.2 25 mM Magnesium chloride (Promega, USA)
 - 2.3 10 mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega, USA)
 - 2.4 Oligonucleotide primer (Biodesign, Thailand)
 - 2.5 5 U/μl *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)
3. สารเคมี/เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอ
 - 3.1 *Bam*HI (NEB, USA)
 - 3.2 *Eco*RI (NEB, USA)
 - 3.3 10x buffer 3 (NEB, USA)
 - 3.4 100x BSA (NEB, USA)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
 - 4.1 Yeast extract powder (Bio Basic Inc., Canada)
 - 4.2 Agar bacterial powder (Conda, Spain)
 - 4.3 Tryptone powder (Bio Basic Inc., Canada)
 - 4.4 Sodium chloride (BDH, UK)
5. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์
 - 5.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone, Thermo, USA)
 - 5.2 Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, Invitrogen, USA)
 - 5.3 100x Pen-Strep (GIBCO, Invitrogen, USA)
 - 5.4 Trypsin-EDTA (GIBCO, Invitrogen, USA)
 - 5.5 Phosphate Buffered Saline (PBS)
 - 5.6 Tryphan blue(GIBCO, Invitrogen, USA)
6. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Transfection
 - 6.1 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA)
 - 6.2 Opti-MEM Reduced Serum Medium (GIBCO, USA)
7. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย
 - 7.1 QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA)
 - 7.2 Improm-II Reverse Transcriptase Kit (Promega, USA)
 - 7.3 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)

- 7.4 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan)
- 7.5 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)
- 7.6 Mini BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, USA)
- 7.7 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo, USA)

8. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT

- 8.1 RIPA buffer
- 8.2 6x Loading buffer
- 8.3 10x Tris-Glycine
- 8.4 Runnig buffer
- 8.5 Trasfer buffer
- 8.6 Stripping buffer
- 8.7 40% Acrylamide/Bis solution (Bio-RAD, USA)
- 8.8 Non-fat dry milk (Carnation, USA)
- 8.9 Tris Buffer Saline – Tween (TBS-T)
- 8.10 mouse anti-V5 monoclonal antibody (Invitrogen, USA)
- 8.11 goat anti-mouse IgG2a (Abcam, UK)
- 8.12 rabbit anti- GAPDH (Abcam, UK)
- 8.13 goat anti-rabbit (Invitrogen, USA)
- 8.14 Ammoniumpersulphate (APS) (Bio-Rad, USA)
- 8.15 Temed (Bio-Rad, USA)
- 8.16 Sodium dodecyl sulphate (SDS) (Sigma, USA)

9. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

- 9.1 L-alanine (Sigma, USA)
- 9.2 Sodium glyoxylate (Sigma, USA)
- 9.3 Pyridoxal phosphate (Sigma, USA)
- 9.4 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.0
- 9.5 NADH (Sigma, USA)
- 9.6 1 M Potassium phosphate buffer, pH 8.0
- 9.7 Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma, USA)
- 9.8 Lactate dehydrogenase (Sigma, USA)

9.9 Lysis buffer

10. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์

10.1 Methanol (BDH, UK)

10.2 Phosphate Buffered Saline (PBS)

10.3 Triton-X (Pharmacia, Sweden)

10.4 BSA (Sigma, USA)

10.5 Vectashield with DAPI (Thermo, USA)

10.6 Mouse anti-V5 monoclonal (Invitrogen, USA)

10.7 Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG2a (Invitrogen, USA)

10.8 Rabbit anti-catalase polyclonal (Abcam, UK)

10.9 Alexa Flour 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้ แบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

1. การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพื่อผลิตเอนไซม์ AGT
2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

1. การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพื่อผลิตเอนไซม์ AGT

1.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 3 ชนิด เพื่อใช้เป็นแหล่งสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ นอกจากนี้ยังใช้เซลล์ COS 7 เป็นแหล่งสำหรับการถ่ายพลาสมิด (expression vector) เข้าไปภายในเซลล์ เพื่อให้ยีน AGXT มีการแสดงออกโดยผลิตเอนไซม์ AGT

1.1.1 EBV-transformed lymphoblastoid cell lines (EBV cells) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับการส่งถ่าย Epstein-Barr Virus (EBV) เข้าไปภายในเซลล์

1.1.2 Human hepatocellular liver carcinoma cell lines (Hep-G2 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ตับของมนุษย์

1.1.3 African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells (COS 7 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ไตของลิงชนิดหนึ่งที่พบในทวีปแอฟริกา

1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

1.2.1 การเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง (Thaw cell)

โดยปกติเซลล์เมื่อไม่มีการเพาะเลี้ยงจะถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาในระยะยาว ดังนั้นการเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์จึงต้องทำให้เซลล์ที่ถูกแช่แข็งละลายก่อน โดยนำมาอุ่นในวอเตอร์บาธที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะละลาย จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง (การเทหรือเติมสารต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ต้องทำในตู้เขี่ยเชื้อ (Safety cabinet) เพื่อให้เซลล์ปราศจากการปนเปื้อน โดยก่อนเริ่มและหลังการใช้งานต้องเปิดแสง UV เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที แล้วเช็ดทำความสะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์ทุกครั้ง ทั้งนี้หากต้องมีการนำอุปกรณ์หรือสารเคมีเข้าไปภายในตู้เขี่ยเชื้อระหว่างการใช้งาน ต้องเช็ดด้วย 70% แอลกอฮอล์ก่อนเสมอ) เติม 1X PBS 1 มิลลิลิตร แล้วดูดขึ้นลงเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ตะกอนละลายและกระจายทั่ว จากนั้นเทของเหลวทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย DMEM 10%, 1X FBS และ 1X PenStrep แล้วทำให้ตะกอนแตกกระจายออกจากกันเบา ๆ เสร็จแล้วย้ายลงในหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรอยู่ก้นหลุม รวมปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นวนและเอียงจานเลี้ยงเซลล์สลับไปมาเบา ๆ ประมาณ 5 ครั้ง เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วหลุม นำจานเลี้ยงไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.2.2 การเลี้ยงเซลล์

หลังจากเซลล์เพิ่มปริมาณเต็มหลุม ต้องมีการย้ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อในขวดเลี้ยงเซลล์ (T-Flask) ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมทิ้ง แล้วเติม 1X PBS 1 มิลลิลิตร เอียงไปมาเบา ๆ ให้ทั่วหลุม เพื่อดึงอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วดูดทิ้ง จากนั้นเติม Trypsin-EDTA 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปป้อนในตู้เลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดออกจากก้นหลุม เมื่อครบเวลาจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 1.5 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ Trypsin ผสมให้เข้ากันโดยดูดขึ้นลง จนกระทั่งเซลล์แยกกระจายออกจากกัน หลังจากนั้นย้ายไปใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 8 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และกระจายเซลล์ให้ทั่วพื้นที่ โดยวางขวดเลี้ยงเซลล์ในแนวนอนแล้วเขย่าเบา ๆ ในทิศทาง ขึ้น-ลง, ซ้าย-ขวา สลับไปมา ประมาณ 10 ครั้ง นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปเก็บไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นทุก ๆ

2-3 วัน ควรตรวจดูสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ว่าเปลี่ยนแปลงหรือไม่ ถ้าสียังไม่เปลี่ยนและเซลล์ยังไม่เพิ่มจำนวนเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ในขวดเลี้ยงเซลล์เดิม เพื่อเพิ่มอาหารให้กับเซลล์และเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ถ้าหากเซลล์มีปริมาณมาก จนกระทั่งเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ซึ่งโดยปกติสีของอาหารเลี้ยงเซลล์จะเปลี่ยนไป สามารถทำต่อได้หลายแบบดังนี้ เก็บเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาในระยะยาว หรือเก็บเซลล์ในรูปแบบตะกอนแห้งสำหรับนำไปวิเคราะห์ต่อ หรือลดปริมาณเซลล์ให้น้อยลงเหลือประมาณ 10-20% สำหรับการเลี้ยงเซลล์ในรอบต่อไป โดยเซลล์ที่เหลืออาจแบ่งเพิ่มเป็นหลาย ๆ ขวดเลี้ยงเซลล์ หรือทิ้งไปถ้าต้องการเพียงคงสภาพการเพาะเลี้ยงเซลล์ไปเรื่อย ๆ โดยไม่ต้องการจำนวนเซลล์เพิ่ม

1.2.3 การแช่แข็งเซลล์ (Freeze cell)

เป็นการนำเซลล์ไปเก็บรักษาในระยะยาว เพื่อให้คงสภาพเดิมในสภาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยก่อนเริ่มเก็บเซลล์ต้องอุ่นสารต่าง ๆ ที่ต้องใช้และกลั่นลดอุณหภูมิที่ละ 1 องศาเซลเซียส ในวอเตอร์บาร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อทุกอย่างอุ่นแล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมที่อยู่ในขวดเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติม 1X PBS 5 มิลลิลิตร เขย่าไปมาให้ทั่วแล้วดูดทิ้ง เติม Trypsin-EDTA 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 มิลลิลิตร แล้วกระจายเซลล์ออกจากกัน จากนั้นย้ายไปใส่ในหลอด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วเทของเหลวทิ้ง ใช้มือเคาะข้างหลอดเพื่อให้เซลล์กระจายออก เติม 1X PBS 5 มิลลิลิตร แล้วดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายดียิ่งขึ้น นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เสร็จแล้วเทของเหลวทิ้ง เติม Freezing Media 6 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10% DMSO ใน 1X FBS ผสมและกระจายเซลล์ให้แยกออกจากกัน จากนั้นแบ่งใส่หลอดสำหรับเก็บเซลล์ (Cryotube vial) หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด นำหลอดทั้งหมดไปใส่ในกล่องลดอุณหภูมิที่ละ 1 องศาเซลเซียส แล้วนำกล่องไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ

หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด คือ เซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2 และเซลล์ COS 7 จนได้ปริมาณเซลล์พอเหมาะ (ประมาณ 10 ล้านเซลล์) สำหรับเป็นแหล่งในการสกัดอาร์เอ็นเอจึงทำการเก็บเซลล์ในรูปตะกอนแห้ง โดยทำตามขั้นตอนเดียวกันกับการแช่แข็งเซลล์ แต่ไม่ต้องเติม Freezing media จากนั้นจึงนำตะกอนเซลล์แต่ละชนิดที่ได้มาสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วย QIA amp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้ เติมนัฟเฟอร์ RLT 600 ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์แตก ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จนกระทั่งเซลล์กระจายออก ไม่เป็นกลุ่มก้อน จากนั้นย้ายของเหลวทั้งหมดมาใส่ QIA shredder spin column ซึ่งซ้อนทับอยู่บน collection tube แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บของเหลวที่ได้ซึ่งอยู่ใน collection tube มาเติม 70% เอทานอล 600 ไมโครลิตร แล้วผสมในเข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง เมื่อเข้ากันแล้วให้ย้ายของเหลวทั้งหมดรวมทั้งตะกอนซึ่งอาจเกิดขึ้นเล็กน้อยลงใน QIAamp spin column หลอดใหม่ซึ่งซ้อนทับอยู่บน collection tube หลอดเดิม แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที เสร็จแล้วย้าย QIAamp spin column ไปซ้อนทับบน collection tube หลอดใหม่ จากนั้นเติมนัฟเฟอร์ RW1 700 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ย้าย QIAamp spin column ไปซ้อนทับบน collection tube หลอดใหม่ เติมนัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อล้างตะกอนอีกรอบ จากนั้นย้าย QIAamp spin column ไปซ้อนทับบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม RNase-Free water 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ QIAamp spin column เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอให้อยู่ในรูปสารละลาย แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เสร็จแล้วจะได้อาร์เอ็นเอที่ละลายอยู่ในน้ำซึ่งอยู่ในหลอด Microcentrifuge ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

1.4 การสังเคราะห์ยีน AGXT ปกติ

1.4.1 RT – PCR

นำอาร์เอ็นเอของเซลล์แต่ละชนิดที่ได้มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่ผสม (cDNA) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน AGXT ปกติต่อไป โดยใช้ Improm-II Reverse Transcriptase Kit (Promega, USA) ซึ่งมีขั้นตอนแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการนำไพรเมอร์ (Oligo (dT)) มารวมกับอาร์เอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบ โดยเตรียมอาร์เอ็นเอจากเซลล์แต่ละชนิดที่ใช้เป็นต้นแบบแยกแต่ละหลอด ปริมาตร 10.1 ไมโครลิตร ผสมกับไพรเมอร์ชนิด Oligo (dT) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำแต่ละหลอดไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วรีบย้ายไปให้ความเย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ในระหว่างรอให้เตรียม 5X Improm II™ Reaction Buffer 4 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ 2.4 ไมโครลิตร 10 mM dNTP Mixture 1 ไมโครลิตร Ribonuclease Inhibitor (RNasin) 0.5 ไมโครลิตร และ ImProm II™ Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร เมื่อครบ 5 นาทีแล้วจะเข้าสู่ส่วนที่ 2 ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่ผสมจากอาร์เอ็นเอต้นแบบ โดยนำสารผสมในส่วนแรกไปรวมกับสารผสมที่ได้เตรียมไว้ซึ่งมีปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร นำแต่ละหลอดไปใส่เครื่อง PCR แล้วตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาในขั้นต่าง ๆ ดังนี้ ขั้นแรก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับอาร์เอ็นเอต้นแบบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่ผสม และขั้นสุดท้าย 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Reverse Transcriptase หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอคู่ผสมของเซลล์แต่ละชนิดที่ได้มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

1.4.2 การเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region)

นำดีเอ็นเอคู่ผสมของเซลล์แต่ละชนิดมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) ด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่ออกแบบไว้ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับตัดต่อเข้ากับ Expression vector ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน AGXT โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (CDS) จากฐานข้อมูลใน Pubmed ของ NCBI หลังจากออกแบบไพรเมอร์เสร็จ นำไพรเมอร์ที่ได้ทั้ง 2 ชนิดมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อยีน AGXT ด้วยโปรแกรม BLAST แล้วส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

ไพรเมอร์ไปสังเคราะห์ที่บริษัท Biodesign สำหรับส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR และสภาวะต่าง ๆ ในการทำ Gradient PCR แสดงไว้ในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ PCR

ชื่อ	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' to 3')
<i>AGXT-BamHI-F</i>	CCAGGATCCCAGCGGCAGGTT
<i>AGXT-EcoRI-R</i>	CTGAATTCCAGTGGGCAGGTCTCAGCTT

หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตัวหนาคือบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางที่ 2 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR buffer	2.0	1X
2. 25 mM MgCl ₂	1.2	1.5 mM
3. 10 mM dNTPs	0.4	0.2 mM
4. 10 μM Forward primer (<i>AGXT-BamHI-F</i>)	0.3	0.15 μM
5. 10 μM Reverse primer (<i>AGXT-EcoRI-R</i>)	0.3	0.15 μM
6. 5 U/μl Taq Polymerase	0.1	0.5 U
7. Distilled water	13.7	
8. cDNA (แยกชนิดละหลอด)	2.0	
ปริมาตรรวมทั้งหมด	20.0	

ตารางที่ 3 สภาวะในการทำ Gradient PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1. Initial denaturation	94	5 นาที
2. PCR cycle (40 รอบ)		
- Denature	94	45 วินาที
- Annealing	55, 58 และ 60	45 วินาที
- Extension	72	1 นาที 20 วินาที
3. Final extension	72	15 นาที
4. Holding	15	

1.4.3 อิเล็กโทรโฟรีซิส

นำ PCR product ของเซลล์แต่ละชนิดมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจหา ยีน AGXT ที่ได้จากการทำ PCR บนแผ่น agarose gel 1.5% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel-docXR

1.4.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเจล

เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจึงตัดเจลบริเวณนั้นซึ่งมีขนาดเท่ากับ ยีน AGXT มาสกัดโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำเจลที่ตัดได้ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปซึ่งน้ำหนักจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ลงในหลอด ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ต่อเจลหนัก 100 มิลลิกรัม นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จนกระทั่งเจลละลายหมดซึ่งทำให้สารละลายกลายเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลายในหลอด แล้วผสมให้เข้ากัน เตรียม QIAquick spin column ซึ่งซึ้นที่บอยู่บน collection tube ย้ายสารละลายทั้งหมดจากหลอด microcentrifuge มายัง QIAquick spin column เพื่อดักจับดีเอ็นเอไว้ แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ช่องเหวที่ตกลงใน collection tube ทั้งหมด นำ QIAquick spin column มาซึ้นที่บน collection tube อันเดิม เติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร เพื่อล้างให้

สะอาดแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวทั้งหมดใน collection tube แล้วนำไปปั่นตกตะกอนซ้ำอีกรอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAquick spin column มาซ้อนทับบนหลอด microcentrifuge อันใหม่ เติมนัฟเฟออร์ EB 30 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางของ QIAquick membrane เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอจะได้ดีเอ็นเอซึ่งก็คือยีน AGXT ละลายอยู่ในหลอด microcentrifuge

1.5 การสร้างและเพิ่มปริมาณพลาสมิด (pGEM-T vector) สำหรับ mutagenesis

ขั้นตอนนี้เป็น การนำยีน AGXT ปกติที่สังเคราะห์ได้มาตัดต่อเข้ากับ pGEM-T vector เกิดเป็นพลาสมิดลูกผสม แล้วถ่ายพลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ให้มีปริมาณมากพอสำหรับทำ mutagenesis ในขั้นตอนต่อไป เพื่อสังเคราะห์ยีน AGXT กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

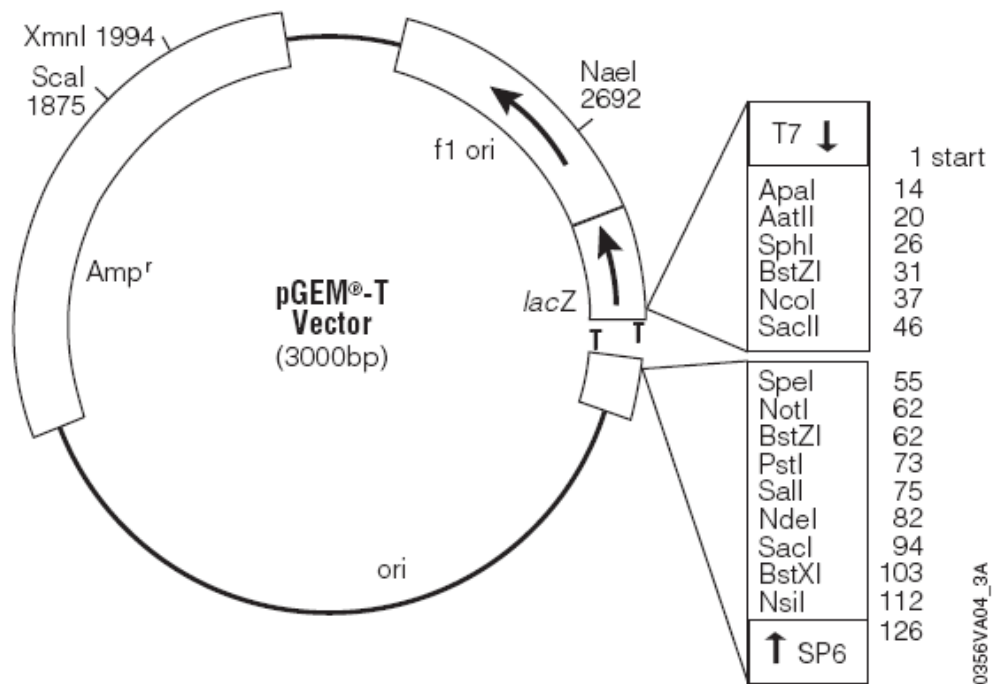
1.5.1 โครงสร้างของ pGEM-T vector

pGEM-T vector (Promega, USA) เป็นพลาสมิดที่มีคุณสมบัติพิเศษคือ มี Thymidine (T) ยื่นออกมาทางปลาย 3' ทั้งสองด้านในบริเวณตำแหน่งที่จะมีการแทรกยีนเข้าไปในพลาสมิด (insertion site, บริเวณ *lacZ*) ดังภาพที่ 11 ทำให้การเชื่อมต่อระหว่างยีนที่ต้องการแทรกกับพลาสมิดเกิดได้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น อีกทั้งยังสามารถป้องกันการกลับมาเชื่อมต่อกันเองของ พลาสมิดเปล่าโดยปราศจากยีนที่ต้องการแทรก นอกจากนี้ยังมียีนต้านยาปฏิชีวนะชนิด ampicillin ทำให้สะดวกต่อการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดเข้าไปภายใน

1.5.2 การเตรียม competent cells

นำเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5- α มาเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ จากนั้นเขี่ยโคโดนีของเซลล์แบคทีเรียมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ หลังจากนั้นทำการเจือจางโดยนำไปเทใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ ย้ายแบ่งมาใส่ในแต่ละหลอดที่ยีนในหลอด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บเซลล์ในรูปของตะกอน เทของเหลวทิ้งให้หมดจากนั้นเติม 0.1 M CaCl_2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วใช้ปิเปต บอยดูคขึ้น-ลง เพื่อให้

เซลล์แยกกระจายออกจากกัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้งให้หมด จากนั้นเติม 0.1 M CaCl₂ ที่ผสม 10% v/v glycerol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาปั่นตกตะกอนในตอนแรก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 11 โครงสร้างของ pGEM-T vector

(www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cloning)

1.5.3 การเชื่อมต่อยีน AGXT กับ pGEM-T vector (Ligation)

เตรียมสารผสมต่าง ๆ ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 4 เสร็จแล้วนำไปบ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Ligation ระหว่างยีน AGXT กับ pGEM-T vector

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 2X Rapid Ligation buffer	5.0
2. 50 ng/μl pGEM-T vector	1.0
3. 33.6 ng/μl PCR product	3.0
4. 3 U/μl T4 DNA Ligase	1.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

1.5.4 การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ competent cells (Transformation)

โดยปกติ competent cells จะถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเริ่มต้นจึงต้องทำให้เซลล์ที่ถูกแช่แข็งละลายก่อน โดยนำมาแช่ในน้ำแข็งจนกว่าจะละลาย จากนั้นนำ competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการทำ Ligation ปริมาตร 8 ไมโครลิตร โดยห้ามเขย่าแรง ๆ แล้วนำไปบ่มไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เสร็จแล้วนำไปวางในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปผสมกับ SOC media 980 ไมโครลิตร 2 M MgCl₂ 10 ไมโครลิตร และ 2 M glucose 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาทีในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วดูดของเหลวทิ้งเหลือไว้ประมาณ 100 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้น-ลงเพื่อให้ตะกอนกระจายออกจากกันและละลายในของเหลวอีกครั้ง แบ่งไปเลี้ยงปริมาตร 25 ไมโครลิตรในจานเพาะเชื้อแต่ละใบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งผสมกับ ampicillin ในอัตราส่วน 1:1,000 ซึ่งใช้เป็น marker ในการคัดเลือก ทำให้เซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดเข้าไปเท่านั้นจึงจะสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้ เนื่องจากภายในโครงสร้างของพลาสมิดมียีนต้านยา ampicillin อยู่ โดยนำไปเลี้ยงในเครื่องบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นในจานเพาะเชื้อมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยแยกโคโลนีละหลอด ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร ผสมกับ ampicillin 5 ไมโครลิตร ในหลอด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องบ่ม

เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.5.5 การสกัดพลาสมิด

สกัดพลาสมิดด้วย High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้ นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ได้จากการทำ Transformation แบ่งใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวให้หมด ในขั้นตอนนี้สามารถปั่นตกตะกอนซ้ำเพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบบที่เรียกเพิ่มเติมในหลอดเดิมได้อีก เติมน้ำ PD1 buffer ที่ผสม RNase A แล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้น-ลง เพื่อให้ตะกอนแตกกระจายออกจากกันและผสมเป็นเนื้อเดียวกับของเหลวที่เติม จากนั้นเติมน้ำ PD2 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันเบา ๆ โดยพลิกหลอดไปมาประมาณ 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งสารละลายใส แล้วเติมน้ำ PD3 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที โดยพลิกหลอดไปมาประมาณ 10 ครั้ง ห้ามเขย่าแรง ๆ นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างรอให้นำ PD Column ใส่ใน Collection Tube ขนาด 2 มิลลิลิตร เมื่อปั่นตกตะกอนเสร็จให้ดูเฉพาะของเหลวที่อยู่ด้านบนในหลอดใน PD Column แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube แล้วนำไปรองใส่กับ PD column ตามเดิม จากนั้นเติมน้ำ W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube แล้วนำไปรองใส่กับ PD column ตามเดิม จากนั้นเติมน้ำ Wash buffer ที่ผสมกับเอทานอลเรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube แล้วนำไปรองใส่กับ PD column ตามเดิม เสร็จแล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาทีอีกครั้ง เพื่อทำให้ PD Column แห้ง จากนั้นย้าย PD Column มาใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นหลอดใหม่และสะอาด แล้วเติมน้ำ Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง PD Column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เสร็จแล้วจะได้พลาสมิดที่อยู่ใน Elution buffer ในหลอด Microcentrifuge

1.5.6 การตรวจสอบพลาสมิด

เป็นการนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับที่ออกแบบไว้ในไพรเมอร์ตั้งแต่ตอนแรก 2 ชนิด คือ *Bam*HI กับ *Eco*RI เพื่อตรวจสอบขนาดโดยประมาณของยีน AGXT ที่แทรกเข้าไปและพลาสมิด โดยเตรียมสารผสมต่าง ๆ ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 5 เสร็จแล้วนำไปปั่นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิส บนแผ่น agarose gel 1.5% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel-docXR เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏว่าตรงกับขนาดของยีน AGXT และพลาสมิดเปล่าหรือไม่ ถ้าแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 แถบตรงกับขนาดของยีน AGXT และพลาสมิดจริง จึงทำการส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ที่แทรกอยู่ใน pGEM-T vector ต่อไปที่บริษัท Macro Gen เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนถูกต้องหรือไม่ โดยใช้ universal primer ในการตรวจสอบ คือ pUC/M13 Forward และ pUC/M13 Reverse

ตารางที่ 5 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 20 U/μl <i>Bam</i> HI	0.5
2. 20 U/μl <i>Eco</i> RI	0.5
3. 10 X Buffer of <i>Eco</i> RI	1.0
4. Distilled water	3.0
5. พลาสมิดที่ได้จากการสกัด	5.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

1.6 การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

ขั้นตอนนี้เป็น การนำพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ซึ่งมีลำดับเบสถูกต้องเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector) มาทำ mutagenesis โดยใช้ QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) เพื่อสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ซึ่งมีขั้นตอนในการทำดังนี้ ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน AGXT ในตำแหน่งที่ต้องการให้มีการกลายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งงานวิจัยนี้ต้องการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 จาก C เป็น G

เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่ผิดปกติ โดยมีกรดอะมิโนในลำดับที่ 11 เปลี่ยนไปจาก Proline เป็น Arginine โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (CDS) จากฐานข้อมูลใน Pubmed ของ NCBI หลังจากออกแบบไพรเมอร์เสร็จ นำไพรเมอร์ที่ได้ทั้ง 2 ชนิดมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อยีน AGXT ด้วยโปรแกรม BLAST แล้วส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์ที่บริษัท Biodesign หลังจากได้ไพรเมอร์แล้วทำ Mutant Strand Synthesis Reaction (Thermal Cycling) โดยการเตรียมส่วนผสมต่าง ๆ ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 7 เสร็จแล้วนำไปทำ PCR โดยใช้สภาวะต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ สำหรับทำ mutagenesis

ชื่อ	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' to 3')
AGXT-P11R-F	GCTGCTGGTGACCCCCGCAAGGCCCTGCTCAAGC
AGXT-P11R-R	GCTTGAGCAGGGCCTTGCGGGGGGTCACCAGCAGC

ตารางที่ 7 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Mutant Strand Synthesis Reaction

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 10X Reaction buffer	5.0
2. 5 ng/μl พลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้	2.0
3. dNTPs mix	1.0
4. 100 ng/μl Forward primer (AGXT-P11R-F)	1.25
5. 100 ng/μl Reverse primer (AGXT-P11R-R)	1.25
6. Distilled water	39.1
ปริมาตรรวมทั้งหมด	50.0
หลังจากนั้นเติม 2.5 U/μl <i>Pfu Turbo</i> DNA polymerase	1.0

ตารางที่ 8 สภาวะในการทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1. Initial denaturation	95	30 วินาที
2. PCR cycle (14 รอบ)		
- Denature	95	30 วินาที
- Annealing	55	30 วินาที
- Extension	68	7 นาที
3. Holding	15	

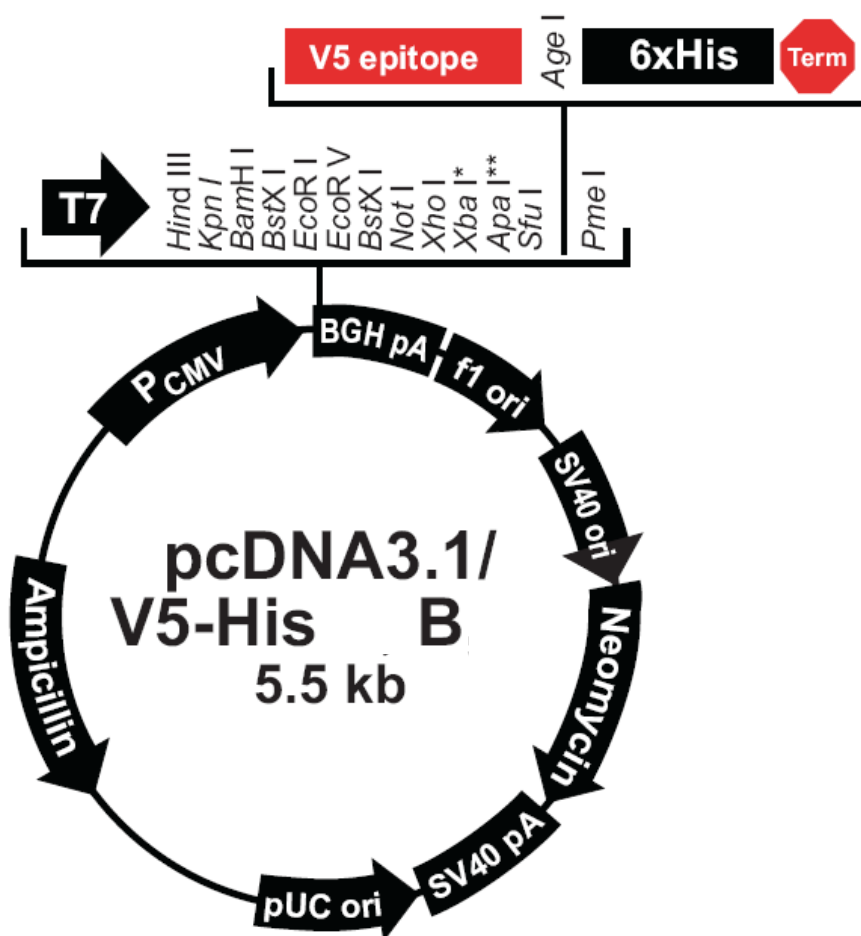
เมื่อทำ PCR เสร็จแล้ว ให้นำ Amplification products ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเติม 10 U/μl Dpn I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด แล้วใช้ไมโครปิเปตผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอน นาน 1 นาที เพื่อให้สารที่ค้างเกาะตามบริเวณต่าง ๆ ของหลอดตกลงมายังก้นหลอด จากนั้นรีบนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเสร็จจากขั้นตอนนี้จะได้พลาสมิดลูกผสมซึ่งมียีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg แทรกอยู่ หลังจากนั้นทำ transformation เพื่อนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีนกลายพันธุ์แทรกอยู่เข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเหมือนกับขั้นตอนในข้อ 1.5.4 เสร็จแล้วจึงทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ ซึ่งเหมือนกับขั้นตอนในข้อ 1.5.5 และ 1.5.6 ตามลำดับ

1.7 การสร้างและเพิ่มปริมาณพลาสมิด (expression vector) สำหรับการทำ transfection

ขั้นตอนนี้เป็นการนำยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ Pro11Arg ติดต่อกับ expression vector (pcDNA3.1/V5-HisB) เพื่อนำพลาสมิดที่ได้ทั้ง 2 ชนิด transfect เข้าสู่เซลล์ COS7 เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ AGT

1.7.1 โครงสร้างของ expression vector

pcDNA3.1/V5-HisB (Invitrogen, USA) เป็นพลาสมิดที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ออกแบบให้เป็นพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนที่แทรกเข้าไปอยู่ในระดับสูงในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสามารถตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากยีนที่แทรกอยู่ในพลาสมิดนี้ได้ เนื่องจากมีโปรตีน เช่น V5 หรือ 6X His ติดอยู่ ดังแสดงในภาพที่ 12 ทำให้ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกหรือติดตามโปรตีนที่เราสนใจในการวิจัยได้ง่าย โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ติดอยู่กับโปรตีนที่เราสนใจในการตรวจสอบ



ภาพที่ 12 โครงสร้างของ pcDNA3.1/V5-HisB ซึ่งในงานวิจัยใช้เป็น expression vector

(<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V81020>)

1.7.2 การเชื่อมต่อยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ

p.Pro11Arg เข้ากับ expression vector

นำ expression vector และพลาสมิดลูกผสมทั้ง 2 ชนิด คือ ยีน AGXT ที่ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ pGEM-T vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam*HI กับ *Eco*RI เพื่อตัดให้มีปลายที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ ระหว่างยีนที่ต้องการแทรกเข้าไปกับ expression vector โดยเตรียมส่วนผสมต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 9 นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่น agarose gel 1% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel-docXR

ตารางที่ 9 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับเตรียมตัดต่อยีน AGXT กับ expression vector

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	
	พลาสมิดลูกผสม	expression vector
1. 20 U/μl BamHI	1.0	1.0
2. 20 U/μl EcoRI	1.0	1.0
3. 10 X Buffer 3	3.0	3.0
4. 100 X BSA	0.3	0.3
4. Distilled water	4.7	23.7
5. พลาสมิดลูกผสมแต่ละชนิด	20.0	-
6. expression vector	-	1.0
ปริมาณรวมทั้งหมด	30.0	30.0

เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งมีทั้งหมด 3 แถบคือ แถบดีเอ็นเอของยีน AGXT ที่ปกติ, แถบดีเอ็นเอของยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg และแถบดีเอ็นเอของ expression vector จึงตัดเจลแต่ละบริเวณมาสกัดโดยใช้วิธีการเดียวกับในข้อ 1.4.4 แต่ในขั้นตอนสุดท้ายให้เปลี่ยนจากบัฟเฟอร์ EB มาใช้ deionized water แทน เมื่อเสร็จแล้วนำสารละลายทั้ง 3 ชนิดไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบผลจากการสกัดและดูความเข้มข้นของสารละลายที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้น ladder เมื่อทราบความเข้มข้นของสารละลายแต่ละชนิดแล้ว จึงนำมาทำ Ligation เพื่อเชื่อมต่อยีน AGXT แต่ละชนิดเข้ากับ expression vector โดยเตรียมสารผสมต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 10 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

ตารางที่ 10 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Ligation ระหว่างยีน AGXT กับ expression vector

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. 10 X Ligation buffer	1.0
2. 30 ng/μl expression vector	3.5
3. 50.0 ng/μl ยีน AGXT แต่ละชนิด	1.5
4. 400 U/μl T4 DNA Ligase	1.0
5. deionized water	3.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

หลังจากนั้นทำ transformation เพื่อนำพลาสมิดเปล่าและพลาสมิดลูกผสมแต่ละชนิด ซึ่งมี 2 ชนิดคือยีน AGXT ที่ปกติเชื่อมต่อกับ expression vector และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ expression vector เข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรีย โดยมีขั้นตอนเหมือนกับในข้อ 1.5.4 เสร็จแล้วจึงทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ ซึ่งเหมือนกับขั้นตอนในข้อ 1.5.5 และ 1.5.6 ตามลำดับ แต่ใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์คนละชนิดกัน โดยเปลี่ยนเป็น T7 Promoter และ BGH Reverse ซึ่งเป็น universal primer

1.7.3 การเพิ่มปริมาณพลาสมิด

ในงานวิจัยจำเป็นต้องใช้พลาสมิดในปริมาณมาก พลาสมิดที่เตรียมไว้ในตอนแรกอาจไม่เพียงพอสำหรับการวิจัย ดังนั้นจึงต้องทำการเพิ่มปริมาณพลาสมิดทั้ง 3 ชนิด โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 ขวด ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่อง autoclaved จากนั้นรอให้เย็น จึงเติม ampicillin ขวดละ 250 ไมโครลิตร (ใช้อัตราส่วน 1:1,000) เมื่อเตรียมเสร็จให้ทำ starter โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจากขวดรูปชมพู่แต่ละใบปริมาตร 40 มิลลิลิตร มาแบ่งใส่ในหลอด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดละ 20 มิลลิลิตร จะได้ทั้งหมด 6 หลอด จากนั้นนำ glycerol stock ของพลาสมิดทั้ง 3 ชนิดมาแบ่งใส่ชนิดละ 2 หลอด แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ เมื่อครบกำหนดจึงนำ starter มาเป็นหัวเชื้อในการเพิ่มปริมาณต่อ โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 หลอดของแต่ละชนิดลงในขวดรูปชมพู่แต่ละขวดแยกกัน นำมาเลี้ยงต่ออีก 2 ชั่วโมงที่สภาวะเดียวกัน จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปทำเป็น glycerol stock เพื่อเป็นแหล่งสำรองพลาสมิดและเก็บรักษาในระยะยาวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยแบ่งมา 1,800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับ 100% glycerol ปริมาตร 200

ไมโครลิตร จากนั้นแบ่งใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิเมตร จำนวน 8 หลอด หลอดละ 250 ไมโครลิตรแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่เหลือทั้งหมดให้นำไปปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรีย ในหลอด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิเมตร พลาสติดละ 4 หลอด ด้วยความเร็ว 5,400 g (rcf) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำไปสกัดพลาสติดและตรวจสอบพลาสติดที่ได้ ซึ่งเหมือนกับขั้นตอนในข้อ 1.5.5 และ 1.5.6 ตามลำดับ ยกเว้นในขั้นตอนสุดท้ายที่ไม่ต้องส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำอีก เนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณพลาสติดที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนทั้ง 2 ชนิดแล้ว

1.8 การถ่ายพลาสติด (expression vector) เข้าสู่ COS7 cells (Transfection)

ขั้นตอนนี้เป็น การนำพลาสติดเปล่า (empty expression vector) และพลาสติดลูกผสมทั้ง 2 ชนิดคือ ยีน AGXT ที่ปกติเชื่อมต่อกับ expression vector และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ expression vector เข้าไปภายในเซลล์ COS7 เพื่อให้มีการแสดงออกของยีน โดยผลิตเอนไซม์ AGT ออกมา ส่วนเซลล์ COS7 ที่ได้รับพลาสติดเปล่านั้นจะไม่มีการผลิตเอนไซม์ AGT จึงใช้เป็นตัวควบคุมเพื่อเปรียบเทียบผลการวิจัย

1.8.1 การ seed cell

ก่อนที่จะทำ Transfection ต้องทำการ Seed cell เพื่อเตรียมปริมาณเซลล์ให้พอเหมาะและมีคุณภาพดีเหมาะสำหรับการทำ Transfection ซึ่งการทำทุกอย่างต้องทำในตู้เชื้อเชื้อ (Safety cabinet) เพื่อให้เซลล์ปราศจากการปนเปื้อน โดยมีข้อควรปฏิบัติอย่างเคร่งครัดเหมือนกับในข้อ 1.2.1 และมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ นำขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 ที่เลี้ยงเซลล์อยู่ก่อนหน้าแล้วมาดูอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM + 10% FBS) ทิ้งให้หมด ล้างด้วย 1 X PBS ปริมาตร 5 มิลลิเมตรแล้วดูดทิ้งให้หมด จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นใส่ Trypsin 2 มิลลิเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์ COS7 หลุดลอกออกจากพื้นขวด เมื่อครบเวลาให้ใช้มือช่วยเคาะข้างขวด เพื่อให้เซลล์หลุดลอกดีขึ้น เมื่อมั่นใจว่าเซลล์หลุดลอกหมดแล้วให้เติม อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 3 มิลลิเมตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ Trypsin จากนั้นใช้ปิเปตช่วยกระจายเซลล์ออกจากกัน แล้วย้ายไปใส่ในหลอด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิเมตร นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อ เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วเทของเหลวที่อยู่ด้านบนทิ้งไป ปิดฝาให้สนิทแล้วใช้มือดีดข้างหลอดเพื่อให้ตะกอนเซลล์กระจายตัวจากกัน จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 5 มิลลิตรลงไปแล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นลง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน เมื่อสังเกตว่า

เซลล์กระจายตัวออกจากกันดี ไม่มีกลุ่มก้อน ให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ติดอยู่ปลายทิวไปทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer) ทำให้ทราบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ COS7 กระจายตัวอยู่ ดังนั้นจึงสามารถคำนวณปริมาณหัวเชื้อนี้ให้มีปริมาณเซลล์ที่พอเหมาะสำหรับการ Transfection ได้ โดยปรับความเข้มข้นให้มีจำนวนเซลล์ตามที่ต้องการในปริมาตรของหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร เช่น แต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมต้องการเซลล์จำนวน 600,000 เซลล์ ดังนั้นจึงต้องทำการปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 600,000 เซลล์/มิลลิลิตร โดยก่อนที่จะนำหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปใส่ในแต่ละหลุมให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปก่อน เมื่อเติมหัวเชื้อลงไปจะได้ปริมาตรรวมในแต่ละหลุม 2 มิลลิลิตร จากนั้นขยับจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมไปมา ซ้าย-ขวา บน-ล่าง เพื่อให้เซลล์ COS7 กระจายทั่วหลุมเท่า ๆ กัน เสร็จแล้วนำจานเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.8.2 การทำ Transfection

วัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดทั้ง 3 ชนิดด้วยเครื่อง spectrophotometer (nano drop) หลังจากนั้นจึงทำการคำนวณปริมาตรของพลาสมิดแต่ละชนิดที่จะถ่ายเข้าไปภายในเซลล์ COS7 โดยแต่ละหลุมต้องการ 4 ไมโครกรัม นำพลาสมิดแต่ละชนิดไปผสมกับ opti-mem ให้ได้ปริมาตรรวม 250 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายอีกหลอดหนึ่งโดยนำ lipofectamine 10 ไมโครลิตร ผสมกับ opti-mem 240 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 หลอดมาผสมกันจะได้ปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปใส่ในหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมที่ทำการ seed cell ไว้ก่อนหน้าแล้ว ซึ่งก่อนใส่ให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยใช้ DMEM ที่ไม่ผสม FCS และ Pen-Strep จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.9 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ขั้นตอนนี้เป็นเตรียมเอนไซม์ AGT สำหรับวิเคราะห์การทำงานต่อไป โดยวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการ Transfection ซึ่งเกิดจากการแสดงออกของยีน AGXT แต่ละชนิดภายในเซลล์ COS7 โดยหลังจาก Transfection ครบ 48 ชั่วโมง จึงเก็บเซลล์ใน RIPA buffer + 1x Protease Inhibitor (PI) สำหรับวิเคราะห์โดยวิธี western blot ส่วนการวิเคราะห์เพื่อวัดความสามารถในการทำงานให้ทำการเก็บเซลล์ใน AGT buffer (100 μ M Pyridoxal phosphate, 240 mM Sucrose และ 100 mM Potassium phosphate buffer; pH 8.0) จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตก (sonication) โดยแช่ในน้ำแข็ง ด้วยเครื่อง Ultrasonic processors รุ่น UP100H 3 รอบๆละ 10 วินาที โดยพักระหว่างรอบ 1 นาที สุดท้ายวัดปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด ด้วยวิธี BCA Protein โดยใช้ Mini BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, USA) ซึ่งมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 11 เสร็จแล้วเตรียม Working reagent (Reagent A : Reagent B : Reagent C = 25 : 24 : 1) หลังจากนั้นนำ Working reagent ไปผสมกับสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารละลายโปรตีนที่ต้องการวัด ในอัตราส่วน 20:1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer (nano drop) ซึ่งมีโปรแกรมอัตโนมัติในการคำนวณปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีนที่ต้องการวัด โดยเทียบกับค่าที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน BSA

ตารางที่ 11 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หลอด	ความเข้มข้นของ BSA (μ g/ μ l)	ปริมาตรของสารละลายที่ใช้เก็บเซลล์ (ไมโครลิตร)	ปริมาตรและแหล่งของ BSA (ไมโครลิตร)
A	2	0	120 จาก stock
B	1.5	50	150 จาก stock
C	1	130	130 จาก stock
D	0.75	70	70 จากหลอด B
E	0.5	130	130 จากหลอด C
F	0.25	130	130 จากหลอด E
G	0.125	130	130 จากหลอด F
H	0 (blank)	160	0

2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT

โดยวิธี western blot เทียบกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเปล่าเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งใช้ Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell and Mini-PROTEAN3 Cell (Bio-Rad, USA) โดยนำเซลล์ COS7 ที่ภายในมีพลาสมิดแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ พลาสมิดที่มียีน AGXT ปกติ, พลาสมิดที่มียีน AGXT กลายพันธุ์ แบบ P11R และพลาสมิดเปล่า ซึ่งแต่ละชนิดอยู่ในสารละลายของ RIPA buffer + 1x Protease Inhibitor (PI) ที่ทำให้เซลล์แตกแล้วมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเฉพาะของเหลวที่อยู่ด้านบนไปวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนรวม ตามขั้นตอนในข้อ 1.9 เพื่อนำมาคำนวณปริมาณของเหลวที่จะนำไปโหลดเจล ซึ่งในแต่ละหลุมใส่โปรตีนรวม 2.5 ไมโครกรัม แล้วนำไปผสมกับ 1X loading buffer, 10% β -mercaptoethanol จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเตรียมแผ่นเจลในชุดเตรียมเจลซึ่งเป็นแผ่นกระจก 2 แผ่นประกบกันมีช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกหนา 1.5 มิลลิเมตร โดยเตรียม separating gel 12% ไว้เป็นส่วนล่างสูงประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นปรับระดับผิวหน้าเจลให้เรียบเสมอกันด้วยการเติม butanol หรือ isopropanol 200 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้แห้งประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วให้เตรียม stacking gel 4% ซ้อนทับด้านบน separating gel โดยเติมลงไปให้ล้นแล้วใส่ comb ลงไปด้านบนเพื่อให้เกิดหลุมในแผ่นเจล ปล่อยให้แห้งประมาณ 30 นาที ในระหว่างรอแผ่นเจลแข็งตัวให้เตรียม running buffer ปริมาตร 1 ลิตร เมื่อทุกอย่างพร้อมแล้วจึงเริ่มทำ SDS-PAGE โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าในการแยกแถบโปรตีน 120 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 15 นาที ในระหว่างรอการทำ SDS-PAGE ให้เตรียม tank น้ำแข็งและ transfer buffer ปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปแช่ไว้ที่ตู้แช่แข็ง เมื่อครบเวลาจึงทำการ transfer โปรตีนจากเจลสู่ nitrocellulose membrane โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยก่อนเริ่ม transfer ให้แช่ membrane, ฟองน้ำและกระดาษกรองใน transfer buffer ประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงนำมาประกบใน blot โดยเรียงตามลำดับดังนี้ blot ด้านสีดำ → ฟองน้ำ → กระดาษกรอง → แผ่นเจล → membrane → กระดาษกรอง → ฟองน้ำ → blot ด้านสีขาว แล้วนำ blot ที่ได้ใส่ลงใน tank run โดยหันด้านสีดำไปทางเดียวกัน พร้อมด้วย tank น้ำแข็ง, transfer buffer และแท่งแม่เหล็ก เพื่อให้ความเย็นกระจายอย่างทั่วถึง เมื่อครบเวลาในการ transfer จึงนำ membrane มาล้างด้วย TBS-T เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น block ด้วย 5% non-fat dry milk นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เสร็จแล้วล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำ membrane มาบ่มด้วย primary antibody 2 ชนิด คือ mouse anti-V5 monoclonal antibody (Invitrogen) ในอัตราส่วน 1:5,000

และ rabbit anti- GAPDH antibody (Abcam) ในอัตราส่วน 1:1,000 โดยผสมกับ 5% non-fat dry milk ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร นำหลอดไปวางบนเครื่องหมุนหลอด 360 องศาแล้วบ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เสร็จแล้วบ่มด้วย secondary antibody 2 ชนิด คือ goat anti-mouse IgG2a (Abcam) ในอัตราส่วน 1:5,000 และ goat anti-rabbit (Invitrogen) ในอัตราส่วน 1:2,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เสร็จแล้วใส่ super signal โดยใช้ Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo, USA) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วปล่อยให้ทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นรีบนำไปประกบกับแผ่นฟิล์มด้วยเวลาที่แตกต่างกัน แล้วนำแผ่นฟิล์มที่ได้ไปล้างด้วยเครื่องล้างฟิล์ม นำแผ่นฟิล์มมาประกบกับ membrane เพื่อระบุตำแหน่งแถบโปรตีนขนาดต่าง ๆ ของ marker จากนั้นจึงอ่านผลจากแผ่นฟิล์ม

2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

โดยวิธี semiautomated spectrophotometric (Rumsby *et al.*, 1997) ซึ่งโปรตีนรวมที่นำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ได้มาจากเซลล์ 5 ชนิด คือ เซลล์ HEPG2, เซลล์ COS7 เปล่า, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ปกติ, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ P11R และเซลล์ COS7 ที่มี expression vector เปล่า สำหรับสารเคมีที่ใช้ในงานส่วนนี้ทั้งหมดซื้อจากบริษัท Sigma Chemical วิธีนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยเติมสารตั้งต้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 12 ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดต้องเตรียม blank แยกจากกันชนิดละหลอดด้วย

เมื่อเตรียมสารละลายในแต่ละหลอดเสร็จ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเอนไซม์ AGT ทำงาน จะได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นไพรูเวท จากนั้นทุกหลอดหยุดการทำงานของเอนไซม์ AGT ด้วยการเติม 3 M TCA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วรีบนำหลอดไปวางในน้ำแข็ง เฉพาะหลอด blank เติม 0.1 M Sodium glyoxylate ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เสร็จแล้วนำทุกหลอดไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะของเหลวชั้นบนแล้วแช่ในน้ำแข็งเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไพรูเวทที่เกิดขึ้นในขั้นตอนต่อไป ส่วนขั้นที่ 2 เป็นการตรวจวัดปริมาณไพรูเวทที่เกิดขึ้น โดยใช้เอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) และ NADH เป็น cofactor เปลี่ยนไพรูเวท เป็นแลคเตท และ NADH เป็น NAD^+ ซึ่ง NADH เท่านั้นที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ดังนั้นจึงต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังใส่เอนไซม์ LDH ประมาณ 5 นาที (A2) ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น CE9500 แล้วนำค่าทั้งสองมา

เปรียบเทียบกันและคำนวณหาปริมาณโพลูเวท ซึ่งจะแสดงค่าความสามารถในการทำงานของ เอนไซม์ AGT ได้ โดยถ้ามีปริมาณโพลูเวทมาก ค่า A2 จะลดต่ำลงมากเมื่อเทียบกับค่า A1 ใน ขั้นตอนนี้นำตัวอย่างที่แช่ในน้ำแข็งจากขั้นตอนแรกมาเจือจาง 3 เท่า โดยเติมตัวอย่างปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมกับ ion-exchanged water ปริมาตร 120 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายผสม (ซึ่ง ประกอบด้วย 0.25 mM NADH และ 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้ เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (A1) เสร็จแล้วเติมเอนไซม์ LDH ซึ่งมีความเข้มข้น 4,981.8 IU/380 ไมโครลิตรปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5 IU ผสมให้เข้ากันแล้ว นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาทีเพื่อรอให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (A2)

ตารางที่ 12 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนแรกของการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		ความเข้มข้น
	Blank	Sample	สุดท้าย
1. โปรตีนรวมจากการ sonicate	X*	X*	100 ไมโครกรัม
2. 1 M Potassium Phosphate buffer, pH 8.0	30	30	100 mM
3. 0.1 M Sodium glyoxylate	-	30	10 mM
4. 1 M L-alanine	45	45	150 mM
5. 10 mM Pyridoxal phosphate	4.5	4.5	150 μ M
6. Ion-exchanged water	300 - X - 79.5	300 - X - 109.5	
ปริมาตรรวมทั้งหมด	300.0	300.0	

หมายเหตุ * X คือ ปริมาตรที่ได้จากการคำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนรวม ซึ่งได้จากการวัดในข้อ 1.9 เพื่อต้องการปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด 100 ไมโครกรัม

2.3 การตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์

โดยวิธี immunofluorescence (Masyuk *et al.*, 2003) เป็นการใช้อแอนติบอดี(secondary antibody) 2 ชนิดที่ติดสารเรืองแสงคนละสีกัน ไปจับกับแอนติบอดี (primary antibody) ต่างชนิดกัน โดยชนิดแรกจับกับ V5 ซึ่งเชื่อมติดกับเอนไซม์ AGT ที่ได้จากการโคลน ส่วนอีกชนิดจับกับเอนไซม์ catalase ซึ่งพบเฉพาะในเพอร์ออกซิโซมเท่านั้น แล้วตรวจสอบตำแหน่งของเอนไซม์ AGT และเพอร์ออกซิโซมภายในเซลล์จากการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Macro Confocal การตรวจสอบนี้ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ยังคงถูกส่งไปยังเพอร์ออกซิโซมตามปกติหรือไม่ มากน้อยเพียงใด โดยมีขั้นตอนในการทำ immunofluorescence ดังนี้ เตรียม methanol เย็นจัดโดยนำไปแช่ในตู้แช่แข็งก่อนเริ่มทำประมาณ 20 นาที นำเซลล์ COS7 ที่ผ่านการ transfect และเลี้ยงบนกระบอกปิดสไลด์ขนาด 24 x 24 mm ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมทั้ง 3 ชนิด คือ เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ปกติ, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg และ เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เปล่า ล้างเซลล์ด้วย PBS หลุมละ 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้น fix เซลล์ด้วย methanol ที่เย็นจัด หลุมละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ไว้ในตู้เย็นนาน 5 นาที ดูดทิ้งแล้วเติมด้วย PBS ที่ผสมกับ 0.1% Triton-X ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร ขั้นนี้ถือว่าเป็นการ Permeabilization โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที ดูดทิ้งแล้ว block ด้วย PBS ที่ผสมกับ 5% BSA และ 0.1% Triton-X เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นบ่มด้วย primary antibody สำหรับจับกับเอนไซม์ AGT คือ mouse anti-V5 monoclonal (Invitrogen) ในอัตราส่วน 1:500 โดยผสมกับ 1% BSA ใน PBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ครั้งละ 4 นาที เสร็จแล้วบ่มด้วย secondary antibody คือ Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG2a (Invitrogen) เป็นสารเรืองแสงสีแดงซึ่งจะไปจับกับ primary antibody ตัวก่อนหน้าในอัตราส่วน 1:1,000 โดยผสมกับ 1% BSA ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นเริ่มบ่มด้วย primary antibody อีกชนิดหนึ่งคือ Rabbit anti-catalase polyclonal (Abcam) ในอัตราส่วน 1:250 โดยผสมกับ 1% BSA ใน PBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ครั้งละ 4 นาที เสร็จแล้วบ่มด้วย secondary antibody คือ Alexa Flour 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) เป็นสารเรืองแสงสีเขียวซึ่งจะไปจับกับ primary antibody ที่จับกับเอนไซม์ catalase ในเพอร์ออกซิโซมในอัตราส่วน 1:250 โดยผสมกับ 1% BSA ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที สุดท้ายนำกระบอกปิดสไลด์ไปปิดลงบนสไลด์ด้วย vectashield with DAPI ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/สไลด์ วางสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืนในที่มืด

สนิท โดยจากนี้ไปต้องให้สไลด์สัมผัสกับแสงน้อยที่สุด นำสไลด์ทั้งหมดไปส่องเพื่อตรวจสอบผล
ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Macro Confocal รุ่น EZ-C1

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

1.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (CDS) จากฐานข้อมูลใน NCBI พบว่า ยีนมีขนาด 1,231 base pairs โดยส่วนที่มีการแสดงออกเริ่มตั้งแต่ นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 123 ถึงนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,301 ดังแสดงในภาพที่ 13 ซึ่งแสดงเป็นช่วงของตัวอักษรหนา ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์ เพื่อผลิตยีน AGXT ที่ปกติ และเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg สุดท้ายยีนทั้ง 2 แบบจะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออก โดยผลิตเอนไซม์ AGT ตามปกติและมีการผลิตเอนไซม์ AGT ที่ผิดปกติไปจากเดิมตามลำดับ โดยออกแบบสาย forward ให้สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ในช่วงลำดับที่ 90 – 111 (ช่วงที่มีแถบสีในแถว 61) ซึ่งมีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในลำดับที่ 95 จาก T เป็น A (ตำแหน่งลูกศรชี้) เพื่อให้เป็นบริเวณจดจำสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI ในการตัดต่อเข้ากับ expression vector ในขั้นตอนต่อไปและออกแบบสาย reverse ให้สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ในช่วงลำดับที่ 1,293 – 1,320 (ช่วงที่มีแถบสีในแถว 1,261) ซึ่งมีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในลำดับที่ 1,314 จาก C เป็น A, ลำดับที่ 1,316 จาก C เป็น T และลำดับที่ 1,317 จาก A เป็น T (ตำแหน่งลูกศรชี้) เพื่อให้เป็นบริเวณจดจำสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI จะเห็นว่าการออกแบบในสาย Reverse มีการซ้อนทับกับนิวคลีโอไทด์ในส่วนท้ายของยีน เพื่อเปลี่ยนรหัสหยุดโดยเปลี่ยนจาก T เป็น A ในนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,299 (ตำแหน่งลูกศรชี้ในแถว 1,261) ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ AGT ยาวขึ้น สามารถสังเคราะห์ต่อไปยังส่วนโปรตีน V5 ใน expression vector ซึ่งใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกหรือติดตามเอนไซม์ AGT ได้ นอกจากนี้ยังสามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ mutagenesis โดยออกแบบทั้งสาย forward และสาย reverse ให้สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ในช่วงลำดับที่ 137 – 171 (ช่วงที่มีแถบสีในแถว 121) เพื่อผลิตยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg โดยเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น G ในลำดับที่ 154 (ตำแหน่งลูกศรชี้ในแถว 121) นับเป็นการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 ภายในยีนโดยเริ่มนับลำดับที่ 123 เป็นนิวคลีโอไทด์ตัวแรก เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่ผิดปกติ โดยมีกรดอะมิโนในลำดับที่ 11 เปลี่ยนไปจาก Proline เป็น Arginine

LOCUS NM_000030 1500 bp mRNA linear PRI 16-MAR-2008

DEFINITION Homo sapiens alanine-glyoxylate aminotransferase (*AGXT*), mRNA.

ACCESSION NM_000030 NM_016236 CDS 123..1301

1	ccggaagccc	atccaccaat	cctcacctct	cacctctgtg	tccgcctgc	tgggaaatat
61	tccaggcttt	ggccaaggcc	agtcagccc	caggtcccc	agcggcaggt	tgggtgcgga
121	ccatggcctc	tcacaagctg	ctggtgacct	cccccaaggc	cctgtcaag	ccctctcca
181	tcccaacca	gtcctctgtg	gggcctggtc	cttccaacct	gcctcctcgc	atcatggcag
241	ccggggggct	gcagatgata	gggtccatga	gcaaggatat	gtaccagata	atggacgaga
301	tcaaggaagg	catccagfac	gtgtccaga	ccaggaacct	actcacactg	gtcatctctg
361	gtcggggaca	ctgtgcctg	gaggccgccc	tggtcaatgt	gctggagcct	ggggactcct
421	tcctggttgg	ggccaatggc	atftgggggc	agcgagccgt	ggacatcggg	gagcgcatag
481	gagcccgagt	gcaccgatg	accaaggacc	ctggaggcca	ctacacactg	caggagggtg
541	aggagggcct	ggcccagcac	aagccagtgc	tgctgttctt	aaccacggg	gagtcgtcca
601	ccggcgtgct	gcagcccctt	gatggcttcg	gggaactctg	ccacaggtag	aagtgcctgc
661	tctgtgtgga	ttcgttgga	tcctggggc	ggacccccct	ttacatggac	cggcaaggca
721	tegacatcct	gtactcgggc	tcccagaagg	ccctgaacgc	ccctccaggg	acctcgtcca
781	tctctctcag	tgacaaggcc	aaaaagaaga	tgactcccg	caagacgaag	ccctctcct
841	tctactgga	catcaagtgg	ctggccaact	tctggggctg	tgacgaccag	cccaggatgt
901	accatcacac	aatcccctgc	atcagcctgt	acagcctgag	agagagcctg	gcctcattg
961	cggaacaggg	cctggagaac	agctggcgcc	agcaccgcca	ggccgcggcg	tatctgcatg
1021	ggcgcctgca	ggcactgggg	ctgcagctct	tcgtgaaggga	cccggcgctc	cggttccca
1081	cagtaccac	tgtggctgta	cccgtggct	atgactggag	agacatcgtc	agctacgtea
1141	tagaccactt	cgacattgag	atcatgggtg	gccttggggc	ctccacgggg	aaggtgctgc
1201	ggatcggcct	gctgggctgc	aatgccacct	gcgagaatgt	ggaccgcgtg	acggaggccc
1261	tgagggcgcc	cctgcagcac	tgcccaaga	agaagctgtg	acctgcccac	tggcacacag
1321	ctggcactgg	cacacacctg	tccatgccc	acctgagggg	atcaggagca	aacagacctt
1381	gcaaggtcct	ccaggcctgg	ggacaggaaa	gccactgacc	cagccgggga	ggcagaacca
1441	ggcagcctcc	ctggccccag	gcagcccttt	tcctccagt	ggcacctcct	ggaaacagtc

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (NCBI, 2008)

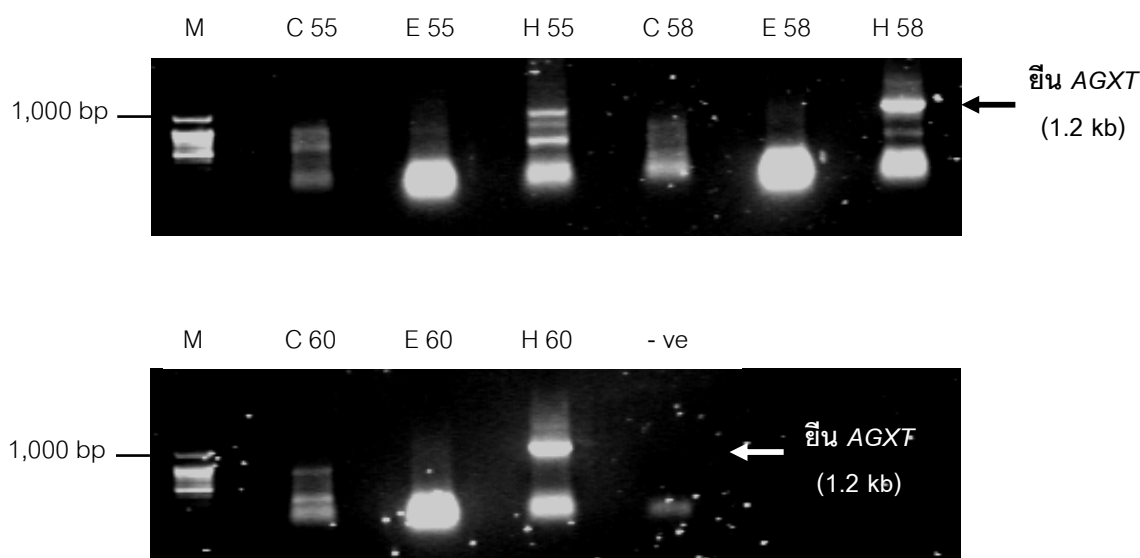
โดย ลูกศร แสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของนิวคลีโอไทด์

ตัวอักษรหนา แสดงตำแหน่งของบริเวณยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน

แถบสี แสดงตำแหน่งของบริเวณที่มีการออกแบบไพรเมอร์

1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region)

งานวิจัยนี้ใช้อาร์เอ็นเอเป็นแหล่งในการผลิตยีน AGXT เนื่องจากต้องการยีนเฉพาะในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) เท่านั้น จึงทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2 และเซลล์ COS 7 แล้วนำมาทำ RT-PCR เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอจากเซลล์แต่ละชนิดเป็นดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA) จากนั้นจึงใช้ cDNA ที่ได้เป็นต้นแบบในการทำ Gradient PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน ด้วยการใส่ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ แล้วนำ PCR products ที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลปรากฏว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน AGXT ได้จาก cDNA ของเซลล์ Hep-G2 เท่านั้น โดยเกิดแถบที่ชัดเจนตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) ที่อุณหภูมิ Annealing 2 ระดับ คือ 58 และ 60 องศาเซลเซียส แสดงในภาพที่ 14 เนื่องจากยีน AGXT ทำงานเฉพาะในเซลล์ตับ ยีนจึงมีการแสดงออกโดยถอดรหัสเป็น mRNA ได้ ส่วนยีนในเซลล์ EBV และเซลล์ COS 7 ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ไต ตามลำดับ ทำให้ไม่มีการแสดงออก จึงไม่สามารถสกัดอาร์เอ็นเอออกมาได้ เมื่อทำ PCR จึงไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT เกิดขึ้น



ภาพที่ 14 ผลการสังเคราะห์ยีน AGXT จาก cDNA ของเซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2

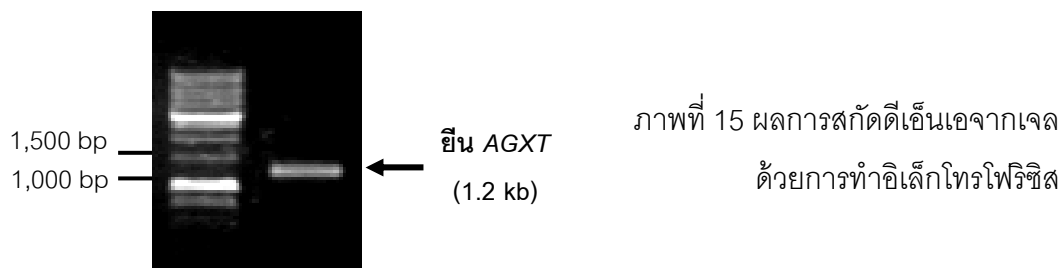
และเซลล์ COS 7 ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส จาก PCR products ของ Gradient PCR

โดย M คือ Marker, C คือ เซลล์ COS7, E คือ เซลล์ EBV, H คือ เซลล์ Hep-G2 และ

- ve คือ negative control ส่วนตัวเลขที่ระบุคู่ตัวอักษร คือ ระดับอุณหภูมิ Annealing

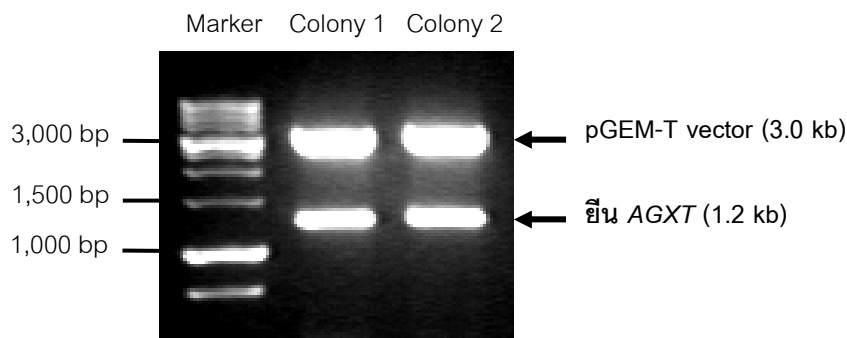
1.3 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเจล

ตัดเจลของภาพที่ 14 เฉพาะบริเวณแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1.2 kb ในช่อง H 58 และ H 60 ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีน AGXT โดยประมาณมารวมกัน แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอจากเจล จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลปรากฏว่า ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีน AGXT แสดงในภาพที่ 15 จึงสรุปว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเจลคือ ยีน AGXT นั่นเอง



1.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector)

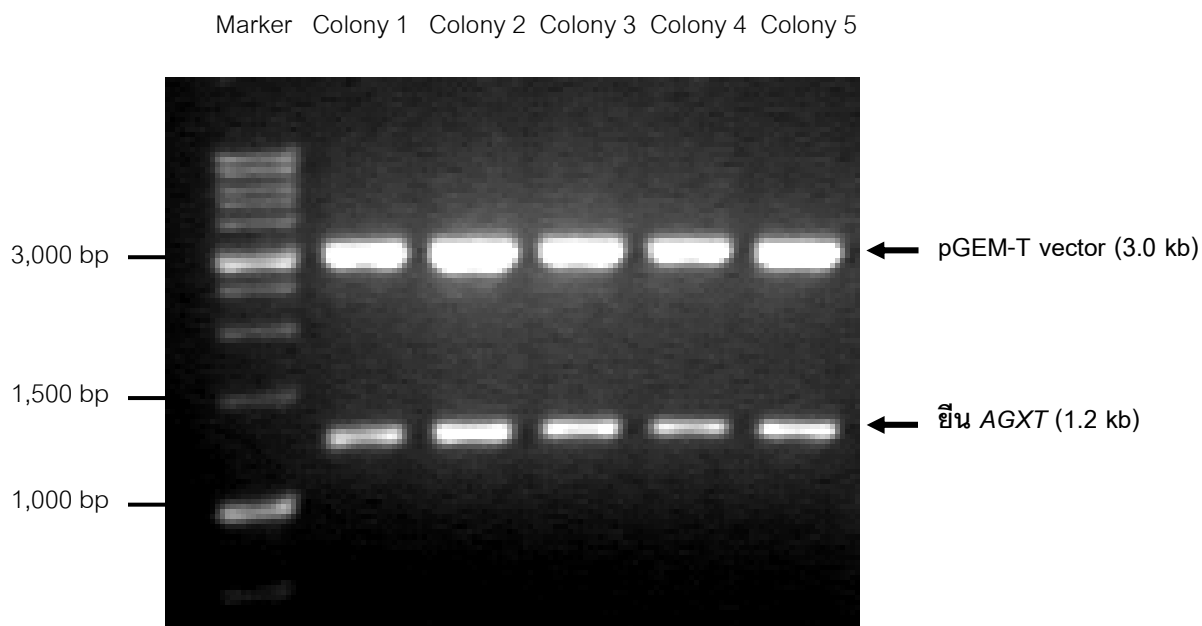
หลังจากที่นำยีน AGXT ปกติที่ได้จากการสกัดเจลมาเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector จนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม แล้วนำไปถ่ายเข้าสู่ competent cells เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด โดยอาศัยการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมี 2 โคโลนีที่สามารถเจริญบน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ได้ จากนั้นจึงสกัดพลาสมิดออกมา แล้วทำการตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam*HI กับ *Eco*RI แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบขนาดโดยประมาณของยีน AGXT ที่แทรกเข้าไปและขนาดของ pGEM-T vector ผลปรากฏว่า ทั้งสองโคโลนีมีพลาสมิดลูกผสมอยู่ในเซลล์จริง แสดงในภาพที่ 16 โดยแต่ละโคโลนีมี 2 แถบ คือ แถบบนซึ่งมีขนาด 3.0 kb เป็นแถบที่ตรงกับขนาดของ pGEM-T vector ส่วนแถบล่างเป็นแถบที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) แต่การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่สามารถตรวจสอบได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ถูกต้องหรือไม่ จึงต้องส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macro Gen โดยใช้ universal primer ในการตรวจสอบ คือ pUC/M13 Forward และ pUC/M13 Reverse ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 2 ถูกต้องทั้งหมด แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 28 และ 29) จึงใช้พลาสมิดลูกผสมจากโคโลนีที่ 2 เป็นแหล่งสำหรับทำ mutagenesis ต่อไป



ภาพที่ 16 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีน AGXT ปกติ
โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.5 ผลการสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

หลังจากนำพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector) จากโคโลนีที่ 2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ถูกต้อง มาทำ mutagenesis เพื่อสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ แล้วนำพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ Pro11Arg เชื่อมต่อกับ pGEM-T vector) ที่ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ผลปรากฏว่า มี 5 โคโลนีที่สามารถเจริญบน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ได้ จากนั้นจึงนำโคโลนีทั้งหมดมาสกัดพลาสมิด แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ต่อด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบเบื้องต้น พบว่า ทั้ง 5 โคโลนีมี พลาสมิดลูกผสมอยู่ในเซลล์จริง แสดงในภาพที่ 17 โดยแต่ละโคโลนีมี 2 แถบ คือ แถบบนซึ่งมีขนาด 3.0 kb เป็นแถบที่ตรงกับขนาดของ pGEM-T vector ส่วนแถบล่างเป็นแถบที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) หลังจากนั้นส่งทั้ง 5 โคโลนีไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macro Gen โดยใช้ universal primer คือ pUC/M13 Forward และ pUC/M13 Reverse ในการตรวจสอบ ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 3 ถูกต้องทั้งหมด ยกเว้นลำดับที่ 32 เปลี่ยนจาก C เป็น G ซึ่งได้ผลตามที่ต้องการเพื่อให้การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนในลำดับที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 30 และ 31) จึงใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีนกลายพันธุ์จากโคโลนีที่ 3 เป็นแหล่งสำหรับนำไปติดต่อเข้ากับ expression vector ต่อไป

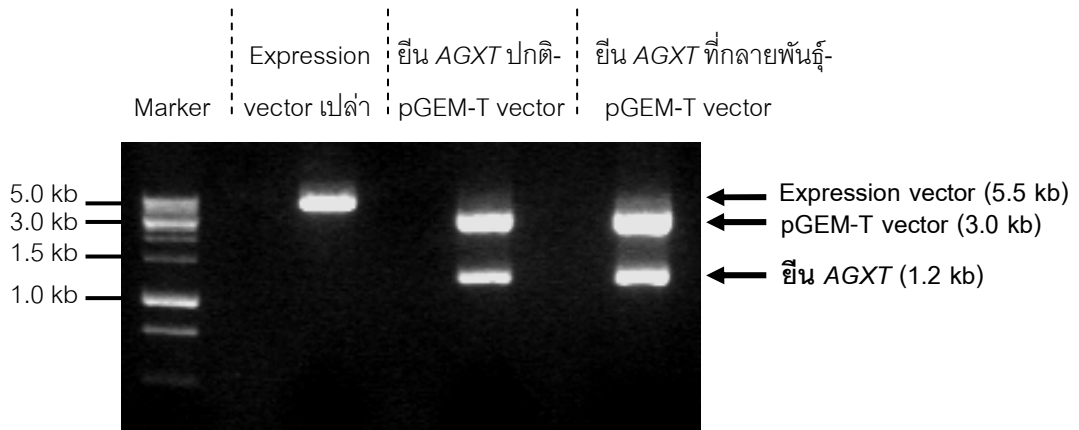


ภาพที่ 17 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีน AGXT กลายพันธุ์ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

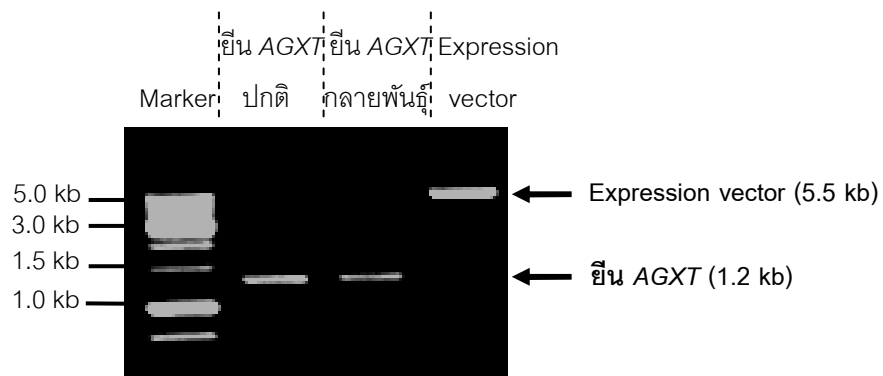
1.6 ผลการสร้างพลาสมิด (expression vector) สำหรับการทำ transfection

เป็นการนำยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ตัดต่อเข้ากับ expression vector (pcDNA3.1/V5-HisB) โดยนำ expression vector และพลาสมิดลูกผสมทั้ง 2 ชนิด คือ ยีน AGXT ที่ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ pGEM-T vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตัดให้มีปลายที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ระหว่างยีนที่ต้องการแทรกเข้าไปกับ expression vector แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงในภาพที่ 18 จากนั้นตัดเจลในแต่ละแถบ รวมทั้งหมด 3 แถบ คือ แถบ 1.2 kb 2 แถบ และ แถบ 5.5 kb ไปสกัดเจล แล้วตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงในภาพที่ 19 นำยีน AGXT แต่ละชนิดมาเชื่อมต่อกับ expression vector หลังจากนั้นจึงถ่ายพลาสมิดลูกผสมแต่ละชนิดที่ได้เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย แล้วเลือกโคโลนีจาก LB agar มาเพิ่มปริมาณใน LB broth ชนิดละ 2 โคโลนี ทำการสกัดพลาสมิด แล้วตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส ผลปรากฏว่า ทุกโคโลนีมีพลาสมิดลูกผสมอยู่ในเซลล์จริง แสดงในภาพที่ 20 โดยแต่ละโคโลนีมี 2 แถบ คือ แถบบนซึ่งมีขนาด 5.5 kb เป็นแถบที่ตรงกับขนาดของ expression vector ส่วนแถบล่างเป็นแถบที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) หลังจากนั้นส่ง ทั้ง 4 โคโลนีไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macro Gen โดยใช้ universal primer คือ BGH Reverse และ T7 Promoter ในการตรวจสอบ ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน

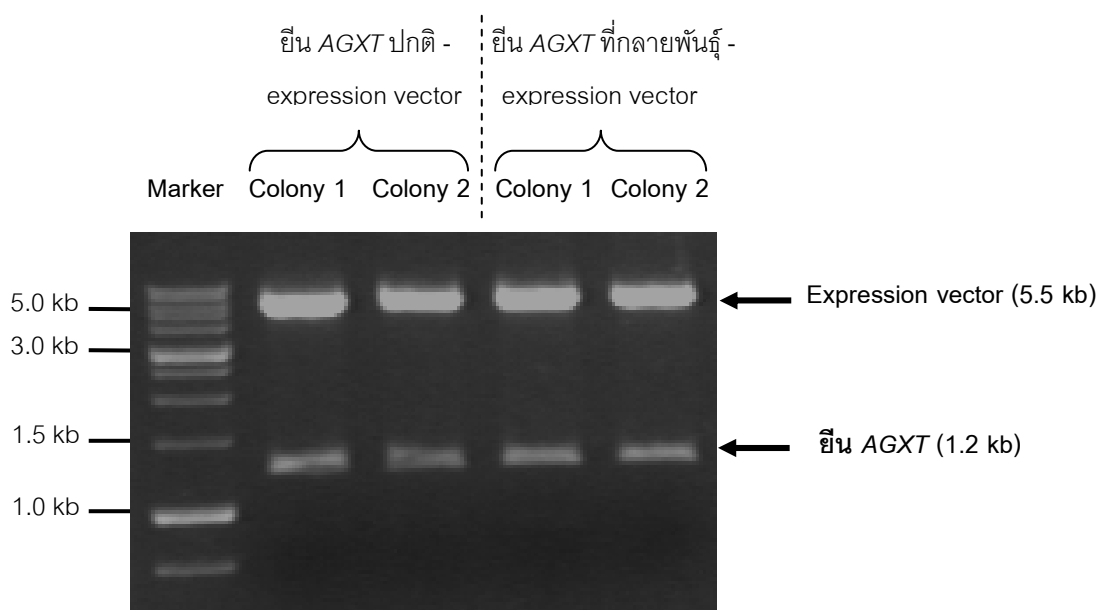
AGXT ปกติที่เชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 2 ถูกต้องทั้งหมด แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 32 และ 33) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 1 ถูกต้องตามที่ต้องการ แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 34 และ 35) หลังจากนั้นจึงนำพลาสมิดที่ได้ทั้ง 2 ชนิด transfect เข้าสู่เซลล์ COS7 ต่อไปเพื่อให้มีการผลิต เอนไซม์ AGT



ภาพที่ 18 ผลการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอจากเจลเฉพาะบริเวณ 1.2 kb และ 5.5 kb



ภาพที่ 19 ผลการตรวจสอบการสกัดดีเอ็นเอจากเจล ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพที่ 20 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ทั้ง 2 ชนิด
ชนิดละ 2 โคโลนี โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.7 ผลการทำ Transfection

หลังจาก transfect พลาสมิดทั้ง 3 ชนิด คือ expression vector เปล่า, ยีน AGXT ปกติซึ่งเชื่อมต่อกับ expression vector และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ซึ่งเชื่อมต่อกับ expression vector เข้าสู่เซลล์ COS7 แล้ว ยีนเหล่านี้จะมีการแสดงออกแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องวัดความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์แต่ละชนิดก่อนที่จะนำไปตรวจสอบการทำงานต่าง ๆ เพื่อให้ปริมาณโปรตีนรวมที่จะนำไปตรวจสอบเท่ากัน จะได้มั่นใจและยืนยันผลได้ว่า ความผิดปกติของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์นั้นเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน ซึ่งมีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์มีความบกพร่องในการทำงานจริง หากค่าที่ได้จากการตรวจสอบมีความแตกต่างกัน โดยใช้การวัดโปรตีนรวมด้วยวิธี BCA Protein ซึ่งเทียบจากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการวัดที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่งเป็นตัวอย่างผลของการวัดปริมาณโปรตีนรวมสำหรับนำไปทำ western blot โดยแต่ละหลุมต้องการโปรตีนรวม 2.5 ไมโครกรัมในปริมาณที่เท่ากัน จะเห็นว่าการเตรียมโปรตีนไปวิเคราะห์นั้นก็ใช้ปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเพื่อสุดท้ายโปรตีนรวมจากแต่ละเซลล์จะได้มีปริมาณเริ่มต้นเท่ากัน

Micro BCA Assay (AGXT ; PH1) 18/11/2552

Standard Curve

OD	0.022	0.039	0.075	0.104	0.136	0.195	0.244
Conc (mg/ml)	0.125	0.250	0.500	0.750	1.000	1.500	2.000

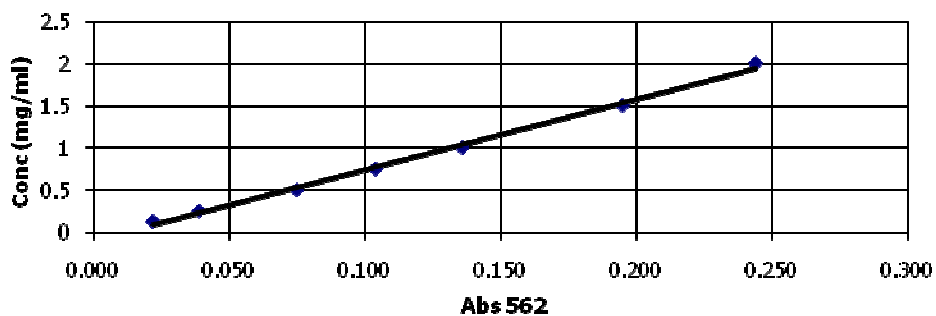
Total Volume 50 ul (3.5x loading buffer 14.3 ul + Protein + RIPA)

ID	OD	Concentration			2.5 ug	
		ug/ul	dilution factor	Total Protein (ug/ul)	Protein	RIPA
Wild type	0.088	0.637	5	3.19	0.8	34.9
Pro11Arg	0.09	0.654	5	3.27	0.8	34.9
Empty vector	0.098	0.721	5	3.60	0.7	35.0

Standard Curve

$$y = 8.365x - 0.098$$

$$R^2 = 0.996$$

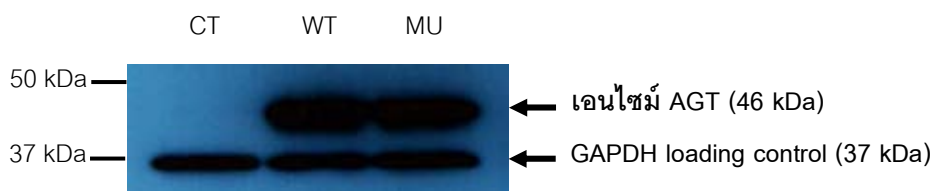


ภาพที่ 21 ตัวอย่างผลของการวัดปริมาณโปรตีนรวม สำหรับนำไปทำ Western blot
ซึ่งแต่ละหลุมต้องการปริมาณโปรตีนรวมเท่ากันคือ 2.5 µg

2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์

เป็นขั้นตอนเพื่อตรวจสอบความสามารถของยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ในการผลิตเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี western blot เทียบกับเซลล์ COS7 ที่ได้รับ expression vector เปล่าเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งผลจากการทำ western blot แสดงให้เห็นว่า ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ยังคงสามารถผลิตเอนไซม์ AGT ซึ่งมีขนาด 46 kDa ได้ตามปกติ เมื่อเทียบกับยีน AGXT ปกติ ดังภาพที่ 22 ส่วนเซลล์ COS7 ที่ได้รับ expression vector เปล่าไม่มีการผลิตเอนไซม์ AGT แสดงให้เห็นว่า โดยปกติยีน AGXT ไม่มีการแสดงออกในเซลล์ COS7 ซึ่งเป็นเซลล์ไต หรือถ้ามีการแสดงออกคงมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ สอดคล้องกับผลการสกัดอาร์เอ็นเอ (mRNA) ซึ่งต่อมาจะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอคู่ผสม (cDNA) แล้วใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน AGXT ปรากฏว่า การทำ PCR ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ เนื่องจากไม่มีต้นแบบ ด้วยเหตุนี้เองผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ COS7 เป็นเซลล์สำหรับถ่ายพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าไป หากยีน AGXT มีการแสดงออกโดยผลิตเอนไซม์ AGT แสดงว่าเป็นผลจากการทำงานของยีน AGXT ที่เชื่อมกับ expression vector เท่านั้น ไม่เกี่ยวข้องกับยีน AGXT ที่มีอยู่ก่อนแล้วภายในเซลล์ COS7



ภาพที่ 22 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี western blot

โดย CT คือ โปรตีนที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่มี vector เปล่า

WT คือ โปรตีนที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่มียีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ expression vector

และ MU คือ โปรตีนที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่มียีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

เชื่อมต่อกับ expression vector

2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

เป็นขั้นตอนเพื่อตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี Semiautomated spectrophotometric โดยนำโปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ 5 ชนิด คือ เซลล์ HEP-G2, เซลล์ COS7 เปล่า, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ปกติ, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg และเซลล์ COS7 ที่มี expression vector เปล่า มาวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ทั้งก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และหลังใส่เอนไซม์ LDH (A2) ซึ่งทำ 3 ซ้ำแล้วนำค่าเฉลี่ย A1 หักล้างด้วยค่าเฉลี่ย A2 (A1 – A2) เหตุที่ค่า A1 สูงกว่าค่า A2 เนื่องจาก NADH ซึ่งเป็น cofactor ของเอนไซม์ LDH สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เมื่อเอนไซม์ LDH ทำงาน NADH จะถูกเปลี่ยนเป็น NAD⁺ ซึ่งไม่สามารถดูดกลืนแสงได้ จึงทำให้ค่า A2 ลดลง สำหรับโปรตีนที่ได้จากแต่ละเซลล์ต้องเตรียม blank แยกจากกันชนิดละหลอดด้วย ซึ่งหลอด blank ต่างจากหลอดตัวอย่างตรงที่ไม่เติม Sodium glyoxylate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ AGT ลงไปตั้งแต่แรก แต่เติมหลังจากที่หยุดปฏิกิริยาด้วย TCA แล้ว ทำให้เอนไซม์ AGT ในหลอด blank ไม่มีการทำงาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่างหักล้างด้วยค่าการดูดกลืนแสงของหลอด blank จะได้ค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ AGT อย่างแท้จริง (ΔA) การวัดนี้ทำทั้งหมด 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย ดังข้อมูลในภาคผนวก ข จากนั้นนำค่าทั้งหมดที่ได้จากการวัดไปคำนวณปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น เพื่อวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT ตามสูตรในภาพที่ 23 ทำให้ได้ข้อมูลเป็นไปตามตารางที่ 13

$$\text{ปริมาณโปรตีน (}\mu\text{mol/h/mg)} = \frac{V \times D}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

โดยที่ V = ปริมาตรรวมทั้งหมดในหลอด = 0.78 ml

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm
= 6.3 l x mmol⁻¹ x cm⁻¹

d = ความกว้างของคิวเวตที่แสงผ่าน = 1 cm

v = ปริมาตรของตัวอย่างที่นำวัดค่าการดูดกลืนแสง = 0.06 ml

D = จำนวนเท่าของการเจือจาง (dilution factor) = 3

ภาพที่ 23 สูตรการคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น สำหรับวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

ตารางที่ 13 ข้อมูลของผลการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT

ชนิดเซลล์	ครั้งที่	ΔA_s	ΔA_b	ΔA	ปริมาณ โปรตีน ($\mu\text{mol/h/mg}$)	ปริมาณ โปรตีนเฉลี่ย ($\mu\text{mol/h/mg}$)	S.D.
COS7	1	0.009	0.002	0.007	0.13	0.087	0.038
	2	0.004	0.001	0.003	0.06		
	3	0.008	0.004	0.004	0.07		
Hep-G2	1	0.029	0.002	0.019	0.35	0.317	0.029
	2	0.019	0.003	0.016	0.30		
	3	0.017	0.001	0.016	0.30		
Empty vector	1	0.008	0.004	0.004	0.07	0.073	0.015
	2	0.005	0.002	0.003	0.06		
	3	0.007	0.002	0.005	0.09		
Wild type	1	0.194	0.005	0.189	3.51	3.213	0.259
	2	0.166	0.003	0.163	3.03		
	3	0.170	0.003	0.167	3.10		
Pro11Arg	1	0.064	0.001	0.063	1.17	1.007	0.249
	2	0.043	0.004	0.039	0.72		
	3	0.062	0.001	0.061	1.13		

หมายเหตุ COS7 คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 เปล่า

Hep-G2 คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ Hep-G2 เปล่า

Empty vector คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่ได้รับ expression vector เปล่า

Wild type คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่ได้รับยีน AGXT ปกติซึ่งเชื่อมต่อกับ
expression vector

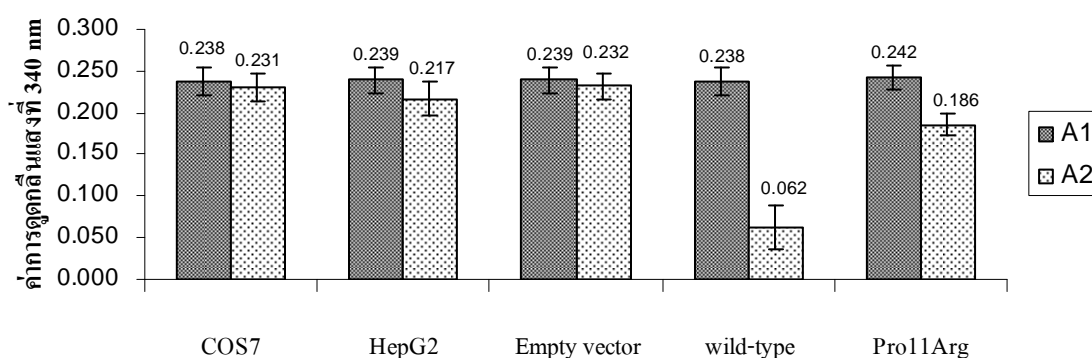
Pro11Arg คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่ได้รับยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ซึ่ง
เชื่อมต่อกับ expression vector

$\Delta A_s = A_1 - A_2$ ของหลอดตัวอย่าง (sample)

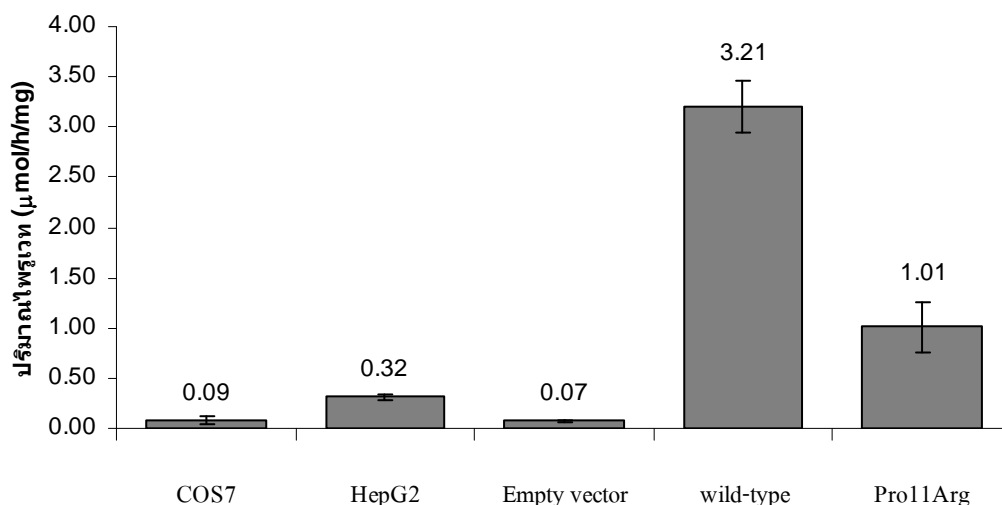
$\Delta A_b = A_1 - A_2$ ของหลอด blank

$\Delta A = \Delta A_s - \Delta A_b$

ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงเป็นกราฟดังภาพที่ 24 จะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) ของทุกชนิดตัวอย่างมีความใกล้เคียงกัน แต่หลังจากใส่เอนไซม์ LDH พบว่าค่าการดูดกลืนแสง (A2) ลดลงแตกต่างกัน โดยเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบปกติมีความแตกต่างระหว่างค่า A1 กับค่า A2 มากที่สุด รองลงมาคือ เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg ตามด้วยเซลล์ Hep-G2 เปลา่ แม้ว่าจะจะเป็นเซลล์ตับ แต่ระดับการแสดงออกของยีน (การผลิตเอนไซม์ AGT) ยังน้อยกว่าเซลล์ 2 ชนิดแรกซึ่งเป็น over expression ส่วนเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยพลาสมิดเปลา่ (empty vector) และเซลล์ COS7 เปลา่ มีความแตกต่างระหว่างค่า A1 กับค่า A2 น้อยมาก ซึ่งแทบจะไม่แตกต่างกัน ที่เป็นเช่นนี้ เพราะโดยปกติเอนไซม์ AGT จะแสดงออกเฉพาะในเซลล์ตับ แต่เซลล์ COS7 เป็นเซลล์ไต ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ western blot ที่ไม่พบเอนไซม์ AGT ในเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วย พลาสมิดเปลา่ (empty vector) สำหรับภาพที่ 25 แสดงให้เห็นถึงปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบในแต่ละชนิดตัวอย่าง โดยถ้ามีปริมาณโปรตีนมาก แสดงว่าเอนไซม์ AGT มีความสามารถในการทำงานได้ดีมากด้วย ซึ่งพบว่า เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบปกติ มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย $3.21 \pm 0.26 \mu\text{mol/h/mg}$ ในขณะที่เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg (Pro11Arg AGXT) มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย $1.01 \pm 0.25 \mu\text{mol/h/mg}$ ซึ่งน้อยกว่าประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีน AGXT ปกติ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีความสามารถในการทำงานเพียง 31% ซึ่งลดลง 69% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีน AGXT ปกติ



ภาพที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และหลังใส่เอนไซม์ LDH (A2)



ภาพที่ 25 กราฟแสดงปริมาณไซโตไคน์ที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ เพื่อดูความสัมพันธ์ในภาพรวมของปริมาณไซโตไคน์เฉลี่ยที่ได้จากเซลล์ทั้ง 5 ชนิด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS 17 ผลที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 14 สามารถสรุปได้ว่า ชนิดของตัวอย่างอย่างน้อย 1 ชนิดมีค่าเฉลี่ยปริมาณไซโตไคน์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 14 ค่าทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA

Oneway ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig. (P-value)
Between Groups	21.121	4	5.280	200.363	.000
Within Groups	.264	10	.026		
Total	21.384	14			

โดยที่สมมติฐาน คือ H_0 : ปริมาณเฉลี่ยของไซโตไคน์ในแต่ละชนิดตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างกัน

H_a : ปริมาณเฉลี่ยของไซโตไคน์อย่างน้อย 1 ชนิดตัวอย่างมีค่าแตกต่างกัน

จากตาราง ANOVA ได้ค่า P-value = 0 → ยอมรับ H_a

เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ด้วยวิธี One-way ANOVA แล้วพบว่า มีปริมาณเฉลี่ยของ ไพรูเวทอย่างน้อย 1 ชนิดตัวอย่างมีค่าแตกต่างกัน แต่ไม่สามารถระบุได้ว่า ปริมาณเฉลี่ยของ ไพรูเวทจากเซลล์คู่ใดที่แตกต่างกันบ้าง จึงต้องทำการเปรียบเทียบโดยการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ด้วยวิธี Post Hoc Tests ซึ่งเป็น Multiple Comparisons ทำให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลทีละคู่ได้ โดยเลือกการวิเคราะห์แบบ Tukey HSD ด้วยโปรแกรม SPSS 17 ข้อมูลที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 15 ซึ่งสรุปผลได้ว่า สามารถแบ่งชนิดตัวอย่าง เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก (COS7 HepG2 และ Empty vector) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณไพรูเวทไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างทั้งกับ wild type และ Pro11Arg AGXT กลุ่มที่สอง (wild type AGXT) และกลุ่มที่สาม (Pro11Arg AGXT) โดยที่ wild type และ Pro11Arg AGXT มีค่าเฉลี่ยของปริมาณไพรูเวทแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลที่แสดงถึงความแตกต่างระหว่างคู่ที่เปรียบเทียบกัน ดังตารางที่ 16 ซึ่งสามารถเปรียบเทียบชนิดตัวอย่างทีละคู่ได้จากค่า P-value (Sig) โดยถ้าคู่ใดมีค่า P-value \leq 0.01 แสดงว่า คู่นั้นมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 15 สรุปผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD

Tukey HSD^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
Empty vector	3	.0733		
COS7	3	.0867		
HepG2	3	.3167		
Pro11Arg AGXT	3		1.0067	
wild type AGXT	3			3.2133
Sig.		.406	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD
โดยการเปรียบเทียบทีละคู่

Post Hoc Tests (Multiple Comparisons)

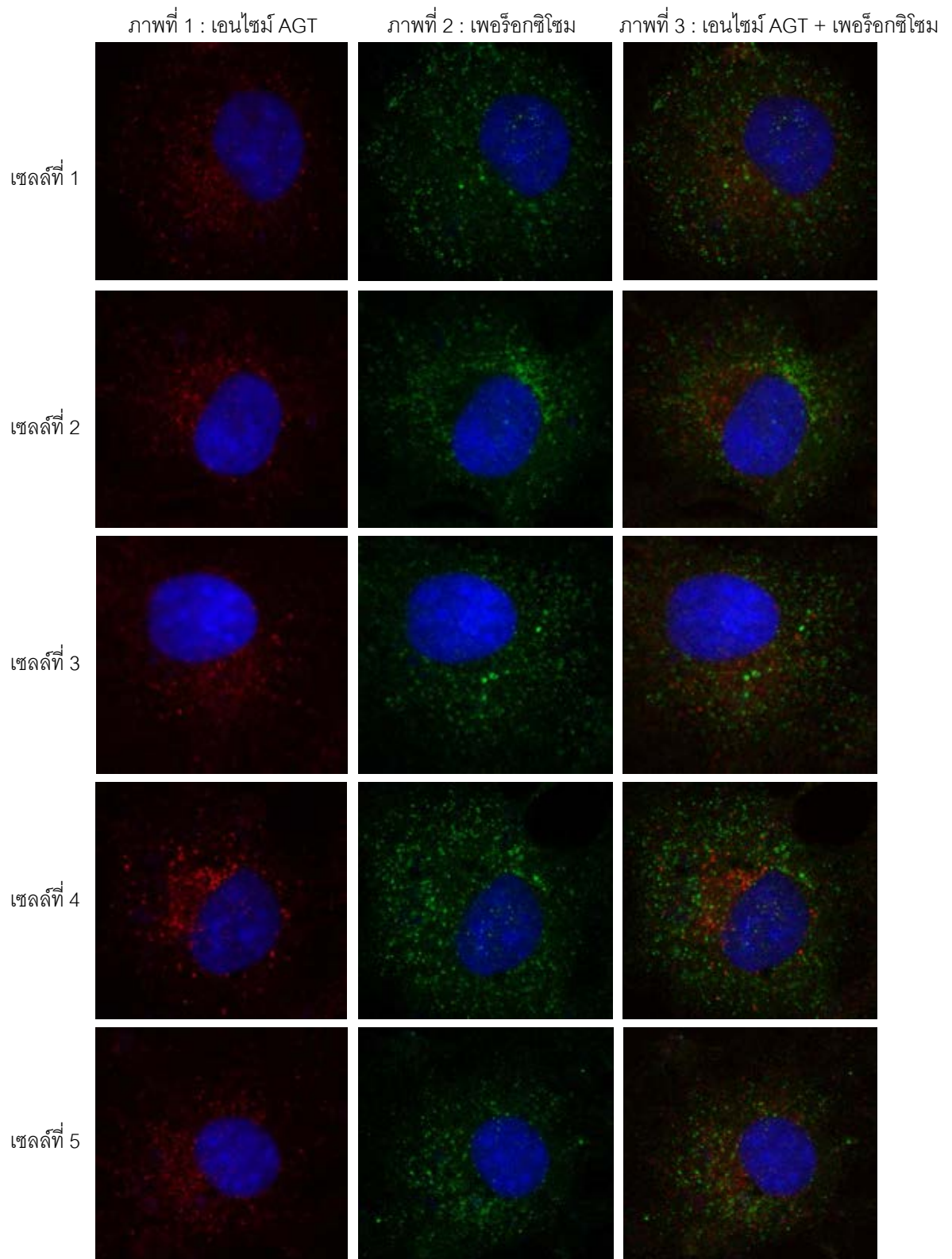
Data (Tukey HSD)

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. (P-value)	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
COS7	HepG2	-.23000	.13255	.457	-.8051	.3451
	Empty vector	.01333	.13255	1.000	-.5618	.5884
	wild type AGXT	-3.12667*	.13255	.000	-3.7018	-2.5516
	P11R AGXT	-.92000*	.13255	.000	-1.4951	-.3449
HepG2	COS7	.23000	.13255	.457	-.3451	.8051
	Empty vector	.24333	.13255	.406	-.3318	.8184
	wild type AGXT	-2.89667*	.13255	.000	-3.4718	-2.3216
	P11R AGXT	-.69000*	.13255	.003	-1.2651	-.1149
Empty vector	COS7	-.01333	.13255	1.000	-.5884	.5618
	HepG2	-.24333	.13255	.406	-.8184	.3318
	wild type AGXT	-3.14000*	.13255	.000	-3.7151	-2.5649
	P11R AGXT	-.93333*	.13255	.000	-1.5084	-.3582
wild type AGXT	COS7	3.12667*	.13255	.000	2.5516	3.7018
	HepG2	2.89667*	.13255	.000	2.3216	3.4718
	Empty vector	3.14000*	.13255	.000	2.5649	3.7151
	P11R AGXT	2.20667*	.13255	.000	1.6316	2.7818
P11R AGXT	COS7	.92000*	.13255	.000	.3449	1.4951
	HepG2	.69000*	.13255	.003	.1149	1.2651
	Empty vector	.93333*	.13255	.000	.3582	1.5084
	wild type AGXT	-2.20667*	.13255	.000	-2.7818	-1.6316

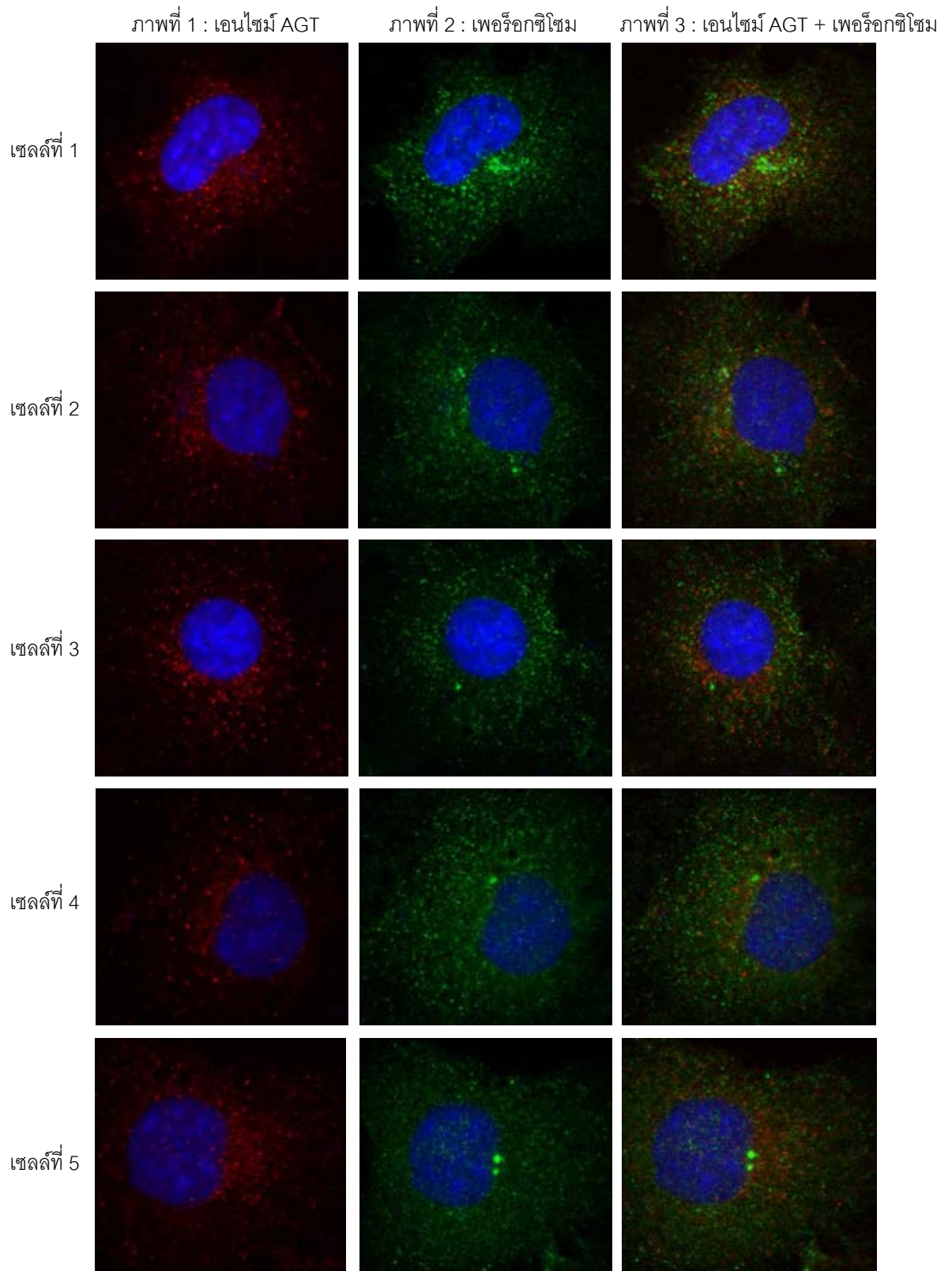
*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

2.3 การตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์

จากการตรวจสอบด้วยวิธี immunofluorescence พบว่า ในเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ ดังภาพที่ 26 มีรูปแบบการย้อมติดสีของเอนไซม์ AGT (สีแดง) โดยถูกทำให้เห็นด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน V5 ที่ผลิตจากยีนใน expression vector ซึ่งใช้เป็น marker ของเอนไซม์ AGT ไม่เหมือนกับรูปแบบของเพอร์อกซิโซม (สีเขียว) โดยถูกทำให้เห็นด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน catalase ซึ่งใช้เป็น marker ของเพอร์อกซิโซม เมื่อเทียบกับผลที่ได้จากเอนไซม์ AGT ปกติ ดังภาพที่ 27 พบว่ารูปแบบจะคล้ายคลึงกัน ทาบทับกันสนิท ทำให้เมื่อซ้อนทับสีกันในภาพที่ 3 ของแต่ละเซลล์ สีที่ได้จึงเปลี่ยนเป็นสีส้ม แต่ในบางบริเวณอาจเห็นเป็นสีแดงอยู่ เนื่องจากการติดสีของสีแดงเข้มมาก ส่วนสีเขียวติดแบบจาง ๆ ทำให้เมื่อซ้อนทับสีกันจึงปรากฏเป็นสีแดงแทนที่จะเป็นสีส้ม แต่ขณะที่ในเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์มีบางบริเวณที่สีแดงไม่ทับซ้อนกับสีเขียวประมาณ 20% แสดงว่า เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ประมาณ 20% นั้นถูกส่งไปยังออร์แกเนลล์อื่นที่ผิดตำแหน่งหรืออาจติดอยู่ที่เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม ไม่ได้ถูกส่งไปยังเพอร์อกซิโซมตามปกติ โดยผลการวิเคราะห์นั้นได้มาจากการเลือกจุดสีแดงในภาพที่ 1 ของแต่ละเซลล์ทั้งเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์และปกติ แล้วเปรียบเทียบกับตำแหน่งเดียวกันในภาพที่ 2 ของเซลล์เดียวกัน ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 เพื่อตรวจสอบว่าสีแดงในภาพที่ 1 ซ้อนทับกับสีเขียวในภาพที่ 2 หรือไม่ ภาพละ 20 จุด พบว่าในกลุ่มเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีค่าเฉลี่ยประมาณ 4 จุดที่สีแดงไม่ซ้อนทับกับสีเขียว



ภาพที่ 26 การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่สังเคราะห์จากเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg ด้วยวิธี immunofluorescence (60X) โดย สีแดง คือ เอนไซม์ AGT, สีเขียว คือ เพอร์ออกซิโซม, และ สีนํ้าเงิน คือ นิวเคลียส



ภาพที่ 27 การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่สังเคราะห์จาก
 เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบปกติ ด้วยวิธี immunofluorescence (60X)
 โดย สีแดง คือ เอนไซม์ AGT สีเขียว คือ เพอร์ออกซิโซม และ สีนํ้าเงิน คือ นิวเคลียส

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ยังคงสามารถผลิตเอนไซม์ AGT ได้ในระดับปกติและไม่ถูกสลาย เนื่องจากแถบที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับยีนแบบปกติ แต่ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ลดลงประมาณ 69% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรค PH1 ของผู้ป่วยรายนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยมีความผิดปกติแบบดีลีชันในระดับโครโมโซม ซึ่งทำให้มีการหลุดหายไปของโครโมโซมคู่ที่ 2 ส่วนปลายซึ่งเป็นบริเวณที่มียีน AGXT รวมอยู่ด้วย ประกอบกับเกิดมิวเทชันในยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg บนโครโมโซมอีกแห่งหนึ่ง ทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT เหลือเพียง 15% เท่านั้น จึงเกิดการสะสมของผลิตภัณฑ์แคลเซียมออกซาเลทปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดนิ่วในไตและเป็นโรค PH1 ส่วนตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ประมาณ 20% นั้นถูกส่งไปยังออร์แกเนลล์อื่นที่ผิดตำแหน่งแทนที่จะเป็นเพอร์ออกซิโซมตามปกติ ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจติดอยู่ที่เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมหรือถูกส่งไปผิดตำแหน่งที่ไม่โทคอนเดรียแทน ดังนั้นผู้ป่วยรายนี้ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์ในยีน AGXT แบบ c.32C>G ส่งผลให้ในระดับโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโนแบบ p.Pro11Arg มีสาเหตุหลักของการเกิดโรค PH1 จากความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสลายไกลออกซิเลทเหลือเพียง 15% เท่านั้น ประกอบกับเอนไซม์ประมาณ 20% ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติเนื่องจากถูกส่งไปผิดตำแหน่ง

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิจัยได้สรุปยืนยันแน่ชัดว่า เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ไม่ได้ถูกย่อยสลาย และมีปริมาณปกติ เนื่องจากการตรวจสอบด้วยวิธี western blot ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าปรากฏแถบของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์และมีปริมาณความเข้มของแถบใกล้เคียงกับแถบของเอนไซม์ AGT ปกติ แสดงว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine ไม่มีผลต่อการจับกันของ 2 หน่วยย่อย (dimerization) ทำให้ 2 หน่วยย่อยของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์สามารถจับกันได้ตามปกติ จึงไม่ถูกย่อยสลาย เพราะส่วนใหญ่การย่อยสลายเกิดจากการที่หน่วยย่อยแต่ละหน่วยไม่สามารถจับกันได้ ทำให้เกิดความไม่เสถียรและนำไปสู่การรวมตัวเป็นกลุ่มก้อน จึงถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว (Danpure *et al.*, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับ dimerization ของเอนไซม์ AGT ที่มีการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งเดียวกัน แต่เปลี่ยนเป็น Leucine ซึ่งพบในแอลลีลรอง (Lumb, *et al.*, 1999) พบว่า การเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนดังกล่าวไม่มีผลต่อ dimerization ของเอนไซม์ หน่วยย่อยของเอนไซม์ยังสามารถจับกันได้ตามปกติเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ AGT ปกติที่พบในแอลลีลหลัก

สำหรับความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ซึ่งลดลงประมาณ 69% จากการตรวจสอบด้วยวิธี semiautomated spectrophotometric นั้นน่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนจาก Proline ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติ คือ ไม่มีขั้ว ไม่ชอบน้ำ เปลี่ยนเป็น Arginine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติตรงกันข้าม คือ มีขั้ว และมีประจุรวมเป็นบวก ส่งผลให้การจัดเรียงตัวของโปรตีน (conformation) เกิดการเปลี่ยนแปลง ทำให้สารตั้งต้นที่จะเข้าจับกับเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์เกิดได้ยากขึ้น เนื่องจากความไม่เหมาะสมกันระหว่างรูปร่างของเอนไซม์ AGT ที่เปลี่ยนไปกับสารตั้งต้น แต่ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่าเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายไกลอออกซีเลทได้เลย ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองที่ยืนยันว่า เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์นี้ยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ แต่เหลือเพียง 31% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ปกติในเวลาเท่ากัน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีความสามารถในการทำงานลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งเดียวกันที่พบในแอลลีลรองจาก Proline เป็น Leucine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันคุณสมบัติเดียวกัน แต่มีผลทำให้ลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ได้ โดยทำให้กระบวนการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีในการสลายไกลอออกซีเลทเกิดได้น้อยลง (Lumb and Danpure, 2000)

ส่วนการตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ด้วยวิธี immunofluorescence นั้นพบว่า เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ประมาณ 20% ไม่ได้ถูกส่งไปยังเพอร์ออกซิโซม

ตามปกติ แต่ส่งไปผิดตำแหน่ง เนื่องจากการวิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 พบว่าสีแดงซึ่งย้อมติดเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ไม่ซ้อนทับกับสีเขียวซึ่งย้อมติดเอนไซม์ catalase ที่พบเฉพาะในเพอร์อกซิโซม โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 4 จุด จากจุดที่สุ่มตรวจสอบทั้งหมด 20 จุดในแต่ละภาพ รวมทั้งหมด 5 ภาพ สำหรับออร์แกเนลล์ที่ส่งไปผิดตำแหน่ง เป้าหมายนั้น คาดว่าน่าจะเป็นไมโทคอนเดรีย เนื่องจากมีรายงานการศึกษาผลของเอนไซม์ AGT ที่มีการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับการกลายพันธุ์ที่พบในงานวิจัยนี้ โดยเปลี่ยนจาก Proline เป็น Leucine สามารถพบได้ในแอลลีลรอง (Purdue *et al.*, 1990) พบว่า เอนไซม์ AGT ประมาณ 5% จะถูกส่งไปผิดตำแหน่งโดยถูกส่งไปยังไมโทคอนเดรีย แทนที่จะเป็นเพอร์อกซิโซมตามปกติ ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 เป็น Leucine นั้นทำให้เกิด mitochondrial targeting sequence (MTS) อย่างอ่อนขึ้น ซึ่งเป็นสัญญาณสำคัญที่นำเอนไซม์ AGT ไปสู่ไมโทคอนเดรีย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่า MTS จะมีการจัดรูปร่างตรงส่วนบริเวณด้านปลายหมู่อะมิโนให้อยู่ในรูปเกลียวแบบแอลฟา ซึ่งมีประจุรวมเป็นบวก (Heijne, 1986) โดย MTS สามารถจับกับตัวรับ (import receptor) TOM20 ที่ฝังตัวอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย ทำให้เอนไซม์ AGT ที่มีสัญญาณ MTS อยู่จะถูกส่งเข้าไปในไมโทคอนเดรียได้ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ AGT ปกติที่ผลิตจากแอลลีลหลักจะมีกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 10 และ 11 เป็น Proline ทั้งคู่ ซึ่งถือว่าการมี Proline อยู่ติดติดกัน 2 ตัวเป็นตัวขัดขวางการจัดรูปร่างเป็นเกลียวแบบแอลฟา ทำให้สัญญาณ MTS จึงไม่เกิดขึ้น (Lumb *et al.*, 1999) ดังนั้นการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบใหม่ในงานวิจัยนี้ จึงส่งผลทำลายตัวขัดขวางการเกิดสัญญาณ MTS ดังกล่าว ทำให้สัญญาณ MTS จึงสามารถเกิดขึ้นได้ อีกทั้ง Arginine เป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันซึ่งมีคุณสมบัติคือ มีขั้ว และมีประจุรวมเป็นประจุบวก ยิ่งส่งผลให้เกิดสัญญาณ MTS ที่แรงขึ้นกว่าการเปลี่ยนเป็น Leucine เนื่องจาก Leucine เป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว จึงเป็นเพียงการทำลายตัวขัดขวางการเกิดสัญญาณ MTS เท่านั้น ทำให้การกลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีการส่งเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ไปผิดตำแหน่งมากถึง 20% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT แบบ p.Pro11Leu ที่ได้จากแอลลีลรองซึ่งเกิดการส่งผิดตำแหน่งเป้าหมายเพียง 5% อย่างไรก็ตามเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ Pro11Arg ส่วนใหญ่ประมาณ 80% ยังคงถูกส่งไปยังเพอร์อกซิโซมตามปกติ ทั้งนี้เป็นเพราะทางด้านปลายหมู่คาร์บอกซียังมี peroxisomal targeting sequence (PTS) อยู่ตรงส่วนปลาย ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ 3 ตัว คือ KKL (Lysine-Lysine-Leucine) เป็นสัญญาณสำคัญที่นำเอนไซม์ AGT ไปยังเพอร์อกซิโซม ส่วนที่คาดการณ์ว่าอาจติดอยู่ที่เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมนั้น เป็นเพราะภาพที่ได้จากการวิเคราะห์ตำแหน่งเป้าหมายของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์

ของเซลล์ที่ 2 ในภาพที่ 26 ของบทที่ 4 พบว่า มีจุดสีแดงกระจายเป็นกลุ่มอยู่ติดกับนิวเคลียสและไม่มีสีเขียว (ตำแหน่งของเพอร์ออกซิโซม) ซ้อนทับ จึงคาดว่าบริเวณนั้นน่าจะเป็นเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม โดยปกติพอลิเพปไทด์ที่ผลิตขึ้นในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแล้วมีการม้วนตัวผิดปกติ จะติดค้างอยู่ภายในออร์แกเนลล์ไม่สามารถส่งต่อไปยังตำแหน่งเป้าหมายได้ตามปกติ จึงต้องมีกระบวนการ surveillance system ซึ่งมี chaperone เข้ามาตรวจสอบและกำจัดพอลิเพปไทด์เหล่านั้นให้หมดไป โดยส่งไปย่อยสลายในไลโซโซม

งานวิจัยนี้ระบุว่ามียีนที่ประโยชน์ต่อผู้ป่วยรายนี้ ซึ่งทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค PH1 ว่าเกิดจากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ลดลงเป็นอย่างมาก ทำให้แพทย์สามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบการรักษารวมทั้งเข้าใจพยาธิสภาพของการเกิดโรคมากขึ้น เพื่อจัดยาหรือวิตามินที่จะช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ AGT ให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ครอบครัวของผู้ป่วยเองยังสามารถใช้ประโยชน์จากงานวิจัยนี้ในการวางแผนสำหรับการมีบุตรคนต่อไป ควรมีการวินิจฉัยทารกในครรภ์ เพื่อตรวจสอบว่ามีความผิดปกติในยีน AGXT หรือไม่ รวมทั้งตรวจสอบในระดับโครโมโซมว่าเกิดการขาดหายไปโครโมโซมคู่ที่ 2 หรือไม่ เพื่อป้องกันไม่ให้บุตรคนต่อไปเป็นโรค PH1 เช่นเดียวกับพี่สาวทั้งสองคน สำหรับในแวดวงวิชาการนับว่าเป็นการเพิ่มเติมองค์ความรู้เกี่ยวกับโรค PH1 ให้มากขึ้น ทำให้ทราบบทบาทและการทำงานที่ผิดปกติไปของยีน AGXT ซึ่งเกิดจากเปลี่ยนชนิดของเบสเพียงตำแหน่งเดียวในลำดับที่ 32 จากไซโทซีน เป็นกวานีน ส่งผลให้ในระดับโปรตีนมีการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับที่พบในแอลลีลรอง แต่เปลี่ยนเป็น Leucine แทน พบว่าแม้จะเป็นตำแหน่งเดียวกัน แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนคนละชนิดกัน กลับส่งผลให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ AGT ผิดปกติไปแตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

การทำ transfection ซึ่งเป็นการถ่ายพลาสมิดเข้าไปภายในเซลล์ COS7 เพื่อให้ยีนมีการแสดงออกโดยผลิตเอนไซม์ AGT สำหรับนำไปตรวจสอบด้วยวิธี immunofluorescence นั้นสามารถปรับลดปริมาณพลาสมิดให้น้อยลงได้ตามความเหมาะสม เพื่อให้สีแดงที่ได้จากการย้อมติดเอนไซม์ AGT ไม่ติดเข้มจนเกินไป เนื่องจากยีนมีการแสดงออกแบบ over expression อยู่แล้ว แต่อย่างไรก็ตามปริมาณพลาสมิดที่ถ่ายเข้าไปภายในเซลล์ COS7 ทั้งยีนปกติและยีนที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ต้องมีปริมาณเท่ากัน เพื่อเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นได้ว่ามาจากความบกพร่องของยีนที่กลายพันธุ์จริง ไม่ได้เป็นผลจากปริมาณการแสดงออกของยีนที่ไม่เท่ากันตั้งแต่เริ่มต้น

ควรศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพิ่มเติมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เหมือนกับงานวิจัยของ Zhang *et al.*, 2003 สำหรับตรวจสอบผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการจำลองสถานการณ์โดยเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมสำหรับการอธิบายความสามารถในการทำงานที่ลดลง รวมทั้งสัญญาณการส่งเอนไซม์ในปลายด้านอะมิโนที่เปลี่ยนไป จึงทำให้ถูกส่งไปผิดตำแหน่ง

ในการทำ immunofluorescence นั้นควรใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมเพิ่มเติม เพื่อตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ซึ่งถูกส่งไปผิดตำแหน่งแทนที่จะเป็นเพอร์อกซิโซมให้แน่ชัดยิ่งขึ้น

การตรวจสอบภาพที่ได้จากการทำ immunofluorescence สามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์สีที่ได้จากการย้อมว่ามี การทับซ้อนกันมากน้อยเพียงใด เพื่อให้การวิเคราะห์ผลมีความสะดวก รวดเร็วยิ่งขึ้น แต่การใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์นี้มีต้นทุนค่าใช้จ่ายทางด้านลิขสิทธิ์โปรแกรมค่อนข้างสูง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์. 2547. โรคพันธุกรรมเมแทบอลิก: แนวทางการวินิจฉัยและดูแลรักษา. ใน *พันธุศาสตร์คลินิกในเด็ก*, หน้า 189. กรุงเทพมหานคร: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น.

ภาษาอังกฤษ

Caldwell, E. F., Mayor, L. R., Thomas, M. G., Danpure, C. J. 2004. Diet and the frequency of the alanine:glyoxylate aminotransferase Pro11Leu polymorphism in different human populations. *Hum. Genet.* 115:504-509.

Cellini, B., Bertoldi, M., Montioli, R., Paiardini, A. and Voltattorni, C. B. 2007. Human wild-type alanine:glyoxylate aminotransferase and its naturally occurring G82E variant: functional properties and physiological implications. *Biochem J.*, 408:39-50.

Coulter-Mackie, M. B., Lian, Q. and Wong, S. G. 2005. Overexpression of human alanine:glyoxylate aminotransferase in *Escherichia coli*: renaturation from guanidine-HCl and affinity for pyridoxal phosphate co-factor. *Protein Expression and Purification.* 41:18-26.

Danpure, C. J. and Jennings, P. R. 1986. Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I. *FEBS Lett.* 201:20-24.

Danpure, C. J., Cooper, P. J., Wise, P. J. and Jennings, P. R. 1989. An enzyme trafficking defect in two patients with primary hyperoxaluria type 1: peroxisomal alanine/glyoxylate aminotransferase rerouted to mitochondria. *J Cell Biol.* 108:1345-1352.

Danpure, C. J., Purdue, P. E., Fryer, P., Griffiths, S., Allsop, J., Lumb, M. J., et al. 1993. Enzymological and mutational analysis of a complex primary hyperoxaluria type 1 phenotype involving alanine:glyoxylate aminotransferase peroxisome-to-mitochondrion mistargeting and intraperoxisomal aggregation. *Am J Hum Genet.* 53:417-432.

- Danpure, C. J., Scriver, C. R., Beauder, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., et al. Hyperoxaluria. in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edition. pp.3323-3367. New York: McGraw Hill.
- Danpure, C. J. and Rumsby, G. 2004. Molecular aetiology of primary hyperoxaluria and its implications for clinical management. *Expert Rev Mol Med*. 6:1-16.
- Danpure, C. J. 2005. Primary hyperoxaluria: from gene defects to designer drugs?. *Nephrol Dial Transplant*. 20:1525-1529.
- Danpure, C. J. 2006. Primary hyperoxaluria type 1: AGT mistargeting highlights the fundamental differences between the peroxisomal and mitochondrial protein import pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763:1776-1784.
- Harambat, J., Fargue, S., Bacchetta, J., Acquaviva, C. and Cochat, P. 2011. Primary Hyperoxaluria. *Int J Nephrol*. 2011:1-11.
- Heijne, G. Von. 1986. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EBMO J*. 5:1335-1342.
- Hoppe, B. and Langman, C. B. 2003. A United States survey on diagnosis, treatment, and outcome of primary hyperoxaluria. *Pediatr Nephrol*. 18:986-991.
- Lumb, M. J., Drake, A. F. and Danpure, C. J. 1999. Effect of N - terminal α - helix formation on the dimerization and intracellular targeting of alanine:glyoxylate aminotransferase. *J Biol Chem*. 274:20587-20596.
- Lumb, M. J. and Danpure, C. J. 2000. Functional synergism between the most common polymorphism in human alanine:glyoxylate aminotransferase and four of the most common disease-causing mutations. *J Biol Chem*. 275:36415-36422.
- Masyuk T. V., Huang B. Q., Ward C. J., Masyuk A. I., Yuan D., Splinter P. L., et al. 2003. Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology* 125:1303–1310.
- Motley, A., Lumb, M. J., Oatey, P. B., Jennings, P. R., De Zoysa, P. A., Wanders, R. J., Tabak, H. F. and Danpure, C. J. 1995. Mammalian alanine/glyoxylate aminotransferase 1 is imported into peroxisomes via the PTS1 translocation pathway. Increased degeneracy and context specificity of the mammalian PTS1

- motif and implications for the peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of AGT in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol.* 131:95-109.
- Purdue, P. E., Takada, Y. and Danpure, C. J. 1990. Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine:glyoxylate aminotransferase in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol.* 111:2341-2351.
- Purdue, P. E., Lumb, M. J., Fox, M., Griffo, G., Hamon-Benais, C., Povey, S. et al. 1991. Characterization and chromosomal mapping of a genomic clone encoding human alanine:glyoxylate aminotransferase. *Genomics.* 10:34-42.
- Purdue, P. E., Lumb, M. J., Allsop, J., Minatogawa, Y. and Danpure, C. J. 1992. A glycine-to-glutamate substitution abolishes alanine:glyoxylate aminotransferase catalytic activity in a subset of patients with primary hyperoxaluria type 1. *Genomics.* 13:215-218.
- Rumsby, G., Weir, T. and Samuelli, C. T. 1997. A semiautomated alanine:glyoxylate aminotransferase assay for the tissue diagnosis of primary hyperoxaluria type 1. *Ann Clin Biochem.* 34:400-404.
- Santana, A., Salido, E., Torres, A. and Shapiro, L. J. 2003. Primary hyperoxaluria type 1 in the Canary Islands: a conformational disease due to I244T mutation in the P11L-containing alanine:glyoxylate aminotransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7277-7282.
- Takada, Y., Kaneko, N., Esumi, H., Purdue, P. E. and Danpure, C. J. 1990. Human peroxisomal L-alanine: glyoxylate aminotransferase. Evolutionary loss of a mitochondrial targeting signal by point mutation of the initiation codon. *Biochem J.* 268:517-520.
- Tantibirojn, P., Kittikowit, W., and Kingwattanakul, P. 2007. Primary hyperoxaluria. *J Med Assoc Thai.* 90:1669-1672.
- Walter, M. J. and Dang, C. V. 1998. Pancytopenia secondary to oxalosis in a 23-year-old woman. *Blood.* 91:4394.
- Wasant, P., Svasti, J., Srisomsap, C. and Liammongkolkul S. 2002. Inherited metabolic disorders in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 85:700-709.

- Williams, E. L., Acquaviva, C., Amoroso, A., Chevalier, F., Coulter-Mackie, M., Monico, C. G., et al. 2009. Primary hyperoxaluria Type 1: Update and Additional Mutation Analysis of the AGXT Gene. *Human Mutation*. 30:910-917.
- Woerden, C. S., Groothoff, J. W., Wanders, R. J., Davin, J. C. and Wijburg, F. A. 2003. Primary hyperoxaluria type1 in The Netherlands: prevalence and outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 18:273-279.
- Zhang, X., Roe, S. M., Hou, Y., Bartlam, M., Rao, Z., Pearl, L. H. et al. 2003. Crystal structure of alanine:glyoxylate aminotransferase and the relationship between genotype and enzymatic phenotype in primary hyperoxaluria type 1. *J Mol Biol*. 331:643-652.

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 ₂ HPO ₄	7.2	กรัม
— KH ₂ PO 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 K₂HPO₄	ปริมาตร 500 มิลลิลิตร	
— K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O		114.1 กรัม
ละลายใน Distilled water ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร		
1 M KH₂PO₄	ปริมาตร 40 มิลลิลิตร	
— KH ₂ PO 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	$\Delta A =$ $\Delta A_s - \Delta A_b$	ปริมาณ โปรตีน ($\mu\text{mol/h/mg}$)
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	$\Delta A = \Delta A_s - \Delta A_b$	ปริมาณ โพรูเวท ($\mu\text{mol/h/mg}$)
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	$\Delta A =$ $\Delta A_s - \Delta A_b$	ปริมาณ ไพริูเวท ($\mu\text{mol/h/mg}$)
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			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ – นามสกุล	นายเนลวัฒน์ กิ่งสุวรรณพงษ์
วันเดือนปีเกิด	2 มีนาคม พ.ศ. 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดลพบุรี
อาชีพปัจจุบัน	ข้าราชการครู ระดับ ค.ศ. 1 โรงเรียนพิบูลวิทยาลัย จ.ลพบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	170/150 หมู่ 5 หมู่บ้านสิริบุญญา 3 ซอย 12/1 ต.ถนนใหญ่ อ.เมือง จ.ลพบุรี 15000
เบอร์โทรศัพท์	036-636153, 089-1399987
ประวัติการศึกษา	

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีการศึกษา ที่สำเร็จการศึกษา
มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ (มศว.)	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) เกียรตินิยมอันดับ 1	ชีววิทยา	2546
	ประกาศนียบัตรบัณฑิต (ป.บัณฑิต)	วิชาชีวคครู	2547

ผลงาน/ทุนการศึกษาที่เคยได้รับ

- พ.ศ. 2543 – 2547 ทุนการศึกษาโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทาง
วิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (ทุน สควค.) ระดับปริญญาตรี
- พ.ศ. 2551 ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช
- พ.ศ. 2551 – 2552 ทุนการศึกษาโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทาง
วิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (ทุน สควค.) ระดับปริญญาโท
- พ.ศ. 2553 รางวัลดี ในการประกวดการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11
ประเภทบรรยาย ระดับปริญญาโท กลุ่มวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
- พ.ศ. 2553 Master teacher สาขาวิชาชีววิทยา โดยมีผลคะแนนสอบในระดับดีมาก
จัดโดยสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์