การแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสจาก *Plasmodium falciparum* ใน *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์กลาย Δ*nce103*

นายภาคภูมิ ปานตั้น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2553 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.

EXPRESSION OF *Plasmodium falciparum* CARBONIC ANHYDRASE IN *Saccharomyces cerevisiae* DELETION MUTANT Δ*nce103*

Mr. Bhakbhoom Panthan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสจาก *Plasmodium falciparum* ใน *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์กลาย Δ*nce103*
โดย	นายภาคภูมิ ปานตั้น
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

……..อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

……กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรกุล อาภรณ์สุวรรณ)

ภาคภูมิ ปานตั้น : การแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสจาก *Plasmodium falciparum* ใน *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์กลาย Δ*nce103*. (EXPRESSION OF *Plasmodium falciparum* CARBONIC ANHYDRASE IN *Saccharomyces cerevisiae* DELETION MUTANT Δ*nce103*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. ชุลี ยมภักดี, 151 หน้า.

มาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัวชนิด *Plasmodium* โดยอาศัยยุงในสกุล *Anopheles* เพศเมียเป็นพาหะในการแพร่เชื้อ ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 1.5 - 2.7 ล้านคนเสียชีวิตจากจำนวนผู้ติดเชื้อ 515 ล้านคนทั่วโลก ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็นที่ตั้งของประเทศไทยนั้นมีการแพร่ระบาดของโรคนี้สูงเป็นอันดับที่สามของโลก สกุลของ *Plasmodium* ที่ก่อให้เกิดโรคมี 4 สกุลแต่สกุลที่สำคัญคือ *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในผู้ติดเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากการดื้อยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันและยาที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียในปัจจุบันยังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอเนื่องจากการดื้อยาและความเป็นพิษของยาที่ใช้รักษา ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นต้องค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆเพื่อพัฒนายาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่ายาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน วิธีการที่จะหายาใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างไปจากเดิมจำเป็นต้องใช้วิธีการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใช้หลักการใหม่ๆ *P. falciparum* สามารถสังเคราะห์เบสไพริมิดีนซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างสารพันธุกรรม โดยมีเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในขั้นตอนแรกๆ และเอนไซม์ดังกล่าวในเชื้อมาลาเรียต่างจากเอนไซม์ชนิดเดียวกันในมนุษย์ ทำให้เอนไซม์นี้น่าจะเป็นโปรตีนเป้าหมายสำหรับการค้นหายาใหม่ๆในการรักษาโรคมาลาเรีย ในงานวิจัยนี้มุ่งหมายที่จะศึกษาการทำหน้าที่ทดแทนเอนไซม์เป้าหมายจากเชื้อมาลาเรียในยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*nce103* โดยทำการดัดแปลงพันธุกรรมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยการทำลายยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส *NCE103* ซึ่งส่งผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มี CO_2 ต่ำ และนำเข้ายีนประมวลรหัสเอนไซม์เป้าหมายของเชื้อ *P. falciparum* (ยีน *pfCA*) สู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อ *P. falciparum* ไม่ว่าจะเป็นชนิด full-length, truncated หรือ แบบยีนสังเคราะห์เพื่อให้มีการแสดงออกในยีสต์ได้ดี (codon-optimized gene) ไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่ของเอนไซม์ชนิดเดียวกันในยีสต์สายพันธุ์กลาย ขณะที่เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์และของมนุษย์สามารถทดแทนการทำหน้าที่ในยีสต์สายพันธุ์กลายได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อ *P. falciparum* ที่ได้จากยีนสังเคราะห์สามารถแสดงออกและสังเคราะห์โปรตีนในยีสต์ดังกล่าวได้เมื่อตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR และเวสเทิร์นบลอตตามลำดับ และพบว่ายีน *pfCA* แบบ truncated form สามารถแสดงออกโดยการสังเคราะห์ mRNA ได้ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี RT-PCR ผลจากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่ายีน *pfCA* ไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่แทนยีน *NCE103* ในยีสต์สายพันธุ์กลายได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2554 .....

5172405923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : *Saccharomyces cerevisiae* / CARBONIC ANHYDRASE / *Plasmodium falciparum* / COMPLEMENTATION

BHAKBHOOM PANTHAN : EXPRESSION OF *Plasmodium falciparum* CARBONIC ANHYDRASE IN *Saccharomyces cerevisiae* DELETION MUTANT Δ*nce103*. ADVISOR : ASST. PROF. CHULEE YOMPAKDEE, Ph.D., 151 pp.

Malaria is caused by the protozoan *Plasmodium* which is transmitted by the female *Anopheles* mosquitoes. The disease afflicts 515 million and kills 1.5–2.7 million people each year. Southeast Asia, where Thailand locates, got the third of the burden. Four species of the parasite cause this disease but *Plasmodium falciparum* is the main cause of clinical malaria and death. Because of the resistance, toxicity and uneffective of currently used drugs emphasizes the need on more effective drugs with antimalarial activity. To search for new antimalarial drugs with a novel mode of action, a screening system with a novel principle is needed. *P. falciparum* is a purine auxotroph, however, it can synthesize pyrimidines de novo, which is important for DNA synthesis. Carbonic anhydrase (CA) is the first enzyme in the pyrimidine biosynthetic pathway which represents a key difference between the parasite and its human host. *P. falciparum* CA (*pfCA*), therefore, is a possible drug target of antimalarial activity. This study aimed to investigate whether *pfCA* could functionally complement the activity CA-like enzyme encoded by *NCE103* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain lacking *NCE103* (Δ*nce103*). The *nce103* null mutant yeast is unable to grow under low CO_2 condition. The plasmid bearing either full-length *pfCA*, truncated-*pfCA*, codon-optimized *pfCA*, *NCE103* or human carbonic anhydrase isozyme II (*hCAII*) was transformed into the Δ*nce103* mutant yeast. It was found that plasmids bearing either full-length or truncated form or codon-optimized *pfCA* could not restore the growth defect under low CO_2 condition of the *nce103* null mutant yeast, while the plasmids bearing either yeast *NCE103* or *hCAII* could. RT-PCR and Western blot analysis revealed that the codon-optimized *pfCA* gene could be transcribed and translated, respectively, whereas the truncated-*pfCA* could only be transcribed in the *nce103* null mutant yeast strain. In conclusion, *pfCA* gene could not functionally complement that of yeast *NCE103*.

Department : Microbiology Student's Signature .....

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature .....

Academic Year : 2011

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2553 (MRG-WII535S005) และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 14 ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร ซึ่งเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรกุล อาภรณ์สุวรรณ กรรมการจากภายในภาควิชา และกรรมการจากภายนอกมหาวิทยาลัยในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ Professor Tokichi Miyakawa Department of Molecular Biotchnology, Graduate School for Advanced Science and Matter, Hiroshima University Japan ที่กรุณาให้สายพันธุ์ยีสต์และพลาสมิดต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยนี้รวมทั้งให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในระหว่างมาเยี่ยมห้องปฏิบัติการ 452 ของภาควิชาจุลชีววิทยา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีต่างๆ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา และขอบคุณ คุณศศิกานต์ บ่อผล คุณปิติปรีญา เสืออ่วม คุณอัญญพร แสงแก้ว พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการห้อง 452 และ 403 ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับทุกความห่วงใยความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว และ คุณณัฐ ทัศนเปรมสิน ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 4

1.3 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย..... 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

2.1 ยีสต์ (*S. cerevisiae*)..... 7

2.2 เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ (*S. cereviseae*)..... 7

2.3 การใช้ยีสต์เป็นเครื่องมือในการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 10

2.4 เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสเป็นเป้าหมายใหม่ในการรักษาโรค..... 12

2.5 บทบาทของ CA ใน *P. falciparum*..... 16

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 18

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 18

3.2 เคมีภัณฑ์..... 20

3.3 ยีสต์..... 23

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์..... 24

3.5 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต..... 27

หน้า

3.6 การกลายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการทำลายยีน *NCE103* โดยแทนที่ด้วยยีน *URA3*..... 27
3.7 การกลายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการทำลายยีน *PDR*5 และ *NCE103* เพื่อเพิ่มความไวของสารยับยั้งต่อยีสต์..... 39
3.8 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *S. cerevisiae* (*NCE103*)..... 41
3.9 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* (*pfCA*)..... 50
3.10 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมนุษย์ (*hCAII*)..... 56
3.11 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* โดยสังเคราะห์ยีนให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์ (*Opt pfCA*)..... 63
3.12 ศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์ Δ*nce103* และผลของการทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* โดยยีน *pfCA* และ *hCAII* ตามลำดับ..... 68
3.13 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Nce103, pfCA และ hCAII ในยีสต์กลายพันธุ์ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต..... 70
3.14 ศึกษาการแสดงออกของยีน *NCE103*, *pfCA* และ *hCAII* ในยีสต์กลายพันธุ์ โดยวิธี reverse transcription-PCR..... 74
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 77
4.1 การกลายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการทำลายยีน *NCE103* โดยแทนที่ด้วยยีน *URA3*..... 77
4.2 การกลายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการทำลายยีน *PDR*5 เพื่อเพิ่มความไวของสารยับยั้งต่อยีสต์..... 82
4.3 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *S. cerevisiae* (*NCE103*)..... 89
4.4 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* (*pfCA*)..... 98

หน้า

4.5 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมนุษย์ (*hCAII*)..... 102
4.6 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* โดยสังเคราะห์ยีนให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์ (*Opt pfCA*)..... 107
4.7 ศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์ Δ*nce103* และผลของการทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* โดยยีน *pfCA* และ *hCAII* ตามลำดับ..... 112
4.8 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Nce103, pfCA และ hCAII ในยีสต์สายพันธุ์กลาย โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต..... 119
4.9 ศึกษาการแสดงออกของยีน *NCE103*, *pfCA* และ *hCAII* ในยีสต์สายพันธุ์กลาย โดยวิธี reverse transcription-PCR..... 121
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 124
รายการอ้างอิง..... 129
ภาคผนวก..... 135
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 151

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์ยีสต์และมนุษย์ในการใช้เป็นระบบ high-throughput screens	11
3.1	สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้	23
3.2	พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้	24
3.3	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้	24
3.4	แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต	27
3.5	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	29
3.6	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับก่อนไลเกชัน	31
3.7	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันเข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์	31
3.8	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP*	34
3.9	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP เข้าที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*	42
3.10	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์	43
3.11	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag), pYES2 และ pENTR™3C	45
3.12	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เข้า pYES2 หรือ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์	46
3.13	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pYES2/NCE103 (C-Flag) และ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)	47
3.14	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชันของ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag) กับ pAG414GPD หรือ GAL-ccdB-HA	49
3.15	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag)	50
3.16	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pGEM T-Easy/pfCA.	51

ตารางที่		หน้า
3.17	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* ก่อนไลเกชัน	53
3.18	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์	53
3.19	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) หรือ pGEM T-Easy/pfCA235 (C-Flag) หรือ pYES2	54
3.20	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) หรือ *pfCA* (235) เข้า pYES2 เวคเตอร์	55
3.21	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pYES2/pfCA418 (C-Flag) หรือ pYES2/pfCA235 (C-Flag)	56
3.22	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับ *hCAII* ก่อนไลเกชัน	58
3.23	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์	58
3.24	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag)	59
3.25	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชัน *hCAII* เข้า pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์	60
3.26	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pENTR™3C/hCAII (C-Flag)	61
3.27	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชันของ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) กับ pAG414GPD หรือ GAL-ccdB-HA	62
3.28	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) หรือ pAG414GAL/hCAII (C-Flag)	63
3.29	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pUC57/Opt pfCA1 (C-Flag), pUC57/Opt pfCA2 (C-Flag), pYES2 และ pENTR™3C	64

ตารางที่		หน้า
3.30	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชัน *Opt pfCA1* หรือ *Opt pfCA2* เข้า pYES2 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์.....	65
3.31	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pYES2/ Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag) และ pENTR™3C/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag).....	66
3.32	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชันของ pENTR™3C/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag) กับ pAG414GPD, GAL-ccdB-HA.....	67
3.33	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag) และ pAG414GAL/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag).....	68
3.34	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR).....	76

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	วิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนของเชื้อพลาสโมเดียม โดยมีไบคาร์บอเนตที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส (CA) ของเชื้อมาลาเรียเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์	3
2.1	ปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับ bicarbonate-dependent carboxylation reaction	9
2.2	การคัดเลือกโปรตีนที่ทำหน้าที่ทดแทนหรือรบกวนการเจริญ	12
2.3	การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส	13
2.4	กลไกการยับยั้งของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส	14
3.1	แผนที่พลาสมิด pUG72 ซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Euroscarf, Germany)	28
3.2	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ pUG72 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (Δ*nce103*) ที่จำเพาะต่อบริเวณด้าน 5' และ 3' ของยีน *NCE103* ตามลำดับ	28
3.3	การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์สำหรับการทำลายยีน *NCE103*	28
3.4	แผนที่พลาสมิด pGEM T-Easy โคลนนิ่งเวคเตอร์ (Promega, USA)	31
3.5	ตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้สำหรับการยืนยันผลการทำลายยีน *NCE103* ที่จับบนโครโมโซมของยีสต์	35
3.6	แผนที่พลาสมิด pSH63 (Euroscarf, Germany)	37
3.7	ขั้นตอนการทำลายยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และการกำจัดยีนมาร์คเกอร์ *URA3* เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ในงานวิจัยขั้นต่อไป	38
3.8	ตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้สำหรับการยืนยันผลการทำลายยีน *PDR5* ที่จับบนโครโมโซมของยีสต์	40
3.9	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ดีเอ็นเอของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ W303-1B เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *NCE103*	41

ภาพที่		หน้า
3.10	แผนที่พลาสมิด pYES2 เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) (ที่มา: products.invitrogen.com/ivgn/product/V82520).....	44
3.11	แผนที่พลาสมิด pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) (ที่มา: products.invitrogen.com/ivgn/product/A10464?ICID==Search-Product).....	44
3.12	แผนที่พลาสมิด pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA (Addgene, USA) (ที่มา: www.addgene.org).....	48
3.13	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ pGEM T-Easy/pfCA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (pfCA_F (418) และ pfCA_F (235), pfCA_R (418) และ pfCA_R (235) ที่จำเพาะต่อยีน *pfCA*.....	52
3.14	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ cDNA ของมนุษย์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (hCAII_F, hCAII_R) ที่จำเพาะต่อยีน *hCAII*.....	57
3.15	ผลิตภัณฑ์จากการสังเคราะห์ยีน (GeneScript, USA) ที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมาลาเรียแบบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ.....	64
4.1	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *loxP-URA3-loxP*..	78
4.2	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ของ pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP*.....	79
4.3	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *NCE103*.....	81
4.4	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการกำจัดยีน *URA3* ออกจากยีสต์ BP-12.....	82
4.5	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *URA3*.....	83
4.6	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ของ pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP*.....	84
4.7	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *PDR5* ด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R1.....	86
4.8	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *PDR5* ด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F2 และ pdr5_R2.....	87

ภาพที่		หน้า
4.9	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *URA3*.....	88
4.10	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *NCE103*.....	90
4.11	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag)).....	91
4.12	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2 เวคเตอร์.....	93
4.13	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์.....	94
4.14	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2/NCE103 (C-Flag).....	95
4.15	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag).....	96
4.16	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag).....	97
4.17	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ของพลาสมิด pGEM T-Easy/pfCA.....	98
4.18	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *pfCA*.....	100
4.19	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) และ pGEM T-Easy/pfCA235 (C-Flag).....	101
4.20	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของพลาสมิด pYES2/pfCA418 (C-Flag) และพลาสมิด pYES2/pfCA235 (C-Flag).....	102
4.21	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *hCAII*.....	103
4.22	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของพลาสมิด pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag).....	104
4.23	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์.....	105
4.24	ผลิตภัณฑ์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pENTR™3C/hCAII.....	106

ภาพที่		หน้า
4.25	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของพลาสมิด pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และพลาสมิด pAG414GAL/hCAII (C-Flag).....	107
4.26	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของพลาสมิด pUC57/Opt pfCA1 (C-Flag) และพลาสมิด pUC57/Opt pfCA2 (C-Flag).....	108
4.27	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของพลาสมิด pYES2/Opt pfCA1 (C-Flag) และพลาสมิด pYES2/Opt pfCA2 (C-Flag).....	109
4.28	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของพลาสมิด pENTR™3C/Opt pfCA1 (C-Flag) และพลาสมิด pENTR™3C/Opt pfCA2 (C-Flag).....	110
4.29	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของพลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA1 พลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA2 (C-Flag) พลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA1 และพลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA2 (C-Flag).....	111
4.30	ลักษณะฟีโนไทป์ของ BP-9 และ BP-15 ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ synthetic dextrose (SD) ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์...	113
4.31	การทดแทนการทำหน้าที่ของยีน *NCE103* ของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 (Δ*nce103*) โดยพลาสมิดที่มียีน *NCE103* ซึ่งมีการติดและไม่ติด Flag tag ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *GAL1*.....	116
4.32	การทดแทนการทำหน้าที่ของยีน *NCE103* ของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 (Δ*nce103*) โดยพลาสมิดที่มียีน *pfCA* ซึ่งมีการติด Flag tag ที่ปลายด้าน 3' ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *GAL1*.....	117
4.33	การทดแทนการทำหน้าที่ของยีน *NCE103* ของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 (Δ*nce103*) โดยพลาสมิดที่มียีน *NCE103*, *hCAII* หรือ *Opt pfCA* ซึ่งมีการติด Flag tag ที่ปลายด้าน 3' ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *GAL1* หรือ *GPD*.....	118
4.34	การตรวจหาโปรตีน Nce103, pfCA และ hCAII ในยีสต์สายพันธุ์กลายที่มียีน CA ชนิดต่างๆ ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *GAL1* โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต.....	120
4.35	การตรวจหาโปรตีน Nce103, pfCA และ hCAII ในยีสต์สายพันธุ์กลายที่มียีน CA ชนิดต่างๆ ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *GPD* โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต.....	121

ภาพที่		หน้า
4.36	การแสดงออกของยีน *NCE103* หรือ *pfCA* หรือ *hCAII* ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *GAL1* ในยีสต์สายพันธุ์กลาย (Δ*nce103*) โดยวิธี reverse transcription-PCR	123
ค1	Codon adaptation index ของยีน *Opt_pfCA1*	149
ค2	Frequency of optimal codons ของยีน *Opt_pfCA1*	149
ค3	GC content adjustment ของยีน *Opt_pfCA1*	149
ค4	Codon quality plot ของยีน *Opt_pfCA2*	150
ค5	Codon quality distribution ของยีน *Opt_pfCA2*	150
ค6	GC content ของยีน *Opt_pfCA2*	150

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัวชนิด *Plasmodium* โดยอาศัยยุงในสกุล *Anopheles* เพศเมียเป็นพาหะในการแพร่เชื้อ (Na-Bangchang และคณะ, 2007) ในแต่ละปีจากจำนวนผู้ติดเชื้อ 515 ล้านคนเสียชีวิตด้วยโรคนี้ถึง 1.5 – 2.7 ล้านคน (Snow และคณะ, 2005) และส่วนใหญ่ก็ยังพบว่าการเสียชีวิตของผู้ป่วยมาลาเรียเป็นผลจากการดื้อยารักษาโรคมาลาเรียที่ใช้กันในปัจจุบัน ดังนั้นยาใหม่ๆที่ใช้รักษาโรคมาลาเรียยังคงเป็นที่ต้องการสูง

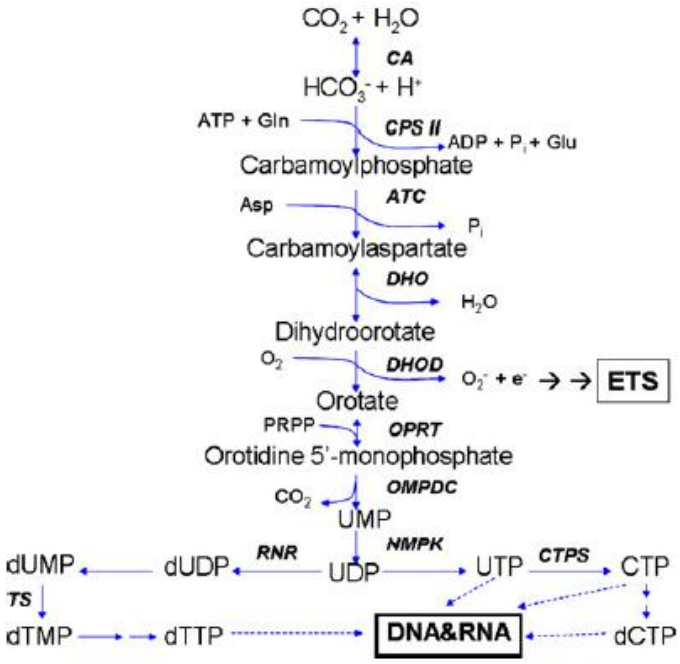
วิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทั่วไปใช้หลักการที่สารออกฤทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์บ่งชี้ (indicator cells) เนื่องจากวิธีการนี้เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไป ทำให้มีความเป็นไปได้สูงที่จะพบสารออกฤทธิ์ชนิดเดิมที่ได้มีการค้นพบก่อนหน้านี้แล้ว ดังนั้นการพัฒนาวิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ด้วยหลักการใหม่ๆจะช่วยเพิ่มโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยถูกค้นพบโดยวิธีการคัดกรองที่มีอยู่เดิมซึ่งจะทำให้ได้สารออกฤทธิ์ที่มีกลไกแตกต่างไปจากเดิม

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่เป็นกลุ่ม eukaryote ขั้นพื้นฐาน ซึ่งถูกใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism) ในการศึกษากระบวนการทางชีวภาพ (biological processes) เนื่องจาก เลี้ยงง่าย เพิ่มจำนวนเร็ว และสามารถถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมได้ง่ายและรวดเร็ว ข้อมูลลำดับเบสของทั้งจีโนมได้ถูกรายงานอย่างสมบูรณ์แล้ว (complete genome sequences) และที่สำคัญกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในยีสต์เช่น การสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งตัว การสังเคราะห์และซ่อมแซมดีเอ็นเอ เป็นต้น นั้นคล้ายกับในเซลล์สิ่งมีชีวิตชั้นสูง (higher eukaryotes) (Mager และ Winderickx 2005) อีกทั้งในปัจจุบันยังมีแนวโน้มในการใช้ยีสต์ที่ได้ถูกทำการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ในการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ (yeast based assay) เนื่องจากว่ามีข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น ไม่จำเป็นต้องทำให้โปรตีนเป้าหมายผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำมาทดสอบ สารที่นำมาทดสอบจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อโปรตีนเป้าหมายที่ก่อให้เกิดโรคได้ดี เพราะมีสภาวะแวดล้อมใกล้เคียงกับในธรรมชาติมากกว่าการใช้การทดสอบทางชีวเคมี และใช้ค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงเซลล์ถูกกว่าการใช้เซลล์จากมนุษย์ (Barberis และคณะ, 2005; Tucker 2002) แต่การใช้

ยีสต์ก็มีข้อเสียด้วยเช่นกันกล่าวคือสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่ใช้เป็นสารทดสอบนั้นสามารถถูกขับออกไปนอกเซลล์มากกว่าเข้ามาในเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของสารประกอบในเซลล์มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงมีการพัฒนายีสต์สายพันธุ์ใหม่ซึ่งถูกทำลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการขับสารโมเลกุลขนาดเล็กออกไปนอกเซลล์ เช่น ยีน *PDR5* เป็นผลให้ให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กคงอยู่ในเซลล์ได้มากขึ้น (Mager และ Winderickx 2005) วิธีการนี้จะช่วยให้สามารถใช้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีความไวสูงต่อสารทดสอบมากขึ้น

จากการศึกษาของ Krungkrai และคณะ (2008) พบว่าเชื้อมาลาเรียสามารถสังเคราะห์เบสไพริมิดีน (De novo pathway) ได้ (ดังภาพที่ 1.1) โดยมีคาร์บอนิคแอนไฮเดรส (CA) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ของ CO_2 กับ HCO_3^- ซึ่งเกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในขั้นตอนแรกๆ และเอนไซม์ชนิดนี้ยังแตกต่างจากในมนุษย์ด้วย เมื่อเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งผู้ป่วยก็ยังสามารถสังเคราะห์ไพริมิดีนได้จากวิถีการสังเคราะห์แบบกู้คืน (Salvage pathway) ซึ่งความแตกต่างนี้ทำให้เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสน่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญสำหรับการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาโรคมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ต่อไป

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสถูกแบ่งออกได้ 5 แฟมิลี่ คือ $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ และ ξ โดยเอนไซม์เหล่านี้มียีนประมวลรหัสที่มีลำดับเบสต่างกันแต่พบว่าเอนไซม์เหล่านี้ทำหน้าที่คล้ายกัน (Krungkrai และคณะ, 2008) ในยีสต์มียีนที่ทำหน้าที่ประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสคือ ยีน *NCE103* ซึ่งเมื่อยีนนี้ถูกทำลายจะส่งผลให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย (Δ*nce103*) นี้ไม่สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจน แต่สามารถเจริญได้ในที่ๆขาดออกซิเจน (Clark และคณะ, 2004) และยังได้ศึกษาถึงการทดแทนหน้าที่ของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสโดยใช้เอนไซม์นี้จากสิ่งมีชีวิตอื่นซึ่งได้แก่ CA ของต้นยาสูบซึ่งเป็นชนิด β และ CA จากมนุษย์ (hCAII) ซึ่งเป็นชนิด α พบว่า CA จากสิ่งมีชีวิตทั้งจากต้นยาสูบและจากมนุษย์สามารถทดแทนการทำหน้าที่ของ CA ในยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ซึ่งเป็นชนิด β (Clark และคณะ, 2004) ในงานวิจัยนี้จึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า CA จากเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นชนิด α ก็น่าจะสามารถทดแทนการทำหน้าที่ CA ในยีสต์ได้เช่นกัน



ที่มา: Krungkrai และคณะ (2008)

ภาพที่ 1.1 วิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนของเชื้อพลาสโมเดียม โดยมีไบคาร์บอเนตที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส (CA) ของเชื้อมาลาเรียเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายที่จะทำการทำลายยีน *NCE103* ของยีสต์ *S. cerevisiae* ก่อน จากนั้นศึกษาการทำหน้าที่ทดแทนของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์โดยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจาก *P. falciparum* (pfCA) และมนุษย์ (hCAII) ผลจากงานวิจัยนี้อาจนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งต่างๆได้ อีกทั้งอาจจะพัฒนาให้เป็นการคัดกรองที่ให้ผลสัมฤทธิ์ (high throughput screen) เพื่อสามารถทดสอบสารต่างๆ ได้ครั้งละจำนวนมากต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่ยีน *NCE103* ถูกทำลาย (Δ*nce103*)

2) ศึกษาการแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* แบบต่างๆ ในยีสต์สายพันธุ์กลาย (Δ*nce103*)

1.3 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส การทดแทนหน้าที่ของยีน (functional complementation) ระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงการแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* และความสามารถในการทดแทนหน้าที่ของยีนดังกล่าว ผลจากงานวิจัยนี้อาจนำไปสู่การศึกษาต่อเพื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์นี้เป็นระบบคัดกรองหายารักษาโรคมาลาเรียต่อไป

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

1) การกลายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการทำลายยีน *NCE103* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำสารออกนอกเซลล์

2) ศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์จากข้อ 1. เมื่อยีน *NCE103* ถูกทำลาย เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มี 0.035% CO_2 และ 20% CO_2

3) สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัส CA ของ *S. cerevisiae* (*NCE103*), *P. falciparum* (*pfCA*) และ CA ของมนุษย์ (*hCAII*) ตามลำดับ

4) นำพลาสมิดจากข้อ 3 เข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์กลายในข้อ 1 เพื่อศึกษาผลของการทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* โดยยีน *pfCA* และ *hCAII* ตามลำดับ

5) ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายในยีสต์ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

6) ศึกษาการแสดงออกของยีนประมวลรหัสโปรตีนเป้าหมายดังกล่าว ด้วยวิธี reverse transcription-PCR

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีผู้ติดเชื้อมาลาเรียจำนวนมากมายซึ่งชนิดของมาลาเรียที่ก่อโรคที่สำคัญคือ *P. falciparum* การเสียชีวิตส่วนใหญ่นั้นเป็นผลมาจากการดื้อยารักษาโรคของมาลาเรียและยาที่ใช้ในปัจจุบันก็มีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหายารักษาชนิดใหม่ๆมาทดแทน แต่ทว่าการใช้วิธีเดิมๆในการคัดสรรยาใหม่ๆกลไกที่ยับยั้งเชื้อมาลาเรียก็มีโอกาสสูงที่จะได้กลไกเดิมๆ ดังนั้นการใช้ยีสต์เป็นระบบคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรียจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะได้กลไกใหม่ๆในการยับยั้งเชื้อโดยใช้วิธีการค้นหาโปรตีนเป้าหมายของเชื้อมาใช้คัดกรองหาสารยับยั้ง

วิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทั่วไป ใช้หลักการที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์บ่งชี้ (indicator cell) ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นเซลล์บ่งชี้ เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism) ในการศึกษากระบวนการทางชีวภาพต่างๆ (biological processes) เลี้ยงง่าย เพิ่มจำนวนเร็ว และยังสามารถถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมได้ง่ายและรวดเร็ว ข้อมูลลำดับเบสของทั้งจีโนมได้ถูกรายงานอย่างสมบูรณ์แล้ว (complete genome sequences) และที่สำคัญกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในยีสต์ดังกล่าวเช่น การสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งตัว การสังเคราะห์และซ่อมแซมดีเอ็นเอ เป็นต้นนั้นคล้ายกับในเซลล์สิ่งมีชีวิตชั้นสูง (higher eukaryotes) (Mager และ Winderickx 2005) ในปัจจุบันยังมีแนวโน้มในการใช้ยีสต์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ในการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ (yeast based assay) เนื่องจากว่ามีข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น ไม่จำเป็นต้องทำให้โปรตีนเป้าหมายผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะมาทดสอบ สารที่นำมาทดสอบจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อโปรตีนเป้าหมายที่ก่อให้เกิดโรคได้ดี เพราะมีสภาวะแวดล้อมใกล้เคียงกับในธรรมชาติมากกว่าการใช้การทดสอบทางชีวเคมี และใช้ค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงเซลล์ถูกกว่าการใช้เซลล์จากมนุษย์ (Barberis และคณะ, 2005; Tucker และคณะ, 2002)

งานวิจัยนี้มุ่งหมายที่จะทำการดัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อศึกษาการทำหน้าที่ทดแทนของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์โดยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจาก *P. falciparum* (pfCA) และมนุษย์ (hCAII) โดยการแสดงออกของยีนดังกล่าวโดยใช้ยีสต์เป็นเซลล์บ่งชี้ เพื่อที่จะนำไปศึกษาผลของสารยับยั้งต่อเอนไซม์ดังกล่าวที่มีต่อการเจริญของยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบระหว่างผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลายที่สังเคราะห์เอนไซม์ pfCA และ hCAII ตามลำดับได้ต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยีสต์ (*S. cerevisiae*)

S. cerevisiae เป็นยีสต์ที่จัดอยู่ในแฟมิลี่ Saccharomycetaceae จีนัส *Saccharomyces* สปีชีส์ *S. cereviseae* สามารถเลี้ยงได้ง่าย มีวัฏจักรการแบ่งเซลล์ (cell cycle) สั้นประมาณ 90 นาที เพิ่มจำนวนเร็ว เสียค่าใช้จ่ายน้อยเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์ ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีความปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) และสามารถถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมได้ง่ายและรวดเร็วกว่า เช่น การทำลายยีน (gene disruption) การติดตามยีน (gene marking) การกลายพันธุ์ (mutation) และการศึกษาผลของจำนวนชุดของยีน (gene-dosage effect) เหตุผลหนึ่งเนื่องมาจากเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆในกลุ่มยูแคริโอตแล้ว ยีสต์มีอัตราการเกิดรีคอมบิเนชันสูง ทำให้การแทรกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าในส่วนโครโมโซมสามารถทำได้โดยง่ายโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Wach และคณะ, 1994) อีกทั้งข้อมูลลำดับเบสของทั้งจีโนม (Goffeau และคณะ, 1996) รวมทั้งลำดับเบสที่คาดว่าจะเป็น open reading frame (ORF) จำนวน 6,466 ORF (Kumar และคณะ, 2002) ได้ถูกรายงานอย่างสมบูรณ์

2.2 เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ (*S. cereviseae*)

Cleves และคณะ (1996) ได้จำแนกโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารผ่านทางกอลจิบอดี้และเอนโดพลาสมิคเรติคิวลัมซึ่งยังไม่มีการจัดชนิดในยีสต์ *S. cereviseae* โดยให้ชื่อว่า Nce103p หลังจากนั้นได้มีการนำกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดนี้มาเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอตแล้วจึงจัดให้อยู่ในชนิด (family) β ของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส (Götz และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ที่ถูกทำลายยีน *nce103* จะไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มี CO_2 ต่ำ แต่สามารถกลับมาเจริญได้อีกครั้งเมื่อใช้เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสจากต้นยาสูบ (*Medicago sativa*) หรือเลี้ยงในสภาวะที่มี CO_2 สูง

Clark และคณะ (2004) ได้ศึกษาการทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* โดยเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสจากสิ่งมีชีวิตอื่นซึ่งก็คือ เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสที่อยู่ในคลอโรพลาสท์จากต้นยาสูบซึ่งเป็นชนิด β และเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสจากมนุษย์ (hCAII) ซึ่งเป็นชนิด α พบว่าเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสทั้งสองชนิดสามารถทดแทนหน้าที่ในยีสต์ได้เมื่อเลี้ยงใน

สภาวะที่มี CO_2 ต่ำ และยังพบว่าผลของความไวต่อออกซิแดนท์ (H_2O_2 และ โซเดียมไนโตรปรัสไซด์) ระหว่างยีสต์กลายพันธุ์ Δ*nce103* และยีสต์สายพันธุ์ปกติที่ไม่ขาดยีน *NCE103* มีความไวไม่ต่างกัน นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Cryptococcus neoformans* ซึ่งก็สามารถทดแทนหน้าที่ได้เช่นเดียวกัน (Cronk และคณะ, 2001; Bahn และคณะ, 2005)

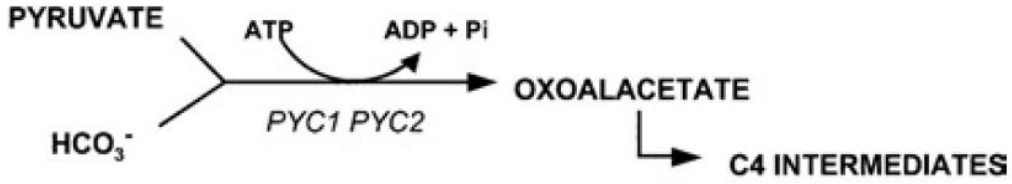
Amoroso และคณะ (2005) พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ในสภาวะที่มี CO_2 ต่ำ (0.035% CO_2) จะมีแอคทิวิตีสูงกว่า 10-20 เท่า เมื่อเทียบกับในสภาวะที่มี CO_2 สูง (5% CO_2) และยังพบว่าในสภาวะที่มี CO_2 ต่ำ จะมีการสะสมของ mRNA ของ *NCE103* มากกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มี CO_2 สูง ดังนั้นจึงได้ข้อสรุปว่า ปริมาณ CO_2 ในอากาศเป็นตัวควบคุมการทรานสคริปชันของยีน *NCE103* เพื่ออาจนำเอนไซม์ไปใช้ในการสร้างไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) หรือใช้ในการควบคุมพีเอชภายในเซลล์ของยีสต์ นอกจากนี้ผลดังกล่าวยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Nishida และคณะ (2009) ซึ่งพบว่า *Symbiobacterium thermophilum* ที่เจริญได้ดีเมื่อได้รับ CO_2 จากแบคทีเรียข้างเคียงจะมีการสูญเสียยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของตัวมันเอง

เพื่อทดสอบความต้องการสารอาหารของยีสต์กลายพันธุ์ Δ*nce103* Aguilera และคณะ (2005) ได้ทำการทดสอบโดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมกรดอะมิโนและกรดไขมันชนิดต่างๆ ลงไป เพื่อดูการเจริญเติบโตบนอาหารภายใต้สภาวะที่มี CO_2 ต่ำ พบว่าเมื่อมีการเติมกรดอะมิโน L-แอสพาเตท ยูราซิล L-อาร์จินีน และกรดไขมัน (กรดไมริสติค สเตียริค และ ปาล์มมิติค) ยีสต์ Δ*nce103* สามารถที่จะเจริญได้อีกครั้ง เนื่องจากเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ (Nce103p) มีหน้าที่หลักในการสร้างไบคาร์บอเนตซึ่งจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการ bicarbonate-dependent carboxylation reaction เช่น pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase และ carbamoyl-phosphate synthetase ดังภาพที่ 2.1

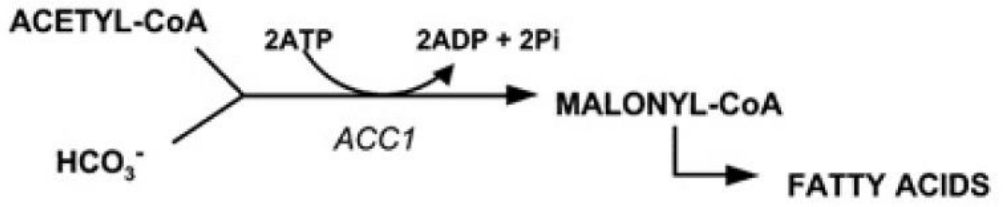
Isik และคณะ (2009) ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับตัวกระตุ้นเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ (scCA) พบว่าสารจำพวกเอมีน เช่น ฮิสตามีน โดปามีน เซโรโทนิน ไพริดิลอัลคิลเอมีน และมอร์โฟลีน กระตุ้นได้ดี (K_As = 10.2-21.3 ไมโครโมลาร์) และอะดรีนาลีนสามารถกระตุ้นได้ดีสุดที่ K_As = 0.95 ไมโครโมลาร์ ส่วนสารยับยั้งการทำงานของ scCA จะเป็นจำพวกแอนไอออน ซัลโฟนาไมด์ และเบนซีนซัลโฟนาไมด์ สารที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ 4-(2-amino-pyrimidin-4-yl)-benzenesulfonamide (KI = 15.1 นาโนโมลาร์) (Isik และคณะ, 2010)

การหาสารกระตุ้นและยับยั้ง scCA จะนำไปสู่ความเข้าใจเอนไซม์ตัวนี้ได้ดีขึ้น อันนำไปสู่การหาตัวควบคุมเอนไซม์ (modulators) เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของราที่ก่อโรค เช่น *Candida albicans* และ *C. neoformans*

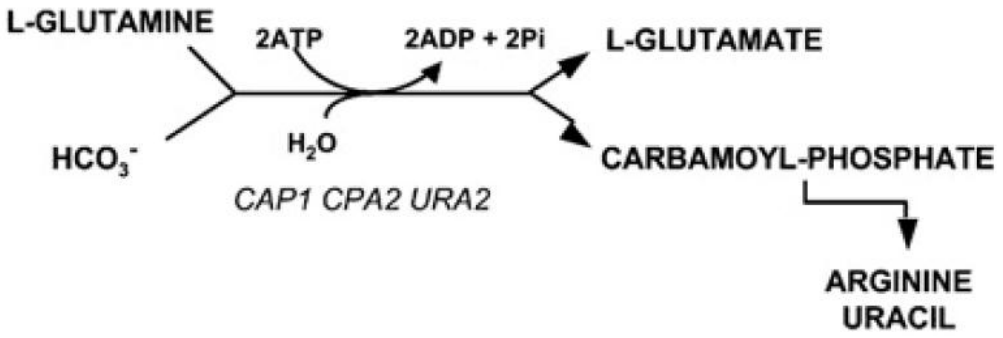
ก.



ข.



ค.



ที่มา: Aguilera และคณะ (2005)

ภาพที่ 2.1 ปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับ bicarbonate-dependent carboxylation reaction

ก.) ปฏิกิริยา pyruvate carboxylase

ข.) ปฏิกิริยา acetyl-CoA carboxylase

ค.) ปฏิกิริยา carbamoyl-phosphate synthetase

จากการศึกษาโครงสร้างคริสตัลของ scCA พบว่าเอนไซม์จะประกอบไปด้วย 2 โมโนเมอร์ และมีกรดอะมิโน 3 ตัวที่ใช้ในการเข้าคู่กับไอออนเหล็ก คือ Cys57, His112 และ Cys115 ซึ่งส่วนที่ทำหน้าที่แอคทิวิตีของเอนไซม์อยู่ที่ด้านปลาย *N* (Teng และคณะ, 2009) ความรู้ใหม่จากโครงสร้างของเอนไซม์จะนำไปสู่การออกแบบสารยับยั้งเพื่อที่จะนำไปใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดจากราก่อโรคต่อไป

2.3 การใช้ยีสต์เป็นเครื่องมือในการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวและเป็นยูคาริโอตที่ถูกนำมาใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์ เนื่องจากเลี้ยงง่ายและใช้อาหารราคาถูกกว่าการเลี้ยงเซลล์ไลน์หรือปริสิตที่เป็นยูคาริโอตซึ่งมีการเลี้ยงที่ยุ่งยาก สามารถแบ่งตัวได้เร็ว (90 นาทีต่อหนึ่งรุ่น) สามารถเลี้ยงได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง และสามารถนำยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นมาแสดงออกในยีสต์ได้ (Simon และ Bedalov 2004) *S. cerevisiae* เป็นยูคาริโอตชนิดแรกที่ทราบจีโนมทั้งหมดแล้ว ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพในการนำมาจัดการดัดแปลงพันธุกรรมได้ง่าย อีกทั้งลำดับยีนโปรตีน และวิถีการสังเคราะห์ต่างๆมีระดับการอนุรักษ์กับมนุษย์สูง จึงได้มีการนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการหายารักษาโรค (Barberis และคณะ, 2005) แต่ทว่ายีสต์มีข้อเสียในการทดสอบสารต่างๆโดยสารที่มีขนาดเล็กจะถูกขับออกจากเซลล์ได้ง่าย ดังนั้นจึงได้มีการทำให้ยีสต์มีความไวต่อสารต่างๆมากขึ้นโดยทำลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ergosterol (ยีน *ERG6*) ทำลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการปั๊มสารออกนอกเซลล์ *PDR1* *PDR3* *PDR5* และ *SNQ2* (Simon และ Bedalov 2004; Mager และ Winderickx 2005)

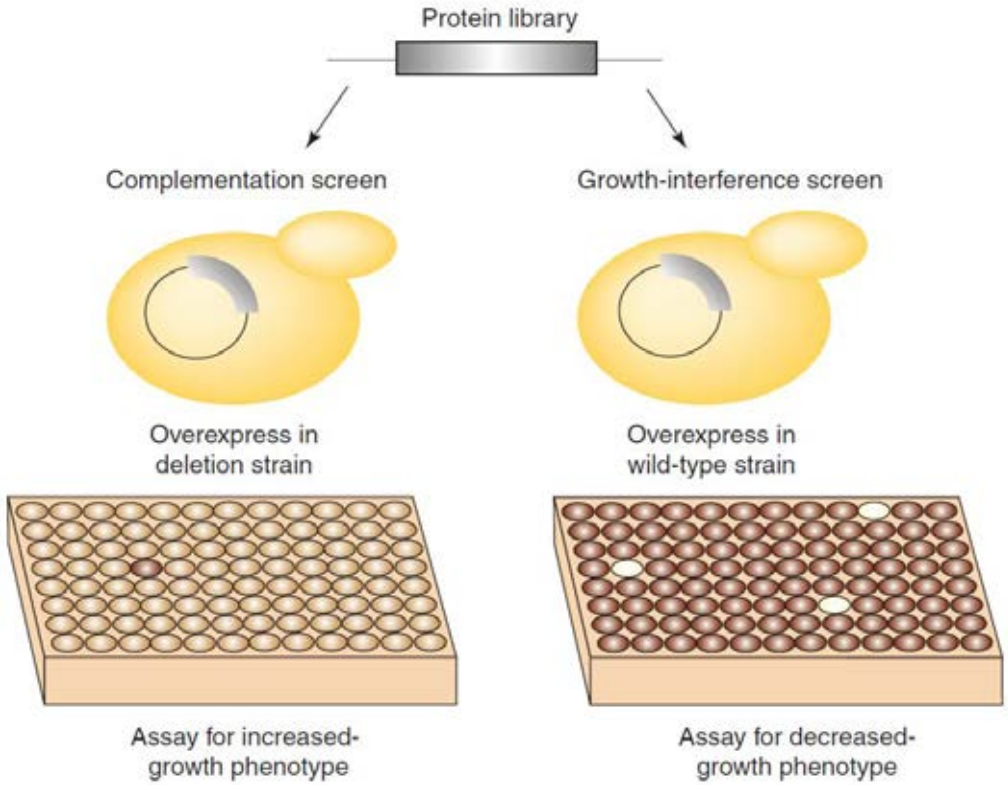
ยีสต์ยังถูกนำมาใช้เป็น cell-based assay สำหรับการคัดเลือกหาสารยับยั้งหรือสารกระตุ้นของเป้าหมายที่เป็นมนุษย์ซึ่งมีกระบวนการเกี่ยวกับเซลล์มากเกินไปและรบกวนการอ่านผลที่ได้ (Barberis และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยีสต์ยังมีข้อได้เปรียบในการนำมาใช้เป็น high-throughput cell-based assay เพื่อใช้ในการหาสารออกฤทธิ์คราวละมากๆได้ ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เซลล์มนุษย์ดังตารางที่ 2.1 โดยเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกหรือเลี้ยงในอาหารเหลว 96 หลุม และมีการนำยีสต์ไปประยุกต์ใช้ในการหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาต่อโปรตีนด้วยกัน เช่น two-hybrid system, one-hybrid system, RNA-based three-hybrid system และ reverse two-hybrid system (Tucker 2002) การนำยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นมาแสดงออกในยีสต์ก็มีการศึกษากัน

หลากหลาย เพื่อศึกษาการเจริญหรือผลของฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนไปดังภาพที่ 2.2 การทดแทนหน้าที่ของยีนอื่นในยีสต์กลายพันธุ์ซึ่งถูกทำลายยีนที่ทำหน้าที่เดียวกันเพื่อศึกษาการทำหน้าที่ทดแทน เช่น การนำยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดัคเตสของ *P. falciparum* มาแสดงออกในยีสต์กลายพันธุ์ที่ขาดยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดัคเตสของตัวมันเอง เพื่อใช้ในการหาสารยับยั้งโดยดูผลของการเจริญ (Tucker 2002)

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์ยีสต์และมนุษย์ในการใช้เป็นระบบ high-throughput screens

	Yeast cellular HTS	Mammalian cellular HTS
ข้อดี	สามารถจัดการพันธุกรรมได้ง่าย	สภาวะแวดล้อมเป็นยูคาริโอตที่ซับซ้อน
	โปรตีนเป้าหมายอยู่ในรูปแบบตามธรรมชาติ	โปรตีนเป้าหมายอยู่ในรูปแบบตามธรรมชาติ
	สามารถคัดเลือกสารที่จะนำเข้าเซลล์เพื่อปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษ	สามารถคัดเลือกสารที่จะนำเข้าเซลล์เพื่อปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษ
	อ่านผลง่ายเพราะมีตัวรบกวนน้อยกว่า	
ข้อเสีย	ความไวต่อสารอาจลดลงจากการปั๊มสารออกจากเซลล์ยีสต์	ยากต่อการแยกผลจริงและผลจริงหลอก
	ความรู้ยังมีจำกัดในบางเรื่อง	เสียเวลามากในการดัดแปลงพันธุกรรม
ราคา	อาหารเลี้ยงราคาถูก	อาหารเลี้ยงราคาแพง

ที่มา: Barberis และคณะ (2005)



ที่มา: Tucker (2002)

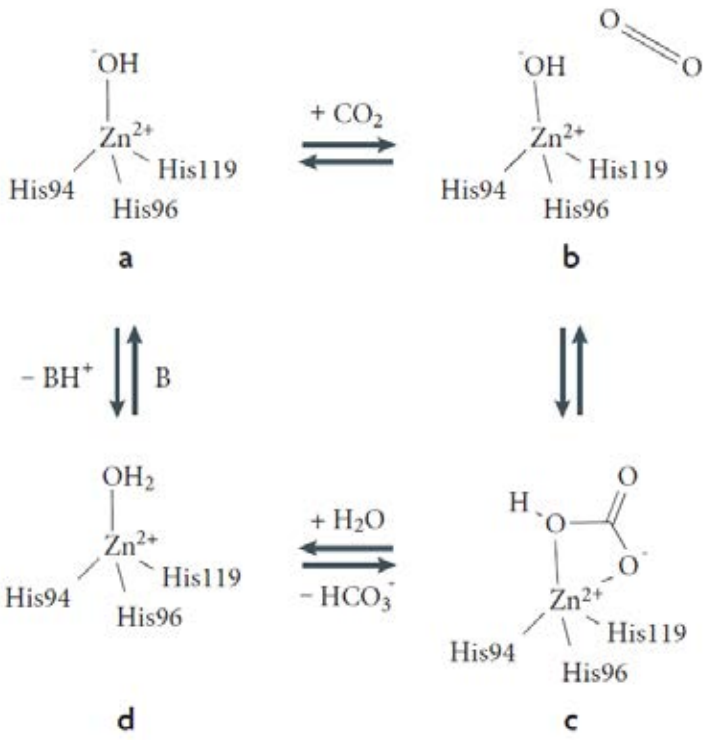
ภาพที่ 2.2 การคัดเลือกโปรตีนที่ทำหน้าที่ทดแทนหรือรบกวนการเจริญ

โปรตีนแปลกปลอมที่ส่งผลให้เกิดการทดแทนหน้าที่ในยีสต์กลายพันธุ์ซึ่งส่งผลให้มีการเจริญ (ซ้าย) และการคัดเลือกโปรตีนแปลกปลอมที่รบกวนการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ปกติ (ขวา)

2.4 เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสเป็นเป้าหมายใหม่ในการรักษาโรค

เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส (CA) หรือคาร์บอเนตดีไฮดราเตส (EC 4.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในโพรคาริโอตและยูคาริโอต ปัจจุบันแบ่งออกได้ 5 ชนิด (family) ได้แก่ α, β, γ, δ และ ζ ชนิด α จะพบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง แบคทีเรีย สาหร่าย และในไซโตพลาสซึมของพืชสีเขียว ชนิด β พบในแบคทีเรีย สาหร่าย และในคลอโรพลาสของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ ชนิด γ พบได้ในอาเคีย และแบคทีเรียบางชนิด และชนิด δ พบในไดอะตอมทะเลบางชนิด (Supuran 2008)

CA ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ของ CO_2 กับ H_2O เปลี่ยนเป็น HCO_3^- กับ H^+ ซึ่งบริเวณที่เร่งปฏิกิริยาของ CA ส่วนใหญ่จะพบว่ามีแร่สังกะสี (Zn^{2+}) ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา ดังภาพที่ 2.3 บริเวณที่เร่งปฏิกิริยาจะมีการเข้าคู่กันของกรดอะมิโนฮิสทิดีน 3 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 94, 96 และ 119 ซึ่งจะเกาะเหล็กที่เชื่อมต่อกับน้ำ จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำที่เกาะกับเหล็ก กับ Thr199 และGlu106 ซึ่งจะไปเพิ่มความเป็นนิวคลีโอไฟล์ของน้ำที่เกาะกับเหล็ก เปลี่ยนเป็นไฮดรอกซิลที่เกาะกับเหล็กซึ่งเป็นรูปแบบที่แอคทีฟของเอนไซม์ (a) จากนั้นนิวคลีโอไฟล์จะเข้าเกาะที่โมเลกุลของ CO_2 ที่อยู่ในโพรงที่ไม่ชอบน้ำ (ไฮโดรโฟบิค) (b) ทำให้เกิดไบคาร์บอเนตประสานกับแร่สังกะสี (c) สุดท้ายไบคาร์บอเนตจะหลุดออกและถูกแทนที่ด้วยโมเลกุลน้ำซึ่งส่งผลให้เอนไซม์อยู่ในรูปไม่ทำงานอีกครั้ง (d) ปฏิกิริยาของ CA เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆที่หลากหลายทั้งภายในและนอกเซลล์ เช่น กระบวนการหายใจ การขนส่ง CO_2 และ HCO_3^- ระหว่างเนื้อเยื่อและปอด การควบคุมความสมดุลของความเป็นกรดด่างและ CO_2 การขับสารอิเล็คโทรไลต์ออกนอกเซลล์ กระบวนการสังเคราะห์ต่างๆ การดูดซึมแคลเซียมกลับสู่กระดูก และการเกิดเนื้องอก (Supuran 2008)

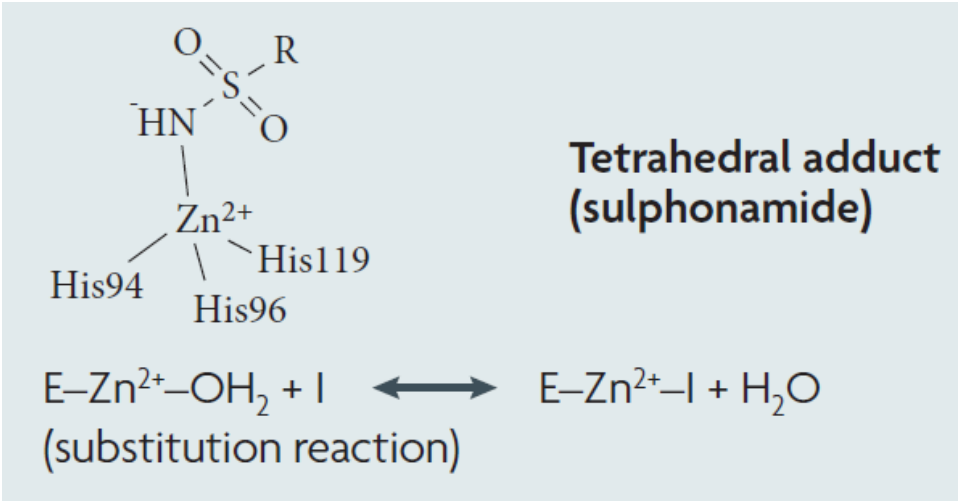


ที่มา: Supuran (2008)

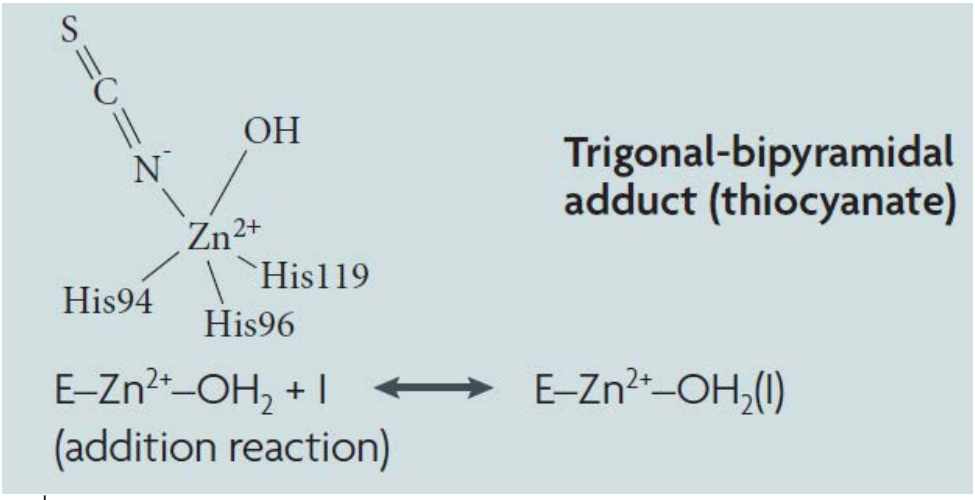
ภาพที่ 2.3 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส

สารยับยั้ง CA มี 2 ประเภท คือ ประจุลบที่จับกับโลหะ และสารประกอบซัลโฟนาไมด์ สารยับยั้งจะจับกับไอออนสังกะสีของเอนไซม์เกิดเป็นรูปแบบ tetrahedral adduct หรือ trigonal-bipyramidal adduct ดังภาพที่ 2.4

ก.



ข.



ที่มา: Supuran (2008)

ภาพที่ 2.4 กลไกการยับยั้งของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส

ก.) ปฏิกิริยาการแทนที่ของสารประกอบซัลโฟนาไมด์ทำให้เกิดรูปแบบ tetrahedral adduct

ข.) ปฏิกิริยาการเติมของสารประจุลบทำให้เกิดรูปแบบ trigonal-bipyramidal adduct

ปัญหาของการออกแบบสารยับยั้งคือ ทำอย่างไรให้สารยับยั้งมีความจำเพาะต่อ CA ชนิดต่างๆแตกต่างกัน เพื่อทำให้สามารถยับยั้ง CA ได้ถูกเป้าหมายตามที่ต้องการ ยกตัวอย่าง ไพริดิ-เนียมซึ่งเป็นสารประกอบซัลโฟนาไมด์ที่เป็นประจุบวกสามารถที่จะยับยั้ง CA ชนิดที่เกาะอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ แต่ไม่ยับยั้ง CA ที่อยู่ภายในเซลล์ เนื่องจากไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ได้ ทำให้เกิดการยับยั้ง CA อย่างจำเพาะ (Supuran 2008)

CA มีศักยภาพที่จะเป็นโปรตีนเป้าหมายชนิดใหม่ เพื่อใช้ค้นหาสารยับยั้ง CA และนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่างๆ เช่น ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ เนื่องจาก CA ในเซลล์ของไตมีบทบาทในการควบคุมสมดุลของกรดด่าง เมื่อใช้ยาอะเซตาโซลเอไมด์ (Acetazolamide, AZA) ปริมาณปัสสาวะเพิ่มมากขึ้นและกลายเป็นด่าง เนื่องจากต้องขับไบคาร์บอเนตออกผ่านทางปัสสาวะ ชนิดของ CA ของมนุษย์ที่เกี่ยวข้องคือ CA II, IV, XII และ XIV ใช้เป็นยารักษาความผิดปกติทางสายตาที่เกิดจากความดันภายในลูกตาสูง สารยับยั้งจะทำให้อัตราการขับไบคาร์บอเนตและของเหลวภายในตาลดลงซึ่งจะทำให้ความดันลดลง ชนิดของ CA ของมนุษย์ที่เกี่ยวข้องคือ CA II ใช้เป็นยารักษาโรคอ้วน เพราะ CA เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันโดยตรง เมื่อใช้สารยับยั้ง เช่น โซนิซาไมด์ จะไปลดการสร้างกรดไขมันทำให้น้ำหนักลดลง ชนิดของ CA ของมนุษย์ที่เกี่ยวข้องคือ CA II, VA และ VB ใช้เป็นยาต้านมะเร็ง ในภาวะพร่องออกซิเจนการแสดงออกของ CA IX จะสูงขึ้นมากส่งผลให้เนื้องอกมีค่าความเป็นกรดด่างเป็นไปทางกรดมากขึ้น และส่งผลให้มีการสร้างไบคาร์บอเนตจำนวนมาก เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์เบสไพริมิดีน นอกจากนี้ยังพบว่าสารอนุพันธ์ของซัลโฟนาไมด์สามารถยับยั้ง CA IX ในภาวะพร่องออกซิเจนเท่านั้นอีกด้วย ใช้เป็นยารักษาโรคกระดูกพรุน เนื่องจาก CA II ในกระดูกมีอยู่จำนวนมากและทำหน้าที่สร้างโปรตอนส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากกระดูก ใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดจากปรสิต เช่น มาลาเรีย โรคที่เกิดจากการติดเชื้อรา เช่น *Candida albicans* และ *C. Neoformans* ซึ่ง CA เป็นเอนไซม์สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ นอกจากการใช้สารยับยั้งต่อ CA แล้วยังสามารถใช้สารกระตุ้นต่อ CA เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์โดยจะไปเพิ่มประสิทธิภาพของสัญญาณประสาท โดยมีเป้าหมายที่ CA I และ II ของมนุษย์ (Supuran 2008)

2.5 บทบาทของ CA ใน *P. falciparum*

มาลาเรียที่เจริญอยู่ภายในเม็ดเลือดแดงสามารถตรึง CO_2 ได้โดยใช้เอนไซม์ CA เพื่อสร้างไบคาร์บอเนตสำหรับเป็นสารตั้งต้นของ carbamoyl-phosphate synthetase II ในการสร้างเบสไพริมิดีนและการควบคุมความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ การใช้สารกำจัดโลหะบางชนิด เช่น desferrioxamine, tetraethylthiuram disulfide, daphnetin และ 8-hydroxyquinoline สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. falciparum* ได้ เนื่องจากทำให้เอนไซม์ไม่พร้อมทำงานเพราะขาดโคแฟคเตอร์ที่เป็นโลหะ (Sein และ Aikawa 1998)

Sein และ Aikawa (1998) ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์ของ CA ถูกพบในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ซึ่งพบในไซโตซอล นิวคลีโอพลาสซึม พลาสม่า นิวเคลียส และเยื่อหุ้มแวคคิวโอลอาหารในระยะ โทรโฟซอยต์ ชิซอนต์ และเมอโรซอยต์ และยังพบว่าผลิตภัณฑ์ของ CA พบมากในปรสิตมากกว่าในเม็ดเลือดแดง บ่งชี้ว่าเอนไซม์นี้มีความสำคัญต่อการเจริญของปรสิต เมื่อดูสัญฐานวิทยาของปรสิตซึ่งถูกให้สารยับยั้ง พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นคลื่น เมมเบรนของแวคคิวโอลอาหารแตกหัก เกิดการสลายของนิวคลีไอ และมีเม็ดกลมที่เป็นเนื้อเดียวกันเหลืออยู่ในช่องว่างของเซลล์ นอกจากนี้พบว่าการยับยั้ง CA ไอโซไซม์ใดไอโซไซม์หนึ่งจะมีการลดลงของปรสิต แต่เมื่อเวลาผ่านไปจำนวนปรสิตก็จะเพิ่มขึ้น แต่ถ้ายับยั้ง CA ทั้ง 2 ไอโซไซม์ปรสิตจะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ภายใน 36 ชั่วโมง ดังนั้น CA มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อและเหมาะแก่การหาสารยับยั้งเพื่อนำมาใช้เป็นยาต้านมาลาเรีย

Reungprapavut และคณะ (2004) พบว่า pfCA มีอย่างน้อย 3 ไอโซไซม์ ซึ่งไอโซไซม์ 1 (pfCA1) เป็นไอโซไซม์หลักและมีลักษณะคล้ายคลึงกับชนิด α ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 235 กรดอะมิโน เชื้อมาลาเรียไม่สามารถสังเคราะห์เบสพิวรีนแบบ de novo (purine auxotroph) และต้องใช้พิวรีนจากเซลล์ของโฮส ในทางตรงกันข้ามเชื้อมาลาเรียสามารถสังเคราะห์เบสไพริมิดีนได้โดยใช้ CA เป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์โดยมีไบคาร์บอเนตซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง carbamoylphosphate เพื่อใช้ในการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนของเชื้อมาลาเรีย แต่ในมนุษย์เมื่อ CA ถูกยับยั้งจะยังคงสามารถสร้างเบสไพริมิดีนได้โดยใช้วิถีแบบกู้คืน (Salvage pathway) นอกเหนือจากวิถีหลักแทน ความแตกต่างข้อนี้เองที่ทำให้ pfCA มีศักยภาพในการถูกนำไปใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายเพื่อหายาชนิดใหม่รักษาโรคมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ซึ่งยาดังกล่าวจะมีกลไกแตกต่างไปจากยาที่ใช้อยู่เดิม เมื่อหาค่าแอคทิวิตีโดยใช้ปฏิกิริยาเอสเทอเรส พบว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีผลรวมของแอคทิวิตีของ CA มากกว่าในเม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้ติดเชื้อถึง 4-

5 เท่า และมีแอคทิวิตีที่จำเพาะมากกว่า 9-10 เท่า pfCA มีความไวต่อสารยับยั้ง AZA น้อยกว่า hCAII แต่เมื่อใช้สารยับยั้งซัลฟานิลาไมด์ (SFA) pfCA จะมีความไวต่อสารยับยั้งมากกว่า (Krungkrai และคณะ, 2001) ความแตกต่างในความไวต่อสารยับยั้งจะเป็นตัวคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

Krungkrai และคณะ (2005) และ Krungkrai และ Supuran (2008) พบว่าสารประกอบอะโรมาติคซัลโฟนาไมด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง pfCA และมีศักยภาพที่จะสามารถถูกนำมาใช้เป็นยาต้านมาลาเรีย โดยสาร 4-(3,4-dichlorophenylureido-ethyl)-benzenesulfonamide สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้ดีกว่า AZA และยังมีความไวต่อการยับยั้งแอคทิวิตีของ pfCA มากกว่า 4 เท่าของในหลอดทดลอง (*in vitro*) นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อร้อยละ 50 (IC_{50}) อยู่ที่ 2 ไมโครโมลาร์ ซึ่งน้อยกว่า AZA ถึง 10 เท่า อันเนื่องมากจากสารประกอบชนิดนี้มีความสามารถในการละลายในไขมันได้ดีกว่า AZA ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความเป็นขั้วสูง คุณสมบัตินี้เองทำให้สารประกอบดังกล่าวสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปข้างในเซลล์ได้โดยง่าย และยับยั้งเอนไซม์ได้ดีกว่า ในทำนองเดียวกัน Krungkrai และคณะ (2008) ได้ศึกษาสารประกอบซัลโฟนาไมด์ คือ 4-(3,4-dichlorophenylureido)thioureido-benzenesulfonamide พบว่าสามารถยับยั้ง pfCA ได้ดีโดยมีค่าคงที่การยับยั้ง (K_I) เท่ากับ 0.18 ไมโครโมลาร์ และค่า IC_{50} ที่ 1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งน้อยกว่า AZA ถึง 20 เท่า อีกทั้งยังพบว่าสารที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย เช่น ควินีน อาร์เทไมซินิน และคลอโรควีน ไม่สามารถยับยั้งแอคทิวิตีของ CA ได้ แสดงว่าสารดังกล่าวมีกลไกการยับยั้งการเจริญของมาลาเรียแตกต่างจากการใช้สารยับยั้ง pfCA ดังนั้น pfCA จึงเหมาะสมและมีศักยภาพที่จะถูกนำไปใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายในการหายารักษาโรคมาลาเรียชนิด *P. falciparum* โดยอาศัยกลไกที่แตกต่างไปจากเดิม

งานวิจัยนี้มุ่งหมายที่จะทำการดัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อศึกษาการทำหน้าที่ทดแทนของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์โดยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจาก *P. falciparum* (pfCA)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
3. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S-20K ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea
6. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น GenieII G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan
9. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 2600 ของบริษัท Denvelle, Germany
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น NST 2000 ของบริษัท EYELA, Japan
11. เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator) รุ่น RK100 บริษัท BANDELIN, Germany
12. เครื่องนับจำนวนเม็ดเลือด (Haemacytometer)
13. ชุดเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-1NW บริษัท EYELA, Japan
14. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
15. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
16. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร Restek,Thailand
17. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA

18. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-ex, Japan
19. เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) ยี่ห้อ Clifton Ceraplate
20. เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
21. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 ของบริษัท Bio-tek instrument
22. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รุ่น ULT 1786 ของบริษัท FORMA Scientific, USA
23. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 ของบริษัท SANYO Electric, Japan
24. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส รุ่น Tiara บริษัท Mitsubishi electric, Thailand
25. ชุดเครื่องมือทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Protein III System) ของบริษัท Biorad, USA
26. ชุดเครื่องมือทำ semi-dry electrophoretic transfer cell รุ่น Trans-Blot® SD ของบริษัท Bio-Rad, USA
27. แผ่นกระจกสไลด์
28. กระจกปิดสไลด์
29. ตะเกียงแอลกอฮอล์
30. ถาดประกบฟิล์ม ของบริษัท OKAMOTO
31. ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (Kodak Medical x-ray flim)
32. กระดาษกรอง (filter paper)
33. กล้อง inverted microscope ของบริษัท Olympus, USA
34. ปิเปตต์แก้ว (seropipette) 1, 5 และ10 มิลลิลิตร Pyrex, USA
35. ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well) ยี่ห้อ NUNC™ , Denmark
36. บีกเกอร์ Pyrex, USA
37. หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Corning Incorporation, USA
38. ทิปปลอดอาร์เอ็นเอส (RNase-free tip) ปริมาตร 2, 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร Axygen, USA
39. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
40. พาราฟิล์ม (Parafilm) Parafilm® M, USA

41. กระบอกตวง (cylinder) Pyrex, USA
42. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
43. หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
44. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, USA
45. เครื่องดูดจากปิเปตต์ (Pipette aid) ยี่ห้อ Drummond, USA
46. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane ของบริษัท Amersham Biosciences, UK
47. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
48. Glass beads, acid –washed ของบริษัท Sigma, USA

3.2 เคมีภัณฑ์

1. Yeast extract ของบริษัท Difco Laboratories, USA
2. Glucose ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. Galactose ของบริษัท Difco Laboratories, USA
4. Yeast Nitrogen Base without Amino Acids ของบริษัท Difco Laboratories, USA
5. กรดอะมิโนทุกชนิด ของบริษัท Sigma, USA
6. Agarose gel ของบริษัท Prondisa, Spain
7. Sodium hydroxide (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany
8. Acetic acid (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E Merck, Germany
9. Glycerol ของบริษัท Carlo ERBA, France
10. Lithium acetate (LiAc) ของบริษัท Merck, Germany
11. Carrier DNA ดีเอ็นเอที่มีมวลโมเลกุลสูง (Deoxyribonuclei acid Sodium salt Type III from salmon testes) ของบริษัท Sigma, USA
12. Phenol ของบริษัท Merck, Germany
13. Polyethylene glycol (PEG) ของบริษัท Sigma, USA
14. 5-Fluoroanthranilic acid ของบริษัท Sigma, USA
15. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA
16. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$) ของบริษัท Sigma, USA

17. EGTA (Ethylene-bis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid tetrasodium) ($C_{14}H_{20}N_2O_{10}Na_4$) ของบริษัท Sigma, USA
18. Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
19. Potassium chloride (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
20. Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
21. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
22. DEPC (diethylpyrocarbonate) ของบริษัท Sigma, USA
23. Random hexamer ของบริษัท Fermentus, Canada
24. Ribonuclease inhibitor ของบริษัท Fermentus, Canada
25. Tag polymerase ของบริษัท Fermentus, Canada
26. Deep $Vent_R$™ DNA Polymerase ของบริษัท New England Biolabs, UK
27. M-MuLV reverse transcriptase ของบริษัท Fermentus, Canada
28. dNTP mix ของบริษัท Fermentus, Canada
29. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Sigma, USA
30. Tween20 ของบริษัท Sigma, USA
31. เอนไซม์ตัดจำเพาะทุกชนิดของบริษัท New England Biolabs, UK
32. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Fermentas, USA
33. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, UK
34. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA
35. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA Absolute alcohol ของบริษัท Merck, Germany
36. Isopropanol ของบริษัท Merck, Germany
37. Protease inhibitor ของบริษัท Sigma, USA
38. Buffer A สำหรับสกัดโปรตีน (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
39. Buffer B สำหรับสกัดโปรตีน (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
40. Chloroform ของบริษัท Lab-scan, Thailand
41. Acrylamide/Bisacrylamide 40% solution ของบริษัท Sigma, USA
42. TEMED (N,N,N,N-Tetramethyethylenediamide) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
43. Amonium persulfate ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
44. β-mercapto-ethanol ของบริษัท Sigma, USA

45. Dithiothreitol (DTT) ของบริษัท USB corporation, USA
46. ECL western bloting ของบริษัท Amersham biosciences, UK
47. Absolute methanol ของบริษัท Merck, Germany
48. Tris buffer pH 8.8 (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข)
49. Tris buffer pH 6.8 (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข)
50. Prestain molecular weight marker ของบริษัท Fermentus, Canada
51. Bromphenol blue ของบริษัท Sigma, USA
52. น้ำยาล□างฟ□ล□ม ของบริษัทเจเนเซ□น, Thailand
53. BCA™ protein assay ของบริษัท PIERCE, USA
54. DYKDDDDK Tag Antibody; catalog#2368 ของบริษัท Cell Signaling Technology Inc, USA
55. Anti-Actin, clone C4; catalog MAB1501 ของบริษัท Cell Signaling Technology Inc, USA
56. Donkey anti-rabbit IgG-HRP ของบริษัท Amersham biosciences, UK
57. Sheep anti-Mouse Ig, (H+L) HRP conjugate ของบริษัท Cell Signaling Technology Inc, USA
58. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
59. ชุดไลเกชันคิด Rapid DNA Ligation Kit ของบริษัท Fermentas, USA
60. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE, USA
61. ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
62. pGEM®-T Easy Vector ของบริษัท Promega, USA
63. Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix ของบริษัท Life Technologies Corporation, USA
64. พลาสมิด pUG72 และ pSH63 ของบริษัท EUROSCARF, Germany
65. พลาสมิด pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA ของบริษัท Addgene, USA
66. พลาสมิด pENTR™3C Dual Selection ของบริษัท Invitrogen, USA

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (Analytical grade)

3.3 ยีสต์

รายละเอียดของยีสต์ที่ใช้ในการทดลองได้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สายพันธุ์ยีสต์	จีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง/แหล่งที่มา
BP-9	*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP*	สร้างในงานวิจัยนี้ (ดัดแปลงต่อจากสายพันธุ์ W303-1B)
BP-12	*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP Δnce103::loxP-URA3-loxP*	สร้างในงานวิจัยนี้ ดัดแปลงต่อจาก BP-9
BP-15	*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP Δnce103::loxP*	สร้างในงานวิจัยนี้ ดัดแปลงต่อจาก BP-12
BP-13	*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP Δpdr5::loxP-URA3-loxP*	สร้างในงานวิจัยนี้ ดัดแปลงต่อจาก BP-9
BP-14	*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP Δpdr5::loxP*	สร้างในงานวิจัยนี้ ดัดแปลงต่อจาก BP-13
BP-17	*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP Δpdr5::loxP Δnce103::loxP*	สร้างในงานวิจัยนี้ ดัดแปลงต่อจาก BP-14
W303-1B	*MATα ade2-1 his3-11,15 leu23,112 trp1-1 ura3-1 can1-100*	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima University

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้

พลาสมิด	จีโนไทป์	หมายเหตุ
pYES2	*Amp*^{R} *URA3*	บริษัท Invitrogen, USA
pUG72	*Amp*^{R} *URA3*	บริษัท EUROSCARF, Germany
pSH63	*Amp*^{R} *TRP1*	บริษัท EUROSCARF, Germany
pGEM T-Easy	*Amp*^{R} *lacZ*	บริษัท Promega, USA
pENTR™3C Dual Selection	*Kan*^{R} *Cm*^{R} *ccd*B	บริษัท Invitrogen, USA
pAG414GPD-ccdB-HA	*Amp*^{R} *TRP1*	บริษัท Addgene, USA
pAG414GAL-ccdB-HA	*Amp*^{R} *TRP1*	บริษัท Addgene, USA
pUC57	*Amp*^{R} *lacZ*	บริษัท GenScript, USA

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	หมายเหตุ
Δ*nce103*	Fwd:5'-actacagctaagactacaaattt caattattacacatcagacagctgaagct tcgtacgc-3' Rev:5'-ccccgtctactttgtaaatgtctttc tatttcaatgaataataggccactagtggat ctg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
Δ*pdr5*	Fwd:5'-atagtacacaacatttatcacttc acacaatcaggagtggacagctgaagc ttcgtacgc-3' Rev:5'-cggaattctttcggacattgaact Ttgatttatcagaggcataggccactagtg gatctg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	หมายเหตุ
nce103_F1	Fwd:5'-gtcaccatgacgcttatcaagcc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
nce103_R1	Rev:5'-atcgggcgtttaccgtatcgc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
nce103_F2	Fwd:5'-ctacacctggggtcatgattagcc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
nce103_R2	Rev:5'-gacatttgctggatcacagaccg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
pdr5_F1	Fwd:5'-gaaagcagcacctcgttggc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
pdr5_R1	Rev:5'-atcgggcgtttaccgtatcgc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
pdr5_F2	Fwd:5'-ctacacctggggtcatgattagcc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
pdr5_R2	Rev:5'-gccgtatatgagaagacggttcgc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
NCE103_F	Fwd:5'-cgggatccaccaccatgagcgctaccgaatcttcatctatattc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
NCE103_R	Rev:5'-ccgctcgagcgctatttatcatcatcatctttgtaatctttttggggtaacttttgtg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
pfCA_F (418)	Fwd:5'-cgggatccgccaccatgcttgaaatgatagataaatataataccc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
pfCA_R (418)	Rev:5'-ccgctcgagcgttatttatcatcatcatctttgtaatctttattacctgagccgacg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
pfCA_F (235)	Fwd:5'-cgggatccaccaccatgaaagatttaaaggagagag-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	หมายเหตุ
pfCA_R (235)	Rev:5'-ccgctcgagcgttatttatcatcatcatctttgtaatcttt attacctgagccgacg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
hCAII_F	Fwd:5'-ggggtaccaccaccatgtcccatcactggg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
hCAII_R	Rev:5'-ccgctcgagcgttatttatcatcatcatctttgtaatctttg aaggaagctttgatttgc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
c-pfCA_F	Fwd:5'-cgggatccaccaccatgaaagatttaaaggaga gag-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)
c-pfCA_R	Rev:5'-ccgctcgagcgttatttattacctgagccg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)
c-Opt pfCA1_F	Fwd:5'-atgaaagacttgaaggaaagag-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)
c-Opt pfCA1_R	Rev:5'-cttgttaccactacctacg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)
c-Opt pfCA2_F	Fwd:5'-atgaaggatttgaaagaaagag-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)
c-Opt pfCA2_R	Rev:5'-tttgttaccagaaccaacatg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)
c-NCE_F	Fwd:5'-cgggatccaccaccatgagcgctaccgaatcttcat ctatattc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)
c-NCE_R	Rev:5'-ccgctcgagcgctatttatcatcatcatctttgtaatctt ttggggtaacttttgtg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)
c-hCAII_F	Fwd:5'-ggggtaccaccaccatgtcccatcactggg-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)
c-hCAII_R	Rev:5'-ccgctcgagcgttatttatcatcatcatctttgtaatct ttgaaggaagctttgatttgc-3'	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (RT-PCR)

3.5 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต

แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอตที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.4

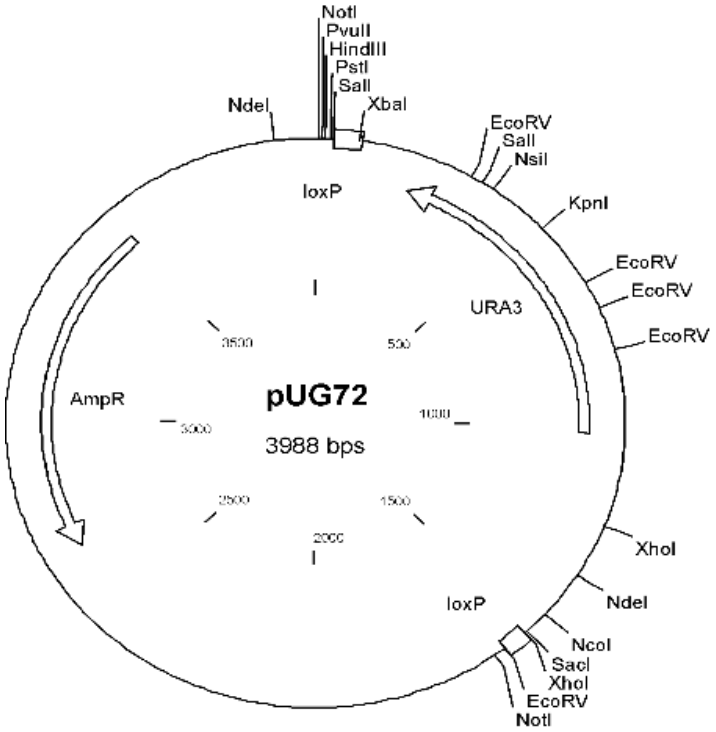
ตารางที่ 3.4 แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต

แอนติเจน	อัตราส่วนแอนติบอดีปฐมภูมิต่อ Blocking solution	อัตราส่วนแอนติบอดีทุติยภูมิต่อ Blocking solution
DYKDDDDK Tag	Rabbit anti-Flag 1:1,000	Donkey anti-rabbit IgG-HRP 1:4,000
Actin	Mouse anti-actin 1:4,000	Sheep anti-Mouse Ig-HRP 1:10,000

3.6 การกลายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการทำลายยีน *NCE103* โดยแทนที่ด้วยยีน *URA3*

3.6.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *loxP-URA3-loxP* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ทำการทำลายยีน *NCE103* โดยใช้ชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* เข้าไปแทนที่ยีน *NCE103* (Carbonic anhydrase-like enzyme) ในโครโมโซมของยีสต์ โดยออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ pUG72 (Euroscarf, Germany ดังภาพที่ 3.1) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) ประกอบด้วย 41 เบส (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 559774 - 559815) ของบริเวณด้านปลาย 5’ ของยีน *NCE103* เชื่อมต่อกับ 19 เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 และรีเวิร์สไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) ประกอบด้วย 40 เบส (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 560480 - 560520) ของบริเวณด้านปลาย 3’ ของยีน *NCE103* เชื่อมต่อกับ 20 เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 ไพร์เมอร์ทั้งสองจะใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *loxP-URA3-loxP* ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR จะมีลักษณะเป็นดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 แผนที่พลาสมิด pUG72 ซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Euroscarf, Germany)

ภาพที่ 3.2 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ pUG72 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (Δ*nce103*) ที่จำเพาะต่อบริเวณด้าน 5' และ 3' ของยีน *NCE103* ตามลำดับ

ภาพที่ 3.3 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์สำหรับการทำลายยีน *NCE103*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้พลาสมิด pUG72 (ภาพที่ 3.1) เป็นต้นแบบในปฏิกิริยาโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Buffer	10 เท่า	2.5	1 เท่า
dNPT mix	10 มิลลิโมลาร์	0.5	200 ไมโครโมลาร์
Forward primer	10 ไมโครโมลาร์	1.25	0.5 ไมโครโมลาร์
Reverse primer	10 ไมโครโมลาร์	1.25	0.5 ไมโครโมลาร์
Deepvent DNA polymerase	2 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.5	1 ยูนิต
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	17	-
DNA template	-	2	10-25 นาโนกรัม
ปริมาตรสุทธิ	-	25	-

โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1.45 นาที, 35 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้นร้อยละ 1.0 หลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตามให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอของตัวอย่างหรือหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mupid (Advance, Japan) ตั้งค่าความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนเกือบสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจล

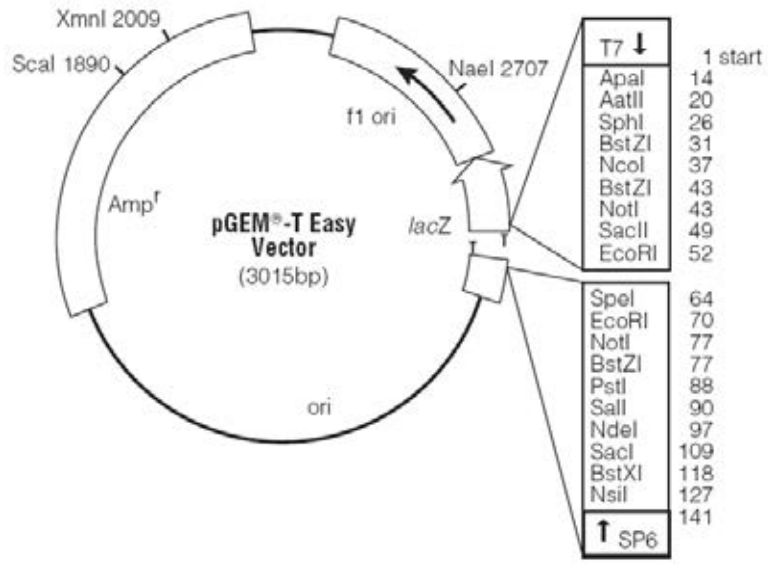
ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA)

3.6.2 ทำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

สกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออก จากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยตัดชิ้นอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล (น้ำหนักอะกาโรสเจล 100 มิลลิกรัม มีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายจนหมด นำส่วนสารละลายสีเหลืองใส่ลงใน QIAquick spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนที่จะหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเอยู่ในส่วนน้ำใส

3.6.3 ทำไลเกชันดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *loxP-URA3-loxP* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Kit แล้วมาเติม dATP ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.6 จากนั้นทำการไลเกชันเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 3.4) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน



ภาพที่ 3.4 แผนที่พลาสมิด pGEM T-Easy โคลนนิ่งเวคเตอร์ (Promega, USA)

ตารางที่ 3.6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับก่อนไลเกชัน

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
Taq DNA polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.5
dATP	2 มิลลิโมลาร์	1
10x buffer	10 เท่า	1
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *loxP-URA3-loxP*	-	7.5
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

ตารางที่ 3.7 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันเข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
pGEM T-Easy เวคเตอร์	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	1
T4 DNA ligase	3 เวสยูนิต/ไมโครลิตร	1
2X Rapid Ligation Buffer	2 เท่า	5
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *loxP-URA3-loxP* ที่เติม dATP	-	3
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์สำหรับการทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α (F– Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (rK–, mK+) *pho*A *sup*E44 λ– *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1, Invitrogen USA) (Sambrook และ Russell 2001) โดยนำแบคทีเรียดังกล่าวเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (Luria-Bertani) (ภาคผนวก ก) 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อลงในอาหารเหลว LB อีกครั้งจนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.4-0.6 นำหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นกระจายเซลล์ด้วย 625 ไมโครลิตรของ $CaCl_2$ 100 มิลลิโมลาร์ แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วนำเชื้อไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กระจายเซลล์ด้วย 100 ไมโครลิตรของ $CaCl_2$ 100 มิลลิโมลาร์ที่ผสมอยู่ในกลีเซอรอล 15% เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

นำหลอดไมโครทิวป์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมแล้วแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ 10-50 นาโนกรัม ดูดใส่ในหลอดไมโครทิวป์ที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครทิวป์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ที่มีพลาสมิดบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วรีบนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ที่ผ่านการทำฮีทช็อคแล้ว บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครทิวป์ดังกล่าวไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดอาหารเหลวออก 700 ไมโครลิตร แล้วนำเซลล์ที่เหลือในหลอดไมโครทิวป์ไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มี IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside), X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) และสารปฏิชีวนะ Ampicillin (ภาคผนวก ข) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ขึ้น ถ้าเป็นโคโลนีสีฟ้าหรือน้ำเงินแสดงว่าไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

3.6.4 ทำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

สกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต นำโคโลนีที่มีสีขาวมา

เลี้ยงในอาหารเหลว LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ดูดเชื้อในอาหารเหลวปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในไมโครทิวป์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนอาหารเหลวทิ้ง ทำซ้ำอีกรอบ จากนั้นเติม Resuspension บัฟเฟอร์ (R3) ที่เติม RNase A เรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจาย เติม Lysis บัฟเฟอร์ (L7) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา 5 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม Precipitation บัฟเฟอร์ (N4) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาจนเข้ากันดี นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ได้ดูดใส่ในสปินคอลัมน์ที่มีวอชทิวป์รองรับของเหลว นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในวอชทิวป์ออกแล้วนำกลับไปใส่ใหม่ เติม Wash บัฟเฟอร์ (W10) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในวอชทิวป์ออก เติม Wash บัฟเฟอร์ (W9) ที่เติมเอทานอลแล้ว ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในวอชทิวป์ออก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอีก 1 นาที เพื่อกำจัด Wash บัฟเฟอร์ที่หลงเหลืออยู่ออกให้หมด นำสปินคอลัมน์ไปใส่ในไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในส่วนกลางของสปินคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6.5 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 นำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore จากนั้นสกัดชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.2

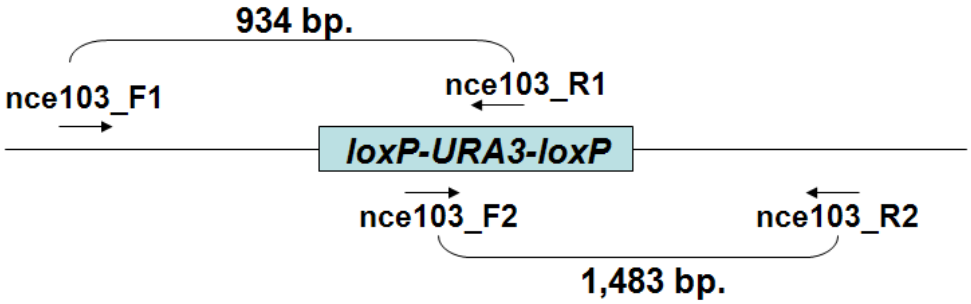
ตารางที่ 3.8 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	28.5	-
10X NEBuffer *EcoR* I	5	1 เท่า
pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP*	16	8 ไมโครกรัม
EcoR I	0.5	10 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	-

3.6.6 ทรานสฟอร์มชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* จากข้อ 3.6.5 เข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ BP-9 และการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์

นำชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* จากข้อ 3.6.5 มาชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ BP-9 (ตารางที่ 3.1) ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) (Gietz และคณะ, 1995) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ BP-9 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสข้ามคืน (16-20 ชั่วโมง) จากนั้นถ่ายเชื้อใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD 50 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยเป็น 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเป็น 2 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีอีกครั้งเพื่อแยกเซลล์ เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติม 0.1 โมลาร์ LiAc ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และถ่ายใส่หลอดไมโครฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วย LiAc ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ระหว่างที่ปั่นแยกเซลล์ให้บ่ม carrier DNA (ภาคผนวก ข) ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการแช่ในน้ำแข็งทันที ถ่ายเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ใส่หลอดไมโคฟิวจ์หลอดละ 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ที่ได้โดยการเติมร้อยละ 50 ของ PEG (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร, LiAc เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 36 ไมโครลิตร, carrier DNA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25

ไมโครลิตรและดีเอ็นเอที่ต้องการชักนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านปริมาณ 5 ไมโครกรัม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามลำดับผสมเข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และ ฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีตามลำดับ นำมาปั่นเพื่อแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที แล้วดูดส่วนน้ำใสออก ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 150 ไมโครลิตร และนำเซลล์มาเกลี่ยในอาหาร synthetic complete (SC) medium ที่ขาดยูราซิล (SC-Ura) (ภาคผนวก ก) (Amberg และคณะ, 2005) เพื่อคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับยีน *loxP-URA3-loxP* จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20 เป็นเวลา 3-4 วัน ซึ่งยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จะนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ยืนยันผลการทำลายยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งไพรเมอร์คู่แรกออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ nce103_F1 ที่จำเพาะต่อ upstream regulatory region ของยีน *NCE103* และรีเวิร์สไพรเมอร์ nce103_R1 ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* (ตารางที่ 3.3) ส่วนไพร์เมอร์คู่ที่สองออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ nce103_F2 ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* และรีเวิร์สไพรเมอร์ nce103_R2 ที่จำเพาะต่อ downstream regulatory region ของยีน *NCE103* (ตารางที่ 3.3) ดังภาพที่ 3.5 โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์ BP-9 เป็นชุดควบคุมผลลบตามลำดับ



ภาพที่ 3.5 ตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้สำหรับการยืนยันผลการทำลายยีน *NCE103* ที่จับบนโครโมโซมของยีสต์

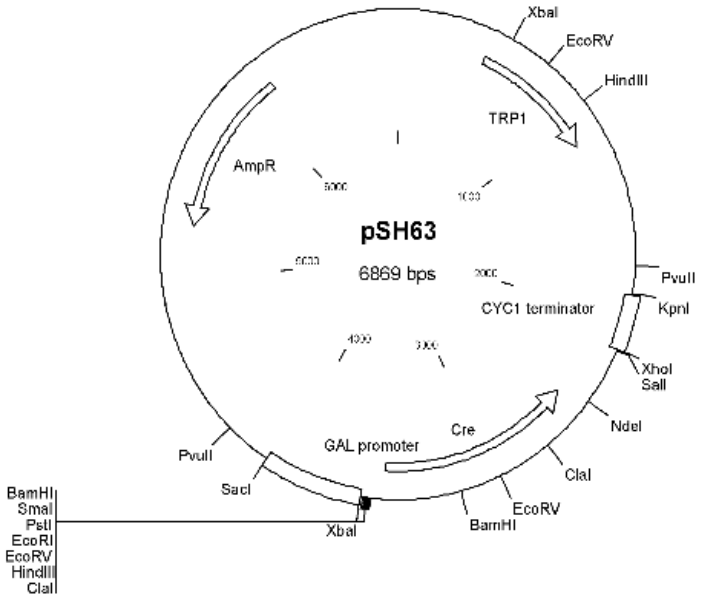
การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้และยีสต์สายพันธุ์ BP-9 เริ่มจากขั้นแรกเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวในอาหารแข็ง YPAUD บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวชนิดเดียวกันข้ามคืน จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำของเหลวทิ้งแล้วล้างเซลล์

ด้วยน้ำกลั่นแล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วใส่ Extraction บัฟเฟอร์ จากนั้นนำเม็ดบีด 0.3 กรัม ใส่ลงในไมโครทิวป์เป็นอย่างสุดท้าย นำไปวอร์เท็กเพื่อทำให้เซลล์แตกเป็นเวลา 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ จากนั้นนำ 1X TE บัฟเฟอร์และสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 ใส่ลงในหลอดให้ได้อัตราส่วน 1:1 ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาแล้วปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใสในหลอดใหม่แล้วเติมสารละลายเดิมอีกครั้ง พลิกหลอดไปมาแล้วปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใสในหลอดใหม่แล้วเติมแอลกอฮอล์ร้อยละ 100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วใส่ 1X TE บัฟเฟอร์ กับ RNase A บ่ม 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นนำโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ และแอลกอฮอล์ร้อยละ 100 ใส่ลงไปเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งจะเห็นตะกอนดีเอ็นเออยู่ด้านล่างซึ่งมีสีขาวขุ่น ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 แล้วปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตะกอนดีเอ็นเอแห้ง (สีขาวขุ่นเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสี) แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย 1X TE บัฟเฟอร์ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่านำไปใช้ จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีที่ได้กล่าวในข้อ 3.6.1 แต่ให้ใช้ Taq DNA polymerase แทน และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

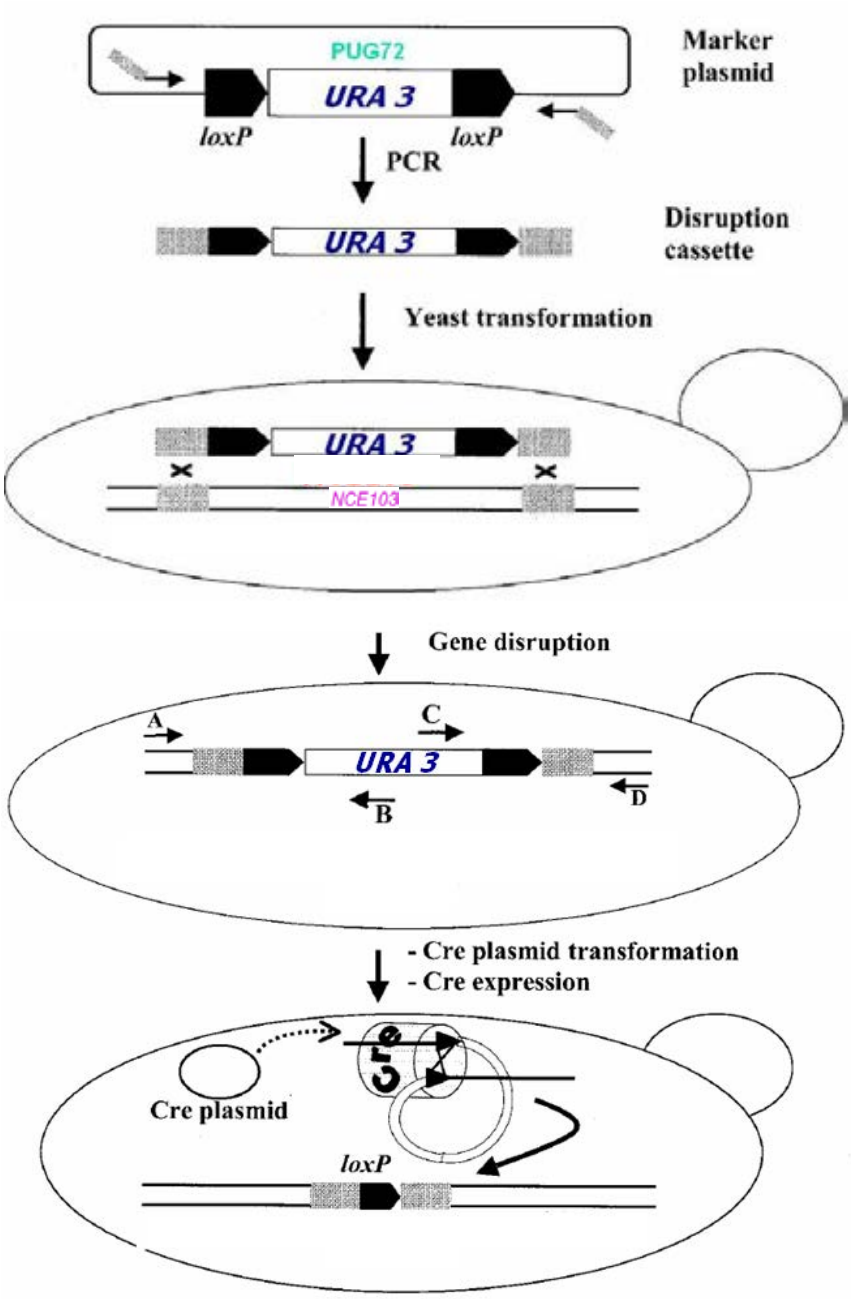
3.6.7 การกำจัดยีน *URA3* ที่เป็นยีนมาร์คเกอร์ซึ่งใช้ในการทำลายยีน *NCE103* ออกจากโครโมโซมของยีสต์

เพื่อนำยีนมาร์คเกอร์ *URA3* กลับมาใช้ใหม่จึงต้องมีการกำจัดยีนมาร์คเกอร์ซึ่งใช้ในการทำลายยีน *NCE103* โดยอาศัยเทคนิค Cre/loxP system (Gueldener และคณะ, 2002) โดยการนำพลาสมิด pSH63 (Euroscarf, Germany ดังภาพที่ 3.6 ที่มีการแสดงออกของยีน Cre recombinase ภายใต้การควบคุมของ *GAL1* promoter และมีทริปโตเฟนเป็นมาร์คเกอร์) เข้าสู่ยีสต์กลายพันธุ์ BP-12 (ตารางที่ 3.1) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.6 แต่ใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครกรัมแทน โดยผู้วิจัยต้องการทำการกำจัดยีน *URA3* ซึ่งถูกขนาบด้วย *loxP* ซึ่งเมื่อนำพลาส-

มิดเข้าสู่ยีสต์กลายพันธุ์แล้วจะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมทริปโตเฟน จากนั้นนำยีสต์ที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว YPGal (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน) (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงจนครบเวลาที่ต้องการแล้วนำสารละลายเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปเจือจางให้เหมาะสมและเกลี่ยเซลล์ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน) บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีที่เหมาะสมไปทำการ Replica ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ SC-Ura บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นคัดเลือกโคโลนีจากจานเพาะเชื้อต้นแบบ (master plate) ที่ไม่เจริญใน SC-Ura และยืนยันผลการกำจัดยีนโดยใช้วิธีการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.6 และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 จากนั้นกำจัดพลาสมิด pSH63 ออกจากเซลล์ยีสต์โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง 5-FAA (Toyn และคณะ, 2000) (ภาคผนวก ก) บ่มเป็นเวลา 3-4 วัน ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำโคโลนีที่ได้ไปเลี้ยงต่อใน synthetic complete medium ที่ขาดทริปโตเฟน (SC-Trp) (ภาคผนวก ก) คัดเลือกโคโลนีจากจานเพาะเชื้อต้นแบบที่ไม่เจริญใน SC-Trp



ภาพที่ 3.6 แผนที่พลาสมิด pSH63 (Euroscarf, Germany)



ภาพที่ 3.7 **ขั้นตอนการทำลายยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และการกำจัดยีนมาร์คเกอร์** *URA3* **เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ในงานวิจัยขั้นต่อไป**

3.7 การกลายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการทำลายยีน *PDR5* และ *NCE103* เพื่อเพิ่มความไวของสารยับยั้งต่อยีสต์

3.7.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *loxP-URA3-loxP* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและนำชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* มาชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ BP-9

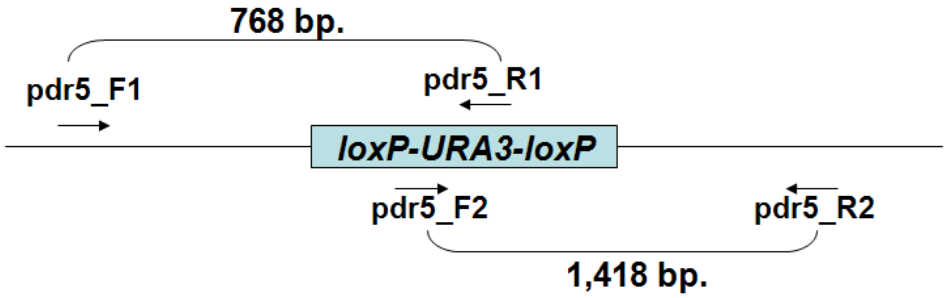
ยีน *PDR5* (Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter, Pleiotropic Drug Resistance) เป็นยีนประมวลรหัสโปรตีนที่ทำหน้าที่ปั๊มสารออกสู่ภายนอกเซลล์ หากยีสต์ขาดยีน *PDR5* จะส่งผลให้ยีสต์นั้นไม่สามารถขับสารขนาดเล็กออกนอกเซลล์ได้ เซลล์ยีสต์ Δ*pdr5* จึงมีความไวต่อสารต่างๆมากขึ้น ในการทดลองนี้ต้องการทำลายยีน *PDR5* โดยใช้ชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* เข้าไปแทนที่ยีน *PDR5* ในโครโมโซมของยีสต์ โดยออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ pUG72 (ดังภาพที่ 3.1) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ประกอบด้วย 41 เบสของบริเวณด้านปลาย 5' ของยีน *PDR5* เชื่อมต่อกับ 19 เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 และรีเวิร์สไพรเมอร์ซึ่งประกอบด้วย 38 เบสของบริเวณด้านปลาย 3' ของยีน *PDR5* เชื่อมต่อกับ 20 เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 ไพร์เมอร์ทั้งสองใช้สำหรับในการเพิ่มจำนวนยีน *loxP-URA3-loxP* ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR จะมีลักษณะคล้ายภาพที่ 3.2 แต่ขนาบข้างด้วยยีน *PDR5*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้พลาสมิด pUG72 เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (Δ*pdr5* ดังตารางที่ 3.3) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.5 โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 67 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1.45 นาที, 35 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *loxP-URA3-loxP* มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.2 แล้วมาเติม dATP ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.6 จากนั้นไลเกชันเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 3.4) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.3 จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.4 และนำ pGEM T-Easy//*loxP-URA3-loxP* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.8 บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 จากนั้นสกัดชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.2

นำชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* มาทรานฟอร์มเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ BP-9 ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.6 และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์บน synthetic complete medium ที่ไม่เติม uracil (SC-Ura) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ยืนยันผลการทำลายยีน *PDR5* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งไพรเมอร์คู่แรกออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ pdr5_F1 ที่จำเพาะต่อ upstream regulatory region ของยีน *PDR5* และรีเวิร์สไพรเมอร์ pdr5_R1 ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* (ตารางที่ 3.3) ส่วนไพร์เมอร์คู่ที่สองออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ pdr5_F2 ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* และรีเวิร์สไพรเมอร์ pdr5_R2 ที่จำเพาะต่อ downstream regulatory region ของยีน *PDR5* (ตารางที่ 3.3) ดังภาพที่ 3.8 ตรวจสอบผลการทำลายยีน *PDR5* โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์ BP-9 เป็นชุดควบคุมผลลบตามลำดับ โดยใช้วิธีการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.6 จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1



ภาพที่ 3.8 ตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้สำหรับการยืนยันผลการทำลายยีน *PDR5* ที่จับบนโครโมโซมของยีสต์

3.7.2 การกำจัดยีน *URA3* ที่เป็นยีนมาร์คเกอร์ซึ่งใช้ในการทำลายยีน *PDR5* ออกจากโครโมโซมของยีสต์

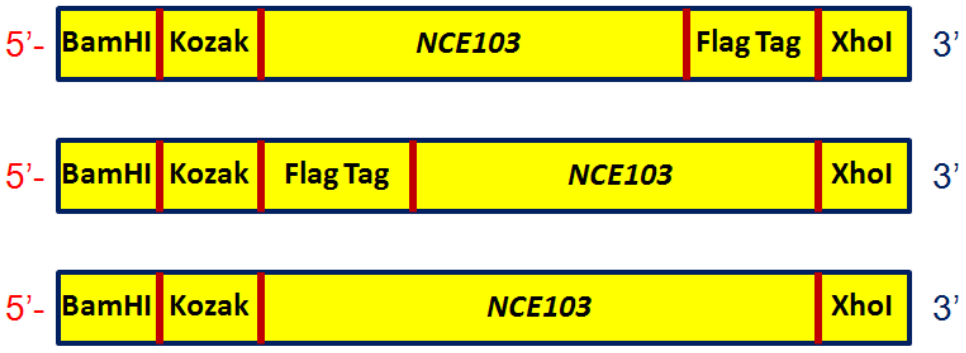
เพื่อนำยีนมาร์คเกอร์กลับมาใช้ใหม่ในงานวิจัยขั้นต่อไปจึงต้องมีการกำจัดยีนมาร์คเกอร์ *URA3* ซึ่งใช้ในการทำลายยีน *PDR5* ซึ่งได้แทรกอยู่ในโครโมโซมของยีสต์สายพันธุ์ BP-13 โดยอาศัยเทคนิค Cre/loxP system โดยมีรายละเอียดการทำตามข้อ 3.6.7

3.8 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *S. cerevisiae* (*NCE103*)

3.8.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *NCE103* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ยีน *NCE103* เป็นยีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *S. cerevisiae* ซึ่งมีหน้าที่หลากหลายและเกี่ยวข้องในกระบวนทางชีวภาพอันได้แก่ กระบวนการหายใจ การสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และไบคาร์บอเนต การรักษาสมดุลของพีเอชและคาร์บอนไดออกไซด์ภายในเซลล์ การเกิดเนื้องอก และกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพต่างๆ เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำกับไบคาร์บอเนตและโปรตอน

การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวจากโครโมโซมทำได้โดยสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์สายพันธุ์ W303-1B (ตารางที่ 3.1) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.6 และออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์ W303-1B เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ NCE103_F (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *NCE103* และให้ด้านปลาย 5’ ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Bam*H I เชื่อมต่อกับ Kozak sequence และรีเวิร์สไพรเมอร์ NCE103_R (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *NCE103* และให้ด้านปลาย 5’ ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho* I และติด Flag Tag ก่อนบริเวณ Stop codon ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR จะมีลักษณะเป็นดังภาพที่ 3.9 นอกจากนั้นยังมีแบบที่ติด Flag Tag ด้านปลาย 5’ และแบบไม่ติดแท็กด้วย



ภาพที่ 3.9 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ดีเอ็นเอของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ W303-1B เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *NCE103*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ W303-1B เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.5 โดยใช้ภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 30 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

3.8.2 ทำไลเกชันดีเอ็นเอ *NCE103* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.2 แล้วมาเติม dATP ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.9 จากนั้นไลเกชันเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 3.4) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.10 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน อัตราส่วนการไลเกชันระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* และ pGEM T-Easy เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1 ตามสูตรคำนวณปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำเข้า (นาโนกรัม) ดังสมการ

$$\frac{\text{ปริมาณเวคเตอร์ (นาโนกรัม)} \times \text{ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (คู่เบส)} \times \text{อัตราส่วนชิ้นดีเอ็นเอต่อเวคเตอร์}}{\text{ขนาดเวคเตอร์ (คู่เบส)}}$$

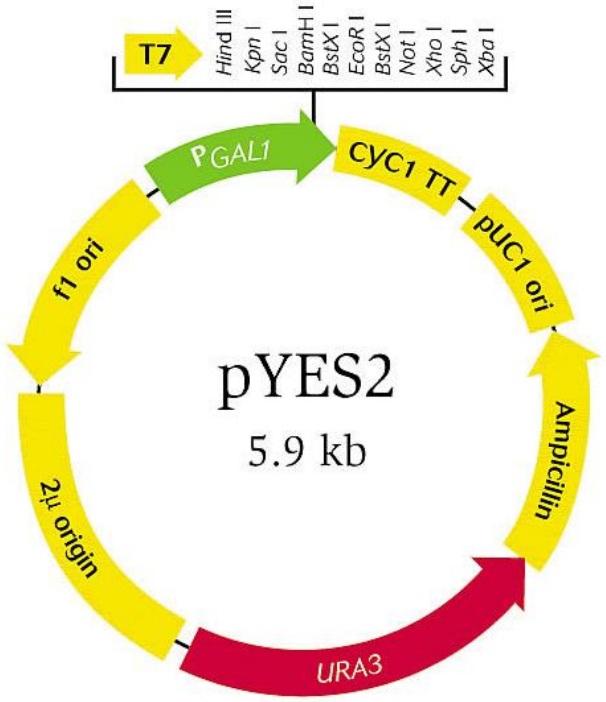
ตารางที่ 3.9 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP เข้าที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
Taq DNA polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.5
dATP	2 มิลลิโมลาร์	1
10x buffer	10 เท่า	1
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*	-	7.5
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

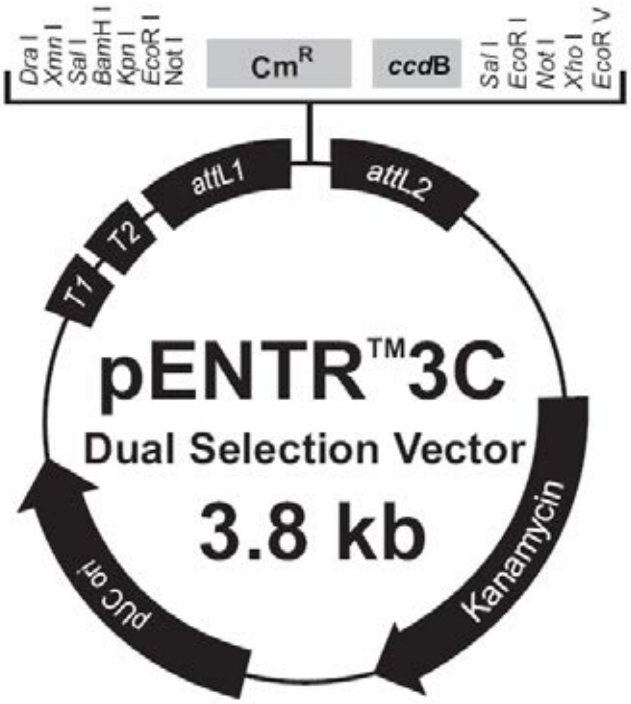
ตารางที่ 3.10 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
pGEM T-Easy เวคเตอร์	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	1
T4 DNA ligase	3 เวสยูนิต/ไมโครลิตร	1
2X Rapid Ligation Buffer	2 เท่า	5
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	-
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* ที่เติม dATP	-	3
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.3 จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.4 และนำ pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag), pYES2 (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3.10 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3.11 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.11 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1



ภาพที่ 3.10 แผนที่พลาสมิด pYES2 **เวคเตอร์** (Invitrogen, USA) (**ที่มา:** products.invitrogen.com/ivgn/product/V82520)



ภาพที่ 3.11 แผนที่พลาสมิด pENTR™3C Dual Selection **เวคเตอร์** (Invitrogen, USA) (**ที่มา:** products.invitrogen.com/ivgn/product/A10464?ICID==Search-Product)

ตารางที่ 3.11 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag), pYES2 **และ** pENTR™3C

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (µl)**	**ส่วนประกอบ**	**ปริมาตร (µl)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	32	น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	32	-
10X NEBuffer 3	5	10X NEBuffer 3	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	100X BSA	0.5	1 เท่า
pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag)	10	pYES2 หรือ pENTR™3C	10	4 ไมโครกรัม
*Bam*H I	2	*Bam*H I	2	5 ยูนิต
Xho I	0.5	*Xho* I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	**ปริมาตรสุทธิ**	**50**	-

3.8.3 ทำไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เข้าเอกเพรสชันเวคเตอร์ (pYES2) กับเอนทรีเวคเตอร์ (pENTR™3C Dual Selection) ตามลำดับ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้อ 3.6.2 ดังนั้นจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*, pYES2, pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เชื่อมต่อเข้ากับเอกเพรสชันเวคเตอร์ pYES2 หรือ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.12 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 10 นาที อัตราส่วนการไลเกชันระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* และ pYES2 เป็น 7 ต่อ 1 สำหรับ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1 ซึ่งมีสูตรคำนวณปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำเข้า (นาโนกรัม) ตามสมการที่ได้กล่าวในข้อ 3.8.2

ตารางที่ 3.12 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เข้า pYES2 หรือ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
pYES2 หรือ pENTR™3C เวคเตอร์	50 นาโนกรัม	2
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*	42 นาโนกรัม (pYES2), 46 นาโนกรัม (pENTR™3C)	2.1, 2.3
5X Rapid Ligation Buffer	1 เท่า	4
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	10.9, 10.7
T4 DNA ligase	5 ยูนิต	1
ปริมาตรสุทธิ	-	**20**

นำหลอดไมโครทิวป์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมแล้วแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ 10-50 นาโนกรัม ดูดใส่ในหลอดไมโครทิวป์ที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครทิวป์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ที่มีพลาสมิดบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วรีบนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ที่ผ่านการทำฮีทช๊อคแล้ว บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครทิวป์ดังกล่าวไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดอาหารเหลวออก 700 ไมโครลิตร แล้วนำเซลล์ที่เหลือในหลอดไมโครทิวป์ไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารฏิชีวนะ Ampicillin สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* ที่อยู่ใน pYES2 เวคเตอร์ หรือสารฏิชีวนะ Kanamycin สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* ที่อยู่ใน pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง

สกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้างต้นข้อ 3.6.4 นำ pYES2/NCE103 (C-Flag) หรือ pENTR™3C/ NCE103 (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.13 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

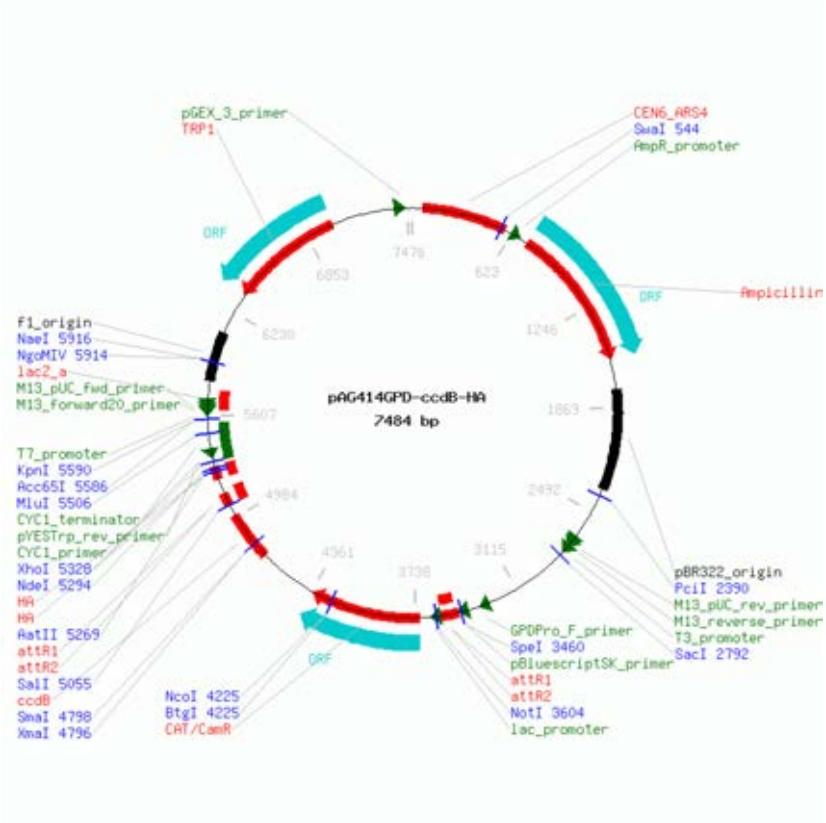
เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

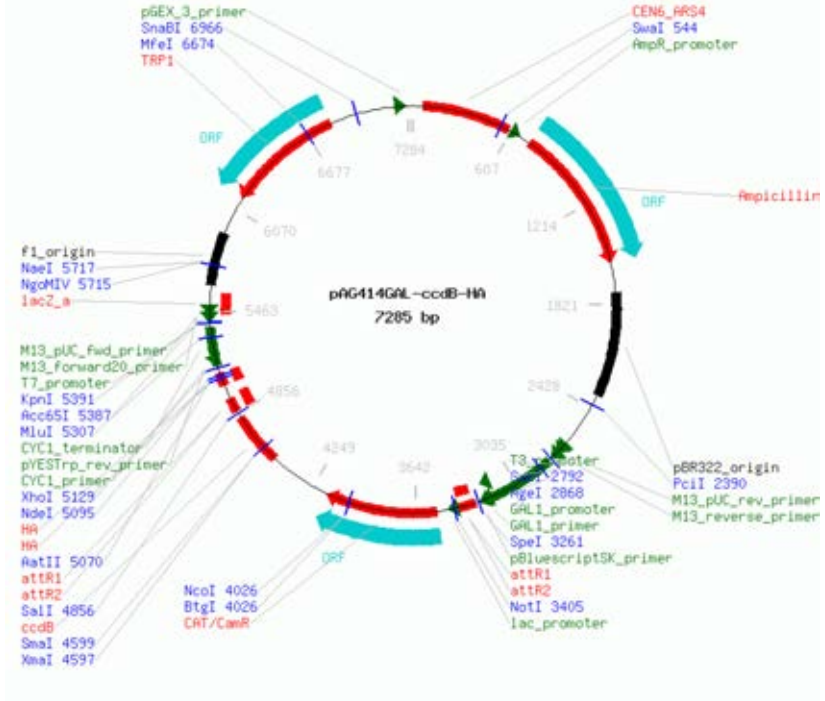
ตารางที่ 3.13 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pYES2/NCE103 (C-Flag) และ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	37	-
10X NEBuffer 3	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	1 เท่า
pYES2/NCE103 (C-Flag), pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)	5	1 ไมโครกรัม
*Bam*H I	2	5 ยูนิต
Xho I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	-

3.8.4 ทำ LR รีคอมบิเนชันเข้าเดสทิเนชันเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag) มาทำ LR รีคอมบิเนชันกับเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA หรือ pAG414GAL-ccdB-HA (Addgene, USA) ตามภาพที่ 3.12 ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.14 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที





ภาพที่ 3.12 แผนที่พลาสมิด pAG414GPD-ccdB-HA **และ** pAG414GAL-ccdB-HA (Addgene, USA) (**ที่มา**: www.addgene.org)

ตารางที่ 3.14 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชันของ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag) กับ pAG414GPD หรือ GAL-ccdB-HA

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
TE บัฟเฟอร์, pH 8.0	-	4
pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
pAG414GPD-ccdB-HA หรือ pAG414GAL-ccdB-HA	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
LR Clonase™ II Enzyme Mix	-	2
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

หมายเหตุ ก่อนนำ LR Clonase™ II Enzyme Mix มาใช้ให้เขย่าให้เข้ากัน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 วินาที และหลังผสมสารละลายทั้งหมดแล้วให้เขย่าให้เข้ากัน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 วินาที เซนทริฟิวจ์ให้สารละลายตกลงแล้วจึงนำไปบ่ม

นำหลอดไมโครทิวป์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมแล้วแช่ในน้ำแข็ง แล้วนำ LR รีคอมบิเนชันดีเอ็นเอที่ได้ 10-50 นาโนกรัม ดูดใส่ในหลอดไมโครทิวป์ที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครทิวป์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ที่มีพลาสมิดบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วรีบนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ที่ผ่านการทำฮีทช็อคแล้ว บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครทิวป์ดังกล่าวไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดอาหารเหลวออก 500 ไมโครลิตร แล้วนำเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครทิวป์ไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารฏิชีวนะ Ampicillin สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* ที่อยู่ใน pAG414GPD-ccdB-HA หรือ pAG414GAL-ccdB-HA เวคเตอร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง

สกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้างต้นข้อ 3.6.4 นำ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) หรือ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag) นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.15 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ว

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore

ตารางที่ 3.15 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	39	-
10X NEBuffer 4	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	1 เท่า
pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) หรือ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag)	5	1 ไมโครกรัม
Xho I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	-

3.9 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* (*pfCA*)

3.9.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *pfCA* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

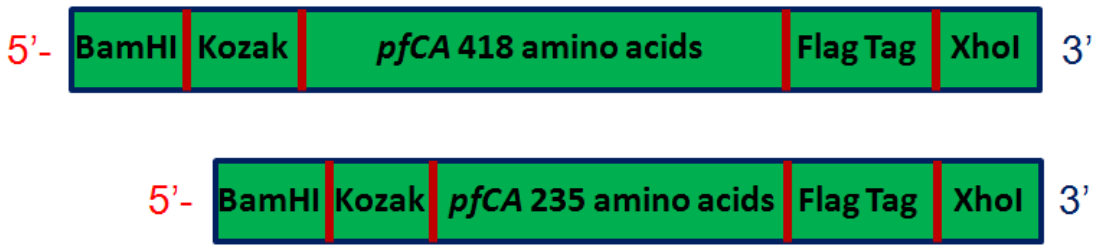
การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวทำได้โดยนำ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *P. falciparum* ซึ่งได้รับมาจาก ศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป แล้วมาเติม dATP ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.9 แต่เปลี่ยนจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เป็น *pfCA* จากนั้นไลเกชันเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 3.4) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.10 แต่เปลี่ยนจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เป็น *pfCA* ที่เติม dATP บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน อัตราส่วนการไลเกชันระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* ต่อ pGEM T-Easy เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1 ซึ่งมีสูตรคำนวณปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำเข้า (นาโนกรัม) ตามสมการดังข้อ 3.8.2

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.3 จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.4 นำ pGEM T-Easy/pfCA นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.16 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

ตารางที่ 3.16 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pGEM T-Easy/pfCA

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร** (µl)	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	39.8	-
10X High บัฟเฟอร์	5	1 เท่า
pGEM T-Easy/pfCA	5	1 ไมโครกรัม
EcoR I	0.2	4 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	-

ออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ pGEM T-Easy/pfCA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ pfCA_F (418) และ pfCA_F (235) (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *pfCA* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Bam*H I เชื่อมต่อกับ Kozak sequence ส่วนในรีเวิร์สไพรเมอร์ pfCA_R (418) และ pfCA_R (235) (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *pfCA* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho* I และติด Flag Tag ก่อนบริเวณ Stop codon ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จะมีลักษณะเป็นดังภาพที่ 3.13



ภาพที่ 3.13 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ pGEM T-Easy/pfCA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (pfCA_F (418) และ pfCA_F (235), pfCA_R (418) และ pfCA_R (235) ที่จำเพาะต่อยีน *pfCA*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ pGEM T-Easy/pfCA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.5 สำหรับ pfCA_F (418) และ pfCA_R (418) ใช้ภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 66 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที, 30 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส และสำหรับ pfCA_F (235) และ pfCA_R (235) ใช้ภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 30 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

3.9.2 ทำไลเกชันดีเอ็นเอ *pfCA* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) และ *pfCA* (235) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.2 แล้วมาเติม dATP ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.17 จากนั้นไลเกชันเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 3.4) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.18 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตารางที่ 3.17 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* ก่อนไลเกชัน

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
Taq DNA polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.5
dATP	2 มิลลิโมลาร์	1
10x buffer	10 เท่า	1
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418), (235)	-	7.5
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

ตารางที่ 3.18 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
pGEM T-Easy เวคเตอร์	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	1
T4 DNA ligase	3 เวสยูนิต/ไมโครลิตร	1
2X Rapid Ligation Buffer	2 เท่า	5
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	-
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) หรือ *pfCA* (235) ที่เติม dATP แล้ว	-	3
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.3 จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.4 นำ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag), pGEM T-Easy/pfCA235 (C-Flag) และ pYES2 (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3.10 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.19 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

ตารางที่ 3.19 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) **หรือ** pGEM T-Easy/pfCA235 (C-Flag) **หรือ** pYES2

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (µl)**	**ส่วนประกอบ**	**ปริมาตร (µl)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	32	น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	32	-
10X NEBuffer 3	5	10X NEBuffer 3	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	100X BSA	0.5	1 เท่า
pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag), pGEM T-Easy/pfCA235 (C-Flag)	10	pYES2	10	4 ไมโครกรัม
*Bam*H I	2	*Bam*H I	2	5 ยูนิต
Xho I	0.5	*Xho* I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	**ปริมาตรสุทธิ**	**50**	-

3.9.3 ทำไลเกชันชิ้นส่วน *pfCA* เข้าเอกเพรสชันเวคเตอร์ (pYES2) และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้อ 3.6.2 ดังนั้นจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418), *pfCA* (235) และ pYES2 เวคเตอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) และ *pfCA* (235) เชื่อมต่อเข้ากับบริเวณตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของเอกเพรสชันเวคเตอร์ pYES2 เวคเตอร์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.20 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 10 นาที

อัตราส่วนการไลเกชันระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) หรือ *pfCA* (235) หรือ pYES2 เป็น 3 ต่อ 1 หรือ 7 ต่อ 1 ตามลำดับซึ่งมีสูตรคำนวณปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำเข้า (นาโนกรัม) ตามสมการดังข้อ 3.8.2

ตารางที่ 3.20 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) หรือ *pfCA* (235) เข้า pYES2 เวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
pYES2 เวคเตอร์	50 นาโนกรัม	2
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) หรือ *pfCA* (235)	64 และ 86 นาโนกรัม (pYES2) ตามลำดับ	2.1 หรือ 2.8
5X Rapid Ligation Buffer	1 เท่า	4
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	10.9 หรือ 10.2
T4 DNA ligase	5 ยูนิต	1
ปริมาตรสุทธิ	-	**20**

ขั้นตอนการทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทำตามรายละเอียดที่ได้ระบุในข้อ 3.8.3 จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้างต้นข้อ 3.6.4 นำ pYES2/pfCA418 (C-Flag) หรือ pYES2/pfCA235 (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ตามลำดับ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.21 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore

ตารางที่ 3.21 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pYES2/pfCA418 (C-Flag) หรือ pYES2/pfCA235 (C-Flag)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	37	-
10X NEBuffer 3	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	1 เท่า
pYES2/pfCA418 (C-Flag) หรือ pYES2/pfCA235 (C-Flag)	5	1 ไมโครกรัม
*Bam*H I	2	5 ยูนิต
Xho I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	-

3.10 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมนุษย์ (*hCAII*)

3.10.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *hCAII* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวทำได้โดยนำ cDNA ของมนุษย์ซึ่งได้รับมาจาก ศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ซึ่งใช้ cDNA ของมนุษย์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ hCAII_F (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *hCAII* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์เชื่อมต่อกับ Kozak sequence และรีเวิร์สไพรเมอร์ hCAII_R (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *hCAII* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho* I และติด Flag Tag ก่อนบริเวณ Stop codon ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR จะมีลักษณะเป็นดังภาพที่ 3.14

ภาพที่ 3.14 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ cDNA ของมนุษย์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (hCAII_F, hCAII_R) ที่จำเพาะต่อยีน *hCAII*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ cDNA ของมนุษย์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.5 โดยใช้สภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

3.10.2 ทำไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.2 แล้วมาเติม dATP ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.22 จากนั้นทำไลเกชันเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 3.4) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.23 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน อัตราส่วนการไลเกชันระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* และ pGEM T-Easy เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1 ซึ่งมีสูตรคำนวณปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำเข้า (นาโนกรัม) ตามสมการดังข้อ 3.8.2

ตารางที่ 3.22 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับ *hCAII* ก่อนไลเกชัน

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
Taq DNA polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.5
dATP	2 มิลลิโมลาร์	1
10x buffer	10 เท่า	1
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII*	-	7.5
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

ตารางที่ 3.23 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
pGEM T-Easy เวคเตอร์	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	1
T4 DNA ligase	3 เวสยูนิต/ไมโครลิตร	1
2X Rapid Ligation Buffer	2 เท่า	5
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	-
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* ที่เติม dATP	-	3
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.3 จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.4 นำ pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag) และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3.11 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.24 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

ตารางที่ 3.24 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag)

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (µl)**	**ส่วนประกอบ**	**ปริมาตร (µl)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	33.75	น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	33.75	-
10X NEBuffer *EcoR* I	5	10X NEBuffer *EcoR* I	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	100X BSA	0.5	1 เท่า
pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag)	10	pENTR™3C	10	4 ไมโครกรัม
EcoR I	0.25	*EcoR* I	0.25	5 ยูนิต
Xho I	0.5	*Xho* I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	**ปริมาตรสุทธิ**	**50**	-

3.10.3 ทำไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* เข้าเอนทรีเวคเตอร์ (pENTR™3C Dual Selection) และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้อ 3.6.2 เพราะฉะนั้นจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* เชื่อมต่อเข้ากับเอนทรีเวคเตอร์ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.25 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 10 นาที อัตราส่วนการไลเกชันระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1 ซึ่งคำนวณปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำเข้า (นาโนกรัม) ตามสูตรในข้อ 3.8.2

ตารางที่ 3.25 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชัน *hCAII* เข้า pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
pENTR™3C เวคเตอร์	50 นาโนกรัม	2
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII*	54 นาโนกรัม (pENTR™3C)	2.7
5X Rapid Ligation Buffer	1 เท่า	4
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	10.3
T4 DNA ligase	5 ยูนิต	1
ปริมาตรสุทธิ	-	**20**

ขั้นตอนการทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทำตามรายละเอียดที่ได้ระบุในข้อ 3.8.3 จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้างต้นข้อ 3.6.4 นำ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.26 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

ตารางที่ 3.26 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pENTR™3C/hCAII (C-Flag)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	38.75	-
10X NEBuffer *EcoR* I	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	1 เท่า
pENTR™3C/hCAII (C-Flag)	5	1 ไมโครกรัม
EcoR I	0.25	5 ยูนิต
Xho I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	-

3.10.4 ทำ LR รีคอมบิเนชัน *hCAII* เข้าเดสทิเนชันเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA **หรือ** pAG414GAL-ccdB-HA **และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

นำ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) มาทำ LR รีคอมบิเนชันกับเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA (Addgene, USA) ตามภาพที่ 3.12 ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.27 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที การทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทำตามรายละเอียดที่ได้ระบุในข้อ 3.8.4

ตารางที่ 3.27 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชันของ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) กับ pAG414GPD หรือ GAL-ccdB-HA

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
TE บัฟเฟอร์, pH 8.0	-	4
pENTR™3C/hCAII (C-Flag)	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
pAG414GPD-ccdB-HA หรือ pAG414GAL-ccdB-HA	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
LR Clonase™ II Enzyme Mix	-	2
ปริมาตรสุทธิ	-	10

หมายเหตุ ก่อนนำ LR Clonase™ II Enzyme Mix มาใช้ให้เขย่าให้เข้ากัน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 วินาที และหลังผสมสารละลายทั้งหมดแล้วให้เขย่าให้เข้ากัน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 วินาที เซนทริฟิวจ์ให้สารละลายตกลงแล้วจึงนำไปบ่ม

สกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้างต้นข้อ 3.6.4 นำ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.28 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 จากนั้นนำพลาส-มิดที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore

ตารางที่ 3.28 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) หรือ pAG414GAL/hCAII (C-Flag)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	39	-
10X NEBuffer 4	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	1 เท่า
pAG414GPD/hCAII (C-Flag) หรือ pAG414GAL/hCAII (C-Flag)	5	1 ไมโครกรัม
Xho I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	-

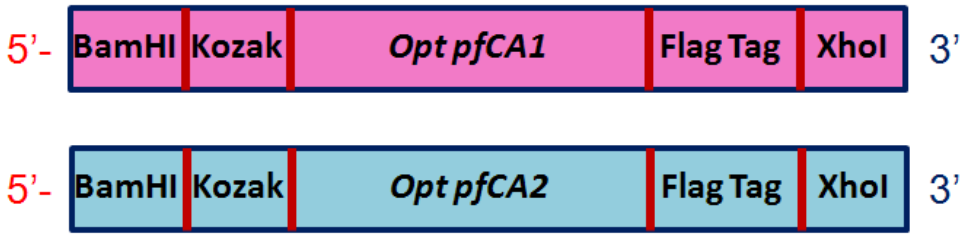
3.11 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* โดยสังเคราะห์ยีนให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์ (*Opt pfCA*)

3.11.1 ทำไลเกชันยีน *Opt pfCA* เข้าเอกเพรสชันเวคเตอร์ (pYES2) กับ เอนทรีเวคเตอร์ (pENTR™3C Dual Selection) และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เนื่องจากยีนในมาลาเรียโดยทั่วไปจะมีการแสดงออกในแบคทีเรียหรือยีสต์ต่ำหรืออาจไม่มีการแสดงออกเลย สาเหตุหลักมาจากการที่ยีนของมาลาเรียมีร้อยละของเบส A หรือ T สูง ซึ่งส่งผลให้อาจเกิดลำดับเบสที่เป็นสัญญาณของการหยุดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ทำให้ยีนนั้นไม่เกิดการแสดงออก และส่งผลให้ไม่เกิดการทดแทนหน้าที่ได้ (Romanos และคณะ, 1992) ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ทำการปรับแต่งเบสของยีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมาลาเรียให้เหมาะสมและเพิ่มการแสดงออกในยีสต์ โดยยังคงไว้ซึ่งกรดอะมิโนเดิมทุกประการ

เริ่มจากนำ pUC57/Opt pfCA1 (C-Flag) และ pUC57/Opt pfCA2 (C-Flag) ซึ่งเป็นยีนสังเคราะห์จากบริษัท GeneScript, USA (ภาคผนวก ค) โดยมีลักษณะของยีนที่สังเคราะห์ดังภาพที่ 3.15 และ pYES2 (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3.10 กับ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3.11 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.29 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1



ภาพที่ 3.15 ผลิตภัณฑ์จากการสังเคราะห์ยีน (GeneScript, USA) **ที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมาลาเรียแบบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ**

ตารางที่ 3.29 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pUC57/Opt pfCA1 (C-Flag), pUC57/Opt pfCA2 (C-Flag), pYES2 **และ** pENTR™3C

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (µl)**	**ส่วนประกอบ**	**ปริมาตร (µl)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	32	น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	32	-
10X NEBuffer 3	5	10X NEBuffer 3	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	100X BSA	0.5	1 เท่า
pUC57/Opt pfCA1 (C-Flag) หรือ pUC57/Opt pfCA2 (C-Flag)	10	pYES2 หรือ pENTR™3C	10	4 ไมโครกรัม
*Bam*H I	2	*Bam*H I	2	5 ยูนิต
Xho I	0.5	*Xho* I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	**ปริมาตรสุทธิ**	**50**	-

สกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้อ 3.6.2 เพราะฉะนั้นจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Opt pfCA1*, *Opt pfCA2*, pYES2 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Opt pfCA1* และ *Opt pfCA2* เชื่อมต่อเข้ากับเอกเพรสชันเวคเตอร์ pYES2 หรือ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.30 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 10 นาที อัตราส่วนการไลเกชันระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Opt pfCA1, Opt pfCA2* และ pYES2 เป็น 7 ต่อ 1 ส่วน pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1 มีสมการคำนวณปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำเข้า (นาโนกรัม) ตามสมการดังข้อ 3.8.2

ตารางที่ 3.30 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชัน *Opt pfCA1* หรือ *Opt pfCA2* เข้า pYES2 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
pYES2 หรือ pENTR™3C เวคเตอร์	50 นาโนกรัม	2
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Opt pfCA1* หรือ *Opt pfCA2*	45 นาโนกรัม (pYES2) หรือ 50 นาโนกรัม (pENTR™3C)	1.8 หรือ 2.0
5X Rapid Ligation Buffer	1 เท่า	4
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	11.2 หรือ 11
T4 DNA ligase	5 ยูนิต	1
ปริมาตรสุทธิ	-	**20**

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8.3 จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.4 นำ pYES2/Opt pfCA1 (C-Flag), pYES2/Opt pfCA2 (C-Flag), pENTR™3C/Opt pfCA1 (C-Flag) และ pENTR™3C/Opt pfCA2 (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.31 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

ตารางที่ 3.31 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pYES2/ Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag) และ pENTR™3C/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	37	-
10X NEBuffer 3	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	1 เท่า
pYES2/Opt pfCA1 หรือ Opt pfCA2 (C-Flag), pENTR™3C/Opt pfCA1 หรือ Opt pfCA2 (C-Flag)	5	1 ไมโครกรัม
*Bam*H I	2	5 ยูนิต
Xho I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	-

3.11.2 ทำ LR รีคอมบิเนชัน *Opt pfCA1* หรือ *Opt pfCA2* เข้าเดสทิเนชันเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pENTR™3C/Opt pfCA1 (C-Flag) และ pENTR™3C/Opt pfCA2 (C-Flag) มาทำ LR รีคอมบิเนชันกับเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA หรือ pAG414GAL-ccdB-HA (Addgene, USA) ตามภาพที่ 3.12 ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.32 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 3.32 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชันของ pENTR™3C/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag) กับ pAG414GPD, GAL-ccdB-HA

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
TE บัฟเฟอร์, pH 8.0	-	4
pENTR™3C/Opt pfCA1 (C-Flag), pENTR™3C/Opt pfCA2 (C-Flag)	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
pAG414GPD-ccdB-HA, pAG414GAL-ccdB-HA	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
LR Clonase™ II Enzyme Mix	-	2
ปริมาตรสุทธิ	-	**10**

หมายเหตุ ก่อนนำ LR Clonase™ II Enzyme Mix มาใช้ให้เขย่าให้เข้ากัน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 วินาที และหลังผสมสารละลายทั้งหมดแล้วให้เขย่าให้เข้ากัน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 วินาที เซนทริฟิวจ์ให้สารละลายตกลงแล้วจึงนำไปบ่ม

ทำการทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าคอมพีเทนต์เซลล์ดังรายละเอียดที่ได้ระบุในหัวข้อ 3.8.4 จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้างต้นข้อ 3.6.4 นำ pAG414GPD/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag) และ pAG414GAL/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.33 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore

ตารางที่ 3.33 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag) **และ** pAG414GAL/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	39	-
10X NEBuffer 4	5	1 เท่า
100X BSA	0.5	1 เท่า
pAG414GPD/Opt pfCA1 หรือ Opt pfCA2 (C-Flag) หรือ pAG414GAL/Opt pfCA1 หรือ Opt pfCA2 (C-Flag)	5	1 ไมโครกรัม
Xho I	0.5	5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	**50**	-

3.12 ศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์ Δ*nce103* และผลของการทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* โดยยีน *pfCA* และ *hCAII* ตามลำดับ

3.12.1 ศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์ Δ*nce103* ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เทียบกับสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20

นำยีสต์สายพันธุ์ BP-9 และ BP-15 (ตารางที่ 3.1) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง synthetic dextrose (SD) ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-9 และ BP-15 (ภาคผนวก ก) โดยใช้ไม้จิ้มฟันขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เทียบกับสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เป็นเวลา 3-4 วัน ดูผลของการเจริญที่เกิดขึ้นโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ BP-9 เป็นชุดควบคุมผลบวก

3.12.2 ศึกษาผลของการทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* โดยยีน *pfCA* และ *hCAII* ตามลำดับ

นำยีสต์สายพันธุ์ BP-15 (ตารางที่ 3.1) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 ข้ามคืน จากนั้นนำ PYES2, pAG414GPD-ccdB-HA, pAG414GAL-ccdB-HA, pYES2/NCE103 (C-Flag), pYES2/NCE103 (N-Flag), pYES2/NCE103, pAG414GPD/NCE103 (C-Flag), pAG414GAL/NCE103 (C-Flag), pYES2/pfCA418 (C-Flag), pYES2/pfCA235 (C-Flag), pYES2/Opt pfCA1 (C-Flag), pYES2/Opt pfCA2 (C-Flag), pAG414GPD/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag), pAG414GAL/Opt pfCA1, Opt pfCA2 (C-Flag), pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag) มาชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ BP-15 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) (Gietz และคณะ, 1995) แต่ดัดแปลงไปจากเดิม โดยนำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงข้ามคืนมานับจำนวน จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเป็น 2 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อ ใส่ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีอีกครั้งเพื่อแยกเซลล์ เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติม 0.1 โมลาร์ LiAc ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และถ่ายใส่หลอดไมโครฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วย LiAc ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ระหว่างที่ปั่นแยกเซลล์ให้บ่ม carrier DNA (ภาคผนวก ข) ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการแช่ในน้ำแข็งทันที ถ่ายเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ใส่หลอดไมโคฟิวจ์หลอดละ 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ที่ได้โดยการเติมร้อยละ 50 ของ PEG MW 3,350 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร, LiAc เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 36 ไมโครลิตร carrier DNA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตรและดีเอ็นเอที่ต้องการชักนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านปริมาณ 1 ไมโครกรัม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามลำดับผสมเข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีตามลำดับ นำมาปั่นเพื่อแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที แล้วดูดส่วนน้ำใสออก ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 150 ไมโครลิตร และนำเซลล์มาเกลี่ยในอาหาร synthetic dextrose (SD) medium ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 แต่

ไม่เติมยูราซิล (SD-Ura) สำหรับบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pYES2 และไม่เติมทริปโตเฟน (SD-Trp) สำหรับบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับเอกเพรสชันพลาสมิดชนิดต่างๆ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20 เป็นเวลา 3-4 วัน ซึ่งยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำทรานสฟอร์แมนท์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง synthetic dextrose ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 แต่ไม่เติมทริปโตเฟน (SD-Trp) สำหรับบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ synthetic galactose ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 แต่ไม่เติมทริปโตเฟน (SG-Trp) (ภาคผนวก ก) สำหรับบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pAG414GAL-ccdB-HA และ synthetic galactose ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 แต่ไม่เติมยูราซิล (SG-Ura) (ภาคผนวก ก) สำหรับบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pYES2 โดยทำการเตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 10^6 – 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์แล้วทำการปั๊มลงบนอาหารแข็งชนิดต่างๆข้างต้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เทียบกับสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เป็นเวลา 5 วัน ดูผลของการเจริญที่เกิดขึ้นโดยใช้เวคเตอร์ pYES2 หรือ pAG414GPD-ccdB-HA หรือ pAG414GAL-ccdB-HA เป็นชุดควบคุมผลลบ

3.13 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Nce103, pfCA และ hCAII ในยีสต์กลายพันธุ์ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

3.13.1 การสกัดโปรตีนสำหรับวิเคราะห์โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

นำยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จากข้อ 3.12.2 มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง synthetic dextrose ที่ไม่เติมทริปโตเฟน (SD-Trp) สำหรับบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ synthetic galactose ที่ไม่เติมยูราซิล (SG-Ura) (ภาคผนวก ก) สำหรับบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pYES2 นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 และภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำปลอด

เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ใช้นิ้วเคาะหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เบาๆ ให้ตะกอนเซลล์กระจาย ปั่นล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ปั่นล้างด้วย buffer A (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง เติม buffer B (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20-80 ไมโครลิตรทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.13.2 **การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี** Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ protein assay kit ของบริษัท PIERCE ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ เตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน A:B = 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA และสารตัวอย่าง โดยทำการเจือจางสารมาตรฐาน BSA 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรด้วยน้ำปลอดประจุในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ซึ่งจะเจือจางลง 2 เท่าด้วยน้ำปลอดประจุทำให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0 31.25 62.5 125 250 500 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเข้มข้น 1:10 จำนวน 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ (ทำสองหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง) เติม working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่างหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม เบาๆประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง microplate reader

3.13.3 **การแยกโปรตีนโดยวิธี** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมเจล SDS-polyacrylamide gel ขนาด 8.3 x 8.3 เซนติเมตร หนา 1.5 มิลลิเมตร โดย separating gel และ stacking gel ใช้ acrylamide ความเข้มข้น 12% และ 5% ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) เตรียมตัวอย่างทดสอบปริมาณ 50 ไมโครกรัม โดยปรับให้มีปริมาตร 15 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ เติม staining buffer 15 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน หยอดสารละลายโปรตีนแต่ละตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในช่อง SDS-polyacrylamide gel ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ใน Western blot running buffer (ภาคผนวก ข) โดยใช้ชุดเครื่องมือ Protein III System ของบริษัท Bio-Rad, USA

3.13.4 **การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลไปยัง** polyvinylidine fluoride (PVDF) membrane

หลังจากแยกโปรตีนด้วยวิธีข้างต้นแล้ว ตัดบริเวณ stacking gel ทิ้ง วัดขนาดของเจล นำเจลไปแช่ใน transfer buffer (ภาคผนวก ข) วางบนเครื่องเขย่าประมาณ 5 นาที ตัดกระดาษกรองและ PVDF membrane ให้มีขนาดเท่ากับเจลจำนวน 6 แผ่น และ 1 แผ่นตามลำดับ นำแผ่น PVDF membrane แช่ในเมทานอลสัมบูรณ์ (absolute methanol) ให้ซึมทั่วทั้งแผ่น ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ 2 ครั้ง แล้วนำมาแช่ใน transfer buffer จากนั้นนำกระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น PVDF membrane เจล และ กระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น วางบนเครื่อง Semi-dry transfer apparatus ตามลำดับ ทำการไล่ฟองอากาศโดยกลิ้งหลอดแก้วบนกระดาษกรอง และ PVDF membrane เบาๆ 3 ครั้งไปในทิศทางเดียวกัน หยด transfer buffer ปริมาตรเพียงเล็กน้อย ปิดฝาเครื่อง semi-dry Western blot ทำการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 80 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาที ต่อเจลหนึ่งแผ่น

3.13.5 การวิเคราะห์การแสดงออกโดยวิธีเวสเทิร์นบลอตโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Flag tag และ แอคติน

ปิดสวิตซ์ power supply ของเครื่อง semi-dry Western blot จากนั้นเปิดฝาเครื่องแกะ PVDF membrane มาแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง นำมาแช่ในแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบซึ่งเจือจางใน blocking solution (ภาคผนวก ข) ตามตารางที่ 3.4 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที นำ PVDF ออกจากสารละลายแอนติบอดีปฐมภูมิ ล้าง PVDF membrane ด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 2 ครั้ง เท PBST ทิ้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่มี Horse-radish peroxidase ติดฉลากอยู่ ซึ่งเจือจางใน blocking solution ตามตารางที่ 3.4 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที ล้าง PVDF membrane ด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 3 ครั้ง

3.13.6 การตรวจสัญญาณด้วยวิธี chemiluminescence และ การทำให้เกิดสัญญาณบนแผ่นฟิลม์ X-ray

เตรียมซับสเตรตของ Horse-radish peroxidase โดยใช้ ECL Western Blot Reagent โดยผสมรีเอเจนต์ 1 กับ รีเอเจนต์ 2 ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) นำ PVDF membrane แช่ลงไปในซับสเตรต นาน 1 นาที ใช้ปากคีบคีบเมมเบรนวางลงบนพลาสติกใส (wrap membrane) และปิดทับเมมเบรน ใช้กรรไกรตัดพลาสติกใสให้ห่างจากเมนเบรนเล็กน้อย นำไปวางบนถาดประกบฟิล์ม ใช้เทปกาวติดทั้งสี่มุม ปิดฝาถาด นำไปประกบฟิล์ม X-ray นาน 5 นาที และล้างฟิล์ม X-ray ในห้องมืด

3.14 ศึกษาการแสดงออกของยีน *NCE103*, *pfCA* และ *hCAII* ในยีสต์กลายพันธุ์ โดยวิธี reverse transcription-PCR

3.14.1 การสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

สกัด RNA ด้วยชุดสกัด RNA MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit (EPICENTRE, USA) โดยนำยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จากข้อ 3.12.2 มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง synthetic galactose ที่ไม่เติมทริปโตเฟน (SG-Trp) สำหรับบีรคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pAG414GAL-ccdB-HA และ synthetic galactose ที่ไม่เติมยูราซิล (SG-Ura) (ภาคผนวก ก) สำหรับบีรคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pYES2 นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ใช้นิ้วเคาะหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เบาๆ ให้ตะกอนเซลล์กระจาย ปั่นล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อปลอด RNAase ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง เติม Extraction Reagent for RNA 300 ไมโครลิตรที่ผสม Proteinase K 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารนาน 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม MPC 175 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายทิ้ง เติม DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที เติม 2XT&C 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง เติม MPC 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายทิ้ง เติมร้อยละ 70 เอทานอล ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาที

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอน RNA ด้วยบัฟเฟอร์ TE 20 ไมโครลิตรที่ผสม RNAase inhibitor 0.57 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.14.2 การวัดปริมาณ RNA

นำสารละลาย RNA ที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโต้มิเตอร์ NanoDrop 2000 และใช้บัฟเฟอร์ TE เป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) ความบริสุทธิ์ของ RNA คำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 ค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามี DNA ปนเปื้อนสูง

3.14.3 การสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) โดยรีเวอร์สทรานสคริปเทส

ใช้ RNA ตัวอย่างที่เตรียมได้ตามข้อ 3.14.1 จำนวน 1 ไมโครกรัมต่อปฏิกิริยาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอโดยใส่ในหลอดพีซีอาร์ จากนั้นเติม random hexamer ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอด RNAase จนปริมาตรครบ 12.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารและปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกลงที่ก้นหลอดพีซีอาร์ประมาณ 2-3 วินาที นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler; Perkin Elmer, USA) โดยตั้งอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และ 4 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที นำมาเติม 5X Reverse Transcriptase buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร dNPT mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Ribonuclease inhibitor ความเข้มข้น 40 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารและปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกลงที่ก้นหลอดพีซีอาร์ประมาณ 2-3 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติม Reverse Transcriptase ความเข้มข้น 200 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เก็บรักษาคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

3.14.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอจากข้อ 3.14.3 เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์ c-pfCA_F, c-pfCA_R, c-Opt pfCA1_F, c-Opt pfCA1_R, c-Opt pfCA2_F, c-Opt pfCA2_R, c-NCE_F, c-NCE_R, c-hCAII_F และ c-hCAII_R ตามตารางที่ 3.3 และใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนแอคตินเป็นชุดควบคุมผลบวกโดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.34

ตารางที่ 3.34 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR)

ส่วนประกอบ	**ความเข้มข้น**	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
10X Buffer	10 เท่า	2.5	1 เท่า
dNPT mix	10 มิลลิโมลาร์	0.5	200 ไมโครโมลาร์
Forward primer	10 ไมโครโมลาร์	1.25	0.5 ไมโครโมลาร์
Reverse primer	10 ไมโครโมลาร์	1.25	0.5 ไมโครโมลาร์
Taq DNA polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.2	1 ยูนิต
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	17.3	-
คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ	-	2	100 นาโนกรัม
ปริมาตรสุทธิ	-	25	-

โดยใช้ภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 64 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, 35 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที สำหรับไพร์เมอร์ c-pfCA_F, c-pfCA_R, c-NCE_F, c-NCE_R, c-hCAII_F และ c-hCAII_R เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส และใช้ภาวะ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 49 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, 35 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที สำหรับไพร์เมอร์ c-Opt pfCA1_F, c-Opt pfCA1_R, c-Opt pfCA2_F, c-Opt pfCA2_R เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1

บทที่ 4

ผลการทดลอง

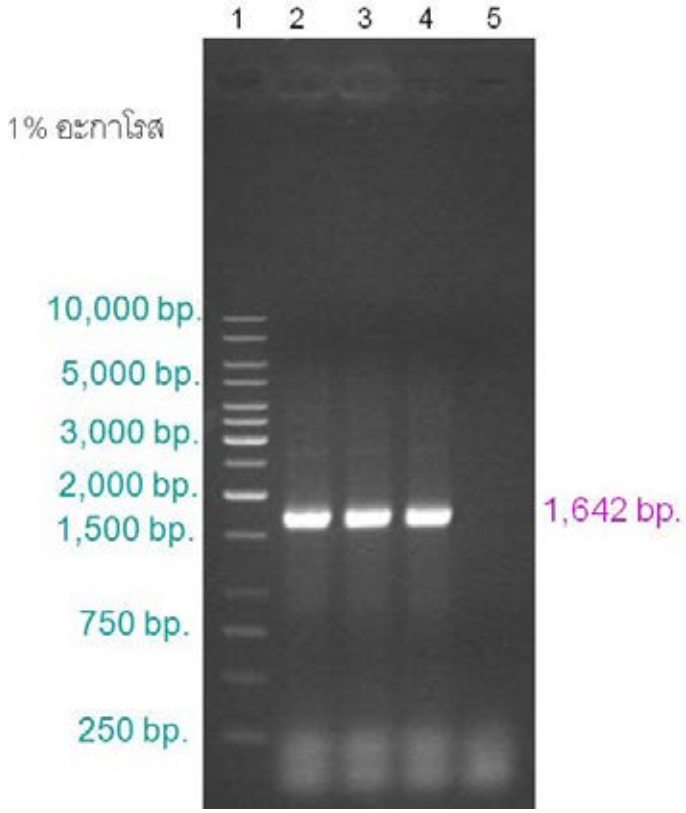
จากการศึกษาของ Krungkrai และคณะ (2008) พบว่าเชื้อมาลาเรียไม่สามารถสังเคราะห์เบสพิวรีนได้ (Purine auxotroph) แต่สามารถสังเคราะห์เบสไพริมิดีนได้ โดยมีเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส (CA) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในขั้นตอนแรกๆ และเอนไซม์ชนิดนี้ยังแตกต่างจากในมนุษย์ด้วย เมื่อยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวผู้ป่วยก็ยังสามารถสังเคราะห์ไพริมิดีนได้จากวิถีการสังเคราะห์อีกวิถีหนึ่ง ซึ่งความแตกต่างนี้ทำให้เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อมาลาเรียน่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญสำหรับการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาโรคมาลาเรียต่อไป ในยีสต์ยังมียีนที่ทำหน้าที่ประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสคือ ยีน *NCE103* ซึ่งเมื่อทำการทำลายยีนนี้จะส่งผลให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย (Δ*nce103*) นี้ไม่สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจน แต่สามารถเจริญได้ในที่ๆขาดออกซิเจน (Clark และคณะ, 2004) และยังได้ศึกษาถึงการทดแทนหน้าที่ของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสโดยใช้เอนไซม์นี้จากสิ่งมีชีวิตอื่นซึ่งได้แก่ CA ของต้นยาสูบ และ CA จากมนุษย์ (hCAII) ซึ่งก็พบว่า CA จากสิ่งมีชีวิตทั้งจากต้นยาสูบและจากมนุษย์สามารถทดแทนการทำหน้าที่ของ CA ในยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ (Clark และคณะ, 2004) ในงานวิจัยนี้จึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า CA จากเชื้อมาลาเรียก็น่าจะสามารถทดแทนการทำหน้าที่ CA ในยีสต์ได้เช่นกัน

4.1 การกลายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการทำลายยีน *NCE103* โดยแทนที่ด้วยยีน *URA3*

4.1.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *loxP-URA3-loxP* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การทำลายยีน *NCE103* โดยใช้ชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* เข้าไปแทนที่ยีน *NCE103* (Carbonic anhydrase-like enzyme) ในโครโมโซมของยีสต์ โดยออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ pUG72 (Euroscarf, Germany ดังภาพที่ 3.1) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบโดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) ประกอบด้วย 41 เบส ของบริเวณด้านปลาย 5’ ของยีน *NCE103* เชื่อมต่อกับ 19 เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 และรีเวิร์สไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) ประกอบด้วย 40 เบส ของบริเวณด้านปลาย 3’ ของยีน *NCE103* เชื่อมต่อกับ 20

เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 ไพร์เมอร์ทั้งสองจะใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *loxP-URA3-loxP* จากตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.0% หลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,642 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* (ดังภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *loxP-URA3-loxP*

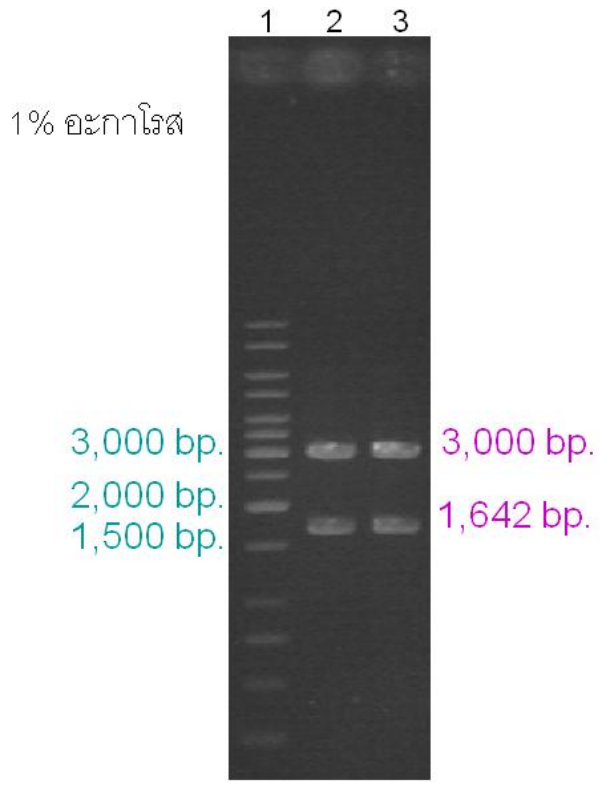
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2-4 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ (Δ*nce103*) ที่จำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP*

5 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ (Δ*nce103*) ที่จำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP*

4.1.2 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP*) **โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

นำ pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,642 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* และ 3,000 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ดังภาพที่ 4.2) เมื่อทำการตรวจสอบลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore พบว่าลำดับเบสมีความถูกต้อง



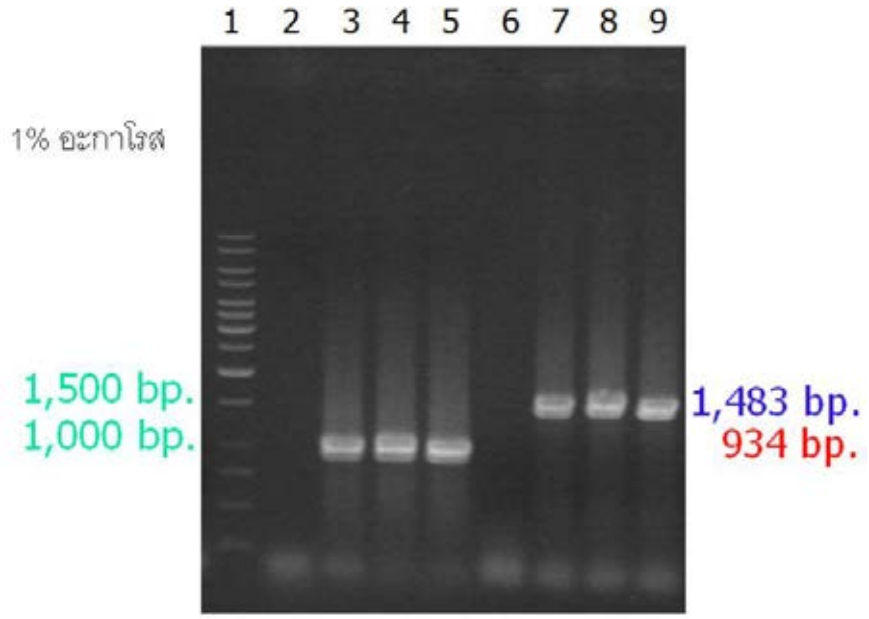
ภาพที่ 4.2 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ของ pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP*

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2-3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *loxP-URA3-loxP* (1,642 bp) และ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (3,000 bp)

4.1.3 ทรานสฟอร์มชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* จากข้อ 4.1.2 เข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ BP-9

นำชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* จากข้อ 4.1.2 มาชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ BP-9 (ตารางที่ 3.1) ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) (Gietz และคณะ, 1995) และนำเซลล์มาเกลี่ยในอาหาร synthetic complete (SC) medium ที่ขาดยูราซิล (SC-Ura) (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับยีน *loxP-URA3-loxP* จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20 เป็นเวลา 3-4 วัน ยืนยันผลการทำลายยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งไพรเมอร์คู่แรกออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ nce103_F1 ที่จำเพาะต่อ upstream regulatory region ของยีน *NCE103* และรีเวิร์สไพรเมอร์ nce103_R1 ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* (ตารางที่ 3.3) ส่วนไพร์เมอร์คู่ที่สองออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ nce103_F2 ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* และรีเวิร์สไพรเมอร์ nce103_R2 ที่จำเพาะต่อ downstream regulatory region ของยีน *NCE103* (ตารางที่ 3.3) ดังภาพที่ 3.5 โดยได้นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์ BP-9 เป็นชุดควบคุมผลลบตามลำดับ ตรวจสอบผลการทำลายยีนจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส โดยถ้าหากทำลายยีน *NCE103* ได้สำเร็จจะได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสทั้งหมด 2 ชิ้นมีขนาด 934 และ 1,483 คู่เบส ตามลำดับ หากทำลายยีน *NCE103* ไม่สำเร็จจะไม่สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ และผลการทดลองที่ได้ พบว่าสามารถทำลายยีนได้สำเร็จโดยได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดตามที่คาดไว้ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *NCE103*

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

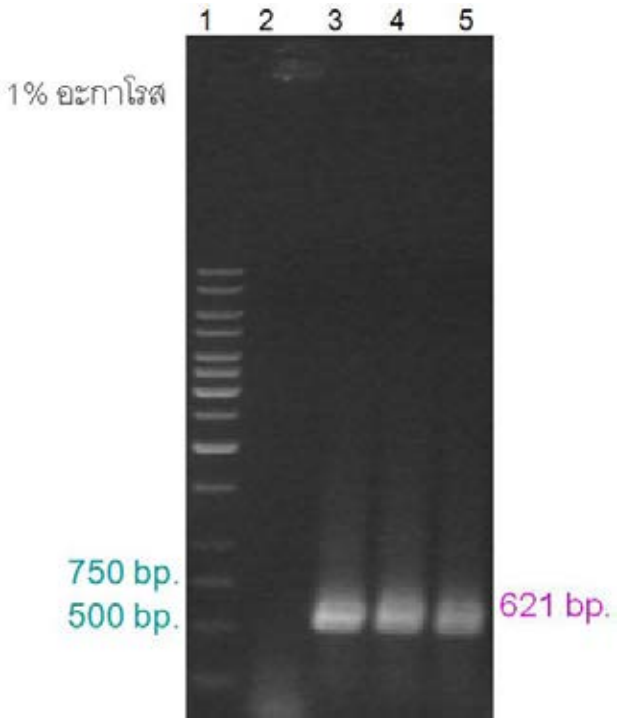
2 และ 6 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพร์เมอร์เมื่อไม่เกิดการทำลายยีน *NCE103*

3-5 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ nce103_F1 และ nce103_R1

7-9 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ nce103_F2 และ nce103_R2

4.1.4 การกำจัดยีน *URA3* ที่เป็นยีนมาร์คเกอร์ซึ่งใช้ในการทำลายยีน *NCE103*

เพื่อนำยีนมาร์คเกอร์ *URA3* กลับมาใช้ใหม่จึงต้องมีการกำจัดยีนมาร์คเกอร์ซึ่งใช้ในการทำลายยีน *NCE103* โดยอาศัยเทคนิค Cre/loxP system (Gueldener และคณะ, 2002) โดยการนำพลาสมิด pSH63 (Euroscarf, Germany ดังภาพที่ 3.6 มีการแสดงออกของยีน Cre recombinase ภายใต้การควบคุมโดย *GAL1* promoter และมีทริปโตเฟนเป็นมาร์คเกอร์) เข้าสู่ยีสต์กลายพันธุ์ BP-12 (ตารางที่ 3.1) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีจากเพลทต้นแบบที่ไม่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร SC-Ura และยืนยันผลการกำจัดยีนโดยใช้วิธีการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.6 และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากการตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ของ *loxP* (621 คู่เบส) ดังภาพที่ 4.4 ดังนั้นยีสต์ดังกล่าว (BP-15) จึงสามารถใช้ยีน *URA3* เป็นยีนมาร์คเกอร์ได้อีกครั้ง



ภาพที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการกำจัดยีน *URA3* ออกจากยีสต์ BP-12

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ nce103_F1 และ nce103_R2

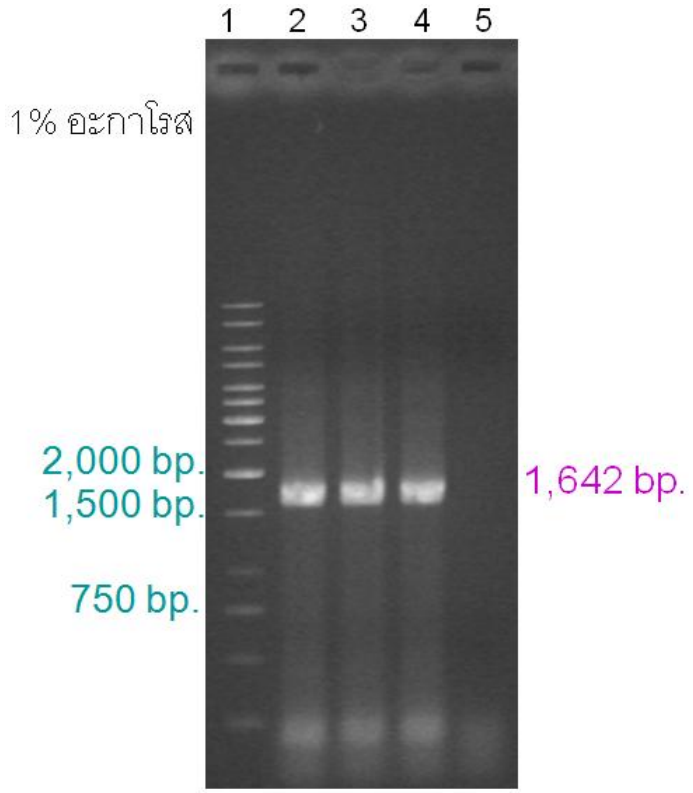
3-5 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ nce103_F1 และ nce103_R2

4.2 การกลายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการทำลายยีน *PDR*5 เพื่อเพิ่มความไวของสารยับยั้งต่อยีสต์

4.2.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *loxP-URA3-loxP* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ยีน *PDR5* (Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter, Pleiotropic Drug Resistance) เป็นยีนประมวลรหัสโปรตีนที่ทำหน้าที่ปั๊มสารออกสู่ภายนอกเซลล์ หากยีสต์ขาดยีน *PDR5* จะส่งผลให้ยีสต์นั้นไม่สามารถขับสารขนาดเล็กออกนอกเซลล์ เซลล์ยีสต์จึงมีความไวต่อสารต่างๆมากขึ้น ในการทดลองนี้ต้องการทำลายยีน *PDR5* โดยใช้ชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* เข้าไปแทนที่ยีน *PDR5* ในโครโมโซมของยีสต์ โดยออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ pUG72

(ดังภาพที่ 3.1) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบโดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ประกอบด้วย 41 เบสของบริเวณด้านปลาย 5’ ของยีน *PDR5* เชื่อมต่อกับ 19 เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 และรีเวิร์สไพรเมอร์ซึ่งประกอบด้วย 38 เบสของบริเวณด้านปลาย 3’ ของยีน *PDR5* เชื่อมต่อกับ 20 เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 ไพร์เมอร์ทั้งสองจะใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *loxP-URA3-loxP* จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสตามวิธีดังกล่าวข้างต้น ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด (Δ*pdr5*) พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,642 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* (ดังภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *URA3*

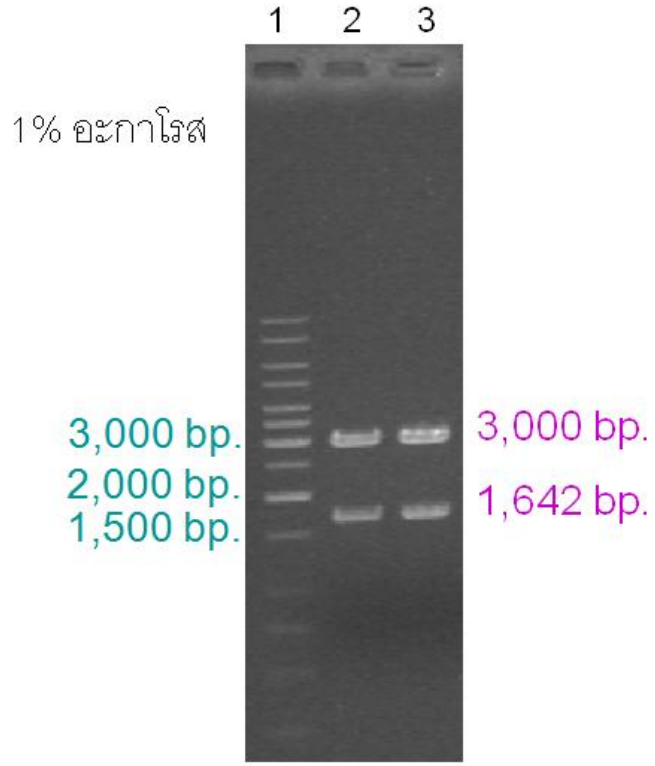
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2-4 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ Δ*pdr5* ที่จำเพาะกับยีน *URA3*

5 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ Δ*pdr5* ที่จำเพาะกับยีน *URA3*

4.2.2 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP*) **โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

นำ pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,642 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* และ 3,000 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ดังภาพที่ 4.6) เมื่อทำการตรวจสอบลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore พบว่าลำดับเบสมีความถูกต้อง



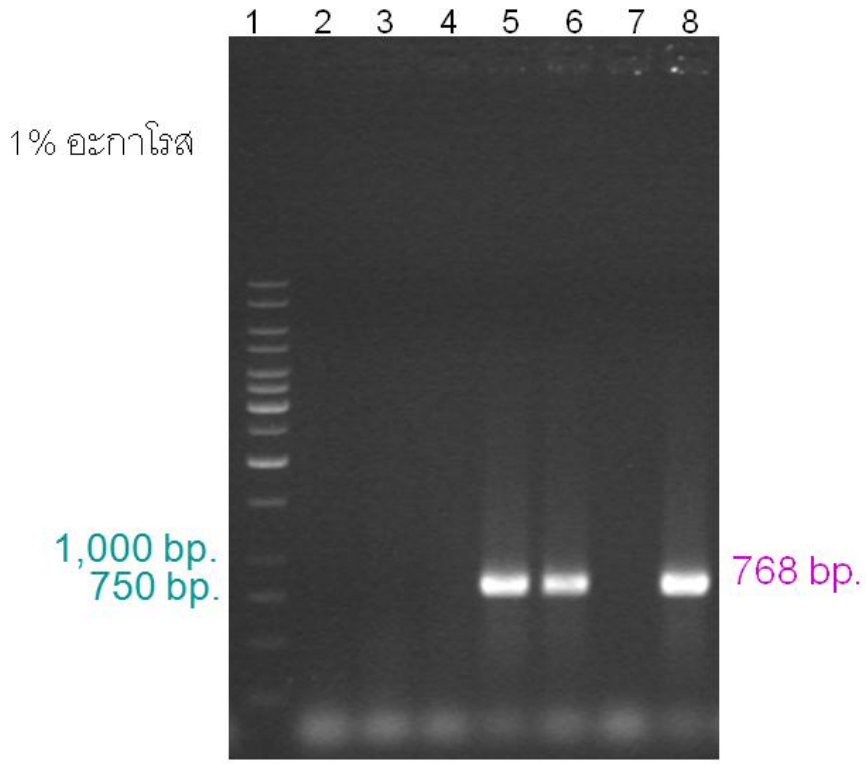
ภาพที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ของ pGEM T-Easy/*loxP-URA3-loxP*

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2-3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *loxP-URA3-loxP* (1,642 bp) และ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (3,000 bp)

4.2.3 นำชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* มาชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ BP-9

นำชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* มาทรานฟอร์มเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ BP-9 ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.6 และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ synthetic complete medium ที่ไม่เติม uracil (SC-Ura) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ยืนยันผลการทำลายยีน *PDR5* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งไพรเมอร์คู่แรกออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ pdr5_F1 ที่จำเพาะต่อ upstream regulatory region ของยีน *PDR5* และรีเวิร์สไพรเมอร์ pdr5_R1 ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* (ตารางที่ 3.3) ส่วนไพร์เมอร์คู่ที่สองออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ pdr5_F2 ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* และรีเวิร์สไพรเมอร์ pdr5_R2 ที่จำเพาะต่อ downstream regulatory region ของยีน *PDR5* (ตารางที่ 3.3) ดังภาพที่ 3.8 ตรวจสอบผลการทำลายยีน *PDR5* โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอยีสต์สายพันธุ์ BP-9 เป็นชุดควบคุมผลลบตามลำดับ จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หากทำลายยีน *PDR5* ได้สำเร็จผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่คาดว่าจะได้ทั้งหมด 2 ชิ้นมีขนาด 768 และ 1,418 คู่เบส ตามลำดับ และจากการตรวจสอบผลการทดลอง พบว่าสามารถทำลายยีนได้สำเร็จโดยสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดตามที่คาดไว้ ดังภาพที่ 4.7 และ 4.8



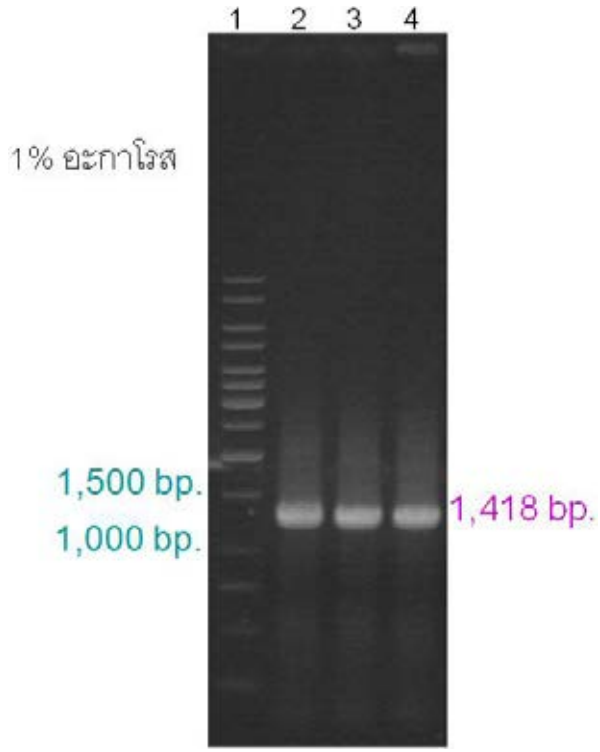
ภาพที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *PDR5* ด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R1

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพร์เมอร์เมื่อไม่เกิดการทำลายยีน *PDR5*

3, 4, 7 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R1 แต่ไม่เกิดการทำลายยีน

5, 6, 8 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R1 เมื่อเกิดการทำลายยีน



ภาพที่ 4.8 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *PDR5* ด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F2 และ pdr5_R2

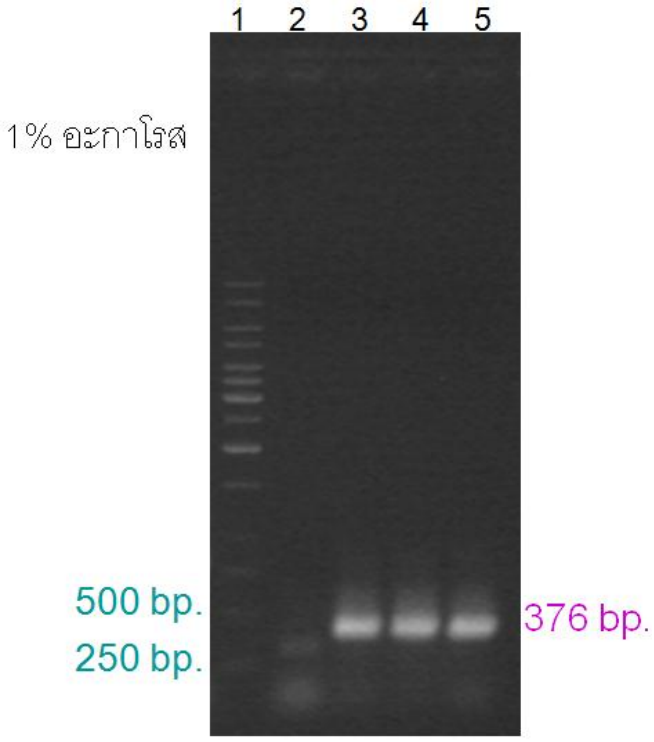
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2-4 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F2 และ pdr5_R2

4.2.4 การกำจัดยีน *URA3* ที่เป็นยีนมาร์คเกอร์ซึ่งใช้ในการทำลายยีน *PDR5*

เพื่อนำยีนมาร์คเกอร์ *URA3* กลับมาใช้ใหม่ในงานวิจัยขั้นต่อไปจึงต้องมีการกำจัดยีนมาร์คเกอร์ซึ่งใช้ในการทำลายยีน *PDR5* ซึ่งได้แทรกอยู่ในโครโมโซมของยีสต์สายพันธุ์ BP-13 โดยอาศัยเทคนิค Cre/loxP system นำพลาสมิด pSH63 (ดังภาพที่ 3.6 มีการแสดงออกของยีน Cre recombinase ภายใต้การควบคุมโดย *GAL1* promoter และมีทริปโตเฟนเป็นมาร์คเกอร์) เข้าสู่ยีสต์กลายพันธุ์ BP-13 (ตารางที่ 3.1) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีจากจานเพาะเชื้อต้นแบบที่ไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ SC-Ura และยืนยันผลการกำจัดยีนโดยใช้วิธีการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.6 และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ของ *loxP* (376 คู่เบส) เกิดขึ้นดังภาพที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่ายีสต์ดังกล่าวได้สูญเสียยีนมาร์คเกอร์ *URA3* ในโครโมโซม

ยีสต์สายพันธุ์ BP-14 ที่ได้ในขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นตอนเพื่อการต่อยอดการสร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *PDR5* และ *NCE103* (สายพันธุ์ BP-17) ตามวิธีข้างต้น



ภาพที่ 4.9 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *URA3*

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

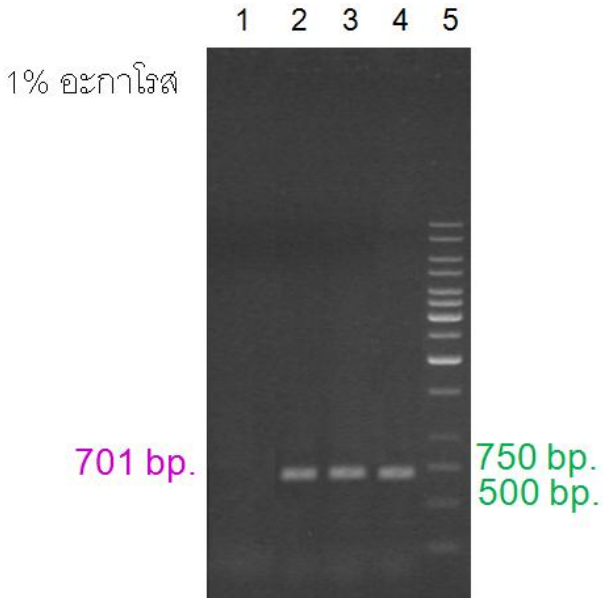
2 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R2

3-5 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R2

4.3 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *S. cerevisiae* (*NCE103*)

4.3.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *NCE103* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ยีน *NCE103* เป็นยีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *S. cerevisiae* ซึ่งมีหน้าที่หลากหลายและเกี่ยวข้องในกระบวนการทางชีวภาพอันได้แก่ กระบวนการหายใจ การสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และไบคาร์บอเนต การรักษาสมดุลของพีเอชและคาร์บอนไดออกไซด์ภายในเซลล์ การเกิดเนื้องอก และกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพต่างๆ เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำกับไบคาร์บอเนตและโปรตอน การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวจากโครโมโซมทำได้โดยสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์สายพันธุ์ W303-1B (ตารางที่ 3.1) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.6 และออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์ W303-1B เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ NCE103_F (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *NCE103* และให้ด้านปลาย 5’ ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Bam*H I เชื่อมต่อกับ Kozak sequence และรีเวิร์สไพรเมอร์ NCE103_R (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *NCE103* และให้ด้านปลาย 5’ ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho* I และติด Flag Tag ก่อนบริเวณ Stop codon จากการตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 701 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *NCE103* ดังภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *NCE103*

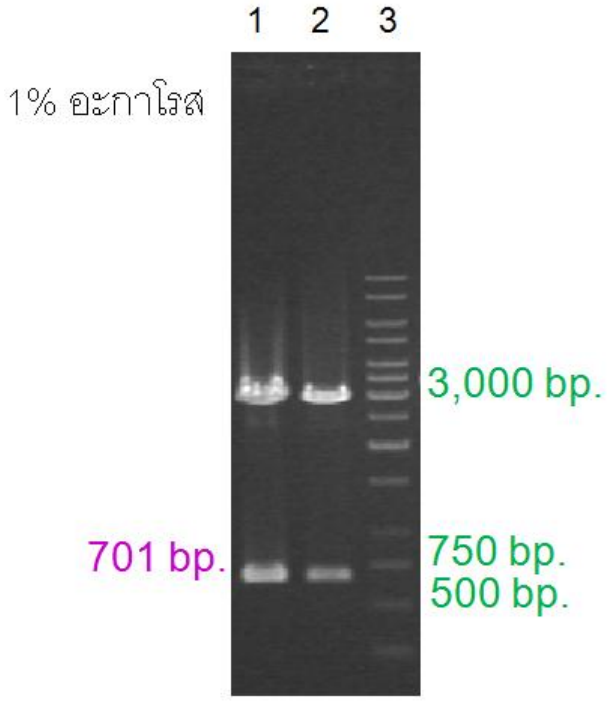
1 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ (NCE103_F, R) ที่จำเพาะกับยีน *NCE103*

2-4 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ (NCE103_F, R) ที่จำเพาะกับยีน *NCE103*

5 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

4.3.2 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag)) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.11 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 701 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *NCE103* และ 3,000 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ ดังภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag))

1-2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *NCE103* (701 bp) และ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (3,000 bp)

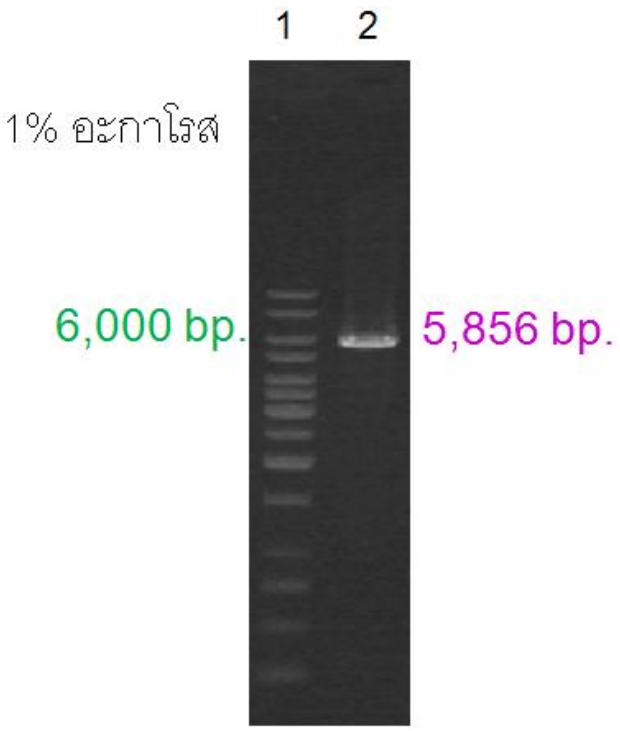
3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

4.3.3 ทำไลเกชันชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เข้าเอกเพรสชันเวคเตอร์ (pYES2) **กับเอนทรีเวคเตอร์** (pENTR™3C Dual Selection) **และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด** (pYES2/NCE103 (C-Flag) **และ** pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)) **โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

นำpYES2 (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3.10 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3.11 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.11 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*, pYES2 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และถูกตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I เชื่อมต่อเข้ากับเอกเพรสชันเวคเตอร์ pYES2 หรือ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.12 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 10 นาที อัตราส่วนการไลเกชันระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* ต่อ pYES2 เป็น 7 ต่อ 1 และสำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* ต่อ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1

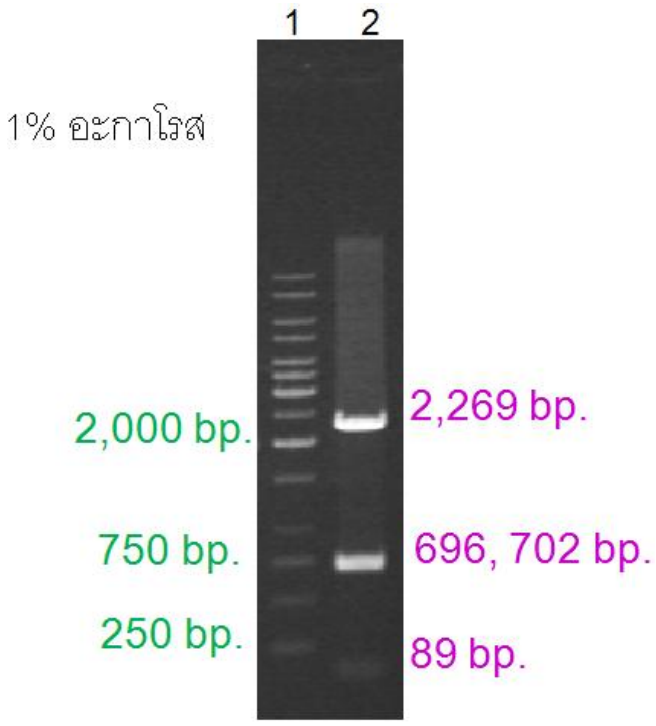
เพราะฉะนั้นจะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด 2 ชนิดคือ pYES2/NCE103 (C-Flag) และ pENTR™3C/ NCE103 (C-Flag) จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.13 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 จากการตรวจสอบพบว่า pYES2 ตัดแล้วได้ชิ้นส่วนขนาด 5,856 คู่เบส (ภาพที่ 4.12) และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ ได้ชิ้นส่วนขนาด 2,269 คู่เบส (ภาพที่ 4.13) ส่วนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2/NCE103 (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 701 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *NCE103* และได้ชิ้นส่วนขนาด 5,856 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของ pYES2 เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.14) และจากการตรวจสอบ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 701 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *NCE103* และ 2,269 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของ pENTR™3C เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4.12 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2 เวคเตอร์

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

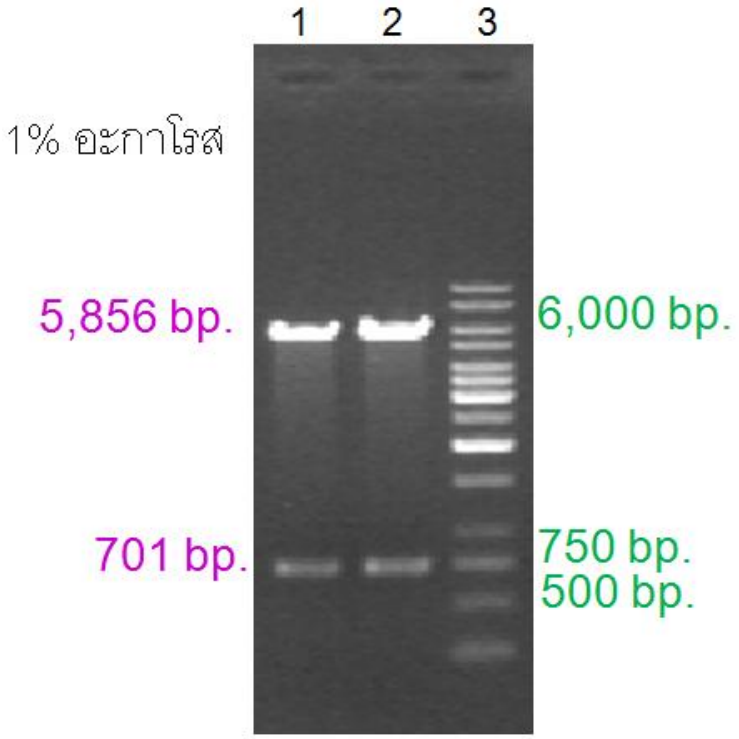
2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pYES2 เวคเตอร์ (5,856 bp)



ภาพที่ 4.13 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

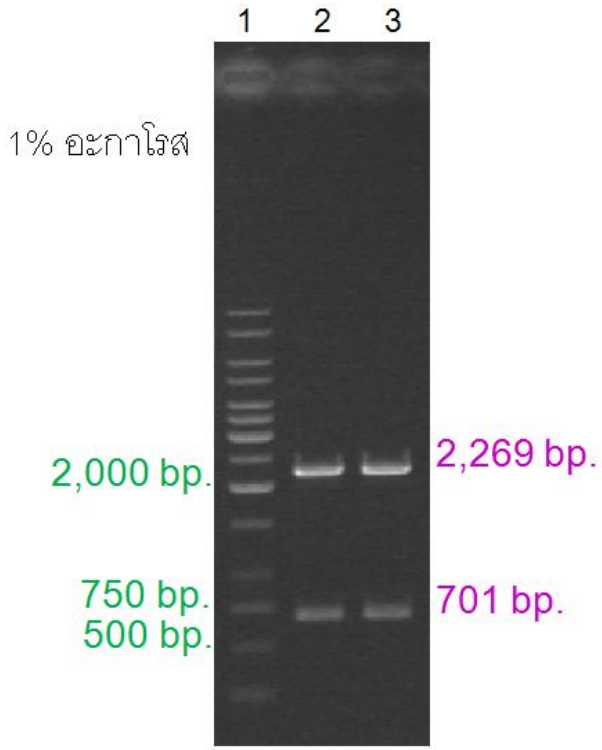
2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (2,269 bp)



ภาพที่ 4.14 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2/NCE103 (C-Flag)

1-2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *NCE103* (701 bp) และ pYES2 เวคเตอร์ (5,856 bp)

3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder



ภาพที่ 4.15 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)

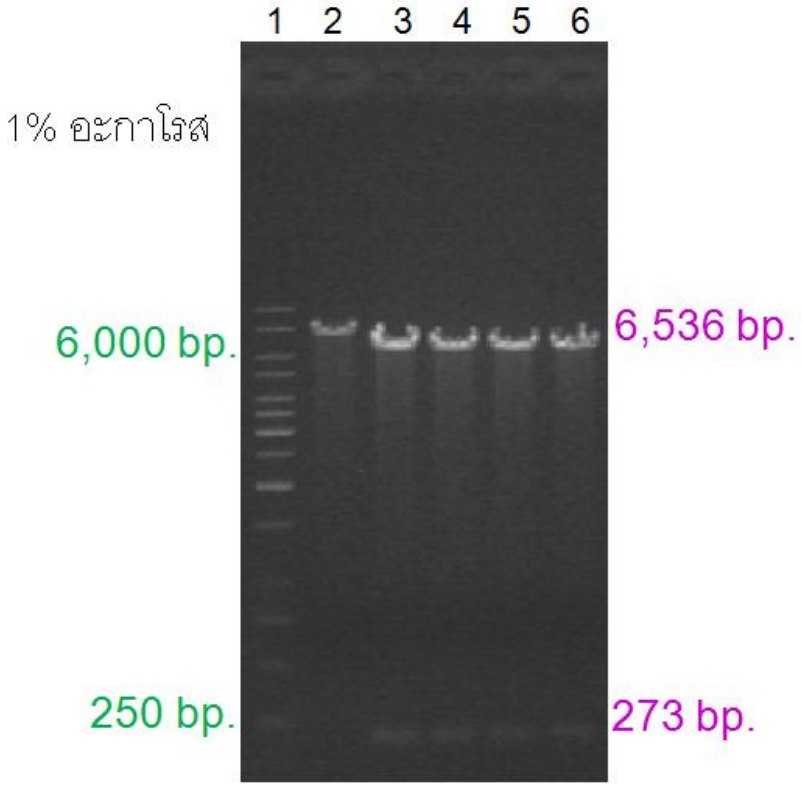
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2-3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *NCE103* (701 bp) และ pENTR™3C เวคเตอร์ (2,269 bp)

4.3.4 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag)) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.15 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.1 จากการตรวจสอบพลาสมิด pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และพลาสมิด pAG414GAL/NCE103 (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 6,536 คู่เบส และ 273 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับการคำนวณตามคาดการณ์ เมื่อมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *NCE103* เข้าไปในเวคเตอร์

ทั้งสอง ดังภาพที่ 4.16 เมื่อทำการตรวจสอบลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore พบว่าลำดับเบสมีความถูกต้อง



ภาพที่ 4.16 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag)

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GPD-ccdB-HA เวคเตอร์

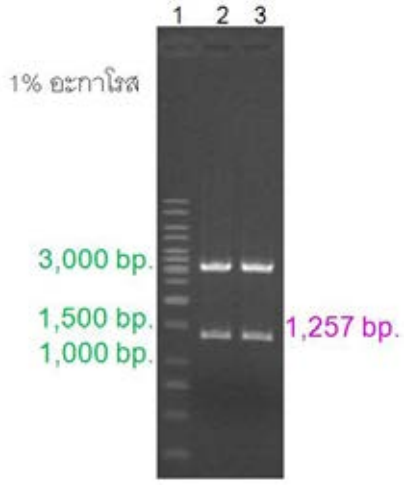
3-4 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากพลาสมิด pAG414GPD/NCE103 (C-Flag)

5-6 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากพลาสมิด pAG414GAL/NCE103 (C-Flag)

4.4 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* (*pfCA*)

4.4.1 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/pfCA) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวทำได้โดยนำ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *P. falciparum* ซึ่งได้รับมาจาก ศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการไลเกชันเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ ได้เป็นพลาสมิด pGEM T-Easy/pfCA จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.16 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบ pGEM T-Easy/pfCA พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,257 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *pfCA* และ 3,000 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.17)



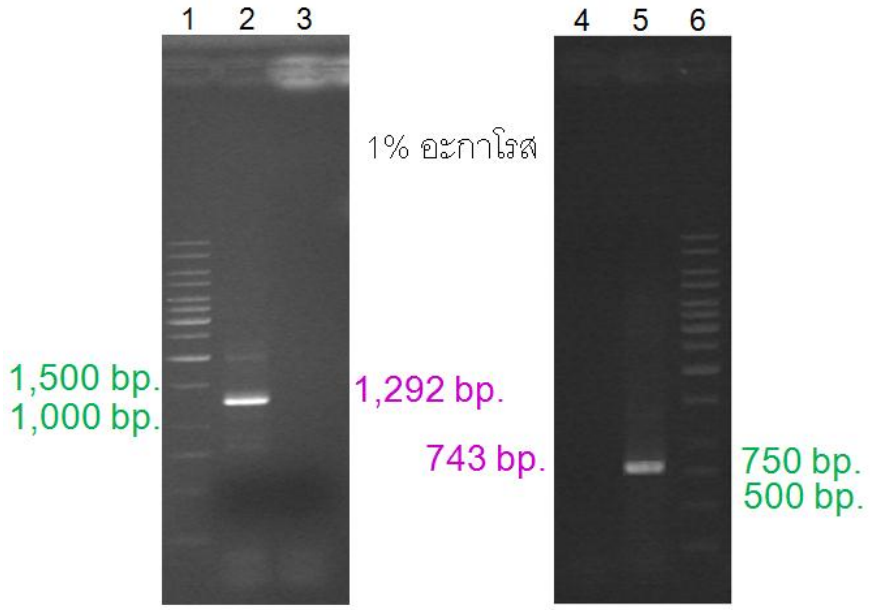
ภาพที่ 4.17 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ของพลาสมิด pGEM T-Easy/pfCA

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2-3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *pfCA* (1,257 bp) และ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (3,000 bp)

4.4.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *pfCA* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ยีน *pfCA* มีขนาด full-length เท่ากับ 1,257 คู่เบส จากงานวิจัยของ ศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวแสดงออกได้น้อยใน *E.coli* แต่เมื่อเป็น *pfCA* แบบ truncated ซึ่งขาดปลายด้าน 5' มีขนาด 708 คู่เบส สามารถแสดงออกได้ดีกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงจะทำการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัส CA ของ *P. falciparum* ทั้งสองขนาด โดยออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ pGEM T-Easy/pfCA เป็นดีเอ็นเอแม่แบบโดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ pfCA_F (418) และ pfCA_F (235) (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *pfCA* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Bam*H I เชื่อมต่อกับ Kozak sequence และรีเวิร์สไพรเมอร์ pfCA_R (418) และ pfCA_R (235) (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *pfCA* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho* I และติด Flag Tag ก่อนบริเวณ Stop codon จากการตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้งสี่ชนิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,292 และ 743 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *pfCA* แบบ full-length และ *pfCA* แบบ truncated ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18)



ภาพที่ 4.18 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *pfCA*

1, 6 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

3 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ (pfCA_F, R (418)) ที่จำเพาะกับยีน *pfCA*

4 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ (pfCA_F, R (235)) ที่จำเพาะกับยีน *pfCA*

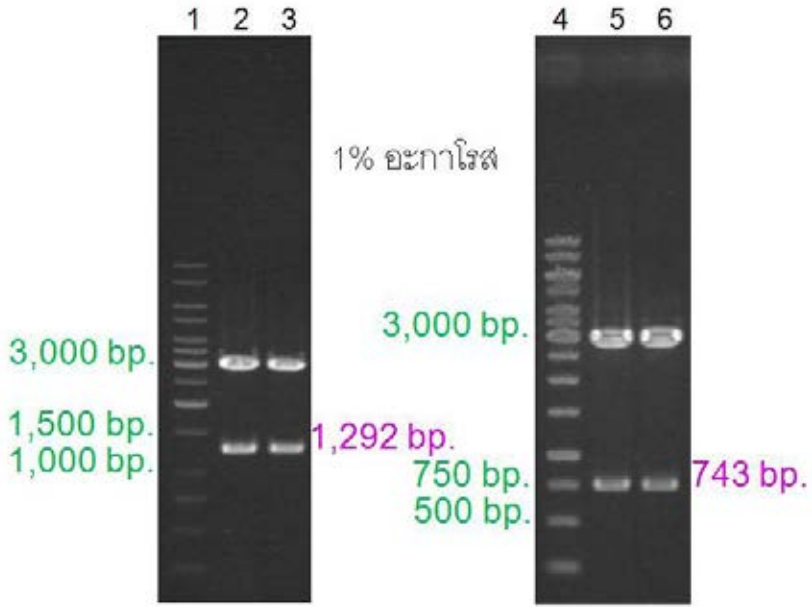
2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณจากการใช้ไพรเมอร์ (pfCA_F, R (418)) ที่จำเพาะกับยีน *pfCA*

5 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณจากการใช้ไพรเมอร์ (pfCA_F, R (235)) ที่จำเพาะกับยีน *pfCA*

4.4.3 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) และ pGEM T-Easy/pfCA235 (C-Flag)) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) และ pGEM T-Easy/pfCA235 (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.19 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

จากการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1,292 และ 743 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *pfCA* (418) และ *pfCA* (235) และ 3,000 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.19 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) และ pGEM T-Easy/pfCA235 (C-Flag)

1, 4 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

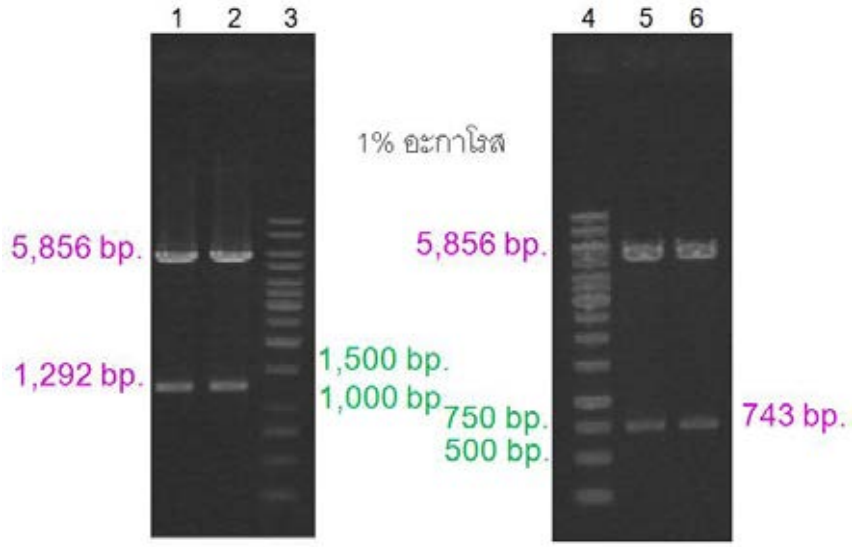
2-3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *pfCA* (418) และ pGEM T-Easy เวคเตอร์

5-6 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *pfCA* (235) และ pGEM T-Easy เวคเตอร์

4.4.4 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pYES2/pfCA418 (C-Flag) และ pYES2/pfCA235 (C-Flag)) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pYES2/pfCA418 (C-Flag) และพลาสมิด pYES2/pfCA235 (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.21 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบ pYES2/pfCA418 (C-Flag) และ pYES2/pfCA235 (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,292 และ 743 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *pfCA* (418)

และ *pfCA* (235) และ 5,856 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของ pYES2 เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.20) เมื่อทำการตรวจสอบลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore พบว่าลำดับเบสมีความถูกต้อง



ภาพที่ 4.20 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของพลาสมิด pYES2/pfCA418 (C-Flag) และพลาสมิด pYES2/pfCA235 (C-Flag)

3, 4 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

1-2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *pfCA* (418) และ pYES2 เวคเตอร์

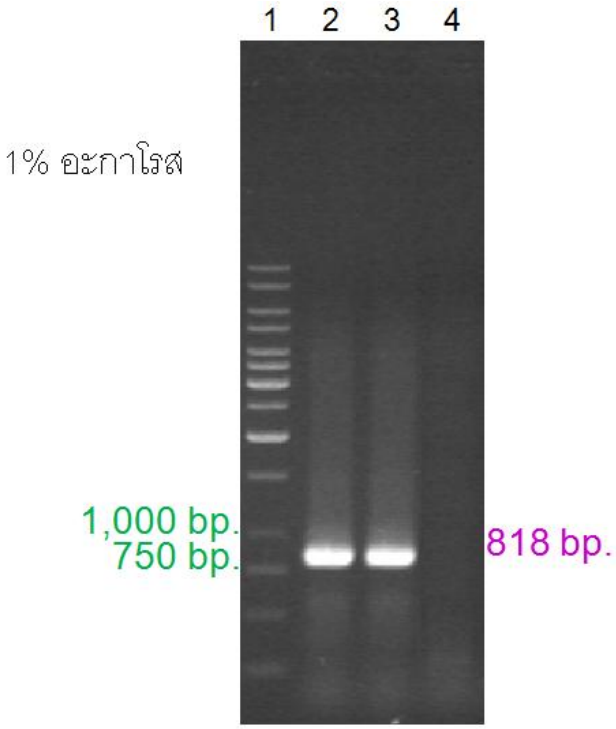
5-6 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *pfCA* (235) และ pYES2 เวคเตอร์

4.5 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมนุษย์ (*hCAII*)

4.5.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *hCAII* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวทำได้โดยนำ cDNA ของมนุษย์ซึ่งได้รับมาจาก ศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ซึ่งใช้ cDNA ของมนุษย์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ hCAII_F (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *hCAII* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์เชื่อมต่อกับ Kozak sequence และรีเวิร์สไพรเมอร์ hCAII_R (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจำเพาะกับยีน *hCAII* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho* I และติด Flag Tag ก่อนบริเวณ Stop codon จากการตรวจสอบผลการทำ

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 818 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *hCAII* (ภาพที่ 4.21)



ภาพที่ 4.21 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *hCAII*

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

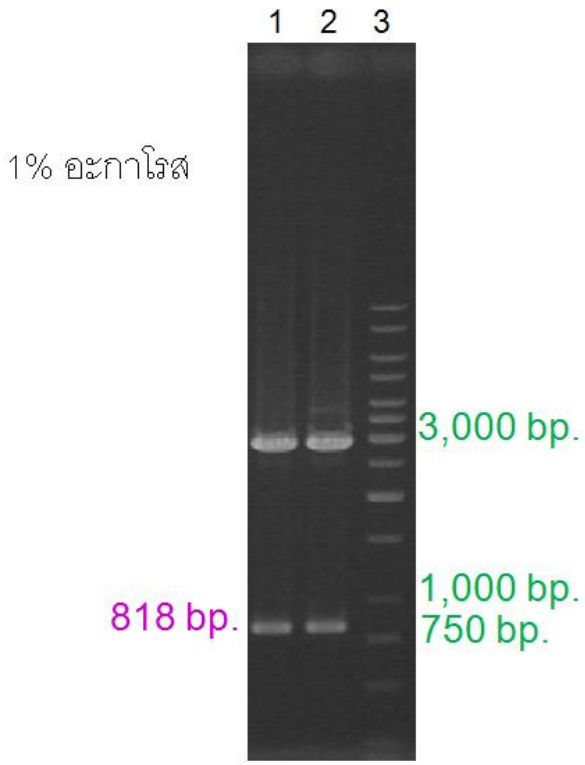
2-3 คือ ดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ (hCAII_F, R) ที่จำเพาะกับยีน *hCAII*

4 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ (hCAII_F, R) ที่จำเพาะกับยีน *hCAII*

4.5.2 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag) และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3.11 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.24 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าได้

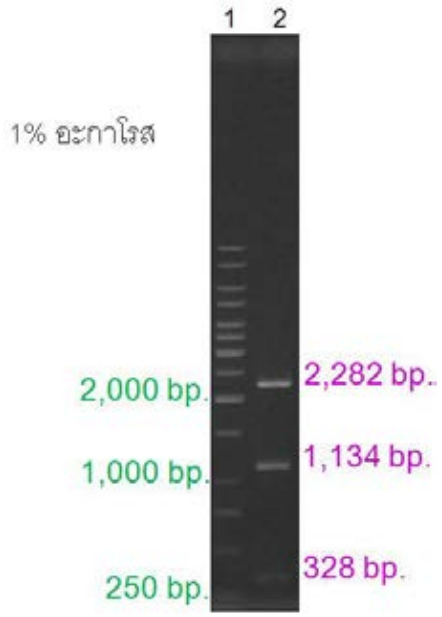
ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 818 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *hCAII* และ 3,000 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.22) ส่วนการตัด pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ พบว่าได้ชิ้นส่วนขนาด 2,282 คู่เบส (ภาพที่ 4.23)



ภาพที่ 4.22 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของพลาสมิด pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag)

1-2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *hCAII* (818 bp) และ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (3,000 bp)

3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder



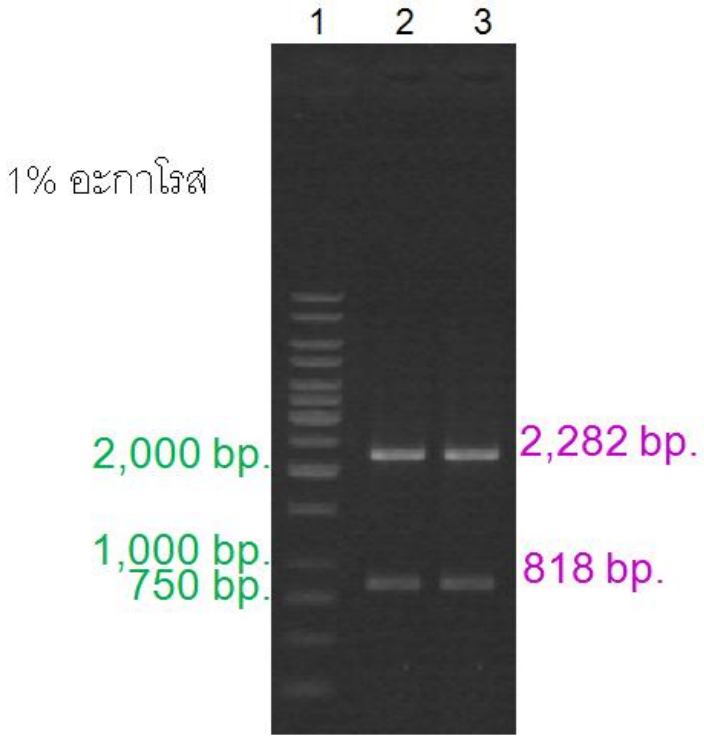
ภาพที่ 4.23 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (2,282 bp)

4.5.3 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pENTR™3C/hCAII (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pENTR™3C/hCAII (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.26 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบพลาสมิด pENTR™3C/hCAII (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 818 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *hCAII* และ 2,282 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของ pENTR™3C เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.24)



ภาพที่ 4.24 ผลิตภัณฑ์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pENTR™3C/hCAII

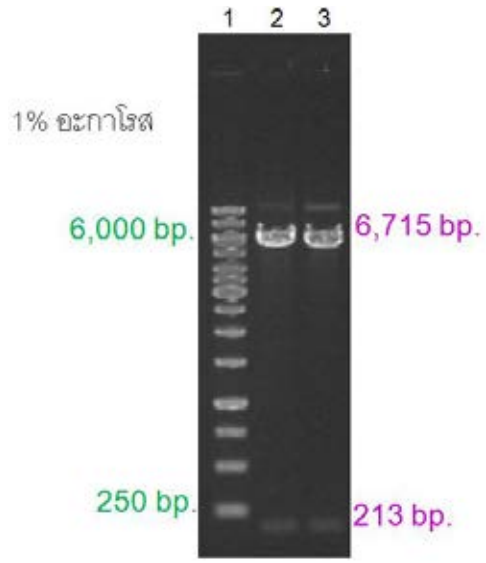
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2-3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *hCAII* (818 bp) และ pENTR™3C เวคเตอร์ (2,282 bp)

4.5.4 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และพลาสมิด pAG414GAL/hCAII (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และพลาสมิด pAG414GAL/hCAII (C-Flag) นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.28 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบพลาสมิด pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และพลาสมิด pAG414GAL/hCAII (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 6,715 คู่เบส และ 213 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับการคำนวณ

ตามคาดการณ์เมื่อมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *hCAII* เข้าไปในเวคเตอร์ทั้งสอง (ภาพที่ 4.25) เมื่อทำการตรวจสอบลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore พบว่าลำดับเบสมีความถูกต้อง



ภาพที่ 4.25 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของพลาสมิด pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และพลาสมิด pAG414GAL/hCAII (C-Flag)

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GPD เวคเตอร์ ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII*

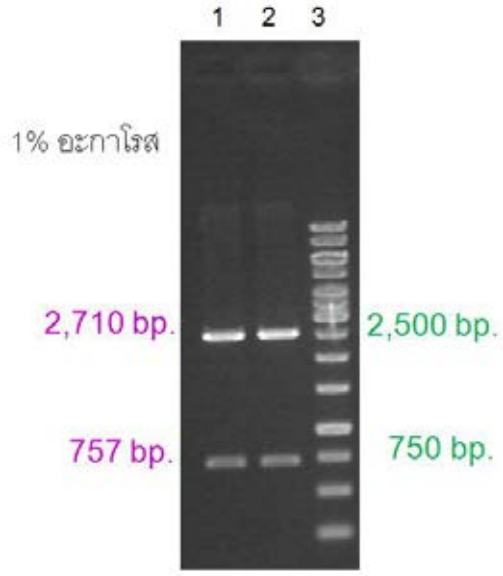
3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GAL เวคเตอร์ ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII*

4.6 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* โดยสังเคราะห์ยีนให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์ (*Opt pfCA*)

4.6.1 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57/Opt pfCA1 (C-Flag) และพลาสมิด pUC57/Opt pfCA2 (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pUC57/Opt pfCA1 (C-Flag) และ pUC57/Opt pfCA2 (C-Flag) ซึ่งได้มาจากการสังเคราะห์ยีนจากบริษัท GeneScript, USA (ภาคผนวก ค) โดยมีลักษณะของยีนที่

สังเคราะห์ดังภาพที่ 3.15 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.29 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 757 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *Opt pfCA1* และ *Opt pfCA2* ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2,710 คู่เบสมีขนาดเท่ากับ pUC57 เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.26)



ภาพที่ 4.26 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของพลาสมิด pUC57/Opt pfCA1 (C-Flag) **และพลาสมิด** pUC57/Opt pfCA2 (C-Flag)

1 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Opt pfCA1* (757 bp) และ pUC57 (2,710 bp)

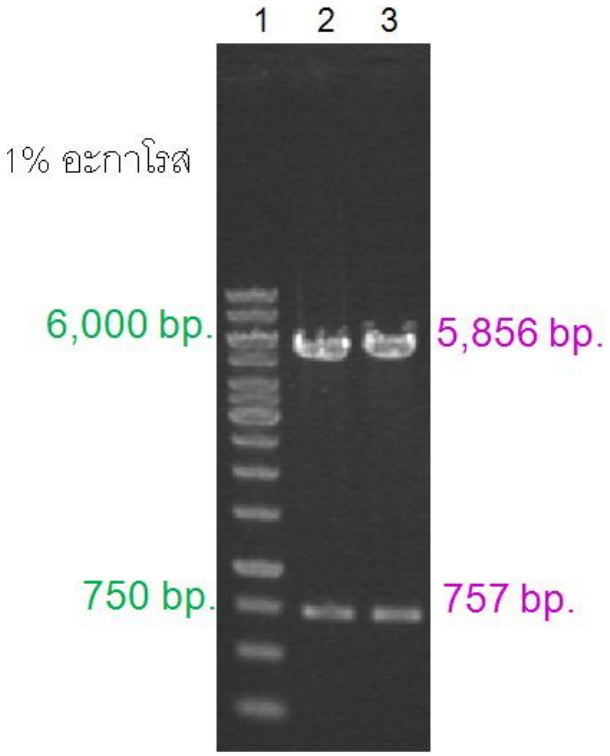
2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Opt pfCA2* (757 bp) และ pUC57 (2,710 bp)

3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

4.6.2 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2/Opt pfCA1 (C-Flag) **พลาสมิด** pYES2/Opt pfCA2 (C-Flag) **พลาสมิด** pENTR™3C/Opt pfCA1 (C-Flag) **และพลาสมิด** pENTR™3C/Opt pfCA2 (C-Flag) **โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

นำพลาสมิด pYES2/Opt pfCA1 (C-Flag) พลาสมิด pYES2/Opt pfCA2 (C-Flag) พลาสมิด pENTR™3C/Opt pfCA1 (C-Flag) และพลาสมิด pENTR™3C/Opt pfCA2 (C-

Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.31 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบบีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 757 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *Opt pfCA1* และ *Opt pfCA2* ส่วน 5,856 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pYES2 เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.27) และพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 757 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *Opt pfCA1* และ *Opt pfCA2* สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2,269 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pENTR™3C เวคเตอร์ (ภาพที่ 4.28)

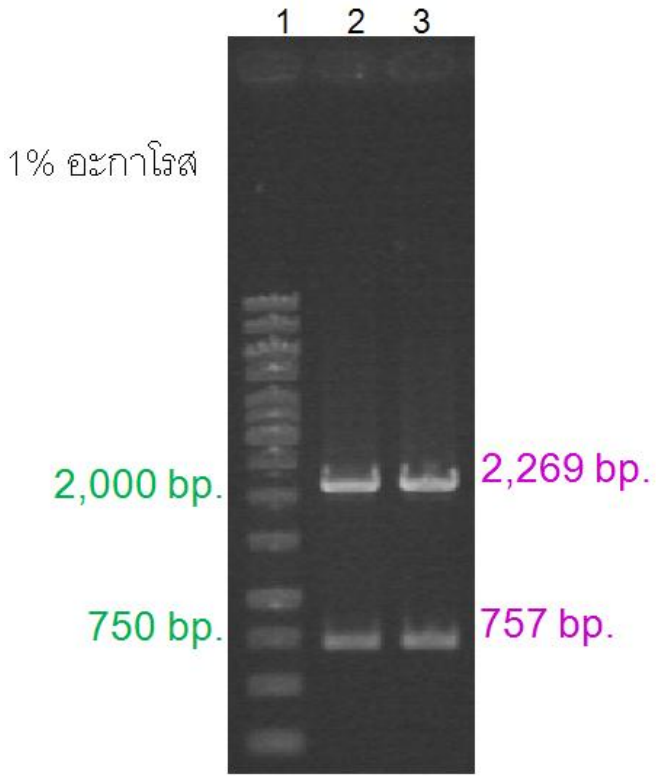


ภาพที่ 4.27 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของพลาสมิด pYES2/Opt pfCA1 (C-Flag) และพลาสมิด pYES2/Opt pfCA2 (C-Flag)

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Opt pfCA1* (757 bp) และ pYES2 (5,856 bp)

3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Opt pfCA2* (757 bp) และ pYES2 (5,856 bp)



ภาพที่ 4.28 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของพลาสมิด pENTR™3C/Opt pfCA1 (C-Flag) และพลาสมิด pENTR™3C/Opt pfCA2 (C-Flag)

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

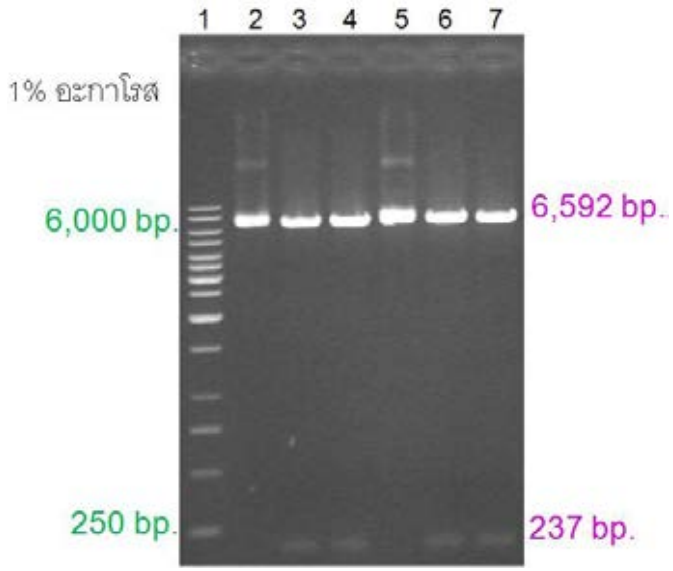
2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Opt pfCA1* (757 bp) และ pENTR™3C (2,269 bp)

3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Opt pfCA2* (757 bp) และ pENTR™3C (2,269 bp)

4.6.3 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA1 พลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA2 (C-Flag) พลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA1 และพลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA2 (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA1 พลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA2 (C-Flag) พลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA1 และพลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA2 (C-Flag) นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.33 บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบพลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA1 พลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA2 (C-Flag) พลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA1 และพลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA2 (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 6,592 คู่เบส และ 237 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับการคำนวณตามคาดการณ์เมื่อมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Opt pfCA1* และ *Opt pfCA2* เข้าไปในเวคเตอร์ทั้งสอง ดังภาพที่ 4.29 เมื่อทำการตรวจสอบลำดับเบสโดยบริษัท First Base, Singapore พบว่าลำดับเบสมีความถูกต้อง



ภาพที่ 4.29 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของพลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA1 พลาสมิด pAG414GPD/Opt pfCA2 (C-Flag) พลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA1 และพลาสมิด pAG414GAL/Opt pfCA2 (C-Flag)

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GPD-ccdB-HA เวคเตอร์

3-4 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GPD เวคเตอร์ ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Opt pfCA1* หรือ *Opt pfCA2* ตามลำดับ

5 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GAL-ccdB-HA เวคเตอร์

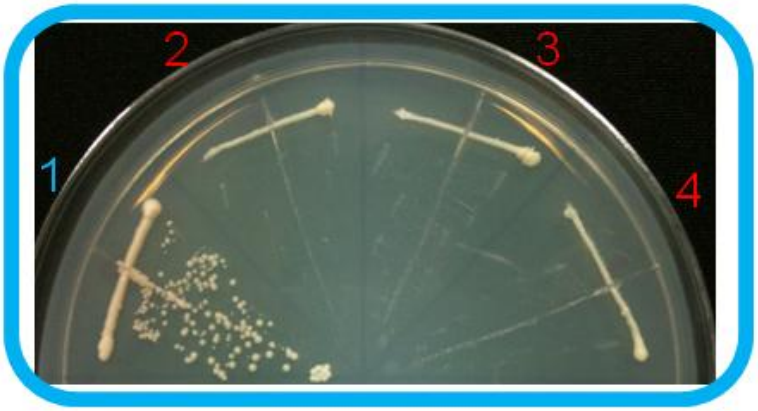
6-7 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GAL เวคเตอร์ ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Opt pfCA1* หรือ *Opt pfCA2* ตามลำดับ

4.7 ศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์ Δ*nce103* และผลของการทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* โดยยีน *pfCA* และ *hCAII* ตามลำดับ

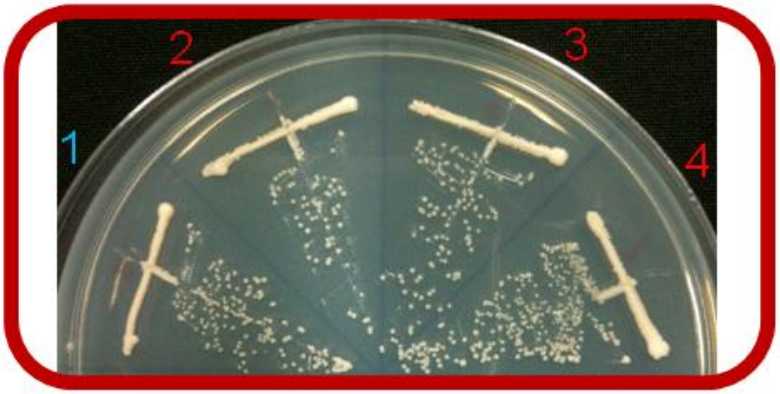
4.7.1 ศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์ Δ*nce103* ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เทียบกับสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20

นำยีสต์สายพันธุ์ BP-9 และ BP-15 (ตารางที่ 3.1) มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง synthetic dextrose (SD) ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-9 และ BP-15 (ภาคผนวก ก) โดยใช้ไม้จิ้มฟันขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เทียบกับสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เป็นเวลา 3-4 วัน จากผลการทดลองพบว่ายีสต์สายพันธุ์ BP-9 สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 และสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เนื่องจากยีสต์ดังกล่าวมีการแสดงออกของยีน *NCE103* ทำให้สามารถสร้างไบคาร์บอเนตไปใช้ในกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ได้เมื่อถูกเลี้ยงในสภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 แต่ในทางตรงกันข้ามยีสต์สายพันธุ์ BP-15 สามารถเจริญได้เฉพาะในสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เนื่องจากยีสต์ดังกล่าวขาดยีน *NCE103* ทำให้ในสภาวะ CO_2 ต่ำไม่สามารถเจริญได้เพราะขาดการผลิตไบคาร์บอเนตไปใช้ในเซลล์ แต่ในสภาวะ CO_2 สูง ยีสต์สามารถนำ CO_2 ในอากาศมาใช้เพื่อผลิตไบคาร์บอเนตแทนทำให้สามารถกลับมาเจริญได้อีกครั้ง ดังภาพที่ 4.30

ก. มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035



ข. ไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20



ภาพที่ 4.30 ลักษณะฟีโนไทป์ของ BP-9 และ BP-15 ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ synthetic dextrose (SD) ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์

ก.) ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035

1 คือ สายพันธุ์ BP-9 ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *NCE103*

2-4 คือ สายพันธุ์ BP-15 ซึ่งถูกทำลายยีน *NCE103*

ข.) ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20

1 คือ สายพันธุ์ BP-9 ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *NCE103*

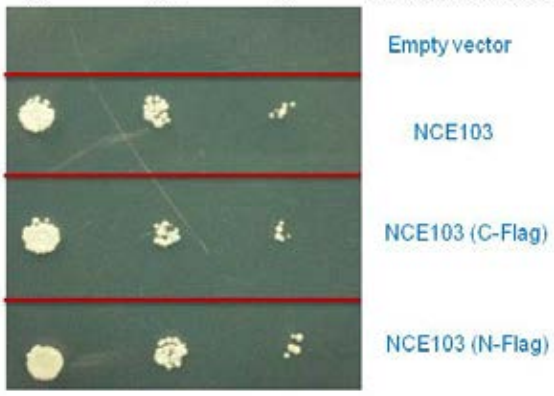
2-4 คือ สายพันธุ์ BP-15 ซึ่งถูกทำลายยีน *NCE103*

4.7.2 ศึกษาผลของการทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* โดยยีน *pfCA* และ *hCAII* ตามลำดับ

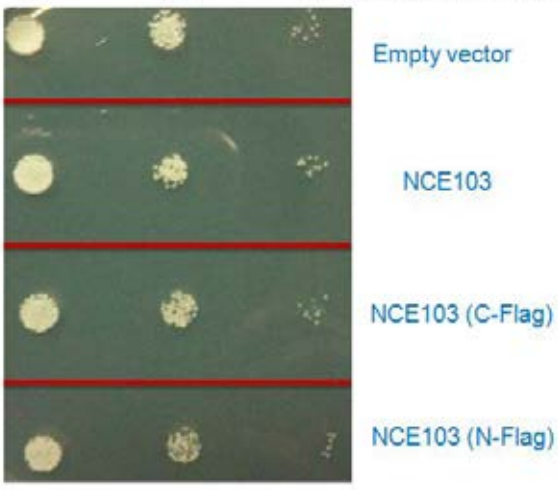
นำพลาสมิดชนิดต่างๆ ที่มีการแสดงออกของยีน *NCE103, pfCA* และ *hCAII* ซึ่งถูกควบคุมการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ของยีน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GPD*) และโปรโมเตอร์ของยีน galactose (*GAL1*) มาชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ BP-15 (Δ*nce103*) (ตารางที่ 3.1) ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) (Gietz และคณะ, 1995) นำยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง synthetic dextrose ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 แต่ไม่เติมทริปโตเฟน (SD-Trp) (ภาคผนวก ก) สำหรับยีสต์ที่มีรีคอมบิแนนท์ที่อยู่ในเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ synthetic dextrose ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 แต่ไม่เติมทริปโตเฟน (SG-Trp) (ภาคผนวก ก) สำหรับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pAG414GAL-ccdB-HA และ synthetic dextrose ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 แต่ไม่เติมยูราซิล (SG-Ura) (ภาคผนวก ก) สำหรับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์ pYES2 โดยทำการเตรียมยีสต์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ $10^6 - 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร วัดความเข้มข้นของเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์แล้วทำการหยดลงบนอาหารแข็งชนิดต่างๆข้างต้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เทียบกับสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เป็นเวลา 5 วัน จากผลการทดลองพบว่าภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 พลาสมิดที่มียีน *NCE103* ทั้งที่มีส่วน tag และไม่มีส่วน Flag tag ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *GAL1* สามารถทดแทนหน้าที่การเจริญแทนยีน *NCE103* ที่ขาดหายไปของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 ได้ ไม่ว่าจะมีการติด Flag tag ด้านปลาย 5' หรือ 3' ดังนั้นการติด Flag tag ด้านปลายของยีนจึงไม่มีผลต่อการทดแทนหน้าที่ในยีสต์ที่ขาดยีน *NCE103* ส่วนในสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 พบว่ายีสต์ดังกล่าวสามารถเจริญได้แม้แต่ยีสต์ที่มีพลาสมิดที่ไม่มียีน *NCE103* (Empty vector) เนื่องจากอาศัย CO_2 ในอากาศซึ่งมีอยู่ในปริมาณสูง (ภาพที่ 4.31) การทดลองการทดแทนหน้าที่ (Funtional complementation) ของยีน *NCE103* โดย ยีน *pfCA* ที่มาจากเชื้อมาลาเรียพบว่าภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 พบว่ายีสต์ที่ได้รับยีน *pfCA* ขนาดเต็ม (pfCA full-length) (กรดอะมิโน 418 ตัว) หรือยีน *pfCA* ขนาดสั้นซึ่งมีส่วนแอคทีฟไซท์ (truncated form) (กรดอะมิโน 235 ตัว) ไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่ในยีสต์ที่ขาดยีน *NCE103* ได้ (ภาพที่ 4.32) นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *pfCA* ที่สังเคราะห์ขึ้นมาให้มีการแสดงออกสูง (*Opt pfCA*) ในยีสต์ก็ยังคงไม่สามารถทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* ได้ ไม่

ว่าจะเป็น *Opt pfCA* 1 หรือ *Opt pfCA* 2 แต่ยีน *hCAII* สามารถทดแทนหน้าที่ของยีน *NCE103* ได้ และโปรโมเตอร์ทั้ง *GPD* และ *GAL1* ไม่สามารถช่วยให้ยีน *pfCA* ทดแทนหน้าที่ในยีสต์ที่ขาดยีน *NCE103* ได้ (ภาพที่ 4.33)

ก. ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ Δ*nce103*



ข. ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ Δ*nce103*

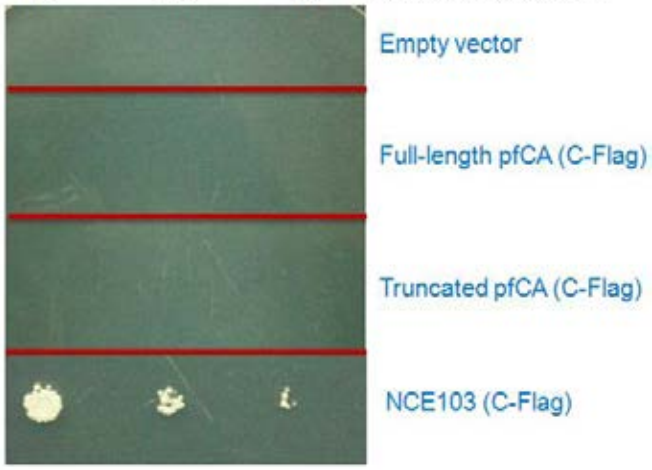


ภาพที่ 4.31 การทดแทนการทำหน้าที่ของยีน *NCE103* ของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 (**Δ*nce103*) โดยพลาสมิดที่มียีน *NCE103* ซึ่งมีการติดและไม่ติด** Flag tag **ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *GAL1***

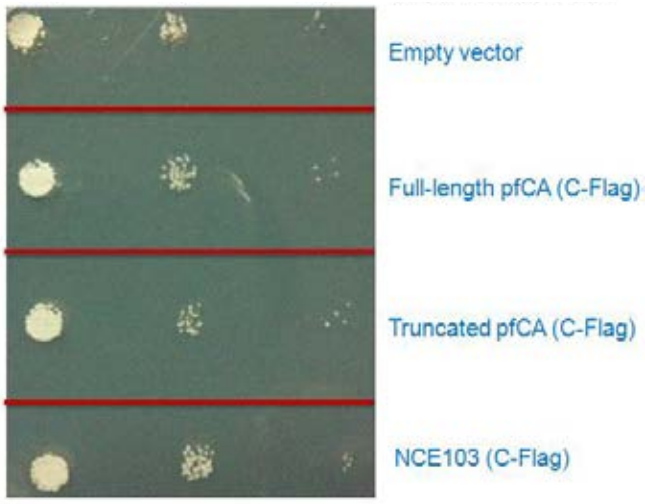
ก.) การเจริญของเซลล์ยีสต์บนอาหารแข็ง SG-Ura บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เป็นเวลา 5 วัน ชุดควบคุมผลบวก NCE103 และชุดควบคุมผลลบ Empty vector

ข.) การเจริญของเซลล์ยีสต์บนอาหารแข็ง SG-Ura บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เป็นเวลา 5 วัน ชุดควบคุมผลบวก NCE103 และชุดควบคุมผลลบ Empty vector

ก. ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ Δ*nce103*



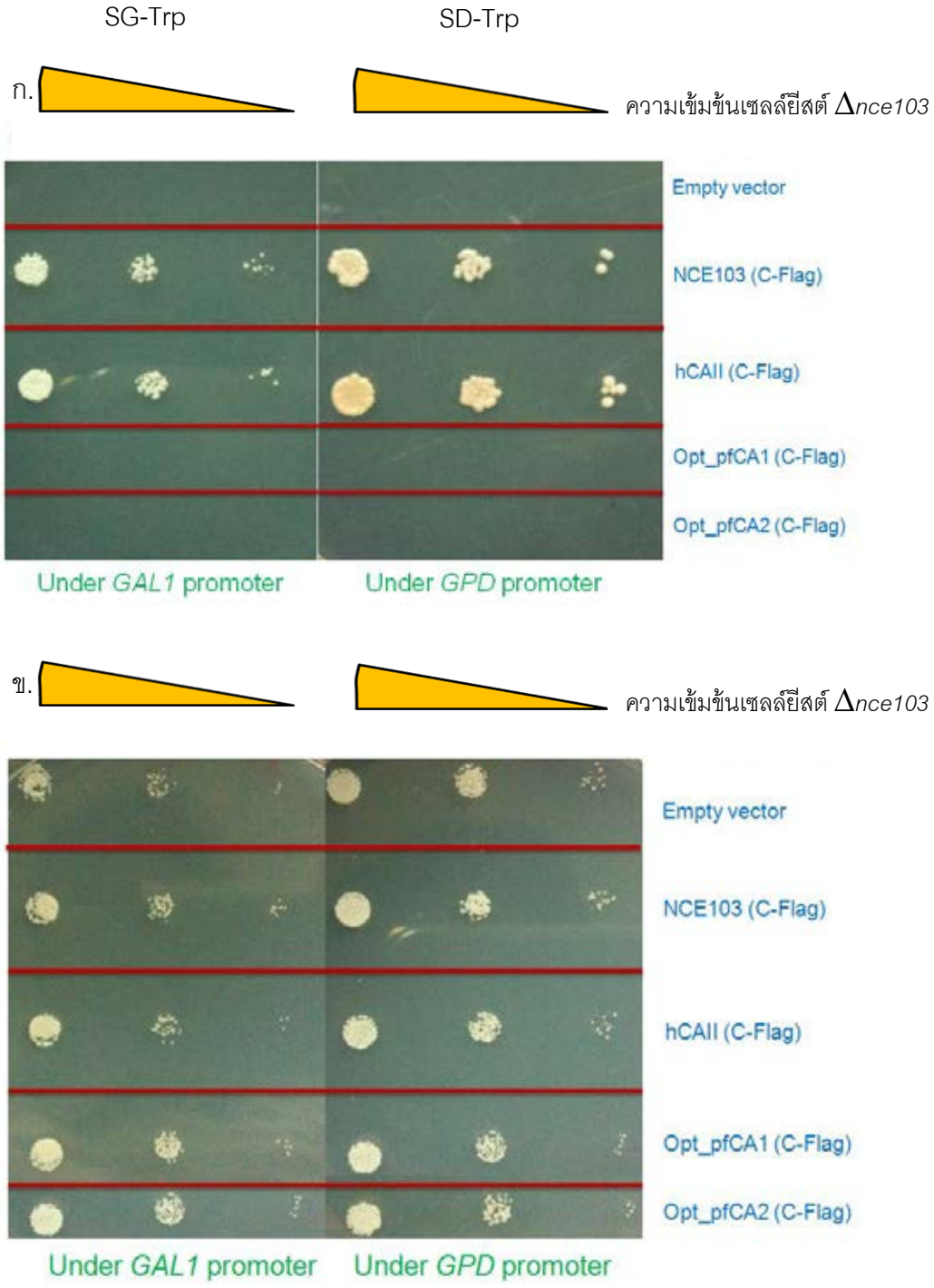
ข. ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ Δ*nce103*



ภาพที่ 4.32 การทดแทนการทำหน้าที่ของยีน *NCE103* ของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 (**Δ*nce103*) โดยพลาสมิดที่มียีน *pfCA* ซึ่งมีการติด Flag tag ที่ปลายด้าน 3' ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *GAL1***

ก.) การเจริญของเซลล์ยีสต์บนอาหารแข็ง SG-Ura บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เป็นเวลา 5 วัน ชุดควบคุมผลบวก NCE103 (C-Flag) และชุดควบคุมผลลบ Empty vector

ข.) การเจริญของเซลล์ยีสต์บนอาหารแข็ง SG-Ura บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เป็นเวลา 5 วัน ชุดควบคุมผลบวก NCE103 (C-Flag) และชุดควบคุมผลลบ Empty vector



ภาพที่ 4.33 การทดแทนการทำหน้าที่ของยีน *NCE103* ของยีสต์สายพันธุ์ BP-15 (Δ*nce103*) **โดยพลาสมิดที่มียีน *NCE103*, *hCAII* หรือ *Opt pfCA* ซึ่งมีการติด** Flag tag **ที่ปลายด้าน** 3' **ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *GAL1* หรือ *GPD***

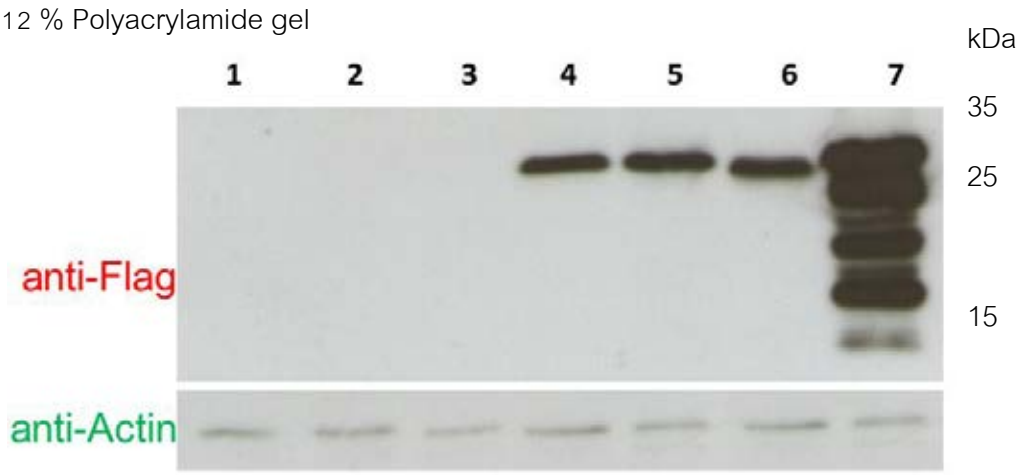
ก.) การเจริญของเซลล์ยีสต์บนอาหารแข็ง SG-Trp และ SD-Trp บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 เป็นเวลา 5 วัน ชุดควบคุมผลบวก NCE103 (C-Flag) และชุดควบคุมผลลบ Empty vector

ข.) การเจริญของเซลล์ยีสต์บนอาหารแข็ง SG-Trp และ SD-Trp บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เป็นเวลา 5 วัน ชุดควบคุมผลบวก NCE103 (C-Flag) และชุดควบคุมผลลบ Empty vector

4.8 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Nce103, pfCA และ hCAII ในยีสต์สายพันธุ์กลายโดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

นำยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ BP- 15 ที่มีพลาสมิดของยีน *NCE103*, *hCAII* และ *pfCA* มาทำการสกัดโปรตีน จากนั้นนำโปรตีนปริมาณ 50 ไมโครกรัม ไปหยอดลงในเจล SDS-polyacrylamide ร้อยละ 12 และตรวจสอบโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์นบลอต โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Flag (Anti-Flag antibody) และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอคติน (Anti-Actin antibody) เป็นชุดควบคุมปริมาณการหยอดโปรตีน

จากการทดลองพบว่าโปรตีน hCAII มีขนาด 29 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนที่ต่ำกว่าซึ่งอาจเกิดจากการเสื่อมสลายของโปรตีนมีขนาด 25, 22, 20, 18, 16 และ 12 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ส่วนโปรตีน Nce103 มีขนาด 25 กิโลดาลตัน และโปรตีน Opt pfCA มีขนาด 26 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โดยโปรตีน hCAII ได้ในปริมาณสูงสุด เมื่อเทียบกับโปรตีน Nce103 และโปรตีน Opt pfCA ในขณะที่โปรตีน Nce103 และ Opt pfCA ถูกพบในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อยีนของโปรตีนดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *GAL1* (ภาพที่ 4.34) แต่ในยีสต์ที่มีโปรตีน pfCA ขนาดเต็ม 46 กิโลดาลตัน (กรดอะมิโน 418 ตัว; pfCA full-length) หรือโปรตีนขนาดสั้นซึ่งมีส่วนแอคทีฟไซท์ 26 กิโลดาลตัน (กรดอะมิโน 235 ตัว; truncated pfCA) ไม่พบว่ามีการสร้างโปรตีนซึ่งสอดคล้องกับผลก่อนหน้านี้ที่พบว่ายีน *pfCA* ในยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*nce103* ไม่สามารถทดแทนหน้าที่ในการเจริญของยีสต์ที่ขาดยีน *NCE103* ได้ เนื่องจากไม่สามารถสร้างโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์ได้นั้นเอง ในทางตรงกันข้ามยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*nce103* ที่มียีน *Opt pfCA* 1 หรือ *Opt pfCA* 2 สามารถสร้างโปรตีนดังกล่าวได้ แต่โปรตีนดังกล่าวไม่สามารถทดแทนหน้าที่ในการเจริญของโปรตีน Nce103 ได้เช่นเดียวกัน สำหรับชุดการทดลองในยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*nce103* ที่มีพลาสมิดของยีน CA ชนิดต่างๆที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ *GPD* พบว่าได้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน แต่พบปริมาณโปรตีนน้อยกว่าที่พบในชุดที่ใช้โปรโมเตอร์ *GAL1* (ภาพที่ 4.35)



ภาพที่ 4.34 การตรวจหาโปรตีน Nce103, pfCA และ hCAII ในยีสต์สายพันธุ์กลายที่มียีน CA ชนิดต่างๆ ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *GAL1* โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

1 คือ Empty vector

2 คือ Full-length pfCA (C-Flag)

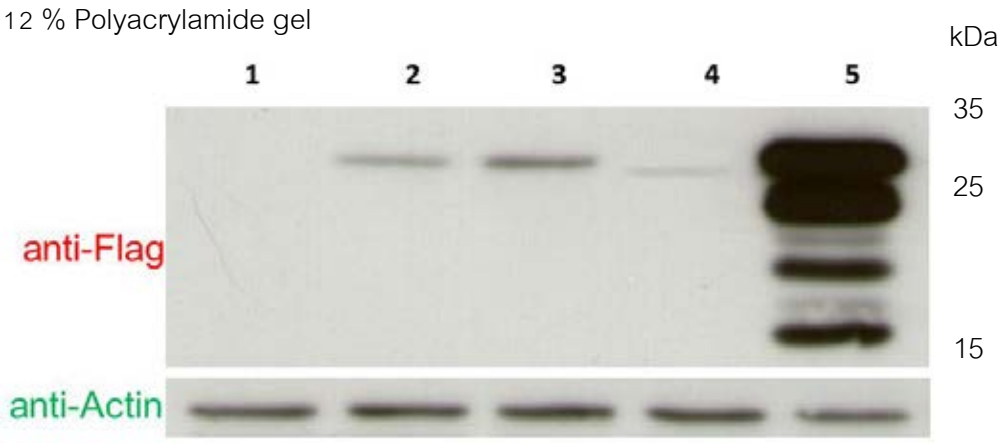
3 คือ Truncated pfCA (C-Flag)

4 คือ Opt_pfCA1 (C-Flag)

5 คือ Opt_pfCA2 (C-Flag)

6 คือ NCE103 (C-Flag)

7 คือ hCAII (C-Flag)



ภาพที่ 4.35 การตรวจหาโปรตีน Nce103, pfCA และ hCAII ในยีสต์สายพันธุ์กลายที่มียีน CA ชนิดต่างๆ ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *GPD* โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

1 คือ Empty vector

2 คือ Opt_pfCA1 (C-Flag)

3 คือ Opt_pfCA2 (C-Flag)

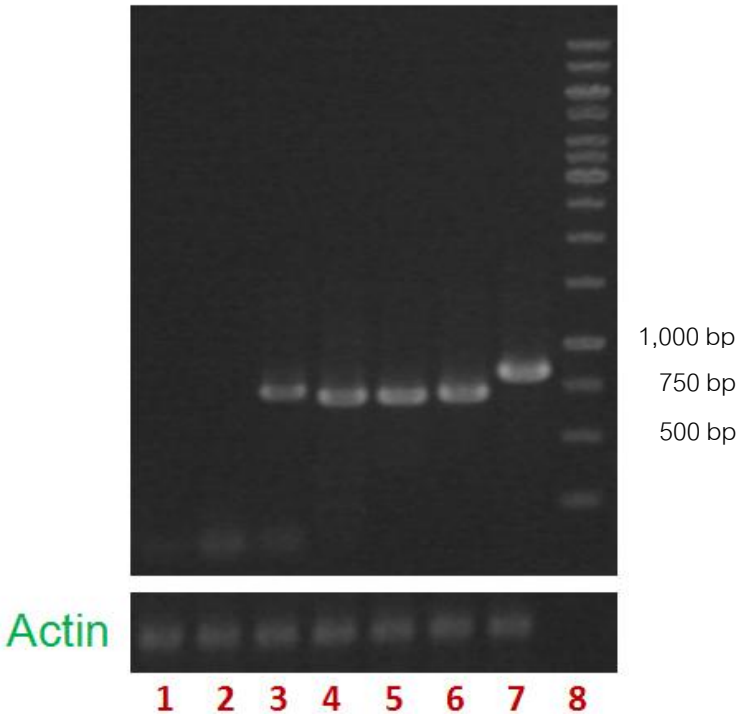
4 คือ NCE103 (C-Flag)

5 คือ hCAII (C-Flag)

4.9 ศึกษาการแสดงออกของยีน *NCE103*, *pfCA* และ *hCAII* ในยีสต์สายพันธุ์กลาย โดยวิธี reverse transcription-PCR

เพื่อที่จะศึกษาว่ายีน pfCA มีการแสดงออกในยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*nce103* หรือไม่ ในการทดลองนี้จะใช้วิธี RT-PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีนดังกล่าว โดยเริ่มจากนำยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ BP- 15 ที่มีพลาสมิดของยีน *NCE103* หรือ *hCAII* หรือ *pfCA* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SG-Ura หรือ SG-Trp ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ และทำการสกัด RNA ด้วยชุดสกัด RNA MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit (EPICENTRE, USA) จากนั้นสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) โดยใช้รีเวอร์สทรานสคริปเทส และนำคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนจากการสังเคราะห์ mRNA โดยมียีสต์สายพันธุ์กลายที่มียีน *NCE103* (C-Flag) เป็นชุดควบคุมผลบวก หรือมี Empty vector เป็นชุดควบคุม

ผลลบ จากผลการทดลองพบว่าในยีสต์สายพันธุ์กลายที่มียีน *pfCA* ขนาดสั้นซึ่งมีส่วนแอคทีฟไซท์ (กรดอะมิโน 235 ตัว) หรือ *Opt pfCA* หรือ *NCE103* หรือ *hCAII* มีการแสดงออกในระดับทรานสคริปชัน แต่ยีน *pfCA* ขนาดเต็ม (กรดอะมิโน 418 ตัว) พบว่าไม่มีการแสดงออกเลย (ภาพที่ 4.36) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทำเวสเทิร์นบลอตที่ไม่พบโปรตีนเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นยังพบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*nce103* ที่มียีน *pfCA* ขนาดสั้นซึ่งมีส่วนแอคทีฟไซท์ไม่พบว่ามีการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นในผลเวสเทิร์นบลอต แต่กลับพบว่าสามารถสังเคราะห์ mRNA ในระดับทรานสคริปชันได้ ผลดังกล่าวอาจเกิดจากความไม่เสถียรของ mRNA หรือครึ่งชีวิตของยีนดังกล่าวมีระยะเวลาสั้นมาก จนไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน และส่งผลให้ไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่ในการเจริญของยีสต์ที่ขาดยีน *NCE103* ได้



ภาพที่ 4.36 การแสดงออกของยีน *NCE103* หรือ *pfCA* หรือ *hCAII* ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *GAL1* ในยีสต์สายพันธุ์กลาย (Δ*nce103*) โดยวิธี reverse transcription-PCR

1 คือ Empty vector

2 คือ Full-length pfCA (C-Flag)

3 คือ Truncated pfCA (C-Flag)

4 คือ Opt_pfCA1 (C-Flag)

5 คือ Opt_pfCA2 (C-Flag)

6 คือ NCE103 (C-Flag)

7 คือ hCAII (C-Flag)

8 คือ 1 Kb DNA Ladder

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. สามารถทำลายยีน *NCE103* หรือยีน *PDR5* ในโครโมโซมของยีสต์โดยการแทนที่ด้วย *loxP-URA3-loxP* ได้สำเร็จ ทำให้ได้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *NCE103* (Δ*nce103::loxP*) และได้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *PDR5* (Δ*pdr5::loxP*) ที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมยูราซิล ทั้งนี้เป็นเพราะยีน *URA3* ซึ่งเป็นยีนมาร์คเกอร์ถูกขับออกจากเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายทั้งสองโดยวิธี Cre/loxP system

2. สามารถสร้างพลาสมิดให้มีการแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสจากยีสต์ *S. cerevisiae* (*NCE103*) *P. falciparum* (*pfCA*) และ มนุษย์ (*hCAII*)

3. ยีสต์สายพันธุ์ BP-15 (Δ*nce103::loxP*) ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20

4. ยีสต์สายพันธุ์ BP-15 ซึ่งมีพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสจากยีสต์ *S. cerevisiae* (*NCE103*) และ มนุษย์ (*hCAII*) สามารถทดแทนการทำหน้าที่การเจริญภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 ได้

5. ยีสต์สายพันธุ์ BP-15 ซึ่งมีพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสจาก *P. falciparum* (*pfCA*) ทั้งแบบ full-length หรือแบบ truncated หรือ แบบที่สังเคราะห์ยีนให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์ (*Opt pfCA* 1 หรือ *Opt pfCA* 2) ล้วนไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่ของยีน *NCE103* ในความสามารถการเจริญภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035

6. ยีสต์สายพันธุ์ BP-15 ซึ่งมีพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสจากยีสต์ *S. cerevisiae* (*NCE103*) หรือของมนุษย์ (*hCAII*) หรือของ *P. falciparum* (*pfCA*) แบบที่สังเคราะห์ยีนให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์ สามารถผลิตโปรตีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสได้

7. ยีสต์สายพันธุ์ BP-15 ซึ่งมีพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนคาร์บอนิคแอนไฮเดรสจากยีสต์ *S. cerevisiae* (*NCE103*) หรือของมนุษย์ (*hCAII*) หรือของ *P. falciparum* (*pfCA*) แบบ truncated และแบบที่สังเคราะห์ยีนให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์สามารถแสดงออกโดยการสังเคราะห์เป็น mRNA ได้

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

การทดลองโดยกลายพันธุ์ยีสต์ให้ขาดยีน *NCE103* สามารถทำได้โดยใช้วิธีการทำลายยีนโดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีของ Amberg และคณะ (2005) ซึ่งผลที่ได้ถูกตรวจสอบการทำลายยีน *NCE103* โดยใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ ตามภาพที่ 4.3 เมื่อยีน *NCE103* ถูกทำลายส่งผลให้ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มี CO_2 ต่ำ แต่สามารถเจริญได้เมื่อใช้เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสจากต้นยาสูบ หรือเลี้ยงในสภาวะที่มี CO_2 สูง (Götz และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังต้องทำลายยีน *URA3* ที่เข้าไปแทนที่ *NCE103* ในโครโมโซมของยีสต์เพื่อจะได้นำยีนมาร์คเกอร์นี้กลับมาใช้ได้ใหม่โดยใช้ระบบ Cre/loxP (Gueldener และคณะ, 2002) โดยเมื่อมีการแสดงออกของ Cre recombinase ในเซลล์ยีสต์จะส่งผลให้ *URA3* ที่ขนาบข้างด้วย *loxP* ถูกตัดออกไปจากโครโมโซม ดังภาพที่ 4.4

ยีสต์สายพันธุ์กลาย BP-15 (Δ*nce103::loxP*) สามารถเจริญได้เฉพาะในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 20 แต่ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ร้อยละ 0.035 ดังภาพที่ 4.30 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง Amoroso และคณะ (2005) ซึ่งพบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ในสภาวะที่มี CO_2 ต่ำ (CO_2 ร้อยละ 0.035) จะมีแอคทิวิตีสูงกว่า 10-20 เท่า เมื่อเทียบกับในสภาวะที่มี CO_2 สูง (CO_2 ร้อยละ 5) และยังพบว่าในสภาวะที่มี CO_2 ต่ำ จะมีการสะสมของ mRNA ของ *NCE103* มากกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มี CO_2 สูง เนื่องจากยีสต์นำเอนไซม์ไปใช้ในการสร้างไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) หรือใช้ในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ของยีสต์

จากผลการทดลองศึกษาการทดแทนการทำหน้าที่พบว่าการใช้ Flag tag ติดทางด้านปลาย 5' หรือ 3' ของยีน *NCE103* ไม่มีผลไปรบกวนต่อหน้าที่การทำงานของยีน *NCE103* ของยีสต์ ดังภาพที่ 4.31 เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Wider และคณะ (2009) ที่นำ Flag tag มาติดด้านปลาย 5' ของยีนฮีทช็อคโปรตีน 90 ของ *P. falciparum* เทียบกับไม่ติด Flag และศึกษาผลการทดแทนหน้าที่ของการเจริญพบว่ามีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้เมื่อนำยีน *hCAII* จากมนุษย์มาทดแทนการทำหน้าที่ในยีสต์สายพันธุ์กลาย BP-15 ก็พบว่าสามารถทดแทนการทำหน้าที่การเจริญ เมื่อเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวในสภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ต่ำได้ (ภาพที่ 4.33) และพบว่าอัตราการเจริญแตกต่างเพียงเล็กน้อยจากในยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*nce103* ที่มีพลาส-มิดที่มียีน *NCE103* อยู่ ผลการทดลองนี้เป็นไปในทำนองเดียวกันทั้งชุดการทดลองที่ให้ยีนแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *GAL1* และของโปรโมเตอร์ *GPD* ผลที่ได้สอดคล้อง

กับ Clark และคณะ (2004) ที่นำเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสจากมนุษย์ (hCAII) ซึ่งถูกจัดเป็น CA ชนิด α มาแสดงออกในยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*nce103* พบว่าสามารถทดแทนการทำหน้าที่ในยีสต์ได้เมื่อเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มี CO_2 ต่ำ ความสามารถในการทดแทนการทำหน้าที่ของ hCAII อาจเป็นผลมาจากลำดับยีน โปรตีน และวิถีการสังเคราะห์ต่างๆมีระดับการอนุรักษ์กับมนุษย์สูง (Barberis และคณะ, 2005) จึงส่งผลให้สามารถทดแทนการทำหน้าที่การเจริญในยีสต์กลายพันธุ์ที่ขาดยีน *NCE103* ได้

แต่เมื่อศึกษาการทดแทนการทำหน้าที่การเจริญของ pfCA ชนิดต่างๆในยีสต์กลับพบว่าทั้ง pfCA ชนิดที่เป็น full-length หรือชนิด truncated ไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่การเจริญภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ต่ำได้เลย ดังภาพที่ 4.32 ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีนที่มาจาก *P. falciparum* มักมีเบส A หรือ T สูง ซึ่งส่งผลต่อการยืดยาวของสาย RNA เมื่อมีการสังเคราะห์ RNA เกิดขึ้น (Romanos และคณะ, 1992) และมีผลงานวิจัยของ Romanos และคณะ (1991) ศึกษาการแสดงออกของ fragment C ของ *Clostridium tetani* ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่เป็นพิษมาแสดงออกในยีสต์เพื่อนำไปใช้เป็นวัคซีนป้องกันบาดทะยัก พบว่า fragment C มีองค์ประกอบของเบส A หรือ T สูงถึงร้อยละ 71 จึงมีบริเวณที่มีเบส A หรือ T ต่อเนื่องกันจำนวนมากจึงส่งผลต่อการยืดยาวของ mRNA เนื่องจากอาจมีบริเวณที่เป็นสัญญาณการหยุดการสังเคราะห์ mRNA เช่น TTTTTATA (Henikoff และ Furlong 1983) ลำดับที่เป็นไตรพาไทต์ TAG..(T-rich)..TA(T)GT..(AT-rich)..TTT (Zaret และ Sherman 1982) และ TAAATAAA/T (Bennetzen และ Hall 1982) แต่ปัญหาที่เกิดจากการหยุดการสังเคราะห์ mRNA สามารถถูกแก้ไขได้โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เส้นดีเอ็นเอแทน โดยส่งผลให้ร้อยละของเบส G หรือ C เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 29 เป็นร้อยละ 47 และยังพบอีกว่าถ้าไม่สังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งเส้น แต่สังเคราะห์เพียงบางส่วนจะไม่สามารถสังเคราะห์เป็น mRNA หรือโปรตีนที่เป็นเส้นเต็มได้ นอกจากนี้เมื่อนำ dihydrofolate reductase-thymidylate synthase ของ *P. falciparum* มาแสดงออกใน *E. coli* พบว่าได้เอนไซม์ในปริมาณต่ำ แต่เมื่อทำการสังเคราะห์ยีนให้ codon เหมาะสมกลับได้ในปริมาณมากขึ้นถึง 10 เท่า (Prapunwattana และคณะ, 1996)

ยีนที่จะแสดงออกได้ดีควรมีปริมาณร้อยละของ GC อยู่ในช่วงร้อยละ 30-70 สำหรับยีน pfCA แบบ full-length และแบบ truncated form พบว่ามีร้อยละ GC เป็น 24 ซึ่งจัดว่าต่ำเกินกว่าค่าที่ควรจะได้การแสดงออกดี ดังนั้นงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการแก้ปัญหาที่เกิดจากองค์ประกอบของเบส A หรือ T สูง (ร้อยละ 76) โดยทำการสังเคราะห์ยีน *pfCA* 2 แบบขึ้นมาให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์ *Opt pfCA* 1 (ร้อยละของเบส G หรือ C คือ 33) และ *Opt pfCA* 2 (ร้อยละของเบส G หรือ C คือ 39) เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากการไม่แสดงออกของยีน *pfCA* นำไปสู่ผลที่ไม่สามารถ

ทดแทนการทำหน้าที่ได้ โดยที่ลำดับกรดอะมิโนไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากรูปแบบดั้งเดิม แต่เมื่อศึกษาผลของการทดแทนการทำหน้าที่การเจริญกลับพบว่ายังคงไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่ได้เช่นเดิม ทั้งชนิดของยีนสังเคราะห์ที่ถูกควบคุมภายใต้โปรโมเตอร์ *GAL1* หรือ *GPD* ดังภาพที่ 4.33 ในทางตรงกันข้ามเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์นบลอตโดยใช้ anti-Flag antibody พบว่ายีสต์ที่มีพลาสมิดที่มียีน *pfCA* ที่ถูกสังเคราะห์ให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์ 2 แบบ (*Opt pfCA* 1 และ *Opt pfCA* 2) สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้และมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีนที่ประมวลรหัสจากยีน *NCE103* แต่พบว่ายีสต์ที่มีพลาสมิดที่มียีน *pfCA* ที่เป็นชนิด full-length หรือ truncated form ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ดังที่ตั้งสมมุติฐานไว้ (ภาพที่ 4.34) การที่ยีน *pfCA* ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นให้มีการแสดงออกสูงในยีสต์ทั้ง 2 แบบไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่การเจริญในยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*nce103* อาจเกิดจากการที่เป็นยีนที่มาจากสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีความแตกต่างจากยีสต์มาก ทำให้เมื่อมาอยู่ในสภาวะแวดล้อมในยีสต์ การทำงานของโปรตีน *pfCA* อาจทำงานได้ไม่ดี เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของยีน P0 จากปรสิต *Leishmania infantum* ซึ่งเป็นไรโบโซมอลโปรตีนไม่สามารถทดแทนหน้าที่การเจริญในยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน P0 ได้เช่นเดียวกัน (Rodriguez-Gabriel และคณะ, 2000) หรืออาจเกี่ยวข้องกับการม้วนพับของโปรตีน เมื่อไม่ได้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมตามธรรมชาติ ซึ่งทำให้เกิดการม้วนพับที่ผิดปกติ เนื่องจากมีความจำเพาะต่อแชพเพอโรน (Chaperone) ในยีสต์ต่ำ (Romanos และคณะ, 1992; Rai และ Padh 2001) หรืออาจเป็นผลจากการที่ยีน *pfCA* เมื่อถูกนำมาทำให้แสดงออกในยีสต์ ด้านปลาย 5' ของยีน *pfCA* อาจมีบทบาทที่ส่งผลต่อกิจกรรมทางชีวภาพทำให้ยีน *Opt pfCA* 1 และ *Opt pfCA* 2 ซึ่งได้ทำการตัดเอาด้านปลาย 5' ออกเพื่อลดปัญหาจากการที่อาจมีบริเวณที่เป็นสัญญาณการหยุดการสังเคราะห์ mRNA ถึงแม้ว่าส่วนแอคทีฟไซต์จะอยู่ด้านปลาย 3' ก็ตาม Wagenbach และคณะ (1991) พบว่าด้านปลาย 5' ของฮีโมโกลบินเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อตัวดัดแปลงของฮีโมโกลบิน นอกจากนั้น Gao และคณะ (2010) พบว่าด้านปลาย 5' ของ Survivin ซึ่งเป็นซัพเพรสเซอร์ของอะพอพโทซิส อาจมีส่วนช่วยในการม้วนพับโปรตีนของตัวมันเองให้ถูกต้อง

จากผลการทดลองดังภาพที่ 4.34 และ 4.35 พบว่ายีนชนิดเดียวกันที่อยู่ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *GPD* มีการแสดงออกต่ำกว่า โดยวัดจากปริมาณโปรตีนที่ได้เทียบกับโปรตีนที่สังเคราะห์มาจากยีนที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ *GAL1* และพบว่าในยีสต์ที่มีพลาสมิดที่มียีน *hCAII* มีการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดเมื่อเทียบกับในยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีพลาสมิดที่มียีน *NCE103* ของยีสต์ หรือ *pfCA* จาก *P. falciparum* แต่พบว่าโปรตีน hCAII มีการเสื่อมสลาย

เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยสังเกตจากผลการทดลองเวสเทิร์นบลอตเป็นที่สังเกตว่าพบแถบโปรตีนที่อยู่ต่ำกว่าโปรตีน hCAII อยู่หลายแถบ อาจเนื่องมาจากการที่นำยีน *hCAII* ของมนุษย์มาแสดงออกในยีสต์ จึงอาจส่งผลให้เกิดการจดจำว่าเป็นโปรตีนที่ผิดปกติ (Goldberg และ Goff 1986; Goldberg 2003) และเกิดการสลายตัวค่อนข้างรวดเร็ว หรืออาจเกิดจากการที่มีการแสดงออกของโปรตีน hCAII เป็นจำนวนมาก ทำให้เซลล์ยีสต์ต้องลดจำนวนโปรตีนที่สร้างขึ้นมากเกินไป โดยเพิ่มการสลายตัวของโปรตีน และอีกทั้งในสภาวะปกติยีน *NCE103* ซึ่งเป็นเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์มีการแสดงออกที่ต่ำในสภาวะมีออกซิเจนและมี CO_2 ต่ำ ซึ่งแสดงว่าโปรตีนดังกล่าวถูกสร้างเพื่อนำมาใช้ในเซลล์ยีสต์ปริมาณต่ำก็เพียงพอต่อกิจกรรมทางชีวภาพของยีสต์ และจากการศึกษาการแสดงออกโดยตรวจสอบระดับ mRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อยืนยันผลที่ได้จากการทดลองชนิดเวสเทิร์นบลอต ดังภาพที่ 4.36 พบว่ายีน *Opt pfCA* 1 และ *Opt pfCA* 2 มีการสังเคราะห์ mRNA เกิดขึ้นเช่นเดียวกับผลการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากผลการทดลองเวส-เทิร์นบลอต แต่เป็นที่น่าแปลกใจที่ยีน *pfCA* แบบ truncated form ก็สามารถสังเคราะห์ mRNA ได้ด้วยทั้งที่ไม่พบว่ามีการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้น ในขณะที่ยีน *pfCA* แบบ full-length ไม่สามารถสังเคราะห์ mRNA ได้ อาจอธิบายได้ว่าการที่ยีนของ *pfCA* แบบ full-length มีลำดับเบสที่เป็นสัญญาณการหยุดการสังเคราะห์ mRNA (TTTTTATA) ในตำแหน่งที่ 445-452 แต่ยีน *pfCA* แบบ truncated form ไม่พบ และ codon bias อาจส่งผลต่อการสร้างโปรตีนของ mRNA ของ *pfCA* แบบ truncated form เนื่องจากพบว่ามี rare codons ที่พบในยีสต์ จากการศึกษาของ Baca และ Hol (2000) พบว่าเมื่อทำทรานส์ฟอร์มพลาสมิดที่มียีนจากปรสิตควบคู่ไปกับพลาสมิดที่มียีนที่ถอดรหัสได้เป็น tRNA ซึ่งจดจำกับ rare codons ที่พบในยีนปรสิตมาแสดงออกใน *E. coli* สามารถเพิ่มปริมาณอย่างมากต่อการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากยีนปรสิต

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาแอคทิวิตีเอสเทอเรสของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *P. falciparum* ใน *in vitro* เพื่อศึกษาว่าเอนไซม์ pfCA ที่ผลิตได้ในยีสต์นั้นมีความสามารถในการทำงานหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์ hCAII ซึ่งพบว่าสามารถทดแทนหน้าที่การเจริญในยีสต์ได้

2. ศึกษาโครงสร้างของ pfCA โดยใช้วิธี x-ray crystallography เพื่อดูโครงสร้างทั้งหมดของโปรตีน อันจะนำไปสู่การวิเคราะห์และเข้าใจเกี่ยวกับโปรตีนดังกล่าวได้ดีขึ้น และนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในยีสต์ให้เหมาะสมต่อไป

รายการอ้างอิง

Aguilera, J., Van Dijken, J.P., De Winde, J.H.,and Pronk, J.T. 2005. Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of Saccharomyces cerevisiae at atmospheric carbon dioxide pressure. Biochemical Journal 391 : 311-316.

Amberg, D.C., Burke, D.,and Strathern, J.N. 2005. Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Amoroso, G., Morell-Avrahov, L., Müller, D., Klug, K.,and Sültemeyer, D. 2005. The gene NCE103 (YNL036w) from Saccharomyces cerevisiae encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. Molecular Microbiology 56 : 549-558.

Baca, A.,and Hol, W. 2000. Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of Plasmodium and other AT-rich parasite genes in Escherichia coli. International Journal for Parasitology 30 : 113-118.

Bahn, Y., Cox, G., Perfect, J.,and Heitman, J. 2005. Carbonic anhydrase and CO_2 sensing during Cryptococcus neoformans growth, differentiation, and virulence. Current Biology 15 : 2013-2020.

Barberis, A., Gunde, T., Berset, C., Audetat, S.,and Lüthi, U. 2005. Yeast as a screening tool. Drug Discovery Today: Technologies 2 : 187-192.

Bennetzen, J.,and Hall, B. 1982. Codon selection in yeast. The Journal of Biological Chemistry 257 : 3026-3031.

Clark, D., Rowlett, R.S., Coleman, J.R.,and Klessig, D.F. 2004. Complementation of the yeast deletion mutant DeltaNCE103 by members of the beta class of carbonic anhydrases is dependent on carbonic anhydrase activity rather than on antioxidant activity. Biochemical Journal 379 : 609-615.

Cleves, A.E., Cooper, D., Barondes, S.H.,and Kelly, R.B. 1996. A new pathway for protein export in Saccharomyces cerevisiae. The Journal of Cell Biology 133 : 1017-1026.

Cronk, J.D., Endrizzi, J.A., Cronk, M.R., O'neill, J.W.,and Zhang, K.Y.J. 2001. Crystal structure of E. coli β–carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH–dependent activity. Protein Science 10 : 911-922.

Gao, Y., et al. 2010. N-terminal deletion effects of human survivin on dimerization and binding to Smac/DIABLO in vitro. The Journal of Physical Chemistry B 114 : 15656-15662.

Gietz, R., Schiestl, R., Willems, A.,and Woods, R. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. Yeast 11 : 355-360.

Goffeau, A., et al. 1996. Life with 6000 genes. Science 274 : 546-567.

Goldberg, A.L. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature 426 : 895-899.

Goldberg, A.L.,and Goff, S. 1986. The selective degradation of abnormal proteins in bacteria. Butterworths, Boston : Butterworth Press.

Götz, R., Gnann, A.,and Zimmermann, F. 1999. Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast Saccharomyces cerevisiae causes an oxygen-sensitive growth defect. Yeast 15 : 855-864.

Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G., Voss, D.,and Hegemann, J. 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucleic Acids Research 30 : e23.

Henikoff, S.,and Furlong, C. 1983. Sequence of a Drosophila DNA segment that functions in Saccharomyces cerevisiae and its regulation by a yeast promoter. Nucleic Acids Research 11 : 789-800.

Isik, S., Guler, O., Kockar, F., Aydin, M., Arslan, O.,and Supuran, C. 2010. Saccharomyces cerevisiae β-carbonic anhydrase: inhibition and activation studies. Current Pharmaceutical Design 16 : 3327-3336.

Isik, S., et al. 2009. Carbonic anhydrase activators: activation of the beta-carbonic anhydrase Nce103 from the yeast Saccharomyces cerevisiae with amines and amino acids. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19 : 1662-1665.

Krungkrai, J., Krungkrai, S.R.,and Supuran, C.T. 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of Plasmodium falciparum carbonic anhydrase with aromatic/heterocyclic sulfonamides--in vitro and in vivo studies. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18 : 5466-5471.

Krungkrai, J., et al. 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of Plasmodium falciparum carbonic anhydrase with aromatic sulfonamides: towards antimalarials with a novel mechanism of action? Bioorganic & Medicinal Chemistry 13 : 483-489.

Krungkrai, J.,and Supuran, C. 2008. The alpha-carbonic anhydrase from the malaria parasite and its inhibition. Current Pharmaceutical Design 14 : 631-640.

Krungkrai, S., Suraveratum, N., Rochanakij, S.,and Krungkrai, J. 2001. Characterisation of carbonic anhydrase in Plasmodium falciparum. International Journal for Parasitology 31 : 661-668.

Kumar, A., et al. 2002. An integrated approach for finding overlooked genes in yeast. Nature Biotechnology 20 : 58-63.

Mager, W.H.,and Winderickx, J. 2005. Yeast as a model for medical and medicinal research. Trends in Pharmacological Sciences 26 : 265-273.

Na-Bangchang, K.,and Congpuong, K. 2007. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. The Tohoku Journal of Experimental Medicine 211 : 99-113.

Nishida, H., Beppu, T.,and Ueda, K. 2009. Symbiobacterium lost carbonic anhydrase in the course of evolution. Journal of Molecular Evolution 68 : 90-96.

Prapunwattana, P., Sirawaraporn, W., Yuthavong, Y.,and Santi, D. 1996. Chemical synthesis of the Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. Molecular and Biochemical Parasitology 83 : 93-106.

Rai, M.,and Padh, H. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. Current Science 80 : 1121-1128.

Reungprapavut, S., Krungkrai, S.,and Krungkrai, J. 2004. Plasmodium falciparum carbonic anhydrase is a possible target for malaria chemotherapy. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 19 : 249-256.

Rodríguez-Gabriel, M., Remacha, M.,and Ballesta, J. 2000. The RNA interacting domain but not the protein interacting domain is highly conserved in ribosomal protein P0. The Journal of Biological Chemistry 275 : 2130-2136.

Romanos, M., et al. 1991. Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. Nucleic Acids Research 19 : 1461-1467.

Romanos, M., Scorer, C.,and Clare, J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. Yeast 8 : 423-488.

Sambrook, J.,and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 2. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sein, K.,and Aikawa, M. 1998. The pivotal role of carbonic anhydrase in malaria infection. Medical Hypotheses 50 : 19-23.

Simon, J.,and Bedalov, A. 2004. Yeast as a model system for anticancer drug discovery. Nature reviews. Cancer 4 : 481-492.

Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y.,and Hay, S.I. 2005. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. Nature 434 : 214-217.

Supuran, C. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nature Reviews Drug Discovery 7 : 168-181.

Teng, Y.B., et al. 2009. Structural insights into the substrate tunnel of Saccharomyces cerevisiae carbonic anhydrase Nce103. BMC Structural Biology 9 : 67-76.

Toyn, J., Gunyuzlu, P., White, W., Thompson, L.,and Hollis, G. 2000. A counterselection for the tryptophan pathway in yeast: 5-fluoroanthranilic acid resistance. Yeast 16 : 553-560.

Tucker, C.L. 2002. High-throughput cell-based assays in yeast. Drug Discovery Today 7 : S125-S130.

Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R.,and Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in Saccharomyces cerevisiae. Yeast 10 : 1793-1808.

Wagenbach, M., et al. 1991. Synthesis of wild type and mutant human hemoglobins in Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology 9 : 57-61.

Wider, D., Péli-Gulli, M.P., Briand, P.A., Tatu, U.,and Picard, D. 2009. The complementation of yeast with human or Plasmodium falciparum Hsp90 confers differential inhibitor sensitivities. Molecular and Biochemical Parasitology 164 : 147-152.

Zaret, K.,and Sherman, F. 1982. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. Cell 28 : 563-573.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone dextrose (YPD)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Glucose	20 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 4.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone adenine uracil dextrose (YPAUD)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Glucose	20 กรัม
Adenine	400 มิลลิกรัม
Uracil	200 มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast peptone adenine uracil dextrose (YPAUD agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD ละลายอะการ์ 20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว synthetic complete medium (SC medium)

Yeast nitrogen base without amino acid	6.7 กรัม
Glucose	20 กรัม
10 x amino acid without uracil	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 4.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Synthetic complete medium (SC medium agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SC medium ละลายอะการ์ 20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone galactose (YPGal)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Galactose	20 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 4.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10 x amino acid without uracil

Adenine sulfate	200 มิลลิกรัม
L-Tryptophan	200 มิลลิกรัม
L-Histidine HCl	200 มิลลิกรัม
L-Argine HCl	200 มิลลิกรัม
L-Methionine	200 มิลลิกรัม
L-Tryosine	300 มิลลิกรัม
L-Leucine	1000 มิลลิกรัม
L-Isoleucine	300 มิลลิกรัม
L-Lysine HCl	300 มิลลิกรัม
L-Phenylalanine	500 มิลลิกรัม
L-Glutamic acid	1000 มิลลิกรัม
L-Aspartic acid	1000 มิลลิกรัม

L-Valine	1500 มิลลิกรัม
L-Threonine	2000 มิลลิกรัม
L-Serine	4000 มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5-FAA

Glucose	5 กรัม
Bacto agar	2 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยอาหารให้เย็นลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นให้เติมสารตามข้างล่างในตู้ laminar

10x Yeast nitrogen base	10 มิลลิลิตร
10x Supplements stock (w/o Tryptophan, Uracil and Leucine)	10 มิลลิลิตร
Tryptophan (1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	100 ไมโครลิตร
Uracil (0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	1 มิลลิลิตร
Leucine (1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	1 มิลลิลิตร
5-Fluoroanthranilic acid	500 ไมโครลิตร

*ต้องนำสารไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ก่อนใส่ลงในฟลาสก์ที่นำไปนึ่งฆ่าเชื้อข้างต้น

ภาคผนวก ข
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีก 2 รอบ

สารละลาย Tris-HCl 1 M ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Trisma base	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มิลลิลิตร

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA 0.5 M ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

EDTA	186.1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Tris-HCl	10 มิลลิโมลาร์
EDTA	1 มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242 กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1 มิลลิลิตร

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 100 มิลลิลิตร ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุ จนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

High extraction buffer

Tris-HCl, pH 8.0	250 มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA, pH 8.0	50 มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	125 มิลลิโมลาร์
น้ำปลอดประจุ	

สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมผงไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ดูดชั้นฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-เบสให้ได้เท่ากับ 7.8 (ใช้ pH paperวัด) ถ้ายังไม่ได้ให้ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8.0 ลงไปอีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25 : 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Loading dye

Bromphenolblue	0.025%
ซูโครส	40%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายโซเดียมอะซีเตท 3 M ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโปรตีเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย RNase A 10 mg/ml

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

70% เอธานอล

99% เอธานอล	700 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300 มิลลิลิตร

สารละลาย 50% PEG

ผสมสารละลาย PEG 50 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อกับน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย carrier DNA 2 mg/ml

ละลาย ดีเอ็นเอที่มีมวลโมเลกุลสูง (Deoxyribonuclei acid Sodium salt Type III from salmon testes) น้ำหนัก 2 มิลลิกรัมในน้ำให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

บัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS, Ca^{2+}, Mg^{2+} Free) **ความเป็นกรด-เบส** 7.4

NaCl	8.0 กรัม
KCl	0.2 กรัม
$NaHPO_4$	1.44 กรัม
KH_2PO_4	0.24 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 0.5 M EGTA

ละลาย EGTA จำนวน 9.52 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 5 M NaCl

ละลาย NaCl จำนวน 14.625 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 1 M Dithiothreitol (DTT)

ละลาย DTT จำนวน 3.09 กรัม ใน Sodium acetate ความเข้มข้น 0.01 M pH 5.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรอง (filter disc) ขนาด 0.22 ไมโครเมตรแบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย 1 M Tris-HCl (ค่าความเป็นกรด-เบส 7.2)

ละลาย Tris-HCl จำนวน 15.76 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 7.2 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Buffer A สำหรับสกัดโปรตีน

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	0.5 มิลลิลิตร
0.1 M EDTA (pH 8.0)	0.5 มิลลิลิตร
0.5 M EGTA (pH 8.0)	0.2 มิลลิลิตร
5 M NaCl	0.05 มิลลิลิตร
100% Tween20	0.005 มิลลิลิตร
100% glycerol	1 มิลลิลิตร
ddH2O	7.745 มิลลิลิตร

สารละลาย Buffer B สำหรับสกัดโปรตีน

Buffer A	690 ไมโครลิตร
10% SDS	200 ไมโครลิตร
10x protease inhibitor	100 ไมโครลิตร
Phosphatase	10 ไมโครลิตร
1 M DTT	1 ไมโครลิตร

สารละลาย BCA™ protein assay

สารละลาย A	50 ส่วน
สารละลาย B	1 ส่วน

สารละลาย 1.5 M Tris ความเป็นกรด-เบส 8.8

ละลาย trisma base จำนวน 90.855 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 8.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น เวลา 15 นาที

สารละลาย 1 M Tris ความเป็นกรด-เบส 6.8

ละลาย trisma base จำนวน 12.114 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 6.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 10% SDS

ละลาย SDS (Sodium dodecyl sulfate) จำนวน 5 กรัมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 40 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.2 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 50 มิลลิลิตร

สารละลาย 10% Ammonium persulfate (APS)

ละลาย Ammonium persulfate จำนวน 0.5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12% Separating gel

ddH2O	3.436 มิลลิลิตร
40% Acrylamide	2.4 มิลลิลิตร
1.5 M Tris pH 8.8	2.0 มิลลิลิตร
10% SDS	0.08 มิลลิลิตร
10% APS	0.08 มิลลิลิตร
TEMED	0.004 มิลลิลิตร

5% staking gel

ddH2O	1.204 มิลลิลิตร
40% Acrylamide	0.25 มิลลิลิตร
1 M Tris pH 6.8	0.504 มิลลิลิตร
10% SDS	0.02 มิลลิลิตร
10% APS	0.02 มิลลิลิตร
TEMED	0.002 มิลลิลิตร

สารละลาย 5x Running buffer

trisma base	15.1 กรัม
glycine	94 กรัม
SDS	5 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 2x loading buffer

10% SDS	4 มิลลิลิตร
Glycerol 87%	2.29 มิลลิลิตร
1.0 M Tris pH 6.8	1 มิลลิลิตร
ddH2O	2.71 มิลลิลิตร
Bromphenol blue	0.001 กรัม

สารละลาย Staining buffer

β-mercapto ethanol	100 ไมโครลิตร
2x loading buffer	900 ไมโครลิตร

สารละลาย Transfer buffer

Glycine	2.9 กรัม
Trisma base	15.1 กรัม

SDS	0.37 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ 700 มิลลิลิตร เติมเมทานอลสัมบูรณ์จำนวน 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 10x Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	80.0 กรัม
KCl	2.0 กรัม
$NaHPO_4$	14.4 กรัม
KH_2PO_4	2.4 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Phosphate buffer saline tween20 (PBST)

1x Phosphate buffer	1 ลิตร
Tween 20	0.5 มิลลิลิตร

สารละลาย Blocking solution (PBST in 3% non-fat dry milk)

PBST	200 มิลลิลิตร
skim milk	6 กรัม

ECL Western blot reagent

สารละลาย 1	2 มิลลิลิตร
สารละลาย 2	2 มิลลิลิตร

น้ำยาล้างฟิล์ม

Developer	1 ส่วน : น้ำ 4 ส่วน
Fixer	1 ส่วน : น้ำ 4 ส่วน

น้ำปลอด RNAase (DEPC water)

เติมสารละลาย Diethylpyrocarbonate (DEPC) 10 ไมโครลิตรลงในน้ำ HPLC ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 70% Ethanol in DEPC water

Absolute Ethanol	70 มิลลิลิตร
DEPC water	30 มิลลิลิตร

สารละลาย 50x TAE buffer

Tris base acetate	48.4 กรัม
Garcial acetic acid	11.42 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0	20 มิลลิลิตร

นำแต่ละส่วนค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1% Agarose gel

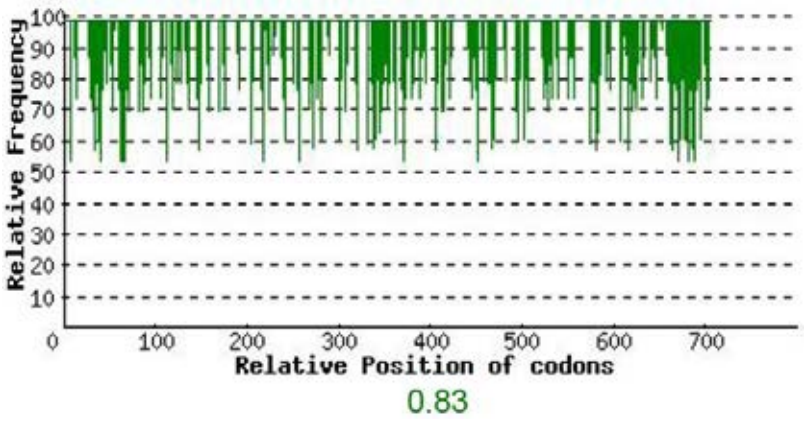
สารละลาย 1x TAE buffer	20 มิลลิลิตร
Agarose gel	0.2 กรัม

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

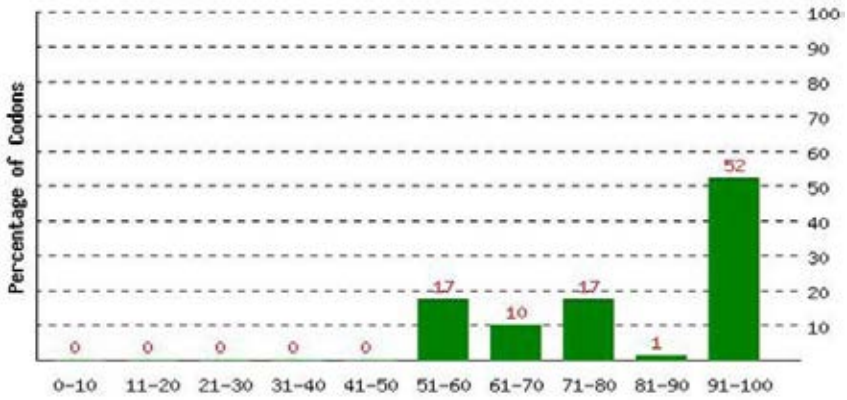
ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ผล

```
Opt_pfCA1       ATGAAAGACTTGAAGGAAAGAGAATTGAAGAACATCAGTGACGTTTACTTGAACTTATTT
Opt_pfCA2       ATGAAGGATTTGAAAGAAAGAGAATTGAAGAACATCTCCGACGTCTACTTGAACTTGTTC
pfCA            ATGAAAGATTTAAAGGAGAGAGAATTAAAAAATATAAGTGATGTGTATTTAAATTTATTT
                ***** ** ** ** ** ******** ** ** **    ** ** ** ** ** ** **

Opt_pfCA1       GACGACGACAACTATGCTTGGAACAACTACAATAAGCCATGGATGAAGGGTGACTTTTTC
Opt_pfCA2       GATGATGATAATTACGCCTGGAACAACTACAACAAACCATGGATGAAGGGTGATTTCTTC
pfCA            GACGATGACAATTATGCATGGAACAATTATAACAAACCATGGATGAAAGGAGATTTTTTT
                ** ** ** ** ** ** ******** ** ** ** *********** ** ** ** **

Opt_pfCA1       TATTACTACGAATACTTCATTAAAAAGATCGTTATTAACAGACAAAATAACATTTTCCAA
Opt_pfCA2       TACTACTACGAATACTTCATCAAGAAGATCGTCATCAACAGACAAAACAACATCTTCCAA
pfCA            TATTATTATGAATATTTTATAAAAAAAATTGTTATTAATAGACAAAATAATATATTTCAA
                ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ******** ** ** ** ***

Opt_pfCA1       ATTAAAGCTGCAAGAGATGGTATTATACCATTTGGTGTCTTATTCACTACAGAACAACCT
Opt_pfCA2       ATCAAGGCTGCCAGAGATGGTATTATTCCATTTGGTGTTTTGTTCACCACTGAACAACCA
pfCA            ATAAAAGCTGCAAGAGATGGAATAATACCATTTGGTGTGTTATTTACTACTGAACAACCT
                ** ** ***** ******** ** ** *********** ** ** ** ** ********

Opt_pfCA1       GCCATGTTTTACGCTGACCAAATTCATTTCCACGCTCCTTCCGAACATACATTTCAAGGT
Opt_pfCA2       GCTATGTTTTACGCCGATCAAATTCATTTTCATGCCCCATCTGAACATACCTTTCAAGGT
pfCA            GCTATGTTTTATGCAGATCAAATCCATTTTCATGCTCCTAGCGAACATACATTTCAAGGT
                ** ******** ** ** ***** ***** ** ** **    ******** *********

Opt_pfCA1       AGTGGTAACAGAAGAGAAATCGAAATGCAAATATTTCACTCCACCAACTACTTCTACGAT
Opt_pfCA2       TCTGGTAATAGAAGAGAAATCGAAATGCAAATCTTCCACTCCACCAACTACTTCTACGAT
pfCA            TCAGGTAATAGAAGAGAAATTGAAATGCAAATATTTCATAGTACAAATTATTTTTATGAT
                   ***** *********** *********** ** **    ** ** ** ** ** ***

Opt_pfCA1       ATACAAGATGACAAGTCTAAGTACAAAAAGAAATACGGTTTGCATATCTATAACAACTTG
Opt_pfCA2       ATCCAAGATGACAAGTCCAAGTACAAGAAGAAGTACGGTTTACACATCTACAACAACTTG
pfCA            ATACAAGATGATAAATCCAAATATAAAAAAAAATACGGGTTACATATATATAATAATTTA
                ** ******** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** **

Opt_pfCA1       AAGAAAAATTCTAAAGAAACTTCAAAGAAAGACTCTTCAAGATACCACTCCTATTTGATG
Opt_pfCA2       AAGAAGAACTCCAAAGAAACCTCCAAGAAGGACTCTTCTAGATACCATTCTTACTTGATG
pfCA            AAAAAAAATTCAAAAGAAACTTCAAAAAAAGATTCAAGTAGATATCATTCTTATCTTATG
                ** ** ** ** ******** ** ** ** ** **    ***** ** ** **  * ***

Opt_pfCA1       TCATTTTTGATGAACTCCTTGAGTAACGAACAATTGCAAAATAAGTACAACAAGAAAAAG
Opt_pfCA2       TCTTTCTTGATGAACTCCTTGTCCAACGAACAATTGCAAAACAAGTACAACAAAAAGAAA
pfCA            TCCTTTCTAATGAATAGCTTATCAAATGAACAATTACAAAACAAATATAATAAAAAAAAA
                ** **  * *****   ***    ** ******** ***** ** ** ** ** ** **

Opt_pfCA1       AGAATTAAAAAGATGAAGAATCAATATGAAGTTATATCTATCACCTTTACTTCAGCAGAA
Opt_pfCA2       AGAATCAAAAAGATGAAGAATCAATACGAAGTCATCTCCATCACTTTCACCTCTGCTGAA
pfCA            AGAATAAAAAAGATGAAAAACCAATATGAAGTAATATCTATTACATTTACTAGTGCAGAA
                ***** *********** ** ***** ***** ** ** ** ** ** **    ** ***

Opt_pfCA1       ATTAATGCCTCTACAATCAACGCATTCAAAAAGTTGCCATCAGAAAAGTTTTTAAGAACA
Opt_pfCA2       ATCAATGCTTCTACCATTAACGCCTTTAAGAAGTTGCCATCCGAAAAGTTCTTGAGAACT
pfCA            ATTAATGCTTCAACTATTAATGCTTTTAAGAAATTACCATCAGAAAAATTTCTAAGAACT
                ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ***** **  * *****

Opt_pfCA1       ATAATCAATGTCAGTAGTGCCGTACACGTAGGTAGTGGTAACAAGGATTACAAAGATGAT
Opt_pfCA2       ATCATCAACGTTTCTTCCGCTGTTCATGTTGGTTCTGGTAACAAAGATTACAAAGATGAT
pfCA            ATAATAAATGTATCAAGTGCAGTTCACGTCGGCTCAGGTAATAAAGATTACAAAGATGAT
                ** ** ** **       ** ** ** ** **    ***** ** ***************

Opt_pfCA1       GATGATAAATAA
Opt_pfCA2       GATGATAAATAA
pfCA            GATGATAAATAA
                ************
```

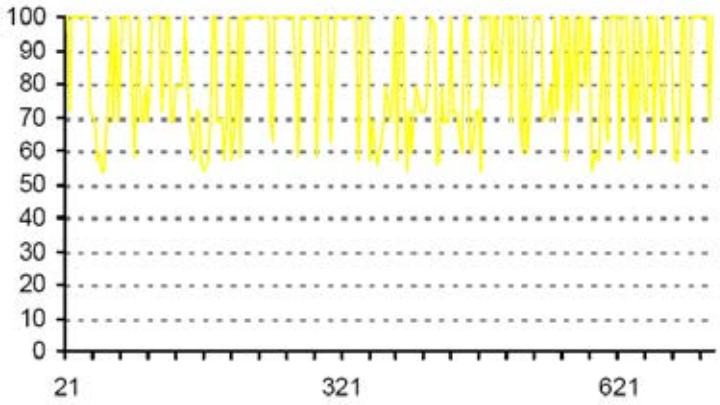


ภาพที่ ค1 Codon adaptation index ของยีน *Opt_pfCA1*

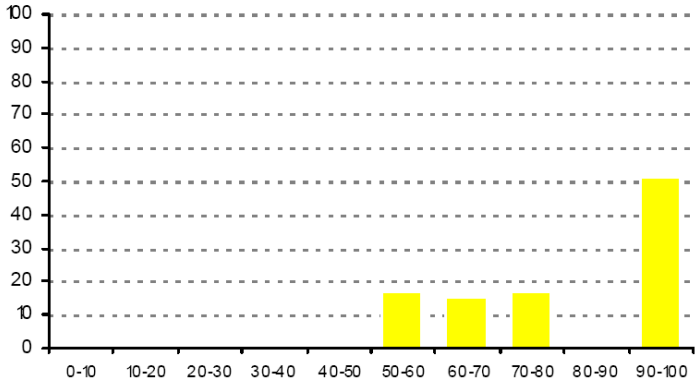


ภาพที่ ค2 Frequency of optimal codons ของยีน *Opt_pfCA1*

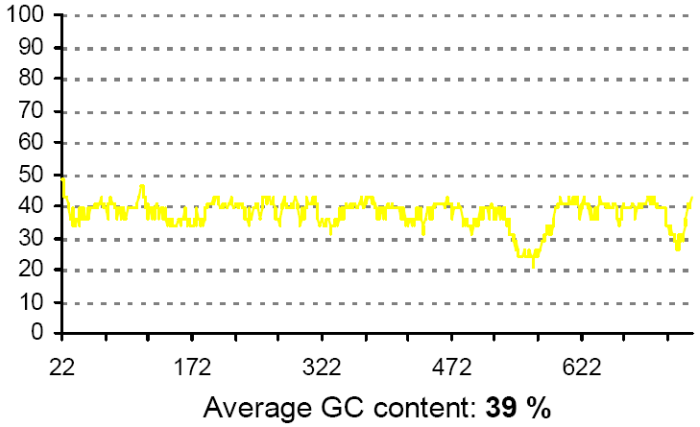
ภาพที่ ค3 GC content adjustment ของยีน *Opt_pfCA*



ภาพที่ ค4 Codon quality plot ของยีน *Opt_pfCA2*



ภาพที่ ค5 Codon quality distribution ของยีน *Opt_pfCA2*



ภาพที่ ค6 GC content ของยีน *Opt_pfCA2*

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภาคภูมิ ปานตั้น เกิดเมื่อวันที่ 10 กันยายน พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2551 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

ผลงานทางวิชาการ

Panthan, B., Krungkrai, J. and Yompakdee, C. *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase cannot functionally complement *Saccharomyces cerevisiae* lacking the carbonic anhydrase-like protein NCE103. The 37th Congress on Science and Technology of Thailand; 2011 October 10-12, Centara Grand & Bangkok Convention Centre at Central World, Bangkok, Thailand.

Panthan, B., Krungkrai, J. and Yompakdee, C. Expression of *Plasmodium falciparum* Carbonic Anhydrase in *Saccharomyces cerevisiae* Deletion Mutant Δ*nce103.* TRF-Master Research Congress VI; 2012 April 4-6, Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Chonburi, Thailand.