บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง

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. เครื่อง FACSCalibur Flow Cytometer รุ่น BD FACSCalibur™ ของบริษัท BD Biosciences, USA
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น NST 2000 ของบริษัท EYELA, Japan
12. เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator) รุ่น RK100 บริษัท BANDELIN, Germany
13. Ultraonicator) รุ่น UP 50 H บริษัท Dr. Hielscher GmbH, Germany
14. เครื่องนับจำนวนเม็ดเลือด (Haemacytometer)
15. ชุดเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-1NW บริษัท EYELA, Japan
16. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
17. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
18. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร Restek,Thailand
19. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

- Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA

20. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-ex, Japan

3.2 เคมีภัณฑ์

1. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
2. กลูโคสของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท Prondisa, Spain
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
7. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E Merck, Germany
8. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France
9. ลิเทียมอะซิเตรด(LiAc) ของบริษัท E Merck, Germany
10. carrier DNA ดีเอ็นเอที่มีมวลโมเลกุลสูง(Deoxyribonuclei acid Sodium salt Type III from salmon testes) ของบริษัท Sigma, USA
11. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท E Merck, Germany
12. NP-40 ของบริษัท Bio Basic, USA
13. Propidium iodide (PI) ของบริษัท Sigma, USA
14. Ortho-nitrophenyl-b-D-*GAL*actopyranoside(ONPG)ของบริษัท Bio Basic, USA
15. Polyethylene glycol(PEG) ของบริษัท Sigma, USA
16. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA
17. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$) ของบริษัท Sigma, USA
18. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
19. เอนไซม์ตัดจำเพาะทุกชนิดของบริษัท New England Biolabs, UK
20. 100 bp และ 1 kb DNA ladder ของบริษัท Fermentas, USA
21. Phusion polymerase ของบริษัท New England Biolabs, UK
22. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, UK
23. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA

24. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA

25. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany

26. ชุดไลเกชั่นคิด Rapid DNA Ligation Kit ของบริษัท Fermentas, USA

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3. ยีสต์และแบคทีเรีย

รายละเอียดของยีสต์และแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองได้แสดงในตารางที่ 3.1และ3.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สายพันธุ์ยีสต์	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง/แหล่งที่มา
W303	*trp1 leu2 ade2 ura3 his3 can1-1*	R. Rothstein
Δzds1	เหมือนกับ W303 ยกเว้น *zds1::TRP1 syr1::HIS3 pdr1::hisG-URA3-hisG pdr3::hisG-URA3-hisG*	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima university
Δmpk1	เหมือนกับ W303 ยกเว้น *TRP1 mpk1::HIS3 syr1::HIS3 pdr1::hisG-URA3-hisG pdr3::hisG-URA3-hisG*	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima university
Δcnb1	เหมือนกับ W303 ยกเว้น *TRP1 cnb1::HIS3 syr1::HIS3 pdr1::hisG-URA3-hisG pdr3::hisG-URA3-hisG*	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima university

ตารางที่ 3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สายพันธุ์แบคทีเรีย	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
E. coli สายพันธุ์ DH5α	ϕ80d*lacZ*ΔM15, *endA*1, *recA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *relA*1, *supE*44, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*)U169	Hanahan, 1983

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้

พลาสมิด	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	หมายเหตุ
pYES2		บริษัท Invitrogen
pYES2::*GAL1*p-CMPΔ2	มีชิ้นส่วน *GAL1*p-*CMPΔ2* แทรกในพลาสมิด pYES2	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima university
pYES2:: *GAL1*p-MCK1	มีชิ้นส่วน *GAL1*p-*MCK1* แทรก ใน พลาสมิด pYES2	สร้างในการทดลองนี้
pNV7:: *GAL1*p-MPK1	มีชิ้นส่วน*GAL1*p-MPK1 แทรก ใน พลาสมิด pNV7	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima university
pKC201	pPMR2A-*lacZ*	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima university

ตารางที่ 3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	หมายเหตุ
Mck1-Fw	CCC AAG CTT GGG ATG TCT ACG GAA (60.8°ซ)	สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการทดลองนี้
Mck1-Rv	TTC AAC GAC TTA TTG CCC TAG GCG (59.2 °ซ)	สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการทดลองนี้

3.5 วิธีการสร้างพลาสมิด pYES2::*GAL1*p-*MCK1*

แทรกยีน *MCK1* ในพลาสมิด pYES2 ในตำแหน่งล่างลงมาของ *GAL1* promoter ซึ่งมีลำดับเบสที่จำเพาะต่อเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind* IIIและ *Bam*H I ตามลำดับ

3.5.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ W303

สกัดดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์ W303 โดยวิธีเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YPAUD (ภาคผนวก ก) ที่ 30 องศาเซลเซียสข้ามคืนปั่นแยกเซลล์ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วล้างเซลล์โดยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 ไมโครลิตร ปั่นแยกเซลล์ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อีกครั้ง นำเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 200 ไมโครลิตร ของสารละลาย A (สารละลายA ประกอบด้วย 2 % Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0 และ 1 mM EDTA) 200 ไมโครลิตรของPhenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) (ภาคผนวก ข) และ 0.3 กรัมของเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52-0.45 ไมครอน หลังจากนั้น เขย่าผสมโดยใช้เครื่องเขย่าผสมเป็นเวลา 3 นาที 30 วินาที แล้วจึงเติม 200 ไมโครลิตร TE บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) ปั่น 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) ปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาเติม 1 มิลลิลิตร ของเอทานอลบริสุทธิ์ ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ มาเติม 400 ไมโครลิตร ของTE บัฟเฟอร์ pH8.0 และ RNase A 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติม แอมโมเนียมอะซิเตต (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตร ของเอทานอลบริสุทธิ์ และไกลโคเจน ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30นาที แล้วจึงปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาล้างด้วย70 %เอทานอล ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย 50 ไมโครลิตร ของ TE บัฟเฟอร์

3.5.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นช่วง ORF ของยีน *MCK1* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

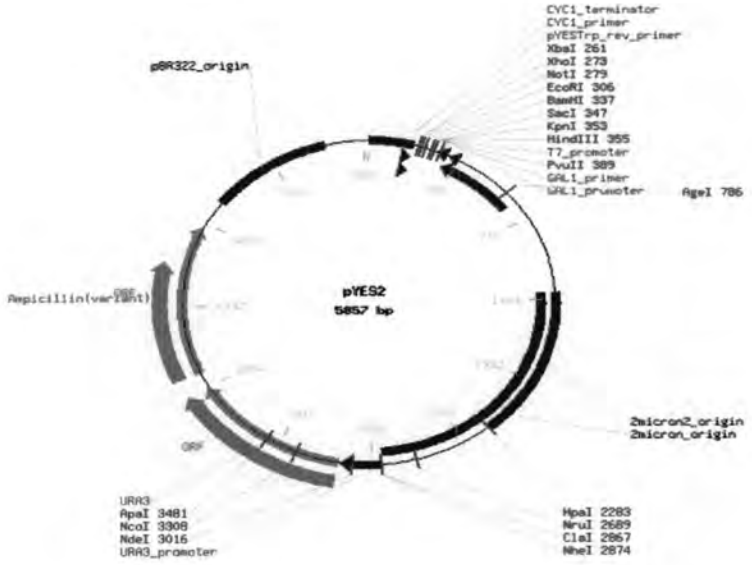
นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.1 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ Mck1-Fw และ Mck1-Rv ซึ่งจำเพาะต่อช่วง ORF ของยีน *MCK1* ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้านปลาย 5' และ 3' มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Bam*H I ตามลำดับ โดยใช้สภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 15 นาที; 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, 35 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียม อะกาโรสเข้มข้น 1.0% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอหรือหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mupid ตั้งความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนเกือบสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA)

3.5.3 ตัดผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสและพลาสมิด pYES2 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ตัดผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากข้อ 3.4.1.2 และพลาสมิด pYES2 (รูปที่ 3.1) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*d III และ *Bam*H I โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ ดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม 10X บัฟเฟอร์ 1/10 ของปริมาตรทั้งหมด เรสทริกชันเอนไซม์ 1 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอและปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายตามต้องการด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.4.1.2 และสกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ด้วยชุดสกัด พลาสมิดออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข) 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 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 นำไปหมุนเหวี่ยง

ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส



รูปที่ 3.1 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิด pYES2

3.5.4 ไลเกชัน (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด pYES2

ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอของยีน *MCK1* เข้ากับพลาสมิด pYES2 ซึ่งเตรียมได้ในข้อ 3.4.1.3 ด้วยไลเกสคิด (Fermentus, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร) ดังนี้ 5X Rapid Ligation Buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอและ พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.5.3 ปริมาตร 1 และ 5 ไมโครลิตรตามลำดับ และน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกและ พลาสมิดเวกเตอร์สามารถแปรผันได้ตามความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอ)

3.5.5 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.4.1.4 เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5∝ และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *MCK1* สอดแทรกอยู่ภายในพลาสมิด pYES2

3.5.5.1 เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell)

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ด้วยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* DH5∝ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน (16-18

ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง OD_{600} มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5

เตรียมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (เตรียมก่อนใช้และทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) โดยผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย $CaCl_2$ ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4$ ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุ ปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งจนกว่าจะใช้

เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD_{600} ที่ต้องการ ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ที่เย็นจำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุนเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30-45 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที หรือมากกว่า แล้วเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อปริมาตร 875 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตรประมาณหลอดละ 100-300 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.5.5.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.5.4 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5∝ ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5∝ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสมาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้จากข้อ 3.5.4 ทั้งหมดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5∝ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที โดย heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา

2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในหลอดปลอดเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* DH5∝ ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิ แนนท์พลาสมิดแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง

3.5.5.3 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

คัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5∝ ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีนที่ต้องการสอดแทรกอยู่ด้วยวิธี Colony Cracking (http://kuchem.kyotou.ac.jp/seika/shiraishi/protocols/cracking.html) ดังนี้ นำโคโลนีที่ได้จากข้อ 3.5.5.2 มาเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อนำโคโลนีของ *E. coli* ดังกล่าวมาละลายใน 20 ไมโครลิตรของสารละลาย cracking buffer (สารละลาย cracking buffer ประกอบด้วย 50 mM NaOH, 0.5% SDS และ 5 mM EDTA) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 4 ไมโครลิตรของ 6x loading dye (ภาคผนวก ข) และตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.5.2 โดยใช้พลาสมิด pYES2 เป็นชุดควบคุมผลลบ และเลือกโคโลนีที่มีขนาดพลาสมิดที่ถูกต้องเพื่อการใช้งานในขั้นตอนต่อไป

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน *MCK1* แทรกอยู่ในพลาสมิด pYES2 โดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีขนาดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ถูกต้องมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* DH5∝ ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครฟิวจ์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เท

ส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการอยู่จริง จึงได้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอแม่แบบโดยใช้พลาสมิด pYES2 และดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.1 เป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ และใช้ไพรเมอร์ Mck1-Fw และ Mck1-Rv ตามวิธีที่ได้กล่าวในข้อ 3.5.2 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.5.2

3.6 การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยระบบยีสต์จากตัวอย่างพืช

3.6.1. เก็บรวบรวมตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่มีรายงานสรรพคุณต้านอักเสบหรือพืชอื่นๆที่ไม่มีรายงานสรรพคุณทั้งที่ได้จากการซื้อที่ร้านหรือได้จากแหล่งที่ปลูกหรือแหล่งที่เจริญในประเทศไทย ทำการจดบันทึกชื่อสามัญ (Common name), ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name), ชื่อวงศ์ (Family name) และส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการทดลอง รายละเอียดของพืชที่ใช้ในการทดลองนี้แสดงในตาราง 3.5

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Acanthaceae	AEB	*Acanthus ebracteatus* Vahl	เหงือกปลาหมอดอกขาว	ทั้งต้น
	AIL	*Acanthus ilicifolius*. L	เหงือกปลาหมอดอกม่วง	ทั้งต้น
	AVA	*Adhatoda vasica* Nees	เสนียด	ราก

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
	APA	*Andrographis paniculata*	ฟ้าทลายโจร	ทั้งต้น
	BPU	*Barleriaiu pulina* Lindl.	สเลดพังพอน	ทั้งต้น
	CNU	*Clinacanthus nutans* (Burm.F.) Lindau	พญายอ	ทั้งต้น
	RNA	*Rhinacanthus nasutus* (L.)Kurz.	ทองพันชั่ง	ทั้งต้น
	TLA	*Thunbergia laurifolia* L.	รางจืด	ลำต้น
Aizoaceae	GOP	*Glinus oppositifolius* A.DC.	ผักขวง	ทั้งต้น
Alliceae	ALSA	*Allium sativum* Linn.	กระเทียม	ใบ
Amaranthaceae	IHE	*Iresine herbstii* Hook f.	ผักแผ่วแดง	ทั้งต้น
Amaryllidaceae	CAS	*Crinum asiaticum* Linn.	พลับพลึง	ใบ
Anacardiaceae	MUS	*Melanorrhoea usitata* Wall.	รักใหญ่	ใบ
Apocynaceae	AGMA	*Aganosma marginata*	มะเดื่อดิน	ลำต้น
	ASC	*Alstonia scholaris* (Linn.) R. Br.	พญาสัตบรรณ	ลำต้น

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Araceae	AIN	*Alocasia indica* Schott var. metallica Schott	กระดาษแดง	เปลือกไม้
	AOD	*Alocasia odorata C. Koch*	อุตพิด	หัวใต้ดิน
	ABL	*Amorphophallus companulatus* Blume.ex Dene	บุก	หัวใต้ดิน
	LSP	*Lasia spinosa* Thw.	ผักหนาม	ราก
Asclepiadaceae	HOV	*Hoya ovalifolia* W. & A.	นมตำเลีย	ทั้งต้น
Asparagaceae	ARA	*Asparagus racemosus* willd	สามสิบ	ราก
Asteraceae	PIN	*Pluchea indica* (Linn.) Less.	ขลู่	ทั้งต้น
	SAC	*Spilanthes acmella* Murr.	ผักคราดหัวแหวน	ทั้งต้น
Avicenniaceae	AAL	*Avicennia alba Bl.*	แสมขาว	ใบ
Bixaceae	BOR	*Bixa orellana* L.	คำแสด	เมล็ด
Boraginaceae	HIN	*Heliotropium indicum*	หญ้างวงช้าง	ทั้งต้น
Caesalpiniaceae	CGA	*Cassia garrettiana*	แสมสาร	ลำต้น
	CSA	*Caesalpinia sappan* Linn.	ฝาง	ลำต้น

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Caesalpiniaceae	CTO	*Cassia tora Linn.*	ชุมเห็ดไทย	ลำต้น
Caricaceae	CPAA	*Carica papaya Linn.*	มะละกอ	ลำต้น
Celastraceae	SCE	*Siphonodon celastrineus* Griff.	มะดูก	ลำต้น
Cleomaceae	CVI	*Cleome viscosa* Linn.	ผักเสี้ยนผี	ทั้งต้น
Clusiaceae	GAC	*Garcinia acuminated* Planch. & Triana	รงทอง	ยาง
Combretaceae	LLI	*Lumnitzera littorea Voigt*	ฝาดแดง	ใบ
	TBE	*Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.	สมอพิเภก	เมล็ด
	TCH	*Terminalia chebula* Retz. var. *chebula*	สมอไทย	เมล็ด
Compositae	ACO	*Ageratum conyzoides Linn.*	สาบแร้งสาบกา	ทั้งต้น
	ASCO	*Artemisia scoparia Waldst. & Kit.*	เทียนเยาวพาณี	เมล็ด

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Compositae	CTI	*Carthamus tinctorius Linn.*	คำฝอย	ดอก
	CAN	*Centratherum anthelminthicum (Willd.) Kuntz.*	เทียนลวด	เมล็ด
	CGR	*Coccinia grandis* (Linn.) Voigt.	ตำลึง	ลำต้น
	EPR	*Eclipta prostrata* Linn.	กะเม็ง	ทั้งต้น
	EST	*Eupatorium stoechadosnum* Ham	สันพร้าหอม	ทั้งต้น
	GPS	*Gynura pseudo – china hispida*	มหากาฬ	หัวใต้ดิน
	TCU	*Trichosanthes cucumerrina* Linn.	บวบขม	เมล็ด
	VCI	*Vermonia cinerea* Less.	หญ้าดอกขาว	ทั้งต้น
Cucurbitaceae	GIN	*Gymnopetalum integriforium* Kurz.	ขี้กาแดง	ทั้งต้น

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Cucurbitaceae	MCH	*Momordica charantia* L.	มะระ	ทั้งต้น
	MOCO	*Momordica cochinensis* (Lour.) Spreng.	ฟักข้าว	ลำต้น
Dioscoreaceae	DHI	*Dioscorea hispida Dennst.*	กลอย	หัวใต้ดิน
Euphorbiaceae	BMO	*Baliospermum montanum Muell. Arg.*	ตองแตก	ใบ
	BOV	*Bridelia ovata* Decne	มะกา	ใบ
	COR	*Cladogynos orientalis* Zipp.ex Span.	เจตพังคี	ราก
	CTIG	*Croton tiglium Linn.*	สลอด	เมล็ด
	EHI	*Euphorbia hirta*	น้ำนมราชสีห์	ดอก
	ECO	*Excoecarice cochinueuse*	กระบือเจ็ดตัว	ทั้งต้น

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Euphorbiaceae	GMU	*Gelonium multiflorum* A. Juss.	ขันทองพยาบาท	ลำต้น
	COB	*Croton oblongifolius* Roxb.	เปล้าใหญ่	ลำต้น
	PAC	*Phyllanthus acidus* Skeels.	มะยม	ลำต้น
	PEM	*Phyllanthus emblica* Linn.	มะขามป้อม	เมล็ด
	PAM	*Phyllanthus* amarus Schum. & Thonn.	ลูกใต้ใบ	ทั้งต้น
	SIN	*Sapium indicum* Willd.	สมอทะเล	เมล็ด
Flacourtiaceae	FIN	*Flacourtia indica Merr.*	ตะขบป่า	ลำต้น
Goodeniaceae	STA	*Scaevola taccada Roxb.*	รักทะเล	ทั้งต้น
Gramineae	CDA	*Cynodon dactylon* Pers	หญ้าแพรก	ทั้งต้น
Guttiferae	GMA	*Garcinia mangostana L.*	มังคุด	ผล

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Guttiferae	GCO	*Garcinia cowa Roxb.*	ชะมวง	ใบ
Iridaceae	BCH	*Belamcanda chinensis* (Linn.) DC.	ว่านหางช้าง	หัวใต้ดิน
Labiatae	OSA	*Ocimum sanctum Linn.*	กะเพรา	ทั้งต้น
	OCA	Ocimum canum Sims	แมงลัก	ทั้งต้น
Lauraceae	CBE	*Cinnamomum bejolghota* Sweet	สมุลแว้ง	ลำต้น
	CIN	*Cinnamomum iners* Blume.	อบเชย	เปลือกไม้
	LGL	*Litsea glutinosa* (Lour.) C.B. Robinson	หมีเหม็น	ลำต้น
Leguminosae	APR	*Abrus precatorius* Linn.	มะกล่ำตาหนู	ทั้งต้น
	CFI	*Cassia agnes* Brenan	ราชพฤกษ์	ฝัก
	EVA	*Erythrina variegata* L.	ทองหลางใบมน	ทั้งต้น
	MPI	*Mimosa pigra* L.	ไมยราบ	ทั้งต้น
Liliaceae	GSU	*Gloriosa superba* Linn.	ดองดึง	ฝัก
Menispermaceae	CPA	*Cissampelos pareira* Linn.	กรุงเขมา	ราก

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Menispermaceae	SPI	*Stephania pierrei* Diels.	บอระเพ็ดพุง ช้าง	หัวใต้ดิน
Menispermaceae	TTI	*Tiliacora triandra Diels.*	ย่านาง	ใบ
	TTU	*Tinospora tuberculata* Beumee	บอระเพ็ด	ลำต้น
Melastomataceae	MPO	*Melastoma polyanthum Bl.*	โคลงเคลง	ใบ
Malvaceae	HAS	*Hibiscus sabdariffa* linn.	กระเจี๊ยบแดง	ดอก
Meliaceae	AIN	*Azadirachta indica* A.Juss var.siamensis *Valet*	สะเดา	ใบ
Milacaceae	SMI	*Smilax* spp. S	หัวข้าวเย็น	หัวใต้ดิน
Mimosoideae	ARU	*Acacia rugata* Merr.	ส้มป่อย	ทั้งต้น
	ACA	*Acacia catechu* Willd.	สีแสด	ยาง

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Moraceae	FHI	*Ficus hispida* Linn. f.	มะเดื่อปล้อง	ลำต้น
	FPU	*Ficus pubigera* Wall.	ม้ากระทืบโรง	ลำต้น
	MCO	*Maclura cochinchinensis* Corner	แกแล	ลำต้น
Moraceae	MAL	*Morus alba L.*	หม่อน	ใบ
	SAS	*Streblus asper* Lour.	ข่อย	ลำต้น
Myristicaceae	MFR	*Myristica fragrans* Houtt.	จันทน์เทศ	เมล็ด
Myrtaceae	SAR	*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry	กานพลู	เมล็ด
Nelumbonaceae	NNU	*Nelumbo nucifera Gaertn*	บัวหลวง	เกสร
Orchidaceae	LDI	*Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A.Rich.	ว่านน้ำทอง	หัวใต้ดิน
Pandanaceae	POD	*Pandanus odoratissimus* L.f.	ลำเจียก	ดอก
Papilionaceae	DEL	*Derris elliptica* (Roxb.) Benth.	หางไหลแดง	ลำต้น
	GGL	*Glycyrrhiza glabara*	ชะเอมเทศ	ลำต้น

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Piperaceae	PCH	*Piper chaba* Hunter.	ดีปลี	เมล็ด
	PINI	*Piper nigrum* L.	พริกไทย	เมล็ด
	PRI	*Piper ribesoides* Wall.	สะค้าน	ลำต้น
	PSA	*Piper sarmentosum* Roxb.	ช้าพลู	ทั้งต้น
Plantaginaceae	PMA	*Plantago major Linn.*	หมอน้อย	ทั้งต้น
Plumbaginaceae	PRO	*Plumbago rosea* Linn.	เจตมูลเพลิงแดง	ราก
	PZE	*Plumbago zeylanica* Linn.	เจตมูลเพลิงขาว	ราก
Poaceae	CAN	Cymbopogon nardus Rendle	ตะไคร้หอม	ใบ
Punicaceae	PGR	*Punica granatum* Linn.	ทับทิม	ลำต้น
Rhizophoraceae	RMU	*Rhizophora mucronata* Poir.	โกงกางใบใหญ่	ใบ
Rubiaceae	HFO	*Hydnophytum formicarum* Jack	กระเช้าผีมด	ลำต้น

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Rubiaceae	MCI	*Morinda citrfolia Linn.*	ยอ	fruit
	PFO	*Paederia foetida* Linn.	กระพังโหม	ลำต้น
Rutaceae	AEMA	*Aegle marmelos* (L.) Corr.	มะตูม	เมล็ด
Salvadoraceae	ASA	*Azima sarmentosa* Benth. & Hook.	หนามพุงดอ	ลำต้น
Sapindaceae	CHA	*Cardiospermum halicacabum* L.	โคกกระออม	ทั้งต้น
Saururaceae	HCO	*Houttuynia cordata* Thunb.	พลูคาว	ทั้งต้น
Scrophulariaceae	AHI	*Adenosma hirsutum* (Miq.) Kurz	โทงเทง	ทั้งต้น
	SDU	*Scoparia dulcis* L.	มะไฟเดือนห้า	ทั้งต้น
Simaroubaceae	BJA	*Brucea javanica Merr.*	ราชดัด	เมล็ด
	ELO	*Eurycoma longifolia* Jack.	ปลาไหลเผือก	ลำต้น

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Solanaceae	SST	*Solanum stramonifolium Jacq.*	มะอึก	ทั้งต้น
Sonneratlaceae	SOV	*Sonnertia ovata Back.*	ลำแพน	ใบ
Sterculiaceae	AAU	*Abroma augusta Linn.f.*	เทียนดำ	เมล็ด
	SMA	*Scaphium macropodum Beaumee*	สำรอง	เมล็ด
Umbelliferae	AGR	*Anethum graveolens Linn.*	เทียนข้าวเปลือก	เมล็ด
	CASI	*Centella asiatica Linn.*	บัวบก	ใบ
	CCY	*Cuminum cyminum Linn.*	เทียนข้าว	เมล็ด
	EFO	*Eryngium foetidum Linn.*	ผักชีฝรั่ง	ทั้งต้น
Umbelliferae	HIS	*Heracleum siamicum Craib var. gracilius Craib*	เทียนตั๊กแตน	เมล็ด
Verbenaceae	VTR	*Vitex trifolia* Linn.	คนทีสอ	ใบ
Zingiberaceae	AKR	*Amomum krervanh* Pierre	กระวาน	เมล็ด
	AVI	*Amomum villosum* Lour. var.xanthioides *(Wall)*	เร่วใหญ่	เมล็ด
	ANI	*Alpinia nigra* (Gaertn.)	ข่า	หัวใต้ดิน

ตารางที่ 3.5 รายชื่อพืชสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์ (ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้
Zingiberaceae	AOF	*Alpinia officinarum* Hance.	ข่าลิง	หัวใต้ดิน
	BPA	*Boesenbergia pandurata*	กระชายเหลือง	หัวใต้ดิน
	CLO	*Curcuma longa* Linn.	ขมิ้นชัน	หัวใต้ดิน
	CXA	*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.	ว่านชักมดลูก	หัวใต้ดิน
	CZE	*Curcuma zedoaria* Rosc.	ขมิ้นอ้อย	หัวใต้ดิน
	ZMO	*Zingiber montanum* (Koen.) Theilade	ไพล	หัวใต้ดิน
	ZZE	*Zingiber zerumbet Smith*	กระทือ	หัวใต้ดิน

* รหัสของพืชประกอบด้วยตัวหนังสือ 3 ตัวโดยกำหนดให้ตัวแรกเป็นอักษรตัวแรกของชื่อ genus และอักษรสองตัวถัดมาจะใช้อักษรสองตัวแรกของชื่อ species ส่วนรหัสที่มีอักษรสี่ตัวนั้นอักษรสองตัวแรกและสองตัวท้ายนั้นคืออักษรสองตัวแรกของชื่อ genus และ species ตามลำดับ

3.6.2 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยวิธีการดองด้วย 95% เอธานอล (Ethanol extraction)

นำตัวอย่างพืชที่แห้งแล้วมาทำให้มีขนาดเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้โดยเครื่องปั่นบด (Blender) แล้วบรรจุลงในโหลแก้ว จากนั้นเติม 95% ethanol จนปริมาตรท่วมตัวอย่างพืช เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 3 วัน นำมาใส่ในเครื่อง sonicator เป็นเวลา 5 นาที (หลีกเลี่ยงความร้อน) กรองเอาเนื้อตัวอย่างพืชออก โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 41 นำสารสกัดที่ได้ ใส่ในขวดทึบแสง ส่วนกากที่เหลือจากการกรอง นำมาทำการสกัดต่อด้วย 95% ethanol โดยทำทั้งหมด 2 ซ้ำ นำเอททานอลที่ผ่านการสกัดสารจากพืชตัวอย่างแล้วมาทำการระเหยเอธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) โดยนำสารสกัดที่ได้มาใส่ลงในขวดก้นกลมแล้วไปต่อเข้ากับเครื่องระเหยสุญญากาศ ดังรูปที่ 3.2 จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกให้มากที่สุด จนได้สารสกัดที่แห้งหรือหนืด เก็บของเหลวหนืดที่ได้จากการระเหยลงในหลอดไมโครฟิวจ์ จากนั้นพันพาราฟิล์มที่ฝาหลอดและนำไปแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปตรวจสอบต่อไป

รูปที่ 3.2 การจัดตั้งอุปกรณ์สำหรับการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ

3.6.3 การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยระบบยีสต์จากสารสกัดอย่างหยาบจากพืช

3.6.3.1 เตรียมสารสกัดอย่างหยาบที่ใช้ในการทดสอบ

นำสารสกัดอย่างหยาบจากพืชที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์แล้วชั่งหาน้ำหนักของสารสกัดโดยใช้เครื่องชั่งแบบละเอียด แล้วนำมาละลายใน absolute ethanol โดยให้

ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

3.6.3.2 เตรียมอาหารแข็ง YPAUD (0.7% agar) (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 8 มิลลิลิตร/หลอด ที่ทำการหลอมจนเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ที่55 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.6.3.3 เตรียมยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ โดยนำเชื้อที่เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส มาทำให้เจริญบนอาหารแข็ง YPAUD (ภาคผนวก ข) แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นจึงเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวบน plate ไปเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยทำการเจือจาง 6 เท่าในแต่ละหลอด จำนวน 4 หลอด แล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ข้ามคืน เลือกหลอดที่มีความเข้มข้นเซลล์อยู่ในช่วง 1-3 x 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร โดยใช้ Haemacytometer นับจำนวนเซลล์/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในขั้นต่อไป

3.6.3.4 ทำการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ, เซลล์บ่งชี้และ $CaCl_2$ เข้าด้วยกันโดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายยีสต์และ $CaCl_2$ ความเข้มข้น 4 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยและความเข้มข้นของ $CaCl_2$ เป็น 3 x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร และ 150 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ และหยดสารสกัดอย่างหยาบที่เตรียมได้จากข้อที่ 3.6.3.1 ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยใช้สาร FK506 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรและเอทานอลปริมาตร 5 ไมโครลิตรเป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ เมื่อสารซึมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผลการทดลองโดยสังเกตการเจริญของยีสต์บนจานเพาะเชื้อเปรียบเทียบชุดทดสอบกับชุดควบคุมผลบวกและผลลบ

3.7 ทดสอบระดับแอคติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์

นำสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกซึ่งแยกได้จากกระชายเหลืองโดย นางสาวสายพิณ บุญเกิด นิสิตระดับดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาทำการทดสอบหาระดับแอคติวิตีที่ความเข้มข้นต่างๆโดยระบบยีสต์ตามวิธีการข้อ3.6

3.8 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของสารออกฤทธิ์ที่คัดกรองจากระบบยีสต์โดยการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1* โดยเครื่อง Flow cytometry และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.8.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1* โดยเครื่อง Flow cytometry

ทำการแปรผันตัวแปรต่างๆ ได้แก่ ค่าความเข้มข้นของ $CaCl_2$ (50-100 มิลลิโมลาร์) และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มหลังการเติม $CaCl_2$ (3-6 ชั่วโมง)

3.8.2 การตรวจสอบการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมของสารออกฤทธิ์โดยการศึกษาระยะการแบ่งเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1* โดยเครื่อง Flow cytometry

นำสารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ แล้วชั่งหาน้ำหนักของสารสกัดโดยใช้เครื่องชั่งแบบละเอียด แล้วนำมาละลายใน dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 หรือ 150 ไมโครโมลาร์ สำหรับสารบริสุทธิ์และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดจากพืชสมุนไพร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสม จนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

เตรียมเซลล์ที่ถูกกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมดังนี้(ดัดแปลงจาก Mizunuma 1998) นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1* ที่ได้รับมาจาก Prof. Tokichi Miyakawa Department of Molecular Biotchnology, Graduate School for Advanced Science and Matter, Hiroshima University Japan มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง Yeast Peptone Dextrose (YPAUD) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งมาเลี้ยงใน 50 มิลลิตรของอาหารเหลว YPAUD แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early log phase (0.5 - 1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อ ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วย haemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเติมสารทดสอบให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามต้องการ บ่มที่ 30

องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้สาร FK506 ความเข้มข้น 500 นาโนโมลาร์และ 1.5 % DMSO เป็นชุดควบคุมผลบวกและชุดควบคุมผลลบตามลำดับ จากนั้นจึงเติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 4 โมลาร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์และล้างตะกอนเซลล์ด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และละลายตะกอนเซลล์ด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กระจายเซลล์โดยเครื่องเขย่าผสมแล้วจึงเติมเอทานอล 750 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยเครื่องเขย่าผสม บ่มที่ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน (หรือ 2-3 วัน)

การเตรียมเซลล์สำหรับการตรวจสอบระยะการแบ่งตัวของเซลล์โดยเครื่อง Flow cytometry ทำได้โดยการปั่นล้างเซลล์ที่ได้ด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และปั่นแยกเซลล์ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตรของ Rnase A ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงปั่นแยกเซลล์และล้างตะกอนเซลล์ด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นแยกเซลล์และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 ไมโครลิตรของ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ propidium iodide ในสารละลาย A (สารละลายA ประกอบด้วย 4 mM Citrate buffer pH 8, 10mM NaCl, 0.1% NP-40 บ่ม 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นถ่ายใส่หลอด Falcon เติมสารละลาย A ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องเขย่าผสม ทำการกระจายเซลล์โดยใช้เครื่อง ultrasonic probe รุ่น UP 50H โดยตั้งความแรงปานกลางเป็นเวลา 5 วินาที แล้วจึงวิเคราะห์ผลโดย FACs cariber รุ่น BD FACSCalibur™ ของบริษัท BD Biosciences

3.8.3 การตรวจสอบการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมของสารออกฤทธิ์โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์และการแบ่งนิวเคลียสด้วยการย้อมสี Hoechst 33342

การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมของสารบริสุทธิ์ที่ได้สามารถดูได้โดยลักษณะการแตกหน่อและการแบ่งนิวเคลียสดังนี้ ปั่นล้างเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ได้จากการเตรียมเซลล์ที่ถูกกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในข้อ 3.8.2 ด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และจากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนกระจกสไลด์และปิดทับด้วยแผ่นกระจกใส(cover slip) แล้วตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า หรือ เติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในสารละลายเซลล์ยีสต์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมแล้วเก็บไว้ในที่มืด 10 นาที จากนั้นดูด

เซลล์แขวนลอยปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนกระจกสไลด์และปิดทับด้วยแผ่นกระจกใส(cover slip) และใช้น้ำยาทาเล็บปิดรอบๆด้านกระจกใส และส่องด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

3.9 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์

สารออกฤทธิ์ที่คัดกรองได้จากระบบยีสต์เบื้องต้นนั้นสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมได้ แต่ไม่ทราบว่ายับยั้งที่ช่วงใดของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ดังนั้นการทดลองดังต่อไปนี้จะทำการศึกษาหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์เซลล์

3.9.1 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อ Mpk1 และ Calcineurin

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาของ Nakamura และคณะ (1996) พบว่ายีสต์ที่มีการทำลายทั้งยีน *MPK1* และยีน *CNB1* (*Δmpk1Δcnb1*) ไม่สามารถเจริญได้ (lethal phenotype) แต่ยีสต์สายพันธุ์ที่มีการทำลายยีน *MPK1* (*Δmpk1*) หรือมีการทำลายยีน *CNB1* (*Δcnb1*) ยังสามารถเจริญได้ ดังนั้นหากสารออกฤทธิ์ที่ได้ไปยับยั้ง ที่โมเลกุลเป้าหมายที่โปรตีน Mpk1 หรือ calcineurin จะทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย (*Δcnb1*) หรือ (*Δmpk1*) ไม่สามารถเจริญได้ตามลำดับ โดยการดูลักษณะการเจริญของสายพันธ์กลายต่างๆเมื่อเติมสารออกฤทธิ์จะทำให้ทราบได้ว่า สารที่ได้ออกฤทธิ์ที่โมเลกุลเป้าหมายคือ Mpk1 และ Calcineurin หรือไม่ โดยมีวิธีการดังนี้

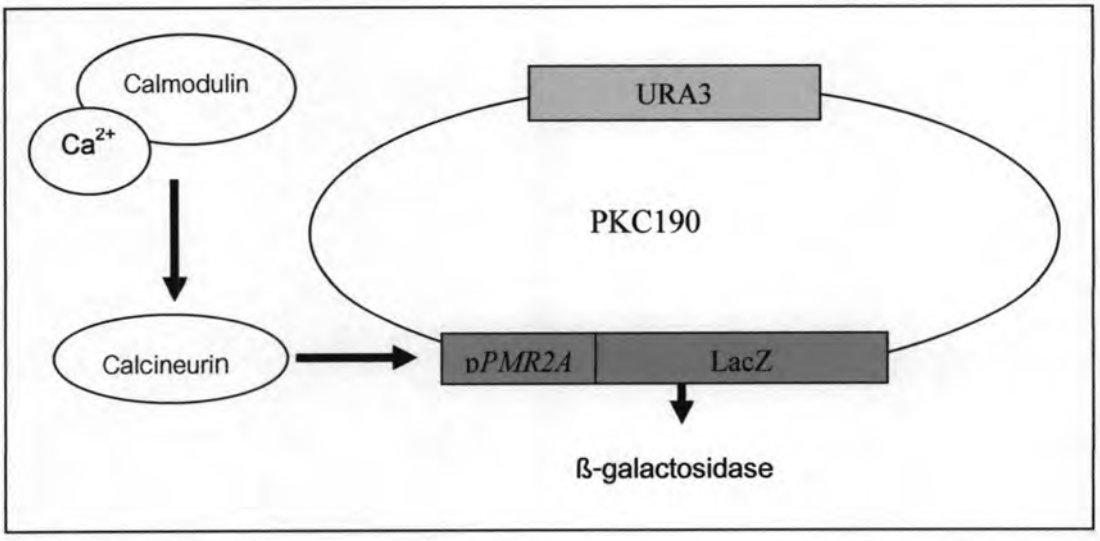
นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย(*Δcnb1*) หรือ (*Δmpk1*) ที่ได้รับมาจาก Prof. Tokichi Miyakawa Department of Molecular Biotchnology, Graduate school of Advance Science and Matter, Hiroshima University, Japan มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง YPAUD และนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง exponential phase (2-5 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เตรียม YPAUD soft agar (0.7%) ปริมาณ 8 มิลลิลิตร/หลอด ที่ทำการหลอมจนเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นับเซลล์เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์ด้วย Haemacytometer เติมเซลล์แขวนลอยใส่อาหาร YPAUD soft agar โดยให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายของยีสต์สายพันธุ์กลาย(*Δcnb1*) หรือ (*Δmpk1*) เป็น 1 x

10^5 และ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม เทราดลงบนจานเพาะเชื้อ แล้วทิ้งไว้ให้แข็งในตู้ปราศจากเชื้อ จากนั้นหยดสารสารออกฤทธิ์ ที่ความเข้มข้น 2 และ 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรตามลำดับ โดยมี FK506 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง calcineurin ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตรและเอททานอลปริมาตร 5 ไมโครลิตรเป็นสารควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการเจริญของยีสต์

3.9.2 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในยีสต์เซลล์

การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อระดับแคลเซียมอิสระในเซลล์ยีสต์ภายใต้สภาวะกดดันจากแคลเซียมสูง ทำได้โดยการวัดระดับแอกติวิตีของเอนไซม์ ß-Galactosidase ดังนี้

ทำการทดลองโดยใช้พลาสมิด pKC 190 (รูปที่ 3.3) ที่มียีนรายงานผล(reporter gene) เป็นยีน lacZ ซึ่งเป็นยีนประมวลรหัส ß-galactosidase จะถูกควบคุมระดับการแสดงออกของยีนจาก *PMR2A* promoter ดังรูปที่ 3.3 *PMR2A* promoter เป็น promoter ที่ตอบสนองต่อการระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ (Cunningham และ Fink, 1996) แคลเซียมอิสระภายในเซลล์จะกระตุ้นการทำงานของ calcineurin ซึ่งควบคุมการทำงานของ transcriptional factor ที่ควบคุมการแสดงออกของ *PMR2A* promoter ดังนั้นเมื่อมีระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้น จึงเป็นผลให้เกิดการสร้างเอ็นไซม์ ß-galactosidase ขึ้น (รูปที่ 3.3) โดยมีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.3 ส่วนประกอบภายในพลาสมิด pKC190 ซึ่งมี *PMR2A* promoter เชื่อมกับ ORF ของเอนไซม์ ß-galatosidase และแผนผังการตอบสนองต่อระดับแคลเซียมอิสระในเซลล์

3.9.2.1 เตรียมสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อแคลเซียมภายในเซลล์

นำพลาสมิด pKC190 (ที่มา: Prof. Tokichi Miyakawa Department of Molecular Biotchnology,Graduate school of Advance Science and Matter, Hiroshima University, Japan) มาชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ W303 ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) (Gietz และSchiestl, 1995) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์ W303 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสข้ามคืน (16-20 ชั่วโมง) จากนั้นถ่ายเชื้อใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD 50 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยเป็น 5 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 ชั่วโมงจนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเป็น 2 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีอีกครั้งเพื่อแยกเซลล์ เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติม LiAc เข้มข้น 0.1โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และถ่ายใส่หลอดไมโครฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วย LiAc ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ระหว่างที่ปั่นแยกเซลล์ให้บ่ม carrier DNA (ภาคผนวก ข) ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการแช่ในน้ำแข็งทันที ถ่ายเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ใส่หลอดไมโคฟิวจ์หลอดละ 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ที่ได้โดยการเติม 50% PEG (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร, LiAc เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 36 ไมโครลิตร, carrier DNA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตรและดีเอ็นเอที่ต้องการชักนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมเข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และ heat shock ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ตามลำดับ นำมาปั่นเพื่อแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที แล้วดูดส่วนน้ำใสออก ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำเซลล์มาเกลี่ยในอาหาร synthetic complete (SC) medium ที่ขาดกรดอะมิโน ยูราซิว (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ซึ่งทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.9.2.2 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์

วิธีการตรวจสอบระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Tutulan-Cunita และคณะ (2005) ดังนี้ นำยีสต์สายพันธุ์ W303 ที่มีพลาสมิด pKC190 มาเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งSC medium ที่ขาดกรดนิวคลีอิกยูราซิว(SC –uralic medium) จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งมาเลี้ยงใน 50 มิลลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SC medium ที่ขาดกรดนิวคลีอิกยูราซิว แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง exponential phase (2-5 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนน้ำใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วย hemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเติมสาร pinostrobin ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามต้องการ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้สาร FK506 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง calcineurin ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 นาโนโมลาร์ และ 1.5 % DMSO เป็นชุดควบคุมผลบวกและชุดควบคุมผลลบตามลำดับ จากนั้นเติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 4 โมลาร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 150 มิลลิโมลาร์ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ ß-galactosidase ด้วยวิธี ß-galactosidase Liquid Assay for Yeast (http://130.15.90.245/lac_z_liquid_assay_for _yeast.htm) โดยทำการเจือจางเซลล์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ได้และนำ 1 มิลลิลิตรของเซลล์แขวนลอยมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ12000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย 1 มิลลิตรของ Z buffer (ภาคผนวก ข) ปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Z buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 0.1 % SDS ปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมด้วยเครื่องเขย่าผสมเป็นเวลา 15 วินาที เติมสารละลาย ONPG ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันพร้อมกับจับเวลาเริ่มต้นปฏิกิริยา บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสจนกว่าสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน จดบันทึกเวลาที่ใช้ และเติม Na_2CO_3

ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยมีชุด blank คือสารละลาย ONPG ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ Na_2CO_3 เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 จดบันทึกค่าที่ได้ จากนั้นคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์ ß-galactosidase ได้จากสมการดังต่อไปนี้

Miller unit = (ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร x 1,000) / (ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร x เวลาที่ใช้เป็นนาที x ปริมาตรเซลล์แขวนลอยที่ใช้)

3.9.3 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อช่วง downstream ของ Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1

เพื่อที่จะศึกษาว่าสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ซึ่งคัดกรองได้จากระบบยีสต์ข้างต้นสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมที่ช่วง downstream ของ Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1 ถ้าเกิดการกระตุ้นช่วงใดช่วงหนึ่งจากทั้ง 3 โมเลกุลเป้าหมายโดยการทำให้มีการแสดงออกมากเกิน (overexpression) ของ Mpk1, Mck1 หรือ CmpΔ2C ซึ่งเป็น hyperactive form ของ calcineurin catalytic subunit (Garrett-Engele และคณะ, 1995) ในยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ *zds1* เป็นผลทำให้โปรตีน Swe1 อยู่ในรูปที่ทำงานได้ (active form) และมีผลทำให้เกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติกล่าวคือมีลักษณะการแตกหน่อที่ยืดยาวออกมา (elongated bud) (Mizunuma และคณะ, 1998) และในสภาวะดังกล่าวถ้าสารออกฤทธิ์ที่ได้สามารถยับยั้งที่ downstream ของเป้าหมายใด จะทำให้ไม่เกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติอันเนื่องมาจากสัญญาณของแคลเซียมที่ผ่านจากแขนงวิถีนั้นถูกขัดขวาง จากหลักการดังกล่าว ในการทดลองนี้ใช้พลาสมิด pYES2::*GAL1*p-*CMPΔ2C*, pYES2::*GAL1*p-*MPK1* หรือ pYES2::p*GAL-MCK1* ชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ *zds1* เพื่อการแสดงออกของยีน *CMPΔ2C* หรือ *MPK1*หรือ *MCK1* ภายใต้ *GAL1* promoter ตามลำดับ แล้วจึงนำยีสต์ดังกล่าวมาทดสอบกับสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะที่ *GAL1* promoter ถูกกระตุ้น ดังการทดลองต่อไปนี้

3.9.3.1 เตรียมสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อช่วง downstream ของ Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1

ชักนำพลาสมิด pYES2, pYES2::*GAL1*p-*CMPΔ2C* และ pYES2::*GAL1*p-*MPK1* ที่ได้รับมาจาก Prof. Tokichi Miyakawa Department of Molecular Biotchnology, Hiroshima University Japan หรือ pYES2::*GAL1*p-*MCK1* ที่ได้สร้างมาจากข้อ 3.6 เข้าสู่ยีสต์กลายพันธุ์ *Δ zds1* ด้วยวิธี Lithium acetate (Burke และคณะ 2000) และทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ดังวิธีข้อ 3.9.2.1

3.9.3.2 **ทดสอบสารออกฤทธิ์ที่มีต่อยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีให้มีการแสดงออกมากเกินของ Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1**

เขี่ยยีสต์สายพันธุ์กลาย*Δ zds1* ที่มีพลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.9.3.1 จากอาหารแข็งมาเลี้ยงใน 50 มิลลิตรของอาหารเหลว SC medium ที่ขาดกรดนิวคลีอิกยูราซิว แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง exponential phase (2-5 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วย SG medium (ใช้ 2% galactose แทน 2% glucose ใน SC medium) ที่ขาดกรดนิวคลีอิกยูราซิว(ภาคผนวก ข) ทำการปั่นล้างด้วย SG medium ที่ขาดกรด อะมิโนยูราซิว ซ้ำ จากนั้นปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว 1% raffinose SC medium ที่ขาดกรดนิวคลีอิกยูราซิว (ภาคผนวก ข) จากนั้นนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วย hemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5.55 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และเติมสารทดสอบให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม SC 20% galactose ที่ขาดกรดนิวคลีอิกยูราซิว(ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะการแบ่งนิวเคลียสด้วยการย้อมด้วยสี Hoechst 33342 ตามวิธีข้อ 3.8.3