



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การก่อการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของยีน Malonyl-Coenzyme A Reductase (<i>MCR</i>) เพื่อการผลิต 3-hydroxypropionate (3-HP) ในยีสต์ <i>Komagatella pastoris</i> ATCC 204164
ชื่อนิสิต	นางสาว พีระพรรณ คัมภีโร
เลขประจำตัวนิสิต	6032138023
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การก่อการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของยีน Malonyl-Coenzyme A
Reductase (*MCR*) เพื่อการผลิต 3-hydroxypropionate (*MCR*) ในยีสต์
Kamagatella pastoris ATCC 204164

นางสาวพีระพรรณ คัมภีโร

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

Site-directed mutagenesis of Malonyl-Coenzyme A Reductase (*MCR*)
gene to produce 3-hydroxypropionate (3-HP) in *Komagatella pastoris*
ATCC 204164

Miss Peeraphan Compiro

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Bachelor of Science in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2020

ชื่อเรื่อง การก่อการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของยีน Malonyl-Coenzyme A Reductase (MCR) เพื่อการผลิต 3-hydroxypropionate (3-HP) ในยีสต์ *Komagatella pastoris* ATCC 204164

ชื่อนิสิต พี่ระพรรณ คัมภีโร

ภาควิชา พฤษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมนุช กลิ่นวงษ์

ปีการศึกษา 2563

ภาควิชาพฤษศาสตร์ อนุมัติให้โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์



.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมนุช กลิ่นวงษ์)



.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.ณัชพัฒน์ บุญวิทยา)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นیرดา หวังสมบูรณ์ดี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การก่อการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของยีน Malonyl-Coenzyme A Reductase (<i>MCR</i>) เพื่อการผลิต 3-hydroxypropionate (3-HP) ในยีสต์ <i>Komagatella pastoris</i> ATCC 204164
ชื่อนิสิต	พีระพรรณ คัมภีโร
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูณัฐ กลิ่นวงษ์
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

3-Hydroxypropionic acid หรือ 3-Hydroxypropionate (3-HP) เป็นกรดอินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตสารเคมีและสารอนุพันธ์ ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมที่สำคัญ แต่วิธีการสังเคราะห์ผ่านกระบวนการเคมีของ 3-HP ได้ผลน้อย ไม่คุ้มต้นทุน และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้จึงใช้กระบวนการชีวสังเคราะห์ในการผลิต 3-HP ผ่านวิถี malonyl-CoA ใน *Komagatella pastoris* ที่ถูกก่อการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของยีน malonyl-Coenzyme A reductase (*mcr*) ตำแหน่ง S1114K โดยมีการวิเคราะห์ codon usage ของยีน *MCR* สำหรับการแสดงออกใน *K. pastoris* จากนั้นสังเคราะห์ยีน *mcr* เพื่อการก่อการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งโดยอาศัยหลักการทำพีซีอาร์ แล้วจึงสังเคราะห์เวกเตอร์ที่ประกอบไปด้วยยีนกลายของ *mcr* เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *K. pastoris* และทดสอบความสามารถในการผลิต 3-HP ด้วย Gas Chromatography จากผลการทดลองพบว่า การใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเฉพาะร่วมกับการใช้ KOD Plus Mutagenesis Kit สามารถสังเคราะห์การกลายที่สองตำแหน่งของการกลายที่อยู่ข้างกันได้สมบูรณ์ อัตราการเกิดการกลายถูกต้องหลังจากเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* แม่นยำตามตำแหน่งที่ความถูกต้องทุกลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์การกลาย ในส่วนการนำยีนกลาย *mcr* เข้าสู่ *K. pastoris* และการผลิต 3-HP จะมีการดำเนินการในอนาคต

คำสำคัญ: 3-Hydroxypropionic acid, การก่อการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่ง, malonyl-Coenzyme A reductase, *Komagatella pastoris*

Title	Site-directed mutagenesis of Malonyl-Coenzyme A Reductase (<i>MCR</i>) gene to produce 3-hydroxypropionate (3-HP) in <i>Kamagatella pastoris</i> ATCC 204164
Student name	Peeraphan Compiro
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assist. Prof. Dr. Chompunuch Glinwong
Academic year	2020

Abstract

3-Hydroxypropionic acid or 3-Hydroxypropionate (3-HP) is an organic acid used in the manufacture of chemicals and derivatives which is commonly used in important industries. The 3-HP chemical synthesis method is low yield, not cost-effective, and impacts the environment. In this study, biosynthesis was used to produce 3-HP via the malonyl-CoA pathway by inducing site-directed mutation on malonyl Coenzyme A reductase (*mcr*) gene that affected production 3-hydroxypropionate (3-HP) in *Kamagatella pastoris*. The codon usage of *mcr* gene for expression in *K. pastoris* was synthesized for location-specific mutation S1114K based on PCR principles. The vector containing the *mcr* gene will be transformed into the host cell *K. pastoris* and investigated for 3-HP production by Gas Chromatography. From the results of the experiment, it was found that using a specially designed primer in conjunction with the use of the KOD Plus Mutagenesis Kit shown the two positions of the adjacent mutagenesis, can be completely synthesized. Correct incidence after entering the host cell *Escherichia coli* was precisely positioned at the correctness of all nucleotide sequences that were synthesized. However, transformed *K. pastoris* with *mcr* mutant gene and 3-HP production analysis will be performed in the future.

Keywords: 3-Hydroxypropionic acid, Site-directed mutagenesis, *Kamagatella pastoris*, malonyl-Coenzyme A reductase

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูษุช กลิ่นวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และดร.ณษพัฒน์ บุญวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการ ที่กรุณาให้คำแนะนำให้ความรู้และให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ตลอดการทำงาน

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบุญรัตน์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ นางสาว สุพัตรา เลิศศรีวงษ์ และ นาย ธนวิชญ์ แสงศิริพัฒน์ ที่ช่วยให้คำแนะนำตลอดการทำโครงการวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือในทุกด้านเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคนะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการเชื้อเพลิงชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงการวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ นักวิจัยในห้องปฏิบัติการเชื้อเพลิงชีวภาพ ที่คอยให้คำแนะนำในเรื่องต่าง ๆ ทั้งเทคนิคในการวิจัยและเป็นกำลังใจในการทำงานตลอดมา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณพี่สาม และเพื่อนๆ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างเต็มที่ในหลาย ๆ ด้านและให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาว ที่ให้การสนับสนุนและให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

เรื่อง	สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญภาพ		จ
สารบัญตาราง		ฉ
บทที่		
1 บทนำ		1
2 การตรวจเอกสาร		3
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา		12
4 ผลการศึกษา		21
5 อภิปรายผลการศึกษา		33
เอกสารอ้างอิง		35
ภาคผนวก ก		39
ภาคผนวก ข		41

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ความสามารถของ 3-Hydroxypropionic acid ในการผลิตสารเคมีที่ถูกใช้ในด้านอุตสาหกรรม	4
2.2	วิถีเมแทบอลิซึมของการผลิต 3-HP จากน้ำตาลกลูโคสไปสู่ malonyl-CoA ในจุลินทรีย์	5
2.3	ปฏิกิริยาการสลายโมเลกุลเพื่อสร้าง 3-HP ผ่านวิถี malonyl-CoA	5
2.4	ระบบการแสดงออกของยีนแบบเฮเทอโรโลจัสใน <i>Kamagatella pastoris</i>	7
2.5	ส่วนประกอบของพลาสมิด pGAPZ α	7
2.6	หลักการพื้นฐานของ Site-directed mutagenesis ในขั้นตอน PCR reaction	9
2.7	ขั้นตอนการทำ Site-directed mutagenesis โดยพลาสมิดต้นแบบ (parental plasmid)	10
3.1	ส่วนประกอบของเวกเตอร์ลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมยีน <i>mcr^m</i> กับเวกเตอร์ pGAPZ α	18
4.1	ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงบางส่วนของ optimize codon ของยีน <i>mcr</i> ใน <i>K. pastoris</i> เทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI	21
4.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการ optimize codon ของยีน <i>mcr</i> จาก <i>C. aurantiacus</i> เพื่อการแสดงออกใน <i>K. pastoris</i>	22
4.3.	ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบพลาสมิดที่มียีน <i>mcr</i> และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	23
4.4	ผลการทำโคลนพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใน <i>S. cerevisiae</i> และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	24
4.5	ผลการวิเคราะห์ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>mcr</i> เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI	25
4.6	ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ยีนกลายของ <i>mcr</i> และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	27
4.7	ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>mcr</i> ที่ทำการกลายด้วย KOD Plus mutagenesis kit (Toyobo, Japan) และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ChromasPro	27
4.8	ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ยีนกลายของ <i>mcr</i> และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	29
4.9	ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการถ่ายฝากยีนกลายของ <i>mcr</i> และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	31
4.10	ผลการตรวจสอบขนาดของชิ้นยีน <i>mcr^m</i> ที่มีบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NotI</i> และ <i>XbaI</i> และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	31
4.11	<i>S. cerevisiae</i> ที่ได้รับการถ่ายฝากเวกเตอร์ลูกผสม pGAPZ α - <i>mcr^m</i> ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่มียาปฏิชีวนะซีโอสินที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	32

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	หน้า
2.1	หน้า
2.2	หน้า
3.1	หน้า
3.2	หน้า
3.3	หน้า
3.4	หน้า
3.5	หน้า
3.6	หน้า
3.7	หน้า
4.1	หน้า

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

3-Hydroxypropionic acid หรือ 3-Hydroxypropionate (3-HP; $C_3H_6O_3$) เป็นกรดอินทรีย์ที่มีการใช้งานในอุตสาหกรรมเพื่อผลิตสารเคมีหลายชนิด เช่น acrylic acid, malonic acid, esters, acrylamide, acrylonitrile, propiolactone, homopolymers, heteropolymers และ 1, 3-propanediol (PDO) ซึ่งสารอนุพันธ์เหล่านี้มีการใช้งานในอุตสาหกรรมผลิตสารยึดเกาะ พอลิเมอร์บรรจุภัณฑ์พลาสติก เส้นใย สารทำความสะอาด และ เรซิน (Wang et al., 2016; Matsakas et al., 2018) แต่วิธีการสังเคราะห์ผ่านกระบวนการเคมีของ 3-HP นั้นกลับมีข้อจำกัดด้านการผลิตที่ผลตอบแทนไม่คุ้มต้นทุนและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีการรายงานว่า β -propiolactone ซึ่งเป็นหนึ่งในตัวกลางที่มีประสิทธิภาพสำหรับการสังเคราะห์ผ่านกระบวนการเคมีของ 3-HP โดยการทำปฏิกิริยาคีตินกับฟอร์มัลดีไฮด์ในกรดลิวอิส ($AlCl_3$, $ZnCl_2$, BF_3) แต่คีตินและฟอร์มัลดีไฮด์มีความเป็นพิษ อีกทั้ง β -propiolactone เป็นสารก่อมะเร็ง วิธีการดังกล่าวจึงก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ (Della, Falletta and Rossi, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ allyl alcohol เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ 3-HP ผ่านการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวกลางโพรพีนและโพรพีนออกไซด์ โดยใช้ทองคำที่มีความสามารถในการออกซิเดชันออกซิเจนและแอลกอฮอล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งพบว่า การเปลี่ยน allyl alcohol ผ่านตัวเร่งในสารละลายต่างจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3-HP สูงถึง 79-83 เปอร์เซ็นต์ แต่ข้อเสียของกระบวนการสังเคราะห์นี้คือ มีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาหลายครั้ง ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตของ 3-HP ลดลงค่อนข้างมาก รวมทั้งค่าใช้จ่ายของวัสดุและต้นทุนในกระบวนการที่ใช้มีราคาสูง (Della, Falletta and Rossi, 2009; Wang et al., 2016) จึงจำเป็นต้องหาวิธีการใหม่มาทดแทนกระบวนการเคมีในการผลิตสาร 3-HP เพื่อให้สามารถเพิ่มการผลิตได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันมีการริเริ่มใช้ชีวสังเคราะห์ในการผลิตแทนกระบวนการเคมีเพื่อลดปัญหาเหล่านี้ (Jiang, Meng and Xian, 2009) ตัวอย่างเช่น งานวิจัยทางด้านชีวสังเคราะห์ในการผลิต 3-HP ผ่านวิถี malonyl-CoA ด้วยการโคลนยีน Malonyl-Coenzyme A reductase (MCR) จาก *Chloroflexus aurantiacus* ซึ่งมีความสามารถสูงในการเปลี่ยน malonyl-CoA ด้วย NADPH เป็น 3-HP ในการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า สามารถผลิต 3-HP ได้ 0.463 กรัมต่อลิตร (Liu et al., 2013; Chen et al., 2014) และการเปลี่ยน pyruvate เป็น 3-HP ผ่าน acetyl-CoA และ malonyl-CoA ใน recombinant *Escherichia coli* มีการรายงานการผลิต 3-HP ได้ 0.192 กรัมต่อลิตร (Rathnasingh et al., 2012) จากการผลิต 3-HP โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในงานวิจัยที่ผ่านมา แม้จะพบว่าสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติมีความสามารถในการผลิต 3-HP ได้ แต่จุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคให้ผลผลิต 3-HP ต่ำ รวมทั้งความเป็นกรดที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณการผลิต 3-HP ในระดับอุตสาหกรรม โดยค่า pH

ที่ลดลงใน 3-HP ส่งผลต่อ *E. coli* ที่ไม่ทนต่อกรด จึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้งานในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นการศึกษการใช้สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมให้มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการผลิต 3-HP จึงเป็นเรื่องสำคัญที่ควรมีการศึกษาต่อไป (Chen et al., 2014)

ในการสังเคราะห์ 3-HP สามารถสร้างขึ้นได้จากการใช้จุลินทรีย์ *Kamagatella pastoris* ซึ่งมีการใช้ในอุตสาหกรรมสำหรับการผลิตสารเคมี เนื่องจาก *K. pastoris* มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อม ทำให้เกิดกระบวนการหมักง่ายขึ้น และในปัจจุบันมีการใช้ยีสต์เป็นเซลล์ให้อาศัยที่สามารถสร้างวิถี malonyl-CoA ในการผลิต 3-HP ได้ (Ji et al., 2018) แต่ผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำ การศึกษารกลายพันธุ์เฉพาะที่ของยีน *mcr* ที่ส่งผลต่อการผลิต 3-HP ใน *K. pastoris* ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตของ 3-HP ได้

1.2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อช้กนนำยีน Malonyl-Coenzyme A Reductase (*mcr*) ให้เกิดการกลายพันธุ์เปลี่ยนที่ตำแหน่งเฉพาะที่ส่งผลต่อการผลิต 3-Hydroxypropionate (3-HP) ใน *Kamagatella pastoris*

1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สายพันธุ์กลายของยีสต์ *K. pastoris* ที่มีความสามารถในการผลิตสาร 3-HP ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

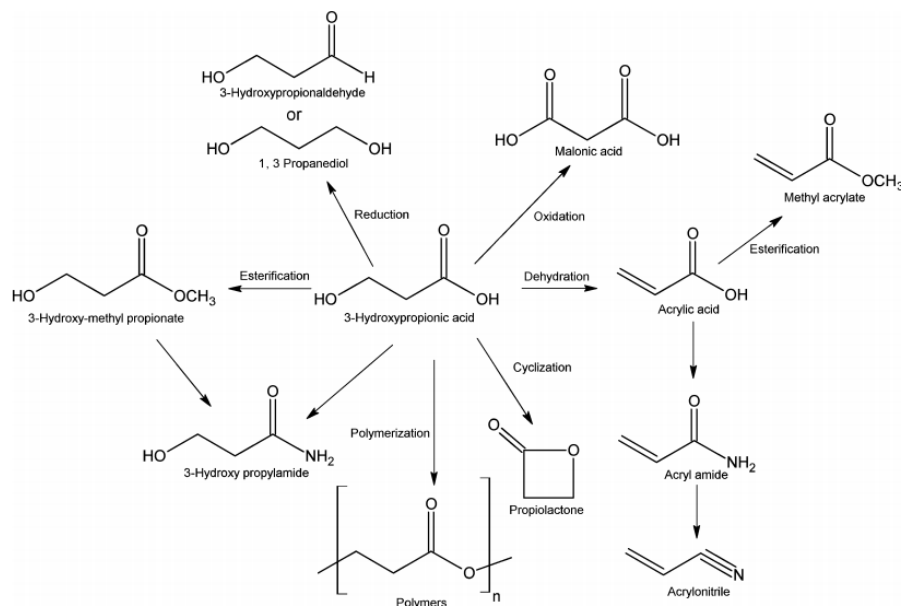
การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. Malonyl-Coenzyme A Reductase (*mcr*)

ยีน *mcr* มีขนาด 3,660 คู่เบส ผลิตโปรตีน Malonyl-Coenzyme A Reductase ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม Short-chain dehydrogenase/reductase family (SDR) ผลผลิตของยีนนี้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต 3-Hydroxypropionic acid (3-HP) โดยเปลี่ยนจาก malonyl-CoA ที่ถูกสร้างจาก acetyl-CoA โดยยีน ACC1 (acetyl-CoA carboxylase) ผ่านปฏิกิริยาของขั้นตอนที่เร่งปฏิกิริยา โดย *mcr* มีการทำงานของเอนไซม์แบบ bi-functionnal ประกอบด้วย 2 short-chain domain ได้แก่ N-terminal domain ถอดรหัสได้แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) และ C-terminal domain ถอดรหัสได้อัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) การเพิ่มการผลิต 3-HP สำเร็จได้โดยการปรับสมดุลของโดเมนเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ (Hügler et al., 2002; Liu et al., 2013, 2016)

2.2. 3-Hydroxypropionic acid (3-HP)

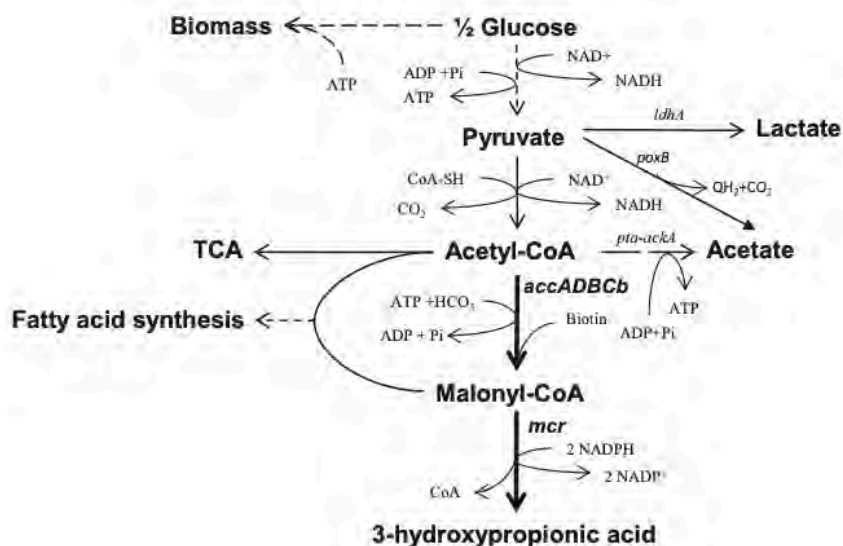
3-Hydroxypropionic acid หรือ 3-Hydroxypropionate จัดเป็นสารตัวกลางในการผลิตสารเคมีที่จำเป็นในภาคอุตสาหกรรม สำหรับสูตรโครงสร้างทางเคมี 3-HP ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอม มีกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเบต้า มีโครงสร้างเป็นไอโซเมอร์กับกรดแลคติก (Jers et al., 2019) ส่งผลให้ 3-HP ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ได้หลากหลายชนิดผ่านกระบวนการไซโคลเซชันและพอลิเมอไรเซชัน เช่น propiolactone polyester และ oligomers รวมทั้งสารเคมีมูลค่าสูง เช่น acrylic acid ที่ถูกสังเคราะห์จากการดัดแปลงของน้ำออกจาก 3-HP ซึ่ง acrylic acid ถูกใช้มากกว่า 6 ล้านตันต่อปี (รูปที่ 2.1) (Della, Falletta and Rossi, 2011; Kildegaard et al., 2016) โดยเป็นสารตั้งต้นที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการผลิตสี กระดาษ ผ้าอ้อม สารยัดเกาะ เส้นใยสิ่งทอ สารเคลือบวัสดุและวัสดุดูดซับของเหลว อีกทั้ง 3-HP เป็นตัวกลางสำคัญในการสร้างไบโอพลาสติกเพื่อการผลิตวัสดุทางการแพทย์โดยการใช้เอนไซม์ในการสลายโมเลกุลของ poly[3-Hydroxypropionic acid] (P[3-HP]) (Ji et al., 2018) จากความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมดังที่ได้กล่าวมา ทำให้มีการศึกษาและพัฒนาการผลิต 3-HP อย่างต่อเนื่องทั้งทางด้านกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและชีวสังเคราะห์



รูปที่ 2.1 ความสามารถของ 3-Hydroxypropionic acid ในการผลิตสารเคมีที่ถูกใช้ในด้านอุตสาหกรรม (Della, Falletta and Rossi, 2011)

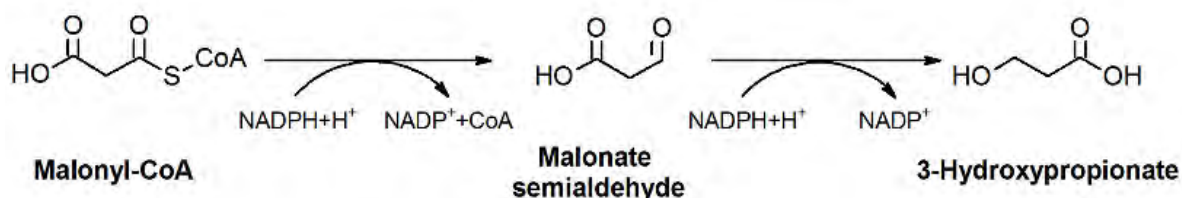
2.2.1 กระบวนการชีวสังเคราะห์ในการผลิต 3-HP

การศึกษากลไกเมแทบอลิซึมในระดับจีโนมพบว่า จุลินทรีย์มีกระบวนการชีวสังเคราะห์ 3-HP ภายในเซลล์ (รูปที่ 2.3) โดยพบชีวสังเคราะห์ 3-HP ผ่าน 4 ตัวกลาง ได้แก่ glycerol (Raj et al., 2008), lactate (Henry, Broadbelt and Hatzimanikatis, 2010), β -alanine (Borodina et al., 2015) และ malonyl-CoA (Rathnasingh et al., 2012) จากวิธีการสังเคราะห์ผ่านตัวกลางดังกล่าว พบว่าวิถี malonyl-CoA ใน *Escherichia coli* *Saccharomyces cerevisiae* และ *Chloroflexus aurantiacus* มีประสิทธิภาพที่ดีในการผลิต 3-HP โดยพิจารณาจาก ช่วงการดูดกลืนแสงที่กว้าง อุณหพลศาสตร์ ปฏิกิริยารีดอกซ์ของตัวกลาง รวมไปถึง การทำงานอย่างอิสระของเอนไซม์ (Liu et al., 2013) จากการแสดงออกของยีน Malonyl-Coenzyme A reductase (*mcr*) ผ่านการเลี้ยงในน้ำตาล C_5 และ C_6 ที่ได้จากสารชีวมวล lignocellulosic สะดวกต่อการเตรียมสารตั้งต้นในวิถี malonyl-CoA ซึ่งได้จากปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนของ acetyl-CoA รวมกับโมเลกุลของ NADH ATP CO_2 ภายในเซลล์ ผลของความสมดุลของสารตั้งต้นในวิธิดังกล่าวส่งผลให้ปริมาณผลผลิตของ 3-HP มีประสิทธิภาพในการผลิตมากขึ้น (รูปที่ 2.2) (Chen et al., 2014; Rathnasingh et al., 2012)



รูปที่ 2.2. วิธีเมแทบอลิซึมของการผลิต 3-HP จากน้ำตาลกลูโคสไปสู่ malonyl-CoA ในจุลินทรีย์ (Rathnasingh et al., 2012)

แม้จะพบว่าสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติมีความสามารถในการผลิต 3-HP ได้ แต่ผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำ ปัญหาดังกล่าวเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างโปรตีน MCR-C และ MCR-N ซึ่งมีรายงานการปรับระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจากการนำยีน *mcr* จาก *C. aurantiacus* ซึ่งมีความสามารถสูงในการเปลี่ยน malonyl-CoA ด้วย NADPH เป็น 3-HP ในการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าสามารถผลิต 3-HP ได้ 0.463 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 2.3) (Liu et al., 2013; Chen et al., 2014) ทำให้เกิดการกลายด้วยวิธี Site-directed mutagenesis โคลนเข้าสู่ *E. coli* พบว่า สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากการแปลรหัสของชิ้นส่วน MCR-C และ MCR-N ส่งผลให้ปริมาณของผลผลิต 3-HP เพิ่มขึ้นจาก 0.15 g/L เป็น 40.6 g/L (Liu et al., 2016) แต่ความเป็นกรดที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณการผลิต 3-HP ในระดับอุตสาหกรรม โดยค่า pH ที่ลดลงใน 3-HP ส่งผลต่อ *E. coli* ที่ไม่ทนต่อกรด จึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้งานในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรม



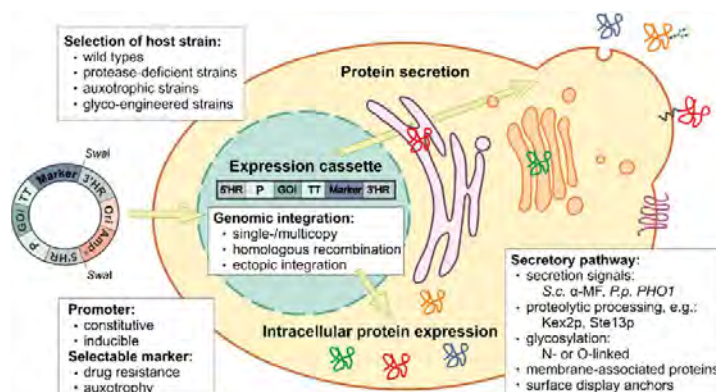
รูปที่ 2.3 ปฏิกริยาการสลายโมเลกุลเพื่อสร้าง 3-HP ผ่านวิถี malonyl-CoA (Liu et al., 2013)

2.3. ระบบการแสดงออกของยีสต์ *Kamagatella pastoris*

ระบบการแสดงออกของยีสต์ได้รับความนิยมในการใช้เป็นระบบการแสดงออกของยีน เนื่องจากมีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีชีวภาพ โดยยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วในอาหารที่เตรียมได้ง่ายด้วยต้นทุนไม่สูง และมีข้อมูลทางพันธุกรรมที่สมบูรณ์ รวมทั้งข้อมูลการศึกษาลำดับเบสทั้งจีโนมที่ครบถ้วน มีพลาสมิดที่เสถียร ซึ่งประกอบไปด้วยยีนที่สำคัญต่อการเกิดรีคอมบิเนชันของยีน และสามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ดี (Parapouli et al., 2020) นอกจากนี้ยีสต์ยังมีความทนต่อกรดซึ่งเป็นสภาวะที่จำเป็นต่อการสร้าง 3-HP จากปฏิกิริยา glutathione-dependent ภายในเซลล์ของยีสต์สามารถลดความเป็นพิษของ aldehyde dehydrogenase ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการเปลี่ยน 3-HPA เป็น 3-HP (Ji et al., 2018)

2.3.1 ลักษณะทั่วไป

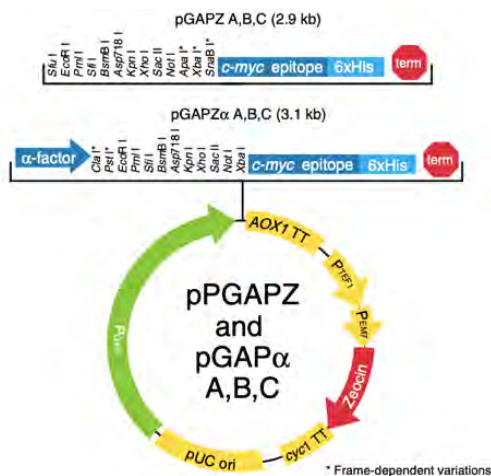
K. pastoris มีชื่อก่อนหน้าว่า *Pichia pastoris* เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญเติบโต (methylotrophic yeast) ยีสต์มีลักษณะเซลล์แบบเซลล์เดี่ยว (unicellular) มีขนาดจีโนม 9,400 กิโลเบส ประกอบด้วย 4 โครโมโซมมีการศึกษาลำดับเบสเสร็จสมบูรณ์ (Love et al., 2016) โดยมียีนที่สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนได้จำนวน 5,313 ยีน จากผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ พบว่า ยีนจำนวนหนึ่งที่สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนที่มีการนำส่งเข้าสู่จีโนมของ *K. pastoris* มีต้นกำเนิดจากการถ่ายโอนยีนของโปรคาริโอตและยูคาริโอต (Doolittle, 1999) *K. pastoris* เป็นยีสต์ที่นิยมใช้เป็นเซลล์ให้อาศัย ได้รับการพัฒนาจนสามารถใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตเฮเทอโรโลกัสโปรตีนออกมาใช้นอกเซลล์ เนื่องจากมีระบบการแสดงออกของยีนแบบเฮเทอโรโลกัส (heterologous expression system) ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตและหลั่งโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น โดยขั้นตอนการสร้างระบบการแสดงออกของยีนแบบเฮเทอโรโลกัสของ *K. pastoris* ต้องพิจารณาจากปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ การเลือกสายพันธุ์ของเซลล์ให้อาศัย โพรโมเตอร์ที่ใช้ ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก รูปแบบการสอดแทรกยีน รวมทั้งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการผลิตโปรตีนภายนอกเซลล์ (รูปที่ 2.4) (Ahmad et al., 2014) นอกจากนี้ *K. pastoris* มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาถูกลงและไม่ซับซ้อน รวมทั้งทนทานต่อสภาวะ pH ต่ำและความเข้มข้นสูงของน้ำตาล ส่งผลให้สามารถใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมเพื่อการสอดแทรกยีนได้ง่าย และเป็นเซลล์ให้อาศัยที่มีประสิทธิภาพ (Cereghino and Cregg, 2000) เช่นเดียวกับ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีการศึกษาอย่างมากในด้านพันธุศาสตร์อีกหนึ่งชนิด ทั้งนี้ *K. pastoris* สามารถใช้วิธีการเช่นเดียวกับ *S. cerevisiae* ในการดัดแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมได้ โดยมีโพรโมเตอร์ให้เลือกหลายชนิด เช่น โพรโมเตอร์แบบ Alcohol oxidase I (AOX1) หรือ โพรโมเตอร์แบบ Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAP) เป็นต้น นอกจากนี้การที่ *K. pastoris* ไม่มีการผลิตเอมไซม์ภายในเซลล์เพื่อย่อยโปรตีน และระดับโปรตีนที่เซลล์ผลิตเองค่อนข้างต่ำจึงมีการปนเปื้อนกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนน้อย ส่งผลให้สามารถทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการความบริสุทธิ์ได้ง่าย (Batt, 2014)



รูปที่ 2.4 ระบบการแสดงออกของยีนแบบเฮเทอโรโลจัสใน *Kamagattella pastoris* (Ahmad et al., 2014)

2.3.2 ดีเอ็นเอเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก

ดีเอ็นเอเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของ *K. pastoris* ที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้กันมาก คือ พลาสมิด pPICZ α และ pGAPZ α ซึ่งประกอบไปด้วยยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ zeocin ที่มีความยาวประมาณ 375 คู่เบส เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับการคัดเลือกเซลล์ให้อาศัยที่ได้รับการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (Daly and Hearn, 2005; Invitrogen, 2010 : online) โดยพลาสมิด pGAPZ α (รูปที่ 2.5) ถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้ในระบบการแสดงออกของยีนทั้งใน *E. coli* และ *K. pastoris* ข้อดีของการใช้พลาสมิด pGAPZ α คือ เป็นพลาสมิดที่ไม่ต้องใช้สารในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน เช่น เมทานอล เนื่องจากประกอบด้วยส่วนของโพรโมเตอร์แบบ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (pGAP) ที่มีการแสดงออกของยีนตลอดเวลา อีกทั้ง พลาสมิด pGAPZ α ยังประกอบด้วย α -factor prepropeptide ซึ่งช่วยทำให้ยีสต์สามารถผลิตโปรตีนออกนอกเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังมี C-terminal (His) $_6$ tag ที่ช่วยในกระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดยยังประกอบไปด้วยส่วนที่สำคัญอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1 (Invitrogen, 2010 : online; Invitrogen, 2013 : online)



รูปที่ 2.5 ส่วนประกอบของพลาสมิด pGAPZ α (Invitrogen, 2010 : online)

ตารางที่ 2.1 หน้าที่ของส่วนประกอบต่าง ๆ ของพลาสมิด pGAPZ α A (Invitrogen, 2013 : online)

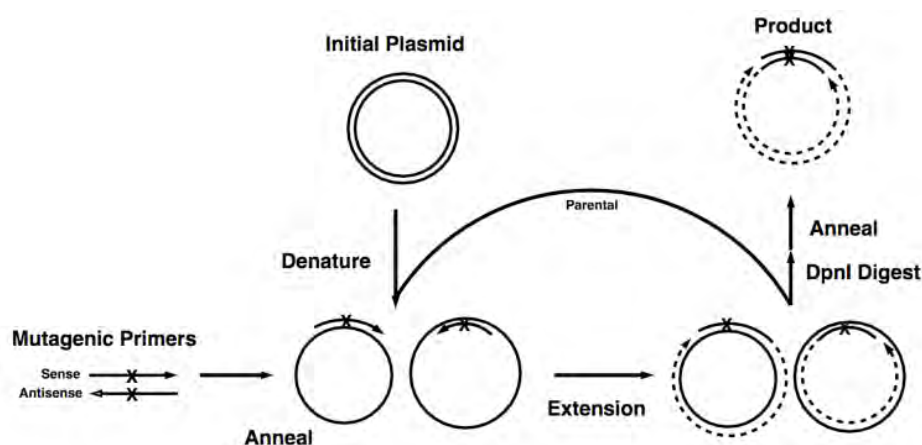
ส่วนประกอบ	หน้าที่
GAP promoter	เป็นโพรโมเตอร์ที่สามารถแสดงออกของยีนได้ตลอดเวลา โดยไม่ต้องใช้สารเหนี่ยวนำ
α -factor secretion signal peptide	ช่วยในการนำโปรตีนที่ <i>K. pastoris</i> สร้างขึ้นมาออกสู่ภายนอกเซลล์
Multiple cloning site	เป็นบริเวณดีเอ็นเอที่ใช้เชื่อมยีนเป้าหมายเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีน
<i>c-myc</i> epitope (Glu-Glu-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu)	ช่วยในการคัดแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยจับกับ anti- <i>myc</i> antibody หรือ anti- <i>myc</i> -HRP antibody
C-terminal polyhistine (6xHis) tag	ช่วยในการคัดแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการไปจับกับ metal-chelating resin
AOX1 transcription termination (TT) region	หยุดกระบวนการถอดรหัสและเติมพอลิอะดีนีนปลายด้าน 3' ของอาร์เอ็นเอในระหว่างกระบวนการ RNA processing
<i>TEF1</i> promoter (GenBank accession nos. D12478, DO1130)	เป็นโพรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนด้านทานยาปฏิชีวนะ zeocin ใน <i>P. pastoris</i>
<i>EM7</i> promoter	เป็นโพรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนด้านทานยาปฏิชีวนะ zeocin ใน <i>E. coli</i>
Zeocin TM resistance gene (<i>Sh ble</i>)	ยีนด้านทานยาปฏิชีวนะ zeocin ซึ่งช่วยในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว
<i>CYC1</i> transcription region (GenBank accession no. M34014)	เป็นลำดับเบสที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA processing ทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นมีความเสถียร
pUC origin	จุดเริ่มการเพิ่มจำนวนพลาสมิดเมื่ออยู่ภายใน <i>E. coli</i>

2.4. การพัฒนาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคพันธุศาสตร์

จากการศึกษาทางด้านชีวสังเคราะห์ พบว่านักวิทยาศาสตร์สามารถคัดกรองจุลินทรีย์ที่ต้องการได้จากธรรมชาติ แต่พบว่าประสิทธิภาพในการผลิตสารที่ต้องการนั้นยังไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากปริมาณและประสิทธิภาพของสารที่ได้ค่อนข้างต่ำ ปัจจุบันจึงริเริ่มการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เพื่อให้สามารถผลิตสารเคมีที่ใช้เพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เทคนิคนี้สามารถเปลี่ยนโครงสร้างในระดับโมเลกุล และใช้วิธีคัดกรองที่มีประสิทธิภาพเพื่อให้ได้พันธุ์กลายตามที่ต้องการ (Pham et al., 2019; Ko et al., 2020)

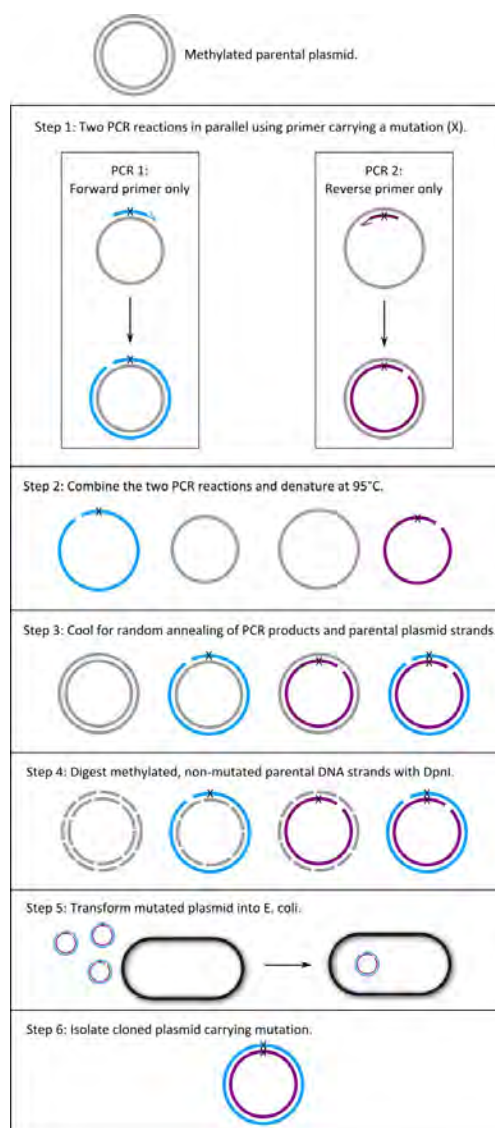
2.4.1 Site-directed mutagenesis

การกลายเฉพาะตำแหน่งโดยอาศัยหลักการทำพีซีอาร์ เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง จากการควบคุมยีน โดยดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของโปรตีน รวมทั้งเพื่อใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาพัฒนาสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยกระบวนการเริ่มจากการแยกดีเอ็นเอสายเดี่ยวออกจากดีเอ็นเอสายคู่ในพลาสมิด แล้วจับกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยให้มีการเปลี่ยนแปลงเบสไปจากดีเอ็นเอแม่แบบ เช่นการสร้างไพรเมอร์ที่สามารถจับได้กับส่วนใดส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอ แต่ไม่มีช่วงที่เป็นคู่สมอยู่ โดยแทนที่เบสที่เป็นคู่สมด้วยการกลายสังเคราะห์ (cassette mutagenesis) หรือการทำลูกผสม (DNA hybridization) และสร้างการกลายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR reaction) (รูปที่ 2.6) ซึ่งไพรเมอร์จะทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส และดีเอ็นเอไลเกสสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตลอดสายจนสมบูรณ์ เมื่อเกิดการจำลองตัวเองจะได้โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีเบสเปลี่ยนไปจากปกติ ส่งผลให้เมื่อเกิดการแสดงของยีนในเซลล์ที่ให้อาศัย การถอดรหัสและแปลรหัสจะได้โปรตีนที่เกิดการกลาย (Adereth et al., 2005; Laible and Boonrod, 2009)



รูปที่ 2.6 หลักการพื้นฐานของ Site-directed mutagenesis ในขั้นตอน PCR reaction (ที่มา : Creative Biostructure, 2018 : online)

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายเฉพาะตำแหน่งของยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ เริ่มต้นจากดีเอ็นเอที่เรทราบบลำดับเบสและได้มีการพิจารณาแล้วว่าต้องการให้เกิดการกลายตำแหน่งใด หลังจากนั้นใช้ไพรเมอร์สังเคราะห์ขนาดสั้นๆ ประมาณ 18-30 เบส ที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ต้องการ โดยไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบเกิดเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นจากวิธีพีซีอาร์ จึงมีการเปลี่ยนแปลงของเบสไปจากปกติตามไพรเมอร์ที่ใช้ แล้วทำการโคลนดีเอ็นเอที่เกิดการกลายนี้ และแสดงออกในเซลล์ที่ให้อาศัยเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนที่สร้างขึ้นต่อไป (รูปที่ 2.7) (Edelheit, Hanukoglu and Hanukoglu, 2009)



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการทำ Site-directed mutagenesis โดยพลาสมิดต้นแบบ (parental plasmid) แสดงเป็นสีเทา เส้นสีฟ้าและสีม่วงแสดงการสังเคราะห์จากวิธีพีซีอาร์ ตัวอักษร x แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ (Edelheit, Hanukoglu and Hanukoglu, 2009)

2.4.2 Zeocin™ antibiotic resistance marker

Zeocin™ หรือ ZeoR (C₆₀H₈₉N₂₁O₂₁S₃) เป็นเครื่องหมายคัดเลือกชนิดยีนต้านทานยาปฏิชีวนะในเซลล์ให้อาศัย เช่น ยีสต์ (Baron et al., 1992) และในกลุ่มโพรคาริโอต (Drocourt et al., 1990) (ตารางที่ 2.2) เพื่อการคัดกรองและการคัดเลือกพันธุ์กลาย เมื่อยีนกลายได้รับการโคลนและแสดงออกโดยการสร้างโปรตีนในเซลล์ให้อาศัยตามลักษณะที่ต้องการ (Invitrogen, 2010 : online)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณความเข้มข้นของ Zeocin™ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Invitrogen, 2010 : online)

จุลินทรีย์	ความเข้มข้นของ Zeocin™ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
<i>Escherichia coli</i>	25-50 µg/ml ใน Low Salt LB Medium*
<i>Kamagatella pastoris</i>	10-1000 µg/ml (varies with strain and medium)

*ประสิทธิภาพการคัดเลือกตามความเข้มข้นของ NaCl < 5 g/L (<90 mM)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

3.1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

<i>Escherichia coli</i> DH5 α	(Genscript, USA)
<i>Kamagatella pastoris</i>	(Genscript, USA)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(สวทช., ประเทศไทย)
พลาสมิดลูกผสม (pGAPZ α A)	(Invitrogen, USA)

3.2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

KOD Plus Mutagenesis Kit	(Toyobo, Japan)
ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Plasmid EasyPure	(Macherey-Nagel, Germany)
<i>i</i> -Taq™ plus DNA polymerase	(iNtRON Biotechnology, Inc.)
10X <i>i</i> -Taq™ plus PCR Buffer	(iNtRON Biotechnology, Inc.)
เจลอะกาโรส (agarose gel)	(Bulldog Bio, UK)
เครื่องทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)	(Bioer technology, China)
เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)	(Vision Scientific, USA)
เครื่องเขย่าสาร (shaker)	(Vision Scientific, Korea)
เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (digital balance)	(Ohaus, USA)
เครื่องถ่ายภาพและบันทึกภาพเจล (gel documentation)	(Maestrogen, Taiwan)
เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge)	(Vision Scientific, Korea)
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerate centrifuge)	(Hermie, Germany)
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet)	(Esco, Singapore)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (Autoclave)	(Daihan Scientific, Korea)
ตู้อบเชื้อ (incubator)	(Mettler, Germany)
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	(BioTek, USA)
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography)	(Shimadzu, Japan)

3.3. สารเคมี

วุ้นผง (Agar)	(วุ้นบริสุทธิ์, ประเทศไทย)
น้ำตาล (Glucose)	(Ajax Finechem, Australia)
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	(Himedia, India)
เปปโตเน (Peptone)	(Himedia, India)
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	(Ajax Finechem, Australia)
ทริปโตเน (Tryptone)	(Bacto, Australia)

จีเนติซิน (Geneticin)	(GoldBio, USA)
ซีโอซิน (Zeocin™)	(Invitrogen, USA)

3.4. วิธีการดำเนินงาน

3.4.1. วิเคราะห์ codon usage ของยีน *mcr* สำหรับการแสดงออกใน *K. pastoris*

ใช้ข้อมูลของยีน *mcr* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GENBANK Database หมายเลข nucleotide accession number AAS20429.1 ที่ได้จาก *Chloroflexus aurantiacus* มาตรวจจสอบ codon usage (<https://www.idtdna.cpm>) ใน *K. pastoris* และนำยีน *mcr* ที่ผ่านการทำ codon usage เพื่อใช้ใน *K. pastoris* ไปวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อให้มีความเหมาะสมกับระบบการแสดงออกของ *K. pastoris*

3.4.2. สังเคราะห์ยีน *mcr* เพื่อการก่อการกลายพันธุ์ใน *K. pastoris*

ส่งผลจากการทำ codon usage ใน *K. pastoris* ไปที่บริษัท GenScript USA Inc. เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ยีน *mcr* สำหรับการก่อการกลายพันธุ์

3.4.3. ตรวจสอบยีน *mcr* เพื่อการแสดงออกใน *K. pastoris* จากการตรวจสอบยีน *mcr* ที่แทรกอยู่ในจีโนมของ *S. cerevisiae*

3.4.3.1. สกัดพลาสมิดที่ประกอบด้วยยีน *mcr* จาก *Escherichia coli* DH5 α ที่ได้รับการอนุเคราะห์จากนางสาว สุพัตรา เลิศศรีวงษ์ โดยใช้ NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel, Germany)

นำเชื้อ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertaini (LB) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำอาหารเหลวที่มีเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำ Buffer A1 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ จากนั้นเติมน้ำ Buffer A2 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมน้ำ Buffer A3 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเตรียมคอลัมน์ และดูดส่วนใสใส่ภายในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติมน้ำ Buffer AQ 450 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ลงในหลอดไมโครเซ็นติพีทวีก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ Buffer AE 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำสารละลายเซลล์ที่ได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทำพีซีอาร์ จากนั้นผสมส่วนผสมสำหรับการทำพีซีอาร์ (ตารางที่ 3.1) นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยขั้นตอนถัดมาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งจะทำการซ้ำจำนวน 30 รอบ และสุดท้ายตามด้วย

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลพีซีอาร์มาทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบสำหรับการทำพีซีอาร์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
Sterilized distilled water	36.2
10x <i>i</i> -Taq™ plus PCR Buffer (1X)	5.0
Forward primer MCR3pF (5' TTTCTTCCTCTAGGGTGTCTG 3') (0.5 μM)	1.0
Reverse primer MCR3pR (5' ATTAAGCCTTCGAGCGTCC 3') (0.5 μM)	1.0
dNTP (2.5 mM)	5.0
<i>i</i> -Taq™ plus DNA Polymerase (2.5 U)	0.8
Template (100 ng)	1.0

3.4.3.2.เตรียมเซลล์ *S. cerevisiae* ให้มีสภาพที่เหมาะสมต่อการถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสม และการถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *S. cerevisiae* (ดัดแปลงจาก Gietz and Schiestl, 2007)

นำ *S. cerevisiae* มาทำการเลี้ยงบนอาหารแห้ง Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นใช้ลูปเซีย *S. cerevisiae* จำนวน 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำค่าที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นเจือจางสารละลายเชื้อดังกล่าวด้วยอาหารเหลว YPD ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้สารละลายเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 1.2-1.6 (จำนวนเซลล์ยีสต์เท่ากับ 10^7) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายตะกอน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร และแบ่งสารละลายเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เติมส่วนประกอบในการถ่ายฝากพลาสมิดเข้าสู่ *S. cerevisiae* (ตารางที่ 3.2) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

จากนั้นเติมอาหารเหลว YPD ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำไปใส่เปอร์ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่มียาปฏิชีวนะจีนิติดิซิน 200 และ 500 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบการถ่ายฝากพลาสมิดเข้าสู่ *S. cerevisiae*

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
PEG3350 (50% w/v)	240
LiAc (1 M)	36
Plasmid DNA (1.0-10 µg)	5

3.4.3.3. การทำโคลนนิ่งพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใน

S. cerevisiae

สุ่มเลือกโคลนนิ่งของ *S. cerevisiae* ที่ได้รับการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยใช้ปลายทิวเปียโคลนนิ่งละลายในน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และนำสารละลายเซลล์ที่ได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทำพีซีอาร์ จากนั้นผสมส่วนผสมสำหรับการทำพีซีอาร์ (ตารางที่ 3.3) นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยขั้นตอนถัดมาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งจะทำการซ้ำจำนวน 30 รอบ และสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลพีซีอาร์มาทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที และทำการส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ไปยังบริษัทแปซิฟิก ไชแอนด์ จำกัด

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบสำหรับการทำพีซีอาร์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
Sterilized distilled water	36.2
10x <i>i</i> -Taq™ plus PCR Buffer (1x)	5.0
Forward primer MCR1pF (5' TTTCTTCCTCTAGGGTGTCTG 3') (0.5 µM)	1.0
Reverse primer MCR1pR (5' TTCAGCTTCATGTCTCCAAA 3') (0.5 µM)	1.0
dNTP (2.5 mM)	5.0
<i>i</i> -Taq™ plus DNA Polymerase (2.5 U)	0.8
Template (100 ng)	1.0

3.4.4. ออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ site-directed mutagenesis

ใช้ข้อมูลของยีน *mcr* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GENBANK Database หมายเลข nucleotide accession number AAS20429.1 เพื่อการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *mcr* ด้วยโปรแกรม Primer3Plus และคำนวณค่า Tm (melting temperature) ด้วยโปรแกรม Tm calculator ออกแบบปลายของชิ้นยีน *mcr* ที่จะเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGAPz α (Invitrogen, USA) สำหรับการแสดงออกโปรตีนในยีสต์ *K. pastoris* โดยให้มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* และ *XbaI* เพื่อการตัดต่อเข้ากับเวกเตอร์

3.4.5. สังเคราะห์ยีนกลายของ *mcr* โดยใช้เทคนิค PCR site-directed mutagenesis โดย

ใช้ KOD Plus Mutagenesis Kit (Toyobo, Japan)

สังเคราะห์พลาสมิดที่มีการกลายของยีน *mcr* (*mcr^m*) เป็นอย่างน้อยจำนวน 1 ตำแหน่ง โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของโปรตีน MCR แม่แบบ (wild-type *mcr* template) ยีน *mcr* ที่มีตำแหน่งการกลาย 1 ตำแหน่งนี้เมื่อแปลรหัสแล้วจะมีกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงชนิดไป 1 ตำแหน่ง (S1114K) โดยใช้ชุด KOD Plus Mutagenesis Kit (Toyobo, Japan) นำยีน *mcr^m* โคลนเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *Escherichia coli* DH5 α โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Luria-Bertani (LB medium) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *mcr^m* จากนั้นสกัดพลาสมิดที่ประกอบด้วยยีน *mcr^m* จาก *E. coli* DH5 α โดยใช้ NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel, Germany) และทำการส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ไปยังบริษัทแปซิฟิก ไชแอนด์ จำกัด

3.4.6. การสังเคราะห์เวกเตอร์ลูกผสมที่ประกอบไปด้วยยีน *mcr^m*

3.4.6.1. การเพิ่มจำนวนยีน *mcr^m* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

เพิ่มจำนวนยีน *mcr^m* สำหรับเชื่อมเข้าสู่เวกเตอร์ pGAPz α ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยออกแบบไพรเมอร์มีความจำเพาะกับบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr^m* ทั้งแบบฟอร์เวิร์ด (5'GCGGCCGCATGAGTGGTACAGGTAGA-3') และรีเวิร์ส (5'TCTAGAAACAGTGATTGCTCTACC-3') ซึ่งบริเวณที่ขีดเส้นใต้คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* ตามลำดับ เพื่อให้สอดคล้องกับ multi-cloning site ของเวกเตอร์ pGAPz α การเพิ่มจำนวนยีน *mcr^m* มีส่วนประกอบดังนี้ (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบสำหรับการทำพีซีอาร์ สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *mcr^m*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Sterillized distilled water	36.2
10x <i>i</i> -Taq™ plus PCR Buffer (1x)	5.0
Forward primer MCRnoti-F (5' <u>GCGGCCGC</u> ATGAGTGGTACAGGTAGA-3')	1.0
Reverse primer MCRxbai-R (5' <u>TCTAGAAAC</u> AGTGATTGCTCTACC-3')	1.0
dNTP (2.5 mM)	5.0
<i>i</i> -Taq™ plus DNA Polymerase (2.5 U)	0.8
Template (100 ng)	1.0

นำไปทำปฏิกิริยาที่สภาวะดังนี้ ขั้นแรกที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที โดยขั้นต้นถัดมาที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยทำปฏิกิริยา 30 รอบ และสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.4.6.2. การตัดยีน *mcr^m* และเวกเตอร์ pGAPz α ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* และเชื่อมยีน *mcr^m* เข้าสู่เวกเตอร์ pGAPz α

วัดปริมาณดีเอ็นเอของยีน *mcr^m* และพลาสมิด pGAPz α ที่ทำให้บริสุทธิ์ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (spectrophotometer) จากนั้นนำค่าปริมาณดีเอ็นเอที่วัดไปคำนวณหาปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* แล้วตัดยีน *mcr^m* และเวกเตอร์ pGAPz α ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* โดยทำปฏิกิริยาดังนี้ (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Sterillized distilled water	18
1x CutSmart Buffer	5.0
Forward primer MCRnoti-F (5' <u>GCGGCCGC</u> ATGAGTGGTACAGGTAGA-3')	1.0
Reverse primer MCRxbai-R (5' <u>TCTAGAAAC</u> AGTGATTGCTCTACC-3')	1.0
DNA	25

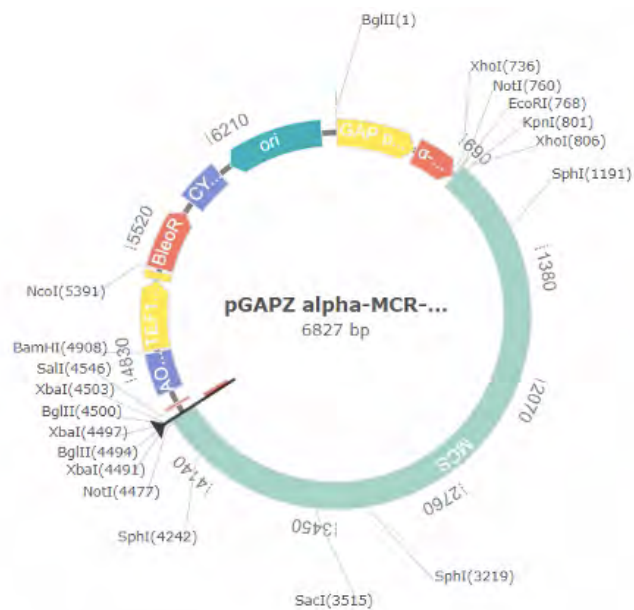
บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำการ Heat inactivation ที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

ทำการเชื่อมต่อยีน *mcr^m* และเวกเตอร์ pGAPz α ด้วยส่วนประกอบดังนี้ (ตารางที่ 3.6) โดยเวกเตอร์ที่มียื่นปลายประกอบอยู่ให้มีชื่อว่า เวกเตอร์ลูกผสม pGAPz α -MCR^m (รูปที่ 3.1)

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบในการสร้างเวกเตอร์ลูกผสม pGAPz α -MCR^m

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Sterillized distilled water	4.0
Ligase Buffer	1.0
T4 DNA Ligase	1.0
Vector DNA (pGAPz α)	1.0
Insert DNA (<i>mcr^m</i> gene with <i>NotI</i> and <i>XbaI</i>)	3.0

บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 ส่วนประกอบของเวกเตอร์ลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมยีน *mcr^m* กับเวกเตอร์ pGAPZ α

3.4.7 การส่งถ่ายเวกเตอร์ที่มียีน *mcr^m* ที่มีการกลายเฉพาะจุดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

3.4.7.1. การส่งถ่ายเวกเตอร์ pGAPz α -MCR^m ที่มียีน *mcr^m* ที่มีการกลายเฉพาะจุดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *S. cerevisiae*

นำ *S. cerevisiae* มาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วันในอาหารเหลว Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) 5 มิลลิตร จากนั้นทำการวัดด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ

เอ (spectrophotometer) สารละลายเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 1.2-1.6 (จำนวนเซลล์ยีสต์เท่ากับ 10^7) จากนั้นถ่ายโอนไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร และแบ่งสารละลายเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เติมส่วนประกอบในการถ่ายฝากพลาสมิดเข้าสู่ *S. cerevisiae* (ตารางที่ 3.7) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติมอาหารเหลว YPD ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำไปสเปรดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่มียาปฏิชีวนะซีไอซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน (ดัดแปลงจาก Gietz and Schiestl, 2007)

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบการถ่ายฝากพลาสมิดเข้าสู่ *S. cerevisiae*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
PEG3350 (50% w/v)	240
LiAc (1 M)	36
Plasmid DNA plus water	34
Boiled single-stranded DNA (20 mg/ml)	50

3.4.7.2. การส่งถ่ายเวกเตอร์ pGAPz α -MCR^m ที่มียีน *mcr^m* ที่มีการกลายเฉพาะจุดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *K. pastoris*

การส่งถ่ายเวกเตอร์ pGAPz α -MCR^m ที่มียีน *mcr^m* ที่มีการกลายเฉพาะจุดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *K. pastoris* ด้วยกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชั่นร่วมกับวิธี lithium acetate transformation วิธีการนี้ประกอบไปด้วยการเลี้ยงเซลล์ *K. pastoris* ในอาหารเหลว Yeast Extract-Peptide-Dextrose (YPD) ที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าในเครื่องบ่มความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำเซลล์ *K. pastoris* ไปบ่มใน 1M lithium acetate พร้อมกับเวกเตอร์ pGAPz α -MCR^m ปริมาณ 20 นาโนกรัม แล้วจึงผ่านกระแสไฟฟ้าตามวิธีของ Suga และคณะ (Suga et al., 2005) คัดเลือกโคลนด้วยการใช้ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ Zeocin (Jessop-Fabre et al., 2016) แล้วตรวจทดสอบพลาสมิดลูกผสมในแต่ละโคลนที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI*

3.4.8. ตรวจสอบความถูกต้องของยีน *mcr^m*

สกัดพลาสมิดลูกผสมใน *K. pastoris* ด้วยการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร YPD เติมสารปฏิชีวนะ Zeocin แล้วเพิ่มปริมาณยีนกลาย *mcr^m* ในโคลนที่คัดเลือก ส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) (Pacific Science, Thailand)

3.4.9. ตรวจสอบการผลิต 3-HP ใน *K. pastoris*

เพาะเลี้ยง *K. pastoris* ในอาหาร YPD ที่เติม 2% glucose ในฟลาสก์ที่มีการเพิ่มผิวสัมผัส (baffled flask) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าในเครื่องบ่มความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง อย่างน้อย 25 โคลนเทียบกับ negative control วัดความขุ่นของเซลล์ที่ OD 600 และทำการทดสอบความสามารถในการผลิต 3-HP ด้วย Gas Chromatography (Shimadzu, Japan)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. ผลการตรวจสอบ codon usage

จากการวิเคราะห์ผล optimize codon ของยีน *mcr* เพื่อใช้ใน *K. pastoris* และวิเคราะห์ ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ของยีน *mcr* ใน *C. aurantiacus* ได้ผลดังนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* ที่ได้จากการ optimize codon ของยีน *mcr* เพื่อใช้ใน *K. pastoris* มีค่าความเหมือนกับฐานข้อมูล NCBI เท่ากับ 77 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* ที่ไม่เหมือนกับฐานข้อมูล 23 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.1)

Sequence ID: Query_65065 Length: 3660 Number of Matches: 1


Range 1: 6 to 3659 [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2790 bits(3093)	0.0	2811/3654(77%)	0/3654(0%)	Plus/Plus
Query 6	TGGCACTGGTAGATTGGCTGGCAAAATAGCCCTAATCACCGCGGTCAGGTAATATAGG	65		
Sbjct 6	TGGTACAGGTAGATTGGCTGGTAAAATAGCATTGATAAATGGTGGTCCCGGTAACATAGG	65		
Query 66	TAGTGAGCTAACCAGAAGGTTCTAGCTGAAGGCGCAACAGTGATCATAAGTGAAGAAA	125		
Sbjct 66	TAGTGAATTGACAAGAAGATTCTTGGCTGAAGGTGCAACTGTTATTATCTCTGGTAGAAA	125		
Query 126	CCGTGCTAAATTGACAGCTCTAGCTGAACGTATGCAGGCAGAAGCTGGCGTCCCGCAA	185		
Sbjct 126	CAGAGCTAAATTGACAGCTTTGGCAGAAAAGAAATGCAAGCTGAAGCAGGTGTTCCAGCTAA	185		
Query 186	GAGAATAGATCTTGAGGTTATGGACGGATCCGACCCCTGTCGCTGTAAGGGCAGGCATCGA	245		
Sbjct 186	AAGAATTGATTGGAAAGTTATGGATGGTCTTGATCCAGTTGCTGTTAGAGCAGGTATTGA	245		
Query 246	GGCAATAGTGGCCAGGCATGGCCAGATCGATATCCTAGTCAATAACGCCGGATCCGCCGG	305		
Sbjct 246	AGCTATTGTTGCAAGACATGGTCAAATCGATATTTGGTTAAACAATGCAGGTTCACTGG	305		
Query 306	AGCCCAAAGGAGACTGGCAGAAAATCCCATTAACGAAGCTGAATTAGGTCAGGCCCGCA	365		
Sbjct 306	TGCACAAAGAAGATTGGCTGAAATCCATTAACGAAGCTGAATTGGTCCAGGTGCAGA	365		
Query 366	AGAAACTTTGCATGCATCTATTGCCAATTTATTAGGAATGGSTGGCACTTAATGAGAAT	425		
Sbjct 366	AGAAACATTGCATGCTTCTATCGCAAATTTGTTGGGTATGGGTTGGCATTGATGAGAAT	425		
Query 426	TGCAGCTCCCTCATATGCCAGTGGGATCAGCTGTATAAATGTTTCCACCATTTCTCCCG	485		
Sbjct 426	TGCTGCTCCACACATGCCAGTTGGTTCAGCAGTTATAATGTTTCTACTATTTTAGTAG	485		

รูปที่ 4.1 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงบางส่วนของ optimize codon ของยีน *mcr* เพื่อใช้ใน *K. pastoris* เทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI

4.2. ผลการสังเคราะห์ยีน *mcr* เพื่อกำหนดการกลายใน *K. pastoris*

จากการ optimize codon ของยีน *mcr* สำหรับการแสดงออกใน *K. pastoris* โดย original sequence คือลำดับกรดอะมิโนของยีน *mcr* จาก *C. aurantiacus* มีขนาด 3,660 คู่เบส ผลิตภัณฑ์ Malonyl-Coenzyme A Reductase และ optimize codon คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* สำหรับการแสดงออกใน *K. pastoris* ที่ผ่านการ optimize codon จาก original sequence ของยีน *mcr* (รูปที่ 4.2)



Make Research Easy

Job ID: 2020100601352311320Z

Date: 10/06/2020

Gene Name: malonyl-CoA reductaseCFX

Host Organism: Pichia pastoris

Sequence Type: Protein

Size: 1220aa

Excluded enzyme sites:

Original sequence:

```

MSGTGRLAGRTALITGGAGNIGSLLTBRFLAEGATVILSGRRRAELTALAEEMQAEAGVPAKRIQLVNRSGSDPVAVRAGTGLIVARHQQIILIV
NNAGSAGAKRLAELPLTSAELGPGASSTLHASLANLLGGWILLMIAAPHPVGGAVINVSIISSRAEYVGRIPYVTKAALNALHQLAARELDG
ARGIRVNTIPPGPIZSDRIRIVFQRMDQLRGRSEGGTAETHFLNTRLCRMDQGLAERRFPSVGDVADAAVFLASAEASAALGGTLEVTGHEMLP
KCFSEPLIARVTLRTEDASGRTLLICAGDQILEVMALTEGLRITGSESVLIQPKSAARLAQYEQAVNESHRLAGADTFPIALGGDEDFPAYIDRV
EDWGAGHNTGGIHAAYLEAETHHPAPCVLEVDURVYLNELAKETGIVIASRLARVWQGRILTEGARARGFPVILISNGADQNGSVYGRIGSA
AIQQDIRVNRHEAELDYQRAEAGIGVLPVWGNQZYRFANSELEGLEEACAWYQLLRHQRIHETLNLIPANIAPITGAREASVQWASLIGD
HCKVALITGGASACIGGGICRLIALGGARVMLAARRHRLKQMQANTQSELABYVITDVEDRVHIAFGCDVSSBAQLADIVERTLSAGTVDVYLL
MNAGIAGVEMVLDMPVBSWRITLIJANLLNYSLMRKLAPLMSKQGGSYIDVSSYPSGKDAIIPYPNRADYAQKAGORAMAEVFAKFLGPEL
QINATAPGVEGDRLRGTGERPOLFARRARLILENKRIMELHAAIIAAKRTESRHEELVELLDPNDVALEQMPAAPTALRELRARRFRSGDPA
ASSSEALLMRSIAAKLIALRLNGGYVPADIFAHLPHPDPFFFTFRAIDREARKVRDQINGMLYLQRMPTETVAMANTVYLAORIVSGSTPHFS
GSLRYERTPTSGELFGLPSFRLAELVGSINYLIGEHUTEHLNLLARAYDERYGARQVVMIVETEYGAETMRKLLHDIVYAGRLMTIVAGUQIEA
AIDQAIVRYSGAPGPPVCTPFBPLPTVPLVGRKDDHSTVLSBAQFALCEIQLIHPHFVARKIALSDGASLALVPTTFYVAGSYTEQLALANPIT
TLHAFATIGVSEBETAQRILINQVOLTARRAAEBSRDPHERQQSLERFIEAVLIVTAPLFPBADTRYAGRIHRGRATIV

```

Optimized sequence:

```

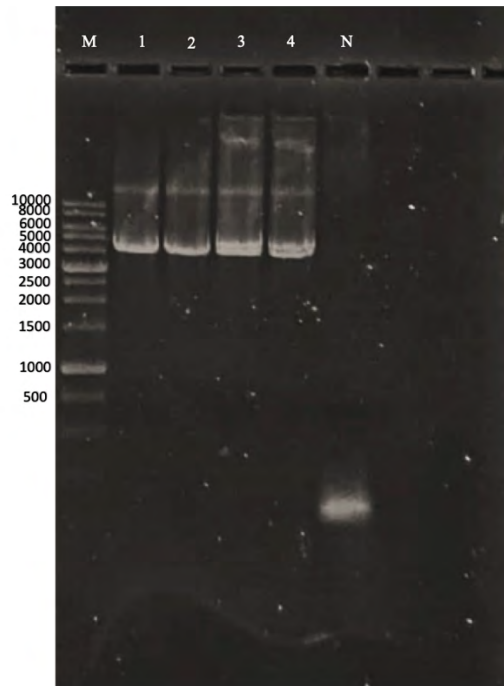
ATGTGGGGAGCGGATAGATPGGGGGAAAGATCGGCCCTATTACGGGGGAGCGGTAAACAATTGGTTCGTGAGCTAACCGAGCGGATTCCTGGGTG#
AGGTGGAGCTYTAJATACTAGTGGGGCAACCGCTGCCAAGCTTACAGCCCTGGCGGAGAGGATGCACCGCTGAGGCGGGGGCTTCTCTGTRAGAGAA
TAGATCTGGAGGTTAVGSAUSSEFTCGAATCCCTTCGCGGTAAAGAGCGCGGTATAGAAGCCATGGTAGCAAGGCAUGGSCAAATAGACSTRTTGGT
AACAALGCTGGSTTCGGCCGGGCACAAAGAGCGCTAGSSGAGATCGCTTCCADAGAGGCGGAACCTGGGCGCCGGGAGAGAGACTCTGGAIDGC
CTCCATCGCAACCTTCTAGSAATGGGGTGGACCTGATCGGAAATGGCTGCCCCACACATCCGCTAGGCTTCAGCCGCTCAFAAACSTATGCAACCA
TPTTTCAGCGGAGCGGAAAPACTADGGCGAAATCGGATATGTCACAGCIIAAGGGGCTCICANTCGCTTTTCGCAATAGCGGCACGGGAACCTGSC
GCTGGGGAAATACGAGGTTAAATGGATCTTCCCTGGACCGCTCGAAAGTGAATAGAACTGGGACGCTCTTCAGAGATPSSGAGCACTGAAAGGGAAAG
AGCAGAAAGGGATACAGGTCACCAATTTCTRAACACTATACGGCTGTCCCGAGCTAACGACCAGGTCGATAGAGAGGCGCATTCGCGAGGCTE
GGRATGTTGCTGATCTCTGGCTGTTTTCTGCGACTCTGCGAATCCCGCGGCAATATCACAGAGAGCCATACAAAGTTGACAGTGTGATGTTGGAAGTCCCG
GCTGCGGGAATACGAGCTTAATCGCTGGCAGAGACAGCTTCCGTAGAAICGAGGCGCTCGGGGCTACAAAGCTAAIDCTVETGGGDTGAGCAGATAGA
AGAACTCATGGGCTCAGGGCATGCTTCCGAACCTTGATCGGAAGTGAATATAGCGCTTAGAAAGCGCTCCCGCGCTAGCGCACTTTGAGCAAG
CTGTGAAGTAAAGTAGAGCGCTTCGAGCGCAGAGCTTACCCTCGGCTATTTGCACTACCGCTGATATCCCGGGGAGCCCTCCACTATTCGATGCTGTG
TTGATTTGGGAGCGGGGAGAGACAGCGGGAGCAATCCATCGAGCGGTTATTTTCGGCGGACCCTGGCATGAGCGGAGCGCTGCTGTATAGAGST
AGATGATGAAGGCGCTGCTCAATTTTCTCGGTGACAGAGATTACTTGGGACTATGGTCAATGCAAGTGGACTGGTATAGTACTGCGAATCTCAGGGCC
TACCCCTCCGGGCCAGGGCCGCGGGGCCCGAGCTGATCTTTTATTAAGAGCGCTCGGACCGAGAGCGGTAATGCTATCGGCGAATCAGTCAAGTCAAGG
GCTATAGGAGAGCIIAATGGGCTGTGGGCTCTGAAAGCGGAACTGATATVATVATGAAAGGAGAGTGCAGCGGGTGAAGCGGGTTCVPGCCCGGATTTG
GGCAACAGGATCTGCGCTTCCGAAATAGATCTCTTSSAGGACTCGAATTCGGCTGTGCTTGGACTGCTCAGTNTTAACTCTCAGAAAGAGAA
TERAGGAAATPACACTCAACATCCAGGTAATATAACAGCACTACCGGCTCGCGGCTGAGCGCTCTAGCTTGGGAGAGAAAGCTATCTAGTGGGCT
CAACTGGTAAAGCTGGCTCTTATCACAGAGGCTAGCGCTGAGGATAGGAGAGCAAAATAGGAGGGCTGGCTTGGCTTAPGTGGAGGAGGCTAATGTT
AGAGCGCCAGATGCTCACAACCTTGAAACAAATGCAAGCAATGATACAACTGTGAGCTAGCGGAAATGGCTTATVACGAGTGTAGAGGAGGCTGAGG
AGATGGCACTAGCTTGGATATCTTCCCTCGAGGCAACACTCCGAGACTTGGTAGAGSAAAGGTTAAGCGCATGGGGAGCCCTGGATTAATGCTGAAT
AACTATCCGGATTTGCTGGGTAGAGAGATGGTTAAGACATCGCGGTPGAAGGCTCGAGACACACGCTTATTCCTATTAATTAATAGCAATTA
CTACAGATCGGTAAACTCGCTCCATGGTAGAAAAGAAAGGCTTAGGGIACAATYTAGAAATTTTCTCTTATTTTGGCGGGGAGAAAGAGCGCG
CGAATCCPATTCCATAATGGGCGATTTAGCAGTCAAGCAAGGCGGAGCAGCGCCCGCAAGCGAAGATTTTGTAGGCTCTGAGCGCCAGAAAPR
CAGATCAAGGGGATTTGCCCGAGGGCCCTTCGAGGGAGATGCTCTGCGGGAAACCGGSAACCTCGCGGATTTGCTCGCTGCCCGGAGACTTAAAT
CTTGGAGAACAAAGCTTTGAATGAATTAACCGGCGCATTAAGTGTGCGCAAGAGAGAGAGAGAGTGTGATGAATGATGUTVAGTGTGCTVSC
TACTTAAAGACTAGCAGCTTTGCGAGCAAAAGCCGGCTGCCCGAGAGCGCTCAGAGAACTTGGCGCGCGTTFATGATCCGAGAGTACCTCGCC
GCTAGITGAGACTTGGCACTACTTAAZUGAGTATVSCCGGCTAAGTATCTCGCTGCTTACATTAAGSAGETTAUGTTCATAGCGGACAGACATD
TSCCAAITTAAGCGAAATCCCGGAGCCCATTTTTCAGTTCGCGGAAAGANTGAGAGGGAGGCTAGGAAAGTTGCGGATGGGATCAGGGCATGGCT
ACTTGCACCGTATCCGAGGGCACTGATGTAGCGATGGGCAAGTATAGTATCTAGCTGACCGCAANTCAAGCGGCGGACACTTCACTCGTACG
STGCGCTCGATATAGSGGIACACCAAGCGGCGGGGAACCTTTCGGTCTCCCTTCCGCGAGAGAGSCTTGCAGAAITGGSGGGGDCGACTGATTA
NCTTTAGGCGAACACTAAGTGAACACTAAATTEAUTGGCGGGGGTACTTAGAGAGATAAGGAGCGAGGAGSCTGCTCATGATTTGATTTGASA
CTSAACAGGAGCTGAGAGCATGCTGCACTCTTGCATATCATGTTGAGGCTGGCAGGTTGATGACATTTGCTGGCATGACATCAGGCA
GCRAATGATTAAGCAATGCCGPTAGCGAGCGGCAAGCGCAAGYGGTCTGTGATGGCTTTCCGGGUSPTCCCAAGTCCCGCTGGTGGCGGAA
GGACTTGGATTCGCTCAACAGTCTAAGCGAAGCGAAATTCCTGAGGTTTTCGAAACTCAACTAACACATCACTTCCTGTGAGCGGAGAAAGATTG
CTCTTAGCGAGCGGCAAGCGCTCGCATTAGTAACTCCAGAGACCAAGGCTACTTCCGACCAACCGAGCAATTTGCTACTTCCCAATTTATAAAAAC
ACTGTGACAGATTTACTTGGAGGATCGGCTCGAGTCCGAGAGGAGCGGCGCAAGGATATGATCAATCAAGTGGACCTGAGCTAGAGCTYAG
GGCGGAAAGCGCAAGGAGTCCCATGAGCGACAAAGGAGATTGGAAGGATTCAGCGAAGCGGATTACTCGGTGACCGCAACTTACTCTGCGAAG
CTGATACTGATAGCGCGCTGGTATTATAGAGGAGCTGCTATAAGGCTG

```

รูปที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการ optimize codon ของยีน *mcr* จาก *C. aurantiacus* เพื่อการ แสดงออกใน *K. pastoris*

4.3. ตรวจสอบชิ้นยีน *mcr* ที่แทรกอยู่ในจีโนมของ *S. cerevisiae*

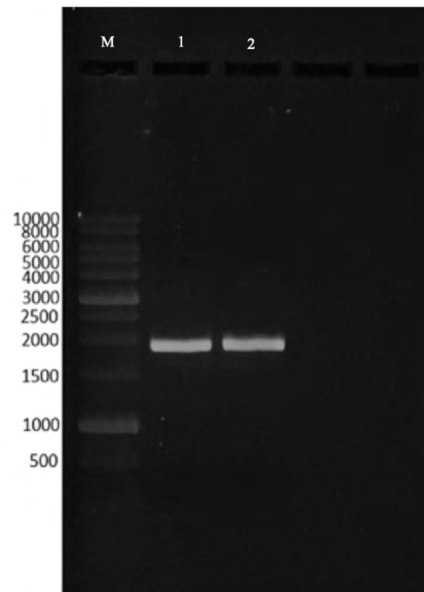
สำหรับการเพิ่มจำนวนและการตรวจสอบยีน *mcr* ใน *E. coli* ด้วยการสกัดพลาสมิด เมื่อทำการตรวจสอบด้วยการทำพีซีอาร์ และนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีขนาดประมาณ 3600 คู่เบส (รูปที่ 4.3) ดังนั้นจึงคาดว่าเป็นแถบดีเอ็นเอของยีน *mcr* เนื่องจากในขั้นตอนพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *mcr* ซึ่งทำให้มีผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 3600 คู่เบส



รูป 4.3 ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบพลาสมิดที่มียีน *mcr* และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 3,600 คู่เบส (M) ดีเอ็นเอ แลตเตอร์ขนาด 1 กิโลเบส (2-5) ยีน *mcr* ขนาด 3,600 คู่เบส (N) Negative control

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *S. cerevisiae* ด้วยวิธีของ Gietz และ Schiestl (Gietz and Schiestl, 2007) และตรวจสอบยีน *mcr* ที่แทรกอยู่ในจีโนมของ *S. cerevisiae* โดยนำโคลนที่ขึ้นในอาหาร YPD agar ที่มีส่วนผสมของซีโอซิน 200 500 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 1 วัน ผลปรากฏว่า *S. cerevisiae* สามารถขึ้นบนอาหาร YPD agar ที่มีส่วนผสมของซีโอซินได้ที่มีความเข้มข้น 200 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่ายีสต์นั้นได้รับเอาพลาสมิดที่มียีนต้านทานต่อซีโอซินเข้าไปในจีโนมแล้ว

การทำโคลนพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใน *S. cerevisiae* โดยใช้ไพรเมอร์ MCR1pF และ MCR1pR แล้วดูขนาดของยีน *mcr* ที่แทรกอยู่ในจีโนมของ *S. cerevisiae* และนำไปวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 ผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใน *S. cerevisiae* และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 1,700 คู่เบส (M) ดีเอ็นเอ แลตเตอร์ขนาด 1 กิโลเบส (1, 2) ยีน *mcr* ที่แทรกอยู่ในจีโนมของ *S. cerevisiae* ขนาด 1,700 คู่เบส

การวิเคราะห์ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* จากการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใน *S. cerevisiae* เทียบกับฐานข้อมูล NCBI ของยีน *mcr* ใน *C. auranticus* พบว่ายีน *mcr* (SCpMCR45) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,123 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* ที่ส่งตรวจมีค่าความเหมือนกับฐานข้อมูลใน NCBI ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* บางส่วนที่ไม่เหมือนกับฐานข้อมูลเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.5)

Job Title	SCpMCR45
RID	PY1FKNTW014 Search expires on 09-27 17:12 pm Download All
Program	BLASTN Citation
Database	nt See details
Query ID	lcl Query_30287
Description	SCpMCR45
Molecule type	dna
Query Length	1123
Other reports	Distance tree of results MSA viewer

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy		
Sequences producing significant alignments						
Download Manage Columns Show 100						
Select all 6 sequences selected						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Synthetic construct CaMCR gene for malonyl-CoA reductase, complete cds	442	442	86%	5e-119	70.26%	LC175022.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chloroflexus aurantiacus strain OK-70-fl malonyl-CoA reductase (mcr) gene, complete cds	430	430	93%	9e-116	69.66%	AY530019.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chloroflexus sp. Y-400-fl, complete genome	419	419	93%	2e-112	69.47%	CP001384.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chloroflexus aurantiacus J-10-fl, complete genome	419	419	93%	2e-112	69.47%	CP000909.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chloroflexus sp. WFC3-1 malonyl-CoA reductase gene, partial cds	208	208	59%	5e-49	67.76%	KC154234.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chloroflexus aggregans DSM 9485, complete genome	105	105	85%	5e-18	63.08%	CP001337.1

รูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

4.4. ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ site-directed mutagenesis

จากการออกแบบไพรเมอร์ (ตารางที่ 4.1) ไพรเมอร์ที่ได้เป็นไปตามการพิจารณา โดยมีปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 40-60 % และมีค่า Tm ในช่วง 50-80 องศาเซลเซียส forward primer และ reverse primer มีความยาว 24 นิวคลีโอไทด์ ภายในยีนมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อใช้ในการเชื่อมต่อเข้าสู่เวกเตอร์ pGAP α เพื่อถ่ายเข้าสู่ *K. pastoris*

ตารางที่ 4.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตำแหน่ง	ลำดับเบส 5'-3'	ค่า Tm ($^{\circ}$ C)	ปริมาณ GC (%)
Forward primer	GCTAAATTAGCATTGGTTACTCCA	52.40	37.50
Reverse primer	ACCATCAGACAATGCGATCTTTCT	56.09	41.67

บริเวณที่ขีดเส้นใต้ หมายถึง ตำแหน่งของ forward primer ที่ถูกออกแบบให้ลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนไปจากยีน *mcr 2* ตำแหน่ง เพื่อทำการกลายในตำแหน่ง S1114K

4.5. สังเคราะห์ยีนกลายของ *mcr* โดยใช้เทคนิค PCR site-directed mutagenesis โดยใช้ชุด KOD Plus Mutagenesis Kit (Toyobo, Japan)

ผลการสังเคราะห์ยีน *mcr^m* (รูปที่ 4.6) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน *mcr* บริเวณที่ทำการกลาย เทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นฉบับ (Template) ของยีน *mcr* ในด้าน forward และ reverse พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนที่ทำการกลายมีบางจุดที่ผลเบี่ยงเบนไปจากที่คาดการณ์ไว้ โดยจุดที่ต้องการเปลี่ยนจาก S1114K (TCA>AAA) ซึ่งแสดงกรดอะมิโนเป็นเซอริน (Serine) เปลี่ยนเป็น ไลซีน (Lysine) แต่ผลที่ได้เป็น (TCA>ACA) ซึ่งเป็นไทโอนีน (Threonine) (รูปที่ 4.7) นอกจากนี้ยังมีตำแหน่งที่ให้ลำดับเบสที่ผิดไปจากที่ควรจะเป็นอีกหนึ่งตำแหน่งที่คาดว่าจะส่งผลต่อการแสดงโปรตีนใน *K. pastoris*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

template      GGAAGATACGGTGCCAGACAAGTTGTTATGATTGTTGAAACTGAAACAGGTGCTGAAAC   60
S1114K-F      -----AAAGTTNTGTGAACTGAAACAGGTGCTGAAAC   32
                *  ** *  *****

template      TATGAGAAGATTATTGCATGATCATGTTGAAGCTGGTAGATTGATGACAATTGTCGCTGG   120
S1114K-F      TATGAGAAGATTATTGCATGATCATGTTGAAGCTGGTAGATTGATGACAATTGTCGCTGG   92
                *****

template      TGACCAAATTGAAGCTGCAATTGATCAAGCTATTACTAGATATGGTAGACCAGGTCCAGT   180
S1114K-F      TGACCAAATTGAAGCTGCAATTGATCAAGCTATTACTAGATATGGTAGACCAGGTCCAGT   152
                *****

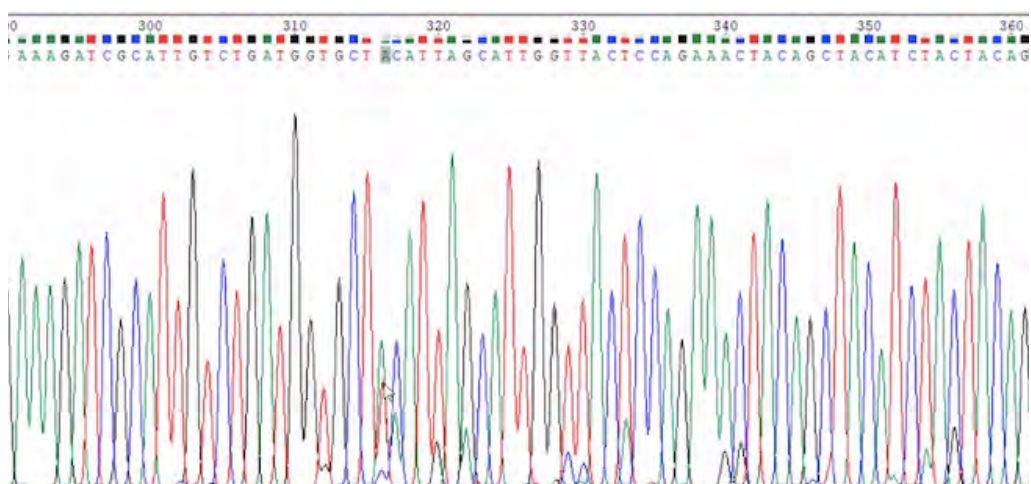
template      TGTTTGTACTCCTTTTAGACCATTACCAACAGTTCATTGGTTGGTAGAAAAGATTCTGA   240

```

S1114K-F	TGTTTGTACTCCTTTTAGACCATTACCAACAGTTCATTGGTTGGTAGAAAAGATTCTGA *****	212
template	TTGGTCAACAGTTTTGTCTGAAGCTGAATTTGCAGAATTGTGTGAACATCAATTGACTCA	300
S1114K-F	TTGGTCAACAGTTTTGTCTGAAGCTGAATTTGCAGAATTGTGTGAACATCAATTGACTCA *****	272
template	TCATTTAGAGTTGCTAGAAAAGATCGCATTGTCTGATGGTGCTTCATTAGCATTGGTTAC	360
S1114K-F	TCATTTAGAGTTGCTAGAAAAGATCGCATTGTCTGATGGTGCTTCATTAGCATTGGTTAC *****	332
template	TCCAGAACTACAGCTACATCTACTACAGAACAATTCGCTTTGGCAAACCTCATCAAGAC	420
S1114K-F	TCCAGAACTACAGCTACATCTACTACAGAACAATTCGCTTTGGCAAACCTCATCAAGAC *****	392
template	TACATTGCATGCTTTTACTGCAACAATTGGTGTGAATCAGAAAGAACTGCCTAAAGAAT	480
S1114K-F	TACATTGCATGCTTTTACTGCAACAATTGGTGTGAATCAGAAAGAACTGCCTAAAGAAT *****	452
template	TTTAATTAATCAAGTTGATTGACAAGAAGAGCTAGAGCAGAAGAACCAAGAGATCCACA	540
S1114K-F	TTTAATTAATCAAGTTGATTGACAAGAAGAGCTAGAGCAGAAGAACCAAGAGATCCACA *****	512
template	TGAAAGACAACAAGAATTAGAAAGATTCATTGAAGCTGTTTTGTTGGTTACTGCACCATT	600
S1114K-F	TGAAAGACAACAAGAATTAGAAAGATTCATTGAAGCTGTTTTGTTGGTTACTGCACCATT *****	572
template	GCCACCAGAAGCCGACACCAGATACGCAGGTAGAATCCATAGAGGTAGAGCAATCACTGT	660
S1114K-F	GCCACCAGAAGCCGACACCAGATACGCAGGTAGAATCCATAGAGGTAGAGCAATCACTGT *****	632
template	TGGTTAAATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACCATCCGC	720
S1114K-F	TGGTTAAATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACCATCCGC *****	692
template	TCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTAT	780
S1114K-F	TCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTAT *****	752
template	AGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTCTTTTTTCTGTACAG	840
S1114K-F	AGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTCTTANTTTTCTGAACAG *****	812
template	ACGCGTGACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTC	900
S1114K-F	ACACGCGTACGCATGTAACATTATACTGACAACCTTGCTTGAGAAGGATTGGGACGCTC ** * ***** * * *****	872
template	GAAGCTTTAATTTGCGGC--	919
S1114K-F	CAAGCTTTACTTTGCGGCAT	893



รูปที่ 4.6 ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ยีน *mcr^m* และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 916 คู่เบส และ 3660 คู่เบส (M) ดีเอ็นเอ แลคเตอริขนาด 1 กิโลเบส (1) ชิ้นส่วนยีน *mcr^m* ก่อนทำการ ligation ด้วย KOD Plus mutagenesis kit (2) ยีน *mcr^m* หลังจากทำการ ligation ด้วย KOD Plus mutagenesis kit (3) พลาสมิดที่ประกอบด้วยยีน *mcr^m* ก่อนทำการ ligation ด้วย KOD Plus mutagenesis kit (4) พลาสมิดที่ประกอบด้วยยีน *mcr^m* หลังทำการ ligation ด้วย KOD Plus mutagenesis kit (P) Positive control (N) Negative control



รูปที่ 4.7 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* ที่ทำการกลายด้วย KOD Plus mutagenesis kit (Toyobo, Japan) และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ChromasPro พบว่า ในตำแหน่งของชิ้นส่วนของยีน *mcr* ที่มีบริเวณที่ต้องการการก่อการกลายตำแหน่งที่ S1114K ดังรูปแสดง

ตำแหน่งที่ 317 เบสไซโตซีน (Cytocine) ไม่ทำการเปลี่ยนเป็นเบสอะดีนีน (adenine) ตามที่คาดการณืไว้

ผลการสังเคราะห์ยีน *mcr^m* ในครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.8) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน *mcr* บริเวณที่ก่อการกลาย จากการนำผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ มาทำเจลิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียง 916 คู่เบส ส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) (Pacific Science, Thailand) และนำผลที่ได้เทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นฉบับ (Template) ของยีน *mcr* ในด้าน forward และ reverse พบว่า สามารถทำการสังเคราะห์ยีน *mcr^m* ในตำแหน่ง S1114K (TCA>AAA) ซึ่งแสดงกรดอะมิโนเป็นเซอริน (Serine) เปลี่ยนเป็น ไลซีน (Lysine) ได้สำเร็จ

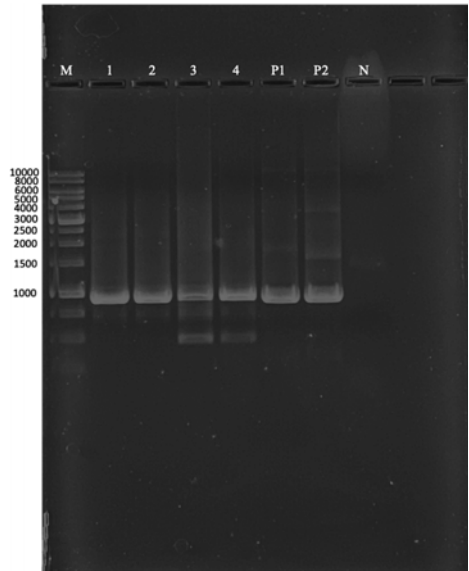
```

PSD1114L1_23MCR_F      -----AAAGTANTGAACTGAAACAGGTG----CTG
MCRtemplate             GGAAAGATACGGTGCCAGACAAGTTGTATGATTGTTGAAACTGAAACAGGTG----CTG
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      AAACTATGAGAAGATTATTGCATGATCATGTTGAAGCTGGTAGATTGATGACAAATTGTCG
MCRtemplate             AAACTATGAGAAGATTATTGCATGATCATGTTGAAGCTGGTAGATTGATGACAAATTGTCG
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      CTGGTGACCAAATTGAAGCTGCAATTGATCAAGCTATTACTAGATATGGTAGACCAGGTC
MCRtemplate             CTGGTGACCAAATTGAAGCTGCAATTGATCAAGCTATTACTAGATATGGTAGACCAGGTC
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      CAGTTGTTTGTACTCCTTTTAGACCATTACCAACAGTTCATTGGTTGGTAGAAAAGATT
MCRtemplate             CAGTTGTTTGTACTCCTTTTAGACCATTACCAACAGTTCATTGGTTGGTAGAAAAGATT
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      CTGATTGGTCAACAGTTTGTCTGAAGCTGAATTTGCAGAATTGTGTGAACATCAATTGA
MCRtemplate             CTGATTGGTCAACAGTTTGTCTGAAGCTGAATTTGCAGAATTGTGTGAACATCAATTGA
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      CTCATCATTTTCAGAGTTGCTAGAAAGATCGCATTGTCTGATGGTGCCTAAATTAGCATTGG
MCRtemplate             CTCATCATTTTCAGAGTTGCTAGAAAGATCGCATTGTCTGATGGTGCCTAAATTAGCATTGG
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      TTACTIONCAGAACTACAGCTACATCTACTACAGAACAATTCGCTTTGGCAAACCTTCATCA
MCRtemplate             TTACTIONCAGAACTACAGCTACATCTACTACAGAACAATTCGCTTTGGCAAACCTTCATCA
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      AGACTACATTGCATGCTTTTACTGCAACAATTGGTGTGAATCAGAAAGAACTGCTCAAA
MCRtemplate             AGACTACATTGCATGCTTTTACTGCAACAATTGGTGTGAATCAGAAAGAACTGCTCAAA
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      GAATTTTAATTAATCAAGTTGATTGACAAGAAGAGCTAGAGCAGAAGAACCAGAGATC
MCRtemplate             GAATTTTAATTAATCAAGTTGATTGACAAGAAGAGCTAGAGCAGAAGAACCAGAGATC
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      CACATGAAAGACAACAAGAATTAGAAAGATTCATTGAAGCTGTTTGTGGTTACTGCAC
MCRtemplate             CACATGAAAGACAACAAGAATTAGAAAGATTCATTGAAGCTGTTTGTGGTTACTGCAC
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      CATTGCCACCAGAAGCCGACACCAGATACGCAGGTAGAATCCATAGAGGTAGAGCAATCA
MCRtemplate             CATTGCCACCAGAAGCCGACACCAGATACGCAGGTAGAATCCATAGAGGTAGAGCAATCA
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      CTGTTGGTTAAATCATGTAATTAGTTATGTACGCTTACATTACGCCTCCCCCACAT
MCRtemplate             CTGTTGGTTAAATCATGTAATTAGTTATGTACGCTTACATTACGCCTCCCCCACAT
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      CCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTTATTTATTTT
MCRtemplate             CCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTTATTTATTTT
                          * * * * *
PSD1114L1_23MCR_F      TTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTCTGT

```

```

MCRtemplate      TTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTCAAATTTTTCTTTTTTCTGT
                  *****
PSD1114L1_23MCR_F ACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTGGGAC
MCRtemplate      ACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTGGGAC
                  ***** **
PSD1114L1_23MCR_F GCTCGAGGCTATAAATTTNNNTGNNNNANNA
MCRtemplate      GCTCGAAGGCTTAATTTGCGGC-----
                  *          *
    
```



รูปที่ 4.8 ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ยีน *mcr^m* และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 916 คู่เบส (M) ดีเอ็นเอแลนเดอร์ขนาด 1 กิโลเบส (1-4) ชิ้นส่วนยีน *mcr^m* หลังทำการ ligation ด้วย KOD Plus mutagenesis (P1,P2) Positive control (N) Negative control

ผลการสกัดยีน *mcr^m* จากการถ่ายฝากยีน เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 α เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *mcr^m* (รูปที่ 4.9) จากการนำผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์มาทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียง 916 คู่เบส ส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) (Pacific Science, Thailand) และนำผลที่ได้เทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นฉบับ (Template) ของยีน *mcr* ในด้าน forward และ reverse รวมทั้งเทียบกับข้อมูลของยีน *mcr* ที่ทำการก่อการกลายต้นแบบด้วย KOD plus mutagenesis kit พบว่า สามารถยืนยันการสังเคราะห์ยีน *mcr^m* ในตำแหน่ง S1114K (TCA>AAA) ซึ่งแสดงกรดอะมิโนเป็นเซอรีน (Serine) เปลี่ยนเป็น ไลซีน (Lysine) ได้สำเร็จ

```

PSD1114K2_23MCR_F -----CCTGGCAGTGACTGGCAACAGGTGCTGAAAC
PSD1114L1_23MCR_F -----AAAGTANTGAAC TGAAACAGGTG----CTG
MCRtemplate      GGAAAGATACGGTGCCAGACAAGTTGTATGATTGTTGAAACTGAAACAGGTG----CTG
                  *          *          *          *          *
PSD1114K2_23MCR_F TNATGAGAAGANGNATTCATGATCATGTTGAAGCTGGTAGATTGATGACAATTGTCG
PSD1114L1_23MCR_F AAACATGAGAAGATTATTCATGATCATGTTGAAGCTGGTAGATTGATGACAATTGTCG
MCRtemplate      AAACATGAGAAGATTATTCATGATCATGTTGAAGCTGGTAGATTGATGACAATTGTCG
                  * * * * *
    
```

```

PSD1114K2_23MCR_F      CTGGTGACCAAATTGAAGCTGCAATTGATCAAGCTATTACTAGATATGGTAGACCAGGTC
PSD1114L1_23MCR_F      CTGGTGACCAAATTGAAGCTGCAATTGATCAAGCTATTACTAGATATGGTAGACCAGGTC
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      CAGTTGTTTGTACTCCTTTTAGACCATTACCAACAGTTCATTGGTTGGTAGAAAAGATT
PSD1114L1_23MCR_F      CAGTTGTTTGTACTCCTTTTAGACCATTACCAACAGTTCATTGGTTGGTAGAAAAGATT
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      CTGATTGGTCAACAGTTTGTCTGAAGCTGAATTTGCAGAATTGTGTGAACATCAATTGA
PSD1114L1_23MCR_F      CTGATTGGTCAACAGTTTGTCTGAAGCTGAATTTGCAGAATTGTGTGAACATCAATTGA
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      CTCATCATTTTCAGAGTTGCTAGAAAGATCGCATTGTCTGATGGTGCTAAATTAGCATTGG
PSD1114L1_23MCR_F      CTCATCATTTTCAGAGTTGCTAGAAAGATCGCATTGTCTGATGGTGCTAAATTAGCATTGG
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      TTACTCCAGAACTACAGCTACATCTACTACAGAACAATTTCGCTTTGGCAAACCTTCATCA
PSD1114L1_23MCR_F      TTACTCCAGAACTACAGCTACATCTACTACAGAACAATTTCGCTTTGGCAAACCTTCATCA
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      AGACTACATTGCATGCTTTTACTGCAACAATTGGTGTGAATCAGAAAGAAGCTGCTCAA
PSD1114L1_23MCR_F      AGACTACATTGCATGCTTTTACTGCAACAATTGGTGTGAATCAGAAAGAAGCTGCTCAA
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      GAATTTTAATTAATCAAGTTGATTTGACAAGAAGAGCTAGAGCAGAAGAACCAAGAGATC
PSD1114L1_23MCR_F      GAATTTTAATTAATCAAGTTGATTTGACAAGAAGAGCTAGAGCAGAAGAACCAAGAGATC
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      CACATGAAAGACAACAAGAATTAGAAAGATTCATTGAAGCTGTTTTGTTGGTTACTGCAC
PSD1114L1_23MCR_F      CACATGAAAGACAACAAGAATTAGAAAGATTCATTGAAGCTGTTTTGTTGGTTACTGCAC
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      CATTGCCACCAGAAGCCGACACCAGATACGCAGGTAGAATCCATAGAGGTAGAGCAATCA
PSD1114L1_23MCR_F      CATTGCCACCAGAAGCCGACACCAGATACGCAGGTAGAATCCATAGAGGTAGAGCAATCA
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      CTGTTGGTTAAATCATGTAATTAGTTATGTACAGCTTACATTACGCCTCCCCCAGAT
PSD1114L1_23MCR_F      CTGTTGGTTAAATCATGTAATTAGTTATGTACAGCTTACATTACGCCTCCCCCAGAT
MCRtemplate             *****

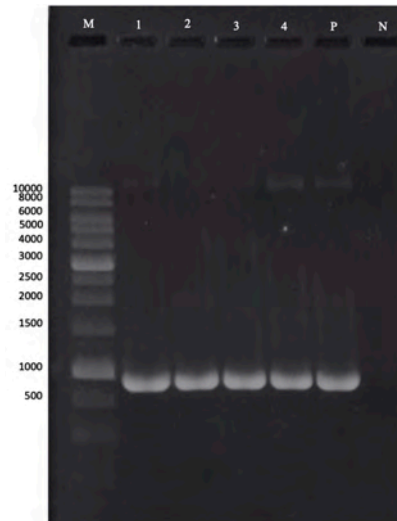
PSD1114K2_23MCR_F      CCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTTATTTATTTT
PSD1114L1_23MCR_F      CCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTTATTTATTTT
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      TTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGT
PSD1114L1_23MCR_F      TTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGT
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      ACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTGGGACG
PSD1114L1_23MCR_F      ACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTGGGAC
MCRtemplate             *****

PSD1114K2_23MCR_F      CTCATGTTTTTTGTTGGAGAAGAAGAAGAA
PSD1114L1_23MCR_F      GCTCGAGGCTATAATTTNNTGGNNNANNA
MCRtemplate             GCTCGAAGGCTTAATTTGCGGC-----
                          *           *

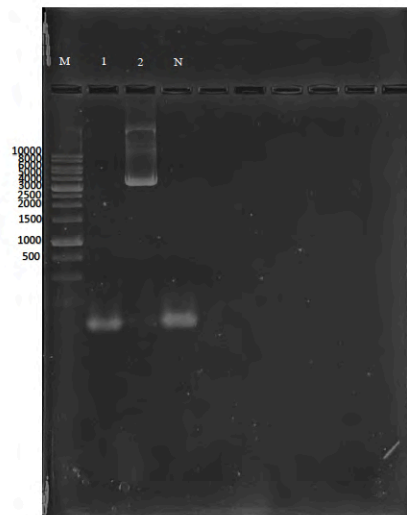
```

รูปที่ 4.9 ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการถ่ายฝากยีน *mcr^m* และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียง 916 คู่เบส (M) ดีเอ็นเอแลตเตอร์ขนาด 1 กิโลเบส (1-4) ชิ้นส่วนยีน *mcr^m* ที่สกัดจากเซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 α (P) Positive control (N) Negative control

4.6. การสังเคราะห์เวกเตอร์ลูกผสมที่ประกอบไปด้วยยีน *mcr^m*

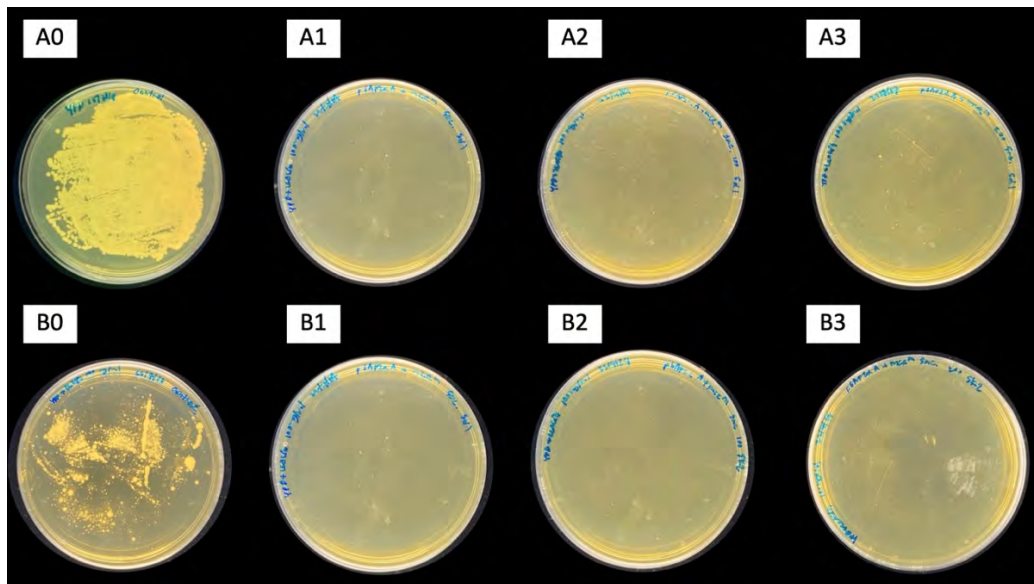
การตรวจสอบยีน *mcr^m* ที่มีบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* ที่ปลาย 5' และปลาย 3' ตามลำดับ แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นยีน *mcr^m* ที่มีบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ผลที่ได้พบว่าเป็น ชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 3672 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับชิ้นของยีน *mcr^m* ดังรูปที่ 4.10 โดยในเลนที่ 2 สามารถตรวจสอบยีน *mcr^m* ที่มีบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* ได้สำเร็จ แต่ในเลนที่ 1 นั้น ไม่สามารถตรวจสอบได้ เนื่องจากข้อผิดพลาดในการปิเปตต์ และการปนเปื้อนภายในหลอดพีซีอาร์ที่ส่งผลต่อการย่อยสลายของดีเอ็นเอ จากนั้นเชื่อมยีน *mcr^m* ที่มีบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* เข้าสู่เวกเตอร์ pGAP α A



รูปที่ 4.10 ผลการตรวจสอบขนาดของชิ้นยีน *mcr^m* ที่มีบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* และวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มีขนาดใกล้เคียง 3672 คู่เบส (M) ดีเอ็นเอแลตเตอร์ขนาด 1 กิโลเบส (1) ชิ้นส่วนยีน *mcr^m* จากผลการสังเคราะห์การกลายครั้งที่ 1 ที่มีบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* (2) ชิ้นส่วนยีน *mcr^m* จากผลการสังเคราะห์การกลายครั้งที่ 2 ที่มีบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* (N) Negative control

4.7. การส่งถ่ายเวกเตอร์ที่มียีน *mcr^m* ที่มีการกลายเฉพาะจุดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

หลังจากสกัดเวกเตอร์ลูกผสมจาก *E. coli* แล้ว นำเวกเตอร์ลูกผสม pGAP α -*mcr^m* ทำการเพิ่มความเข้มข้นของพลาสมิดลูกผสม และจึงถ่ายฝากเข้าสู่ *S. cerevisiae* จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD ที่เติมยาปฏิชีวนะซีโอสติน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า *S. cerevisiae* ที่มีเวกเตอร์ลูกผสม pGAP α -*mcr^m* สามารถเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่มียาปฏิชีวนะซีโอสติน ลงไป 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้เนื่องจากชุดควบคุมเป็นอาหารแข็ง YPD ที่เติม 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ *S. cerevisiae* ที่ไม่ได้รับเวกเตอร์ลูกผสม pGAP α -*mcr^m* สามารถเจริญบนอาหารได้ (รูปที่ 4.11) จึงไม่สามารถคาดได้ว่า *S. cerevisiae* ที่ขึ้นบนอาหารแข็ง YPD ที่เติมยาปฏิชีวนะซีโอสติน ลงไปได้รับเวกเตอร์ลูกผสมที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ



รูปที่ 4.11 *S. cerevisiae* ที่ได้รับการถ่ายฝากเวกเตอร์ลูกผสม pGAP α -*mcr^m* ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่มียาปฏิชีวนะซีโอซินที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(A0) ชุดควบคุมอาหารแข็ง YPD + *S. cerevisiae*

(B0) ชุดควบคุมอาหารแข็ง YPD + Zeocin + *S. cerevisiae*

(A1-A3, B1-B3) YPD + Zeocin + *S. cerevisiae* (pGAP α -*mcr^m*)

4.8. ตรวจสอบความถูกต้องของยีน *mcr^m*

เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อโรคโควิด-19 มีความรุนแรงเพิ่มขึ้นอย่างมาก ทางมหาวิทยาลัยได้ทำการขยายเวลาการปิดสถานที่ทำการชั่วคราว ทำให้แผนการดำเนินการที่จะทำคือ transformation recombinant vector เข้าสู่ *K. pastoris* ด้วยวิธี electroporation ไม่สามารถดำเนินการต่อได้

4.9. ตรวจสอบการผลิต 3-HP ใน *K. pastoris*

เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อโรคโควิด-19 มีความรุนแรงเพิ่มขึ้นอย่างมาก ทางมหาวิทยาลัยได้ทำการขยายเวลาการปิดสถานที่ทำการชั่วคราว ทำให้แผนการดำเนินการที่จะทำคือ ตรวจสอบการผลิต 3-HP ใน *K. pastoris* ไม่สามารถดำเนินการต่อได้ อย่างไรก็ตามในหน่วยปฏิบัติการวิจัยได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับในการวิเคราะห์หาปริมาณ 3-HP ได้สำเร็จเรียบร้อยแล้ว หากมีการ transformation recombinant vector เข้าสู่ *K. pastoris* ได้สำเร็จ ก็สามารถที่จะทำการทดสอบความสามารถในการผลิต 3-HP ด้วย Gas Chromatography ได้

บทที่ 5

อภิปรายผลและสรุปผล

การตรวจสอบ codon usage และวิเคราะห์ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกใน *K. pastoris* พบว่ายีน *mcr* ที่ได้จาก *C. auranticus* ยังไม่สามารถนำมาใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีน *mcr* ใน *K. pastoris* ได้โดยตรง เนื่องจากค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* ที่ได้จากการ optimize codon ของยีน *mcr* ใน *K. pastoris* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* ที่ไม่เหมือนกับฐานข้อมูลถึง 23 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้โปรตีนที่เราต้องการใช้สามารถแสดงออกได้ในสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการ โดยสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะเลือกใช้รหัสการแปลโปรตีนที่แตกต่างกัน เราจำเป็นต้องเลือกรหัสให้ที่พบได้ในเซลล์ให้อาศัยจากการ optimize codon (Quax et al., 2015) ดังนั้นเมื่อพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* ที่ไม่เหมือนกับฐานข้อมูลมากเกินไป จึงจำเป็นต้องส่งส่งเคราะห์ยีน *mcr* เพื่อให้ยีนสามารถแปลรหัสโปรตีนตามที่เราต้องการได้

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* และวิเคราะห์ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เทียบกับฐานข้อมูล NCBI ของยีน *mcr* ใน *C. auranticus* สาเหตุที่มีความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* บางส่วนที่ไม่เหมือนกับฐานข้อมูลเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะว่ายีสต์ *S. cerevisiae* มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่ต่างจาก *C. aurantiacus* จึงทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน (Kildegaard et al., 2016)

S. cerevisiae และ *K. pastoris* ใกล้เคียงกัน จึงนำมาใช้ในการทดสอบการเป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อเทียบเคียงการแสดงออกของยีน เนื่องจากระบบการจัดการทางพันธุกรรม (Genetic manipulation) ของ *S. cerevisiae* และ *K. pastoris* มีความใกล้เคียงกันและสามารถใช้ร่วมกันได้ บางระบบ (Darby et al., 2012) ในด้านของ codon frequency พบว่าระหว่าง *S. cerevisiae* และ *K. pastoris* มีความคล้ายกันมาก แสดงว่า สามารถสร้างโปรตีนโครงสร้างโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อาจปรับแต่ง codon optimization เพียงเล็กน้อย หรือมีความสามารถที่จะแปลรหัสโดย codon bias ไม่ส่งผลกระทบต่อลำดับกรดอะมิโนมากนัก (Tran et al., 2017) และการวิเคราะห์รูปแบบของ codon bias ในยีสต์ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน มีรายงานว่า รูปแบบ codon หนึ่งที่กระจายอยู่ในจีโนมของ *S. cerevisiae* สามารถช่วยส่งเสริมความเร็วในกระบวนการ protein elongation ในยีสต์ที่เป็นกลุ่มที่ใช้งานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Villada, Brustolini and Batista, 2017) ซึ่งในระหว่างการส่งส่งเคราะห์ยีน *mcr* สำหรับการแสดงออกใน *K. pastoris* ได้ทำการตรวจสอบยีน *mcr* ที่แทรกอยู่ในจีโนมของ *S. cerevisiae* เพื่อให้สามารถยืนยันการถ่ายฝากยีน *mcr* เข้าสู่จีโนมของยีสต์ได้เป็นเบื้องต้น ก่อนที่จะนำไปศึกษาผลของการก่อการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของยีน *mcr* เพื่อการผลิต 3-HP ในยีสต์ *K. pastoris* ต่อไป

ในการศึกษาการกลายของยีน *mcr* ที่มีผลต่อการผลิต 3-HP นี้ เลือกยีน *mcr* ที่ได้จากการ optimize codon ของยีน *mcr* เพื่อใช้ใน *K. pastoris* เป็นยีนต้นแบบในการจำลองยีนเพื่อการสังเคราะห์เวกเตอร์ที่ประกอบไปด้วยยีน *mcr* จากการออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็น TCA ซึ่งเป็นลำดับเบสที่ถอดรหัสออกเป็นกรดอะมิโนเซอรีนเปลี่ยนเป็นอะมิโนไลซีนที่มีลำดับเบสเป็น AAA ที่ตำแหน่ง S1114K ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ Malonyl-Coenzyme A Reductase เช่นเดียวกับในการศึกษาของ Liu และคณะ (Liu et al., 2016) ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ Site-directed mutagenesis โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบพิจารณาตามความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์ ประมาณ GC-content อยู่ระหว่าง 40-60 % ค่า Tm ของแต่ละไพรเมอร์มีค่าใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 50-80 องศาเซลเซียส (Lorenz, 2012) จากผลการทดลองคาดว่า ไพรเมอร์ที่ได้จะมีความจำเพาะต่อชิ้นยีนเป้าหมายและสามารถจำลองชิ้นดีเอ็นเอได้ต่อตามขนาด 3,660 bp ตามที่ต้องการ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจะถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อตรวจสอบความถูกต้องเพื่อใช้ในการเชื่อมต่อเข้าสู่เวกเตอร์ pGAP α และถ่ายเข้าสู่ *K. pastoris* ต่อไป

จากการสังเคราะห์ยีน *mcr^m* พบว่า เกิดตำแหน่งกลายที่ผิดพลาดไปจากที่คาดหวังไว้ ในตำแหน่งที่ต้องการเปลี่ยนคือ S1114K (TCA เป็น AAA) โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีตำแหน่งเปลี่ยนไปสองตำแหน่งเพื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แต่ผลที่ได้นั้นพบว่า ในการทำการทดลอง เกิดการกลายในตำแหน่งที่ผิดพลาดไปจากที่คาดหวังไว้อีก จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในข้อมูลของ KOD Plus mutagenesis kit พบว่าปัญหาที่เกิดขึ้นนั้น อาจเกิดจากข้อผิดพลาดในเรื่องของ inverse PCR ซึ่งสามารถแก้ไขในด้านของตรวจสอบความถูกต้องของการออกแบบไพรเมอร์ และ ลำดับขั้นตอนพีซีอาร์ (PCR conditions) โดยปรับในขั้น annealing จาก 54 องศาเซลเซียส เป็น 56 องศาเซลเซียส เพื่อลดการจับอย่างไม่เฉพาะเจาะจงระหว่างไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ และเพิ่มจำนวนรอบจาก 9 รอบ เป็น 10 รอบ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอและระยะเวลาให้ Ligation สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น (Toyobo, 2017 : online) พบว่าการปรับลำดับขั้นตอนพีซีอาร์ในข้างต้น สามารถทำให้ก่อการกลายพันธุที่ตำแหน่ง S1114K ได้สำเร็จและสามารถสังเคราะห์การกลายที่สองตำแหน่งของการกลายที่อยู่ข้างกันได้สมบูรณ์ อัตราการเกิดการกลายถูกต้องหลังจากเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* แม่นยำตามตำแหน่งที่ความถูกต้องทุกลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์การกลาย ถึงแม้ *E. coli* DH5 α จะมีการตัดระบบรีคอมมิเนชันและระบบการซ่อมแซมดีเอ็นเอบางส่วนออกไป แต่ยังคงมีระบบอื่น ๆ อยู่ในระบบของ *E. coli* ที่ส่งผลให้สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เกิดตำแหน่งมิวเทชันที่ไม่คาดหวังได้ (Morita et al., 2013)

จากการส่งถ่ายเวกเตอร์ที่มียีน *mcr^m* เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยที่เวกเตอร์ pGAP α สามารถส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์ให้อาศัย *S. cerevisiae* และ *K. pastoris* ได้เนื่องจากสามารถใช้โพรโมเตอร์ pGAP ได้ทั้งสองระบบ (Invitrogen, 2013 : online) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการถ่ายฝาก

เวกเตอร์ลูกผสม pGAP α -*mcr*^m เข้าสู่ *S. cerevisiae* เป็นเบื้องต้น ก่อนที่จะถ่ายฝากเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่ *K. pastoris* เนื่องจากเชื้อ *K. pastoris* ยังมาไม่ถึงด้วยระยะเวลาและสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อโรคโควิด-19 จากผลการตรวจสอบส่งถ่ายเวกเตอร์ที่มียีน *mcr*^m ที่มีการกลายเฉพาะจุดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *S. cerevisiae* พบว่าในชุดควบคุมอาหารแข็ง YPD ที่เติม 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ *S. cerevisiae* ที่ไม่ได้รับเวกเตอร์ลูกผสม pGAP α -*mcr*^m สามารถเจริญบนอาหารได้ จึงไม่สามารถสรุปผลได้ว่า *S. cerevisiae* ที่ขึ้นบนอาหารแข็ง YPD ที่เติมยาปฏิชีวนะซีโอสติน ลงไปได้รับเวกเตอร์ลูกผสมที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการหาสาเหตุ ซึ่งพบว่าอาจจะเป็นเพราะยาปฏิชีวนะซีโอสตินถูกเติมในอาหาร YPD ขณะที่อาหารยังร้อน ยาปฏิชีวนะซีโอสตินอาจเกิดการเสื่อมสภาพไปได้ เนื่องจากคุณสมบัติของยาปฏิชีวนะซีโอสติน ไม่ทนร้อนและทนแสง ดังนั้นควรปรับอุณหภูมิอาหาร YPD ให้เย็นลงก่อนเติมยาปฏิชีวนะซีโอสติน (Invitrogen, 2010 : online)

ในการทดลองนี้ได้ประสบผลสำเร็จในการสังเคราะห์การกลายที่สองตำแหน่งของการกลายที่อยู่ข้างกันได้สมบูรณ์ แต่เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อโรคโควิด-19 มีความรุนแรงเพิ่มขึ้นอย่างมาก ทางมหาวิทยาลัยได้ทำการขยายเวลาการปิดสถานที่ทำการชั่วคราว ทำให้ไม่สามารถดำเนินการทดลองลำดับถัดไปได้ ดังนั้นงานที่สามารถดำเนินการต่อไปได้ในอนาคตคือการตรวจความถูกต้องของยีน *mcr*^m โดยการ transformation recombinant vector เข้าสู่ *K. pastoris* ด้วยวิธี electroporation และหากมีการ transformation recombinant vector เข้าสู่ *K. pastoris* ได้สำเร็จ ก็สามารถที่จะทำการทดสอบความสามารถในการผลิต 3-HP ด้วย Gas Chromatography ได้

เอกสารอ้างอิง

- Adereth, Y., Champion, K. J., Hsu, T., and Dammai, V. 2005. Site-directed mutagenesis using *Pfu* DNA polymerase and T4 DNA ligase. Biotechniques 38(6) : 864-868.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Applied Microbiology and Biotechnology 98(12) : 5301-5317.
- Batt, C.A. 2014. Encyclopedia of food microbiology. Academic Press. USA.
- Baron, M., Reynes, J. P., Stassi, D., and Tiraby, G. 1992. A selectable bifunctional β -galactosidase:: phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. Gene 114(2) : 239-243.
- Borodina, I., Kildegaard, K. R., Jensen, N. B., Blicher, T. H., Maury, J., Sherstyk, S., and Öberg, F. 2015. Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via β -alanine. Metabolic Engineering 27 : 57-64.
- Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Reviews 24(1) : 45-66.
- Chen, Y., Bao, J., Kim, I.K., Siewers, V., and Nielsen, J. 2014. Coupled incremental precursor and co-factor supply improves 3-hydroxypropionic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic Engineering 22 : 104-109.
- Creative Biostrure. 2018. Site-directed Mutagenesis Libraries [Online]. Available from : <https://www.creative-biostructure.com/site-directed-mutagenesis-libraries-342.htm> [2020, September 24]
- Daly, R., and Hearn, M. T. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal 18(2) : 119-138.
- Darby, R. A., Cartwright, S. P., Dilworth, M. V., and Bill, R. M. 2012. Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris*. Recombinant Protein Production in Yeast 11-23.
- Della Pina, C., Falletta, E., and Rossi, M. 2009. Oxidation of allyl alcohol in the presence of a gold catalyst: A route to 3-hydroxypropionic acid. Chemistry and Sustainability Energy and Materials 2(1) : 57-58.

- Della Pina, C., Falletta, E., and Rossi, M. 2011. A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid. Green Chemistry 13(7) : 1624-1632.
- Doolittle, W. F. 1999. Lateral genomics. Trends in Biochemical Sciences 24(12) : M5-M8.
- Drocourt, D., Calmels, T., Reynes, J. P., Baron, M., and Tiraby, G. R. 1990. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. Nucleic Acids Research 18(13) : 4009.
- Edelheit, O., Hanukoglu, A., and Hanukoglu, I. 2009. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. BMC Biotechnology 9(1) : 1-8.
- Gietz, R. D., and Schiestl, R. H. 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nature Protocols 2(1) : 31-34.
- Henry, C. S., Broadbelt, L. J., and Hatzimanikatis, V. 2010. Discovery and analysis of novel metabolic pathways for the biosynthesis of industrial chemicals: 3-hydroxypropanoate. Biotechnology and Bioengineering 106(3) : 462-473.
- Hügler, M., Menendez, C., Schägger, H., and Fuchs, G. 2002. Malonyl-coenzyme A reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO₂ fixation. Journal of Bacteriology 184(9) : 2404-2410.
- Invitrogen. 2010. *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins [Online]. Available from : [https://www.pdfFiller.com/249799107-pgapz_manpdf-pGAPZ-A-B-ampampampamp-C-Pichia-pastoris-Expression -Vectors-from-Thermo-](https://www.pdfFiller.com/249799107-pgapz_manpdf-pGAPZ-A-B-ampampampamp-C-Pichia-pastoris-Expression-Vectors-from-Thermo-) [2020, September 1]
- Invitrogen. 2013. Easy selectTM *Pichia* expression kit for expresstion of recombinant proteins using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*[online]. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf. [2020, September 21]
- Jers, C., Kalantari, A., Garg, A., and Mijakovic, I. 2019. Production of 3-hydroxypropanoic acid from glycerol by metabolically engineered bacteria. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 7 : 124.

- Jessop-Fabre, M.M., et al. 2016. EasyClone-MarkerFree: A vector toolkit for marker-less integration of genes into *Saccharomyces cerevisiae* via CRISPR-Cas9. Biotechnology Journal 11(8) : 1110-1117.
- Ji, R.Y., et al. 2018. Metabolic engineering of yeast for the production of 3-hydroxypropionic acid. Frontiers in Microbiology 9 : 2185.
- Jiang, X., Meng, X., and Xian, M. 2009. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. Applied Microbiology and Biotechnology 82(6) : 995-1003.
- Kildegaard, K. R., et al. 2016. Engineering and systems-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 3- hydroxypropionic acid via malonyl-CoA reductase-dependent pathway. Microbial Cell Factories 15(1) : 1-13.
- Ko, Y. S., et al. 2020. Tools and strategies of systems metabolic engineering for the development of microbial cell factories for chemical production. Chemical Society Reviews 49(14) : 4615-4636.
- Laible, M., and Boonrod, K. 2009. Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. Journal of Visualized Experiments (27) : e1135.
- Liu, C., Wang, Q., Xian, M., Ding, Y., and Zhao, G. 2013. Dissection of malonyl-coenzyme A reductase of *Chloroflexus aurantiacus* results in enzyme activity improvement. Plos One 8(9).
- Liu, C., Ding, Y., Zhang, R., Liu, H., Xian, M., and Zhao, G. 2016. Functional balance between enzymes in malonyl-CoA pathway for 3-hydroxypropionate biosynthesis. Metabolic Engineering 34 : 104-111.
- Lorenz, T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. Journal of Visualized Experiments (63) : e3998.
- Love, K. R., et al. 2016. Comparative genomics and transcriptomics of *Pichia pastoris*. BMC genomics 17(1) : 550.
- Matsakas, L., Hrůzová, K., Rova, U., and Christakopoulos, P. 2018. Biological production of 3-hydroxypropionic acid: An update on the current status. Fermentation 4(1) : 13.
- Morita, R., et al. 2010. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. Journal of nucleic acids 2010.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., and Hatziloukas, E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. AIMS microbiology 6(1) : 1.
- Pham, J. V., et al. 2019. A review of the microbial production of bioactive natural products

- and biologics. Frontiers in Microbiology 10 : 1404.
- Raj, S. M., Rathnasingh, C., Jo, J. E., and Park, S. 2008. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. Process Biochemistry 43(12) : 1440-1446.
- Quax, T. E., Claassens, N. J., Söll, D., and van der Oost, J. 2015. Codon bias as a means to fine-tune gene expression. Molecular Cell : 59(2) : 149-161.
- Rathnasingh, C., et al. 2012. Production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains. Journal of Biotechnology 157(4) : 633-640.
- Suga, S., Okajima, M., Fujiwara, K., and Yoshida, J.I. 2005. Electrochemical combinatorial organic syntheses using microflow systems. QSAR and Combinatorial Science 24(6) : 728-741.
- Tran, A. M., et al 2017. *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: a case study on the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. BMC Research Notes 10(1) : 1-8.
- Toyobo. 2017. KOD-Plus-Mutagenesis Kit [Online]. Available from : https://www.toyobo-global.com/seihin/xr/lifescience/products/clon_006.html [2021, March 1]
- Villada, J. C., Brustolini, O. J. B., and Batista da Silveira, W. 2017. Integrated analysis of individual codon contribution to protein biosynthesis reveals a new approach to improving the basis of rational gene design. DNA Research 24(4) : 419-434.
- Wang, Y., et al. 2016. Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO₂ in cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. Metabolic Engineering 34 : 60-70.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลวและอาหารแข็ง LB ปริมาตร 1 ลิตร

ประกอบด้วย	ทริปโตน	10 กรัม
	ยีสต์สกัด	5 กรัม
	โซเดียมคลอไรด์	10 กรัม
	ผงวุ้น (สำหรับอาหารแข็ง)	15 กรัม

อาหารแข็ง LB low salt ปริมาตร 1 ลิตร

ประกอบด้วย	ทริปโตน	10 กรัม
	ยีสต์สกัด	5 กรัม
	โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม
	ผงวุ้น (สำหรับอาหารแข็ง)	15 กรัม

อาหารเหลว SOB ปริมาตร 1 ลิตร

ประกอบด้วย	ทริปโตน	20 กรัม
	ยีสต์สกัด	5 กรัม
	โซเดียมคลอไรด์	0.584 กรัม
	โพแทสเซียมคลอไรด์	0.186 กรัม
	แมกนีเซียมคลอไรด์	0.952 กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต	2.408 กรัม

อาหารเหลว SOC ปริมาตร 1 ลิตร

ประกอบด้วย	ทริปโตน	20 กรัม
	ยีสต์สกัด	5 กรัม
	โซเดียมคลอไรด์	0.584 กรัม
	โพแทสเซียมคลอไรด์	0.186 กรัม
	แมกนีเซียมคลอไรด์	0.952 กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต	2.408 กรัม
	กลูโคส	3.603 กรัม

อาหารเหลวและอาหารแข็ง YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย	ยีสต์สกัด	1 กรัม
	เพปไตน์	2 กรัม
	กลูโคส	2 กรัม
	ผงวุ้น (สำหรับอาหารแข็ง)	1.5 กรัม

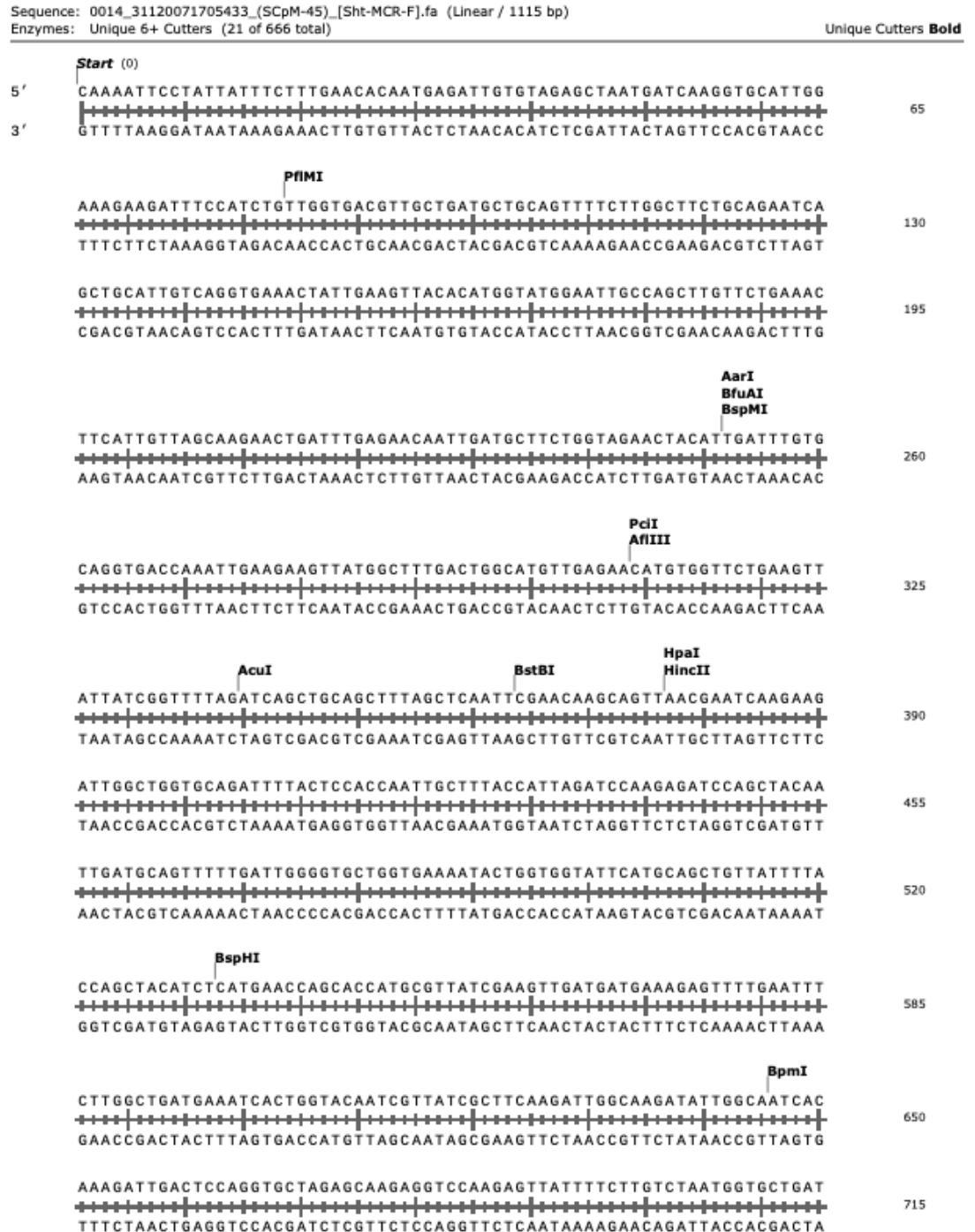
อาหารแข็ง YPDS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย	ยีสต์สกัด	1 กรัม
	เพปไตน์	2 กรัม
	กลูโคส	2 กรัม
	ซอลบิทอล	18.2 กรัม
	ผงวุ้น (สำหรับอาหารแข็ง)	1.5 กรัม

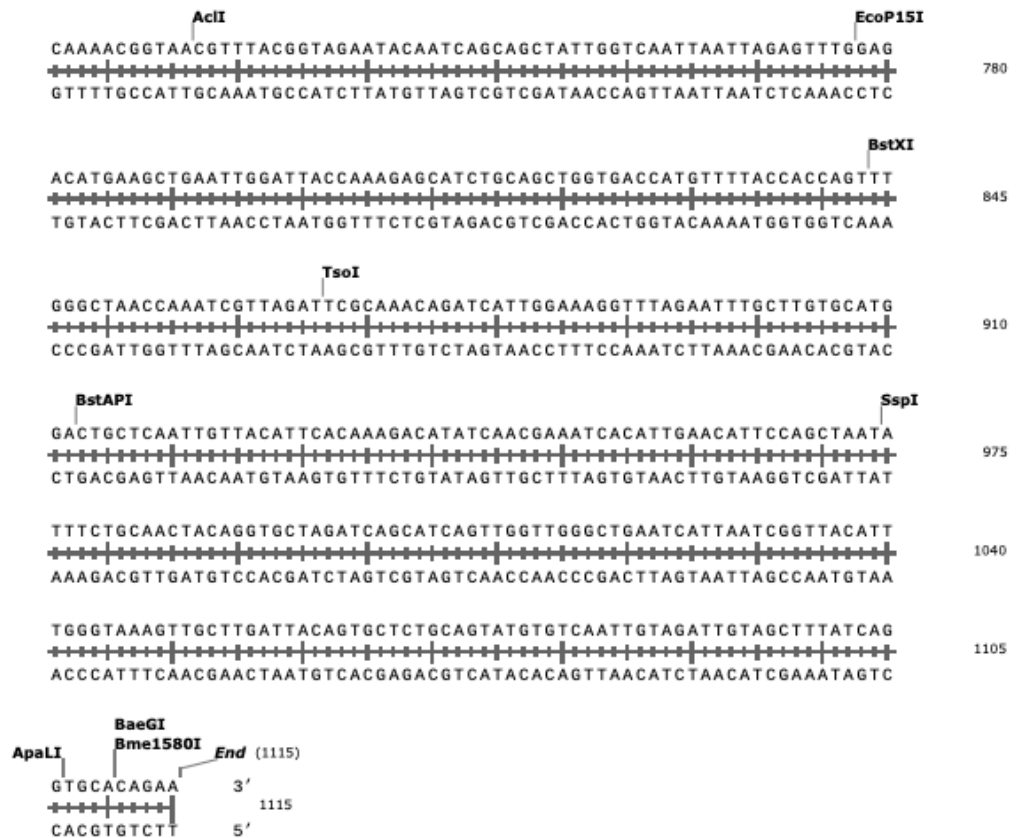
ภาคผนวก ข

ผลการส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* ได้ผลดังนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* (SCpMCR45F) ด้าน Forward



0014_31120071705433_(SCpM-45)_[Sht-MCR-F].fa (Linear / 1115 bp)



ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mcr* (SCpMCR45R) ด้าน Reverse

Sequence: 0013_31120071705433_(SCpM-45)_[Sht-MCR-R].seq (Linear / 1123 bp)
 Enzymes: Unique 6+ Cutters (22 of 666 total)

Unique Cutters **Bold**

Start (0)

5' CTTTTTTTTGTACCCAAATATCTGTATTTCTTTGTATTTCATTAACCTTTACCCAAATGTAAA 65
 3' GAAAAAAAAACATGGGTTTATAGACATAAAGAAAACATAAGTATAATTGAAATGGGTTTACATT

BsaBI* **SspI**

CCTTATTATTGATTCAGCCCAACCAACTGATGCTGATCTAGCACCTGTAGTTGCAGAAATATTAT 130
 GGAATAATAACTAAGTCGGGTTGGTTGACTACGACTAGATCGTGGACATCAACGCTTTTATAATA

BstAPI

CTGGAATGTTCAATGTGATTTTCGTTGATATGCTTTTGTGAATGTAACAATTGAGCAGTCCATGCA 195
 GACCTTACAAGTTACACTAAAGCAACTATACGAAACACTTACATTGTTAACTCGTCAGGTACGT

TsoI **BstXI**

CAAGCAAATCTAAACCTTCCAATGATCTGTTTGCGAATCTAACGATTTGGTTAGCCCAAATGG 260
 GTTCGTTAAGATTTGGAAGGTTACTAGACAAACGCTTAGATTGCTAAACCAATCGGGTTTGACC

TGGTAAAACATGGTCACCAGCTGCAGATGCTCTTTGGTAATCCAATTCAGCTTCATGTCTCCAAA 325
 ACCATTTGTACCAGTGGTCGACGCTACGAGAAACCATTAGGTTAAGTCGAAGTACAGAGGTTT

AseI **AclI**

CTCTAATTAATTGACCAATAGCTGCTGATTGTATTCTACCGTAAACGTTACCGTTTTGATCAGCA 390
 GAGATTAATTAAC TGGTTATCGACGACTAACATAAGATGGCATTGCAATGGCAAAACTAGTCGT

BpmI

CCATTAGACAAGAAAATAACTCTTGGACCTCTTGCTCTAGCACCTGGAGTCAATCTTTGTGATTG 455
 GGTAATCTGTTCTTTTATTGAGAACCTGGAGAACGAGATCGTGGACCTCAGTTAGAAACCTAAC

CCAATATCTTGCCAATCTTGAAGCGATAACGATTGTACCAGTGATTCATCAGCCAAGAAATTC A 520
 GGTTATAGAACGGTTAGAACTTCGCTATTGCTAACATGGTCACTAAAGTAGTCGGTTCTTTAAGT

BspHI

AAACTCTTTCATCATCAACTTCGATAACGCATGGTGTGGTTTCATGAGATGTAGCTGGTAAAATA 585
 TTTGAGAAAAGTAGTAGTTGAAGCTATTGCGTACCACGACCAAGTACTCTACATCGACCATTTTAT

ACAGCTGCATGAATACCACCAATTTTACCAGCACCCCAATCAAAAACGTCATCAATTGTAGC 650
 TGTCGACGTA CTTATGGTGGTCATAAAAGTGGTCGTGGGGTTAGTTTTTGACGTAGTTAACATCG

TGGATCTCTTGGATCTAATGGTAAAGCAATTGGTGGAGTAAAATCTGCACCAGCCAATCTTCTTG 715
 ACCTAGAGAACCTAGATTACCATTTTCGTTAACCACTCATTTTAGACGTGGTCGGTTAGAAGAAC

0013_31120071705433_(SCpM-45)_[Sht-MCR-R].seq (Linear / 1123 bp)

```
      HpaI      BstBI      AcuI
      HincII
ATTTCGTTAACTGCTTGTTTCGAATTGAGCTAAAGCTGCAGCTGATCTAAAACCGATAATAACTTCA
-----
TAAGCAATTGACGAACAAGCTTAACTCGATTTTCGACGTCGACTAGATTTTGGCTATTATTGAAGT
780

      PciI      AarI
      AflIII    BfuAI
      BspMI
GAACCACATGTTCTCAACATGCCAGTCAAAGCCATAACTTCTTCAATTTGGTCACCTGCACAAAT
-----
CTTGGTGTAACAAGAGTTGTACGGTCAGTTTCGGTATTGAAGAAGTTAAACCAAGTGGACGTTTTA
845

CAATGTAGTTCTACCAGAAGCATCAATTGTTCTCAAATCAGTTCTTGCTAACAATGAAGTTTCAG
-----
GTTACATCAAGATGGTCTTCGTAGTTAACAAGAGTTTAGTCAAGAACGATTGTTACTTCAAAGTC
910

AACAAGCTGGCAATCCATACCATGTGTAACCTTCAATAGTTTCACCTGACAATGCAGCTGATTCT
-----
TTGTTGACCGTTAAGGTATGGTACACATTGAAGTTATCAAAGTGGACTGTTACGTCGACTAAGA
975

      AlwNI      PflMI
GCAGAGCCAGAACTGCAGCATCAGCAACGTCACCAACAGATGGAATCTTCTTTCCAATGCACTT
-----
CGTCTCGGTCCTTGACGTCGTAGTCGTTGCAGTGGTTGTCTACCTTAGAAGAAAGGTTACGTGAA
1040

      BtsaI
GATCATTAGCTCTACCCAATCTCATTGTGTTTCAGAAATGATGGAGCAGTGTCACCTTTCTGGTCT
-----
CTAGTAATCGAGATGGGTTAGAGTAACACAAGTCTTTACTACCTCGTCACAGTGGAAAGACCAGA
1105

      End (1123)
TACCCTTTCAATTTGGGT   3'
-----
ATGGGAAAGTTAAACCCA   5'
```