รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์เพื่อใช้ค้นหาสารยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม

Development of yeast based screening system to search for growth inhibitor of *Plasmodium falciparum*

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี
ศาสตราจารย์ ดร.จิระพันธ์ กรึงไกร

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ประจำปีงบประมาณ 2555

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์เพื่อใช้ค้นหาสารยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม

Development of yeast based screening system to search for growth inhibitor of *Plasmodium falciparum*

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี
ศาสตราจารย์ ดร.จิระพันธ์ กรึงไกร

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ประจำปีงบประมาณ 2555

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
วัสดุที่ใช้ในการทดลอง	4
พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	4
วิธีดำเนินการวิจัย	5
1. สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสใน *Saccharomyces cerevisiae*	5
1.1 ทำลายยีน *NCE103* และ/หรือ ยีน*PDR5* ในยีสต์ *S. cerevisiae* BP-9	5
1.2 ตรวจสอบฟีโนไทป์ของยีสต์สายพันธุ์กลายภายหลังที่ถูกทำลายยีน *NCE103*	7
2. สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *S. cerevisiae*	8
2.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *NCE103* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	8
2.2 ทำไลเกชั่นดีเอ็นเอ *NCE103* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	10
2.3 ทำไลเกชั่น *NCE103* เข้าเอกเพรสชั่นเวคเตอร์ กับ เอนทรีเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์ พลาสมิด	13
2.4 ทำ LR รีคอมบิเนชั่นเข้าเดสทิเนชั่นเวคเตอร์ และ ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	15
3. สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *Plasmodium falciparum*	17
3.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *pfCA* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	17
3.2 ทำไลเกชั่นดีเอ็นเอ *pfCA* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	19
3.3 ทำไลเกชั่น *pfCA* เข้าเอกเพรสชั่นเวคเตอร์ และ ตรวจสอบความถูกต้องของ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด	20
4. สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมนุษย์	22
4.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *hCAII* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	22
4.2 ทำไลเกชั่นดีเอ็นเอ *hCAII* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	22

หน้า

4.3 ทำไลเกชั่น *hCAII* เข้าเอนทรีเวคเตอร์ และ ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 24

4.4 ทำ LR รีคอมบิเนชั่น *hCAII* เข้าเดสทิเนชั่นเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 25

ผลการทดลอง และ อภิปรายผล 26

1. สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสใน *S. cerevisiae* 26

1.1 ทำการทำลายยีน *NCE103* และ ยีน *PDR5* โดยใช้ชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* 26

1.2 ศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์ Δ*nce103* ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี 0.035% CO_2 เทียบกับสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี 20% CO_2 30

2. สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *S. cerevisiae* 31

2.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *NCE103* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 31

2.2 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag) 32

2.3 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2/NCE103 (C-Flag) และ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 33

2.4 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 35

3. สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *Plasmodium falciparum* 36

3.1 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM T-Easy/pfCA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 36

3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *pfCA* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 37

3.3 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 38

3.4 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2/pfCA418 (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 38

4. สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมนุษย์ (*hCAII*) 39

4.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *hCAII* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 39

หน้า

4.2 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag)โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 40

4.3 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pENTR™3C/hCAII (C-Flag)โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 41

4.4 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 42

สรุปผลการทดลอง 42

งานวิจัยที่จะดำเนินการในปีที่ 2 43

เอกสารอ้างอิง 43

เอกสาร
เลขทะเบียน 018131
วัน. เดือน. ปี 8 ก.พ. 62

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้	4
2	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้	4
3	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *loxp-URA3-loxp*	6
4	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *NCE103*	9
5	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับ *NCE103*	10
6	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *NCE103* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์	11
7	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag), pYES2 และ pENTR™3C	13
8	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *NCE103* เข้า pYES2 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์	14
9	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pYES2/NCE103 (C-Flag) และ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)	15
10	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชั่นของ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag) กับ pAG414GPD, GAL-ccdB-HA	15
11	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag)	17
12	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pGEM T-Easy/pfCA.	18
13	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับ *pfCA* ก่อนไลเกชั่น	19
14	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *pfCA* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์	19
15	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) และ pYES2	20
16	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *pfCA* (418) เข้า pYES2 เวคเตอร์	21
17	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pYES2/pfCA418 (C-Flag)	21

ตารางที่		หน้า
18	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับ *hCAII* ก่อนไลเกชั่น	22
19	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *hCAII* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์	23
20	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag)	23
21	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *hCAII* เข้า pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์	24
22	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pENTR™3C/hCAII (C-Flag)	25
23	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชั่นของ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) กับ pAG414GPD, GAL-ccdB-HA	25
24	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag)	26

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ดีเอ็นเอของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ W303-1B เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (NCE103_F, NCE103_R) ที่จำเพาะต่อยีน *NCE103*	9
2	แผนที่พลาสมิด pYES2 เวคเตอร์ (Invitrogen, USA)	12
3	แผนที่พลาสมิด pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA)	13
4	แผนที่พลาสมิด pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA (Addgene, USA)	16
5	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ pGEM T-Easy/pfCA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (pfCA_F (418) และ pfCA_F (235), pfCA_R (418) และ pfCA_R (235) ที่จำเพาะต่อยีน *pfCA*	18
6	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ cDNA ของมนุษย์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (hCAII_F, hCAII_R) ที่จำเพาะต่อยีน *hCAII*	22
7	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *NCE103*	27
8	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการกำจัดยีน *URA3* ออกจากยีสต์ BP-12	27
9	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *PDR5* (1)	28
10	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *PDR5* (2)	29
11	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *URA3*	29
12	ความต้องการ CO_2 ต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-9, BP-15 และ BP-17	31
13	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *NCE103*	32
14	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของรีคอมบิแนนท์ พลาสมิด (pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag)).	32
15	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2 เวคเตอร์	33
16	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์	34
17	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2/NCE103 (C-Flag)	34

ภาพที่		หน้า
18	ผลิตภัณฑ์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)	35
19	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/ NCE103 (C-Flag)	36
20	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ของ pGEM T-Easy/pfCA	37
21	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *pfCA*	37
22	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag)	38
23	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2/pfCA418 (C-Flag)	39
24	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *hCAII*	39
25	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag)	40
26	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์	41
27	ผลิตภัณฑ์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pENTR™3C/hCAII	41
28	ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag)	42

บทนำ

ในแต่ละปี พบว่ามีผู้ติดเชื้อมาลาเรียเสียชีวิตสูงถึง 2.5 ล้านคน จากประมาณ 5 ร้อยล้านคนของผู้ติดเชื้อดังกล่าวทั่วโลก(Nchinda 1998) เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม (*Plasmodium falciparum*)เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ติดเชื้อมีอัตราการเสียชีวิตสูง ทั้งนี้เนื่องจากการดื้อต่อยารักษาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จากการแพร่กระจายของการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียทำให้ประเทศที่ยากจนมีอัตราการตายที่สูงขึ้น(NaBangchang และคณะ 2007) นอกจากนี้การขาดวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมยุงที่เป็นพาหะของโรค รวมทั้งการขาดวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ เป็นเหตุให้มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการหายาชนิดใหม่ๆสำหรับรักษาโรคมาเลเรียให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ขณะเดียวกันยาใหม่ๆนั้นต้องมีความเป็นพิษน้อยลง ยาชนิดใหม่ควรจะมีการออกฤทธิ์โดยกลไกที่ต่างไปจากยาเดิมที่ใช้กันอยู่ (White, 2004; Pink และคณะ 2005; Hopkins และคณะ 2007; Gardner และคณะ 2002) ที่น่าสนใจคือการหายาชนิดใหม่ๆที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพได้ของเชื้อมาลาเรีย

จากรายงานที่พบว่าในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมมีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสอยู่สูงกว่าในเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีการติดเชื้อดังกล่าว โดยที่แอคติวิตี้ของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นตามช่วงเวลาที่เชื้อมีการพัฒนาจากระยะตัวอ่อน (ring stage) ไปสู่ระยะชิซอนต์ (schizont stage) ในเม็ดเลือดแดง (Krungkrai และคณะ 2001) จากการค้นหาในฐานข้อมูลพบว่ายีนประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส มีอยู่ในตัวปรสิตทั้งที่เป็นโปรโตซัวและหนอนพยาธิ ในเชื้อมาลาเรียมียีนและเอนไซม์ชนิดนี้อยู่เพื่อให้เชื้อสามารถดำรงชีพอยู่ได้ เพื่อการสร้างไบคาร์บอเนต สำหรับนำไปใช้ในแมทาบอลิซึมต่างๆ รวมทั้งวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีน ซึ่งจะถูกนำไปใช้สร้างสารพันธุกรรมต่อไปด้วย

เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสในเชื้อมาลาเรียมีความแตกต่างจากเอนไซม์ชนิดเดียวกันกับที่มีอยู่ในมนุษย์ โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญอย่างยิ่งยวดต่อการดำรงชีพของเชื้อมาลาเรีย จะส่งผลให้เชื้อมาลาเรียไม่สามารถสังเคราะห์ไพริมีดีนได้ ในขณะที่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาเลเรีย (host) ยังสามารถสังเคราะห์ไพริมีดีนได้จากอีกวิถีหนึ่ง (salvage pathway) ด้วยความแตกต่างของวิถีการสังเคราะห์ไพริมิดีนของเชื้อมาเลเรียกับของมนุษย์ จึงนำไปสู่การพัฒนายารักษามาลาเรียกลุ่มใหม่ จากการศึกษาของ Krungkrai และ คณะ (2008) ที่ได้นำอนุพันธุ์ซัลโฟนาไมด์มาทดสอบ พบว่าสารสังเคราะห์ดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อมาลาเรียและมีผลต่อการยับยั้งหรือต้านการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองได้ (*in vitro*) ผลจากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการใช้เอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสเป็นเป้าหมายของยาชนิดใหม่ๆ เพื่อการรักษาโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไป

การใช้วิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีหลักการใหม่ๆ ที่มีหลักการคัดกรองที่แตกต่างไปจากหลักการแบบเดิม จะช่วยให้สามารถค้นพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ๆซึ่งอาจยังไม่ถูกค้นพบโดยวิธีการคัดกรองที่ใช้หลักการแบบเดิมได้ แนวโน้มหนึ่งในการพัฒนาหายาชนิดใหม่ๆในปัจจุบันคือ การใช้ยีสต์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ต่อโปรตีนเป้าหมายหนึ่งๆ ซึ่งนอกจากยีสต์จะเลี้ยงง่าย เจริญได้รวดเร็ว การดัดแปลงพันธุกรรมในยีสต์ยังสามารถทำได้ง่ายกว่า และเร็วกว่าในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงอื่น และที่สำคัญคือการใช้ยีสต์เป็นระบบคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหนึ่งๆ (yeast-based assay) สามารถพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสารทดสอบที่มีจำนวนตัวอย่างครั้งละมากๆได้ (high throughput screening)

ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มียีน *NCE103* ทำหน้าที่ประมวลรหัสเอนไซม์ CA และในยีสต์ที่ถูกทำลายยีน *NCE103* ไป (Δ*nce103*) ทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายนี้ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (O2; aerobic condition) แต่เจริญได้ในสภาวะที่ขาดออกซิเจน (anaerobic condition) (Clark และคณะ 2004) จากการศึกษาการทดแทนหน้าที่ของเอนไซม์ CA จากสิ่งมีชีวิตต่างๆในยีสต์ พบว่าเอนไซม์ CA จากต้นยาสูบซึ่งถูกจัดเป็น α-CA และ เอนไซม์ CA จากมนุษย์ (huCAII) ซึ่งถูกจัดเป็น β-CA สามารถทดแทนการทำหน้าที่ของ CA ในยีสต์ได้ (Clark และคณะ 2004) คณะผู้วิจัยตั้งข้อสังเกตว่าเอนไซม์ CA จากกลุ่ม α-CA หรือ β–CA ต่างก็สามารถทดแทนหน้าที่ของ เอนไซม์ CA ของยีสต์ได้ แม้จะยังไม่มีรายงานการทดแทนการทำหน้าที่ของ CA จากเชื้อมาลาเรียในยีสต์ คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าเอนไซม์ CA จากเชื้อมาลาเรียก็น่าจะทำหน้าที่ทดแทน CA ของยีสต์ได้เช่นกัน

งานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายที่จะพัฒนาระบบคัดกรองชนิดใหม่ โดยทำการดัดแปลงพันธุ์กรรมของยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อใช้เป็นเซลล์บ่งชี้สำหรับใช้ค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม หากทำได้สำเร็จ ระบบการคัดกรองที่ใช้ยีสต์นี้จะมีข้อดีกว่าวิธีการคัดกรองที่ใช้อยู่เดิม กล่าวคือเป็นผลการยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์เป้าหมายในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ทั้งนี้โดยอาศัยความสามารถในการทดแทนการทำหน้าที่ (functional complementation) ของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ด้วยเอนไซม์จากเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม ที่ทำหน้าที่เดียวกัน จากนั้นจะได้ทำการพัฒนาเป็นระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์ (yeast-based assay) สำหรับค้นหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม อันจะเป็นหนทางนำไปสู่การค้นหายาชนิดใหม่ๆที่ใช้รักษาโรคมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ทำลายยีน *NCE103* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา เช่น ยีน *PDR5* ยีน *ERG3* ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์สายพันธุ์กลาย ต่อความไวต่อออกซิเจน (ปีที่ 1)

2. สร้างพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสในยีสต์ *S. cerevisiae (NCE103)* ในเชื้อมาลาเรีย *(pfCA)* และ ในมนุษย์ *(hCAII)* (ปีที่ 1)

3. ศึกษาความสามารถในการทดแทนการทำหน้าที่ของเอ็นไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ ด้วยเอนไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม โดยวิธี Functional Complementation assay ในยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน*NCE103* (ปีที่ 2)

4. หากพบว่าเอ็นไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม สามารถทดแทนการทำหน้าที่ของเอ็นไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ได้ จะศึกษาผลของสารยับยั้งเอ็นไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรส ในยีสต์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมจากข้อ 3 เพื่อพัฒนาเป็นระบบทดสอบสำหรับค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม (ปีที่ 2)

วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้

พลาสมิด	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	หมายเหตุ
pYES2	*Amp*^{R} *URA3*	บริษัท Invitrogen
pGEM T-Easy	*Amp*^{R} *lacZ*	บริษัท Promega
pENTR™3C Dual Selection	*Kan*^{R} *Cm*^{R} *ccd*B	บริษัท Invitrogen
pAG414GPD-ccdB-HA	*Amp*^{R} *TRP1*	บริษัท Addgene
pAG414GAL-ccdB-HA	*Amp*^{R} *TRP1*	บริษัท Addgene
pUG72	*Amp*^{R} *URA3*	บริษัท Euroscarf

ตารางที่ 2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	T_m(°C)	หมายเหตุ
Δ*nce103*_F	Fwd:5'-actacagctaagactacaaatttcaattattacacatca gacagctgaagcttcgtacgc-3'	72	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
Δ*nce103*_R	Rev:5'-ccccgtctactttgtaaatgtctttctatttcaatgaata ataggccactagtggatctg-3'	72	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
Δ*pdr5*_F	Fwd:5'-atagtacacaacatttatcacttcacacaatcaggag tggacagctgaagcttcgtacgc-3'	74	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
Δ*pdr5*_R	Rev:5'-cggaattctttcggacattgaactttgatttatcagaggc ataggccactagtggatctg-3'	74	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
nce103_F1	Fwd:5'-gtcaccatgacgcttatcaagcc-3'	64	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
nce103_R1	Rev:5'-atcgggcgtttaccgtatcgc-3'	64	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
nce103_F2	Fwd:5'-ctacacctggggtcatgattagcc-3'	66	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
nce103_R2	Rev:5'-gacatttgctggatcacagaccg-3'	64	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)

pdr5_F1	Fwd:5'-gaaagcagcacctcgttggc-3'	64	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
pdr5_R1	Rev:5'-atcgggcgtttaccgtatcgc-3'	64	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confirm disruption)
NCE103_F	Fwd:5'-cgggatccaccaccatgagcgctaccgaatcttcatctatattc-3'	74	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
NCE103_R	Rev:5'-ccgctcgagcgctatttatcatcatcatctttgtaatctttggggtaacttttgtg-3'	72	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
pfCA_F (418)	Fwd:5'-cgggatccgccaccatgcttgaaatgatagataaatataataccc-3'	71	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
pfCA_R (418)	Rev:5'-ccgctcgagcgttatttatcatcatcatctttgtaatcttattacctgagccgacg-3'	73	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
hCAII_F	Fwd:5'-ggggtaccaccaccatgtcccatcactggg-3'	74	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
hCAII_R	Rev:5'-ccgctcgagcgttatttatcatcatcatctttgtaatctttgaaggaagctttgatttgc-3'	72	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)

วิธีดำเนินการวิจัย

1 สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสใน *S. cerevisiae*

1.1 ทำลายยีน *NCE103* **และ/หรือ ยีน***PDR5* **ในยีสต์** *S. cerevisiae* BP-9

ใช้พลาสมิด pUG72 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ Δ*nce103* forward และ Δ*nce103* reverse (ตารางที่ 2) สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน *loxP-URA-loxP* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อการทำลายยีน *NCE103* ในขณะที่การทำลายยีน *PDR5* ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบชนิดเดียวกัน แต่เปลี่ยนคู่ไพรเมอร์เป็น Δ*pdr5* forward และ Δ*pdr5* reverse (ตารางที่ 2)

ทำการกำจัดยีนมาร์คเกอร์ *URA3* ออกไปจากเซลล์ยีสต์ โดยวิธี Cre/lox system (Gueldener และคณะ, 2002) ตรวจสอบความถูกต้องของตำแหน่งยีนที่ถูกทำลายในยีสต์ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ที่ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ nce103_F1 และ nce103_R1 และ คู่ nce103_F2 และnce103_R2 สำหรับกรณีการทำลายยีน *NCE103* หรือใช้ 2 คู่ไพรเมอร์คือ pdr5_F1 และ pdr5_R1 และคู่ pdr5_F2 และ pdr5_R2 สำหรับกรณีการทำลายยีน *PDR5*

1.1.1 **เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นของยีน *loxP-URA3-loxP* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส** (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ทำการทำลายยีน *NCE103* และ ยีน *PDR5* โดยใช้ชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* เข้าไปแทนที่ยีน *NCE103* (Carbonic anhydrase-like enzyme) และ ยีน *PDR5* ในโครโมโซมของยีสต์ โดยออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ pUG72 (Euroscarf, Germany)เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (ตารางที่ 2) ประกอบด้วย 41 เบสของบริเวณด้านปลาย 5' ของยีน *NCE103* หรือ *PDR5* ถูกเชื่อมต่อกับ 19 เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 และรีเวิร์สไพรเมอร์ (ตารางที่ 2) ประกอบด้วย 40 เบสของบริเวณด้านปลาย 3' ของยีน *NCE103* หรือ *PDR5* เชื่อมต่อกับ 20 เบสของ *loxP* ซึ่งจำเพาะกับยีน *loxP-URA3-loxP* ของพลาสมิด pUG72 ไพร์เมอร์ทั้งสองถูกใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *loxP-URA3-loxP*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้พลาสมิด pUG72 เป็นต้นแบบในปฏิกิริยาโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2) ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *loxP-URA3-loxP*

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

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

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.0% หลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE ตั้งความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA)

1.1.2 **การนำเข้าผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส จากข้อ 1.1.1 เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ BP-9**

นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 1.1.1 เข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ BP-9 *(MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP)* ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) (Gietz และ Schiestl, 1995) และคัดเลือกยีสต์ทรานสฟอร์แมนต์บนอาหาร synthetic complete medium ที่ไม่เติม uracil (SC-Ura) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 20% เป็นเวลา 3-4 วัน ยืนยันผลการทำลายยีน *NCE103* ในโครโมโซมของยีสต์ทรานสฟอร์แมนต์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ไพรเมอร์คู่แรก คือ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ nce103_F1 และรีเวิร์สไพรเมอร์ nce103_R1 ส่วนไพร์เมอร์คู่ที่สอง คือ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ nce103_F2 และรีเวิร์สไพรเมอร์ nce103_R2

1.1.3 **การกำจัดยีนมาร์คเกอร์ *URA3* ซึ่งถูกใช้ในการทำลายยีน *NCE103* และ *PDR5***

เพื่อนำยีนมาร์คเกอร์ *URA3* กลับมาใช้ใหม่ในขั้นตอนต่อไป จึงต้องมีการกำจัดยีนมาร์คเกอร์ซึ่งใช้ในการทำลายยีน โดยอาศัยเทคนิค Cre/loxP system โดยการนำพลาสมิด pSH63 (Euroscarf, Germany ซึ่งยีน Cre recombinase ที่จะมีการแสดงออกภายใต้การควบคุมของ *GAL1* promoter และมีทริปโตเฟน (Tryptophan) เป็นยีนมาร์คเกอร์ เข้าสู่ยีสต์กลายพันธุ์ นำยีสต์ทรานต์ฟอร์แมนท์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมทริปโตเฟน ไปเลี้ยงในอาหารเหลว YPGal (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน) เพื่อชักนำให้ยีน *CRE* ที่อยู่ปลายน้ำของ *GAL1* promoter มีการแสดงออก โดยเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน เมื่อครบเวลา นำยีสต์ที่ได้ไปเจือจางให้เหมาะสมและเกลี่ยเซลล์ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน: เป็นสภาวะที่ยีน *CRE* recombinase ไม่มีการแสดงออก) บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน นำเพลทที่มีโคโลนีที่เหมาะสมไปทำการ Replica ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ SC-Ura บ่มภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 20% จากนั้นคัดเลือกโคโลนีจากเพลทต้นแบบที่ไม่เจริญใน SC-Ura และยืนยันผลการกำจัดยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

1.2 **ตรวจสอบฟีโนไทป์ของยีสต์สายพันธุ์กลายภายหลังที่ถูกทำลายยีน *NCE103***

โดยศึกษาความสามารถในการเจริญของยีสต์ที่ถูกทำลายยีน *NCE103(Δnce103)* และ ถูกทำลายยีน *PDR5* และ *NCE103(Δpdr5Δnce103)* (Bp15 และ Bp17 ตามลำดับ) ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น

นำยีสต์สายพันธุ์ BP-9 BP-15 และ BP-17 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง synthetic dextrose (SD) ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-9 BP-15และ BP-17 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี 0.033% CO_2 (Elleuche และ Pöggeler 2010) เทียบกับสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี 20% CO_2 (เลี้ยงใน GENbox anaer, bioMerieux, France) เป็นเวลา 3-4 วัน

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

2.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *NCE103* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

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

การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวจากโครโมโซมทำได้โดยสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์สายพันธุ์ W303-1B (*MATα ade2-1 his3-11,15 leu23,112 trp1-1 ura3-1 can1-100*, ได้รับจาก Prof. Tokichi Miyakawa, Hiroshima University) ขั้นแรกเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวในอาหารแข็ง (YPAD medium) บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 30° เซลเซียส นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวชนิดเดียวกันข้ามคืน จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำของเหลวทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วใส่ 1X TE บัฟเฟอร์กับ Extraction บัฟเฟอร์ จากนั้นนำเม็ดบีด 0.3 กรัม ใส่ลงในไมโครทิวป์ นำไปเขย่าผสมเพื่อทำให้เซลล์แตกเป็นเวลา 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ จากนั้นนำสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 ใส่ลงในหลอดให้ได้อัตราส่วน 1:1 ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาแล้วปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใสในหลอดใหม่แล้วเติมสารละลายเดิมอีกครั้ง พลิกหลอดไปมาแล้วปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใสในหลอดใหม่แล้วเติมแอลกอฮอล์ 100% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วใส่ 1X TE บัฟเฟอร์ กับ RNase A บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ และแอลกอฮอล์ 100% เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ 70% และปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วย 1X TE บัฟเฟอร์ เก็บที่อุณหภูมิ -20° เซลเซียสจนกว่านำไปใช้ จากนั้นทำการออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์ W303-1B เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ NCE103_F (ตารางที่ 2) ซึ่งจำเพาะกับยีน *NCE103* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Bam*H I เชื่อมต่อกับ Kozak sequence และรีเวิร์สไพรเมอร์ NCE103_R (ตารางที่ 2) ซึ่งจำเพาะกับยีน *NCE103* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho* I และติด Flag Tag ก่อนบริเวณ Stop codon ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR จะมีลักษณะเป็นดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR **จากการที่ใช้ดีเอ็นเอของ** *S. cerevisiae* **สายพันธุ์** W303-1B **เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์** (NCE103_F, NCE103_R) **ที่จำเพาะต่อยีน** *NCE103*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ W303-1B เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2) ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 4 โดยใช้ภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 30 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 4 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

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

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	-	17	-
DNA template	-	2	10-25 นาโนกรัม
ปริมาตรสุทธิ	-	25	-

2.2 ทำไลเกชั่นดีเอ็นเอ *NCE103* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยตัดชิ้นอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนัก อะกาโรสเจล (น้ำหนักอะกาโรสเจล 100 มิลลิกรัม มีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายจนหมด นำส่วนสารละลายสีเหลืองใส่ลงใน QIAquick spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนที่จะหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส แล้วมาเติม dATP ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 5 จากนั้นไลเกชั่นเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตารางที่ 5 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับ *NCE103* ก่อนไลเกชั่น

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

ตารางที่ 6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *NCE103* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์

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

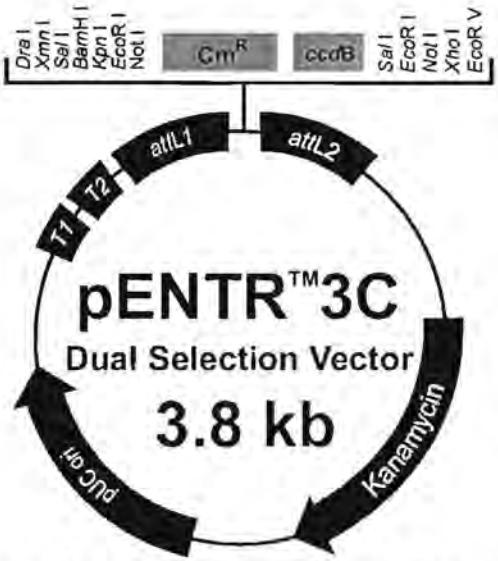
ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมแล้วแช่ในน้ำแข็ง แล้วนำพลาสมิดที่ได้ 10-50 นาโนกรัม ดูดใส่ในคอมพีเทนต์เซลล์ แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำคอมพีเทนต์เซลล์ที่มีพลาสมิด บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วรีบนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ที่ฮีทช็อคแล้ว บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที จากนั้นนำเชื้อไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดอาหารเหลวออก 700 ไมโครลิตร แล้วนำเซลล์ที่เหลือไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มี IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside), X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) และสารปฏิชีวนะ Ampicillin บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญ ถ้าเป็นโคโลนีสีฟ้าหรือน้ำเงินแสดงว่าไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต นำโคโลนีที่มีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ดูดเชื้อในอาหารเหลวปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในไมโครทิวป์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนอาหารเหลวทิ้ง ทำซ้ำอีกรอบ จากนั้นเติม Resuspension บัฟเฟอร์ (R3) ที่เติม RNase A เรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจาย เติม Lysis บัฟเฟอร์ (L7) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา 5 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม Precipitation บัฟเฟอร์ (N4) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาจนเข้ากันดี นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ดูดใส่ในสปินคอลัมน์ที่มีวอชทิวป์รองรับของเหลว นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในวอชทิวป์ออกแล้วนำกลับไปใส่ใหม่ เติม Wash บัฟเฟอร์ (W10) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1

นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในวอชทิวป์ออก เติม Wash บัฟเฟอร์ (W9) ที่เติมเอทานอลแล้ว ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในวอชทิวป์ออก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอีก 1 นาที เพื่อกำจัด Wash บัฟเฟอร์ที่หลงเหลืออยู่ออกให้หมด นำสปินคอลัมน์ไปใส่ในไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในส่วนกลางของสปินคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำ pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag), pYES2 (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 2 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) ดังภาพที่ 3 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ภาพที่ 2 แผนที่พลาสมิด pYES2 เวคเตอร์ (Invitrogen, USA)



ภาพที่ 3 แผนที่พลาสมิด pENTR™3C Dual Selection **เวคเตอร์** (Invitrogen, USA)

ตารางที่ 7 **สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์** pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag), pYES2 **และ** pENTR™3C

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

2.3 **ทำไลเกชั่น** *NCE103* **เข้าเอกเพรสชั่นเวคเตอร์** (pYES2) **กับ เอนทรีเวคเตอร์** (pENTR™3C Dual Selection) **และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

สกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 2.2 ดังนั้นจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*, pYES2, pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และถูกตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เชื่อมต่อเข้ากับเอกเพรสชั่นเวคเตอร์ pYES2 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 8 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 10 นาที อัตราส่วนการไลเกชั่นระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* และ pYES2 , pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ เป็น 7 ต่อ 1 และ 3 ต่อ 1 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *NCE103* เข้า pYES2 และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์

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

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 2.2 แต่เซลล์ที่ได้จะถูกเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารฏิชีวนะ Ampicillin สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* ที่อยู่ใน pYES2 เวคเตอร์ และสารฏิชีวนะ Kanamycin สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* ที่อยู่ใน pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง

สกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วในข้อ 2.2 นำ pYES2/NCE103 (C-Flag) และ pENTR™3C/ NCE103 (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 9 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pYES2/NCE103 (C-Flag) **และ** pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)

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

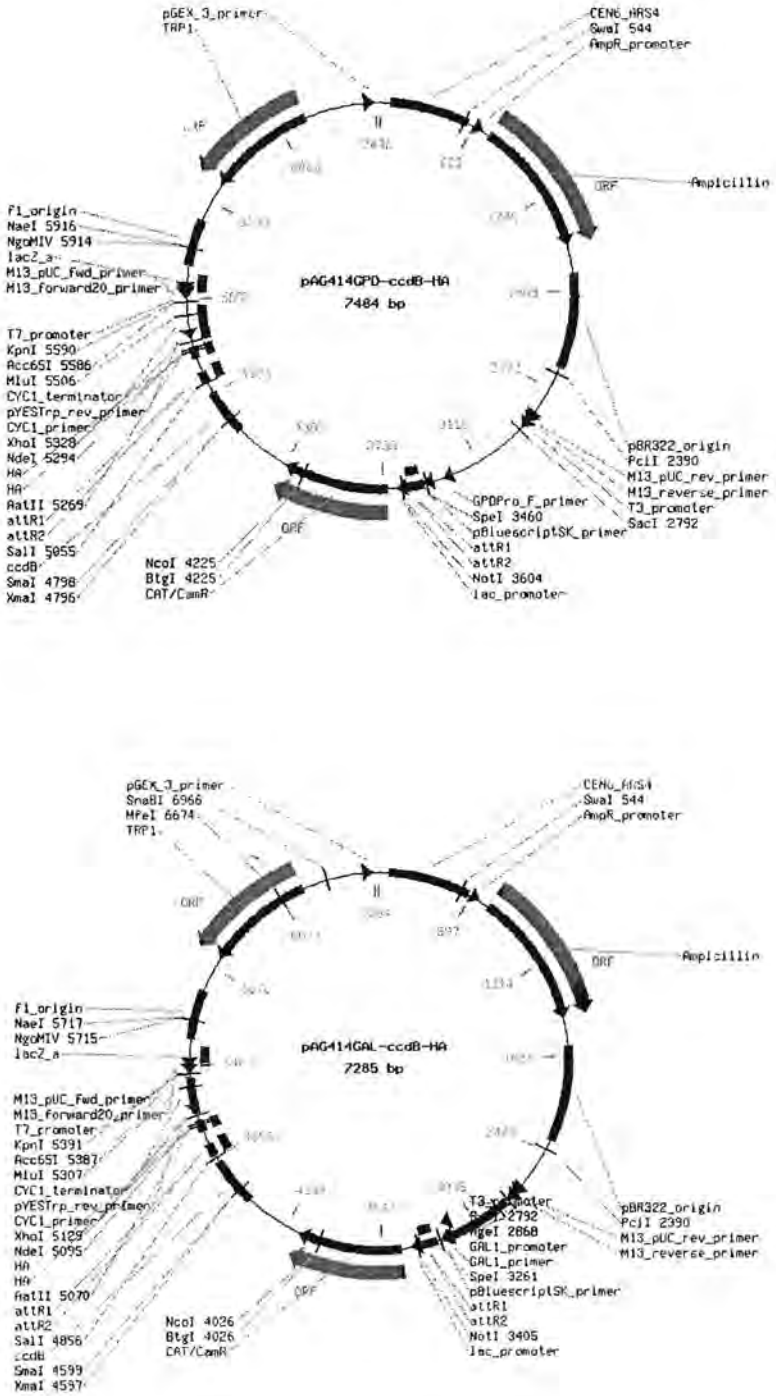
2.4 **ทำ LR รีคอมบิเนชั่นเข้าเดสทิเนชั่นเวคเตอร์** pAG414GPD-ccdB-HA **และ** pAG414GAL-ccdB-HA **และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

นำ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag) มาทำ LR รีคอมบิเนชั่นกับเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA (Addgene, USA) ตามภาพที่ 4 ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 10 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชั่นของ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag) **กับ** pAG414GPD, GAL-ccdB-HA

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

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



ภาพที่ 4 แผนที่พลาสมิด pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA (Addgene, USA)

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 2.2 แต่เซลล์ที่ได้จะถูกเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารฏิชีวนะ Ampicillin สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* ที่อยู่ใน pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA เวคเตอร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง

สกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วข้างต้นข้อ 2.2 นำ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag) นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 11 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 11 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag)

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

3 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *Plasmodium falciparum* (*pfCA*)

3.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *pfCA* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวทำได้โดยนำ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *P. falciparum* ซึ่งได้รับมาจาก ศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Kit จากนั้นนำมาเติม dATP (มีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 5 แต่เปลี่ยนจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103* เป็น *pfCA*) เพื่อไลเกชั่นเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส ข้ามคืน อัตราส่วนการไลเกชั่นระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* และ pGEM T-Easy เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.2 โดยเซลล์จะถูกเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มี IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside), X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) และ สารปฏิชีวนะ Ampicillin บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือก

โคโลนีสีขาวที่เจริญ ถ้าเป็นโคโลนีสีฟ้าหรือน้ำเงินแสดงว่าไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.2 นำ pGEM T-Easy/pfCA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 12 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 12 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pGEM T-Easy/pfCA

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

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน *pfCA* โดยออกแบบให้สายฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ pfCA_F (418) (ตารางที่ 2) จำเพาะกับยีน *pfCA* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Bam*H I เชื่อมต่อกับ Kozak sequence และรีเวิร์สไพรเมอร์ pfCA_R (418) (ตารางที่ 2) จำเพาะกับยีน *pfCA* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho* I และติด Flag Tag ก่อนบริเวณ Stop codon ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จะมีลักษณะเป็นดังภาพที่ 5

ภาพที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ pGEM T-Easy/pfCA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและมีฟอร์เวิร์ดกับรีเวิร์สไพร์เมอร์ (pfCA_F (418) และ pfCA_R (418) ที่จำเพาะต่อยีน *pfCA*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ pGEM T-Easy/pfCA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา และใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3 ใช้ภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 66 องศาเซลเซียส

30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที, 30 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศา ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

3.2 ทำไลเกชั่นดีเอ็นเอ *pfCA* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* ขนาด 418 bp ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น เติม dATP ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 13 จากนั้นไลเกชั่นเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 14 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตารางที่ 13 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับ *pfCA* ก่อนไลเกชั่น

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

ตารางที่ 14 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *pfCA* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์

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

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.2 โดยเซลล์จะถูกเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มี IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside), X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-

β-D-galactopyranoside) และ สารปฏิชีวนะ Ampicillin บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญ จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.2 นำ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) และ pYES2 (Invitrogen, USA) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 15 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 15 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) **และ** pYES2

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

3.3 ทำไลเกชั่น *pfCA* เข้าเอกเพรสชั่นเวคเตอร์ (pYES2) และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) และ pYES2 เวคเตอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เชื่อมต่อเข้ากัน โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 16 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 10 นาที อัตราส่วนการไลเกชั่นระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) และ pYES2 เป็น 3 ต่อ 1

ตารางที่ 16 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *pfCA* (418) เข้า pYES2 เวคเตอร์

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

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 2.2 เซลล์ที่ได้จะถูกเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารฏิชีวนะ Ampicillin สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *pfCA* (418) ที่อยู่ใน pYES2 เวคเตอร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็งสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.2 pYES2/pfCA418 (C-Flag) ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 17 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 17 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์pYES2/pfCA418 (C-Flag)

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

4 สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมนุษย์ (*hCAII*)

4.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *hCAII* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวทำได้โดยนำ cDNA ของมนุษย์ซึ่งได้รับมาจาก ศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยออกแบบไพรเมอร์ให้สายฟอร์เวิร์ด hCAII_F (ตารางที่ 2) จำเพาะกับยีน *hCAII* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์เชื่อมต่อกับ Kozak sequence สายรีเวิร์สไพรเมอร์ hCAII_R (ตารางที่ 2) ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน *hCAII* และให้ด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์มีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho* I และติด Flag Tag ก่อนบริเวณ Stop codon ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR จะมีลักษณะเป็นดังภาพที่ 6

ภาพที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการที่ใช้ cDNA ของมนุษย์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ cDNA ของมนุษย์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และ ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3 ภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ; 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, 30 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

4.2 ทำไลเกชั่นดีเอ็นเอ *hCAII* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์ และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น เติม dATP ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 18 จากนั้นไลเกชั่นเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 19 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน อัตราส่วนการไลเกชั่นระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* และ pGEM T-Easy เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1

ตารางที่ 18 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาเติม dATP สำหรับ *hCAII* ก่อนไลเกชั่น

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

ตารางที่ 19 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *hCAII* เข้าโคลนนิ่งเวคเตอร์

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

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.2.2 โดยเซลล์จะถูกเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มี IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside), X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) และ สารปฏิชีวนะ Ampicillin บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีสีขาว จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.2 นำ pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag) และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 20 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 20 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag) และ pENTR™3C

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

4.3 ทำไลเกชั่น *hCAII* เข้าเอนทรีเวคเตอร์ (pENTR™3C Dual Selection) และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I เชื่อมต่อเข้าด้วยกัน ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 21 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 10 นาที อัตราส่วนการไลเกชั่นระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ เป็น 3 ต่อ 1

ตารางที่ 21 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาไลเกชั่น *hCAII* เข้า pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์

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

ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 2.2 เซลล์ที่ได้จะถูกเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารฏิชีวนะKanamycin สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* ที่อยู่ใน pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.2 นำ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 22 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 22 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของเวคเตอร์ pENTR™3C/hCAII (C-Flag)

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

4.4 ทำ LR รีคอมบิเนชั่น *hCAII* เข้าเดสทิเนชั่นเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA และตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) มาทำ LR รีคอมบิเนชั่นกับเวคเตอร์ pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA (Addgene, USA) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 23 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทรานฟอร์มพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยใช้อาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะ Ampicillin สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* ที่อยู่ใน pAG414GPD-ccdB-HA และ pAG414GAL-ccdB-HA เวคเตอร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง

ตารางที่ 23 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยา LR รีคอมบิเนชั่นของ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) **กับ** pAG414GPD, GAL-ccdB-HA

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

สกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.2 นำ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาตามตารางที่ 24 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

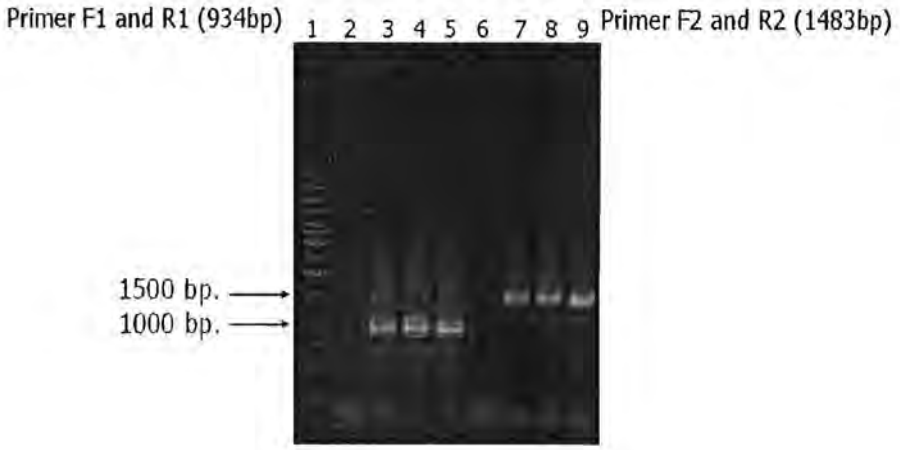
ตารางที่ 24 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะของ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag)

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

ผลการทดลอง และ อภิปรายผล

1. สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสใน *S. cerevisiae*

1.1 ทำการทำลายยีน *NCE103* และ ยีน *PDR5* โดยใช้ชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* เข้าไปแทนที่ยีน ดังกล่าวในโครโมโซมของยีสต์ จากการตรวจสอบผลการทำลายยีนจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส โดยถ้าหากทำลายยีน *NCE103* ได้สำเร็จจะได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสทั้งหมด 2 ชิ้นมีขนาด 934 และ 1483 คู่เบส ตามลำดับ หากทำลายยีน *NCE103* ไม่สำเร็จจะได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสเพียง 1 ชนิดขนาด 1223 คู่เบส และจากผลการทดลองที่ได้เลือกยีสต์ทรานฟอร์แมนท์ จำนวน 3 ทรานฟอร์แมนท์ มาตรวจสอบ พบว่าสามารถทำลายยีนได้สำเร็จในทั้ง 3 ทรานฟอร์แมนท์ที่เลือกมา โดยได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดตามที่คาดไว้ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *NCE103*ในโครโมโซมของยีสต์

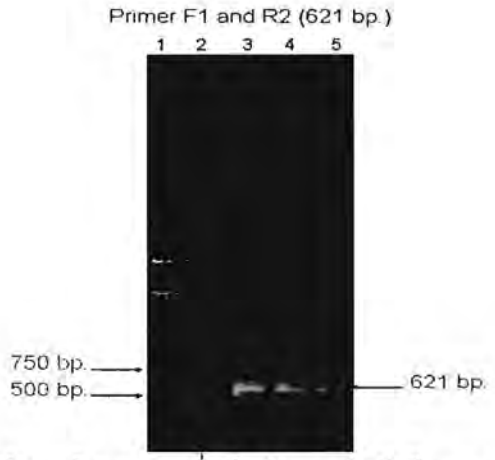
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 กับ 6 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพร์เมอร์เมื่อไม่เกิดการทำลายยีน *NCE103*

3-5 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ nce103_F1 และ nce103_R1

7-9 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ nce103_F2 และ nce103_R2

จากนั้นคัดเลือกยีสต์ทรานฟอร์แมนท์ตัวแทนโดยให้ชื่อสายพันธุ์ว่า BP-12 (*MAT*α *ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1* Δ*leu2::loxP* Δ*nce103::loxP-URA3-loxP*) เพื่อทำการกำจัดยีนมาร์คเกอร์ *URA3* คัดเลือกโคโลนีจากเพลทต้นแบบที่ไม่เจริญใน SC-Ura และยืนยันผลการกำจัดยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการกำจัดยีน *URA3* ออกจากยีสต์ BP-12

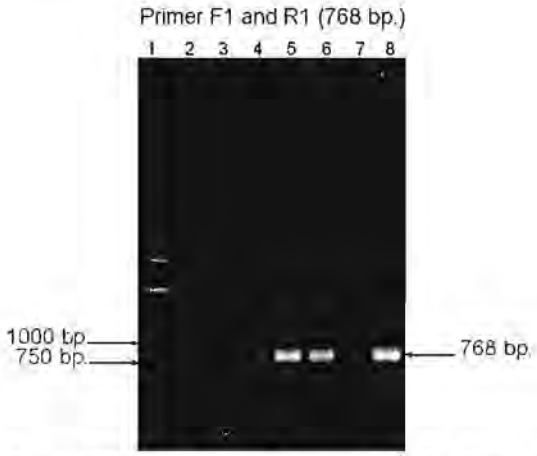
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ nce103_F1 และ nce103_R2

3-5 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ nce103_F1 และ nce103_R2

ผลการทดลองยืนยันการไม่พบยีน *URA3* ในโครโมโซมของยีสต์ จึงเลือกตัวแทนของยีสต์ที่ได้ในขั้นตอนนี้มาและให้ชื่อว่าสายพันธุ์ BP-15 (*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP Δnce103::loxP*)

ยีน *PDR5* (Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter, Pleiotropic Drug Resistance) เป็นยีนประมวลรหัสโปรตีนที่ทำหน้าที่ปั๊มสารออกสู่ภายนอกเซลล์ หากยีสต์ขาดยีน *PDR5* จะส่งผลให้ยีสต์นั้นไม่สามารถขับสารออกนอกเซลล์ เซลล์ยีสต์จึงมีความไวต่อสารต่างๆมากขึ้น ในการทดลองนี้ต้องการทำลายยีน *PDR5* โดยใช้ชิ้นส่วน *loxP-URA3-loxP* เข้าไปแทนที่ยีน *PDR5* ในโครโมโซมของยีสต์ ตรวจสอบผลการทำลายยีน *PDR5* จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส หากทำลายยีน *PDR5* ได้สำเร็จผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่คาดว่าจะได้ทั้งหมด 2 ชิ้นมีขนาด 768 และ 1418 คู่เบส ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าสามารถทำลายยีนได้สำเร็จ โดยพบผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดตามที่คาดไว้ ดังภาพที่ 9 และ 10



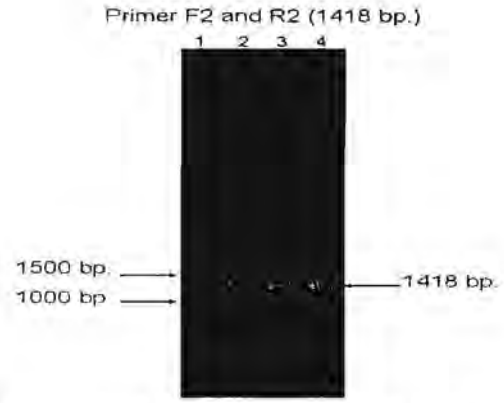
ภาพที่9 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *PDR5*

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพร์เมอร์เมื่อไม่เกิดการทำลายยีน *PDR5*

3, 4, 7 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R1 แต่ไม่เกิดการทำลายยีน

5, 6, 8 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R1 เมื่อเกิดการทำลายยีน



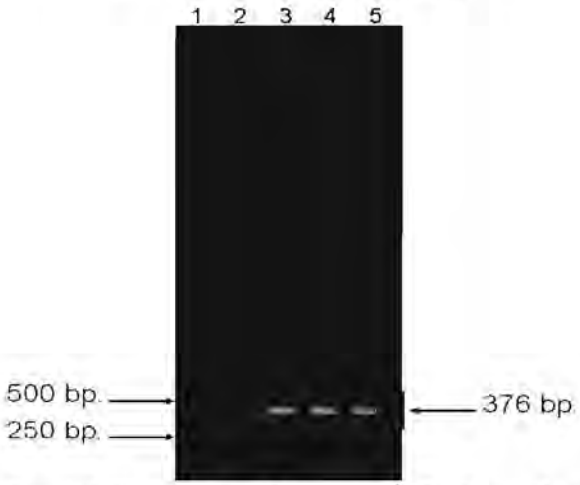
ภาพที่ 10 การยืนยันการทำลายยีน *PDR5* ในยีสต์ทรานฟอร์แมนท์

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2-4 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F2 และ pdr5_R2

จากผลการทดลองพบว่าสามารถทำลายยีน *PDR5* ในยีสต์สายพันธุ์กลาย BP-9 ได้สำเร็จได้ยีสต์ผลลัพธ์สายพันธุ์กลาย BP-13 (*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP Δpdr5::loxP-URA3-loxP*) ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมยูราซิล แสดงให้เห็นว่ายีน *URA3* ได้เข้าไปแทนที่ในโครโมโซมของยีสต์ดังกล่าวตรงตำแหน่งยีน *PDR5* ตามผลการตรวจสอบด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสข้างต้น

จากนั้นคัดเลือกยีสต์ทรานฟอร์แมนท์เพื่อทำการกำจัดยีนมาร์คเกอร์*URA3*คัดเลือกโคโลนีจากเพลทต้นแบบที่ไม่เจริญใน SC-Ura ยืนยันผลการกำจัดยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังภาพที่ 11



ภาพที่11 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *URA3*ในยีสต์ BP-13

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R2

3-5 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพร์เมอร์ pdr5_F1 และ pdr5_R2

ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่ายีสต์ดังกล่าวได้สูญเสียยีนมาร์คเกอร์ *URA3* ในโครโมโซมได้สำเร็จ จึงได้เลือกตัวแทนยีสต์ทรานฟอร์แมนท์ในขั้นนี้ และให้ชื่อว่าสายพันธุ์ Bp-14 (*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP Δpdr5::loxP*) จากนั้นยีน *NCE103* ในยีสต์สายพันธุ์ Bp-14 จะถูกทำลาย เพื่อที่จะสร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดทั้งยีน *PDR5* และยีน *NCE103* จึงได้เตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และ นำเข้าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ Bp14 (*Δpdr5*) ทำการกำจัดยีนมาร์คเกอร์ *URA3* ออกไป ได้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดทั้งยีน *PDR5* และ *NCE103* โดยให้ชื่อว่าสายพันธุ์ BP-17 (*MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 Δleu2::loxP Δpdr5::loxP Δnce103::loxP*)

1.2 ศึกษาฟีโนไทป์ของยีสต์ *Δnce103* ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี 0.035% CO_2 เทียบกับสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี 20% CO_2

นำยีสต์สายพันธุ์ BP-9 BP-15 และ BP-17 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง synthetic dextrose (SD) ที่มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-9 BP-15และ BP-17 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี 0.033% CO_2 เทียบกับสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี 20% CO_2 (เลี้ยงใน GENbox anaer, bioMerieux, France) เป็นเวลา 3-4 วัน จากผลการทดลองพบว่ายีสต์สายพันธุ์ BP-9 สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและมี 0.035% CO_2 และสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี 20% CO_2 เนื่องจากมีการแสดงออกของยีน *NCE103* ทำให้สามารถสร้างไบคาร์บอเนตไปใช้ในกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ได้เมื่ออยู่ในสภาวะมีออกซิเจนและมี 0.035% CO_2 แต่ในทางตรงกันข้ามยีสต์สายพันธุ์ BP-15 และBP-17 สามารถเจริญได้เฉพาะในสภาวะไม่มีออกซิเจนและมี 20% CO_2 เนื่องจากยีสต์ดังกล่าวขาดยีน *NCE103* ทำให้ในสภาวะ CO_2 ต่ำ ไม่สามารถเจริญได้เพราะขาดการผลิตไบคาร์บอเนตไปใช้ในเซลล์ แต่ในสภาวะ CO_2 สูง ยีสต์จะนำ CO_2 ในอากาศมาใช้เพื่อผลิตไบคาร์บอเนตแทนทำให้สามารถกลับมาเจริญได้อีกครั้ง ดังภาพที่ 12

ก.

ข.

ภาพที่ 12 ความต้องการ CO_2 ต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ BP-9, BP-15 และ BP-17

ก. ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและมี 0.035% CO_2

1 คือ สายพันธุ์ BP-9 (wild type derivative of W303-1B)

2 คือ สายพันธุ์ BP-15 (△*nce103*)

3-4 คือ สายพันธุ์ BP-17 (△*nce103* △*pdr5*)

ข.ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมี 20% CO_2

1 คือ สายพันธุ์ BP-9

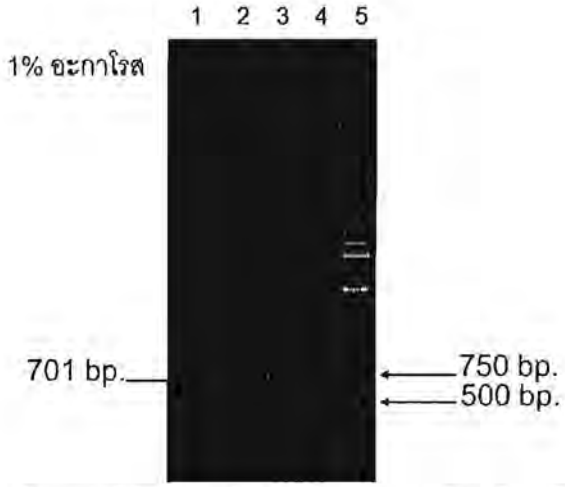
2 คือ สายพันธุ์ BP-15

3-4 คือ สายพันธุ์ BP-17

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

2.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *NCE103* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณยีน *NCE103* ทำได้โดยสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์สายพันธุ์ W303-1B และออกแบบไพร์เมอร์ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์ W303-1B เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากการตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 701 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *NCE103* ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *NCE103*

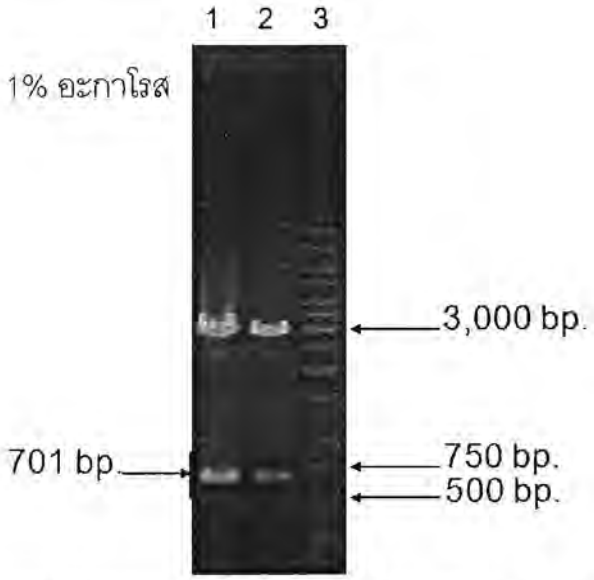
1 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ (NCE103_F, R) ที่จำเพาะกับยีน *NCE103*

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

5 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

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

นำ pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I และตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 701 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *NCE103* และ 3,000 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ ดังภาพที่ 14



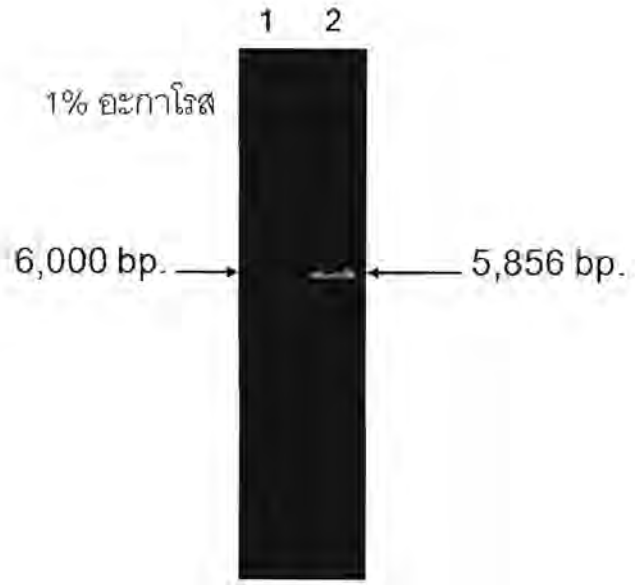
ภาพที่ 14 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/NCE103 (C-Flag))

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

3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2.3 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pYES2/NCE103 (C-Flag) และ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

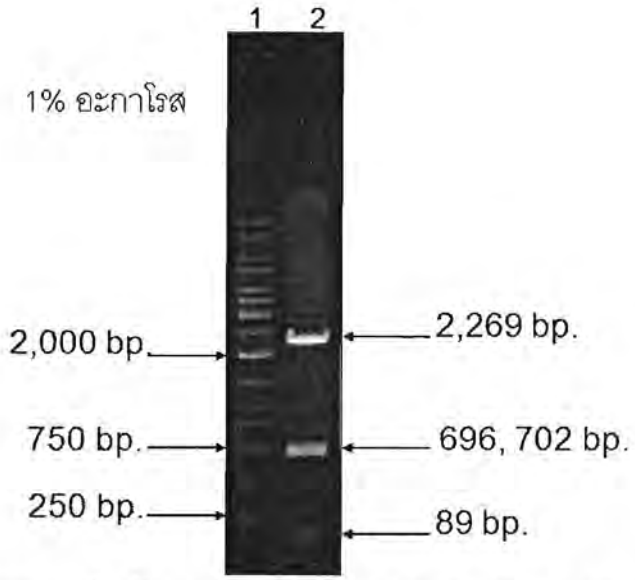
จากการทดลองนี้ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด 2 ชนิดคือ pYES2/NCE103 (C-Flag) และ pENTR™3C/ NCE103 (C-Flag) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบ พบว่า pYES2 ตัดแล้วได้ชิ้นส่วน 5,856 คู่เบส (ภาพที่ 15) และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ ได้ชิ้นส่วนขนาด 2,269 คู่เบส (ภาพที่ 16) ส่วนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2/NCE103 (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 701 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *NCE103* และ 5,856 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของ pYES2 เวคเตอร์ (ภาพที่ 17) และจากการตรวจสอบ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 701 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *NCE103* และ 2,269 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของ pENTR™3C เวคเตอร์ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 15 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2 เวคเตอร์

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

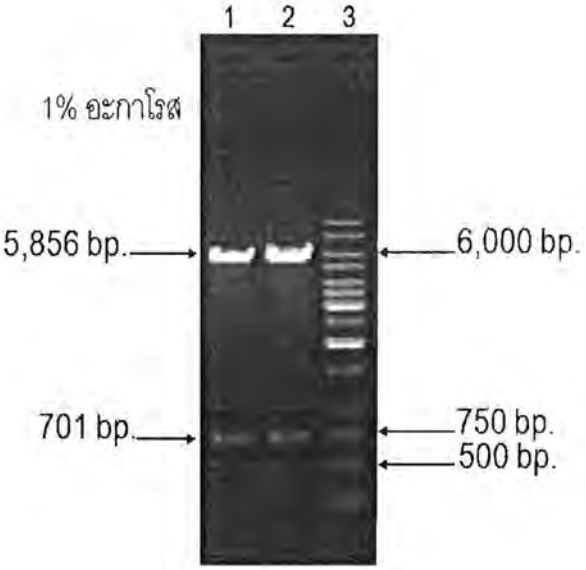
2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pYES2 เวคเตอร์ (5,856 bp)



ภาพที่ 16 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

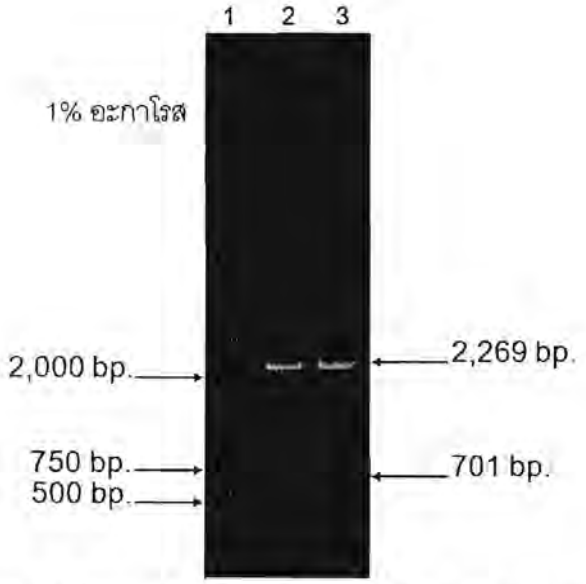
2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (2,269 bp)



ภาพที่ 17 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2/NCE103 (C-Flag)

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

3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder



ภาพที่ 18 ผลิตภัณฑ์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pENTR™3C/NCE103 (C-Flag)

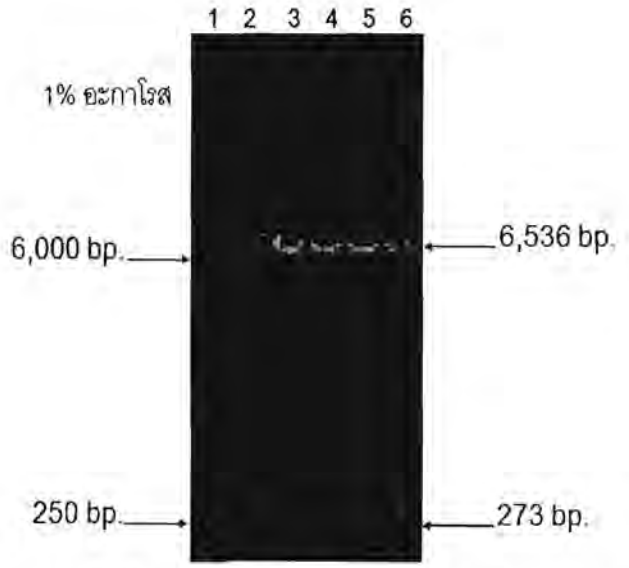
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

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

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

นำ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซีส จากการตรวจสอบ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 6,536 คู่เบส และ 273 คู่เบส ดังภาพที่ 19

i 28214286



ภาพที่ 19 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของ pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) **และ** pAG414GAL/ NCE103 (C-Flag)

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GPD-ccdB-HA เวคเตอร์ ที่ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*

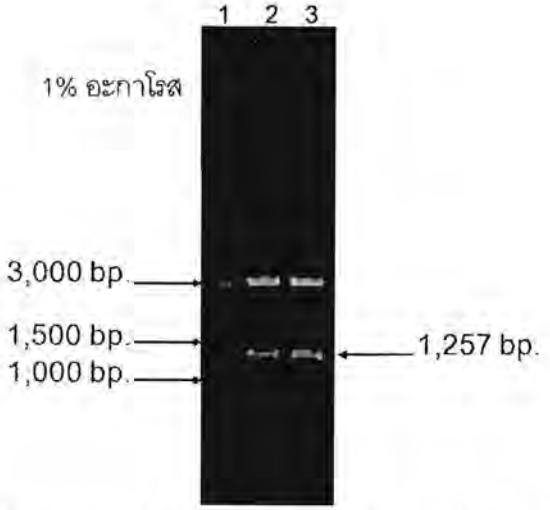
3-4 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GPD เวคเตอร์ ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*

5-6 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GAL เวคเตอร์ ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *NCE103*

3. สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของ *Plasmodium falciparum* (*pfCA*)

3.1 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/pfCA)**โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

การเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวทำได้โดยนำ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *P. falciparum* ซึ่งได้รับมาจาก ศ .ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไลเกชั่นเข้าสู่ pGEM T-Easy เวคเตอร์ และ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบ pGEM T-Easy/pfCA พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,257 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *pfCA* และ 3,000 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่20)



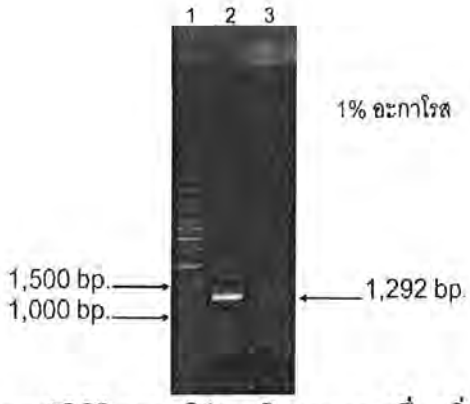
ภาพที่ 20 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ของ pGEM T-Easy/pfCA

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

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

3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *pfCA* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *pfCA* โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์pfCA F(418) และ pfCA R(418) และใช้ pGEM T-Easy/pfCA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากการตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,292 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *pfCA* (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *pfCA*

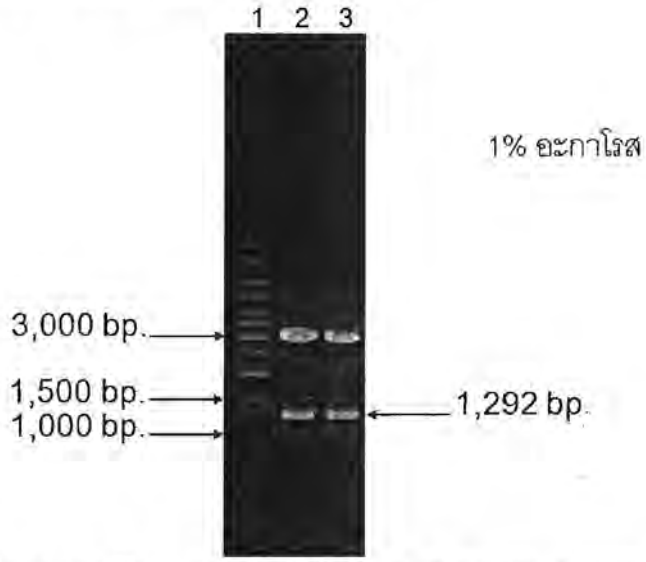
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

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

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

3.3 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,292 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *pfCA* (418) และ 3,000 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 22)



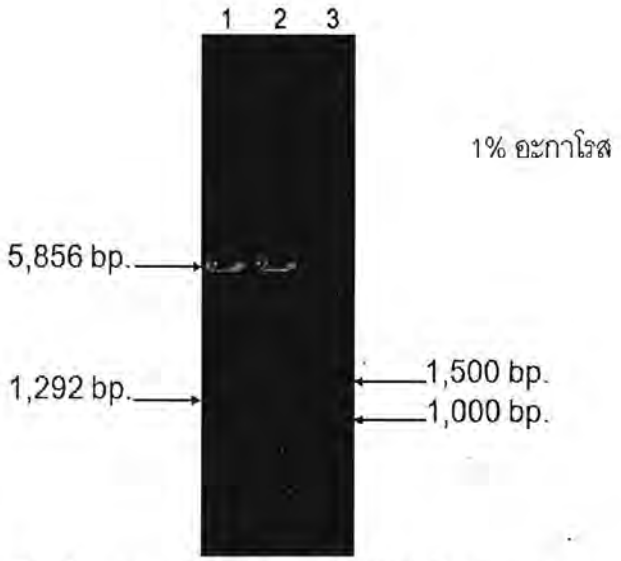
ภาพที่ 22 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pGEM T-Easy/pfCA418 (C-Flag)

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

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

3.4 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pYES2/pfCA418 (C-Flag) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pYES2/pfCA418 (C-Flag) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบ pYES2/pfCA418 (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,292 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *pfCA* (418) และ 5,856 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของ pYES2 เวคเตอร์ (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Xho* I ของ pYES2/pfCA418 (C-Flag)

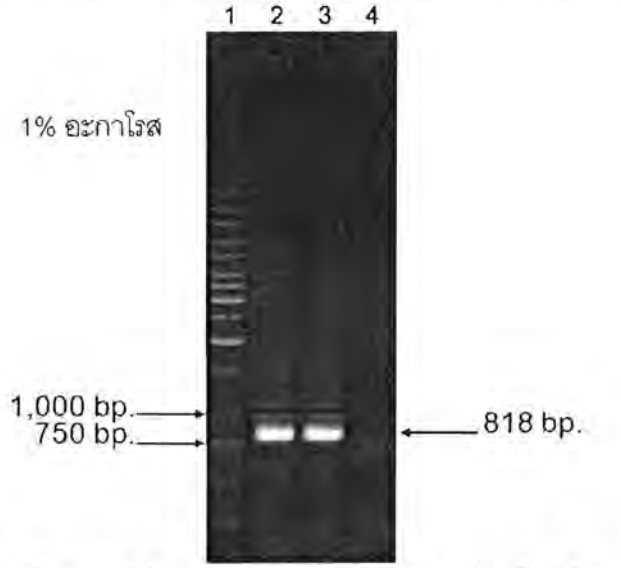
3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

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

4. สร้างพลาสมิดให้มียีนที่ประมวลรหัสคาร์บอนิคแอนไฮเดรสของมนุษย์ (*hCAII*)

4.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นของยีน *hCAII* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวโดยนำ cDNA ของมนุษย์ซึ่งได้รับมาจาก ศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ hCAII_F และรีเวิร์สไพรเมอร์ hCAII_R จากการตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 818 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *hCAII* (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *hCAII*

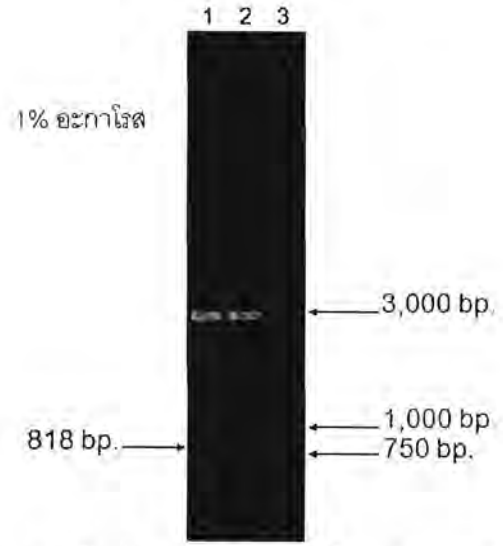
1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

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

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

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

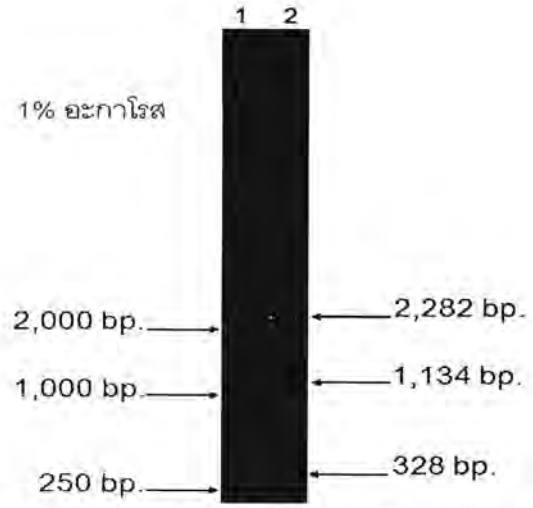
นำ pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag) และ pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ (Invitrogen, USA) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 818 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *hCAII* และ 3,000 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากับ pGEM T-Easy เวคเตอร์ (ภาพที่ 25) ส่วน pENTR™3C Dual Selection เวคเตอร์ พบว่าตัดแล้วได้ชิ้นส่วน 2,282 คู่เบส (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 25 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pGEM T-Easy/hCAII (C-Flag)

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

3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder



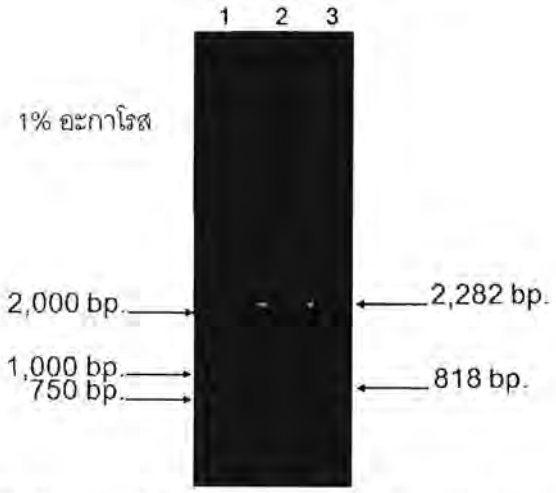
ภาพที่ 26 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pENTR™3C Dual Selection **เวคเตอร์**

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

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

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

นำ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบ pENTR™3C/hCAII (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 818 คู่เบสซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของชิ้นส่วน *hCAII* และ 2,282 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับขนาดของ pENTR™3C เวคเตอร์ (ภาพที่ 27)



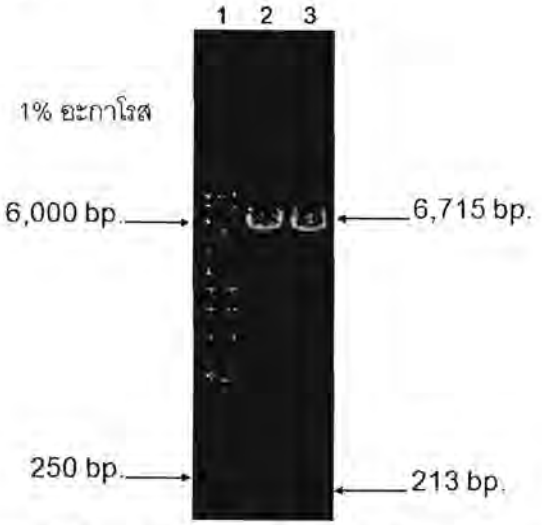
ภาพที่ 27 ผลิตภัณฑ์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Xho* I ของ pENTR™3C/hCAII

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

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

4.4 ตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag)) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส จากการตรวจสอบ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 6,715 คู่เบส และ 213 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับการคำนวณตามคาดการณ์เมื่อมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *hCAII* เข้าไปในเวคเตอร์ทั้งสอง (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ของ pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag)

1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder

2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GPD เวคเตอร์ ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII*

3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pAG414GAL เวคเตอร์ ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII*

สรุปผลการทดลอง

1. สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน NCE103(สายพันธุ์ BP-15) ได้สำเร็จ
2. สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน NCE103และยีน PDR5(สายพันธุ์BP-17) ได้สำเร็จ
3. สร้างพลาสมิด pAG414GPD/NCE103 (C-Flag) และ pAG414GAL/NCE103 (C-Flag) ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *NCE103* ภายใต้การควบคุมของ GPD และ GAL promoters ได้สำเร็จ
4. สร้างพลาสมิด pYES2/pfCA418 (C-Flag) ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *pfCA* ภายใต้การควบคุมของ GAL promoter ได้สำเร็จ
5. สร้างพลาสมิด pAG414GPD/hCAII (C-Flag) และ pAG414GAL/hCAII (C-Flag) ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *hCAII* ภายใต้การควบคุมของ GPD และ GAL promoters ได้สำเร็จ

งานวิจัยที่จะดำเนินการในปีที่ 2

1. ศึกษาความสามารถในการทดแทนการทำหน้าที่ของเอ็นไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของยีสต์ ด้วยเอ็นไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม

2. หากสามารถทดแทนหน้าที่ได้จากข้อ 1 จะได้ศึกษาผลของสารยับยั้งเอ็นไซม์คาร์บอนิคแอนไฮเดรสของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม ที่มีต่อการเจริญของยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อการพัฒนาเป็นระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์ เพื่อใช้ค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Clark, D., Rowlett, R.S., Coleman, J.R. and Klessig, D.F. 2004. Complementation of the yeast deletion mutant □*NCE103* by members of the β class of carbonic anhydrase is dependent on carbonic anhydrase activity rather than on antioxidant activity. *Biochem. J.* 379: 609-615.

Elleuche, S., Poggeler, S. 2010. Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiol.* 156:23-29.

Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M.A., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M. and Barrell, B. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature.* 419: 498-511.

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

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

Hopkins, A.L., Witty, M.J. and Nwaka, S. 2007. Mission possible. *Nature.* 449: 166-169.

Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochankij, S. and Krungfrai, J. 2001. Characterisation of carbonic anhydrase in Plasmodium falciparum. *Inter. J. Parasitol.* 31: 661-668.

Krungkrai, J., Krungkrai, S.R. and Supuran, C.T. 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase with aromatic/heterocyclic sulfonamides-in vitro and in vivo studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18: 5466-5471.

Krungkrai, J. and Supuran, C. T. 2008. The alpha-carbonic anhydrase from. the malaria parasite and its inhibition. *Curr. Pharm. Des.* 14: 631-640.

Na-Bangchang, K. and Congpuong, K. 2007. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. *J. Exp. Med.* 211: 99-113.

Pink, R., Hudson, A., Mouries, M.-A. and Bendig, M. 2005. Opportunities and challenges in antiparasitic *drug* discovery. *Nat. Rev. Drug. Disc.* 4: 727-740.

White, N.J.J. 2004. Antimalarial drug resistance. *Clin. Invest.* 113: 1084-1092.