โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของการติดอิพิโทปที่ปลายด้าน *N*- ของเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสไอโซไซม์ II ของมนุษย์ที่มีต่อแอคทิวิตี้ของมันในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

Effect of *N*- terminal epitope tagging of human carbonic anhydrase isozyme II on its activity in *Saccharomyces cerevisiae*

ชื่อนิสิต นายสหกฤษณ์ เกษจินดา **เลขประจำตัว** 5832351723

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงงาน	ผลของการติดอิพิโทปที่ปลายด้าน *N*- ของเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสไอโซไซม์ II ของมนุษย์ที่มีผลต่อแอคทิวิตี้ของมันในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*
โดย	นายสหกฤษณ์ เกษจินดา รหัสนิสิต 5832351723
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์)

ชื่อโครงการ ผลของการติดอิพิโทปที่ปลายด้าน *N-* ของเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสไอโซไซม์ II ของมนุษย์ที่มีต่อแอคทิวิตี้ของมันในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ชื่อนิสิต นายสหกฤษณ์ เกษจินดา รหัสประจำตัวนิสิต 5832351723

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (CA) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแบบผันกลับของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) กับน้ำ (H_2O) ให้กลายเป็นไบคาร์บอเนต แอนไอออน (HCO_3^-) กับโปรตอน (H^+) การแสดงออกของเอนไซม์ออกของเอนไซม์ CA โดยเฉพาะ human CA II (hCAII) มีความสัมพันธ์กับการก่อโรคต่างๆ ในมนุษย์ อาทิ เช่น โรคต้อหิน เป็นต้น โดย hCAII ทำหน้าที่ในการผลิต HCO_3^- ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของน้ำหล่อเลี้ยงลูกตา (aqueous humor) ในผู้ป่วยโรคต้อหินการระบายน้ำหล่อเลี้ยงตามีความบกพร่องทำให้ความดันภายในลูกตามีระดับที่สูงขึ้นและอาจนำไปสู่การสูญเสียการมองเห็น ดังนั้นการลดการผลิตน้ำหล่อเลี้ยงลูกตาจึงเป็นจุดมุ่งหมายของการรักษาโรค อย่างไรก็ตามในการค้นหายารักษาโรคต้อหินจำเป็นที่จะต้องมีระบบที่มีประสิทธิภาพในการค้นหา โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งในโครงการวิจัยพัฒนาระบบคัดกรองฐานยีสต์สำหรับการค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCAII หรือไม่ โดยมีจุดประสงค์เพื่อที่จะศึกษาว่าการติดอิพิโทป His ที่ตำแหน่งปลายด้าน *N-* ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ hCAII ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะ โดยมีพลาสมิด pRS414 (*GAL1.4_hCAII*) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอถูกไลเกชั่นกับพลาสมิดที่ใช้แสดงออกในยีสต์ (Yeast expression plasmid) เพื่อให้ได้รับพลาสมิด *N-His-hCAII* ที่แสดงออกภายใต้การควบคุมของ *GAL1* โปรโมเตอร์ ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ชนิดที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกได้ พลาสมิดที่ได้ถูกนำไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่ขาดยีน *NCE103* (Δ*nce103*) หรือยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสในยีสต์ ผลการทดลองพบว่า *hCAII* ที่ถูกติดด้วยอิพิโทป His ที่ปลายด้าน *N-* สามารถทำหน้าที่ทดแทนหน้าที่ของ *Nce103* ในยีสต์สายพันธุ์ AS01 (Δ*nce103*) ได้ ซึ่งสายพันธุ์ยีสต์ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้อาจถูกใช้เพื่อค้นหายารักษาโรคต้อหินได้ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถทำเอนไซม์ hCAII ให้บริสุทธิ์ได้ง่าย เพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของ hCAII ใน *in vitro* ได้

Project Title Effect of *N*- terminal epitope tagging of human carbonic anhydrase isozyme II on its activity in *Saccharomyces cerevisiae*

Investigator Mr. Sahakrit Keschinda 5832351723

Advisor Associate Professor. Chulee Yompakdee, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 2018

Abstract

Carbonic anhydrase (CAs) play an important role on reversible CO_2 hydration to HCO_3^- and H^+. The expression of CAs especially human CA II (hCAII) was found to associate with many human diseases including Glaucoma. The hCAII produces HCO_3^- which is the major component of aqueous humor. In glaucoma, aqueous humor can't be drained out efficiently leading to the increase in intraocular pressure and resulting in visual loss. Therefore, the goal for glaucoma treatment is to reduce the aqueous humor production. However, the effective system for searching glaucoma drugs is important. This project, was in part of development of yeast-base assay for hCAII inhibitor screening system, aimed to see whether the addition of His-epitope tagging using at *N*-terminus of *hCAII* affect its activity or not. The *hCAII* DNA fragment was amplified by PCR a specific primer pair and pRS414 (*GAL1.4_hCAII*) as template. Then, the DNA fragment was cloned into a yeast expression plasmid to obtain a plasmid containing *N-His-hCAII* under a strong inducible *GAL1* promoter. The obtained plasmid was transformed into a *Saccharomyces cerevisiae* strain lacking of *NCE103*, a gene encodes carbonic anhydrase-like enzyme (Δ*nce103*). It was found that *hCAII* fused with His epitope tag at its *N*-terminus could functionally complement the Nce103 function in the Δ*nce103* mutant yeast. Thus, epitope tagging at the *N*-terminus of *hCAII* does not affect its carbonic anhydrase activity. Furthermore, the *N*-terminus His-epitope tag should facilitate purification step of *hCAII* from the yeast stain overexpressed *N-His-hCAII*.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงและด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆทุกขั้นตอนในการศึกษาโครงการฉบับนี้ ตลอดจนตรวจแก้ไขและปรับปรุงข้อบกพร่องด้านต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง นิสิตตระหนักถึง ความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์พลาสมิด pET22B และเครื่องมือต่างๆในการศึกษาครั้งนี้ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส รวมถึงเหล่าคณาจารย์ในภาคจุลชีววิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะต่างๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษาในระดับปริญญาตรี และขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ของภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561ที่ช่วยให้โครงการวิจัยฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่อัญญพร แสงแก้ว นิสิตในระดับปริญญาเอก และพี่ๆในห้องปฏิบัติการ 2017 ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาคจุลชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำและความรู้ในการปฏิบัติงานวิจัยฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อนๆที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอดจนโครงการสำเร็จลุล่วง

นายสหกฤษณ์ เกษจินดา

สารบัญ

บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญรูป	v
สารบัญตาราง	vii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย	6
บทที่ 3 ผลการทดลอง	25
บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก ก.	42
ภาคผนวก ข.	45

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของ Carbonic anhydrase และส่วนของ Active site 1

ภาพที่ 1.2 โครงสร้างภายในลูกตาและการเกิดโรคต้อหิน 4

ภาพที่ 2.1 แผนภาพแสดงผลิตภัณฑ์จาก PCR เมื่อใช้คู่ไพร์เมอร์จำเพาะ SacI_hCAII และ XhoI_hCAII 11

ภาพที่ 2.2 แผนภาพแสดงพลาสมิด pGEM T- Easy โคลนนิ่งเวกเตอร์ 13

ภาพที่ 2.3 แผนภาพแสดงพลาสมิด pYES2 (*N-His 418 pfCA*) 17

ภาพที่ 2.4 แผนภาพแสดงพลาสมิด pRS316 21

ภาพที่ 3.1 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บรรจุยีนประมวลรหัสเอนไซม์ hCAII 25

ภาพที่ 3.2 แสดงการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Insert DNA) ด้วยวิธี Blue-White Selection ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pGEM (*hCAII*) 26

ภาพที่ 3.3 แสดงการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM (*hCAII*) เบื้องต้นโดยวิธีการ colony cracking 27

ภาพที่ 3.4 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I ของพลาสมิด pGEM (*hCAII*) 28

ภาพที่ 3.5 ทรานสฟอร์แมนท์ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่เกิดจากการทรานสฟอร์เมชั่นขึ้นด้วยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไลเกชั่นระหว่าง pYES (*N-His*) และ *hCAII* 29

ภาพที่ 3.6 แสดงการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) เบื้องต้นโดยวิธี colony cracking 29

ภาพที่ 3.7 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I ของพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) 30

ภาพที่ 3.8 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His hCAII-CYC1t* 31

ภาพที่ 3.9 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I และทำการ Dephosphorylation 32

ภาพที่ 3.10 ทรานสฟอร์แมนท์ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่ถูกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไลเกชั่นระหว่างที่มีพลาสมิด pRS316 และ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* 33

ภาพที่ 3.11 แสดงการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) เบื้องต้นโดยวิธีการ colony cracking 33

ภาพที่ 3.12 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I ของพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) 34

ภาพที่ 3.13 ลักษณะฟีโนไทป์ของยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AS01 (Δ*nce103*) ที่ความเข้มข้น 10^6-10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 36

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.1 แสดงการจัดกลุ่มของ Carbonic anhydrase ในสิ่งมีชีวิต 2

ตารางที่ 1.2 แสดงไอโซไซม์ของ Human Carbonic Anhydrase (hCAs) 3

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 10

ตารางที่ 2.2 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง 10

ตารางที่ 2.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง 10

ตารางที่ 2.4 แสดงสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 11

ตารางที่ 2.5 แสดงภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 12

ตารางที่ 2.6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาในการเติม dATP ก่อนการทำไลเกชั่นกับ pGEM T- Easy โคลนนิ่งเวกเตอร์ 14

ตารางที่ 2.7 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาไลเกชั่นเข้าสู่ pGEM T- Easy โคลนนิ่งเวกเตอร์ 14

ตารางที่ 2.8 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะของ Insert และ Vector 17

ตารางที่ 2.9 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาไลเกชั่นเพื่อสร้างพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) 18

ตารางที่ 2.10 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อยืนยันผลการทรานสฟอร์เมชั่นมีพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) 19

ตารางที่ 2.11 แสดงสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* 20

ตารางที่ 2.12 แสดงภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 20

ตารางที่ 2.13 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I 22

ตารางที่ 2.14 แสดงสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา Dephosphorylation 22

ตารางที่ 2.15 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาไลเกชั่นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII -CYC1t* เข้าสู่เวกเตอร์ pRS316 22

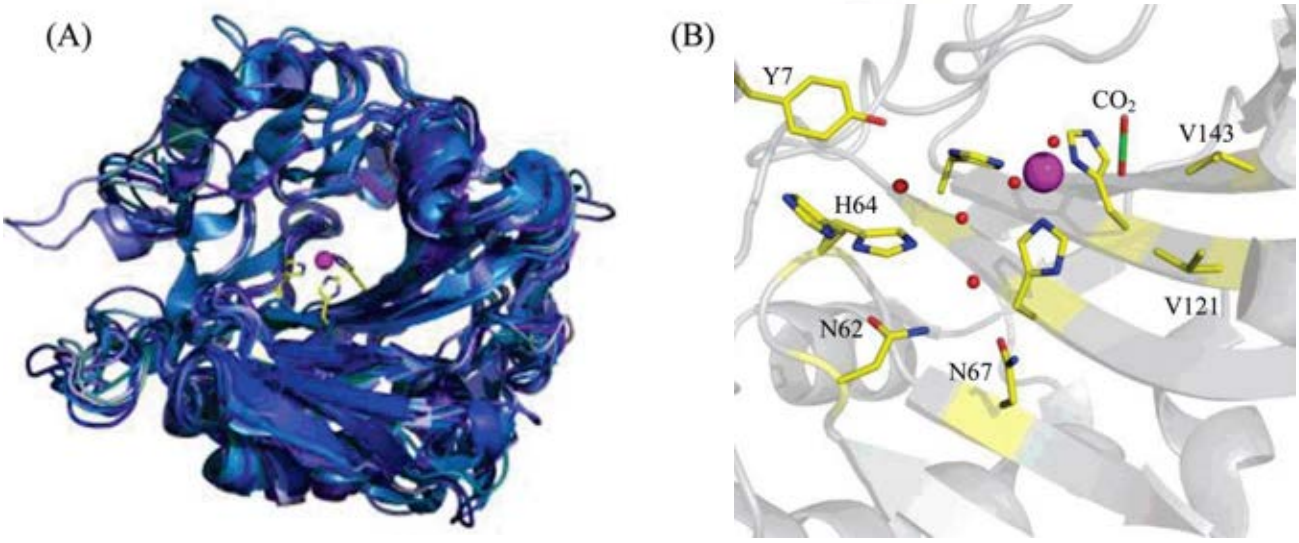
ตารางที่ 2.16 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I 23

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Carbonic anhydrase (CAs) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา CO_2 hydration แบบผันกลับได้ของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) กับน้ำ (H_2O) ให้กลายเป็นไบคาร์บอเนต แอนไอออน (HCO_3^-) กับโปรตอน (H^+) ดังสมการ $CO_2 + H_2O \rightleftarrows HCO_3^- + H^+$ ซึ่ง CAs เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญกับกระบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ (McKenna และ Supuran, 2014) ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกอาณาจักร (Bacteria, Archaea และ Eukarya) โดยมีบทบาทที่สำคัญ ได้แก่ การควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ปฏิกิริยาคาร์บอกซิลเลชั่น และสมดุลของเหลวเป็นต้น พบว่า CAs มีการแสดงออกอยู่ในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ส่วนมากพบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โปรโตซัว สาหร่าย พืช และแบคทีเรียบางชนิด (Arabaci และคณะ, 2014) โดยการเร่งปฏิกิริยาแบบผันกลับของ CAs จำเป็นต้องมี co-factor หรือไอออนของโลหะ (metalloenzyme) เข้าไปจับบริเวณ active site ของ CAs เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์กับไอออนของโลหะจำพวกไฮดรอกไซด์ (nucleophilic metal hydroxide species) เช่น ซิงค์(II) ไฮดรอกไซด์ ($Zn(OH)_2$หรือZn^{2+}) แคดเมียม (II) ไฮดรอกไซด์ ($Cd(OH)_2$หรือ Cd^{2+}) หรือไอรอน(II) ไฮดรอกไซด์ ($Fe(OH)_2$หรือ Fe^{2+}) ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ CAs (Scozzafava และ Supuran, 2014) (ภาพที่ 1.1)



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของ Carbonic anhydrase และส่วนของ Active site

ที่มา: Aggarwal และคณะ (2013)

ปัจจุบันมีการจัดจำแนก CAs ออกเป็น 7 genetic family ได้แก่ α-CA, β-CA, γ-CA, δ-CA, ζ-CA, θ-CA และ η-CA (De Simone และคณะ, 2015) ซึ่งชนิด α-CA (McKenna และ Supuran, 2014) สามารถพบได้ในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง สาหร่าย โปรโตซัว ไซโตพลาสซึมของพืชที่มีสีเขียว และแบคทีเรียบางชนิดสำหรับชนิด β-CA พบได้ในกลุ่มแบคทีเรีย สาหร่ายและคลอโรพลาสต์ของพืชที่มีใบเลี้ยงเดี่ยวและคู่ และยังสามารถพบได้ในฟังไจรวมถึงอาร์เคียบางชนิด ชนิด γ-CA (Şentürk และคณะ, 2011) พบได้ในกลุ่มอาร์เคียและแบคทีเรียบางชนิด δ-CA, ζ-CA และ θ-CA พบได้ในไดอะตอมทะเล (Kikutani และคณะ, 2016) η-CA พบได้ในกลุ่มโปรโตซัว (Del P. และคณะ, 2014) (ตารางที่ 1.1)

ตารางที่ 1.1 แสดงการจัดกลุ่มของ Carbonic anhydrase ในสิ่งมีชีวิต

CA class	Organism	Accession number	Cryptonim
Alpha (α)	*Helicobacter pylori J99*	NP_223829.1	HpylCA_alpha
	Homo sapiens, isoform II	AAI11949.1	HumCAII_alpha
	Homo sapiens, isoform I	NP_001158302.1	HumCAI_alpha
	Sulfurihydrogenibium yellowstonense YO3AOP1	ACD66216.1	SspCA_alpha
	Streptococcus salivarius	EIC81445.1	SsalCA_alpha
	Neisseria gonorrhoeae	CAA72038.1	NgonCA_alpha
Beta (β)	*Schizosaccharomyces pombe*	CAA21790	SpoCA_beta
	Brucella suis 1330	NP_699962.1	BsuCA_beta
	Burkholderia thailandensis	ZP_02386321	BthCA_beta
	Coccomyxa sp.	AAC33484.1	CspCA_beta
	Chlamydomonas reinhardtii	XP_001699151.1	CreCA_beta
	Acinetobacter baumannii	YP_002326524	AbaCA_beta
	Porphyromonas gingivalis	YP_001929649.1	PgiCA_beta
	Myroides injenensis	ZP_10784819	MinCA_beta
	Zea mays	NP_001147846.1	ZmaCA_beta
	Vigna radiata	AAD27876	VraCA_beta
	Flaveria bidentis, isoform 1	AAA86939.2	FbiCA_beta
	Arabidopsis thaliana	AAA50156	AthCA_beta
	Helicobacter pylori	BAF34127.1	HpyCA_beta
	Legionella pneumophila	YP_003619232	LpnCA_beta
	Escherichia coli	ACI70660	EcoCa_beta
	Methanobacterium thermoautotrophicum	GI:13786688	Cab_beta
	Saccharomyces cerevisiae	GAA26059	SceCA_beta
	Dekkera bruxellensis	EIF49256	DbrCA_beta
Gamma (γ)	*Pseudomonas sp.*	ZP_10427314.1	PseCA_gamma
	Burkholderia gladioli	YP_004359911.1	BglCA_gamma
	Methanosarcina thermophila	ACQ57353.1	CAM_gamma
	Chlamydomonas reinhardtii	XP_001703237.1	CreCA_gamma
	Arabidopsis thaliana	NP_564091.1	AthCA_gamma
	Porphyromonas gingivalis	YP_001929649.1	PgiCA_gamma
Delta (δ)	*Thalassiosira weissflogii*	AAV39532.1	TweCA_delta
	Thalassiosira pseudonana	XP_002287620.1	TpsCA_delta
	Emiliania huxleyi	ABG37687.1	EhuCA_delta
	Bathycoccus prasinos	CCO20234.1	Bpr_delta
	Lingulodinium polyedrum	ABS87870.1	LpoCA_delta
Zeta (ζ)	*Thalassiosira weissflogii*	AAX08632.1	TweCA_zeta,CDCA1
	Micromonas pusilla	XP_003063214.1	MpuCA_zeta
	Thalassiosira oceanica	EJK51395.1	TocCA_zeta
	Thalassiosira pseudonana	XP_002295227.1	TpseCA_zeta
	Micromonas sp.	XP_002504722.1	MicCA_zeta
Eta (η)	*Plasmodium falciparum 3D7*	PF3D7_1140000	Pf3D7_eta
	Plasmodium reichenowi	CDO65199.1	Preich_eta
	Plasmodium yoelii yoelii 17X	PY17X_0910400	Py17X_eta
	Plasmodium yoelii yoelii 17XNL	PY00744	Py17XNL_eta
	Plasmodium vinckei vinckei	KEG02328.1	Pvvinc_eta
	Plasmodium vinckei petteri	EUD73019.1	Pvpet_eta
	Plasmodium berghei ANKA	PBANKA_090900	PbANKA_eta
	Plasmodium chabaudi chabaudi	PCHAS_071030	Pcchab_eta
	P. falciparum CA(residues 211 to 445[24,25]	–	PfCA_eta

ที่มา: Del และคณะ (2014)

ในกลุ่มของ α-CA พบได้ในกลุ่มสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังรวมไปถึงในมนุษย์ CAs (human CAs) ซึ่งสามารถถูกแบ่งออกได้เป็นทั้งหมด 16 ไอโซไซม์ (Isozymes) (Alterio และคณะ, 2012) ตามความแตกต่างของบริเวณที่พบที่ (Subcellular localization) เช่น cytosol ,membrane และสารคัดหลั่งต่างๆ (Boron, 2005) และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮเดรชั่นของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 hydration) รวมถึงมีความจำเพาะในการจับกับสารในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ (Affinity for sulfonamides) ได้แตกต่างกัน (Taslimi และคณะ, 2016) (ตารางที่ 1.2) โดย hCA II เป็นเอนไซม์ที่ถูกศึกษาอย่างแพร่หลาย พบว่า hCA II มีการแสดงออกที่หลากหลายบริเวณ กล่าวคือมีการแสดงออกได้ใน cytosol ของทุกเนื้อเยื่ออวัยวะและมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา CO_2 hydrationที่สูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารยั้งยั้งกลุ่มซัลโฟนาไมด์มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ได้อย่างมีความจำเพาะสูง (Scozzafava A. และ Supuran, 2007) ในงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ CAs มีความเกี่ยวข้องกับโรคหลายชนิดได้แก่ edema, glaucoma, obesity, cancer, epilepsy และ osteoporosis (Şentürk และคณะ, 2011)

ตารางที่ 1.2 แสดงไอโซไซม์ของ Human Carbonic Anhydrase (hCAs)

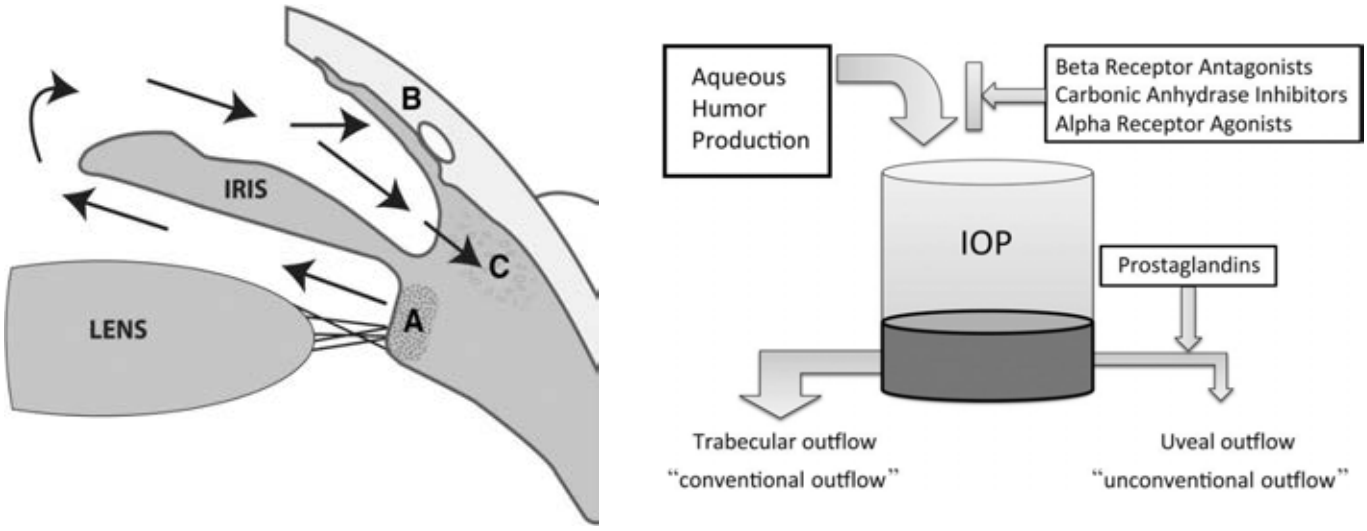
	organ/tissue distribution	subcellular localization	catalytic activity (CO_2 hydration)	affinity for sulfonamides
CA I	erythrocytes, gastrointestinal tract, eye	cytosol	low	medium
CA II	erythrocytes, eye, gastrointestinal tract, bone osteoclasts, kidney, lung, testis, brain	cytosol	high	very high
CA III	skeletal muscle, adipocytes	cytosol	very low	very low
CA IV	kidney, lung, pancreas, brain capillaries, colon, heart muscle, eye	membrane-bound	medium	high
CA VA	liver	mitochondria	low	high
CA VB	heart and skeletal muscle, pancreas, kidney, spinal cord, gastrointestinal tract	mitochondria	high	high
CA VI	salivary and mammary glands	secreted into saliva and milk	low	very high
CA VII	central nervous system	cytosol	high	very high
CA VIII	central nervous system	cytosol	acatalytic	ND[a]
CA IX	tumours, gastrointestinal mucosa	transmembrane	high	high
CA X	central nervous system	cytosol	acatalytic	ND[a]
CA XI	central nervous system	cytosol	acatalytic	ND[a]
CA XII	kidney, intestine, reproductive epithelia, eye, tumors	transmembrane	low	very high
CA XIII	kidney, brain, lung, gut, reproductive tract	cytosol	low	high
CA XIV	kidney, brain, liver, eye	transmembrane	low	high

[a]ND = not determined.

ที่มา: Alterio และคณะ (2012)

โรคต้อหิน (Glaucoma) เป็นสาเหตุหนึ่งของอาการตาบอดที่เกิดขึ้นกับประชากรจำนวนมาก สามารถเกิดได้กับคนทุกช่วงอายุและพบมากในกลุ่มของผู้สูงอายุ ซึ่งเกิดจากความเสียหายของเส้นประสาทตาทำให้สูญเสียการมองเห็นเนื่องจากความดันตาที่เพิ่มสูงขึ้น (Increase in ocular pressure หรือIOP) ซึ่งภายในดวงตามีการผลิตของเหลวที่เรียกว่าน้ำเลี้ยงลูกตา (Aqueous humor) ที่ถูกหลั่งออกมาโดยซีเลียรีบอดี้ (Ciliary body) ไปสู่ช่องว่างระหว่างกระจกตาและม่านตา หรือช่องว่างหน้าลูกตา (Anterior Chamber) ซึ่งจะมีการระบายออกของน้ำ

หล่อเลี้ยงลูกตา ผ่านเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายตะแกรงเป็นตัวกรองเรียกว่า trabecular meshwork น้ำหล่อเลี้ยงลูกตาจะถูกดูดซึมเข้าสู่เส้นเลือดดำผ่านท่อ schlemm's canal Doreen (Schmidl และคณะ, 2015) โดยพบว่าในคนสุขภาพดีมักมีอัตราการผลิตและระบายออกของน้ำหล่อเลี้ยงลูกตาในอัตราคงที่ แต่ในกรณีของผู้ป่วยที่เป็นโรคต้อหินมักพบว่ามีการไหลเวียนของน้ำหล่อเลี้ยงลูกตาที่ผิดปกติเนื่องจากการอุดตันของ trabecular meshwork ส่งผลให้ความดันภายในดวงตาสูงขึ้นและเกิดการกดทับเส้นประสาทดวงตาและในที่สุดอาจนำไปสู่การสูญเสียการมองเห็น (Supuran, 2008) การเกิดโรคต้อหินมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II อันเนื่องมาจากการสร้างน้ำหล่อเลี้ยงลูกตา โดยเอนไซม์ hCA II ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา CO_2 hydration ให้กลายเป็น HCO_3^- ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญในการสังเคราะห์น้ำหล่อเลี้ยงลูกตา ดังนั้นการรักษาโรคต้อหินจึงมุ่งเน้นที่จะทำการยับยั้งแอคทิวิตี้ hCAII บริเวณ ciliary body เพื่อลดระดับความดันภายในลูกตา ทำให้เส้นประสาทตาไม่ถูกทำลายไปมากกว่าเดิม (Scozzafava และ Supuran, 2014) ปัจจุบันพบว่ายาที่ใช้รักษาโรคต้อหินเป็นสารในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ซึ่งมีผลข้างเคียงกับผู้ป่วยค่อนข้างสูงเนื่องจากความไม่จำเพาะเจาะจงของยาในการยับยั้งเอนไซม์ CA ไอโซไซม์อื่นๆ และในผู้ป่วยบางรายมีอาการแพ้ยาในกลุ่มซัลฟาอีกด้วย (Epstein และ Grant, 1977)



ภาพที่ 1.2 โครงสร้างภายในลูกตาและการเกิดโรคต้อหิน

ที่มา: Schmidl และคณะ (2015)

จากผลข้างเคียงในผู้ป่วยที่ใช้ยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ทำให้มีความพยายามค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์CA ชนิดใหม่ที่มีความปลอดภัยต่อผู้ป่วยที่แพ้หรือมีการแสดงอาการข้างเคียงของยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการปรับปรุงโครงสร้างสารทดสอบรวมถึงการค้นหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ

ในการยับยั้งแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ hCAII ในหลอดทดลอง (*in vitro assay*) อย่างไรก็ตามการค้นหาสารทดสอบใน *in vitro* มีข้อเสียหลายประการ อาทิเช่น ไม่สามารถรับรู้ความสามารถของสารทดสอบ (ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ ความเป็นพิษต่อเวลล์ เป็นต้น) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเป็นส่วนหนึ่งที่สนับสนุนโครงการวิจัยเพื่อการค้นหาสารทดสอบใน *in vivo* assay (Scozzafava and Supuran, 2014)

โดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวและเป็นยูคาริโอต ที่ถูกนำมาใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ หรือโมเดลต้นแบบในการหาองค์ความรู้ทางกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญๆของมนุษย์ เนื่องจากยีสต์มีวงจรชีวิตที่เป็น haploid ที่เมื่อเกิดกลายพันธุ์สามารถแสดงออกลักษณะทางฟีโนไทป์ออกมาได้โดยตรง นอกจากนี้ยีสต์ยังเลี้ยงง่ายและมีการเพิ่มจำนวนที่รวดเร็ว มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนประมาน 90 นาทีต่อหนึ่งรุ่น และนอกจากนี้ยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่ทราบทั้งจีโนม จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการในการดัดแปลงพันธุกรรมได้ง่าย และมีความสามารถในการแสดงออกของโปรตีน จีโนมที่มีส่วนที่อนุรักษ์หรือมีความใกล้เคียงกับมนุษย์ที่สูง จึงถูกนำมาใช้ในการผลิตสารที่มีมูลค่าสูงหรือวัคซีนที่มีการใช้งานกับมนุษย์ (Gomes และคณะ, 2018) ในปี 1999, Gotz และคณะ แสดงให้เห็นว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ที่บกพร่องที่ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ CA (Δ*nce103*) ไม่สามารถเจริญในภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ (0.035%) แต่เจริญได้ในภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง (5%) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ CA จากถั่วอัลฟาฟ่าและจากมนุษย์ (hCAII) สามารถทดแทนการแสดงออกของเอนไซม์ CA ของยีสต์ได้ โดยสามารถที่จะทำให้ยีสต์สายพันธุ์ Δ*nce103* เจริญได้ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของการติดอิพิโทปที่ปลายด้าน *N-* ของเอนไซม์ hCAII (*N-his-hCAII*) ว่ายังสามารถมีการทำงานของเอนไซม์ได้ปกติหรือไม่ ในยีสต์ที่ขาดยีน *NCE103* (Δ*nce103*)

โดยมีขั้นตอนในการศึกษาดังนี้

1. สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสเอนไซม์ hCAII ที่มี His อิพิโทปติดอยู่ที่ปลายด้าน *N-* (*N-his-hCAII*)
2. สร้างยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ได้รับพลาสมิดจากข้อ 1
3. ศึกษาการทำหน้าที่ทดแทนของเอนไซม์ hCAII (*N-his-hCAII*) ในพลาสมิดที่ถูกสร้างขึ้นจากข้อ 1 ในยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ขาดยีน CA (Δ*nce103*)

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 วัสดุอุปกรณ์

รายชื่อ	บริษัท
ตู้อบฆ่าเชื้อชนิดความร้อนแห้ง (Hot air oven)	Memmert, Germany
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Hirayama, Japan
ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator)	Memmert, Germany
ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Incubator)	Forma Scientific, USA
เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลุมความร้อนแบบดิจิตอล (Heating Block)	Labnet, USA
ตู้ชีวนิรภัย (Laminar flow)	Lab Service, Thailand
ไมโครปิเปต (Micropipate)	Gilsor, France
เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)	Scientific Industries, USA
เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge)	Denvelle, Germany
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert, Germanny
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo, Switzerland
ชุดเครื่องมือทำเจลอะกาโรสอิเลคโตรฟอเรซิส (agarose gel electrophoresis)	Mupid ex, Japan
เครื่องถ่ายภาพเจลอิเลคโตรฟอเรซิส (Gel documentation)	Bio Rad, USA
เครื่องไมโครเวฟ (Microwave oven)	Samsung, Korea
ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Deep freezer)	Forma scientific, USA

ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Deep freezer)	SANYO Electric, Japan
ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Refrigerator)	Mitsubishi, Japan
หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (Cryotube)	Corning Incorporation, USA
เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle)	Bio Rad, USA
พาราฟิล์ม (Paraflim)	Paraflim M, USA
หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)	Corning Incorporation, USA
หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microcentrifuge tube)	Quality Services plastic, USA
เครื่องชั่งหยาบ	Mettler-Toledo, USA
เครื่องชั่งละเอียด	Mettler-Toledo, USA
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)	Pyrex, USA
กระบอกตวง (Cylinder)	Vitlab, Germany
บีกเกอร์ (Beaker)	Pyrex, USA

2.1.2 เคมีภัณฑ์

รายชื่อ	บริษัท
Glucose	Difco Laboratories, USA
Agarose gel	Prondisa, Spain
Lithium acetate	Carlo ERBA,France
Sodium hydroxide (NaOH)	E Merck, Germany
Glacial acetic acid (CH_3COOH)	E Merck, Germany
Glycerol	Carlo ERBA, France
Phenol	Merck, Germany
Yeast nitrogen base without amino acids	Difco Laboratories, USA
Amino Acids or Nucleotides	Sigma, USA
- Adenine	
- Leucine	
- Histidine	
- tryptophan	
Potassium acetate	Sigma, USA
Magnesium sulfate	Sigma, USA
Tris [hydroxymethyl] aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)	Sigma, USA
EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$)	Sigma, USA
Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Germany
Ribonuclease	Sigma, USA
KOD-plus-Neo	Toyobo, Japan

dNTP	Fermentus, Canada
Sodium dodesyl sulfate (SDS)	Sigma, USA
Restriction enzymes	Fermentus, Canada
1 kb DNA ladder	Fermentus, USA
Chloroform	Lab-scan, Thailand
Rapid DNA ligation kit	Fermentus, USA
GF-1 AmbiClean kit	Vivantis, Malaysia
GF-1 Bacterial DNA extraction kit	Vivantis, Malaysia
Anaeropack-MicroAero	MGC, USA

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ พลาสมิด และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	จีโนไทป์	ยีนคัดเลือก	แหล่งที่มา
Escherichia coli	DH5α	F-endA1 hsdR17 (r – K/m – K) supE44 thi-1 λ-recA1 gyrA96 Δ lacU169 (ϕ80lacZΔM15)	*Amp*^{r}	Thermo Fisher Scientific, USA
Saccharomyces cerevisiae	AS01	*MATa ade2-1 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 nce103::loxP*	*URA3*	อัญญาพร แสงแก้ว ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิด	จีโนไทป์	แหล่งที่มา
pGEM T-Easy	*Amp*^{r} *lacZ*	Promega, USA
pYES2	*Amp*^{r} *URA3*	Invitrogen, USA
pRS316	*Amp*^{r}*URA3 CEN6*	Yeast Genetic Resources Center, Japan

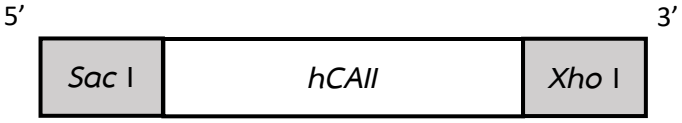
ตารางที่ 2.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทป์	หมายเหตุ
SacI_hCAII	5’-CGA GCT CGA TGT CCC ATC ACT GGG GG-3’	Macrogen, UK
XhoI_hCAII	5’-CCG CTC GAG CGG TTA GAA GGA AGC TTT GAT TTG C-3’	Macrogen, UK
3R-GAL1p (Fw)	5’-CGG GAT CCG TCT AGA TGC GGC CGC TAA CGG ATT AGA ACC CGC CG-3’	Macrogen, UK
CYC1-ter (Rv)	5’-TTT TCC TTT TGC GGC CGC TTT TTT CCT TGC AAA TTA AAG CCT TCG AGC G-3’	Macrogen, UK

2.3 การสร้างพลาสมิดที่บรรจุยีน *hCAII* ใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

2.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hCAII* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

ทำการเพิ่มจำนวนยีน *hCAII* โดยมีพลาสมิด pRS414 (*GAL1.4_hCAII*) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้รับมาจากการศึกษาของ Sangkaew และคณะ (2018) ด้วยไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบในการทดลองนี้ คือ SacI_hCAII และ XhoI_hCAII (ตารางที่ 2.3) เพื่อให้ได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บรรจุยีน *hCAII* ที่มีส่วนของ Restriction enzyme *Sac* I และ *Xho* I ที่บริเวณปลาย 5’ และ 3’ ตามลำดับ (ภาพที่ 2.1) โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาและภาวะดังตารางที่ 2.4 และ 2.5



ภาพที่ 2.1 แผนภาพแสดงผลิตภัณฑ์จาก PCR เมื่อใช้คู่ไพร์เมอร์จำเพาะ SacI_hCAII และ XhoI_hCAII

ตารางที่ 2.4 แสดงสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Deionized distilled water	-	32
10X Buffer for KOD Plus	10 เท่า	5
dNTP	2 มิลลิโมลาร์	5
MgSO4	25 มิลลิโมลาร์	3
SacI_hCAII	10 มิลลิโมลาร์	1.5
XhoI_hCAII	10 มิลลิโมลาร์	1.5
DNA template	1 และ 2 เท่า	0.5 และ 1
KOD	1 ยูนิต/ไมโครลิตร	1
ปริมาตรสุทธิ	-	50

ตารางที่ 2.5 แสดงภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา
Pre-Denaturation	95	3 นาที
Denaturation	95	30 วินาที
Annealing/Extension	72	1 นาที
Extension	72	10 นาที
Storage	25	∞

35 cycle

ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำการเตรียมโดยหลอมเจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ 0.5x TAE (ภาคผนวก ก) และเทลงในแม่พิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ โดยต้องหลอมเจลให้สมบูรณ์ รวมทั้งไม่ให้มีฟองอากาศและสิ่งแปลกปลอมเจอปนทั้งภายในหรือผิวหน้าของเจล ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาทีแล้วนำเจลอะกาโรสใส่ลงในเครื่องอิเลคโทรฟอเรซิส Mupid (Advance, Japan) พร้อมทั้งเทบัฟเฟอร์ 0.5x TAE ให้สูงกว่าเจลอะกาโรส ทำการโหลดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับสีติดตามที่มีเข้มข้น 6 เท่า ให้สุดท้ายมีความเข้มข้น 1 เท่า และหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) ลงไปเพื่อทำการเปรียบเทียบ ทำการตั้งค่าให้มีความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45-60 นาที จากนั้นทำการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลาประมาณ 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One Version 4.4.1 (Bio-Rad, USA)

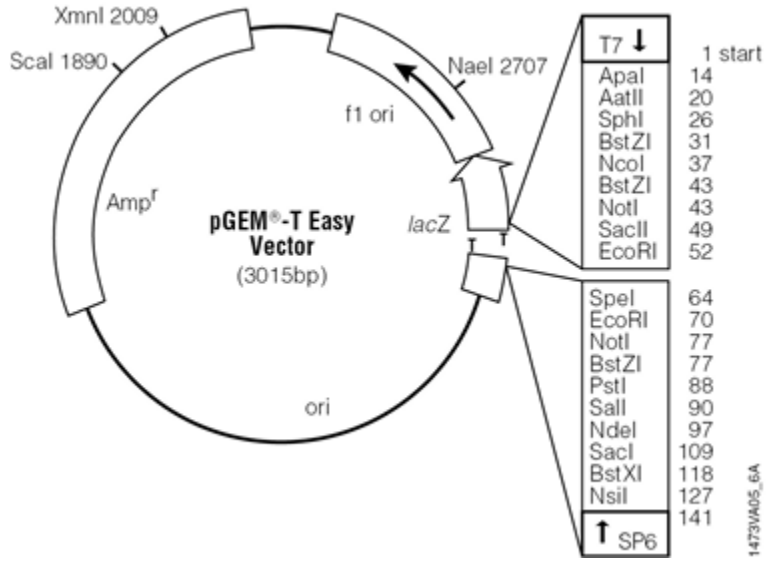
2.3.2 การทำผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

ทำการสกัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 2.3.1 ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ GF-1 AmbiClean kit (Vivantis, Malaysia) โดยเริ่มจากการตัดชิ้นเจลอะกาโรสที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการแล้วทำการจดบันทึกน้ำหนักของเจลอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นทำการเติมบัฟเฟอร์ DB ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจลอะกาโรสที่ตัดออกมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสด้วย Heat Box หรือ Water Bath จนเจลอะกาโรสละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน

column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทำการเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการเติมสารละลาย Wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทำการเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการปั่นให้แห้งที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการย้าย column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุที่ปราศจากเชื้อ (Sterile DDI water) หรือ Elution buffer ปริมาตร 30-200 ไมโครลิตร บริเวณแผ่นกรองของ column และตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที

2.3.3 ทำการไลเกชั่นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บรรจุยีน *hCAII* ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่สกัดให้บริสุทธิ์เข้าสู่โคลนนิ่งเวกเตอร์

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป มาทำการไลเกชั่นเข้าสู่โคลนนิ่งเวกเตอร์ pGEM T-Easy (Promega, USA) (ภาพที่ 2.2) ซึ่งต้องมีการเติม dATP กับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้มาจากการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.6 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงทำการไลเกชั่นกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.7 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน



ภาพที่ 2.2 แผนภาพแสดงพลาสมิด pGEM T- Easy โคลนนิ่งเวกเตอร์ (Promega, USA)

ที่มา: Promega Corporation (www.promega.com)

ตารางที่ 2.6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาในการเติม dATP ก่อนการทำไลเกชั่นกับ pGEM T- Easy โคลนนิ่งเวกเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Deionized distilled water	-	5.3
10x Thermopol buffer	10 เท่า	1
DNA	130 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2.2
dATP	2 มิลลิโมลาร์	1
Taq polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.5
ปริมาตรสุทธิ	-	10

ตารางที่ 2.7 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาไลเกชั่นเข้าสู่ pGEM T- Easy โคลนนิ่งเวกเตอร์

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
		อัตราส่วน Insert:Vector (3:1)	อัตราส่วน Insert:Vector (6:1)
Deionized distilled water	-	1.5	-
2X Rapid ligation buffer	2 เท่า	5	5
pGEM T- Easy	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	1	1
DNA	130 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	1.5	3
T4 DNA ligase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	1	1
ปริมาตรสุทธิ	-	10	10

2.3.4 การทรานสฟอร์เมชั่นพลาสมิด pGEM (*hCAII*) เข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α และการยืนยันผลการทรานสฟอร์เมชั่น

การทำทรานสฟอร์เมชั่นเพื่อนำพลาสมิดที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ Heat shock method (Froger และ Hall, 2007) โดยนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาแช่ในน้ำแข็งและนำพลาสมิดใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 1-5 ไมโครลิตร พร้อมทั้งปิเปตผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว แล้วทำการบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีคอมพีเทนต์เซลล์และพลาสมิดทำการฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไปบ่มบนน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Luria Bertani (LB) ปริมาตร 800 ไมโครลิตรลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วทำการบ่มที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดอาหารเหลวออก 700 ไมโครลิตร แล้วทำการ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการขีดเชื้อที่เจริญลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ X-Gal ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำการคัดเลือกโคโลนีด้วยวิธี Blue-White Selection และยืนยันผลด้วยการทำ colony cracking

การทำ colony cracking (Barnes, 1977) เพื่อยืนยันผลเบื้องต้นของการทรานสฟอร์เมชั่นเริ่มจากการเขี่ยโคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์เมชั่นใส่ลงใน cracking buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตรและใส่สีติดตามปริมาตร 4 ไมโครลิตร จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลโดยการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสอิเลคโตรฟอเรซิส

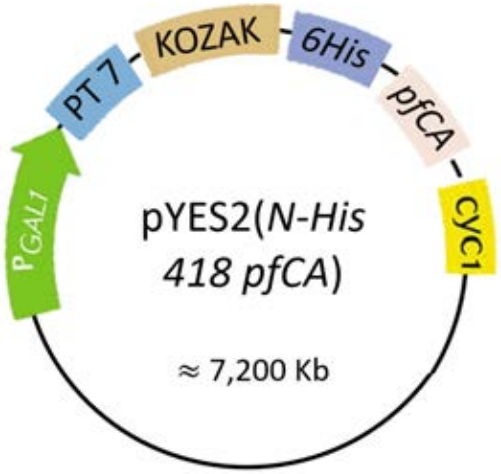
2.3.5 ทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM (*hCAII*)

ทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์พลาสมิด pGEM (hCAII) จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5**α** จากขั้นตอนที่ 2.3.4 ด้วยวิธี Alkaline lysis (Ehrt และ Schnappinger, 2003) เริ่มจากการนำ *E. coli* ทรานสฟอร์แมนท์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน บ่มที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งและซับให้แห้งบนกระดาษให้เหลือแต่ตะกอนของ *E. coli* และใส่สารละลาย Lysis Solution I ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พร้อมบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที และเติมสารละลาย Lysis Solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยกลับหลอดผสมให้เข้ากัน 5-6 ครั้ง พร้อมบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Lysis Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร กลับหลอดผสมให้เข้ากัน 5-6 ครั้ง บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดแยกส่วนใสออกจากตะกอนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ จากนั้นทำการเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พร้อมกลับหลอดผสมให้เข้ากัน 5-6 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนลงสู่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ จากนั้นทำการเติม Absolute ethanol เย็นปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่ดูดมาได้พร้อมพลิกหลอดไปมาผสมให้เข้ากันและบ่มที่ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและซับให้แห้งบนกระดาษ จากนั้นเติม 70% Ethanol เย็นปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งและซับให้แห้งบนกระดาษ จากนั้นทำพลาสมิดดีเอ็นเอให้แห้งการตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการละลายดีเอ็นเอลงในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ หรือ TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.6 การตรวจสอบเพื่อยืนยันผลความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pGEM (*hCAII*) ที่สกัดให้บริสุทธิ์จากขั้นตอนที่ 2.3.5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบยืนยันความถูกต้อง พร้อมทั้งตัดพลาสมิด pYES2 (N-His 418 pfCA) สำหรับทำการไลเกชั่นในขั้นตอนที่ 2.3.7 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Xho* I และ *Sac* I ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.8 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ด้วย

เจลอิเลคโตฟอเรซิสตามขั้นตอนที่ 2.3.1 และสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจลอิเลคโตฟอเรซิสตามขั้นตอนที่ 2.3.2



ภาพที่ 2.3 แผนภาพแสดงพลาสมิด pYES2 (*N-His 418 pfCA*)

ตารางที่ 2.8 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะของ Insert และ Vector

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
		pGEM (*hCAII*)	pYES2
Deionized distilled water	-	33	38
10x Cutsmart buffer	10 เท่า	5	5
DNA	-	10	5
Xho I	10 ยูนิต/ไมโครลิตร	1	1
Sac I	10 ยูนิต/ไมโครลิตร	1	1
ปริมาตรสุทธิ	-	50	50

2.3.7 สร้างพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) และทรานสฟอร์เมชั่นเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

ทำการไลเกชั่นโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* ขนาดประมาณ 800 คู่เบส เข้าสู่เวกเตอร์ pYES2 (*N-his*) ขนาดประมาณ 6,000 คู่เบส ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและทำให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนที่ 2.3.6 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาไลเกชั่นดังตารางที่ 2.9 และบ่มที่ 16 องศาเซลเซียสข้ามคืน

ตารางที่ 2.9 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาไลเกชั่นเพื่อสร้างพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Deionized distilled water	-	10.6
10X Buffer T4 ligase	10 เท่า	2
Vector	16 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
Insert	6 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	4.4
Ligase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	1
ปริมาตรสุทธิ	-	20

และทำการทรานสฟอร์เมชั่นพลาสมิดที่ได้จากการไลเกชั่นเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α นำโคโลนีที่เจริญจากการทรานสฟอร์เมชั่นมาทำ colony cracking เพื่อตรวจสอบผลการทรานสฟอร์เมชั่นเบื้องต้นดังขั้นตอนที่ 2.3.4 ซึ่งทำการขีด *E. coli* ทรานสฟอร์แมทท์ที่เจริญลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน

2.3.8 ตรวจสอบเพื่อยืนยันผลความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการใส่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วทำการสกัดตามขั้นตอนที่ 2.3.5 จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดให้บริสุทธิ์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจสอบยืนยันความถูกต้อง

ด้วยเอนไซม์ *Xho* I และ *Sac* I ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.10 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตโฟเรซิสตามขั้นตอนที่ 2.3.1

ตารางที่ 2.10 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อยืนยันผลการสร้างพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Deionized distilled water	-	24.6
10x Cutsmart buffer	10 เท่า	3
DNA	2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
Xho I	10 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.2
Sac I	10 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.2
ปริมาตรสุทธิ	-	30

2.3.9 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* โดยวิธีการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) ที่สกัดให้บริสุทธิ์จากขั้นตอนที่ 2.3.8 มาทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพร์เมอร์จำเพาะ 3R-GAL1p (Fw) และCYC1-ter (Rv) โดยมีส่วนผลมของสารละลายและภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังตารางที่ 2.11 และ 2.12 โดยการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยการวิเคราะห์เจลอีเลคโทรฟอเรซิสตามขั้นตอนที่ 2.3.1 และสกัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเจลอิเลคโทโฟเลซิส ตามขั้นตอนที่ 2.3.1 และ 2.3.2

ตารางที่ 2.11 แสดงสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Deionized distilled water	-	32.5
10X buffer	10 เท่า	5
dNTP	2 มิลลิโมลาร์	5
MgSO4	25 มิลลิโมลาร์	3
3R-GAL1p (Fw)	10 มิลลิโมลาร์	1.5
CYC1-ter (Rv)	10 มิลลิโมลาร์	1.5
DNA Template	2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	0.5
KOD	1 ยูนิต/ไมโครลิตร	1
ปริมาตรสุทธิ	-	50

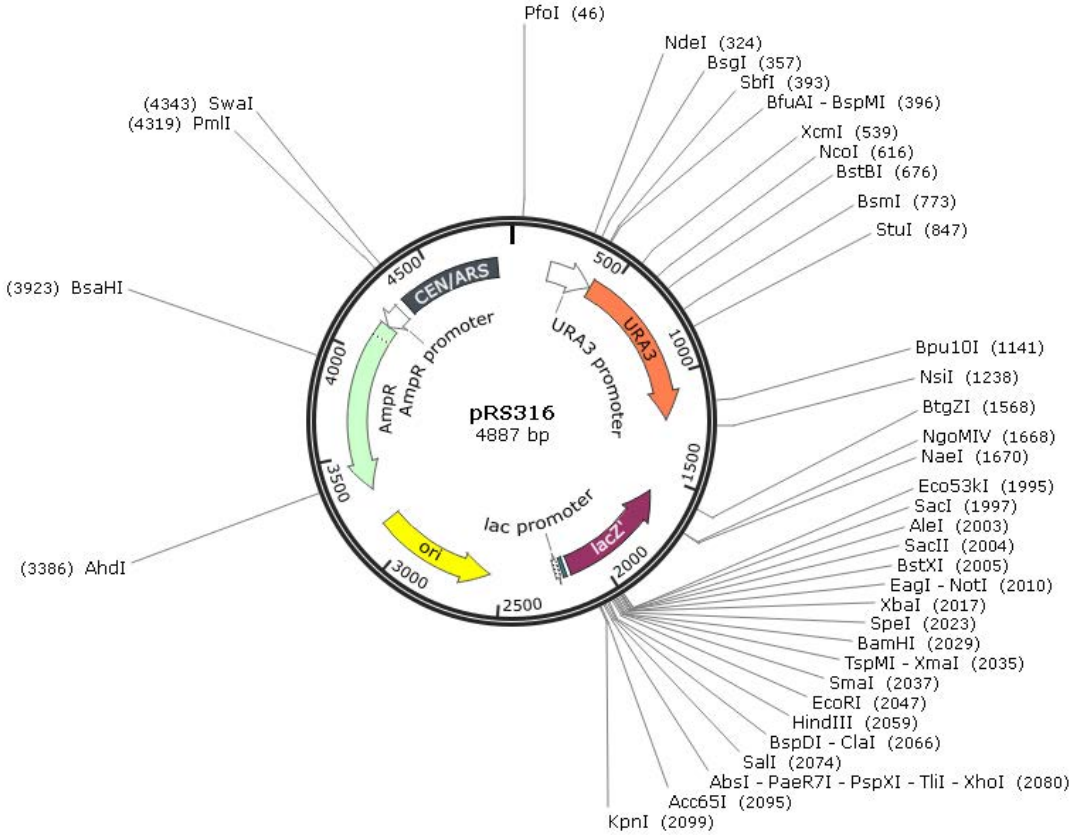
ตารางที่ 2.12 แสดงภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา
Pre-Denaturation	95	3 นาที
Denaturation	95	30 วินาที
Annealing/Extension	72	3 นาที
Extension	72	10 นาที
Storage	25	∞

35 cycle

2.3.10 การสร้างพลาสมิด pRS316(*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*)

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป และเวกเตอร์ pRS316 (ภาพที่ 2.3) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.13 จากนั้นนำ pRS316 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I มาทำ Dephosphorylation เพื่อป้องกันการเกิดเซลฟ์ไลเกชั่น (Self ligation) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา Dephosphorylation ดังตารางที่ 2.14 และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อหยุดยั้งปฏิกิริยา จากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็คโตฟอเรซิสตามขั้นตอน 2.3.1 และสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1,700 คู่เบส และ 4,800 คู่เบส ของ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* และ pRS316 ตามลำดับ ออกจากอะกาโรสเจลตามข้อ 2.3.2 และทำการไลเกชั้นกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.15 แล้วนำไปบ่มที่ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน



ภาพที่ 2.4 แผนภาพแสดงพลาสมิด pRS316

ที่มา : www.addgene.org

ตารางที่ 2.13 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
		Insert	Vector
Deionized distilled water	-	31	41
10x Cutsmart buffer	10 เท่า	5	5
DNA	2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	13	3
Not I	10 ยูนิต/ไมโครลิตร	1	1
ปริมาตรสุทธิ	-	50	50

ตารางที่ 2.14 แสดงสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา Dephosphorylation

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Deionized distilled water	-	3
10x Antarctic buffer	10 เท่า	6
pRS316	2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	50
Antarctic phosphatase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	1
ปริมาตรสุทธิ	-	60

ตารางที่ 2.15 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาไลเกชั่นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII - CYC1t* เข้าสู่เวกเตอร์ pRS316

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Deionized distilled water	-	12
10X Buffer T4 Ligase	10 เท่า	2
Vector	9 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	3
Insert	30 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
Ligase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	1
ปริมาตรสุทธิ	-	20

2.3.11 การเพิ่มปริมาณพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

ทำการทรานสฟอร์เมชั่นพลาสมิดที่ได้จากการไลเกชั่นเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) โดยการทรานสฟอร์เมชั่นและทำ colony cracking เพื่อตรวจสอบผลการทรานสฟอร์เมชั่นเบื้องต้นดังขั้นตอนที่ 2.3.4 ทำการขีดโคโลนีที่เจริญลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และทำการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เพื่อสกัดพลาสมิดตามขั้นตอนที่ 2.3.5 จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้บริสุทธิ์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบยืนยันความถูกต้องด้วยเอนไซม์ *Not* I ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.16 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตฟอเรซิสตามขั้นตอนที่ 2.3.1

ตารางที่ 2.16 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Deionized distilled water	-	24.8
10x Cutsmart buffer	10 เท่า	3
DNA	50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	2
Not I	10 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.2
ปริมาตรสุทธิ	-	30

2.3.12 การทรานสฟอร์เมชั่นพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) เข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AS01

นำพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) จากข้อ 2.3.9 เข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ AS01 (ได้รับมาจากนางสาว อัญญพร แสงแก้ว นิสิตระดับปริญญาเอก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ด้วยวิธีการ Lithium acetate (Gietz และ Woods, 2006) โดยทำการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ AS01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร YPD ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยเป็น 5x 10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่ม

ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จนมีความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยเป็น 2x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ และทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำการแยกเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 0.1 โมลาร์ Lithium acetate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และย้ายเข้าสู่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 โมลาร์ Lithium acetate ปริมาตร 400 ไมโครมิลลิลิตร โดยระหว่างปั่นแยกตะกอนเซลล์ทำการบ่ม carrier DNA ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นบนน้ำแข็งทันที ถ่ายเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ และทำการปั่นหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ และนำสารละลาย Lithium acetate ทิ้งไป ทำการละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย 50% w/v PEG (MW 3,350) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร, 1 โมลาร์ Lithium acetate ปริมาตร 36 ไมโครลิตร และ carrier DNA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และพลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการนำเข้าสู่ยีสต์เซลล์เจ้าบ้าน 5 ไมโครกรัม 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ และผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-25 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 6,000-8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที และนำส่วนใสออก ละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ 0.2-1.0 ไมโครลิตร และนำมาเกลี่ยบนอาหาร synthetic dextrose (SD) medium ที่ไม่เติมนิวคลีโอไทด์ยูราซิล หรือ SD-Ura จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง (5%) โดยใช้ Anaeropack-MicroAero (MGC, USA) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการขีดโคโลนีลงบนอาหาร synthetic raffinose (SR) medium หรือ selective medium ที่ไม่เติมยูราซิล หรือSR-Ura

2.3.13 การศึกษาการทดแทนการทำหน้าที่ของยีน *NCE103* ของยีสต์ ด้วยยีน *N-His-hCAII* ในยีสต์ที่ขาดยีน *NCE103*

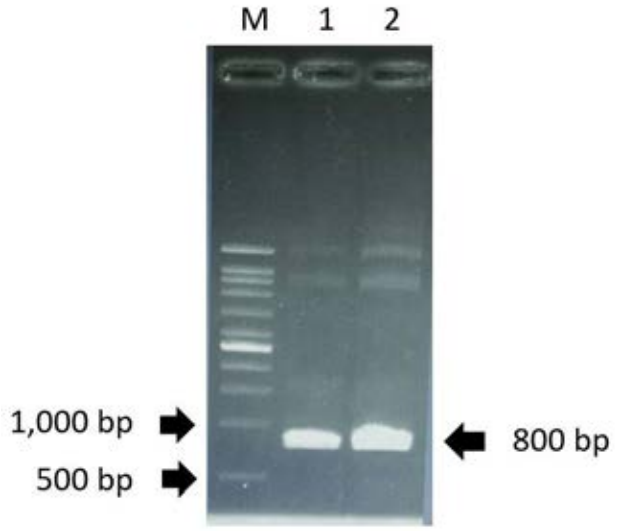
ใส่ยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SR-Ura ในขั้นตอนที่ 2.3.12 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SR-Ura ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 10^6-10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และทำการหยดแต่ละความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ที่เจือจางปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง synthetic galactose (SG) medium ที่ไม่เติมยูราซิล หรือ SG-Ura และทำการบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ (0.035%) และสูง (5%) ตามลำดับ เป็นเวลา 3 วัน

บทที่3

ผลการทดลอง

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hCAII* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มจำนวนยีน *hCAII* โดยใช้คู่ไพร์เมอร์จำเพาะที่ทำการออกแบบในการทดลองนี้ คือ *Sac*I_hCAII และ *Xho*I_hCAII (ตารางที่ 2.3) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่บรรจุยีนประมวลรหัสเอนไซม์ hCAII ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส โดยตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซิส ทำโดยเตรียมเจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ 0.5XTAE ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส *hCAII* มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (ภาพที่ 3.1) ซึ่งเป็นไปตามที่คาดหวัง จากนั้นทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Vivantis, Malaysia)



ภาพที่ 3.1 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บรรจุยีนประมวลรหัสเอนไซม์ hCAII

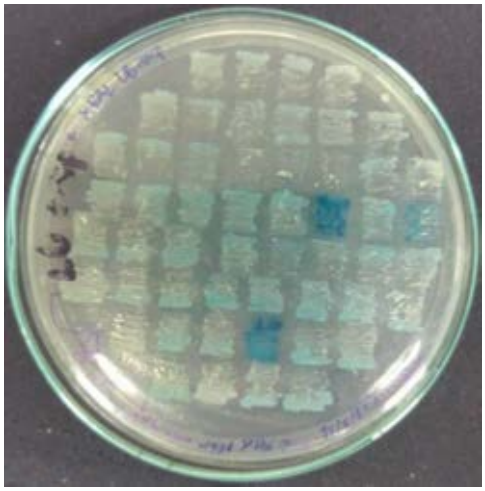
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

1 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากการใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ 0.5 ไมโครลิตร

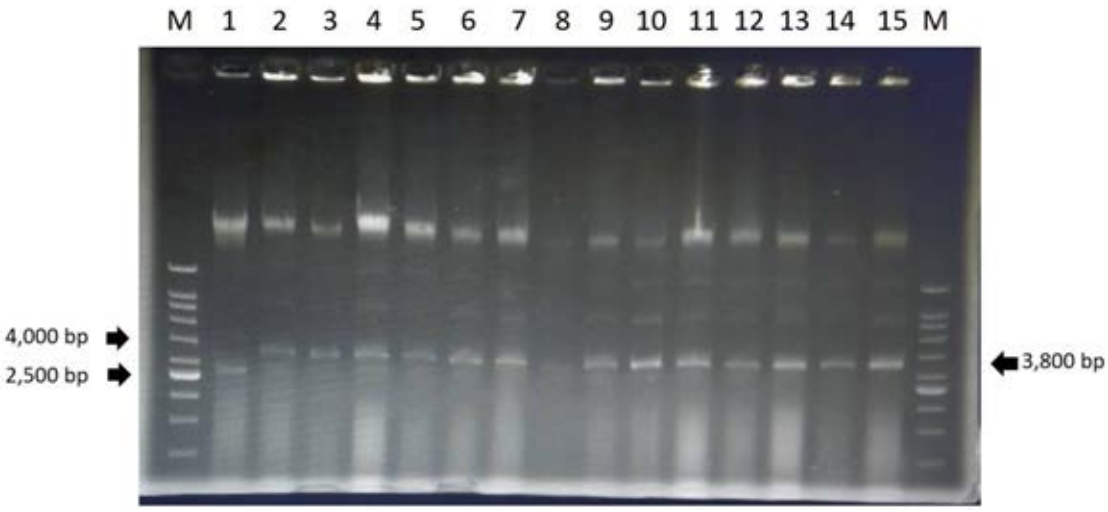
2 คือ ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากการใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ 1.0 ไมโครลิตร

3.2 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM (*hCAII*) และตรวจสอบยืนยันความถูกต้องด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปมาทำการไลเกชั่นเข้าสู่โคลนนิ่งเวกเตอร์ pGEM T-Easy (Promega, USA) เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM (*hCAII*) ซึ่งมีขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส โดยทำการทรานสฟอร์เมชั่นเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด นำ *E. coli* ทรานสฟอร์แมนท์มาคัดเลือกด้วยวิธี Blue-White Selection (ภาพที่ 3.2) โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาว เนื่องจากน่าจะมีชิ้นส่วน Insert แทรกอยู่ในส่วนของยีน *lac Z* ทำให้ยีน *lac Z* ไม่สามารถแสดงออกเอนไซม์ β-galactosidase ได้ จึงไม่เกิดการเปลี่ยน x-gal ที่เป็นสับสเตรตเป็นสีน้ำเงิน จึงทำให้ได้โคโลนีสีขาว นำโคโลนีสีขาวมาทำการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี colony cracking (ภาพที่ 3.3) ซึ่งพบว่าแถบจากการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตฟอเรซิสมีขนาดสูงกว่า control (colony cracking ของ *E. coli* ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีโคโลนีสีน้ำเงิน) ประมาณ 800 คู่เบส ทำให้คาดว่าเป็นพลาสมิด pGEM (*hCAII*) หลังจากนั้นทำการสกัดพลาสมิด และทำการยืนยันผลด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Xho* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.7 ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซิสดังภาพที่ 3.4 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 3,000 และ 800 คู่เบส ของเวกเตอร์เปล่า pGEN T-Easy และชิ้นส่วนของยีน *hCAII* ตามลำดับ โดยมีชิ้นส่วนของยีน *hCAII* ที่ได้รับจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นตัวควบคุมผลบวก



ภาพที่ 3.2 แสดงการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Insert DNA) ด้วยวิธี Blue-White Selection ของ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pGEM (*hCAII*)

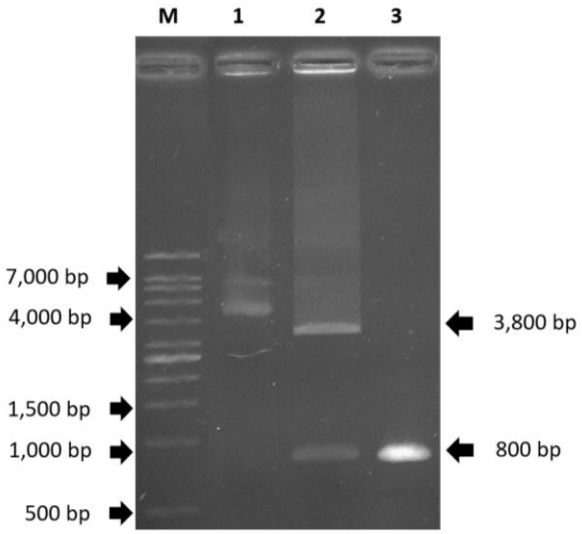


ภาพที่ 3.3 แสดงการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM (*hCAII*) เบื้องต้นโดยวิธีการ colony cracking

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

1 คือ Colony cracking ของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีโคโลนีน้ำเงิน

2-15 คือ Colony cracking ของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีโคโลนีขาว



ภาพที่ 3.4 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I ของพลาสมิด pGEM (*hCAII*)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

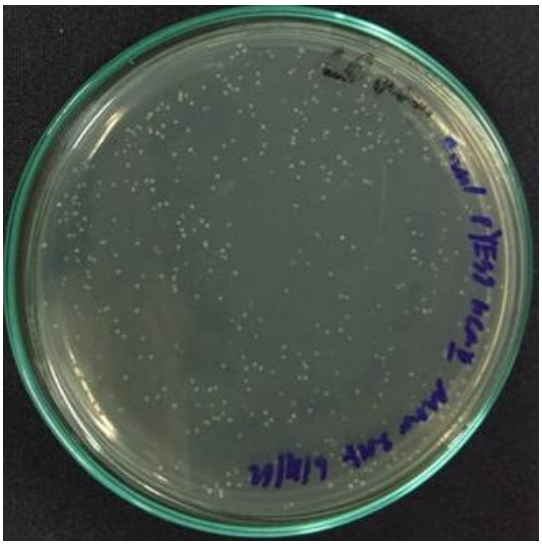
1 คือ pGEM (*hCAII*) ก่อนถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I

2 คือ pGEM (*hCAII*) หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I

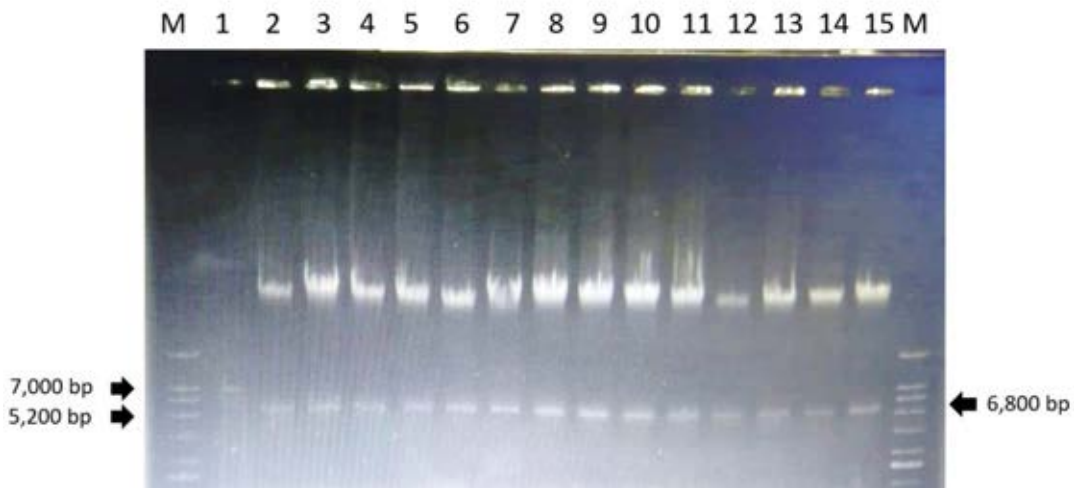
3 คือ ชิ้นส่วนยีน *hCAII* ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นชุดควบคุมผลบวก

3.3 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) และตรวจสอบยืนยันความถูกต้องด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำเวกเตอร์ pYES2 (*N-His 418 pfCA*) ขนาดประมาณ 7,200 คู่เบส (ได้รับมาจากนางสาว อัญญาพร แสงแก้ว นิสิตระดับปริญญาเอก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM (*hCAII*) มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I (ภาพที่ 3.5) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.8 จากผลการทดลองเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวข้างต้นพบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pYES (*N-His*) ขนาดประมาณ 6,000 คู่เบส และ *hCAII* ขนาดประมาณ 800 คู่เบส เพื่อทำการไลเกชั่นสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *N-His-hCAII* ที่มีส่วนโปรโมเตอร์ *GAL1p* และเทอร์มิเนเตอร์ *CYC1t* จากเวกเตอร์ pYES2 (*N-His*) หรือ pYES2 (*N-His-hCAII*) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *hCAII* ถูกไลเกตเข้าสู่เวกเตอร์ pYES (*N-His*) ในสัดส่วน 6:1 จากนั้นทำการทรานสฟอร์เมชั่นเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ดังขั้นตอนที่ 2.3.4 และนำมาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี colony cracking พบว่า *E. coli* ทรานสฟอร์แมนท์ที่เจริญบนเพลทที่ทำการไลเกชั่นสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) (ภาพที่ 3.5) มีขนาดของดีเอ็นเอต่ำกว่าขนาดของดีเอ็นเอชุดควบคุมผลบวกหรือพลาสมิด pYES2 (*N-His 418 pfCA*) ประมาณ 400 คู่เบส ดังภาพที่ 3.6 จากนั้นทำการสกัดพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) เพื่อนำมายืนยันผลด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.10 ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซิส พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 และ 6,000 คู่เบส ของชิ้นส่วนยีน *hCAII* และพลาสมิด pYES2 (*N-His*) ตามลำดับ ในขณะที่พลาสมิด pYES2 (*N-His 418 pfCA*) ซึ่งเป็นชุดควบคุมขนาดประมาณ 7,200 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 และ 6,000 คู่เบส ของชิ้นส่วนยีน *418 pfCA* และพลาสมิด pYES (*N-His*) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเป็นไปตามที่คาดหวังดัง ภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.5 ทรานสฟอร์แมนท์ของ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ที่เกิดจากการทรานสฟอร์เมชั่นด้วยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไลเกชั่นระหว่าง pYES (*N-His*) และ *hCAII*

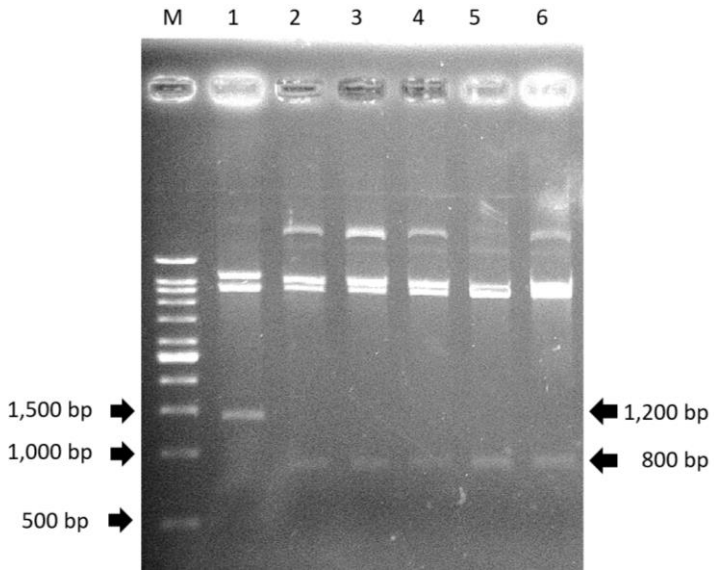


ภาพที่ 3.6 แสดงการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) เบื้องต้นโดยวิธี colony cracking

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

1 คือ พลาสมิด pYES2 (*N-His 418 pfCA*)

2-15 คือ Colony cracking ของ *E. coli* ทรานสฟอร์แมนท์ที่คาดว่าได้รับพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*)



ภาพที่ 3.7 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I ของพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*)

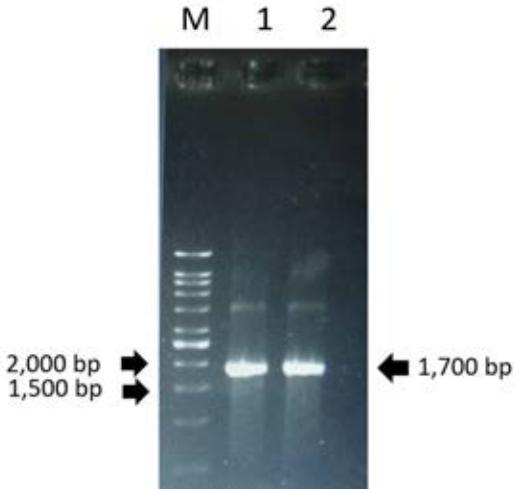
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

1 คือ พลาสมิด pYES2 (*N-His 418 pfCA*) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I

2-6 คือ ชิ้นส่วนของพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I

3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* จากพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) โดยใช้คู่ไพร์เมอร์จำเพาะ คือ 3R-GAL1p (Fw) และ CYC1-ter (Rv) (ตารางที่ 2.3) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* ที่มีขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส ทำการตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซิส พบว่าผลที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส ดังภาพที่ 3.8 และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Vivantis, Malaysia)



ภาพที่ 3.8 ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

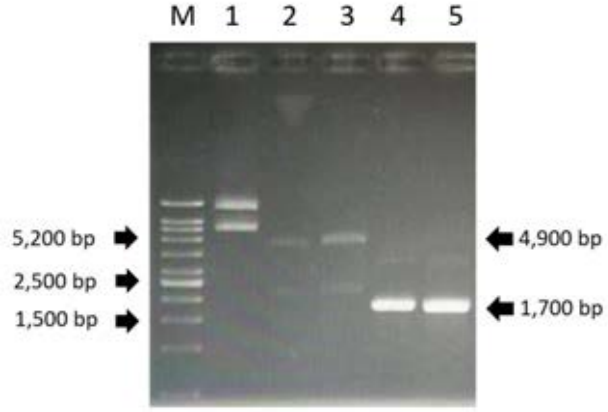
1 คือ ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่เกิดจากใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.5 ไมโครลิตร

2 คือ ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่เกิดจากใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร

3.5 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) และตรวจสอบยืนยันความถูกต้องด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำเวกเตอร์พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) และผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* ที่ถูกสกัดให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรส มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*1 เพื่อให้ได้รับดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,800 และ 1,700 คู่เบส ของ pRS316 และ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* ตามลำดับ (ภาพที่ 3.10) จากนั้นนำ pRS316 มาทำการ dephosphorylation เพื่อทำให้ไม่เกิดกระบวนการเซลฟ์ไลเกชั่น (Self ligation) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.13 และ 2.14 ตามลำดับ การวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตรโฟเล็คซิสและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล จากนั้นทำการไลเกชั่นเพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *N-His-hCAII* ที่มีส่วนโปรโมเตอร์ *GAL1p* และเทอร์มิเนเตอร์ *CYC1t* หรือพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) ซึ่งมีขนาดประมาณ 6,500 คู่เบส ทำการทรานสฟอร์เมชั่นเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5**α** พบว่าในชุดควบคุมผลลบไม่มีการเจริญของ *E. coli* ทรานสฟอร์แมนท์และเพลทของทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) มีการเจริญของ *E. coli* ทรานสฟอร์แมนท์บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ดังภาพที่ 3.10 และนำมาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี colony cracking พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับ

พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) (ภาพที่ 3.10 ข.) มีขนาดของแถบดีเอ็นเอ ต่ำกว่าขนาดของแถบดีเอ็นเอของชุดควบคุมผลบวกหรือ พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t*) ซึ่งมีขนาดประมาณ 7,000 คู่เบส ดังภาพที่ 3.11 จากนั้นคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่คาดว่าได้รับพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His -hCAII-CYC1t*) มาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรฟอเรซิส พบว่าได้ผลเป็นไปตามที่คาดหวัง (ภาพที่ 3.12) และเมื่อทำการยืนยันผลด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.16 ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซิส พบว่ามีเพียง 4 ทรานสฟอร์แมนท์จาก 5 ทรานสฟอร์แมนท์ที่ให้ขนาดประมาณ 1,700 และ 4,800 คู่เบส ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* และพลาสมิด pRS316 ตามลำดับ ในขณะที่พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t*) ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ทราบขนาดดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,100 และ 4,800 คู่เบส ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t* และ พลาสมิด pRS316 ตามลำดับ ดังภาพที่ 3.12



ภาพที่ 3.9 ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I และทำการ Dephosphorylation

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

1 คือ เวกเตอร์ pRS316 ก่อนทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

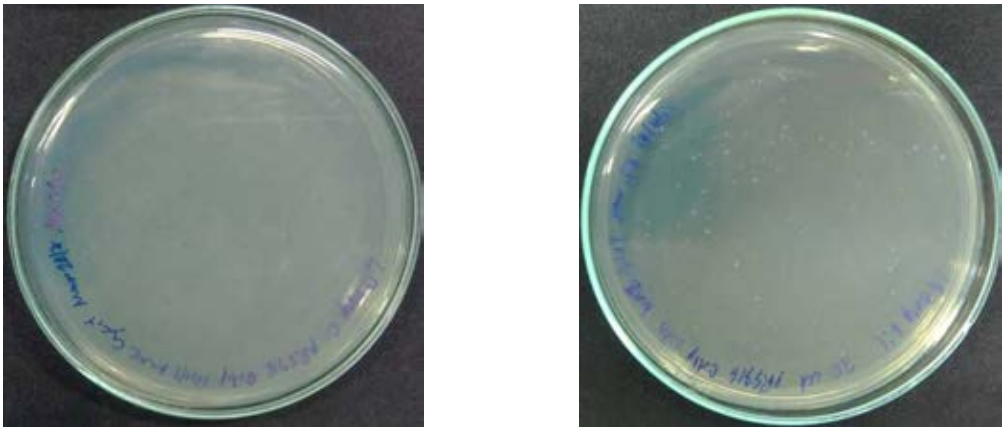
2 คือ เวกเตอร์ pRS316 หลังทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

3 คือ เวกเตอร์ pRS316 หลังทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I และ ทำปฏิกิริยา Dephosphorylation

4 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *N-His-hCAII-CYC1t* ก่อนทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

5 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *N-His-hCAII-CYC1t* หลังทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

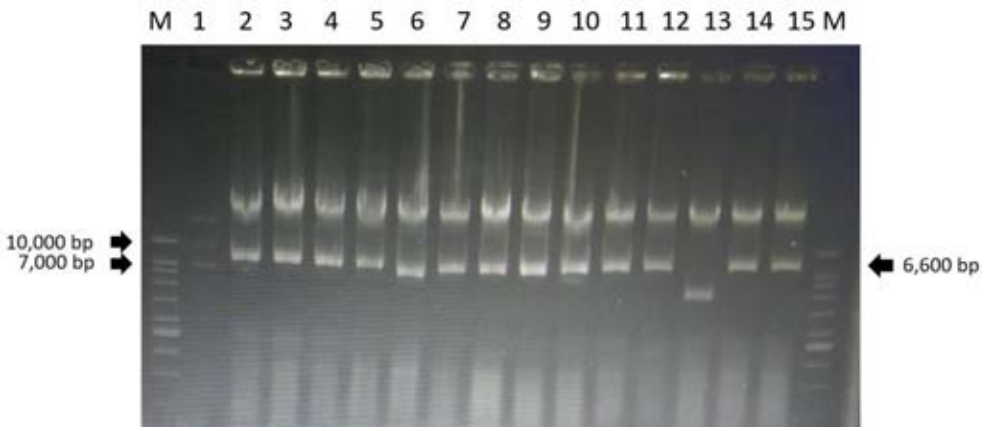
ก) ข)



ภาพที่ 3.10 ทรานสฟอร์แมนท์ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5**α** ที่ถูกทรานสฟอร์มด้วยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไลเกชั่นระหว่างที่มีพลาสมิด pRS316 และ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*

ก) ชุดควบคุมผลลบที่ไม่มีการใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* ในขั้นตอนไลเกชั่น

ข) *E. coli* สายพันธุ์ DH5**α** ที่มีการใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* ในขั้นตอนไลเกชั่น

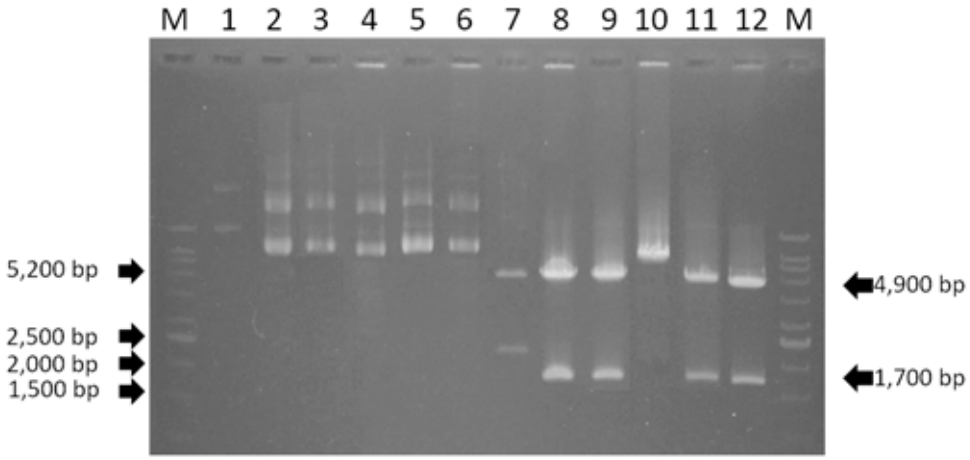


ภาพที่ 3.11 แสดงการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) เบื้องต้นโดยวิธีการ colony cracking

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

1 คือ พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t*)

2-15 คือ Colony cracking ของทรานสฟอร์แมนท์ที่คาดว่าได้รับพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His -hCAII-CYC1t*)



ภาพที่ 3.12 ผลิตภัณฑ์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I ของพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*)

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

1 คือ พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t*) ก่อนทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

2-6 คือ พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) ก่อนทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

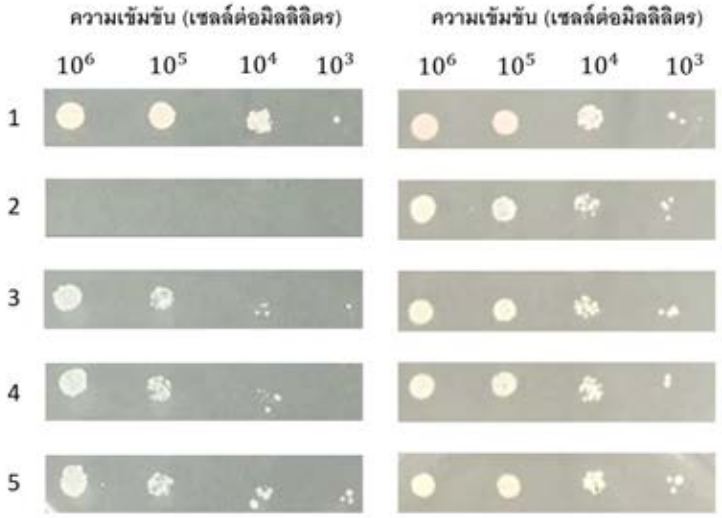
7 คือ พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t*) หลังทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

8-12 คือ พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) หลังทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I

3.6 การศึกษาการทำหน้าที่ทดแทนยีน *NCE103* ของยีสต์ ด้วย *N-His-hCAII* ในยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Δ*nce103* (AS01)

ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AS01 (Δ*nce103*) ที่ขาดยีนประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (*NCE103*) ถูกทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) ด้วยวิธี Lithium Acetate (Gietz และ Woods, 2006) จากนั้นทำการทดสอบการทำหน้าที่ทดแทนเอนไซม์ Nce103 ของยีสต์ ด้วยเอนไซม์ hCAII ที่ติด His อิพิโทปที่ปลายด้าน *N-* ในยีสต์ที่ขาดยีน *NCE103* (Δ*nce103*) โดยการเตรียมยีสต์ให้มีความเข้มข้น 10^6-10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และหยดลงบนอาหาร SG-Ura ที่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ เพื่อชักนำการแสดงออกของยีน *N-his-hCAII* ที่อยู่ภายใต้การควบคุม *GAL1* โปรโมเตอร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ภายใต้ภาวะทั้งที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ (0.035%) และคาร์บอนไดออกไซด์สูง (5%) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหาก *N-his-hCAII* สามารถทดแทนเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (*NCE103*) ได้ ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AS01 ที่ได้รับพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) จะสามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงและต่ำ ในขณะที่ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AS01 ที่ได้รับพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N His-Cyc1t*) ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลลบซึ่งไม่ได้รับยีน *hCAII* จะสามารถเจริญได้ในภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงแต่ไม่สามารถเจริญในภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ AS01 ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน *N-His-hCAII* และพลาสมิดที่มียีน *C-flag-hCAII* หรือพลาสมิด pRS414 (*GAL1.4-C-flag-hCAII*) ซึ่งได้รับมาจากนางสาวอัญญพร แสงแก้ว นิสิตระดับปริญญาเอก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถเจริญได้ในภาวะทั้งที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำและสูง แสดงให้เห็นว่าการติดอิพิโทปที่ปลายด้าน *N-* ของ *hCAII* ไม่มีผลต่อการทำงานของ *hCAII* โดยสามารถทดแทนการทำหน้าที่ของยีน *NCE103* ได้ ดังภาพที่ 3.13

ก) ข)



ภาพที่ 3.13 ลักษณะฟีโนไทป์ของยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ S. cerevisiae สายพันธุ์ AS01 (Δ*nce103*) ที่ความเข้มข้น 10^6-10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ก) ภายใต้ภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ (0.035%)

1 คือ ยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pRS414 (*GAL1.4-C-flag-hCAII*)

2 คือ ยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pRS316 (*N-His*)

3-5 คือ ยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*)

ข) ภายใต้ภาวะคาร์บอนไดออกไซด์สูง (5%)

1 คือ ยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pRS414 (*GAL1.4-C-flag-hCAII*)

2 คือ ยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pRS316 (*N-His*)

3-5 คือ ยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*)

บทที่4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายศึกษาผลของการติด His อิพิโทปที่ปลายด้าน *N-* ของ *hCAII* ต่อการทำงานของ *hCAII* ในยีสต์ ทำการสร้างยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AS01 ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) ในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ดังกล่าวมีการใช้ *E.coli* สายพันธุ์ DH5**α** เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยเริ่มที่ขั้นตอนแรก คือ ทำการเพิ่มปริมาณยีน *hCAII* ซึ่งมีขนาดประมาณ 800 คู่เบส ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซึ่งโดยมีดีเอ็นเอแม่แบบของยีน *hCAII* ที่ได้รับมาจากการศึกษาของ Sangkaew และคณะ (2018) และใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ คือ SacI_hCAII และ XhoI_hCAII ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสถูกตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซิส ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส ตามที่คาดหวัง ดังภาพที่ 3.1 จากนั้นนำมาสกัดออกจากเจลให้บริสุทธิ์ เพื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาทำการไลเกชั่นเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM T-Easy และทำการทรานสฟอร์เมชั่นเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ DH5**α** เพื่อทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิด pGEM T-Easy จากนั้นคัดเลือก *E. coli* ทรานสฟอร์แมนท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ x-gal สำหรับการคัดเลือกด้วยวิธี Blue-White Selection คัดเลือกโคโลนีสีขาว เนื่องจากมีชิ้นส่วนยีน Insert แทรกอยู่ในส่วนของยีน *lac Z* เลยทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ **β**-galactosidase ได้ จึงไม่เกิดการย่อย x-gal ทำให้ได้โคโลนีสีขาว แต่ผลที่ได้พบว่าโคโลนีที่เกิดขึ้นมีสีฟ้า ซึ่งคาดว่าเกิดจากชิ้นส่วน Insert มีขนาดเล็กเมื่อทำการแทรกอยู่ภายในยีน *lac Z* จึงอาจยังสามารถเกิดการอ่านยีนและแสดงออกของเอนไซม์ **β**-galactosidase ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sadeghi และคณะ (2017) โดยนำโคโลนีสีขาวหรือสีฟ้ามาทำการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย colony cracking และยืนยันผลการไลเกชั่นด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I จากผลการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซิส พบว่า pGEM (*hCAII*) สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I ได้ขนาดประมาณ 800 และ 3,000 คู่เบส ของยีน *hCAII* และ pGEM T-Easy ตามลำดับ ดังภาพที่ 3.4 จากนั้นทำการสกัดชิ้นส่วน *hCAII* จากเจลอะกาโรส เพื่อทำการไลเกชั่นเข้าสู่เวกเตอร์ pYES2 (*N-His*) และทรานสฟอร์เมชั่นเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5**α** เพื่อให้ได้รับพลาสมิด pYES2 (*N-His-hCAII*) ซึ่งมีขนาดประมาณ 6,800 คู่เบส ผลจากการทำวิธี colony cracking พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่คาดว่าได้รับพลาสมิดดังกล่าวมีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุมที่มีขนาดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแล้ว pYES2 (*N-His 418 pfCA*) ซึ่งผลการทดลองเป็นไปตามคาดหวัง จากนั้นสกัดพลาสมิดและยืนยันผลด้วยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Sac* I พบว่าได้แถบของชิ้นส่วนยีน *hCAII* ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส ซึ่งมีขนาดที่เล็กกว่าชิ้นส่วนยีน *418 pfCA* ที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ตามภาพที่ 3.7 เนื่องจากเวกเตอร์ pYES2 มีส่วน

ของโปรโมเตอร์ *GAL1p* ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก เมื่อมีน้ำตาลกาแลคโตสทำหน้าที่ชักนำการแสดงออก และเทอร์มิเนเตอร์ *CYC1t* เพื่อทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ คือ 3R-GAL1P (Fw) และ CYC1-ter(Rv) เมื่อทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยการวิเคราะห์ด้วยเจลเลคโตรฟอเรซิส พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาน 1,700 คู่เบสของ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t* ดังภาพที่ 3.8 หลังจากนั้นทำการสกัดออกจากเจลอะกาโรสและทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I พร้อมกับเวกเตอร์ pRS316 (*GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t*) และทำ dephosphorylate เวกเตอร์เพื่อทำให้ไม่เกิดกระบวนการเซลฟ์ไลเกชั่นของเวกเตอร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Not* I จากนั้นจึงทำการไลเกชั่นและทรานสฟอร์เมชั่นให้ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α การยืนยันเบื้องต้นด้วยการทำวิธี colony cracking พบว่าขนาดของแถบดีเอ็นเอของพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) มีขนาดต่ำกว่าขนาดแถบดีเอ็นเอของชุดควบคุมที่ทราบขนาดพลาสมิดแล้วหรือพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t*) อยู่ประมาณ 400 คู่เบส ดังภาพที่ 3.11 ทำการสกัดพลาสมิดและยืนยันผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I โดยมีชุดควบคุมผลบวกคือ พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t*) พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,700 คู่เบส ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His-hCAII-CYC1* ในขณะที่ชุดควบคุมผลที่ทราบขนาดพลาสมิดแล้วของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *GAL1p-N-His 418 pfCA-CYC1t* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,100 คู่เบส ซึ่งเป็นไปตามที่คาดหวังดังภาพที่ 3.12 จากที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ได้พลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) ซึ่งเป็น Yeast Centromeric plasmid กล่าวคือเป็นพลาสมิดที่มีความเสถียร เนื่องจากส่วนของ centromere และมีจำนวน 1-2 copyต่อเซลล์ เท่านั้น ทำให้ยีสต์ที่ถูกทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดดังกล่าวมีจำนวนชุดของยีนที่เหมือนยีสต์ปกติ (Gnügge และ Rudolf, 2017) นำพลาสมิดดังกล่าวมาทำการทรานสฟอร์เมชั่นด้วยวิธี Lithium acetate เพื่อนำเข้าสูยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AS01 ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ยูราซิล ยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่เติมนิวคลีโอไทด์ยูราซิล ถูกนำมาศึกษาความสามารถในการเจริญในภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงและต่ำตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pRS316 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกในภาวะทั้งที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำและสูง แสดงให้เห็นว่าการติด His อิพิโทปที่ปลายด้าน *N-* ของ *hCAII* ไม่มีผลต่อการทำงานของ *hCAII* ผลต่อยอดของการทดลองนี้สามารถนำไปสู่การทำให้บริสุทธิ์ของ *hCAII* ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ AS01 (*GAL1p-N-His-hCAII-CYC1t*) ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Aggarwal, M., Boone, C. D., Kondeti, B., and McKenna, R. (2013). Structural annotation of human carbonic anhydrases. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *28*(2), 267-277.

Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., and De Simone, G. (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. *Chemical reviews*, *112*(8), 4421-4468.

Arabaci, B., Gulcin, I., and Alwasel, S. (2014). Capsaicin: a potent inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Molecules*, *19*(7), 10103-10114.

Barnes, W. M. (1977). Plasmid detection and sizing in single colony lysates. Science, 195(4276), 393-394.

Casali, N., and Preston, A. (Eds.). (2003). *E. coli plasmid vectors: methods and applications* (Vol. 235). Springer Science & Business Media. New Jersey. USA.

Clark, D., Rowlett, R. S., Coleman, J. R., and Klessig, D. F. (2004). Complementation of the yeast deletion mutant DeltaNCE103 by members of the beta class of carbonic anhydrases is dependent on carbonic anhydrase activity rather than on antioxidant activity. *Biochemical Journal*, *379*(3), 609-615.

Cooper, G. M., Hausman, R. E., and Hausman, R. E. (2000). *The cell: a molecular approach* (Vol. 10). American Society for Microbiology. Washington. USA.

De Simone, G., Di Fiore, A., Capasso, C., and Supuran, C. T. (2015). The zinc coordination pattern in the η-carbonic anhydrase from Plasmodium falciparum is different from all other carbonic anhydrase genetic families. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 25(7), 1385-1389.

Del Prete, S., Vullo, D., Fisher, G. M., Andrews, K. T., Poulsen, S. A., Capasso, C., and Supuran, C. T. (2014). Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen Plasmodium falciparum—The η-carbonic anhydrases. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *24*(18), 4389-4396.

Ehrt, S., and Schnappinger, D. (2003). Isolation of plasmids from E. coli by alkaline lysis. In E. coli Plasmid Vectors. Humana Press. 75-78.

Epstein, D. L., and Grant, W. M. (1977). Carbonic anhydrase inhibitor side effects: serum chemical analysis. *Archives of Ophthalmology*, *95*(8), 1378-1382.

Froger, A., and Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (6), e253.

Gnügge, R., and Rudolf, F. (2017). Saccharomyces cerevisiae Shuttle vectors. Yeast, 34(5), 205-221.

Götz, R., Gnann, A., and Zimmermann, F. K. (1999). Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast Saccharomyces cerevisiae causes an oxygen-sensitive growth defect. Yeast, 15(10A), 855-864.

Karioti, A., Ceruso, M., Carta, F., Bilia, A. R., and Supuran, C. T. (2015). New natural product carbonic anhydrase inhibitors incorporating phenol moieties. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *23*(22), 7219-7225.

Kikutani, S., Nakajima, K., Nagasato, C., Tsuji, Y., Miyatake, A., and Matsuda, Y. (2016). Thylakoid luminal θ-carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom Phaeodactylum tricornutum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(35), 9828-9833.

McKenna, R., and Supuran, C. T. (2014). Carbonic anhydrase inhibitors drug design. In Carbonic Anhydrase: Mechanism, regulation, Links to Disease, and Industrial Applications (pp. 291-323). Springer, Dordrecht. Berlin. Germany.

Mojica, F. J., Charbonnier, F., Juez, G., Rodriguez-Valera, F., and Forterre, P. (1994). Effects of salt and temperature on plasmid topology in the halophilic archaeon Haloferax volcanii. *Journal of bacteriology*, *176*(16), 4966-4973.

Sadeghi, S., Ahmadi, N., Esmaeili, A., and Javadi-Zarnaghi, F. (2017). Blue-white screening as a new readout for deoxyribozyme activity in bacterial cells. *RSC Advances*, *7*(86), 54835-54843

Sangkaew, A., Krungkrai, J., and Yompakdee, C. (2018). Development of a high throughput yeast-based screening assay for human carbonic anhydrase isozyme II inhibitors. *AMB Express*, *8*(1), 124.

Scozzafava, A., and Supuran, C. T. (2014). Glaucoma and the applications of carbonic anhydrase inhibitors. In *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications* (pp. 349-359). Springer, Dordrecht. Berlin. Germany.

Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J. (Eds.). (2004). *Carbonic anhydrase: its inhibitors and activators* (Vol. 1). CRC press

Supuran, C. T., and Scozzafava, A. (2007). Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *15*(13), 4336-4350.

Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nature reviews Drug discovery, 7(2), 168.

Taslimi, P., Gulcin, I., Ozgeris, B., Goksu, S., Tumer, F., Alwasel, S. H., and Supuran, C. T. (2016). The human carbonic anhydrase isoenzymes I and II (hCA I and II) inhibition effects of trimethoxyindane derivatives. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *31*(1), 152-157.

Vieira Gomes, A., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., and Parachin, N. (2018). Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms*, *6*(2), 38.

ภาคผนวก ก.

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria–Bertani (LB)

ละลายส่วนผสม 25 กรัมของ LB powder (MILLER'S LB Broth) ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria–Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และละลายอะการ์ 20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวLB 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone dextrose (YPD)

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Glucose	20	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Synthetic dextrose medium dropout Uracil (SD-Uracil medium agar)

Yeast nitrogenbase witgout amino acid	6.7	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 976 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเติมกรดอะมิโนที่ปราศจากเชื้อ ได้แก่ 0.5 % Adenine 10 มิลลิลิตร, 1 % Leucine 10 มิลลิลิตร, 2 % Histidine 2 มิลลิลิตร และ 1% Tryptophan 2 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Synthetic raffinose medium dropout Uracil (SR Uracil medium)

Yeast nitrogenbase witgout amino acid	6.7	กรัม
Raffinose	20	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเติมกรดอะมิโนที่ปราศจากเชื้อ ได้แก่ 0.5 % Adenine 10 มิลลิลิตร, 1 % Leucine 10 มิลลิลิตร, 2 % Histidine 2 มิลลิลิตร และ 1 % Tryptophan 2 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Synthetic raffinose medium dropout Uracil (SR-Uracil medium agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SR และละลายอะการ์ 20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SR 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นทำการเติมกรดอะมิโนที่ปราศจากเชื้อ ได้แก่ 0.5 % Adenine 10 มิลลิลิตร, 1 % Leucine 10 มิลลิลิตร, 2 % Histidine 2 มิลลิลิตร และ 1 % Tryptophan 2 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Synthetic galactose medium (SG medium agar)

Yeast nitrogenbase witgout amino acid	6.7	กรัม
Raffinose	10	กรัม
Galactose	20	กรัม
Agar	8	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเติมกรดอะมิโนที่ปราศจากเชื้อ ได้แก่ 0.5 % Adenine 10 มิลลิลิตร, 1 % Leucine 10 มิลลิลิตร, 2 % Histidine 2 มิลลิลิตร และ 1 % Tryptophan 2 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข.

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA 0.5M pH8.0

EDTA	186.1	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับความเป็นกรดเบสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริกให้เป็น 8.0 และเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (50X TAE)

Tris base	242	กรัม
Acetic acid conc.	57.1	มิลลิลิตร

นำสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 100 มิลลิลิตร ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TE

1 M Tris (pH 8.0)	0.5	มิลลิลิตร
5 M NaCl	1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH0.8)	0.1	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Loading dye

Bromophenolblue	0.025	%
Sucrose	40	%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลาย 10% SDS

ละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS) จำนวน 5 กรัมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 40 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับความเป็นกรดเบสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริกให้เป็น 7.2 และเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

สารละลาย 5M NaCl

ละลาย NaCl จำนวน 14.625 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 1 M Tris pH 8.0

Tris base	12.11 กรัม

นำมาละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับความเป็นกรดเบสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริกให้เป็น 8.0 และเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 1 M Tris pH 8.0

Potassium acetate	49.07 กรัม

นำมาละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ Cracking สำหรับ Colony cracking

1 M NAOH	1	มิลลิลิตร
10% SDS	1	ลิลลิลิตร
0.5M EDTA	0.2	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดผสมในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Solution I สำหรับสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์

1 M Tris (pH 8.0)	1.0	มิลลิลิตร
Glucose	0.45	กรัม
0.5 M EDTA (pH8.0)	0.1	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดผสมในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Solution II สำหรับสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์

5 N NaOH	0.4	มิลลิลิตร
10%(w/v) SDS	1	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบทั้งหมดผสมในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Solution III สำหรับสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์

5M Potassium Acetate	30	มิลลิลิตร
Glacial Acetic Acid	5.75	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดผสมในน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที