การโคลนและการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 ในแบคทีเรียและยีสต์

นางสาวนิลเนตร อัศวะศิริจินดา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING AND EXPRESSION OF DEXTRANASE FROM *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 IN BACTERIA AND YEAST

Miss Nilnate Assavasirijinda

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนและการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 ในแบคทีเรียและยีสต์
โดย	นางสาวนิลเนตร อัศวะศิริจินดา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิลเนตร อัศวะศิริจินดา : การโคลนและการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 ในแบคทีเรียและยีสต์. (CLONING AND EXPRESSION OF DEXTRANASE FROM *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 IN BACTERIA AND YEAST) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร. ปาหนัน เริงสำราญ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, 142 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้โคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 และนำไปแสดงออกในแบคทีเรียและยีสต์ โดยการแสดงออกในแบคทีเรียมีการเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนฮิสทิดีน 6 หมู่ด้านปลายคาร์บอกซีของสายพอลิเพปไทด์ จากนั้นนำไปแสดงออกใน *Escherichia coli* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ BL21(DE3)pLysS และ Rosetta-gami B(DE3)pLysS ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ T7 อีกทั้งยังได้เปรียบเทียบผลของ signal peptide จากราที่มีต่อการแสดงออกในแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม 1% สายพันธุ์ Rosetta-gami B(DE3)pLysS สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากกว่าสายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS และโคลนที่แสดงออกเดกซ์แทรนเนสที่มี signal peptide จากราผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าโคลนที่แสดงออกเดกซ์แทรนเนสที่ไม่มี signal peptide ดังนั้นจึงเลือก *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-gami B(DE3)pLysS ที่แสดงออกเดกซ์แทรนเนสที่มี signal peptide จากราไปหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสในอาหาร minimal medium ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดโดยการวิเคราะห์ผลด้วย SDS-PAGE จากผลการทดลองสรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-gami B(DE3)pLysS คือ ที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเข้มข้น IPTG 25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากการทดสอบแอกทิวิตีของรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสโดยวิธี Blue dextran SDS-PAGE พบว่าหลังจากรีเนเจอร์แล้วเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้สามารถย่อยบลูเดกซ์แทรนและเกิดบริเวณใสบนเจลได้ และเมื่อนำรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ได้มีขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน สำหรับการแสดงออกในยีสต์ พบว่าเมื่อนำเดกซ์แทรนเนสไปแสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ BJ5462 ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ PGK ที่ควบคุมให้มีการแสดงออกตลอดเวลาแล้ว ยีสต์ดังกล่าวสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสและหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเดกซ์แทรนเนสดังกล่าวสามารถย่อยเดกซ์แทรนได้

ภาควิชา : จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต : นิลเนตร อัศวะศิริจินดา

สาขาวิชา : จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก :

ปีการศึกษา : 2551 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม :

4972341823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: DEXTRAN / DEXTRANASE / *Penicillium* / EXPRESSION

NILNATE ASSAVASIRIJINDA : CLONING AND EXPRESSION OF DEXTRANASE FROM *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 IN BACTERIA AND YEAST. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST.PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., 142 pp.

Dextranase gene from *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 was expressed in bacteria and yeast. In bacteria, the dextranase gene with and without native signal peptide at the N-terminus was fused with six histidine residues tagged at the C-terminus. The dextranase gene was expressed in *Escherichia coli* strains BL21(DE3)pLysS and Rosetta-gami B(DE3)pLysS under the control of T7 promoter. It was found that activity of dextranase from Rosetta-gami B(DE3)pLysS was higher than BL21(DE3)pLysS, and the dextranase gene with native signal sequence was expressed higher than the gene without native signal sequence as evidenced by their respective clear zones on agar plate containing 1% industrial grade dextran. Hence, Rosetta-gami B(DE3)pLysS harboring dextranase gene with native signal sequence was chosen as expression host for further optimization in minimal medium for high productivity monitored by SDS-PAGE. Optimum conditions for dextranase production obtained are cultivation at 37°C, IPTG 25 μM with induction time of 6 hr. The recombinant dextranase also conferred dextranase activity on Blue dextran SDS-PAGE. After purification with affinity chromatography, it was found that recombinant dextranase revealed a distinct specific band with molecular weight of about 68 KDa. In yeast, the dextranase gene with native signal peptide at the N-terminus was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* strain BJ5462 under the control of constitutive PGK promoter. The result showed that the *S. cerevisiae* produced active dextranase which was secreted into culture medium.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department : Microbiology Student's Signature : Nilnate Assavasirijinda

Field of Study : Industrial Microbiology Principal Advisor's Signature : Panan Rerngsamran

Academic Year : 2008 Co-advisor's Signature : Supat

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ เอาใจใส่ดูแลและเป็นที่ปรึกษาในเรื่องต่างๆ ตลอดจนการอบรมสั่งสอนอย่างดียิ่งเสมอมา ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของท่านอาจารย์ฯ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ กำลังใจและเป็นที่ปรึกษาในเรื่องต่างๆอย่างดียิ่งเสมอมา ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของท่านอาจารย์ฯ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณท่านรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป อาจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง ที่ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์สำหรับงานวิจัยและให้คำปรึกษาต่างๆ เกี่ยวกับขั้นตอนการวิจัย ทำให้ผู้วิจัยสามารถทำการวิจัยได้เป็นอย่างดีตลอดมา

กราบขอบพระคุณ ดร.ลิลี่ เอื้อวิไลจิตร และ National BioResource Project ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความกรุณาเอื้อเฟื้อสายพันธุ์จุลินทรีย์และเวกเตอร์ต่างๆ สำหรับใช้ในงานวิจัย ทำให้งานวิจัยของผู้วิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่น่ารัก และสมาชิกห้องวิจัย 448 ทุกคนที่คอยเป็นห่วง ดูแลเอาใจใส่ ให้กำลังใจ และช่วยเหลือผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา ทำให้ผู้วิจัยมีช่วงเวลาที่ดีที่ประทับใจตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ทำให้สามารถดำเนินการทำวิจัยได้อย่างสะดวก รวดเร็ว

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่ชาย ที่คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นที่ปรึกษา ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

สารบัญ

บทที่ หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฑ

สารบัญภาพ..... ฒ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ต

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง..... 28

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 28

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ..... 30

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 33

3.3.1 รา..... 33

3.3.2 แบคทีเรีย..... 33

3.3.3 ยีสต์..... 34

3.4 พลาสมิดและไพรเมอร์..... 34

3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 36

3.5.1 การเก็บรักษารา..... 36

3.5.1.1 การเก็บรักษารา ในระยะสั้น..... 36

3.5.1.2 การเก็บรักษาในระยะยาว..... 37

3.5.2 การเก็บรักษาแบคทีเรีย..... 37

3.5.2.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น..... 37

3.5.2.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว..... 37

3.5.3 การเก็บรักษายีสต์..... 37

3.5.3.1 การเก็บรักษายีสต์ในระยะสั้น..... 37

3.5.3.2 การเก็บรักษายีสต์ในระยะยาว..... 38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.6 การเลี้ยงราเพื่อชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสและการเก็บตัวอย่างเส้นใย..... 38
3.7 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเส้นใยและการทดสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี northern hybridization..... 38
3.7.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเส้นใย..... 38
3.7.2 การวัดปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ..... 39
3.7.3 การทำอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส..... 40
3.7.4 การถ่ายอาร์เอ็นเอจากเจลไปยังไนลอนเมมเบรน..... 40
3.7.5 การตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอยีนเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Lebeling and Detection Starter Kit (Roche, Germany)..... 41
3.7.5.1 การพรีไฮบริไดเซชันและไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอโพรบ.... 41
3.7.5.2 การตรวจสอบสัญญาณการไฮบริไดซ์..... 41
3.8 การแยก mRNA และการเตรียม cDNA..... 42
3.8.1 การแยก mRNA (messenger RNA) จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ชัดเจนที่สุดจากข้อ 3.7.5 โดยใช้ชุดสำเร็จ PolyATtract mRNA Isolation System III (Promega, USA)..... 42
3.8.1.1 การเตรียมสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิล (Streptavidin-Paramagnetic Particles)..... 43
3.8.1.2 การ annealing กับ Biotinylated-Oligo(dT) Probe..... 43
3.8.1.3 การจับ mRNA ด้วยสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิลและการล้าง annealed Oligo(dT)-mRNA Hybrids.. 43
3.8.1.4 การชะ mRNA..... 44
3.8.2 การทำ mRNA ให้เข้มข้น..... 44
3.8.3 การสร้างสาย cDNA โดยใช้ Universal RiboClone cDNA Synthesis System (Promega, USA)..... 44
3.8.3.1 การสังเคราะห์สาย cDNA สายแรก (First-strand synthesis)..... 44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.8.3.2 การสังเคราะห์สาย cDNA สายคู่ (Second-strand synthesis)..... 45
3.8.3.3 การทำ cDNA สายคู่ให้เข้มข้นโดยการตกตะกอน..... 46
3.9 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA เข้าในเวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน... 46
3.9.1 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA..... 46
3.9.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA..... 46
3.9.1.2 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 46
3.9.1.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส..... 47
3.9.1.4 การเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 48
3.9.1.5 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)..... 49
3.9.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pJET โดยใช้ชุดสำเร็จ GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, USA)..... 49
3.9.3 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock..... 49
3.9.3.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยใช้รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)..... 50
3.9.3.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์..... 50
3.9.4 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส..... 51
3.9.5 การสกัดพลาสมิดที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)..... 52

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.10 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออก..... 53
3.10.1 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในแบคทีเรีย..... 53
3.10.1.1 การเตรียมเวกเตอร์ pETHis (ภาคผนวก ค1) และ pCS24 (ภาคผนวก ค2) สำหรับเชื่อมต่อกับยีนเดกซ์แทรนเนส..... 53
3.10.1.2 การเตรียมยีนเดกซ์แทรนเนสเพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pETHis และ pCS24..... 54
3.10.1.3 การเชื่อมต่อยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากข้อ 3.10.1.2 เข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pETHis และ pCS24..... 55
3.10.1.4 การสร้างเวกเตอร์สำหรับแสดงออกยีนเดกซ์แทรนเนสโดยออกแบบให้มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนส..... 56
3.10.1.4.1 การเตรียมเวกเตอร์ pNAT2 สำหรับเชื่อมต่อกับยีนเดกซ์แทรนเนสที่มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3'..... 56
3.10.1.4.2 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก pNAC9 ซึ่งมีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 57
3.10.1.4.3 การเตรียมยีนเดกซ์แทรนเนสที่มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' เพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pNAT2..... 57
3.10.1.4.4 การเชื่อมต่อยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากข้อ 3.10.1.4.3 เข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pNAT2..... 58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.10.1.5 การสร้างเวกเตอร์สำหรับแสดงออกยีนเดกซ์แทรนเนส โดยออกแบบให้มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนส และตัดส่วน 101 คู่เบสทางด้าน 5' ซึ่งเป็น signal sequence ออกและมีส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสบางส่วนหายไป..... 59
3.10.2 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในยีสต์..... 60
3.10.2.1 การเตรียมเวกเตอร์ pYEX-S1 เพื่อเชื่อมต่อกับยีนเดกซ์แทรนเนส..... 60
3.10.2.2 การเตรียมยีนเดกซ์แทรนเนสเพื่อเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pYEX-S1..... 61
3.10.2.2.1 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก pNAT2 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 61
3.10.2.2.2 การเตรียมยีนเดกซ์แทรนเนสเพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pYEX-S1 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.10.2.1..... 61
3.10.2.3 การเชื่อมต่อยีนเดกซ์แทรนเนส เข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pYEX-S1..... 62
3.11 การทรานสฟอร์มเวกเตอร์สำหรับแสดงออกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อการแสดงออก..... 62
3.11.1 การทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียเพื่อการแสดงออก... 62
3.11.2 การทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านยีสต์เพื่อการแสดงออก..... 63
3.12 การตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส..... 65
3.12.1 การตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็ง..... 65
3.12.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE..... 65
3.12.3 การตรวจสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสบน Blue dextran SDS-PAGE..... 67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.13 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส..... 67
3.13.1 การแปรผันอุณหภูมิในการบ่ม..... 67
3.13.2 การแปรผันความเข้มข้นของ IPTG..... 68
3.13.3 การแปรผันเวลาในการผลิตหลังการชักนำด้วย IPTG..... 68
3.14 การทำรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์..... 68
4. ผลการทดลอง..... 70
4.1 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14..... 70
4.2 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA..... 71
4.3 การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้าในเวกเตอร์ pJET..... 72
4.4 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออก..... 74
4.4.1 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในแบคทีเรีย..... 74
4.4.2 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในยีสต์..... 85
4.5 การตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส..... 88
4.5.1 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็ง..... 88
4.5.1.1 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็งของเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย..... 88
4.5.1.2 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็งของเซลล์เจ้าบ้านยีสต์..... 91
4.5.2 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE..... 93
4.5.3 การแสดงแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสบน Blue dextran SDS-PAGE..... 95
4.6 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส..... 96
4.6.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส..... 96
4.6.2 ความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมในการชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนส..... 97
4.6.3 เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสหลังการชักนำด้วย IPTG..... 98

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

4.7 ความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสหลังทำบริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์โปรตีน His Bind® Purification Kits..... 99

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 101

รายการอ้างอิง..... 107

ภาคผนวก..... 115

ภาคผนวก ก..... 116

ภาคผนวก ข..... 120

ภาคผนวก ค..... 133

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 142

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	แสดงขนาดของยีนเดกซ์แทรนเนสและขนาดของโปรตีนเดกซ์แทรนเนส.....	24
3.1	จีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....	33
3.2	จีโนไทป์ของยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง.....	34
3.3	ลักษณะสมบัติของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง.....	34
3.4	ลำดับนิวคลีโอไทด์และค่า T_m ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้.....	35
3.5	แสดงชื่อโคลนที่ได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิดแต่ละชนิดเข้าใน *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ.....	63
3.6	แสดงชื่อโคลนที่ได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิดแต่ละชนิดเข้าในยีสต์.....	64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของเดกซ์แทรน.....	4
2.2	ปฏิกิริยาการสร้างเดกซ์แทรนโดยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส.....	5
2.3	การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA.....	16
2.4	การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA โดยไม่ใช้เอนไซม์ S_1 nuclease.....	17
4.1	การแสดงออกของอาร์เอ็นเอของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 (ก) อาร์เอ็นเอในอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ข) สัญญาณจากการติดตามอาร์เอ็นเอด้วยดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส, หมายเลข 1-7 เป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากเส้นใยชุดควบคุมผลลบที่ใช้ซูโครส 5% เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมอายุ 3 5 7 9 11 13 และ 15 วัน ตามลำดับ และหมายเลข 8-14 เป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากเส้นใยที่ใช้เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นตัวเหนี่ยวนำอายุ 3 5 7 9 11 13 และ 15 วัน ตามลำดับ.....	71
4.2	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่เพิ่มจำนวนจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งแรกโดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F และ Dex14R.....	72
4.3	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Dex2F และ Dex2R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนต์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pJET.....	73
4.4	ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNA-1.....	74
4.5	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F และ Dex14R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนต์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pETHis.....	75
4.6	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F และ Dex14R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนต์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pCS24.....	76
4.7	ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAT2.....	77
4.8	ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAC9.....	78

รูปที่		หน้า
4.9	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter และ Dex12R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนต์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pETHis อย่างถูกทิศทาง	80
4.10	ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAH6.....	82
4.11	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter และ Dex12R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนต์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสที่ถูกตัดส่วน 101 คู่เบสทางด้าน 5' ซึ่งเป็น signal sequence และบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสออก.....	83
4.12	ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAH29.....	84
4.13	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ YEX-F1 และ Dex1R.....	86
4.14	ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAY44.....	87
4.15	การเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีแบคทีเรียหลังจากราดด้วยเอทานอล 95% (ก) RN6 เมื่อเทียบกับ RE (ข) RN29 เมื่อเทียบกับ RE (ค) BN6 เมื่อเทียบกับ BE (ง) BN29 เมื่อเทียบกับ BE.....	90
4.16	การเกิดบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์ YN44 หลังจากราดด้วยเอทานอล 95% เมื่อเปรียบเทียบกับ YS1.....	92
4.17	การทดสอบแอกทิวิตีเดกซ์แทรนเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ YN44 บนอาหารแข็งที่มีเดกซ์แทรนเมื่อเปรียบเทียบกับ YS1.....	93
4.18	การแสดงออกของ RN6 ในเจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250.....	94
4.19	แสดงเจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของโคลน RN6 ที่มีการชักนำด้วย IPTG (ก) และแอกทิวิตีบน Blue dextran SDS-PAGE ของตัวอย่างโปรตีนหยาบของโคลน RN6 ที่ชักนำด้วย IPTG (ข).....	95
4.20	เจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละอุณหภูมิ.....	97
4.21	เจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของตัวอย่าง (insoluble fraction) ที่ชักนำให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสที่ IPTG ความเข้มข้นต่างๆ....	98
4.22	เจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของตัวอย่าง (insoluble fraction) ที่เก็บทุกชั่วโมงหลังจากชักนำด้วย IPTG.....	99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ หน้า

4.23 เจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ..... 100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
°ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เดกซ์แทรนเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งสายหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก และแตกแขนงออกไปจากสายหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,2 แอลฟา-1,3 หรือ แอลฟา-1,4 ได้อีกด้วย เดกซ์แทรนมีน้ำหนักโมเลกุลที่หลากหลายตั้งแต่ 1.5×10^4 ถึง 2×10^6 ดาลตัน หรือมากกว่านั้น เมื่อน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีการแตกแขนงมากขึ้นจะทำให้ความสามารถในการละลายน้ำลดลงซึ่งจะทำให้สารละลายมีลักษณะเหนียวหนืด จุลินทรีย์ในสกุล *Leuconostoc* และ *Streptococcus* (Monchois และคณะ, 1999) รวมถึงราในสกุล *Rhizopus* spp. (Sankpal และคณะ, 2001) เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ เนื่องจากจุลินทรีย์ในสกุลเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (1,6-α-D-glucan-6-α-glucosyltransferase, dextransucrase, EC 2.4.1.5) ซึ่งสร้างเดกซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครสได้ และแบคทีเรียบางสกุล เช่น *Acetobacter capsulatus* และ *Acetobacter viscous* สามารถสร้างเดกซ์แทรนจากเดกซ์ทรินได้เช่นกัน (Sim และคณะ, 2001; Yamamoto และคณะ,1993)

ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลพบปัญหามากมายที่เกิดจากเดกซ์แทรน ซึ่งเดกซ์แทรนดังกล่าวไม่ได้เป็นองค์ประกอบตามธรรมชาติของน้ำอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต แต่ถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc* ที่ปนเปื้อนมากับอ้อยและน้ำอ้อย ซึ่งเมื่อแบคทีเรียเหล่านี้เจริญเติบโตมากขึ้นและเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยเป็นเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5×10^6 ดาลตัน จึงทำให้น้ำอ้อยมีลักษณะเหนียวหนืดเกิดการบูดเปรี้ยวได้ง่าย มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ และยังก่อให้เกิดปัญหามากมายในกระบวนการผลิตน้ำตาล เช่น ทำให้เกิดการอุดตันในท่อส่งน้ำอ้อย ถัง แผ่นกรอง เครื่องกรองและอื่นๆ นอกจากนี้ยังทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตลดลง ผลผลิตที่ได้ลดลงและมีคุณภาพต่ำอีกด้วย (Imrie และ Tilbury, 1972) ปัญหาของเดกซ์แทรน นอกจากจะพบในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลแล้ว ยังพบว่าเดกซ์แทรนเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดฟันผุอีกด้วย เนื่องจากเดกซ์แทรนเป็นองค์ประกอบของคราบจุลินทรีย์ (plaque) ที่บริเวณผิวฟันซึ่งสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* ทำให้เป็นที่ยึดเกาะของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ง่าย (Marotta และคณะ, 2002) และเมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้เจริญเติบโตจะสร้างกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ มากัดกร่อนผิวฟันทำให้เกิดฟันผุขึ้น วิธีที่เหมาะสมและมีความจำเพาะสูงในการแก้ปัญหาที่เกิดจากเดกซ์แทรนทั้งในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลและทันตสาธารณสุขคือ การใช้เดกซ์แทรนเนส (dextranase, EC 3.2.1.11) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก ที่เชื่อมต่อหน่วยย่อยของกลูโคสในสายหลักของเดกซ์แทรน และ

ปลดปล่อยไอโซมอลโทแซ็กคาไรด์ ที่มีกลูโคส 3 ถึง 5 หน่วย เป็นองค์ประกอบออกมา ซึ่งในกระบวนการผลิตน้ำตาล เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจะย่อยพอลิเมอร์ของเดกซ์แทรนให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ดังนั้นน้ำอ้อยจึงมีความหนืดลดลงและช่วยลดปัญหาต่างๆในการผลิตได้ (Fulcher และ Inkerman, 1976) ส่วนปัญหาทางด้านทันตสาธารณสุขนั้น มีการใช้เดกซ์แทรนเนสในการย่อยสลายและยับยั้งการสร้างเดกซ์แทรนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นการช่วยป้องกันฟันผุได้อีกทางหนึ่งด้วย (Marotta และคณะ, 2002) ดังนั้นเดกซ์แทรนเนสจึงเป็นที่ต้องการอย่างมากในการนำไปใช้แก้ปัญหาจากเดกซ์แทรนในด้านต่างๆ เหล่านี้

จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น รา ยีสต์ และแบคทีเรีย สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ โดยพบว่าเดกซ์แทรนเนสจากราเป็นแหล่งสำคัญที่สุดของการผลิตเอนไซม์ในเชิงพาณิชย์ ซึ่งเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมและมีขายในทางการค้านั้นได้มาจากราในสกุล *Penicillium* และ *Chaetomium* เนื่องจากราสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในปริมาณมากและสามารถหลั่งออกนอกเซลล์ได้เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ (Hutson และ Weigel, 1963) และเดกซ์แทรนเนสจากรายังสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียด้วย แต่อย่างไรก็ตามราใช้เวลาในการผลิตนานกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้งรายังสร้างสารมัธยันตร์ทุติยภูมิอีกหลายชนิดที่อาจทำให้ยากต่อการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ต้นทุนในการผลิตสูง ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากรานั้นเป็นการผลิตเมื่อมีการชักนำด้วยเดกซ์แทรนซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นถ้าสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้โดยไม่ต้องมีการชักนำ หรือใช้สารชักนำที่มีราคาถูก หาได้ง่าย เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและใช้เวลาในการผลิตที่รวดเร็วขึ้นก็จะเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้มากตามไปด้วย

เนื่องจากราจัดเป็นยูแคริโอตจึงทำให้การผลิตโปรตีนชนิดต่างๆจากรานั้นต้องผ่านกระบวนการดัดแปลงทั้งก่อนและหลังการแปลรหัส ซึ่งได้แก่ การขจัดอินทรอนออก (mRNA processing) การสร้างพันธะไดซัลไฟด์ที่ถูกต้อง การเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) การเติมน้ำตาล (glycosylation) การเติมหมู่อะเซทิล (acetylation) การเติมหมู่เอซิล (acylation) และการตัดโดยโปรติเอส (proteolytic cleavage) เป็นต้น เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีสมบัติต่างๆ และมีโครงสร้างที่ถูกต้องเหมาะสม ดังนั้นการแสดงออกโปรตีนที่ได้จากรานั้นจึงควรนำไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม ซึ่งเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้เพื่อการแสดงออกได้แก่ แบคทีเรียและยีสต์ ซึ่งแบคทีเรียจะไม่มีกระบวนการขจัดอินทรอนออก แต่ยีสต์มีกระบวนการขจัดอินทรอนออก ดังนั้นเพื่อให้ง่ายแก่การนำยีนต่างๆไปแสดงออกทั้งในแบคทีเรียและยีสต์จึงจำเป็นต้องใช้ลำดับ cDNA จากรา

จากการศึกษาราที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ โดย เอก แสงวิเชียร (2531) ซึ่งได้คัดแยก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้นั้น ต่อมา สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) ได้กลายพันธุ์ราสายพันธุ์ดังกล่าวจนได้ *Penicillium* sp. สายพันธุ์

SMCU 3-14 ที่สามารถเดกซ์แทรนเนสได้ 330.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร และศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ (2547) ได้หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส ทำให้ *Penicillium* sp. SMCU 3-14 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูงถึง 600 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในภาวะที่เหมาะสมคือ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใน 0.045 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเบส 4.5 ซึ่งแสดงว่าเดกซ์แทรนเนสจากราสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงและในสภาพที่เป็นกรด ซึ่งเหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาล อย่างไรก็ตามการผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 เป็นการผลิตที่ต้องอาศัยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นถ้าสามารถนำเดกซ์แทรนเนสจากราสายพันธุ์ดังกล่าวไปแสดงออกในแบคทีเรีย หรือยีสต์ได้โดยไม่ต้องมีการชักนำหรือใช้สารชักนำที่มีราคาถูกได้ ก็จะสามารถช่วยลดระยะเวลาในการผลิตอีกทั้งเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย ทั้งนี้ พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี (2549) ได้โคลนและหาลำดับจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 แล้ว และพบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสบนโครโมโซมมีเพียง 1 ชุด มีกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1,824 คู่เบส และไม่มีอินทรอน นอกจากนี้ยังพิสูจน์เอกลักษณ์ของราสายพันธุ์ดังกล่าวแล้วพบว่าเป็น *Penicillium pinophilum* อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสและเพื่อยืนยันผลของลำดับจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะโคลน cDNA ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium pinophilum* สายพันธุ์ SMCU 3-14 เพื่อจะนำไปแสดงออกในแบคทีเรีย และยีสต์ โดยมุ่งที่จะผลิตเดกซ์แทรนเนสที่ไม่ต้องอาศัยการชักนำจากเดกซ์แทรน และให้เอนไซม์ที่ได้มีคุณสมบัติเหมือนกันกับเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากรา เพื่อที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาที่เกิดจากเดกซ์แทรนในด้านต่างๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

โคลนและแสดงออกเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 ในแบคทีเรียและยีสต์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลิตเดกซ์แทรนเนสในแบคทีเรียและยีสต์ได้โดยไม่ต้องอาศัยการชักนำจากเดกซ์แทรน โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและใช้เวลาในการผลิตที่รวดเร็วขึ้น

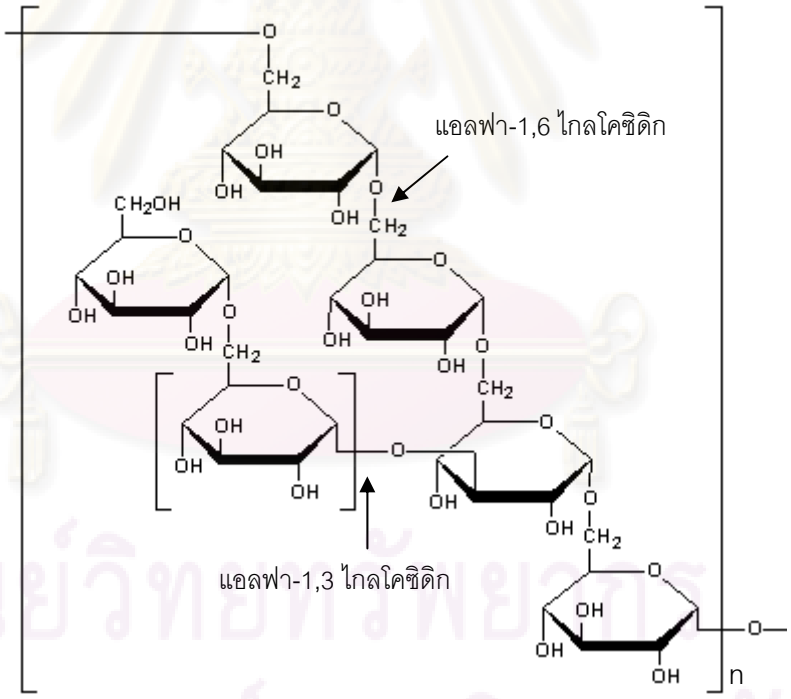
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

เดกซ์แทรน

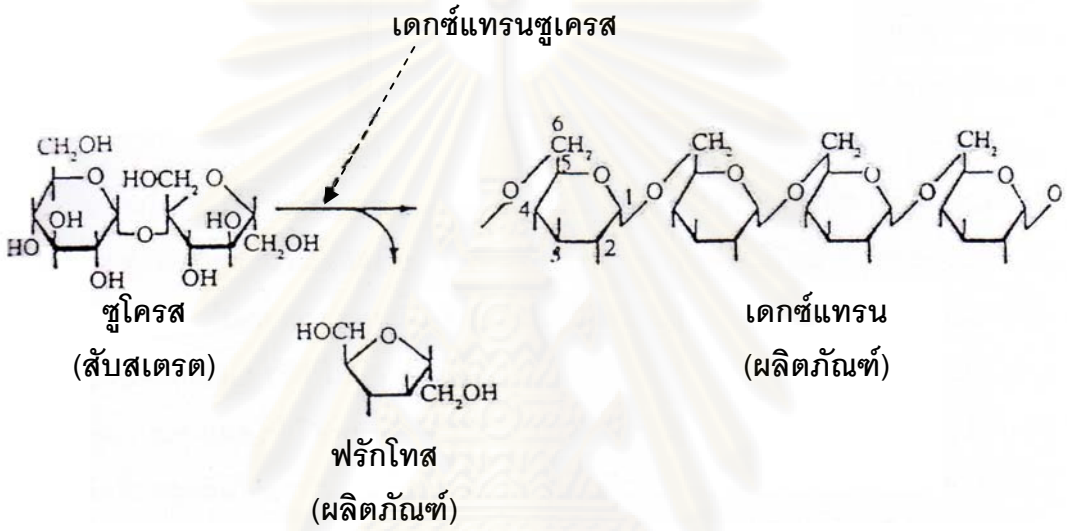
เดกซ์แทรน (dextran) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งสายหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก และแตกแขนงออกไปจากสายหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,2 แอลฟา-1,3 หรือ แอลฟา-1,4 ได้อีกด้วย โดยโครงสร้างของเดกซ์แทรนได้แสดงไว้ดังในรูปที่ 2.1 เดกซ์แทรนมีน้ำหนักโมเลกุลที่หลากหลายตั้งแต่ 1.5×10^4 ถึง 2×10^6 ดาลตัน หรือมากกว่านั้น เมื่อน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีการแตกแขนงมากขึ้นจะทำให้ความสามารถในการละลายน้ำลดลง ซึ่งจะทำให้สารละลายที่มีลักษณะเหนียวหนืด



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเดกซ์แทรน (ที่มา : ดัดแปลงจาก Sigma-Aldrich Co., 2008)

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนได้ ได้แก่ จุลินทรีย์ในสกุล *Leuconostoc* และ *Streptococcus* (Monchois และคณะ, 1999) รวมถึงราในสกุล *Rhizopus* spp. (Sankpal และคณะ, 2001) เนื่องจากจุลินทรีย์ในสกุลเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส

(dextransucrase, 1,6-α-D-glucan-6-α-glucosyltransferase, EC 2.4.1.5) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูโครส เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส หรืออีกชื่อหนึ่งคือ เดกซ์แทรน (dextran) พร้อมกับปลดปล่อยฟรักโทสอิสระออกมา (Cole, 1977; Van Houte และ Russo, 1986) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 และแบคทีเรียบางสกุลเช่น *Acetobacter capsulatus* และ *Acetobacter viscous* สามารถสร้างเดกซ์แทรนจากเดกซ์ทรินได้เช่นกัน (Sims และคณะ, 2001; Yamamoto และคณะ,1993)



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการสร้างเดกซ์แทรนโดยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (ที่มา : ดัดแปลงจากจินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2542)

ปัญหาที่เกิดจากเดกซ์แทรน

ทางอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล

ในกระบวนการผลิตน้ำตาลพบการปนเปื้อนของเดกซ์แทรน โดยเดกซ์แทรนไม่ได้เป็นองค์ประกอบตามธรรมชาติของน้ำอ้อย แต่ถูกสร้างขึ้นโดย *Leuconostoc mesenteroides* และ *Leuconostoc dextranicum* ที่ปนเปื้อนมากับบาดแผลของอ้อยที่ถูกไฟไหม้และน้ำอ้อย ซึ่งเมื่อแบคทีเรียเหล่านี้เจริญเติบโตมากขึ้นและเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยเป็นเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 5×10^6 ดาลตัน จึงทำให้น้ำอ้อยมีลักษณะเหนียวหนืดเกิดการบูดเปรี้ยวได้ง่าย มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ และยังก่อให้เกิดปัญหามากมายในกระบวนการผลิตน้ำตาล เช่น ทำให้เกิดการอุดตันในท่อส่งน้ำอ้อย ถัง แผ่นกรอง เครื่องกรองและอื่นๆ นอกจากนี้ยังทำให้ประสิทธิภาพใน

การผลิตลดลง ผลผลิตที่ได้ลดลงและมีคุณภาพต่ำอีกด้วย (Imrie และ Tilbury, 1972) เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศทางเกษตรกรรม และน้ำตาลถือว่าเป็นสินค้าทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศ ทั้งนี้มีรายงานว่าประเทศไทยมีการผลิตน้ำตาลถึง 6.72 ล้านตันต่อปีในปี 2550 และ 7.813 ล้านตันต่อปีในปี 2551 โดยแบ่งออกเป็นทั้งที่ใช้บริโภคภายในประเทศและส่งออกไปขายยังต่างประเทศ ประเทศไทยถือว่าเป็นประเทศที่มีการส่งออกน้ำตาลทรายสูงมากเป็นอันดับที่สามของโลก ซึ่งในปี 2550 มีการส่งออกน้ำตาลประมาณ 4.497 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออก 44,527 ล้านบาท และในปี 2551 (ม.ค.-มิ.ย.) มีการส่งออกน้ำตาลประมาณ 2.497 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออก 22,725 ล้านบาท (กระทรวงพาณิชย์, กรกฎาคม 2551) ในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายนั้นต้องประสบกับปัญหาของการปนเปื้อนด้วยเดกซ์แทรน ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียผลผลิตราว 9.2 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด (Tilbury และคณะ,1977) แต่ละปีจึงสูญเสียรายได้จำนวนมหาศาล การแก้ปัญหาที่เกิดจากเดกซ์แทรนในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายมีหลายวิธี เช่น การป้องกันการเกิดเดกซ์แทรนโดยการเก็บน้ำอ้อยไว้ในที่เย็น การใช้ความร้อน การควบคุมค่าความเป็นกรดเบส หรือการใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดเดกซ์แทรน การกำจัดเดกซ์แทรนที่เกิดขึ้น เช่น การสลายเดกซ์แทรนด้วยกรดร่วมกับการให้ความร้อนการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต หรือการใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูง แต่อย่างไรก็ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วนั้นเป็นวิธีที่ต้องใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรง ใช้พลังงานสูง ก่อให้เกิดสารพิษและของเสียในปริมาณมาก ทำให้มลภาวะเป็นพิษ และบางวิธีใช้ต้นทุนสูงทำให้ไม่คุ้มกับการลงทุน

ทางทันตสาธารณสุข

เดกซ์แทรนเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดฟันผุ เนื่องจากคราบจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวฟันมีเดกซ์แทรนเป็นองค์ประกอบซึ่งสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* ทำให้เป็นที่ยึดเกาะของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ง่าย (Marotta และคณะ, 2002) และเมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้เจริญเติบโตจะสร้างกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ออกมาทำให้ช่องปากมีค่าความเป็นกรดเบสต่ำลง เกิดการสูญเสียแร่ธาตุบริเวณผิวฟัน (demineralization) ผิวฟันเกิดการกัดกร่อนทำให้เกิดฟันผุขึ้น (dental caries) อีกทั้งยังก่อให้เกิดปัญหาโรคปริทันต์ได้อีกด้วย เนื่องจากมีการสะสมของคราบจุลินทรีย์และหินปูนบริเวณคอฟันทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ เช่น แบคทีเรียแกรมลบ *Porphyromonas gingivalis, Peptostreptococcus micros* และแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus spp., Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis, Streptococcus* mitis, *Streptococcus intermedius* ทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบๆคอฟันหรือที่เรียกว่าโรคเหงือกอักเสบ ถ้าเป็นมากคอฟันจะเกิดการผุกร่อนและอาจทำให้สูญเสียฟันได้ วิธีการป้องกัน

ฟันผุมีหลายวิธี เช่น การแปรงฟันอย่างถูกวิธี การใช้ฟลูออไรด์ป้องกันฟันผุ การขูดหินปูนเป็นประจำ การใช้น้ำยาบ้วนปากหลังการแปรงฟัน การใช้สารเคมีควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในช่องปาก เช่น สารสกัดจากธรรมชาติ สารจำพวกควอร์เทอร์นารีแอมโมเนียม สารจำพวกฟีนอลิก การใช้สารปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลลิน (penicillin) แวนโคมัยซิน (vancomycin) และกานามัยซิน (kanamycin) การใช้วัคซีนในการป้องกันฟันผุ การใช้น้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่ซับสเตรตของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสในการให้ความหวาน หรือใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์เป็นวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาล เช่น ไซลิทอล มอลติทอล เป็นต้น (Addy, 1986) อย่างไรก็ตามวิธีที่กล่าวมานั้นใช้ป้องกันฟันผุได้ระดับหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากไม่มีวิธีไหนที่สามารถกำจัดคราบจุลินทรีย์ให้หมดจากผิวฟันได้ และจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ชั้นในของคราบจุลินทรีย์อาจไม่ถูกทำลายด้วยสารต่างๆที่ใช้ยับยั้งเนื่องจากไม่สามารถแทรกซึมผ่านเดกซ์แทรนเข้าไปถึงชั้นในของคราบจุลินทรีย์ได้

วิธีที่เหมาะสมและมีความจำเพาะสูงในการแก้ปัญหาที่เกิดจากการปนเปื้อนเดกซ์แทรนทั้งในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลและทันตสาธารณสุขคือ การใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก ที่เชื่อมต่อหน่วยย่อยของกลูโคสในสายหลักของเดกซ์แทรน เอนไซม์ดังกล่าวคือ เดกซ์แทรนเนส ซึ่งในกระบวนการผลิตน้ำตาลนั้น เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจะย่อยพอลิเมอร์ของเดกซ์แทรนให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ดังนั้นน้ำอ้อยจึงมีความหนืดลดลงและช่วยลดปัญหาต่างๆในการผลิตได้ (Fulcher และ Inkerman, 1976) ส่วนปัญหาทางด้านทันตสาธารณสุขนั้น มีการใช้เดกซ์แทรนเนสในการย่อยสลายและยับยั้งการสร้างเดกซ์แทรนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นการช่วยป้องกันฟันผุได้อีกทางหนึ่งด้วย (Marotta และคณะ, 2002)

เดกซ์แทรนเนส

สิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ พบตั้งแต่จุลินทรีย์หลายชนิด สัตว์และมนุษย์ พืชในสกุล *Avena* รวมถึงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด (Rosenfeld และ Lukomskaya, 1957) ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ เช่น รา *Penicillium luteum, Penicillium funiculosum, Penicillium lilacinum, Penicillium notatum, Aspergillus carneus*, *Chaetomium gracile* และ *Fusarium sp.* แบคทีเรีย *Streptococcus mutans, Flavobacterium sp., Pseudomonas sp., Paenibacillus illinoisensis* ยีสต์ *Lipomyces starkeyi* เป็นต้น

การจำแนกประเภทย่อยของเดกซ์แทรนเนสสามารถจำแนกได้หลายวิธี โดยขึ้นอยู่กับหลักเกณฑ์ที่ทำมาใช้ในการจัดจำแนก ตัวอย่างเช่น หากแบ่งตามความสามารถในการย่อยคาร์โบไฮเดรตและการย้ายหมู่ต่างๆภายในสายคาร์โบไฮเดรต จะสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เอกโซเดกซ์แทรนเนสและเอนโดเดกซ์แทรนเนส โดยรายละเอียดของเอนไซม์ 2 กลุ่มนี้ มีดังต่อไปนี้

1. เอกโซเดกซ์แทรนเนส (exodextranase)

เอกโซเดกซ์แทรนเนส (EC3.2.1.70, glucan-1,6-α-D-glycosidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะที่เชื่อมต่อโมเลกุลของกลูโคสปลายสายของเดกซ์แทรนด้านใดด้านหนึ่ง โดยจะตัดพันธะที่เชื่อมต่อกลูโคสจากปลายสายทีละหนึ่งโมเลกุล ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกลูโคสและไอโซมอลโทส จุลินทรีย์ที่สร้างเอกโซเดกซ์แทรนเนส ได้แก่ *Streptococcus mutans*, *Achromobacter* spp. และ *Arthrobacter globiformis* T6 และยีสต์ *Lipomyces lipofer* เป็นต้น (Wynter, 1997; Sutherland, 1996)

2. เอนโดเดกซ์แทรนเนส (endodextranase)

เอนโดเดกซ์แทรนเนส (EC3.2.1.11, glucan-1,6-α-D-6-glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะที่เชื่อมต่อโมเลกุลของกลูโคสภายในสายหลักของเดกซ์แทรนแบบสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นพอลิเมอร์ขนาดต่างๆ อาจเป็นโมโนเมอร์, ไดเมอร์ หรือโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เช่น ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทเททราโอส และไอโซมอลโทเพนทะโอส ขึ้นอยู่กับความห่างระหว่างจุดตัด จุลินทรีย์ที่สร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนส ได้แก่ แบคทีเรีย *Athrobacter globiformis, Pseudomonas* spp., *Streptococcus mutans* และรา *Chaetomium gracile, Cladosporium resinae* และ *Flavobacterium* spp. เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็จะสร้างเอนโดเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะแตกต่างกันไปอีกด้วย (Wynter, 1997; Sutherland, 1996)

สำหรับตามหลักของ The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB) ได้แบ่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเดกซ์แทรนโดยอาศัยหลักการแบ่งกลุ่มตามปฏิกิริยาและชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยเดกซ์แทรนได้เป็นดังนี้ เดกซ์แทรนเนส (dextranases; EC 3.2.1.11), กลูแคน-1,6-แอลฟา-ดี-กลูโคซิเดส (glucan-1,6-α-D-glucosidases; EC 3.2.1.70), กลูแคน-1,6-แอลฟา-ไอโซมอลโทซิเดส (glucan-1,6-α-

isomaltosidases; EC 3.2.1.94), เดกซ์แทรน-1,6-แอลฟา-ไอโซมอลโทไทรโอซิเดส (dextran1,6-α-isomaltotriosidases; EC 3.2.1.95) และบรานช์-เดกซ์แทรน เอกโซ-1,2-แอลฟา-กลูโคซิเดส (branched-dextran exo-1,2-α-glucosidases; EC 3.2.1.115) รวมถึงยังมีไซโครไอโซมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ กลูคาโนทรานเฟอเรส (cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase; CITase) ที่มีความสามารถในการย่อยเดกซ์แทรนได้อีกด้วย (Khalikova และคณะ, 2005)

ในอีกระบบหนึ่งได้จำแนกเอนไซม์กลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสและไกลโคซิลทรานสเฟอเรสออกเป็นแฟมิลีโดยอาศัยความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน (Henrissat และ Davies, 2000) ในการจำแนกกลุ่มวิธีนี้ เอนโดเดกซ์แทรนเนสถูกจัดอยู่ในแฟมิลีไกลโคซิลไฮโดรเลส 49 และ 66 (glycosylhydrolase families 49 and 66) โดยเดกซ์แทรนเนสที่จัดอยู่ในแฟมิลี 49 ได้แก่ เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย *Arthobacter* sp. (CB-8 และ T-3044) เดกซ์แทรนเนสจากราในสกุล *Penicillium* และเดกซ์แทรน 1,6-α-ไอโซมอลโทรทริโอซิเดสจาก *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum* ส่วนเดกซ์แทรนเนสที่จัดอยู่ในแฟมิลี 66 ได้แก่ เอนโดเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียหลายสปีชีส์ในสกุล *Steptococcus* และไซโคลไอโซมอลโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์กลูคาโนทรานสเฟอเรสจาก *Bacillus* sp. เป็นต้น (Khalikova และคณะ, 2005) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของเดกซ์แทรนเนสทั้งสองแฟมิลีดังกล่าว พบว่าลำดับเบสของเดกซ์แทรนเนสทั้งสองแฟมิลีไม่มีความเหมือนกัน

การนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ประโยชน์

1. ทางด้านการแพทย์

เดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลจำเพาะสามารถใช้ในการรักษาระดับของเลือดในผู้ป่วยที่สูญเสียเลือดมาก โดยปกติเดกซ์แทรนดังกล่าวผลิตจากเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงโดยวิธีการย่อยด้วยกรดและแยกส่วนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent fractionation) แต่วิธีดังกล่าวนั้นได้ผลผลิตต่ำประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเกิดการสูญเสียในระหว่างการย่อยด้วยกรด ดังนั้นจึงมีวิธีการปรับปรุงกระบวนการผลิตโดยเปลี่ยนมาใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นถึง 25-52 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการใช้เดกซ์แทรนเนสนั้นมีข้อดีต่อการผลิตคือ ใช้พลังงานน้อย ใช้เครื่องมืออย่างง่ายในการผลิต และก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมต่ำ (Khalikova และคณะ, 2005)

การใช้เดกซ์แทรนและเดกซ์แทรนเนสในการนำส่งยาไปออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมาย (drug targeting) เช่น การรักษามะเร็งโดยใช้เดกซ์แทรนเป็นตัวห่อหุ้มยาที่ใช้ในการรักษาและเชื่อมต่ออยู่กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเซลล์มะเร็งฉีดเข้าไปทางเส้นเลือด เมื่อโมเลกุลของเดกซ์แทรนพายาไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมายแล้ว ต่อจากนั้นจึงฉีดเดกซ์แทรนเนสเข้าไป เมื่อเดกซ์แทรนเนสเข้าสู่กระแสเลือดจะมุ่งจำเพาะต่อเดกซ์แทรน ย่อยเดกซ์แทรน และปลดปล่อยยาออกมาทำให้ยาออกฤทธิ์ที่เซลล์มะเร็งเป้าหมายได้อย่างถูกต้อง (Khalikova และคณะ, 2005)

การใช้เดกซ์แทรนเนสกับยาชนิดเพปไทด์ (Sinha และ Kumria, 2001) เนื่องจากยาหลายชนิดเป็นสายเพปไทด์สั้นๆ หรือโปรตีนที่มีขนาดเล็ก เช่น อินซูลิน ทำให้ไม่สามารถใช้ในการรักษาโดยการรับประทานได้ เนื่องจากยาชนิดเพปไทด์จะถูกย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ดังนั้นจึงมีการใช้เดกซ์แทรนเป็นตัวพายาเข้าสู่ระบบดูดซึมอาหาร โดยโมเลกุลของยาจะเชื่อมต่ออยู่กับหมู่ที่มีขั้วของเดกซ์แทรนหรือเรียกอีกอย่างว่าโพรดรัก (prodrug) ซึ่งเดกซ์แทรนจะไม่ถูกย่อยดูดซึมที่กระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก แต่เมื่อโมเลกุลของยาที่เชื่อมต่ออยู่กับเดกซ์แทรนเดินทางไปถึงลำไส้ใหญ่ จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่ในลำไส้ใหญ่เช่น *Bacteroides* (Drasar และ Hill, 1974) มีความสามารถในการสร้างเดกซ์แทรนเนสออกมาย่อยเดกซ์แทรน โมเลกุลของยาจะถูกปลดปล่อยออกมาและถูกดูดซึมเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ต่อไป การใช้เดกซ์แทรนเป็นโพรดรักนั้นมีข้อดีคือ เป็นสารชีวโมเลกุล ง่ายในการเชื่อมต่อโมเลกุลของเดกซ์แทรนกับยาชนิดต่างๆ เช่น Harboe และคณะ (1989) ได้เชื่อมต่อยานาพรอกเซน (naproxen) เข้ากับโมเลกุลของเดกซ์แทรนโดยใช้พันธะเอสเทอร์ (ester linkage) Larsen และคณะ (1989,1991) เชื่อมต่อยาคีโทโพรเฟน (ketoprofen) เข้ากับโมเลกุลของเดกซ์แทรน โดยผู้วิจัยทั้งสองใช้เดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10,000-500,000 ดาลตัน และสามารถปลดปล่อยยาที่ลำไส้ของหมูได้ อีกทั้งเดกซ์แทรนจะถูกย่อยอย่างช้าๆ ทำให้ยาค่อยๆ ปลดปล่อยออกมา ซึ่งมักใช้ในกรณีที่ต้องการให้ยาความเข้มข้นต่ำๆอย่างต่อเนื่องในการรักษาอีกด้วย

2. ทางด้านทันตสาธารณสุข

มีการใช้เดกซ์แทรนเนสช่วยยับยั้งการเกิดคราบจุลินทรีย์และย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ เนื่องจากองค์ประกอบของคราบจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวฟันนั้นมีกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำหรือเดกซ์แทรนเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เป็นที่ยึดเกาะของจุลินทรีย์ต่างๆ เมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้น จุลินทรีย์เหล่านี้จะใช้น้ำตาลและเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์จำพวกกรดต่างๆผ่านทางเมแทบอลิซึม ทำให้ช่องปากมีค่าความเป็นกรดเบสต่ำลง เกิดการสูญเสียแร่ธาตุต่างๆบริเวณผิวฟัน ดังนั้นถ้าสามารถกำจัดกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำหรือยับยั้งการ

สร้างได้ก็จะสามารถช่วยในการยับยั้งฟันผุได้ มีการศึกษาจำนวนมากที่ใช้เดกซ์แทรนเนสในการกำจัดคราบจุลินทรีย์และได้ผลเป็นอย่างดี ตัวอย่างเช่น

Marotta และคณะ (2002) ใช้เดกซ์แทรนเนสทางการค้า (Dextranase 50L) ในการยับยั้งการสร้างเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* ในหลอดทดลอง พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ความเข้มข้น 3.75×10^{-2}–1.5×10^{-1} หน่วยต่อลิตร สามารถยับยั้งการสร้างเดกซ์แทรนได้ทั้งหมด และสามารถย่อยเดกซ์แทรนที่สร้างอยู่แล้วได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.5 ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำลาย (ค่าความเป็นกรดเบส 5.0) ซึ่งเป็นข้อดีคือ มีความเสถียรในการนำไปใช้ผสมในน้ำยาบ้วนปาก (ครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) มากกว่า 120 วัน) เพื่อช่วยป้องกันฟันผุและโรคปริทันต์ได้อีกทางหนึ่งด้วย

Schachtele และคณะ (1975) ใช้เดกซ์แทรนเนสจาก *Actinomyces israeli* และ *Bacteroides ochraceus* ในการยับยั้งการสร้างกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำจาก *S. mutans* พบว่าเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว ที่ความเข้มข้น 0.002 หน่วยต่อมล. สามารถยับยั้งการเกิดกลูแคนได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 0.005 หน่วยต่อมล. สามารถลดการยึดเกาะของ *S. mutans* ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจึงสามารถช่วยลดการยึดเกาะของ *S. mutans* กับผิวฟันได้ และช่วยลดปริมาณแบคทีเรียในช่องปากได้ถึง 50-60 เปอร์เซ็นต์

Fitzgerald และคณะ (1968) ใช้เดกซ์แทรนเนสจาก *P. funiculosum* ในการยับยั้งการเกิดฟันผุในหนูแฮมสเตอร์ พบว่าเมื่อเติมเดกซ์แทรนเนสลงในอาหารและน้ำดื่มของหนูจะช่วยลดการเกิดฟันผุในหนูได้ และการเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปในน้ำดื่มเพียงอย่างเดียวจะลดการเกิดฟันผุได้น้อยกว่าการเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปทั้งในน้ำและอาหาร

Block และคณะ (1969) ได้ศึกษาการป้องกัน การรักษาการเกิดคราบจุลินทรีย์และฟันผุในหนูแฮมสเตอร์ด้วยเดกซ์แทรนเนส พบว่าในสัตว์ทดลองที่ได้รับเดกซ์แทรนเนสจะมีคราบจุลินทรีย์ลดลงและไม่มีฟันผุเกิดขึ้น ในขณะที่สัตว์ทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเดกซ์แทรนเนสจะมีคราบจุลินทรีย์และเกิดฟันผุมาก ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเดกซ์แทรนเนสสามารถใช้ในการป้องกันฟันผุได้ และเมื่อเลี้ยงสัตว์ทดลองด้วยอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสสูงเป็นเวลา 21 วัน จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสลงในน้ำให้สัตว์ทดลองดื่ม พบว่าภายในเวลา 2 วัน คราบจุลินทรีย์จะถูกขจัดไปหมดและอัตราการเกิดคราบจุลินทรีย์ก็จะลดลงด้วย

3. ทางด้านอุตสาหกรรม

ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย มีการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในการช่วยลดปัญหาในกระบวนการผลิตที่เกิดจากการสะสมของเดกซ์แทรน เช่น มีการใช้ Novo dextranase

และ dextranase Hutten DL-2 ซึ่งเป็นเดกซ์แทรนเนสทางการค้าในการช่วยลดปริมาณเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในสายการผลิตน้ำตาล เมื่อปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยเพิ่มสูงขึ้นถึง 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ความสามารถในการกรองของแผ่นกรองน้ำอ้อยจะลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อัตราการกรองลดลง แต่เมื่อใช้ dextranase NOVO 50L ที่ความเข้มข้น 10 ppm ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน ทำให้แผ่นกรองมีความสามารถกลับมากรองได้เป็นปกติถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Khalikova และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้เดกซ์แทรนเนสในการช่วยลดความหนืดของน้ำอ้อย ช่วยลดการยึดเกาะของจุลินทรีย์ตามถังเก็บน้ำอ้อย ท่อส่งน้ำอ้อย และเครื่องมือต่างๆในกระบวนการผลิต และช่วยลดการสูญเสียระหว่างกระบวนการผลิตได้

ในการผลิตไอโซมอลโทแซ็กคาไรด์และโอลิโกเดกซ์แทรนเพื่อใช้เป็นพรีไบโอติก (prebiotic) นั้น Goulas และคณะ (2004) ใช้เดกซ์แทรนเนสควบคู่กับเดกซ์แทรนซูเครสในการผลิตไอโซมอลโทแซ็กคาไรด์และโอลิโกเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่จำเพาะและเหมาะสมเพื่อนำไปใช้เป็นพรีไบโอติก

Kim และ Day (1994) ผลิตเดกซ์แทรนสำหรับใช้ในทางการแพทย์ (clinical grade) เพื่อใช้สำหรับเป็นสารเพิ่มปริมาตรและช่วยการไหลเวียนของเลือด จาก *L. mesenteroides* และเดกซ์แทรนเนสจาก *Lipomyces starkeyi* ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเดกซ์แทรนที่ผลิตได้และนำไปใช้ทางการแพทย์มีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 75,000+/-25,000 ดาลตัน

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์มาก โดยสามารถนำไปใช้ได้หลากหลาย ดังนั้นเดกซ์แทรนเนสจึงเป็นที่ต้องการอย่างมาก จากที่กล่าวมาแล้วว่าจุลินทรีย์หลายชนิดทั้ง แบคทีเรีย ยีสต์ และรา มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ แต่อย่างไรก็ตามแหล่งผลิตเดกซ์แทรนเนสที่สำคัญได้แก่ แบคทีเรียและรา

เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียผลิตได้จากแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas, Bacillius, Brevibacterium, Streptococcus* และ *Bacteroides* แต่จะผลิตเมื่อมีการเหนี่ยวนำจากเดกซ์แทรน และเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยและมีแอกทิวิตีต่ำ

เดกซ์แทรนเนสจากราผลิตได้จากราหลายชนิด โดยเฉพาะราในสกุล *Penicillium* และ *Chaetomium* โดยมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสเมื่อมีการเหนี่ยวนำจากเดกซ์แทรน เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จากรามีแอกทิวิตีสูงกว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียและยีสต์ (Walker, 1978 และ Sun และคณะ, 1988) และยังสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย อีกทั้งเดกซ์แทรนเนสจากรายังหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ (extracellular

enzyme) ดังนั้นการผลิตเดกซ์แทรนเนสในทางการค้าจึงมักผลิตโดยใช้ราเป็นเซลล์ผู้ผลิตหลัก เช่น dextranase NOVO 50L ที่ผลิตจาก *P. lilacinum* (เดนมาร์ก) และ dextranase Hutten DL-2 ที่ผลิตจาก *C. gracile* (ญี่ปุ่น) แต่อย่างไรก็ตามราใช้เวลาในการผลิตนานกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้งรายังสร้างสารมัธยันตร์ทุติยภูมิอีกหลายชนิดที่อาจทำให้ยากต่อการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดย Leach (1969) พบว่า ราบางชนิดสามารถสร้างอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งออกมาในสภาวะที่มีการสร้างเดกซ์แทรนเนสด้วย อีกทั้งส่วนประกอบผนังเซลล์ของรา เช่น กลูแคน ยังส่งผลให้เกิดอาการแพ้ต่อสิ่งมีชีวิตได้อีกด้วย ดังนั้นการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากราจึงใช้ต้นทุนในการผลิตสูง ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากรานั้นเป็นการผลิตเมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยเดกซ์แทรนซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นถ้าสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้โดยไม่ต้องมีการเหนี่ยวนำ หรือใช้สารเหนี่ยวนำที่มีราคาถูก หาได้ง่าย และผลิตในเซลล์ผู้ผลิตที่ไม่สร้างสารมัธยันตร์ทุติยภูมิที่ไม่พึงประสงค์และเป็นเซลล์ที่เจริญได้รวดเร็วกว่าราแล้ว ก็จะทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและใช้เวลาในการผลิตที่รวดเร็วขึ้นซึ่งก็จะเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้มากตามไปด้วย

เนื่องจากราจัดเป็นยูแคริโอต ดังนั้นการผลิตโปรตีนชนิดต่างๆจากราจึงมีขั้นตอนที่แตกต่างจากโพรแคริโอต โดยเมื่อราถอดรหัสอาร์เอ็นเอออกมาแล้ว อาร์เอ็นเอดังกล่าวยังไม่สามารถทำหน้าที่ได้ จำเป็นต้องมีการดัดแปลงหลังจากการถอดรหัส เช่น การตัดสาย RNA ออกเป็นท่อนๆ เปลี่ยนแปลงบางส่วนของเบสหรือไรโบส (เช่น เติมหมู่เมทิล) และมีการขดม้วนตัวของสาย RNA ตลอดจนการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสภายในสายทำให้เกิดเป็นเกลียวคู่ (internal double helix) สำหรับชนิดของอาร์เอ็นเอที่ใช้ในการแปลรหัสเป็นโปรตีนคือ mRNA โดยการเปลี่ยนแปลงของ mRNA ที่สำคัญมีดังนี้ การเติม 5’ cap หรือ 7-เมทิลกวาโนซีน (7-methylguanosine) ที่ปลาย 5’ ของ mRNA การเติมพอลิเอ (poly A) (ประมาณ 150-200 นิวคลีโอไทด์) ที่ปลาย 3’ การตัดอินทรอนออก (intron splicing) เมื่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงสายอาร์เอ็นเอดังกล่าวเสร็จสิ้น อาร์เอ็นเอจะถูกส่งออกนอกนิวเคลียสเพื่อใช้ในการแปลรหัสเป็นสายเพปไทด์หรือโปรตีน บางครั้งหลังจากสายเพปไทด์ถูกสร้างขึ้นแล้วสายเพปไทด์หรือโปรตีนจะอยู่ในรูปที่ยังไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นหลังจากการผลิตโปรตีนออกมาแล้วจึงจำเป็นต้องมีกระบวนการการเปลี่ยนแปลงสายโปรตีนเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีสมบัติต่างๆ และมีโครงสร้างที่ถูกต้องเหมาะสม เช่น การตัดหมู่ฟอร์มิลออกจาก fmet การตัดเพปไทด์บางส่วนออก (proteolytic cleavage) การสร้างพันธะไดซัลไฟด์ที่ถูกต้องระหว่างซิสเทอีนภายในสายเดียวกันหรือระหว่างสาย การเติมหมู่ต่างๆ ที่หมู่-R ของกรดอะมิโนในสายเพปไทด์ เช่น หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) หมู่ฟอสเฟต

(phosphorylation) หมู่เมทิล (methylatiom) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) หมู่คาร์โบไฮเดรต (glycosylation) หมู่พรอสเทติกต่างๆ และการเกิดโครงสร้างระดับที่ 2 และที่ 3 (folding) เป็นต้น

ดังนั้นการแสดงออกโปรตีนที่ได้จากรานั้นจึงควรนำไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม ซึ่งเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้เพื่อการแสดงออกได้แก่ แบคทีเรียและยีสต์ ซึ่งในแบคทีเรียนั้นจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสาย mRNA หลังจากการถอดแบบ ดังนั้นถ้าจะนำโปรตีนที่ได้จากราไปแสดงออกในแบคทีเรียจึงจำเป็นต้องใช้ลำดับ cDNA จากรา และเพื่อให้ง่ายแก่การโคลนยีนและนำไปแสดงออกทั้งในแบคทีเรียและยีสต์จึงสามารถโคลนยีนได้โดยตรงจาก cDNA

การโคลนยีนและนำไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน

การโคลนยีน หมายถึง การแยกยีนใดยีนหนึ่งที่สนใจ และนำมาเพิ่มปริมาณให้ได้เท่าที่ต้องการ เพื่อใช้ในการศึกษา เช่น การควบคุมการแสดงออก หน้าที่ และความสำคัญของยีนนั้นในเซลล์ อาจจะถ่ายฝากยีนดังกล่าวลงในสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อผลิตสารหรือให้แสดงลักษณะบางประการ โดยในขั้นตอนแรกต้องเตรียมดีเอ็นเอก่อน ซึ่งวิธีการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับโคลนมีหลายวิธีเช่น ดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์ หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ซึ่งเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น เรียกว่า จีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจาก mRNA เรียกว่า cDNA (complementary DNA) เป็นดีเอ็นเอที่มาจากยีนที่มีการแสดงออกในอวัยวะหนึ่งในช่วงเวลาหนึ่งของชีวิต และสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี หรือใช้เอนไซม์ หรือใช้ร่วมกันทั้งวิธีทางเคมีและใช้เอนไซม์

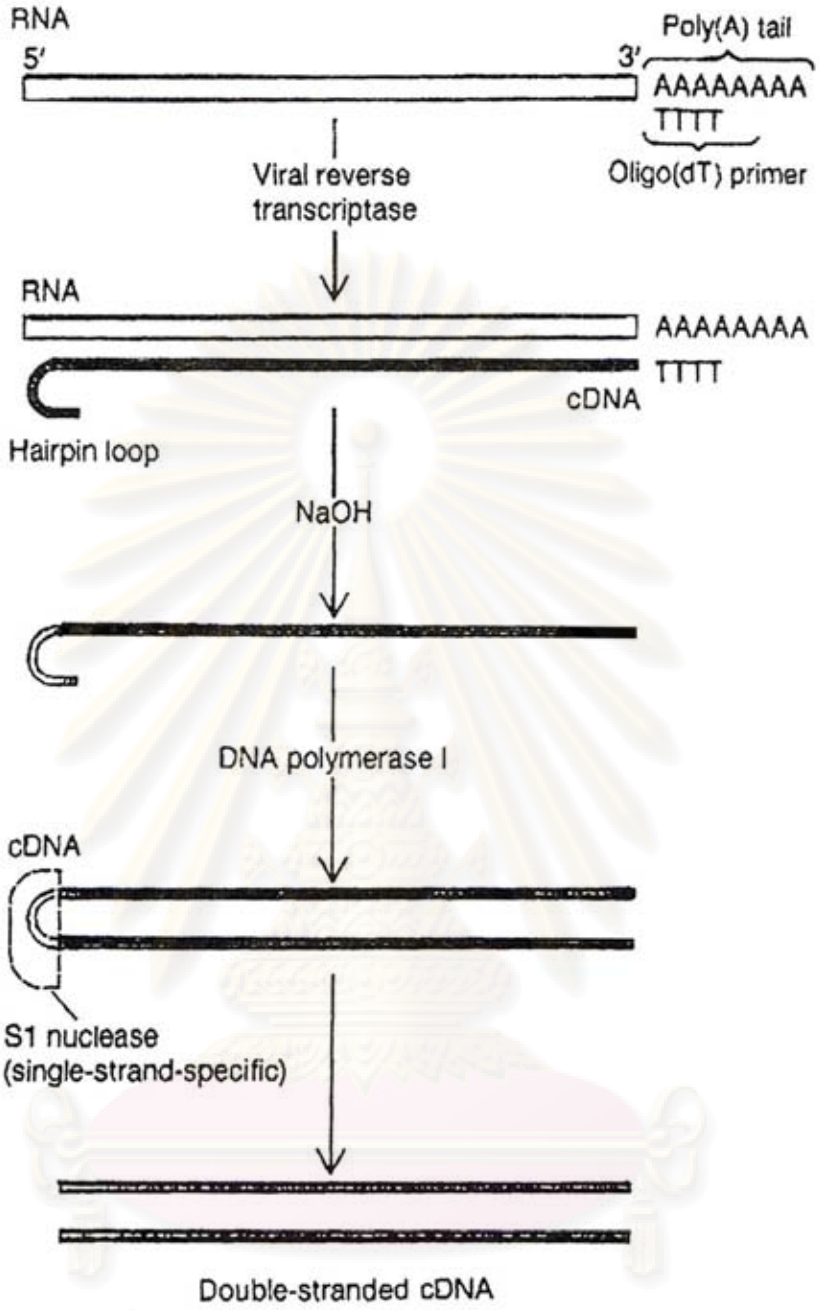
การสังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) จาก mRNA

การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA เป็นกระบวนการที่ต้องการความละเอียดรอบคอบและต้องระมัดระวังมาก เนื่องจาก mRNA มีช่วงอายุสั้นและจะถูกย่อยสลายไปได้ถ้ามีการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNase อาร์เอ็นเอที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เป็น rRNA และ tRNA ผลผลิตของ mRNA จะมีอยู่น้อยมาก ดังนั้นเมื่อนำมาใช้สังเคราะห์ cDNA ผลผลิตของ cDNA ที่ได้ก็ยิ่งต่ำลงอีก และอาจจะได้ cDNA ไม่ครบตามชนิดของ mRNA โดยเฉพาะ mRNA ชนิดที่มีปริมาณน้อยๆ ในเนื้อเยื่อนั้น การเตรียม complementary DNA (cDNA) จาก mRNA เป็นการเตรียมยีนที่ได้เพียงยีนบางยีนที่มีการแสดงออกในช่วงเวลาและในอวัยวะหนึ่งเท่านั้น ซึ่งเซลล์ดังกล่าวนี้บางชนิดจะมีการสร้าง mRNA สำหรับยีนตัวหนึ่งมากกว่ายีนอื่นๆ ทำให้อัตราส่วนของ

mRNA ชนิดนั้นมีอยู่ในอัตราสูง จึงเป็นข้อดีในกรณีที่ต้องการศึกษายีนสำหรับ mRNA ชนิดนั้น เช่น ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ยังอ่อนอยู่จะมีการสร้าง mRNA สำหรับฮีโมโกลบินจำนวนมาก ในท่อนำไข่ของไก่จะมีการสร้าง mRNA สำหรับโปรตีนโอวัลบูมินในปริมาณมากถึง 100,000 โมเลกุลต่อเซลล์ ขณะที่มีการสร้าง mRNA ชนิดอื่นๆ ประมาณ 12,507 ชนิด ในปริมาณรวมกันไม่ถึง 100,000 โมเลกุลต่อเซลล์ นั่นคือมี mRNA สำหรับโปรตีนโอวัลบูมิลอยู่มากกว่า 50% ของ mRNA ทั้งหมด นอกจากนี้ cDNA ที่ได้จากการลอกรหัสมาจาก mRNA จะเป็นส่วนของยีนที่ไม่มีอินทรอน เพราะ mRNA ที่อยู่ในไซโทพลาซึมได้ผ่านการตัดแต่งเอาอินทรอนออกเรียบร้อยแล้ว

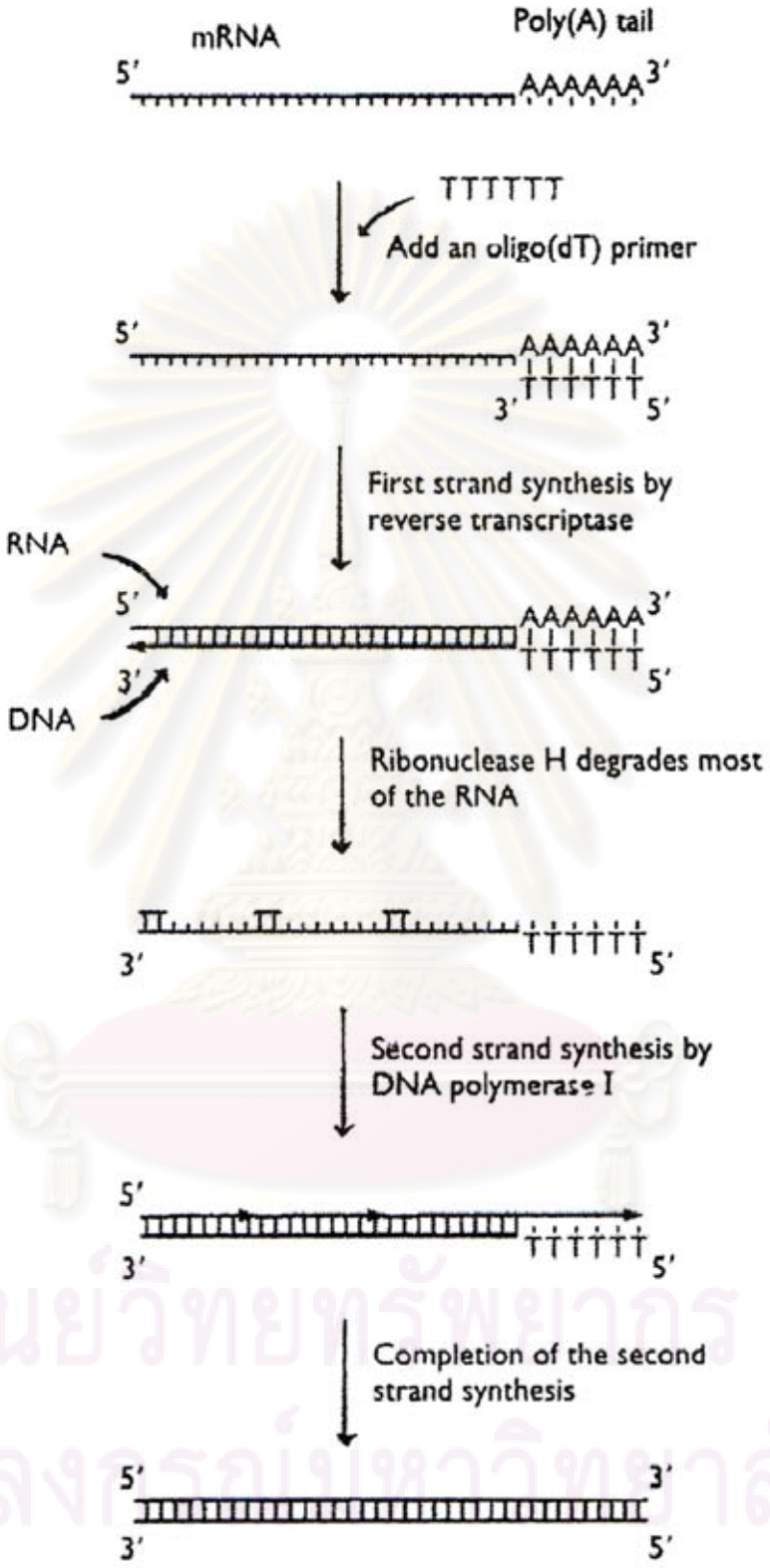
cDNA ที่ได้จากการลอกรหัสจาก mRNA ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิด ขั้นแรกต้องศึกษาก่อนว่ายีนที่สนใจนั้นมีการแสดงออกในอวัยวะใด และในช่วงเวลาใด แล้วจึงแยกสกัด mRNA จากเซลล์ดังกล่าวมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase วิธีดั้งเดิมที่ใช้กัน (classical method) รายงานในปี ค.ศ.1976 โดย Efstradiatis และคณะ (รูปที่ 2.3) โดยอาศัยคุณสมบัติของ mRNA ที่มีปลาย 3′ เป็นเบส A จำนวนมาก การสังเคราะห์ cDNA จึงเริ่มต้นโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยเบส T หลายๆเบส (oligo dT) เป็นไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะที่ปลาย 3′ ของ mRNA ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบส T และ A แล้วจึงสังเคราะห์ cDNA สายแรกในทิศทาง 5′ ไป 3′ โดยเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วจึงย่อยอาร์เอ็นเอออกไปโดยใช้ด่างเหลือเพียงสาย cDNA สายเดียว cDNA สายแรกนี้จะมีปลาย 3′ ที่วกกลับคล้ายตะขอ จึงสามารถสังเคราะห์ cDNA อีกสายหนึ่งได้ทันทีโดยไม่ต้องใช้ไพรเมอร์อีก โดยใช้เอนไซม์ polymerase จาก *E. coli* ได้ cDNA ที่เป็นเกลียวคู่ แต่มีปลายข้างหนึ่งเป็นปลายปิด ต้องใช้เอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอภายในสายและมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอช่วงที่เป็นสายเดี่ยว คือ S_1 nuclease มาตัดปลายด้านที่ปิดนี้ให้เปิดออกเป็นปลายทู่จึงจะสมบูรณ์ การสังเคราะห์ cDNA โดยวิธีนี้ปัญหาอยู่ตรงการสังเคราะห์ cDNA สายที่สองโดยใช้ปลายของ cDNA สายแรกที่วกกลับมาเป็นไพรเมอร์นั้น จะมีประสิทธิภาพไม่ค่อยดี cDNA ที่ได้มักจะไม่มากเท่าที่ควร นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ S_1 nuclease ตัดปลายปิดของดีเอ็นเอก็มีส่วนทำให้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดสั้นลงหรือมีปลายที่ยาวไม่เท่ากัน ทำให้นำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเออื่นได้ยาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA (Griffiths และคณะ, 1993)

ปี ค.ศ. 1983 Gubler และ Hoffman ได้ดัดแปลงวิธีเพิ่มเติม (modified method) พบว่าสามารถสังเคราะห์ cDNA ได้ประสิทธิภาพสูงขึ้นทั้งผลผลิตที่ได้และขนาดของ cDNA (รูปที่ 2.4) ขั้นตอนที่เปลี่ยนไปคือ การย่อยอาร์เอ็นเอออกใช้เอนไซม์ RNase H แทนการใช้ด่าง เอนไซม์นี้จะตัดอาร์เอ็นเอแบบสุ่มภายในสาย แล้วจึงใช้อาร์เอ็นเอที่ยังคงเกาะอยู่กับ cDNA สายแรกนี้เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA สายที่สองโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase I เสร็จแล้วจึงใช้เอนไซม์ T4 DNA polymerase เติมเบสที่ปลายสายดีเอ็นเอเพื่อให้เป็นปลายทู่อย่างสมบูรณ์



รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA โดยไม่ใช้เอนไซม์ S_1 nuclease (Brown, 1999)

ข้อดีของการโคลนยีนจาก cDNA คือ การตรวจหา cDNA ที่ต้องการสามารถทำได้ง่าย ไม่ต้องตรวจหาจากโคลนจำนวนมากนัก ได้ยีนที่ไม่มีอินทรอนดังนั้นสามารถนำไปแสดงออกในเซลล์ผู้รับที่ไม่มีกระบวนการดัดแปลงหลังการถอดรหัสได้

โดยเมื่อได้ดีเอ็นเอจากแหล่งที่ต้องการแล้ว ต้องนำมาเชื่อมต่อเวกเตอร์ (vector) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) แล้วจึงนำไปถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับ (host) เพื่อเพิ่มจำนวนได้ โดยถ้าแบ่งเวกเตอร์ตามวัตถุประสงค์ของการโคลนยีนสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน และเวกเตอร์สำหรับแสดงออก เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวนจะประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

1. ส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัว (origin of replication) ซึ่งทำงานได้ในเซลล์ผู้รับ

2. จุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (multiple cloning site)

3. ยีนสำหรับคัดเลือก (selectable marker) เป็นยีนที่กำหนดลักษณะที่สามารถตรวจสอบได้ เช่น ยีนสำหรับต้านยาปฏิชีวนะต่างๆ และยีนที่เกี่ยวกับวิถีการสังเคราะห์สารต่างๆ ภายในเซลล์

สำหรับเวกเตอร์สำหรับแสดงออกนั้นจะมีส่วนประกอบต่างๆเพิ่มเติมจากที่กล่าวมาแล้ว ดังนี้

1. โปรโมเตอร์ ซึ่งสามารถจดจำและควบคุมการแสดงออกได้ภายในเซลล์ผู้รับ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

- โปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive promoter)
- โปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกเมื่อมีการชักนำ (inducible promoter)

2. เทอร์มิเนเตอร์ เป็นส่วนที่ช่วยในการสิ้นสุดการถอดรหัส

เวกเตอร์จะทำหน้าที่สองอย่าง คือป้องกันไม่ให้ยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจถูกย่อยซึ่งถูกทำลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ผู้รับ และช่วยให้มีการจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มปริมาณและถ่ายทอดไปยังเซลล์รุ่นต่อไปได้ ช่วยให้ยีนที่ใส่เข้าไปนั้นแสดงออกในเซลล์ผู้รับ เวกเตอร์ที่จะใช้ขึ้นอยู่กับเซลล์ของผู้รับ ส่วนใหญ่เวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวนจะเพิ่มปริมาณหรือจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับเป็นจำนวนมาก ตั้งแต่ 100 โมเลกุลขึ้นไปจนถึง 10,000 โมเลกุลต่อหนึ่งเซลล์ได้ แต่สำหรับเวกเตอร์สำหรับแสดงออกอาจจะใช้เวกเตอร์จำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับเป็นจำนวนมากหรือน้อยก็ได้ แล้วแต่ความต้องการในการแสดงออกของโปรตีนนั้นๆ โดยถ้าต้องการผลิตโปรตีนให้ได้ปริมาณ

มากๆ มักจะเลือกใช้เวกเตอร์ที่จำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับเป็นจำนวนมาก แต่ถ้าโปรตีนที่ต้องการผลิตนั้นเป็นโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไปรบกวนการเจริญของเซลล์ มักจะเลือกใช้ชนิดเวกเตอร์ที่จำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับเป็นจำนวนน้อย ดังนั้นการเลือกเวกเตอร์เพื่อนำไปแสดงออกในเซลล์ผู้รับจึงจำเป็นต้องเลือกชนิดของเวกเตอร์ให้เหมาะสมกับเซลล์ผู้รับ และให้เหมาะสมกับปริมาณของโปรตีนที่ต้องการแสดงออก

หลังจากเชื่อมต่อยีนที่ต้องการโคลนเข้ากับเวกเตอร์แล้วจึงสามารถนำไปถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ผู้รับได้ วิธีการถ่ายโอนเวกเตอร์เข้าสู่เซลล์ทำได้หลายวิธี เช่น ทรานส์ฟอร์เมชัน (transformation) อิเล็คโทรโพเรชัน (electroporation) จากนั้นจำเป็นต้องคัดเลือกโคลนที่ต้องการโดยวิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการนั้นทำได้หลายวิธีขึ้นกับเวกเตอร์ที่ใช้และที่มาของโคลน ดังนี้

- การคัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotypic selection)
- การตรวจหาโดยวิธีทางอิมมูโนเคมี
- การตรวจหาโดยวิธีนิวคลีอิคแอซิดไฮบริดไดเซชัน (nucleic acid hybridization)

เซลล์ผู้รับสำหรับการแสดงออก

เซลล์ผู้รับที่ใช้ในการแสดงออกของยีน แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. โปรคาริโอต เช่น *E. coli*, *Bacillus subtilis* และอื่นๆ
2. ยูแคริโอต เช่น ยีสต์, รา, เซลล์สัตว์ต่างๆ, Chinese hamster ovary, เซลล์ตับ และอื่นๆ

โดยเซลล์ผู้รับทั้งสองมีความแตกต่างกัน คือ เซลล์ยูแคริโอตมีองค์ประกอบของเซลล์ที่ซับซ้อนมากกว่าโปรคาริโอต อีกทั้งในยูแคริโอตยังมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงหลังการถอดรหัสรวมถึงมีโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการ folding มากกว่าในโปรคาริโอต

การผลิตโปรตีนในโปรคาริโอต

การแสดงออกโปรตีนในโปรคาริโอต เป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขว้างเนื่องจากในโปรคาริโอตมีการศึกษากันเป็นจำนวนมาก ทำให้มีข้อมูลพื้นฐานต่างๆมากมาย ทำให้ง่ายแก่การนำมาใช้ประโยชน์ โปรคาริโอตที่นิยมใช้ในการแสดงออกของโปรตีนคือ *E. coli* โดยการผลิตโปรตีนนั้นอาจจะผลิตโปรตีนและอยู่ในไซโทรพลาซึม หรือผลิตและส่งออกไปเก็บไว้ในเพอริพลาซึมก็ได้ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตโปรตีนในโปรคาริโอตมีการแข่งขันกันระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลง

โครงสร้างโปรตีนให้ถูกต้องเหมาะสมซึ่งต้องอาศัย chaperone และกระบวนการส่งโปรตีนออกไปที่เพอริพลาซึม ซึ่งต้องอาศัย signal sequence โดย signal sequence มีความจำเป็นสำหรับการส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะผลิตโปรตีนให้มีโครงสร้างที่ถูกต้องเหมาะสมและหลั่งออกสู่นอกเซลล์ได้ การแสดงออกเกินของโปรตีนในโปรคาริโอต (*E. coli*) ส่วนใหญ่มักจะเกิดการรวมตัวกันของโปรตีนเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า อินคลูชันบอดี (inclusion bodies) (Kane และ Hartley, 1988) ดังนั้นการแสดงออกเกินในโปรคาริโอตมักจะต้องมีการแยกโปรตีนดังกล่าวออกจากเซลล์และนำมาผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงให้โปรตีนมีโครงสร้างที่ถูกต้องเหมาะสมในหลอดทดลอง (in vitro folding methods) ต่อไป (Rudolph และ Lilie, 1996) ผลิตโปรตีนในโปรคาริโอตมีข้อดีและข้อเสียดังนี้

ข้อดี

- มีการศึกษาเป็นจำนวนมาก
- ทำได้ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก เมื่อเทียบกับยูแคริโอต
- การแสดงออกของโปรตีนควบคุมได้ง่าย
- เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้ง่าย ทำให้สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก

ข้อเสีย

- โปรคาริโอตไม่มีกระบวนการเปลี่ยนแปลง mRNA หลังการถอดรหัส จึงไม่สามารถแสดงออกยีนที่มีอินทรอนได้
- โปรตีนที่ผลิตได้มักอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ และเกิดการรวมตัวกันเป็นอินคลูชันบอดี
- กระบวนการดัดแปลงโปรตีนหลังการแปลรหัสมีน้อย เช่น ไม่สามารถเติมหมู่น้ำตาลให้แก่สายเพปไทด์ได้ ดังนั้นโปรตีนที่ผลิตได้จึงไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้
- โปรคาริโอตส่วนใหญ่ไม่เป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมการหมัก

ตัวอย่างการแสดงออกโปรตีนในโปรคาริโอต

Liu และคณะ (2007) โคลนยีน human LKB1 tumor suppressor โดยมีการเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนฮิสทิดีน 6 หมู่และนำไปแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และ Rosetta-gami(DE3)pLysS พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้หลังจากชักนำด้วย IPTG 0.8 มิลลิโมลาร์ จากสายพันธุ์ BL21(DE3) คิดเป็น 34.8 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมด และคิดเป็น 8.1 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein) สำหรับสายพันธุ์ Rosetta-gami(DE3)pLysS สามารถผลิตได้ 39.3

เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมด และคิดเป็น 34.1 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนที่ละลายได้หลังจากผลิตโปรตีนและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ โปรตีนที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ BL21(DE3) มีค่าเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโปรตีนที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ Rosetta-gami(DE3)pLysS มีค่าเท่ากับ 92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

De-la-Re-Vega และคณะ (2004) โคลนยีนที่ผลิต lysozyme จากกุ้งทะเล (*Penaeus vannamei*) และนำไปแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta Gami โดยควบคุมการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ T7 พบว่าสามารถผลิต lysozyme ได้แต่เกิดการสะสมเป็นอินคลูซันบอดีภายในเซลล์ แต่เมื่อแยกอินคลูซันบอดีออกมาจากเซลล์และนำมา refolding ในหลอดทดลอง พบว่าสามารถทำให้โปรตีนกลับมาทำงานได้ประมาณ 10%

Yano และคณะ (2006) ได้โคลนยีน แอลฟา-1, 3-กลูคาเนส จาก *Bacillus circulans* KA-304 และนำไปแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta Gami B(DE3) โดยควบคุมการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ T7 เมื่อชักนำการแสดงออกด้วย IPTG พบว่า สามารถตรวจสอบแอกทิวิตีได้จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ 6.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเมื่อตรวจสอบพบว่าโปรตีนที่ผลิตได้อยู่ทั้งในส่วนที่สามารถละลายได้ (soluble fraction) และส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ (insoluble fraction) ภายในเซลล์อีกด้วย

การผลิตโปรตีนในยูคาริโอต

สำหรับการโคลนยีนในยูแคริโอตนั้น สิ่งมีชีวิตที่นิยมใช้กันมาก คือ ยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นยูแคริโอต เนื่องจากยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวมีการสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วเมื่อเทียบกับเซลล์ยูแคริโอตชนิดอื่นๆ สามารถเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารแข็งก็ได้ การเจริญเติบโตบนอาหารแข็งจะมีลักษณะเป็นโคโลนีคล้ายกับแบคทีเรีย ซึ่งทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกทรานฟอร์แมนท์ อีกทั้งการศึกษาจีโนมของยีสต์ในปัจจุบันนั้นยังเจริญก้าวหน้าอย่างมาก ในยีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* และ *Candida albican* มีการศึกษาจนทราบจีโนมทั้งหมดแล้ว ดังนั้นการนำยีสต์ไปใช้ในการแสดงออกของโปรตีนจึงทำได้ง่าย อีกทั้งในยีสต์ยังมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงหลังการถอดรหัสเหมือนยูแคริโอตทั่วไป อีกทั้งยังมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงสายเพปไทด์หลังการแปลรหัสที่ใกล้เคียงกับยูแคริโอตชั้นสูงอีกด้วย ทำให้โปรตีนที่ผลิตขึ้นมามีโครงสร้างที่ถูกต้องเหมาะสมและส่วนใหญ่สามารถทำงานได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ยูแคริโอตมีข้อดีและข้อเสียดังนี้

ข้อดี

- มีกระบวนการปรับแต่งให้โปรตีนอยู่ในรูปร่างที่ถูกต้องเหมาะสม

- มีการเติมหมู่ต่างๆ ให้กับโปรตีน ทำให้โปรตีนสามารถทำงานได้ เช่น การเติมหมู่น้ำตาลต่างๆ (glucosylation) ในตำแหน่งที่ถูกต้องเหมาะสม มีความสำคัญอย่างยิ่งในการขดพับของโปรตีนที่ถูกต้องเหมาะสม และสามารถป้องกันการจับรวมตัวกัน (aggregation) ภายใน ER (endoplasmic reticulum)

- การผลิตโปรตีนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

- สามารถผลิตโปรตีนและหลั่งออกสู่นอกเซลล์ได้ง่าย เช่น รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แสดงออกโดยมี signal sequence จะช่วยในการหลั่งออกสู่นอกเซลล์ได้ โดยคุณสมบัติของ signal sequence ทั่วไปที่ช่วยในการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ ประกอบด้วย 3 โดเมนหลัก ดังนี้

1. ประจุสุทธิปลายด้านกรดอะมิโนของสายเพปไทด์จะเป็นประจุบวก
2. มักจะมีกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic ประมาณ 7-16 หมู่
3. ด้านปลายคาร์บอกซีของ signal sequence มักจะเป็น proline หรือ glycine

- สามารถนำไปเลี้ยงในกระบวนการหมักได้เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว

- เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

ข้อเสีย

- เซลล์ยูคาริโอตมีโครงสร้างที่ซับซ้อนทำให้ต้องใช้ขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่าเซลล์โปรคาริโอต

- บางครั้งการเติมหมู่ต่างๆให้สายเพปไทด์มีมากเกินไป เช่น hyperglycosylation ทำให้เมื่อนำโปรตีนที่ผลิตได้ไปใช้กับมนุษย์ทำให้ก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ง่าย

ตัวอย่างการแสดงออกโปรตีนในยูแคริโอต

Morawski และคณะ (2000) ได้โคลนยีน HRP เข้าในเวกเตอร์ pYEX-S1 สำหรับนำไปผลิตโปรตีน horseradish peroxidase เพื่อนำไปแสดงออกใน *S. cerivisiae* สายพันธุ์ BJ5462 โดยการแสดงออกของ horseradish peroxidase ถูกควบคุมการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ phosphoglycerate kinase ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลาในระหว่างการเจริญของยีสต์ และยีน HRP ยังเชื่อมต่ออยู่กับส่วนแอลฟาแฟกเตอร์ทางด้านคาร์บอกซิลิกซึ่งเป็นส่วนที่แปลรหัสให้ leader peptide และช่วยในการขนส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ พบว่าเมื่อเลี้ยง *S. cerivisiae* สายพันธุ์ BJ5462 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดดังกล่าวในอาหาร YEPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยีสต์ดังกล่าวสามารถผลิต horseradish peroxidase ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ถึง 25 หน่วยต่อลิตร

พรพิมล เมธีนุกูล (2005) ได้โคลนยีนเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจากเมล็ดไม้พะยูงไทย (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) และนำไปแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และ AD494(DE3), *S. cerevisiae* สายพันธุ์ BJ5462 และ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ GS115 พบว่าการแสดงออกของบีตา-กลูโคซิเดสใน *P. pastoris* ให้แอกทิวิตีที่สูงที่สุด และค่า Km, อุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจากเมล็ดไม้พะยูงไทย

Kiiskinen และ Saloheimo (2004) โคลนยีน laccase จากราที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophilic fungus) คือ *Melanocarpus albomyces* และนำไปแสดงออกใน *S. cerevisiae* โดยควบคุมการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ GAL1 พบว่า laccase ที่ผลิตได้มีปริมาณต่ำมาก แต่เมื่อแทนที่signal peptide จาก *M. albomyces* ด้วยแอลฟาเฟกเตอร์ของ *S. cerevisiae* ทำให้สามารถผลิต laccase ได้สูงขึ้น และมีการผลิตสูงขึ้นเป็น 6 เท่า เมื่อมีการเติมรหัสหยุด (stop codon) เข้าไปทางปลายด้านคาร์บอกซี

การศึกษาเกี่ยวกับการโคลนยีนเดกซ์แทรนเนส

จากการศึกษาเกี่ยวกับยีนเดกซ์แทรนเนสและเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส พบว่าขนาดของยีนเดกซ์แทรนเนสและขนาดของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสมีความหลากหลายดังแสดงในตารางที่ 2.1 และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสต่างๆมาเปรียบเทียบความเหมือนและจัดกลุ่ม พบว่า เดกซ์แทรนเนสที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่เหมือนกันแม้ว่าจะมีความแตกต่างกันภายในโครงสร้างที่ 1 ของโปรตีน (primary protein structure) ระหว่างเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากแต่จุลินทรีย์ (Khalikova และคณะ, 2005) จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเดกซ์แทรนเนสที่มีการรายงานอยู่แล้วในฐานข้อมูลต่างๆโดยใช้โปรแกรม PileUp พบว่าเดกซ์แทรนเนสมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) 9 บริเวณ ซึ่งคาดว่าบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส แต่จากการศึกษาต่างๆยังไม่มีการระบุหน้าที่ของแต่ละบริเวณอนุรักษ์อย่างชัดเจน มีเพียงบางบริเวณอนุรักษ์เท่านั้นที่ทีการกล่าวถึง เช่น บริเวณอนุรักษ์ที่ 3 เป็นบริเวณอนุรักษ์ที่พบในเอนไซม์ที่สามารถย่อยเดกซ์แทรนได้ บริเวณอนุรักษ์ที่ 4 เป็นบริเวณที่พบว่าเป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ (catalytic site) และบริเวณอนุรักษ์ที่ 8 และ 9 เป็นบริเวณที่ใช้จับกับเดกซ์แทรน (dextran binding domain) เป็นต้น (Tamura และคณะ, 2007)

ตารางที่ 2.1 แสดงขนาดของยีนเดกซ์แทรนเนสและขนาดของโปรตีนเดกซ์แทรนเนส (Khalikova และคณะ, 2005)

ชนิดของจุลินทรีย์	ขนาดของเดกซ์แทรนเนสยีน (คู่เบส)	ขนาดของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (กิโลดาลตัน)
Streptococcus sobrinus	3,999	80-130 (*E. coli* expressed); 160-260 (native)
Streptococcus mutans Ingbritt (endodextranase)	1,610	70, 105, 120 (native)
Streptococcus salivarius PC-1	-	70, 90, 190 (*E. coli* expressed); 110 (native)
Arthrobacter sp. strain CB-8	1,920	62 (native)
Arthrobacter globiformis T6	1,926	66 (native)
Streptococcus mutans Ingbritt (exodextranase)	2,550	88, 104, 118, 133 (*E. coli* expressed); 96, 108, 167 (native)
Streptococcus salivarius M-33	2,469	86 (native)
Penicillium minioluteum HI-4	2,109	67 (*E. coli* expressed)
Streptococcus suis	1,629	62 (native)
Bacillus circulans T-3040	3,000	110 (*S. gordonii* expressed)
Arthrobacter globiformis T-3044	3,153	120 (*A. globiformis* และ *E. coli* expressed)
Brevibacterium fuscum var. *dextranolyticum* strain 0407	1,923	68 (*E. coli* expressed)
Penicillium minioluteum HI-4	1,859	-
Streptococcus downei	3,891	220 (native); 210 (*E. coli* expressed) + multiple smaller forms
Streptococcus rattus	2,760	100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาต่างๆ ที่มีการโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสและนำไปแสดงออกในแบคทีเรียและยีสต์มีมากมายเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น

Garcia และคณะ (1996) ได้โคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA ของ *P. minioluteum* HI-4 โดยนำ cDNA ที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสไปแสดงออกโดยใช้ *Escherichia coli* T7 พบว่า cDNA ขนาด 2,109 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วย poly(A) tail สามารถแปลรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนขนาด 608 หมู่ ซึ่งที่ปลายทางด้านอะมิโนของสายเพปไทด์ (N-terminus) ประกอบด้วยกรดอะมิโนขนาด 20 หมู่ ที่คาดว่าเป็นส่วนของ signal sequence

Mizuno และคณะ (1999) โคลนยีนไอโซมอลโทไทรโอสเดกซ์แทรนเนสจาก *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* สายพันธุ์ 0407 และนำไปแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS และ BL21(DE3) พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้หลังจากชักนำด้วย IPTG 0.5 มิลลิโมลาร์ มีสมบัติเหมือนเดิมทุกประการและสามารถผลิตไอโซมอลโทไทรโอสเดกซ์แทรนเนสได้ 0.1 หน่วยต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตโดยสายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS และ 0.02 หน่วยต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตโดยสายพันธุ์ BL21(DE3)

Li และคณะ (2006) ได้โคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *P. minioluteum* (สายพันธุ์ IMI068219) และนำไปแสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* โดยนำส่วนของดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสให้เดกซ์แทรนเนสไปเชื่อมต่อกับ alpha-factor signal sequence และแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ GAL1 ซึ่งใช้กาแลคโทสเป็นตัวชักนำการแสดงออก พบว่า *S. cerevisiae* สามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสและหลั่งออกนอกเซลล์ได้ โดยมีแอกทิวิตี 0.63 หน่วยต่อมิลลิลิตรและเดกซ์แทรนเนสภายในเซลล์มีแอกทิวิตี 0.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Roca และคณะ (1996) ได้แสดงออกเดกซ์แทรนเนสจาก *P. minioluteum* ใน *Pichia pastoris* ภายใต้โปรโมเตอร์แอลกอฮอล์ออกซิเดส 1 (AOX1 promoter) และใช้ลำดับกรดอะมิโนจากยีน SUC2 จาก *S. cerevisiae* เป็น signal sequence พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 574 หมู่ และสามารถหลั่งออกนอกเซลล์หลังจากชักนำด้วยเมทานอลได้และมีแอกทิวิตีสูงถึง 98 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีแอกทิวิตีจำเพาะประมาณ 950 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีค่า Km เท่ากับ 2.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันกับเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *P. miniolutium* นอกจากนี้ปลายด้านอะมิโนของสายเพปไทด์ยังมีลักษณะเหมือนกันทุกประการกับที่พบในราอีกด้วย และเมื่อนำไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพพบว่า ได้ผลผลิตเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นกว่า 30 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า

จากการศึกษาราที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ โดย เอก แสงวิเชียร (2531) ซึ่งได้คัดแยก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้นั้น ต่อมา สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) ได้กลายพันธุ์ราสายพันธุ์ดังกล่าวจนได้ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่สามารถเดกซ์แทรนเนสได้ 330.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร และศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ (2547) ได้หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส ทำให้ *Penicillium* sp. SMCU 3-14 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูงถึง 600 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในภาวะที่เหมาะสมคือ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใน 0.045 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเบส 4.5 ซึ่งแสดงว่าเดกซ์แทรนเนสจากราสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงและในสภาพที่เป็นกรด ซึ่งเหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาล นอกจากนี้จากการศึกษาของ พัชราวดี บุตรทา (2548) พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จากราสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทำงานได้ที่ค่าความเป็นกรดเบสตั้งแต่ 3.0-6.0 และที่อุณหภูมิตั้งแต่ 35-55 องศาเซลเซียส ซึ่งจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านทันตสาธารณสุขและด้านอื่นๆได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามการผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 เป็นการผลิตที่ต้องอาศัยการเหนี่ยวนำด้วยเดกซ์แทรนซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นถ้าสามารถนำเดกซ์แทรนเนสจากราสายพันธุ์ดังกล่าวไปแสดงออกในแบคทีเรียหรือยีสต์ได้โดยไม่ต้องมีการเหนี่ยวนำหรือใช้สารเหนี่ยวนำที่มีราคาถูกได้ จะสามารถช่วยลดระยะเวลาในการผลิต อีกทั้งเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย ทั้งนี้ พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี (2549) ได้โคลนและหาลำดับจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 แล้ว (GenBank Accession No. EU635729) และพบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสบนโครโมโซมมีเพียง 1 ชุด มีกรอบอ่านรหัสเปิดขนาด 1,824 คู่เบส ไม่มีอินทรอน และประมวลรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 608 หมู่ ซึ่งที่บริเวณปลาย N-terminal พบ signal peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนยาว 20 หมู่ (ภาคผนวก ค1) นอกจากนี้ยังพิสูจน์เอกลักษณ์ของราสายพันธุ์ดังกล่าวแล้วพบว่าเป็น *Penicillium pinophilum* อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส และเพื่อยืนยันผลของลำดับจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนส งานวิจัยนี้จึงโคลน cDNA ของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* สายพันธุ์ SMCU 3-14 เพื่อนำไปแสดงออกในแบคทีเรียและยีสต์ โดยการแสดงออกในแบคทีเรียนั้นมีการเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนฮิสทิดีน 6 หมู่ด้านปลายคาร์บอกซีของสายพอลิเพปไทด์ เพื่อที่สามารถนำเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ จากนั้นนำไปแสดงออกใน *E. coli* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ BL21(DE3)pLysS และ Rosetta-gami(DE3)pLysS ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ T7 และการแสดงออกในยีสต์มีการเชื่อมต่อกับ signal sequence ทางด้านปลายอะมิโนเพื่อให้เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตออกมาสามารถหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ และแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ phosphoglycerate kinase ซึ่งเป็นโปร

โมเตอร์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลาในระหว่างการเจริญของยีสต์ ดังนั้นระหว่างที่ยีสต์เจริญเติบโตจะสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ตลอดเวลา โดยงานวิจัยนี้มุ่งที่จะผลิตเดกซ์แทรนเนสที่ไม่ต้องอาศัยการเหนี่ยวนำจากเดกซ์แทรน และให้เอนไซม์ที่ได้มีคุณสมบัติเหมือนกันกับเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากรา เพื่อที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาที่เกิดจากเดกซ์แทรนในด้านต่างๆ ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P Sartorius, USA
2. เครื่องชั่ง รุ่น AG 204 Mettler Toledo, Switzerland
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybermetics, Singapore
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Thermo Spectronic, USA
5. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, USA
6. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, USA
7. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) บริษัท Memmert, Germany
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14 รุ่น W760 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany และชนิดที่ประกอบเข้ากับเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan ซึ่งต่อเข้ากับ
    - เครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-110 บริษัท Eyela, Japan
    - เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S บริษัท Eyela, Japan
10. ตู้เขี่ยเชื้อ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124, USA
11. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) บริษัท Memmert, Germany
12. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) บริษัท Memmert, Germany
13. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko,Ltd., Japan
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J-301 บริษัท Backman, Germany

16. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H บริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
17. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°ซ บริษัท Forma Scientific, USA
18. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan
19. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab Thermo-block SLTDB-120 บริษัท Seoulin Bioscience, Korea
20. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (speed vacuum) บริษัท Eppendorf AG, Germany
21. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan
22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA
23. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One Version 4.4.1 บริษัท Bio-Rad, USA
24. เครื่อง hybridization oven บริษัท Thermo electron, USA
25. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
    - Mini gel electrophoresis system บริษัท Mupid-2 Advance, Japan
    - i-Myrun electrophoresis complete system บริษัท Cosmo bio, Japan
26. ชุดเครื่องมือทำ SDS-PAGE Mini-PROTEAN Tetra Cell บริษัท Bio-Rad, Japan
27. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น UNILUX-12 บริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
28. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P10 P100 P200 P1000 และ P5000 บริษัท Nichiryo, Japan และบริษัท Gilson, France
29. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร บริษัท Nissho Nipro, Japan
30. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร และ 0.22 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC บริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
31. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 บริษัท Whatman International Ltd., England
32. ฮีมาไซโทมิเตอร์ (haemacytometer) บริษัท Schott Duran, Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดอะมิโน ของบริษัท Fluka, Germany ดังนี้
   - ลิวซีน (leucine)
   - ฮิสทิดีน (histidine)
   - ทริปโตเฟน (tryptophane)
3. อะดีนีน (adenine) ของบริษัท Fluka, Germany
4. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
5. กลีเซอรอล ของบริษัท Merck, Germany
6. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Fluka, Japan
7. กานามัยซิน (kanamycin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
8. ไกลซีน (glycine) ของบริษัท Amersham Biosciences, Sweden
9. คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
10. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
11. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
12. ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR GeneJET™PCR Cloning Kit ของบริษัท Fermentas, USA
13. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit ของบริษัท Roche, Germany
14. ชุดทำบริสุทธิ์โปรตีน His Bind® Purification Kits ของบริษัท Novagen, USA
15. ชุดแยก mRNA PolyATtract mRNA Isolation System III ของบริษัท Promega, USA
16. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
17. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
18. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ e-Zi RNA kit ของบริษัท Sunolin corporation, Thailand
19. ชุดสร้างสาย cDNA Universal Riboclone cDNA Synthesis System ของบริษัท Promega, USA
20. ซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany
21. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
22. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
23. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24. บลูเดกซ์แทรน (blue dextran) ของบริษัท Sigma, USA
25. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
26. ผงสกัดจากยีสต์ที่ปราศจากกรดอะมิโน (yeast nitrogen base without amino acid) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
27. เพปโตน (peptone) ของบริษัท Merck, Germany
28. 2-โพรพานอล (2-propanol) ของบริษัท Merck, Germany
29. โพแทสเซียมอะซีเทต (CH_3COOK) ของบริษัท Merck, Germany
30. ฟอร์มาไมด์ (formamide) ของบริษัท Bio Basic Inc., Canada
31. ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ของบริษัท Carlo ERBA, France
32. มังกะนีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
33. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
34. รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) ของบริษัท Sigma, USA
35. ลิเธียมอะซีเทต (lithium acetate) ของบริษัท Sigma, USA
36. สารละลายฟีนอลอิ่มตัว (equilibrated phenol, ultrapure) ของบริษัท USB, USA
37. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ของบริษัท Fluka, Germany
38. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท Bio-Rad, USA
39. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ของบริษัท New England Biolabs, USA
40. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I, *Kpn*I, *Bgl*II และ *Sac*I ของบริษัท Fermentas, USA
41. เอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) ของบริษัท Finnzymes, Finland
42. เอนไซม์ T4-ดีเอ็นเอไลเกส (T4- DNA ligase) ของบริษัท New England BioLabs, USA
43. แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
44. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของบริษัท BioLabs, USA
45. Coomassie brilliant blue R250 ของบริษัท Fluka, Germany
46. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท SibsEnzyme, Russia
47. DEPC ของบริษัท Bio Basic Inc., Canada
48. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA
49. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder ของบริษัท Fermentas, USA
50. GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus ของบริษัท Fermentas, USA
51. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA
52. 2-mercaptoethanol ของบริษัท BioLabs, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

53. MOPS, FREE ACID ของบริษัท Bio Basic Inc., Canada
54. 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid ของบริษัท Sigma, USA
55. PEG (polyethylene glycol) ของบริษัท Sigma, USA
56. *Pfu* DNA polymerase ของบริษัท Fermentas, USA
57. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA
58. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
59. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท New England BioLabs, USA
60. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) ของบริษัท USB Corporation, UK
61. Triton X-100 ของบริษัท USB Corporation, UK
62. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma USA
63. X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-galactoside) ของบริษัท Fermentas, USA

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 รา

รา *Penicillium pinophilum* สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นเชื้อที่ได้จากการคัดแยกโดย เอก แสงวิเชียร (2531) และปรับปรุงสายพันธุ์โดย สุวรรณา นพพรพันธ์ (2538) ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

3.3.2 แบคทีเรีย

แบคทีเรียและจีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 จีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	จีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
Escherichia coli DH5α	*supE*44, *deoR*, Δ*lac*U169(φ80*lacZ*ΔM15), *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1	Hanahan, 1983
Escherichia coli BL21(DE3)pLysS	F-*ompT* $hsdS_B(r_B\text{-}m_B\text{-})$ *gal dcm* (DE3)pLysS (CamR)	Novagen, Germany
Escherichia coli Rosetta-Gami B(DE3)pLysS	F- *ompT* $hsdS_B(r_B\text{-}m_B\text{-})$ *gal dcm lacY1 ahpC* (DE3) *gor522::*Tn*10 trxB* pLysSRARE (CamR, KanR, TetR)	Novagen, Germany

3.3.3 ยีสต์

ยีสต์และจีโนไทป์ของยีสต์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 จีโนไทป์ของยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีสต์	จีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae BJ5462	MATα ura3 leu2 pep4::HIS3 prb1 trp1 can1	Gietz, 1992

3.4 พลาสมิดและไพรเมอร์

พลาสมิดและไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 ลักษณะสมบัติของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิด	ลักษณะสมบัติ	เอกสารอ้างอิง
pJET1/blunt Cloning Vector	Apr, *eco471R*, P_{lacUV5}	บริษัท Fermentas, USA
pETHis	Apr, P_{T7}	National BioResource Project, Japan
pCS24	Kmr, P_{cspA}	National BioResource Project, Japan
pYEX-S1	Apr, P_{PGK}, *URA3, leu2-d*	Clontech Laboratories, Canada
pNA-1	Apr, พลาสมิด pJET1/blunt Cloning Vector ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ Dex14F และ Dex14R ขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส แทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้
pNAT2	Apr, พลาสมิด pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนส ขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส แทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้

pNAC9	Kmr, พลาสมิด pCS24 ที่มียีนเดกซ์แทรนเนส ขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบส แทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้
pNAH6	Apr,พลาสมิด pETHis ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เชื่อมต่ออยู่กับ His tag ทางด้าน 3' แทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้
pNAH29	Apr,พลาสมิด pETHis ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เชื่อมต่ออยู่กับ His tag ทางด้าน 3' และไม่มี 101 คู่เบสทางด้าน 5' ซึ่งเป็นส่วนของ signal sequence แทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้
pNAY44	Apr, P_{PGK}, *URA3, leu2-d*, พลาสมิด pYEX-S1 ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ Dex16F และ Dex16R ขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส แทรกอยู่	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และค่า T_m ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	เอกสารอ้างอิง
T7 promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (56.3°ซ)	Sambrook และ Russell, 2001
T7 terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (60.2°ซ)	Sambrook และ Russell, 2001
Dex1F	5'-TCTGTACCTGGTGGCATGATTC-3' (59.0°ซ)	พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี, 2549
Dex1R	5'-TCGCTAATTTGACTTGAGATGC-3' (58.2°ซ)	พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี, 2549
Dex2F	5'-TTCCCACCAGGTGTATACTG-3' (55.6°ซ)	พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี, 2549
Dex2R	5'-TGTCGATTGTCACTCCACTG-3' (55.6°ซ)	พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี, 2549

Dex12R	5'-TTGAATCTAGTGTGTTGCTG-3' (54.8°ซ)	พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี, 2549
Dex14F	5'-CTCAAACATATGCCCACAATG-3' (58.7°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex14R	5'-AGCTGGAGGATCCCTAATCTG-3' (62.6°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
YEX-F1	5'-CAAGAAATACATATTTGGTC-3' (60.0°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex16F	5'-GAAGGAGCTCTACATATGCCCAC-3' (64.6°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex16R	5'-TTCCTTTCGAGCTCTGTTAGCAGC-3' (64.6°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex17F	5'-TAAAGGGGTACCCATATGGGCACT-3' (64.6°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้
Dex17R	5'- TGTTAGCAGCCAGATCTCAGTG-3' (62.7°ซ)	ออกแบบในการทดลองนี้

3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.5.1 การเก็บรักษารา

3.5.1.1 การเก็บรักษารา ในระยะสั้น

เขี่ยเส้นใยรา *P. pinophilum* สายพันธุ์ SMCU 3-14 ลงบนอาหารแข็งเอียง Fukumoto (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

3.5.1.2 การเก็บรักษาในระยะยาว

นำสปอร์มาทำไลโอฟิไลซ์ (lyophilization) และเก็บรักษาในรูปสปอร์แห้ง

3.5.2 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.2.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น

เลี้ยง *E. coli* บนอาหารแข็งเอียง LB (ภาคผนวก ก6) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

3.5.2.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว

เลี้ยง *E. coli* ในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก5) โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอล 1:1 โดยปริมาตร โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มล. และความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเท่ากับ 40% บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 1 ปี

3.5.3 การเก็บรักษายีสต์

3.5.3.1 การเก็บรักษายีสต์ในระยะสั้น

เลี้ยง *S. cerevisiae* บนอาหารแข็งเอียง YPD (ภาคผนวก ก8) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.3.2 การเก็บรักษายีสต์ในระยะยาว

เลี้ยง *S. cerevisiae* ในอาหารเหลว YPD (ภาคผนวก ก7) โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอล 1:1 โดยปริมาตร โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มล. และความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเท่ากับ 40% บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 1 ปี

3.6 การเลี้ยงราเพื่อชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสและการเก็บตัวอย่างเส้นใย

เขี่ยเส้นใยรา *P. pinophilum* สายพันธุ์ SMCU 3-14 ลงบนอาหารแข็ง Fukumoto (ภาคผนวก ก1) สำหรับผลิตสปอร์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ โดยเติม tween-80 ความเข้มข้น 0.1% ในน้ำ ลงบนผิวหน้าอาหารที่มีสปอร์ของราอยู่ และใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหาร แล้วนับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโทมีเตอร์ จากนั้นถ่ายสารแขวนลอยของสปอร์จำนวน 2×10^7 สปอร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Fukumoto (1971) ที่ปรับปรุงโดย ศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ (2547) (ภาคผนวก ก2) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่มีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่ความเข้มข้น 0.94% เป็นตัวชักนำเพื่อการผลิตเอนไซม์ สำหรับชุดควบคุมผลลบถ่ายสารแขวนลอยสปอร์จำนวน 2×10^7 สปอร์ ลงในอาหารที่ไม่มีการชักนำด้วยเดกซ์แทรนโดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 5% เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเส้นใยโดยการกรองและไลโอฟิไลซ์ ที่เวลา 3 5 7 9 11 13 และ 15 วัน

3.7 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเส้นใยและการทดสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี northern hybridization

3.7.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเส้นใย

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเส้นใยที่ได้จากข้อ 3.6 ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและบรรจุไนโตรเจนเหลว จากนั้นบดจนเส้นใยเป็นผงละเอียด สกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุด e-Zi RNA kit (ภาคผนวก ข2) โดยเติมบัฟเฟอร์ RA ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ RB

ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนกระทั่งบัฟเฟอร์ละลายจนหมด จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RA ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และดูดของผสมใส่หลอดไมโครฟิวจ์ นำไปผสมโดยใช้เครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ RC ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปผสมโดยใช้เครื่องผสมสารเป็นเวลา 20 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ RD ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ RE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดีดหลอดจนตะกอนละลายหมด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% ที่เตรียมด้วยน้ำ DEPC (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ดูดส่วนใสด้านบนออกให้หมดด้วยไมโครปิเปตต์ ระเหยแห้งตะกอนด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ ละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ

3.7.2 การวัดปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

นำสารละลายอาร์เอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) จากนั้นคำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ซึ่งค่าที่เหมาะสมสำหรับสารละลายอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ควรจะอยู่ในช่วงประมาณ 2.0 ถ้าน้อยกว่า 2.0 แสดงว่ามีดีเอ็นเอหรือโปรตีนปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอจากสมการ

อาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 40 x dilution factor

แบ่งตัวอย่างอาร์เอ็นเอทุกตัวอย่างใส่หลอดไมโครฟิวจ์ให้ได้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 20 ไมโครกรัมในแต่ละหลอด และนำไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศจนกระทั่งอาร์เอ็นเอแห้ง

3.7.3 การทำอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำอุปกรณ์สำหรับทำอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสทุกชิ้นแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (ภาคผนวก ข3) เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วยน้ำปลอดประจุหลายๆ ครั้งและผึ่งให้แห้ง ขวดสำหรับเตรียมเจลปฏิบัติเช่นเดียวกันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อและอบให้แห้ง เตรียมเจลโดยชั่งผงอะกาโรส 0.9 กรัม ใส่ลงในขวดสำหรับเตรียมเจล เติมน้ำ DEPC (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 44.5 มิลลิลิตร นำไปชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักไว้ ละลายเจลด้วยไมโครเวฟจนกระทั่งเม็ดเจลละลายหมด นำไปชั่งน้ำหนักและเติมน้ำ DEPC จนได้น้ำหนักเท่ากับก่อนละลายเจล ผสม 10X MOPS buffer (ภาคผนวก ข4) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร กับฟอร์มัลดีไฮด์ปริมาตร 9.8 มิลลิลิตร ในหลอดผสมสารและเทลงในสารละลายเจล ผสมให้เข้ากันจนทั่ว เทลงในถาดสำหรับขึ้นรูปเจล รอจนกระทั่งเจลแข็ง เตรียมบัฟเฟอร์สำหรับผสมกับตัวอย่างอาร์เอ็นเอโดยผสมสารตามลำดับ ดังนี้

1. ฟอร์มัลดีไฮด์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
2. ฟอร์มาไมด์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
3. 10X MOPS buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
4. เอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
5. น้ำ DEPC ปริมาตร 3 ไมโครลิตร

จากนั้นเติมลงในตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.7.2 หลอดละ 20 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันโดยเคาะหลอดเบาๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที นำเจลที่เตรียมไว้วางลงบนเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสและโหลดตัวอย่างทั้งหมดลงไป ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที และนำไปถ่ายรูปบันทึกผล

3.7.4 การถ่ายอาร์เอ็นเอจากเจลไปยังไนลอนเมมเบรน

นำเจลที่ได้จากข้อ 3.7.3 ไปแช่ในน้ำ DEPC เป็นเวลา 10 นาที และตัดไนลอนเมมเบรนขนาดเท่ากับเจลและนำไปแช่ในน้ำ DEPC เป็นเวลา 10 นาที เช่นเดียวกัน ทำ northern blotting ตามวิธี capillary transfer (Sambrook และ Russell, 2001) เพื่อย้ายอาร์เอ็นเอจากอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลไปยังไนลอนเมมเบรน โดยใช้ 10X SSC (ภาคผนวก ข5) เป็นบัฟเฟอร์ หลังจากถ่ายอาร์เอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรนเป็นเวลาข้ามคืน นำเจลไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อ

ตรวจสอบว่าการย้ายอาร์เอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรนสมบูรณ์หรือไม่ และนำไนลอนเมมเบรนไปตรึงอาร์เอ็นเอโดยใช้ UV crosslink เป็นเวลา 3 นาที

3.7.5 การตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอของยีนเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Lebeling and Detection Starter Kit (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข6)

3.7.5.1 การพรีไฮบริไดเซชันและไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอโพรบ

นำสารละลาย DIG Easy Hyp Granule (ภาคผนวก ข6) ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 42°ซ ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำไนลอนเมมเบรนที่ตรึงอาร์เอ็นเอจากข้อ 3.7.4 ใส่ในหลอดไฮบริไดเซชัน และเติมสารละลาย DIG Easy Hyp Granule ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 100 ตารางเซนติเมตร ลงไปกลิ้งให้ทั่วหลอด นำไปบ่มในเครื่อง hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42°ซ ด้วยอัตราการหมุนคงที่อย่างช้าๆ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทสารละลายออกและเติมสารละลาย DIG Easy Hyp Granule ซึ่งมีโพรบที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส (พิมลรัตน์, 2549) ที่ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อสารละลาย DIG Easy Hyp Granule ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมอยู่ (อุ่นที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำมาใช้) จากนั้นนำไปบ่มในเครื่อง hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42°ซ ด้วยอัตราการหมุนคงที่อย่างช้าๆ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) (สารละลายดีเอ็นเอโพรบที่ใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกหลายครั้ง ด้วยการเก็บรักษาในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ -20°ซ เมื่อนำกลับมาใช้ในครั้งต่อไปต้องบ่มที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนจะนำไปใช้)

3.7.5.2 การตรวจสอบสัญญาณการไฮบริไดซ์

เมื่อเสร็จการไฮบริไดซ์แล้ว นำไนลอนเมมเบรนมาใส่ในกล่องพลาสติกเพื่อล้างดีเอ็นเอโพรบส่วนเกินออก โดยเติมสารละลาย 2X SSC/0.1% SDS (ภาคผนวก ข7) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆที่อุณหภูมิ 15-25°ซ เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย 0.5X SSC/0.1% SDS (ภาคผนวก ข8) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วเทสารละลายทิ้ง ตรวจหาสัญญาณการไฮบริไดซ์ด้วยวิธี Enzyme Immunoassay โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข6) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้

(ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) นำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอโพรบส่วนเกินออกแล้วใส่ในกล่องพลาสติก และนำมาล้างด้วย washing buffer (ภาคผนวก ข6) โดยให้ปริมาตรท่วมไนลอนเมมเบรน เขย่าเบาๆเป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติมสารละลายแอนติบอดี (anti-DIG-AP conjugation) ที่เตรียมโดยการเจือจาง anti-DIG-AP conjugate ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ใน blocking solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1:5,000) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้งแล้วล้าง anti-DIG-Ap conjugation ส่วนเกินออกด้วย washing buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเขย่าเบาๆเป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมซับสเตรต NBT/BCIP โดยเจือจางสารละลายในหลอดหมายเลข 5 ของชุดสำเร็จ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน detection buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มป้องกันแสง) ย้ายไนลอนเมมเบรนมาใส่ในกล่องพลาสติกกล่องใหม่ จากนั้นเทซับสเตรตที่เตรียมไว้ลงบนไนลอนเมมเบรน นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1-16 ชั่วโมง) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไนลอนเมมเบรนมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและนำไปแช่ในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข9) เขย่าเบาๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และนำไปถ่ายรูปบันทึกผลการทดลอง หลังจากนั้นนำไนลอนเมมเบรนไปเก็บไว้ในบัฟเฟอร์ TE ที่อุณหภูมิ 4°ซ ระวังอย่าให้เมมเบรนแห้ง

3.8 การแยก mRNA และการเตรียม cDNA

3.8.1 การแยก mRNA (messenger RNA) จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ชัดเจนที่สุดจากข้อ 3.7.5 โดยใช้ชุดสำเร็จ PolyATtract mRNA Isolation System III (Promega, USA) (ภาคผนวก ข10)

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเส้นใยที่ให้สัญญาณการไฮบริไดซ์มากที่สุดโดยใช้ชุดสำเร็จ e-Zi RNA Extraction Kit (Sunolin, Thailand) ตามวิธีในข้อ 3.7.1 นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้มาคัดแยก mRNA โดยใช้ชุดสำเร็จ PolyATtract mRNA Isolation System III (Promega, USA) ตามวิธีดังนี้

3.8.1.1 การเตรียมสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิล (Streptavidin-Paramagnetic Particles)

นำหลอดบรรจุสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิล มาล้างโดยเคาะก้นหลอดเบาๆ จนกระทั่งสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิล กระจายเป็นเนื้อเดียวกันทั่วหลอด ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ถ้าสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิล ไม่ตกตะกอนจึงนำไปใช้ได้ จากนั้นนำไปตั้งบนแมกเนติกสแตนด์ (magnetic stand) ประมาณ 30 วินาที จนกระทั่งสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิลถูกจับด้วยแม่เหล็กจนหมด ดูดสารละลายส่วนใสออกและเติม 0.5X SSC ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเคาะหลอดเบาๆ จนกระทั่งสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิล กระจายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปตั้งบนแมกเนติกสแตนด์ ประมาณ 30 วินาที จนกระทั่งสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิลถูกจับด้วยแม่เหล็กจนหมด ดูดสารละลายส่วนใสออกและเติม 0.5X SSC ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง โดยล้างก่อนใช้ไม่เกิน 30 นาที

3.8.1.2 การ annealing กับ Biotinylated-Oligo(dT) Probe (ภาคผนวก ข10)

ดูดอาร์เอ็นเอที่เตรียมไว้ปริมาณ 1.0 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดหลอดไมโครฟิวจ์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที เติม Biotinylated-Oligo(dT) Probe ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ 20X SSC ปริมาตร 13 ไมโครลิตร ตามลำดับ เคาะหลอดเบาๆ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.8.1.3 การจับ mRNA ด้วยสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิลและการล้าง annealed Oligo(dT)-mRNA Hybrids

เติมอาร์เอ็นเอที่จับกับ Biotinylated-Oligo(dT) Probe แล้ว จากข้อ 3.8.1.2 ลงในสเตรปทาวิดิน พาราแมกเนติก พาร์ทิเคิลที่ผ่านการล้างแล้วที่ได้จากข้อ 3.8.1.1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที โดยกลับหลอดเบาๆ ทุก 1-2 นาที จะได้ annealed Oligo(dT)-mRNA Hybrids จากนั้นนำไปตั้งบนแมกเนติกสแตนด์ ประมาณ 30 วินาที จนกระทั่ง Annealed Oligo(dT)-mRNA Hybrids ถูกจับด้วยแม่เหล็กจนหมด ดูดสารละลายส่วนใสออกและเติม 0.1X SSC ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆ จน annealed Oligo(dT)-mRNA Hybrids

กระจายเป็นเนื้อเดียวกันทั่วสารละลาย นำไปตั้งบนแมกเนติกสแตนด์ ประมาณ 30 วินาที จนกระทั่ง annealed Oligo(dT)-mRNA Hybrids ถูกจับด้วยแม่เหล็กจนหมด ดูดสารละลายส่วนใสออก ทำซ้ำ 4 ครั้ง

3.8.1.4 การชะ mRNA

เมื่อล้าง annealed Oligo(dT)-mRNA Hybrids เสร็จแล้ว ละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เคาะก้นหลอดเบาๆ ให้กระจายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปตั้งบนแมกเนติกสแตนด์ ประมาณ 30 วินาที ดูดส่วนใสซึ่งมี mRNA ใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เคาะก้นหลอดเบาๆ ให้กระจายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปตั้งบนแมกเนติกสแตนด์ ประมาณ 30 วินาที ดูดส่วนใสใส่รวมกับส่วนใสตอนแรก จะได้ mRNA ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำ mRNA ที่ได้ไปทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล

3.8.2 การทำ mRNA ให้เข้มข้น

เติมสารละลายโซเดียมอะซีเทต 3 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 5.2 (ภาคผนวก ข11) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมดลงในตัวอย่าง mRNA ที่ได้จากข้อ 3.8.1.4 และเติม 2-โพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรทั้งหมดลงไป นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลาข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนโดยเติมเอทานอล 75% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระเหยแห้งตะกอนด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ ละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ

3.8.3 การสร้างสาย cDNA โดยใช้ Universal RiboClone cDNA Synthesis System (Promega, USA) (ภาคผนวก ข12)

3.8.3.1 การสังเคราะห์สาย cDNA สายแรก (First-strand synthesis)

นำตัวอย่าง mRNA ที่ได้จากข้อ 3.8.2 ปริมาณ 2 ไมโครกรัม ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติม Oligo (dT) primer ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงไป จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำที่

ปราศจากนิวคลีเอส (nuclease-free water) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 15 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติม First strand 5X buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ RNasin ribonuclease inhibitor (ความเข้มข้น 40 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ เป็นเวลา 3-5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไพโรฟอสเฟต (sodium pyrophosphate) (ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และ AMV reverse transcriptase (ความเข้มข้น 25 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากนิวคลีเอสให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเคาะก้นหลอดเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปแช่ในกล่องน้ำแข็งเพื่อเตรียมสังเคราะห์สายคู่ของ cDNA ต่อไป

3.8.3.2 การสังเคราะห์ cDNA สายคู่ (Second-strand synthesis)

นำ cDNA สายแรกที่ได้จากข้อ 3.8.3.1 มาเติมสารละลายต่างๆ ตามลำดับดังนี้

1. cDNA สายแรก ปริมาตร 25 ไมโครลิตร
2. Second strand 2.5X buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร
3. Acetylated BSA (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
4. DNA polymerase I (ความเข้มข้น 8 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร
5. RNase H (ความเข้มข้น 1.5 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากนิวคลีเอสให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตร ทุกขั้นตอนทำบนน้ำแข็ง ผสมให้เข้ากันโดยเคาะก้นหลอดเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 14°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ 70°ซ เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในกล่องน้ำแข็ง เติม T4 DNA polymerase (ความเข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1.3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ข13) ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข14) 1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสด้านบนซึ่งมี cDNA สายคู่ใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ และนำไปทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล

3.8.3.3 การทำ cDNA สายคู่ให้เข้มข้นโดยการตกตะกอน

นำ cDNA สายคู่ที่ได้จากข้อ 3.8.3.2 มาเติมสารละลายโซเดียมอะซีเทต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 5.2 (ภาคผนวก ข11) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด และเติมเอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมดลงไป นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนโดยเติมเอทานอล 70% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระเหยแห้งตะกอนด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ และละลายตะกอนของ cDNA ด้วยบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข9) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

3.9 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA เข้าในเวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน

3.9.1 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA

3.9.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA ให้มีจุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ที่บริเวณจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสและ *Bam*HI ที่บริเวณจุดสิ้นสุดการถอดรหัส โดยตั้งชื่อไพรเมอร์คือ Dex14R และ Dex14R (ตารางที่ 3.4) ตามลำดับ

3.9.1.2 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ใช้ cDNA ที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.3.3 เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนสที่ออกแบบจากข้อ 3.9.1.1 โดยผสมส่วนประกอบต่างๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตร ดังนี้

- 10X *Pfu* DNA polymerase buffer with $MgSO_4$	2.5	ไมโครลิตร
- สารละลายไพรเมอร์ Dex14F	2	ไมโครโมลาร์
- สารละลายไพรเมอร์ Dex14R	2	ไมโครโมลาร์
- สารละลาย dNTPs (ภาคผนวก ข15)	200	ไมโครโมลาร์
- สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์	2	มิลลิโมลาร์

- เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase	1.25	หน่วย
- ดีเอ็นเอแม่แบบ	50	นาโนกรัม

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา 5	นาที
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา 45	วินาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ 58°ซ	เป็นเวลา 1	นาที
Extension	ที่อุณหภูมิ 72°ซ	เป็นเวลา 6	นาที
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72°ซ	เป็นเวลา 15	นาที

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา

3.9.1.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมเจลโดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ใส่ลงในขวดสำหรับเตรียมเจล เติมบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข16) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกน้ำหนักไว้ ละลายเจลด้วยไมโครเวฟ จนกระทั่งผงเจลละลายหมด นำไปชั่งน้ำหนัก และเติมน้ำกลั่นจนได้น้ำหนักเท่ากับเมื่อก่อนละลายเจล เทลงในถาดสำหรับขึ้นรูปเจล รอจนกระทั่งเจลแข็ง นำเจลที่เตรียมไว้วางลงบนเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสและโหลดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสลงไป โดยผสมกับ 10X loading buffer (ภาคผนวก ข17) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1X และใช้ GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, USA) หรือ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และนำเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในน้ำกลั่นเพื่อชะเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก เป็นเวลา 5 นาที และนำไปถ่ายรูป

3.9.1.4 การเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 3.9.1.2 มาเป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยผสมส่วนประกอบต่างๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร ดังนี้

- 10X *Pfu* DNA polymerase buffer with $MgSO_4$	5	ไมโครลิตร
- สารละลายไพรเมอร์ Dex14F	1	ไมโครโมลาร์
- สารละลายไพรเมอร์ Dex14R	1	ไมโครโมลาร์
- สารละลาย dNTPs	200	ไมโครโมลาร์
- สารละลาย $MgCl_2$	2	มิลลิโมลาร์
- เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase	2.5	หน่วย
- ดีเอ็นเอแม่แบบ	1	ไมโครกรัม

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา 5	นาที
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา 45	วินาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ 58°ซ	เป็นเวลา 1	นาที
Extension	ที่อุณหภูมิ 72°ซ	เป็นเวลา 6	นาที
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72°ซ	เป็นเวลา 15	นาที

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 จากนั้นตัดเจลบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

3.9.1.5 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข18)

นำชิ้นอะกาโรสที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม Buffer QG ลงไป 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 10 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 1-2 นาที จนกระทั่งเจลละลายหมด เติม 2-โพรพานอลลงไป 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดใส่ใน Qiaquick column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Buffer PE ลงไป 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที 2 ครั้ง ย้ายคอลัมน์ด้านบนใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติม Buffer EB ลงไป 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจะอยู่ในสารละลาย นำไปเก็บไว้ที่ -20°ซ

3.9.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pJET1 โดยใช้ชุดสำเร็จ GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, USA) (ภาคผนวก ข19)

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากการสกัดออกจากอะกาโรสเจลจากข้อ 3.9.1.5 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pJET1 โดยผสมสารละลายต่างๆ ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ดังนี้

2X Reaction buffer	5	ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	2	ไมโครลิตร
pJET1/blunt Cloning Vector	25	นาโนกรัม
T4 DNA ligase	2.5	หน่วย

เติมน้ำปราศจากนิวคลีเอสให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22°ซ) เป็นเวลา 30 นาที

3.9.3 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001)

3.9.3.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยใช้รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) (Sambrook และ Russell, 2001)

นำเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α มาขีดลงบนอาหารแข็ง ψb (ภาคผนวก ก 4) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว ψb (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (A_{550}) เท่ากับ 0.3 ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว ψb ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (A_{550}) เท่ากับ 0.48 จากนั้นนำไปแช่ในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ถ่ายใส่ในขวดสำหรับปั่นเหวี่ยง (centifuge tube) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเติมสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข20) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องผสมสาร แช่ในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเติมสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข21) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แช่ในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดละ 50 ไมโครลิตร จนหมด นำไปทำให้แข็งอย่างรวดเร็วโดยนำหลอดไปแช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ จนกระทั่งนำออกมาใช้ทรานสฟอร์ม

3.9.3.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

ทรานสฟอร์มสารละลายผสมจากข้อ 3.9.2 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.3.1 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งรอจนละลาย จากนั้นใส่สารละลายผสมที่ได้จากข้อ 3.9.2 ทั้งหมดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ 42°ซ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก5) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป กระจายเซลล์ให้ทั่วอาหารเหลวจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปเกลี่ยให้ทั่ว

ผิวหน้าอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก6) ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 22) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้นและนำไปตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสต่อไป

3.9.4 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสโดยคัดเลือก 10 โคโลนีมาทำโคโลนี PCR (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเขี่ยโคโลนีบนอาหารแข็งที่ได้จากข้อ 3.9.3.2 มาครึ่งโคโลนีใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตร ดังนี้

- 10X *Tag* DNA polymerase buffer	2.5	ไมโครลิตร
- สารละลายไพรเมอร์ Dex2F	1	ไมโครโมลาร์
- สารละลายไพรเมอร์ Dex2R	1	ไมโครโมลาร์
- สารละลาย dNTPs	200	ไมโครโมลาร์
- สารละลาย $MgCl_2$	2	มิลลิโมลาร์
- เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase	1	หน่วย
- ดีเอ็นเอแม่แบบ (โคโลนี)		

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา 5	นาที
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°ซ	เป็นเวลา 45	วินาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55°ซ	เป็นเวลา 45	วินาที
Extension	ที่อุณหภูมิ 72°ซ	เป็นเวลา 2	นาที
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72°ซ	เป็นเวลา 7	นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.9.1.3

3.9.5 การสกัดพลาสมิดที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข23)

นำโคโลนีที่เกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.9.4 ซึ่งมีส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* DH5α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB ซึ่งผสมแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 รอบ กระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใสใส่ลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้งก่อนที่จะปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20°ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออก

3.10.1 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในแบคทีเรีย

3.10.1.1 การเตรียมเวกเตอร์ pETHis (ภาคผนวก ค2) และ pCS24 (ภาคผนวก ค3) สำหรับเชื่อมต่อกับยีนเดกซ์แทรนเนส

นำเวกเตอร์ pETHis และ pCS24 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Nde*I โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 ไมโครลิตร ดังนี้

เวกเตอร์	50	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Bam*HI	50	หน่วย
10X *Bam*HI buffer	25	ไมโครลิตร
100X BSA	2.5	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำไปทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล โดยนำดีเอ็นเอมาเติมสารละลายโซเดียมอะซีเทต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมดและเติมเอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมดลงไป นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนโดยเติมเอทานอล 70% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระเหยแห้งตะกอนด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ และละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

นำเวกเตอร์ pETHis และ pCS24 ที่ผ่านการตัดด้วย *Bam*HI และทำให้เข้มข้นแล้วมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร ดังนี้

เวกเตอร์	40	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Nde*I	10	หน่วย
10X *Nde*I buffer	10	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที และนำไปทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนตามวิธีดังกล่าวข้างต้น

3.10.1.2 การเตรียมยีนเดกซ์แทรนเนสเพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pETHis และ pCS24

นำพลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.9.5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Nde*I โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตรดังนี้

เวกเตอร์	80	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Bam*HI	80	หน่วย
10X *Bam*HI buffer	20	ไมโครลิตร
100X BSA	2	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 และตัดเจลบริเวณที่มีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,383 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5 จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I แบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 120 ไมโครลิตร ดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4,383 คู่เบส	40	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Nde*I	0.624	หน่วย
10X *Nde*I buffer	12	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 120 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 และตัดเจลบริเวณที่มีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,700-1,800 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5

3.10.1.3 การเชื่อมต่อยีนเดกซ์แทรนเนสเข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pETHis และ pCS24

นำยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากข้อ 3.10.1.2 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pETHis และ pCS24 ที่ได้จากข้อ 3.10.1.1 โดยผสมสารละลายต่างๆให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ดังนี้

เวกเตอร์ (pETHis หรือ pCS24)	1	ไมโครกรัม
ยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากข้อ 3.10.1.2	3	ไมโครกรัม
ไลเกส (ligase)	400	หน่วย
10X บัฟเฟอร์ ไลเกส	1.5	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock ตามวิธีในข้อ 3.9.3 ยกเว้นเวกเตอร์ pCS24 ใช้อาหารสำหรับคัดเลือกเป็นอาหารแข็ง LB ที่มีกานามัยซิน (ภาคผนวก ข 22) 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส ตามวิธีในข้อ 3.9.4 แต่เปลี่ยนไพรเมอร์เป็น Dex14F และ Dex14R ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 จากนั้นเลือกโคลนที่ให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ไปเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.9.5

เวกเตอร์ pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ T7 ตั้งชื่อว่า pNAT2 และเวกเตอร์ pCS24 ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสที่มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' และแทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ cspA ตั้งชื่อว่า pNAC9

3.10.1.4 การสร้างเวกเตอร์สำหรับแสดงออกยีนเดกซ์แทรนเนสโดยออกแบบให้มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนส

3.10.1.4.1 การเตรียมเวกเตอร์ pNAT2 สำหรับเชื่อมต่อกับยีนเดกซ์แทรนเนสที่มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3'

นำเวกเตอร์ pNAT2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร ดังนี้

เวกเตอร์ pNAT2	80	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Kpn*I	80	หน่วย
10X *Kpn*I buffer	10	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 และตัดเจลบริเวณที่มีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 6,400 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5 จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยผสมส่วนประกอบต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร ดังนี้

เวกเตอร์	40	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Bam*HI	40	หน่วย
10X *Bam*HI buffer	5	ไมโครลิตร
100X BSA	0.5	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 และตัดเจลบริเวณที่มีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,600 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10.1.4.2 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก pNAC9 ซึ่งมีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีในข้อ 3.9.1.4 โดยใช้ pNAC9 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และเปลี่ยนไพรเมอร์เป็น Dex17F และ Dex17R (ตารางที่ 3.4) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยตัดเจลบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5

3.10.1.4.3 การเตรียมยีนเดกซ์แทรนเนสที่มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' เพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pNAT2

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากข้อ 3.10.1.4.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร ดังนี้

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	20	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Kpn*I	10	หน่วย
10X *Kpn*I buffer	10	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 และตัดเจลบริเวณที่มีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5 จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร ดังนี้

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	20	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Bgl*II	10	หน่วย
10X Tango buffer	40	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 และตัดเจลบริเวณที่มีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5

3.10.1.4.4 การเชื่อมต่อยีนเดกซ์แทรนเนสเข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pNAT2

นำยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากข้อ 3.10.1.4.3 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pNAT2 ที่ได้จากข้อ 3.10.1.4.1 โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ดังนี้

เวกเตอร์ pNAT2 ที่ได้จากข้อ 3.10.1.4.1	1	ไมโครกรัม
ยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากข้อ 3.10.1.4.3	3	ไมโครกรัม
ไลเกส (ligase)	400	หน่วย
10X บัฟเฟอร์ ไลเกส	1.5	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock ตามวิธีในข้อ 3.9.3 และนำไปตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อโปรโมเตอร์ T7 และยีนเดกซ์แทรนเนสคือ T7 promoter และ Dex12R (ตารางที่ 3.4) ตามลำดับ ตามวิธีในข้อ 3.9.4 แต่เปลี่ยน Extension เป็นที่อุณหภูมิ 72°ซ เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 จากนั้นเลือกโคลนที่ให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาดประมาณ 500 คู่เบส ไปเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.9.5

เวกเตอร์ pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสที่มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ทางด้าน 3' และแทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ T7 ตั้งชื่อว่า pNAH6

3.10.1.5 การสร้างเวกเตอร์สำหรับแสดงออกยีนเดกซ์แทรนเนสโดยออกแบบให้มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนส และตัดส่วน 101 คู่เบสทางด้าน 5' ซึ่งเป็น signal sequence และบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสออก

นำพลาสมิด pNAH6 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I แบบไม่สมบูรณ์ เพื่อคัดเลือกยีนเดกซ์แทรนเนสที่ถูกตัด 101 คู่เบสทางด้าน 5' ซึ่งเป็น signal sequence และบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสออก (ภาคผนวก ค1) โดยผสมสารละลายต่างๆลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร ดังนี้

พลาสมิด pNAH6	30	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Nde*I	0.2	หน่วย
10X *Nde*I บัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 และตัดเจลบริเวณที่มีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 6,300 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอะกาโรสเจลไปเชื่อมต่อกันโดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ดังนี้

เวกเตอร์ที่สกัดได้จากอะกาโรสเจล	10	ไมโครกรัม
ไลเกส (ligase)	400	หน่วย
10X บัฟเฟอร์ ไลเกส	1.5	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock ตามวิธีในข้อ 3.9.3 และนำไปตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสที่ถูกตัด 101 คู่เบสทางด้าน 5' ออกด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อโปรโมเตอร์ T7 และยีนเดกซ์แทรนเนสคือ T7 promoter และ Dex12R (ตารางที่ 3.4) ตามลำดับ ตามวิธีในข้อ 3.9.4 แต่เปลี่ยน Extension เป็น

ที่อุณหภูมิ 72°ซ เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 จากนั้นเลือกโคลนที่ให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาดประมาณ 400 คู่เบส ไปเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.9.5

เวกเตอร์ pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสที่มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ทางด้าน 3' และตัดส่วน 101 คู่เบสทางด้าน 5' ซึ่งเป็น signal sequence และบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนออก โดยแทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ T7 ตั้งชื่อว่า pNAH29

3.10.2 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในยีสต์

3.10.2.1 การเตรียมเวกเตอร์ pYEX-S1 เพื่อเชื่อมต่อกับยีนเดกซ์แทรนเนส

นำเวกเตอร์ pYEX-S1 (ภาคผนวก ค4) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ดังนี้
ดังนี้

เวกเตอร์ pYEX-S1	50	ไมโครกรัม
เอนไซม์ *Sac*I	10	หน่วย
10X *Sac*I บัฟเฟอร์	1.5	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 และตัดเจลบริเวณที่มีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 8.4 กิโลเบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5 จากนั้นนำเวกเตอร์ที่สกัดได้จากอะกาโรสเจลไปตัดหมู่ฟอสเฟตทางด้านปลาย 5' ออกด้วยเอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 80 ไมโครลิตร ดังนี้

เวกเตอร์ pYEX-S1/ *Sac*I	50	ไมโครกรัม
เอนไซม์ CIP	10	หน่วย
10X CIP บัฟเฟอร์	8	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลตามวิธีในข้อ 3.10.1.1

3.10.2.2 การเตรียมยีนเดกซ์แทรนเนสเพื่อเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pYEX-S1

3.10.2.2.1 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก pNAT2 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณยีนเดกซ์แทรนเนสจาก pNAT2 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีในข้อ 3.9.1.4 โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเป็น pNAT2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเพิ่มน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อลงไป 4 ไมโครลิตร และเปลี่ยนไพรเมอร์เป็น Dex16F และ Dex16R (ตารางที่ 3.4) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3

3.10.2.2.2 การเตรียมยีนเดกซ์แทรนเนสเพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pYEX-S1 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.10.2.1

นำยีนเดกซ์แทรนเนสที่เพิ่มจำนวนได้จากข้อ 3.10.2.2.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I โดยใช้วิธีเดียวกันกับการตัดเวกเตอร์ pYEX-S1 ตามข้อ 3.10.2.1 แต่เปลี่ยนจากเวกเตอร์ pYEX-S1 เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากข้อ 3.10.2.2.1 และไม่ต้องนำไปตัดหมู่ฟอสเฟตออก

3.10.2.3 การเชื่อมต่อยีนเดกซ์แทรนเนสเข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pYEX-S1

นำยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากข้อ 3.10.2.2.2 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pYEX-S1 ที่ได้จากข้อ 3.10.2.1 โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวกเตอร์ pYEX-S1 ที่ได้จากข้อ 3.10.2.1	3	ไมโครกรัม
ยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากข้อ 3.10.2.2.2	9	ไมโครกรัม
ไลเกส (ligase)	400	หน่วย
10X บัฟเฟอร์ ไลเกส	1.5	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock ตามวิธีในข้อ 3.9.3 และนำไปตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อโปรโมเตอร์ PGK และยีนเดกซ์แทรนเนส คือ YEX-F1 และ Dex1R (ตารางที่ 3.4) ตามลำดับ ตามวิธีในข้อ 3.9.4 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 จากนั้นเลือกโคลนที่ให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ไปเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.9.5

เวกเตอร์ pYEX-S1 ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ PGK ตั้งชื่อว่า pNAY44

3.11 การทรานสฟอร์มเวกเตอร์สำหรับแสดงออกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อการแสดงออก

3.11.1 การทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียเพื่อการแสดงออก

นำ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS และ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS มาเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ โดยใช้รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) ตามวิธีในข้อ 3.9.3.1 จากนั้นทรานสฟอร์มเวกเตอร์ pETHis pNAH6 และ pNAH29 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์แต่ละสายพันธุ์โดยคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข22) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้นและนำไปตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส โคลนที่ได้จากแต่ละพลาสมิดในแต่ละสายพันธุ์ของ *E. coli* ได้รับการตั้งชื่อดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 แสดงชื่อโคลนที่ได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิดแต่ละชนิดเข้าใน *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์ *E. coli*	**พลาสมิด**	**ชื่อโคลน**
BL21(DE3)pLysS	pETHis	BE
	pNAH6	BN6
	pNAH29	BN29
Rosetta-gami(DE3)pLysS	pETHis	RE
	pNAH6	RN6
	pNAH29	BN29

3.11.2 การทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านยีสต์เพื่อการแสดงออก

นำเวกเตอร์ pYEX-S1 และ pNAY44 มาทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ BJ5462 โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ BJ5462 ลงในอาหารเหลว YPD (ภาคผนวก ก7) ปริมาตร 10 มล. เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลาข้ามคืน นับเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโทมีเตอร์ และถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มล. ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์เท่ากับ 5×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ จนกระทั่งความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 2×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ่ายใส่ในขวดสำหรับปั่นเหวี่ยง (centifuge tube) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเติมน้ำปลอดเชื้อ ปริมาตร 25 มล. ลงไปกระจายเซลล์ให้ทั่วและนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำและเทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายลิเธียมอะซีเทต (ภาคผนวก ข24) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.0 มล. ลงไป กระจายเซลล์ให้ทั่วและย้ายใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ปลอดเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายลิเธียมอะซีเทตออกด้วยไมโครปิเปตต์ จากนั้นเติมสารละลายลิเธียมอะซีเทตให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 ไมโครลิตร กระจายเซลล์ให้ทั่วและแบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ที่ปลอดเชื้อหลอดละ 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายลิเธียมอะซีเทตออกด้วยไมโครปิเปตต์ และเติมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดดังนี้

สารละลาย 50% PEG (ภาคผนวก ข25)	240	ไมโครลิตร
สารละลายลิเธียมอะซีเทต 1 โมลาร์	36	ไมโครลิตร

Single stranded carrier DNA (ภาคผนวก ข26) (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	25	ไมโครลิตร
พลาสมิด pYEX-S1 หรือ pNAY44 (10 ไมโครกรัม)	50	ไมโครลิตร

กระจายเซลล์โดยใช้เครื่องผสมสารเป็นเวลา 1 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ 42°ซ เป็นเวลา 25 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายออกด้วยไมโครปิเปตต์ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปและกระจายเซลล์ให้ทั่วจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปคัดเลือกโดยนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง SD (ภาคผนวก ก9) ที่มีการเติมกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ (ภาคผนวก ก10) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นดังนี้

ลิวซีน (leucine)	20	ไมโครกรัมต่อมล.
ฮิสทิดีน (histidine)	20	ไมโครกรัมต่อมล.
ทริปโตเฟน (tryptophane)	20	ไมโครกรัมต่อมล.
อะดีนีน (adenine)	40	ไมโครกรัมต่อมล.

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 1-3 วัน สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้นและนำไปตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส โคลนที่ได้จากแต่ละพลาสมิดในในยีสต์ ได้รับการตั้งชื่อดังแสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงชื่อโคลนที่ได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิดแต่ละชนิดเข้าในยีสต์

สายพันธุ์ยีสต์	พลาสมิด	ชื่อโคลน
BJ5462	pYEX-S1	YS1
	pNAY44	YN44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12 การตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส

3.12.1 การตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็ง

นำโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกทั้งแบคทีเรียและยีสต์ มาจุดลงบนอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกชนิดเดียวกัน และมีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม 1% โดยจุดลงบนอาหารสองเพลท (replica) สำหรับแบคทีเรียให้เกลี่ยด้วย IPTG (ภาคผนวก ข27) 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ก่อน โดยมีตัวควบคุมผลลบเป็นทรานสฟอร์แมนท์สายพันธุ์เดียวกันที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่ไม่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ (empty vector) สำหรับแบคทีเรียนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับยีสต์นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเพลทหนึ่งมาราดด้วยเอทานอล 95% ลงบนผิวหน้าอาหาร รอจนกระทั่งเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี (Simonson และ Liberta, 1975) แล้วนำไปถ่ายรูปบันทึกผล เลือกโคลนที่มีให้บริเวณใสจากอีกเพลทหนึ่งเพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.12.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของโคลน RN6 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 เติม IPTG (ภาคผนวก ข27) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 400 ไมโครโมลาร์ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิเดิมต่ออีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสออกด้วยไมโครปิเปตต์ นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำ SDS-PAGE ตามวิธีดังนี้

- เตรียม seperating gel ที่ความเข้มข้นเจล 10% โดยผสมสารละลายต่างๆ ดังนี้

40% Acrylamide	2.43	มล.
2% Bis-Acrylamide	1.34	มล.
Tirs-HCl 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.8	2.5	มล.

(ภาคผนวก ข28)

10% SDS (ภาคผนวก ข30)	0.1	มล.
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	3.58	มล.
TEMED	5	ไมโครลิตร
10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ภาคผนวก ข31)	50	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	มล.

ผสมสารทั้งหมดลงในหลอดปลอดเชื้อ ปิดฝาและกลับหลอดไปมาอย่าให้เกิดฟอง จากนั้นโหลดเจลลงในช่องกระจกสำหรับเตรียมเจลและโหลดทับผิวหน้าเจลด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็ง เทน้ำที่ทับผิวหน้าเจลออกให้หมด

- เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายต่างๆ ดังนี้

40% Acrylamide	0.48	มล.
2% Bis-Acrylamide	0.26	มล.
Tirs-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8 (ภาคผนวก ข29)	1.26	มล.
10% SDS	50	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	2.92	มล.
TEMED	5	ไมโครลิตร
10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	25	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	5	มล.

ผสมสารทั้งหมดลงในหลอดปลอดเชื้อ ปิดฝาและกลับหลอดไปมาอย่าให้เกิดฟอง จากนั้นโหลดเจลลงในช่องกระจกที่เตรียม seperating gel ไว้แล้วจนเต็ม ใส่หวีสำหรับเป็นช่องโหลดตัวอย่าง ซับเจลส่วนเกินออก รอจนกระทั่งเจลแข็งดึงหวีออกและนำไปทำอิเล็กโทรโฟเรซิส

- เตรียมตัวอย่างสำหรับโหลดลงในเจล

นำตะกอนเซลล์ที่เก็บไว้มาเติม 2X Laemmli buffer (ภาคผนวก ข32) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95°ซ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปโหลดลงในเจลที่เตรียมไว้ เติม 1X SDS running buffer (ภาคผนวก ข33) ลงไปให้ท่วมเจลด้านในและให้ท่วมขดลวดนำไฟฟ้าด้านนอก ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ค่าความต่างศักย์ 200 โวลต์ เป็นเวลา 50-55 นาที เมื่อเสร็จแล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue staining (ภาคผนวก ข34) เป็น

เวลา 60 นาที และล้างสีที่ไม่ติดโปรตีนออกจากเจลด้วย destaining solution (ภาคผนวก ข35) เปลี่ยน destaining solution ทุก 60 นาที จนกระทั่งพื้นหลังใส นำไปถ่ายรูปบันทึกผล

3.12.3 การตรวจสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสบน Blue dextran SDS-PAGE

นำเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จากโคลน RN6 มาทำ Blue dextran SDS-PAGE โดยเติม บลูเดกซ์แทรน (ภาคผนวก ข36) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5%ลงในเจล SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.12.2 หลังจากทำอิเล็กโทรโฟเรซิสแล้วนำไปตรวจสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Barrett และ Curtiss (1986) โดยนำเจลไปแช่ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.0 (ภาคผนวก ข37) ที่เติม Triton X-100 0.5% และ SDS 0.5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็นบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.0 ที่เติม Triton X-100 0.5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกชั่วโมงจนกระทั่งเห็นบริเวณใสบนเจล Blue dextran

3.13 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

นำโคลน RN6 มาใช้เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยแบคทีเรียโดยเตรียมหัวเชื้อดังนี้ เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นแปรผันภาวะต่างๆ ดังนี้

3.13.1 การแปรผันอุณหภูมิในการบ่ม

นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 30, 37 และ 40°ซ เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 เติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 400 ไมโครโมลาร์ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิเดิมต่ออีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง (ทั้ง soluble fraction และ insoluble fraction) และวิเคราะห์การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.12.2 โดยให้ตัวอย่างที่โหลดในแต่ละช่องเทียบเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เท่ากัน

3.13.2 การแปรผันความเข้มข้นของ IPTG

นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่ให้การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสสูงสุดที่ได้จากข้อ 3.13.1 เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 เติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆกัน คือ 25, 50, 100, 200, 400 และ 600 ไมโครโมลาร์ และมีชุดควบคุมผลลบซึ่งไม่เติม IPTG จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิเดิมต่ออีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.12.2

3.13.3 การแปรผันเวลาในการผลิตหลังการชักนำด้วย IPTG

นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่ให้การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสสูงสุดที่ได้จากข้อ 3.13.1 เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 เติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับความเข้มข้นที่ให้การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสที่สูงสุดที่ได้จากข้อ 3.13.2 และนำกลับไปบ่มที่อุณหภูมิเดิมต่อ โดยเก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และวิเคราะห์การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.12.2

3.14. การทำรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์

นำหัวเชื้อโคลน RN6 ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.13 ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่ให้การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสสูงสุดที่ได้จากข้อ 3.13.1 เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 เติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับความเข้มข้นที่ให้การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสที่สูงสุดที่ได้จากข้อ 3.13.2 และนำกลับไปบ่มที่อุณหภูมิเดิมต่อเป็นเวลาเท่ากับที่ได้จากข้อ 3.13.3 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์โปรตีน His Bind® Purification Kits (Novagen, USA) (ภาคผนวก ข38) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เติม BugBuster® Protein Extraction Reagent (Novagen, USA) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร, Benzonase® Nuclease (Novagen, USA) (ความเข้มข้น 25 หน่วยต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, rLysozyme™ Solution (Novagen, USA)

(ความเข้มข้น 30 กิโลหน่วยต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ Protease inhibitor (Novagen, USA) 8 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์จนเป็นเนื้อเดียวกันและนำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมสารละลายยูเรียความเข้มข้น 6 โมลาร์ (ภาคผนวก ข39) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไป ละลายตะกอนจนเป็นเนื้อเดียวกันและนำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์ด้วย His Bind® Purification Kits (Novagen, USA) (ภาคผนวก ข38) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ นำ His Bind resin ปริมาตร 5 มล. ใส่ลงไปใน Chromatography columns รอจนกระทั่งบัฟเฟอร์ลดลงจนถึงผิวหน้าเจล จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ต่างๆ ดังนี้

1. น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 7.5 มล.
2. 1X charge buffer ปริมาตร 12.5 มล.
3. 1X binding buffer ปริมาตร 7.5 มล.

เมื่อล้างคอลัมน์แล้วเม็ดเจลจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวจึงสามารถนำไปทำโครมาโทรกราฟีได้ ทำโครมาโทรกราฟีโดยรอให้ Binding buffer เคลื่อนลงไปจนถึงผิวหน้าเจล จากนั้นโหลดส่วนใสที่เติมได้ลงในคอลัมน์ จากนั้นล้างโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย 1X binding buffer ปริมาตร 25 มล. และ 1X wash buffer ปริมาตร 15 มล. แล้วชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกด้วย 1X elute buffer ปริมาตร 15 มล. โดยเก็บส่วนใสที่ออกมาจากคอลัมน์ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.12.2 คอลัมน์ที่ใช้เสร็จแล้วสามารถเก็บไว้ใช้ซ้ำได้โดยล้างคอลัมน์ด้วย 1X strip buffer ปริมาตร 7.5 มล. เมื่อบัฟเฟอร์ลดลงจนถึงผิวหน้าเจลแล้วให้พันคอลัมน์ด้วยแผ่นพาราฟิลม์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

หมายเหตุ – ก่อนเติมบัฟเฟอร์ชนิดใหม่ลงในคอลัมน์ทุกครั้งให้รอจนกระทั่งระดับบัฟเฟอร์ลดลงจนถึงผิวหน้าเจล

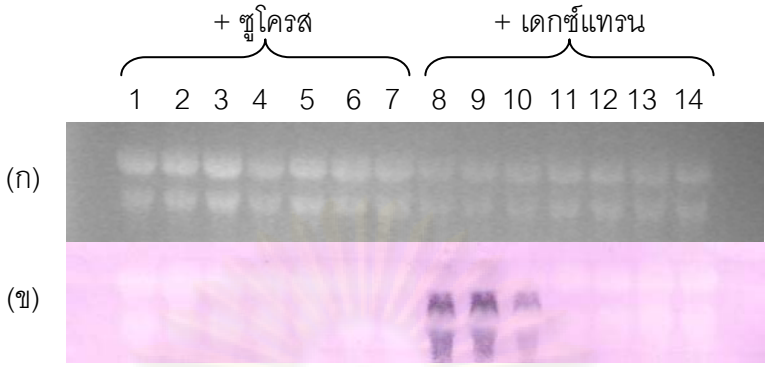
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14

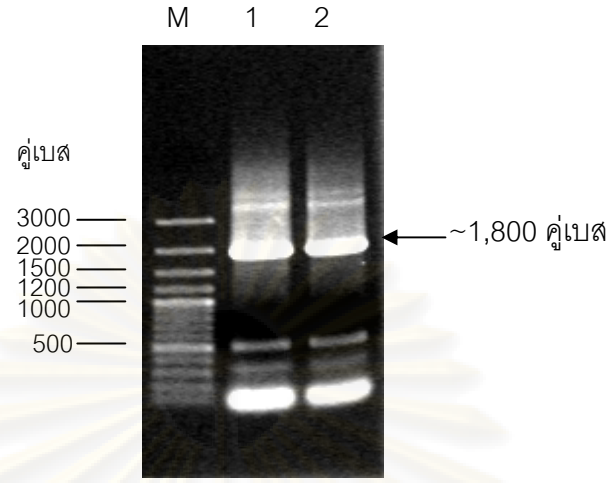
จากการเลี้ยงเชื้อ *P. pinophilum* SMCU 3-14 เพื่อเหนี่ยวนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสและเก็บตัวอย่างเส้นใยที่เวลา 3 5 7 9 11 13 และ 15 วัน ตามวิธีในข้อ 3.6 จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเส้นใยตามวิธีในข้อ 3.7.1 และนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปทำอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและตรวจสอบอาร์เอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตได้ผลดังในรูปที่ 4.1(ก) โดยการเรืองแสงของอาร์เอ็นเอจากแต่ละตัวอย่างมีความเข้มที่ใกล้เคียงกันแสดงว่าปริมาณอาร์เอ็นเอจากแต่ละตัวอย่างมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นถ่ายอาร์เอ็นเอจากเจลไปยังไนลอนเมมเบรนโดยวิธี capillary transfer หลังจากถ่ายอาร์เอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรนแล้ว นำไนลอนเมมเบรนที่ได้ไปตรึงอาร์เอ็นเอโดยใช้ UV crosslink เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอของยีนเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 3.7.5 สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้นแสดงถึงปริมาณของอาร์เอ็นเอของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แสดงออกที่เวลาต่างๆ ดังในรูปที่ 4.1(ข) โดยพบว่าอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้จากตัวอย่างเส้นใยชุดควบคุมผลลบวันที่ 3 5 7 9 11 13 และ 15 (หมายเลข 1-7 ตามลำดับ) ไม่เกิดสัญญาณการไฮบริไดซ์จากการติดตาม ซึ่งยืนยันว่า *P. pinophilum* SMCU 3-14 ไม่มีการแสดงออกเดกซ์แทรนเนสเมื่อไม่มีการเหนี่ยวนำจากเดกซ์แทรน และตัวอย่างเส้นใยที่เลี้ยงโดยการเหนี่ยวนำด้วยเดกซ์แทรนพบว่า ตัวอย่างเส้นใยจากวันที่ 3 5 และ 7 (หมายเลข 8-10 ตามลำดับ) เกิดสัญญาณจากการติดตามด้วยดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส โดยตัวอย่างจากวันที่ 3 และ 5 ให้สัญญาณการติดตามที่เข้มกว่าวันที่ 7 แสดงว่ามีการแสดงออกของยีนเดกซ์แทรนเนสมากกว่า และตัวอย่างจากวันที่ 9 11 13 และ 15 (หมายเลข 11-14 ตามลำดับ) ไม่เกิดสัญญาณการติดตาม ดังนั้นจึงเลือกตัวอย่างเส้นใยจากวันที่ 3 ซึ่งให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ชัดเจนที่สุดไปแยก mRNA เพื่อใช้ในการเตรียม cDNA



รูปที่ 4.1 การแสดงออกของอาร์เอ็นเอของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 (ก) อาร์เอ็นเอในอะกาโรส-ฟอร์มัลดีไฮด์เจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ข) สัญญาณจากการติดตามอาร์เอ็นเอด้วยดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส, หมายเลข 1-7 เป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากเส้นใยชุดควบคุมผลลบที่ใช้ซูโครส 5% เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมอายุ 3 5 7 9 11 13 และ 15 วัน ตามลำดับ และหมายเลข 8-14 เป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากเส้นใยที่ใช้เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นตัวเหนี่ยวนำอายุ 3 5 7 9 11 13 และ 15 วัน ตามลำดับ

4.2 การเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. pinophilum* SMCU 3-14 และเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอและนำมาคัดแยก mRNA โดยใช้ชุดสำเร็จ PolyATtract mRNA Isolation System III ตามวิธีในข้อ 3.8.1 และนำ mRNA ที่คัดแยกได้มาเตรียม cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จ Universal RiboClone cDNA Synthesis System ตามวิธีในข้อ 3.8.3 หลังจากนั้นนำ cDNA ที่เตรียมได้มาเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีในข้อ 3.9.1.2 และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งแรก (ไม่ได้แสดงผลไว้) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำเพื่อเพิ่มปริมาณตามวิธีในข้อ 3.9.1.4 แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.9.1.3 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.2 จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.9.1.5 และนำสารละลายผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pJET1 โดยใช้ชุดสำเร็จ GeneJET^{TM}PCR Cloning Kit ต่อไป

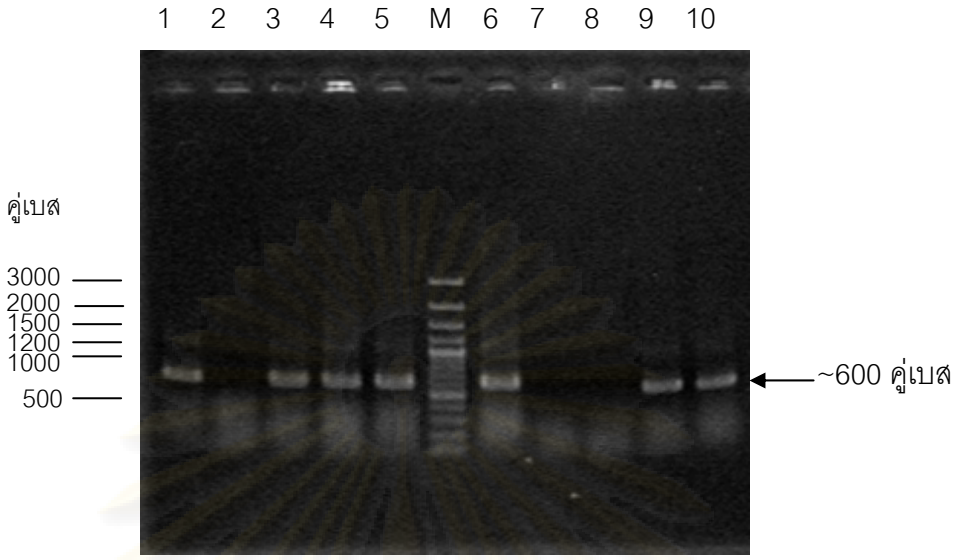


รูปที่ 4.2 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่เพิ่มจำนวนจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งแรกโดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F และ Dex14R

ช่องที่ M	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus
ช่องที่ 1 และ 2	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Dex14F กับ Dex14R โดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งแรกเป็นแม่แบบ

4.3 การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้าในเวกเตอร์ pJET1

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้มาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pJET1 โดยใช้ชุดสำเร็จ GeneJET™ PCR Cloning Kit ตามวิธีในข้อ 3.9.2 จากนั้นทรานสฟอร์มสารละลายผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.3.1 ด้วยวิธี heat shock และนำไปคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นนำไปคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส Dex2F และ Dex2R ตามวิธีในข้อ 3.9.4 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ได้ผลดังในรูปที่ 4.3



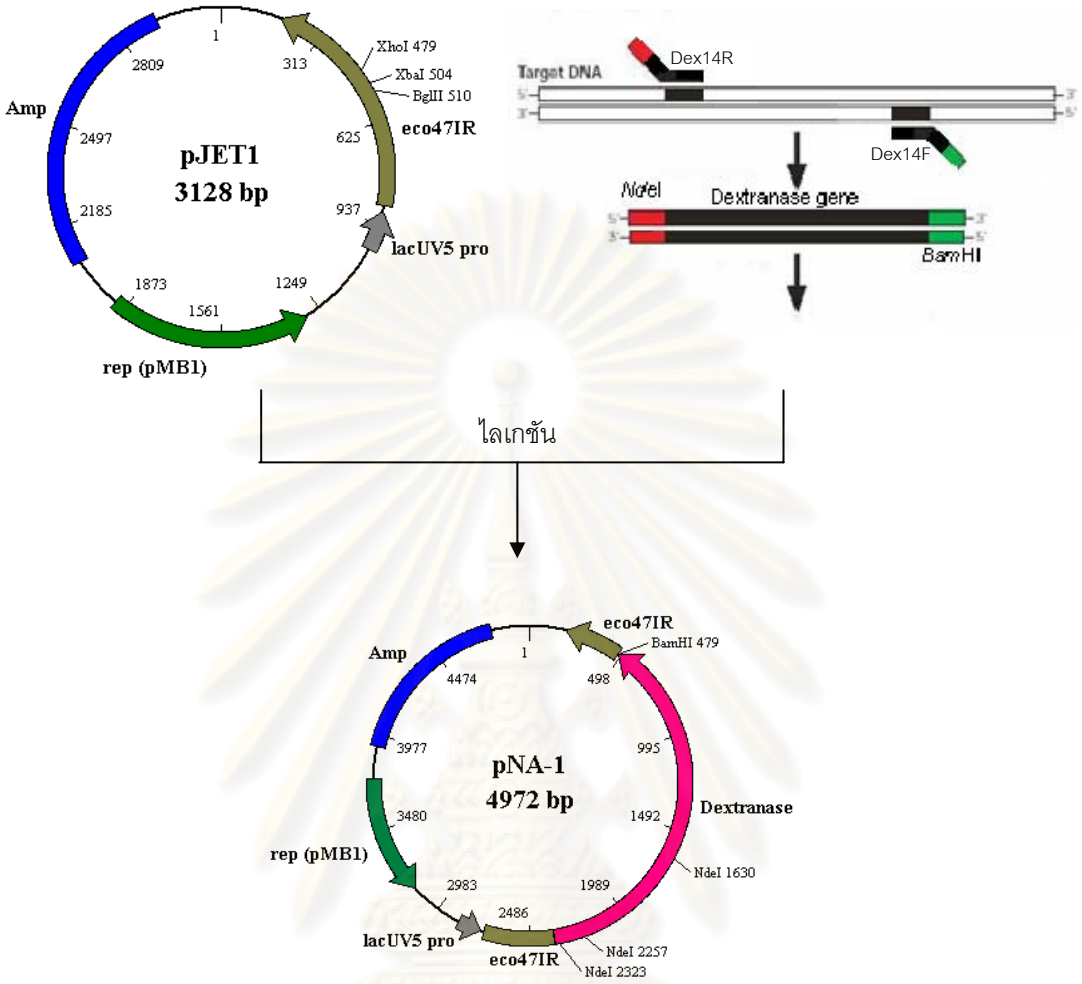
รูปที่ 4.3 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Dex2F และ Dex2R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pJET1

ช่องที่ M GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus

ช่องที่ 1-10 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ Dex2F และ Dex2R โดยใช้โคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกเป็นแม่แบบ

จากรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าทรานสฟอร์แมนต์หมายเลข 1, 3, 4, 5, 6, 9 และ 10 ได้รับพลาสมิด pJET1 ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ ดังนั้นจึงเลือกทรานสฟอร์แมนต์หมายเลข 1 ไปสกัดพลาสมิดที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ตามวิธีในข้อ 3.9.5 และตั้งชื่อพลาสมิดที่ได้ว่า pNA-1 โดยไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNA-1 แสดงไว้รูปที่ 4.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



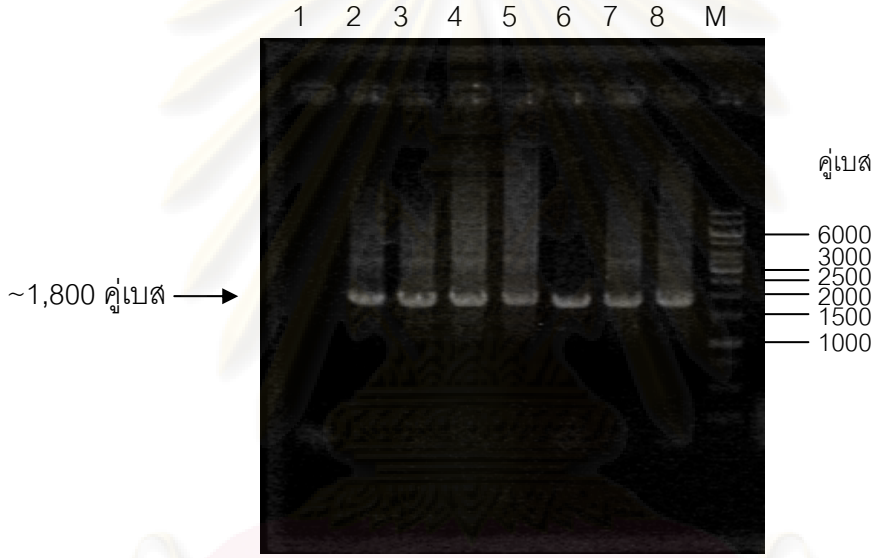
รูปที่ 4.4 ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNA-1

4.4 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออก

4.4.1 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในแบคทีเรีย

นำเวกเตอร์ pETHis และ pCS24 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Nde*I ตามวิธีในข้อ 3.10.1.1 มาเชื่อมต่อกับยีนเดกซ์แทรนเนสที่ตัดออกมาจาก pNA-1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Nde*I ตามวิธีในข้อ 3.10.1.2 จากนั้นทรานสฟอร์มสารละลายผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α และนำไปคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ โดยคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α ที่ได้รับการถ่ายโอนสารละลายผสมเวกเตอร์

pETHis ให้เติมแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารคัดเลือก และคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α ที่ได้รับการถ่ายโอนสารละลายผสมเวกเตอร์ pCS24 ให้เติมกานามัยซินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารคัดเลือก จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส Dex14F และ Dex14R โดยเปรียบเทียบกับชุดควมคุมผลบวกโดยใช้พลาสมิด pPT6 ซึ่งสร้างขึ้นโดยพิมลรัตน์ (2549) เป็นแม่แบบ ซึ่งพลาสมิดดังกล่าวเป็นพลาสมิดที่มีส่วนของจีโนมิกดีเอ็นเอที่มียีนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ได้ผลดังในรูปที่ 4.5 และ 4.6



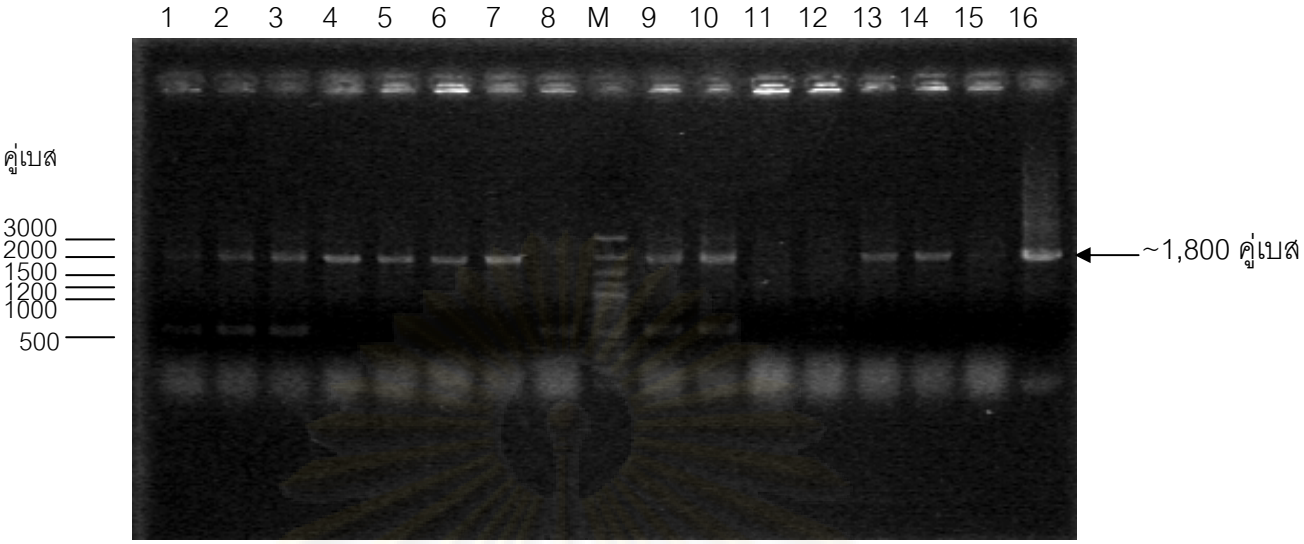
รูปที่ 4.5 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F และ Dex14R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pETHis

ช่องที่ M GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 1-7 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F กับ Dex14R และใช้โคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มสารละลายผสม pETHis กับยีนเดกซ์แทรนเนสเป็นแม่แบบ

ช่องที่ 8 ชุดควบคุมผลบวกคือผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F กับ Dex14R และใช้พลาสมิด pPT6 เป็นแม่แบบ

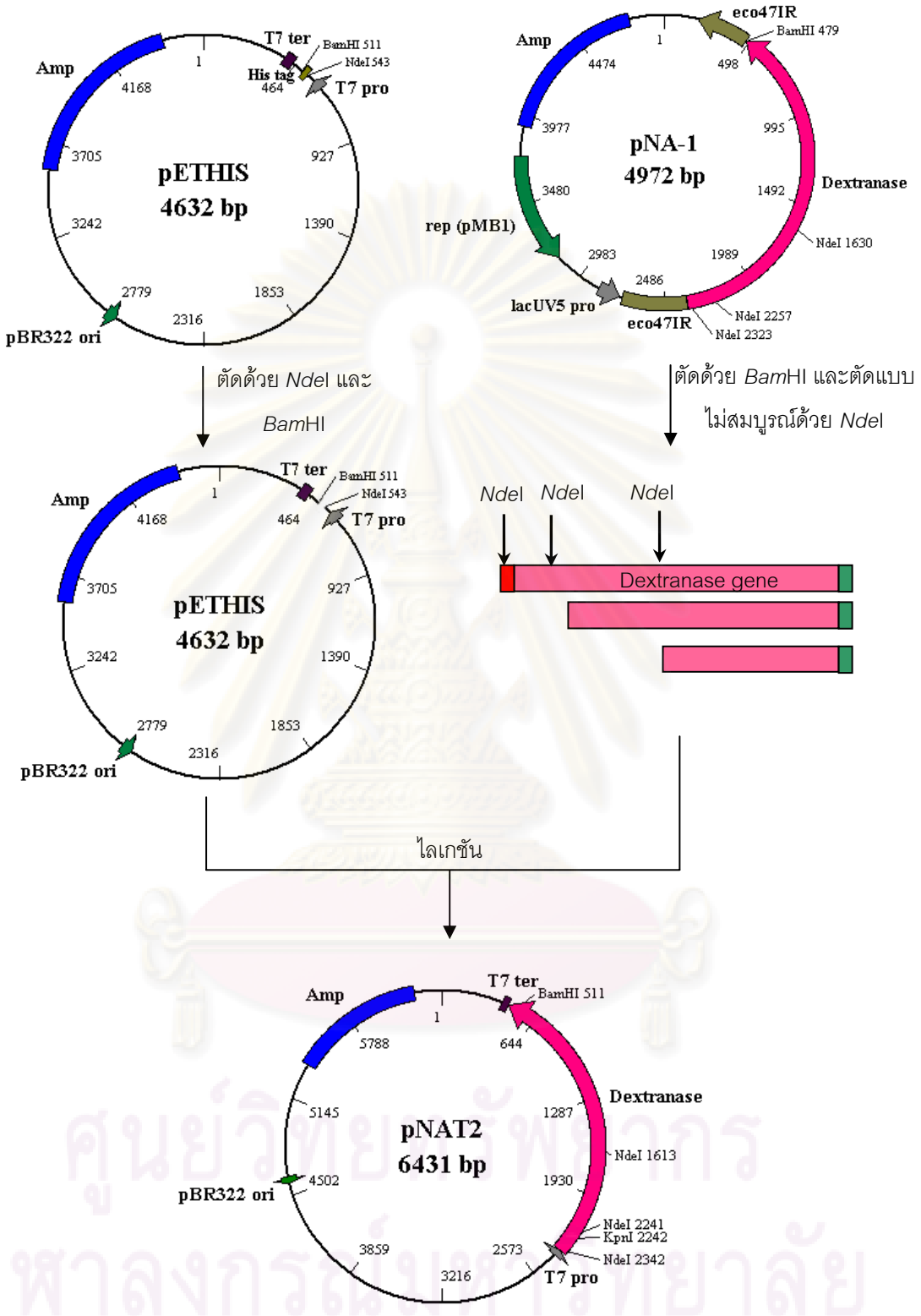
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



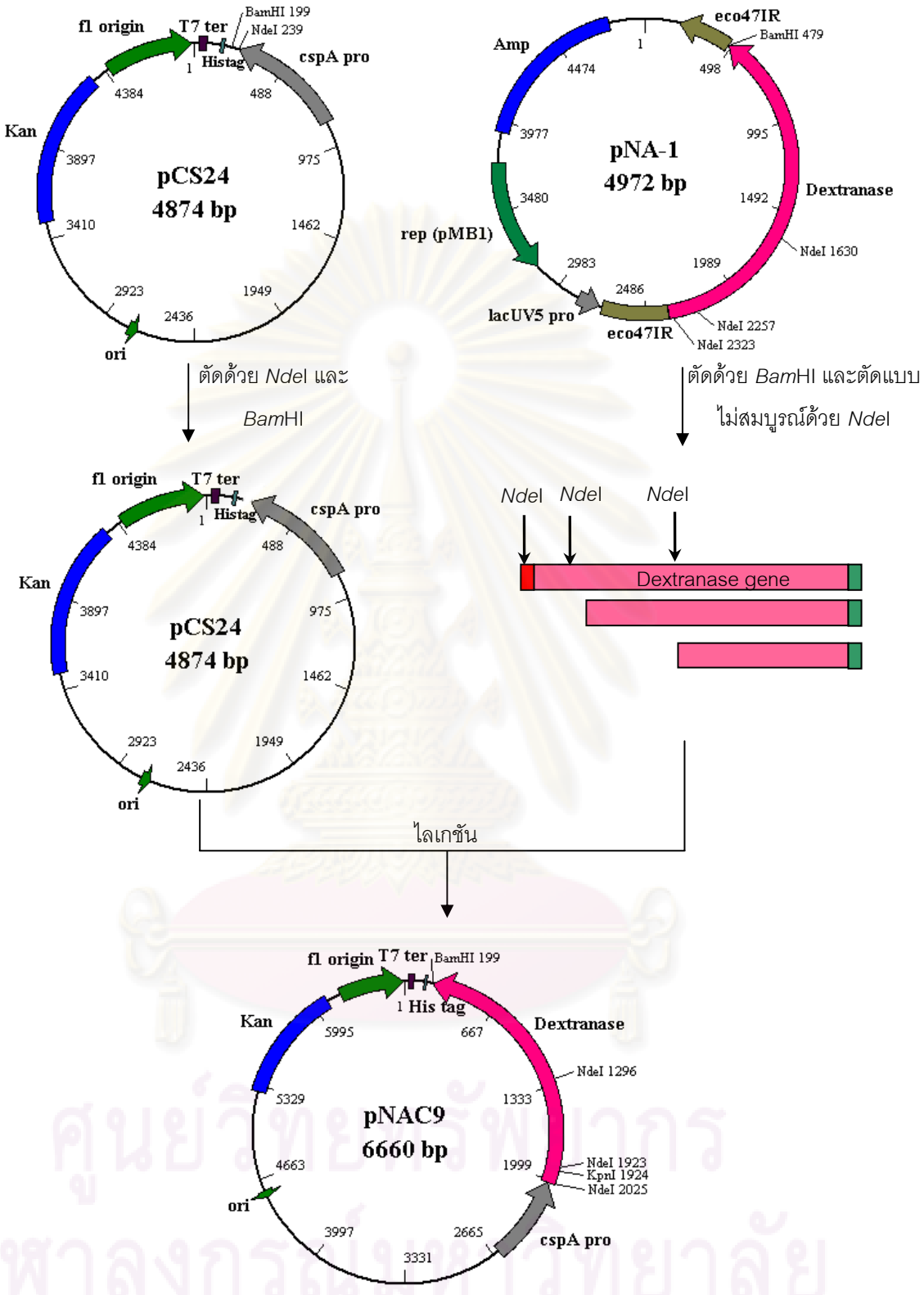
รูปที่ 4.6 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F และ Dex14R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pCS24

ช่องที่ M	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus
ช่องที่ 1-15	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F กับ Dex14R และใช้โคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มสารละลายผสม pCS24 กับยีนเดกซ์แทรนเนสเป็นแม่แบบ
ช่องที่ 16	ชุดควบคุมผลบวกคือผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ Dex14F กับ Dex14R และใช้พลาสมิด pPT6 เป็นแม่แบบ

จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2-7 ได้รับพลาสมิด pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ ดังนั้นจึงเลือกทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 ไปสกัดพลาสมิดที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ตามวิธีในข้อ 3.9.5 และตั้งชื่อพลาสมิดที่ได้ว่า pNAT2 โดยไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAT2 แสดงไว้รูปที่ 4.7 และจากรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2-7, 9, 10, 13 และ 14 ได้รับพลาสมิด pCS24 ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ ดังนั้นจึงเลือกทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 9 ไปสกัดพลาสมิดที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ตามวิธีในข้อ 3.9.5 และตั้งชื่อพลาสมิดที่ได้ว่า pNAC9 โดยไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAC9 แสดงไว้รูปที่ 4.8



รูปที่ 4.7 ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAT2



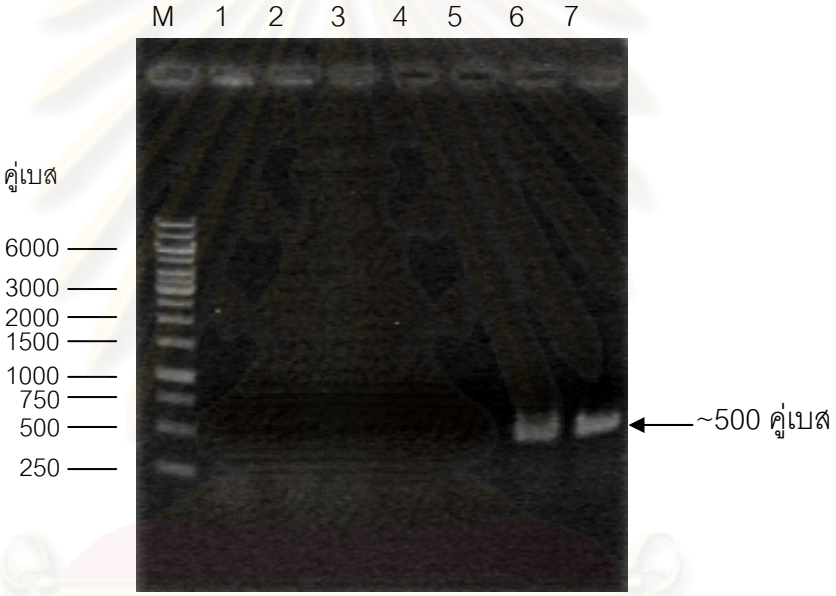
รูปที่ 4.8 ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAC9

จากนั้นนำพลาสมิดทั้งสองไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสบริเวณที่เชื่อมต่ออยู่กับเวกเตอร์ โดยพลาสมิด pNAT2 ใช้ไพรเมอร์ T7 promoter และ T7 terminator เพื่อให้ทราบถึงจุดเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ตามลำดับ และพลาสมิด pNAC9 ใช้ไพรเมอร์ Dex12R และ T7 terminator เพื่อให้ทราบถึงจุดเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ตามลำดับ และทั้งนี้เพื่อให้ทราบว่าเฟรมสำหรับแปลรหัสเป็นโปรตีนถูกต้องหรือไม่และได้ยีนเดกซ์แทรนเนสมาครบหรือไม่อีกด้วย เนื่องจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ก่อนนำมาเชื่อมต่อนั้นสามารถตัดภายในยีนเดกซ์แทรนเนสได้อีกสองตำแหน่งหลังจากจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส โดยได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ของ pNAT2 และ pNAC9 ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ค5 และ ค6 ตามลำดับ โดยพบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pNAT2 นั้นมีขนาด 1824 คู่เบส และมีส่วนที่เป็น signal sequence จาก *P. pinophilum* SMCU3-14 ติดมาด้วย และยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pNAC9 นั้นมีขนาด 1723 คู่เบส (-101 คู่เบส) และไม่มีส่วนที่เป็น signal sequence และกรดอะมิโนอีก 14 หมู่จาก *P. pinophilum* SMCU3-14 ติดมาด้วย แต่สามารถอ่านรหัสได้จนถึงโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ทางด้าน 3' โดยคาดว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพได้

เมื่อได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pNAT2 และ pNAC9 แล้วได้มีการตรวจสอบการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยทรานฟอร์มเข้าในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสำหรับแสดงออกคือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS และ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS และนำไปตรวจสอบบนอาหารแข็ง LB ที่เกลี่ยด้วย IPTG โดยมีตัวควบคุมผลลบเป็นทรานสฟอร์แมนท์ของสายพันธุ์เดียวกันที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่ไม่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่คือ pETHis พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAT2 และ pNAC9 สามารถเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีเมื่อราดด้วยเอทานอล 95% แสดงว่าทรานฟอร์แมนท์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAT2 และ pNAC9 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ (ไม่ได้แสดงผลไว้)

ต่อมาจึงได้โคลนส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก pNAC9 ที่สามารถอ่านรหัสได้จนถึงโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' ไปเข้าในเวกเตอร์ pNAT2 เพื่อให้ได้ยีนเดกซ์แทรนเนสที่มีทั้งส่วนที่เป็น signal sequence จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 ส่วนที่สามารถอ่านรหัสได้เป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' และควบคุมการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ T7 โดยเพิ่มจำนวนยีนเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ pNAC9 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

และไพรเมอร์ Dex17F และ Dex17R จากนั้นนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II และนำเวกเตอร์ pNAT2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I จากนั้นนำไปเชื่อมต่อเข้าด้วยกัน ตามวิธีในข้อ 3.10.1.4 จากนั้นทรานสฟอร์มสารละลายผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α และนำไปคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรโมเตอร์ T7 คือ T7 promoter และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส Dex12R และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสได้ผลดังในรูปที่ 4.9

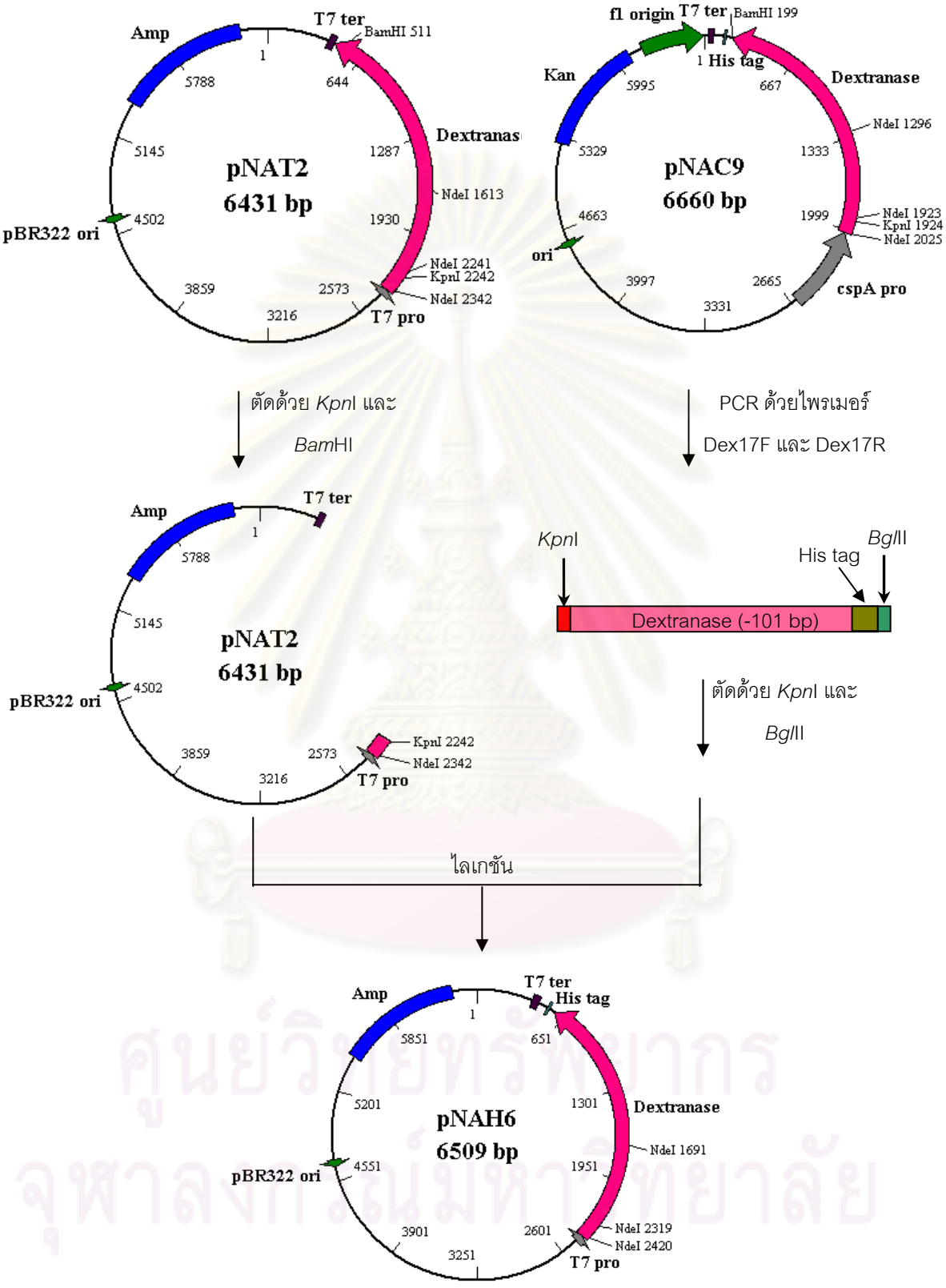


รูปที่ 4.9 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter และ Dex12R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ในเวกเตอร์ pETHis อย่างถูกทิศทาง

ช่องที่ M	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
ช่องที่ 1-7	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter กับ Dex12R และใช้โคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มสารละลายผสมเวกเตอร์ pNAT2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I และส่วนของยีนส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก pNAC9 ที่สามารถอ่านรหัสได้จนถึงโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

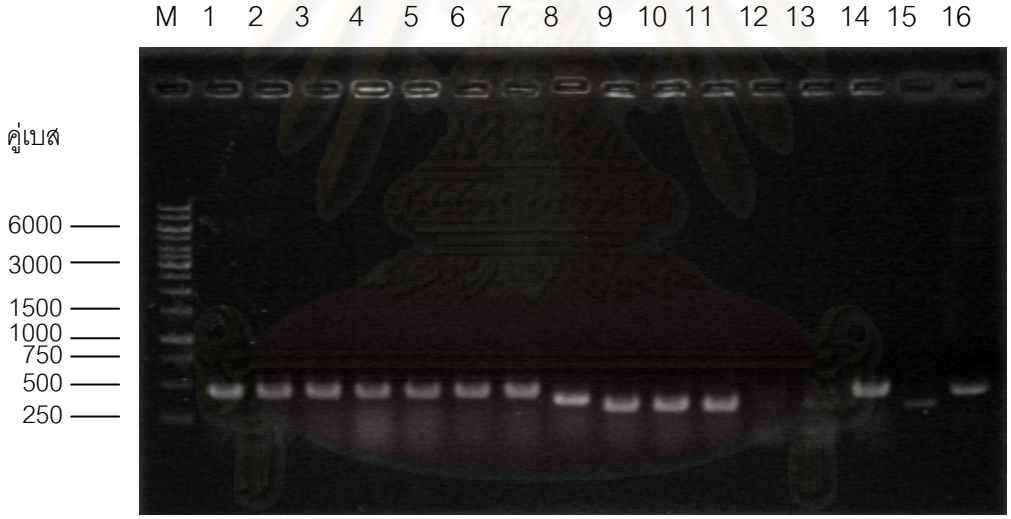
จากรูปที่ 4.9 ช่องที่1-5 ไม่มีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่เกิดขึ้นแสดงว่าได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่มีการเชื่อมต่อไม่ถูกต้อง และในช่องที่ 6 และ 7 มีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่ขนาดประมาณ 500 คู่เบสเกิดขึ้น ทำให้สามารถคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสที่มี signal sequence จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 แทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ T7 และมีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' ตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pNAH6 โดยไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAH6 แสดงไว้รูปที่ 4.10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAH6

ต่อมาจึงได้สร้างเวกเตอร์สำหรับแสดงออกยีนเดกซ์แทรนเนสที่มีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' ของยีนเดกซ์แทรนเนส โดยตัดส่วน 101 คู่เบส ทางด้าน 5' ซึ่งเป็น signal sequence และบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนส (กรดอะมิโนอีก 14 หมู่) ออก (ภาคผนวก ค1 และ ค7) เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสที่มีและไม่มี signal sequence จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 โดยนำพลาสมิด pNAH6 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I แบบไม่สมบูรณ์ และเชื่อมต่อเวกเตอร์ตามวิธีในข้อ 3.10.1.5 จากนั้นทรานสฟอร์มสารละลายผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α และนำไปคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรโมเตอร์ T7 คือ T7 promoter และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส Dex12R และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ได้ผลดังในรูปที่ 4.11



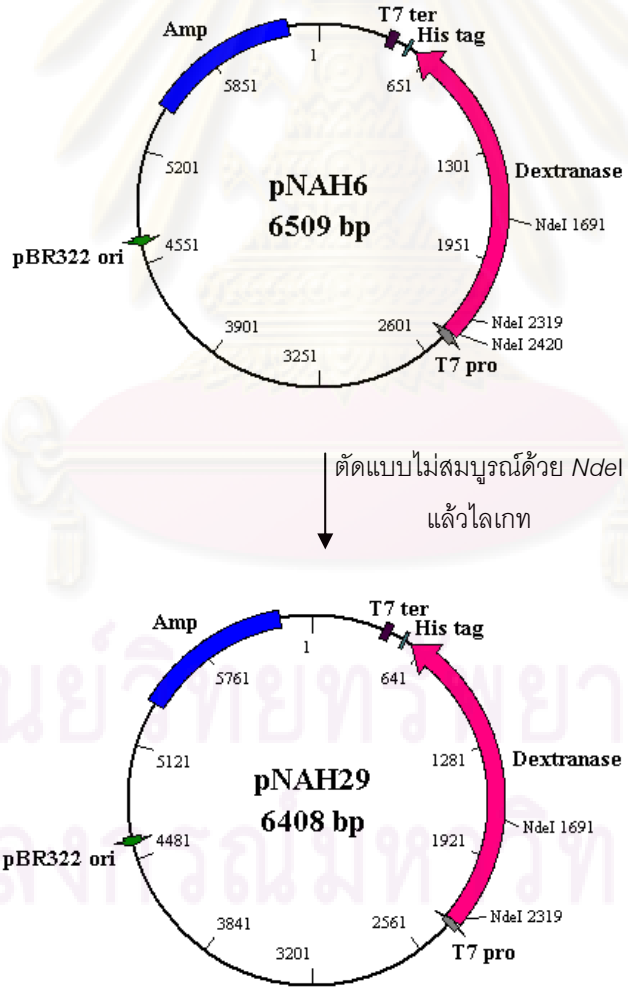
รูปที่ 4.11 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter และ Dex12R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสที่ถูกตัดส่วน 101 คู่เบสทางด้าน 5' ซึ่งเป็น signal sequence และบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสออก

ช่องที่ M GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 1-15 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter กับ Dex12R และใช้โคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มสารละลาย

	เวกเตอร์ pNAH6 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I แบบไม่สมบูรณ์และเชื่อมต่อแล้วเป็นแม่แบบ
ช่องที่ 16	ชุดควบคุมผลบวกคือผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter กับ Dex12R และใช้พลาสมิด pNAH6 เป็นแม่แบบ

จากรูปที่ 4.11 ช่องที่ 9, 10 และ11 มีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่ขนาด 400 คู่เบส เกิดขึ้นแสดงว่ายีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ถูกตัดส่วน 101 คู่เบสทางด้าน 5' ซึ่งเป็น signal sequence และบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสออกแล้ว ดังนั้นจึงคัดเลือกโคโลนีที่ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในช่องที่ 11 ไปเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดโดยพลาสมิดที่ได้ตั้งชื่อว่า pNAH29 โดยไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAH29 แสดงไว้รูปที่ 4.12



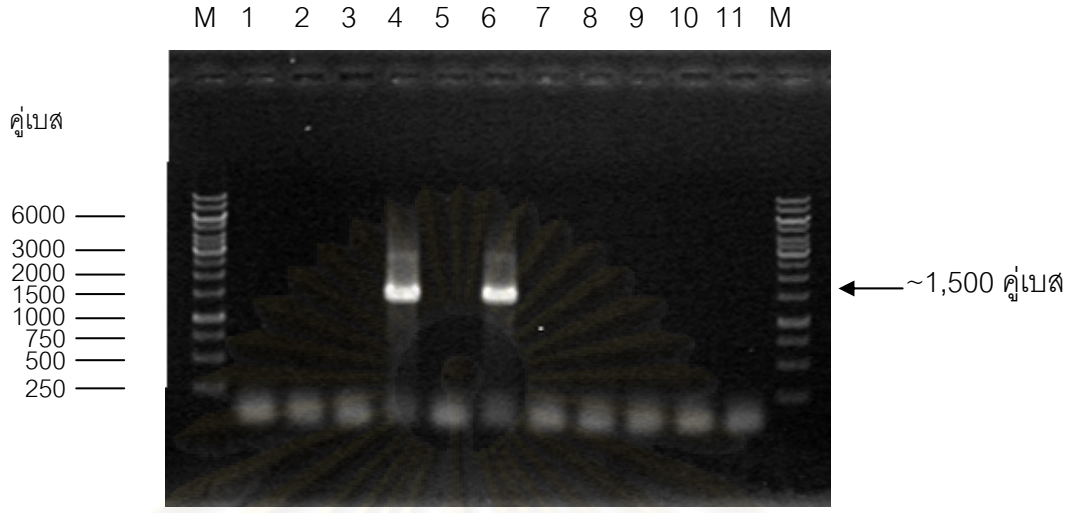
รูปที่ 4.12 ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAH29

จากผลการทดลองได้นำพลาสมิด pNAH6 ซึ่งเป็นเวกเตอร์ pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ โดยยีนเดกซ์แทรนเนสมีส่วนที่เป็น signal sequence จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 ส่วนที่สามารถแปลรหัสได้เป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' และพลาสมิดดังกล่าวควบคุมการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ T7 และพลาสมิด pNAH29 ซึ่งเป็นเวกเตอร์ pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ โดยยีนเดกซ์แทรนเนสไม่มีส่วนที่เป็น signal sequence จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 และบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสหายไป แต่ยีนเดกซ์แทรนเนสดังกล่าวมีส่วนที่สามารถอ่านรหัสได้เป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' และควบคุมการแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ T7 โดยนำพลาสมิดทั้งสองไปถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสำหรับแสดงออกต่อไป

4.4.2 การโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสเข้าในเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในยีสต์

นำเวกเตอร์ pYEX-S1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I และขจัดหมู่ฟอสเฟตทางด้านปลาย 5' ออกด้วยเอนไซม์ CIP ตามวิธีในข้อ 3.10.2.1 แล้ว มาเชื่อมต่อกับยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้มาจากการเพิ่มจำนวนโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ pNAT2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ Dex16F และ Dex16R จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I ตามวิธีในข้อ 3.10.2.2 จากนั้นทรานสฟอร์มสารละลายผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α และนำไปคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อโปรโมเตอร์ PGK และยีนเดกซ์แทรนเนส คือ YEX-F1 และ Dex1R ตามลำดับ และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ได้ผลดังในรูปที่ 4.13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

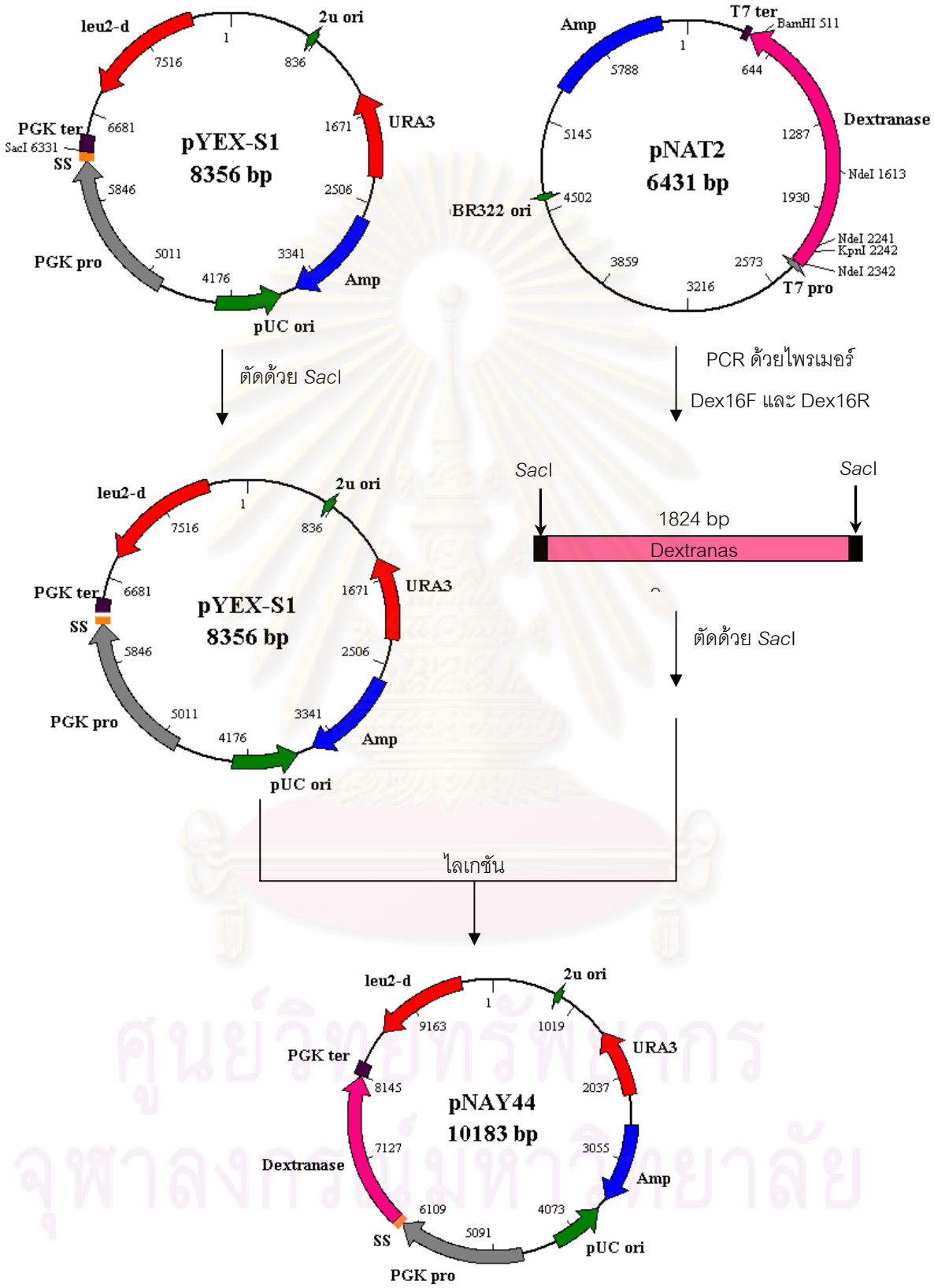


รูปที่ 4.13 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ YEX-F1 และ Dex1R

ช่องที่ M GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 1-11 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ YEX-F1 กับ Dex1R และใช้โคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มสารละลายผสมของเวกเตอร์ pYEX-S1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I กับยีนเดกซ์แทรนเนสเป็นแม่แบบ

จากรูปที่ 4.13 ในช่องที่ 4 และ 6 มีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบสเกิดขึ้นแสดงว่าเวกเตอร์ pYEX-S1 มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์อย่างถูกทิศทางเนื่องจากไพรเมอร์ YEX-F1 จำเพาะต่อบริเวณโปรโมเตอร์ PGK และ Dex1R จำเพาะต่อยีนเดกซ์แทรนเนส ถ้าเกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่แทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์อย่างกลับทิศทางจะไม่เกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังนั้นจึงคัดเลือกโคโลนีที่ใช้เป็นแม่แบบในช่องที่ 4 ไปเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิด โดยพลาสมิดที่ได้ตั้งชื่อว่า pNAY44 โดยไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAY44 แสดงไว้รูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pNAY44

จากนั้นนำพลาสมิด pNAY44 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์โดยใช้ไพรเมอร์ YEX-F1, Dex4F และ Dex13F เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ทั้งหมดอีกทั้งยังทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จุดเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทั้งทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์เพื่อจะได้ทราบว่าเฟรมสำหรับแปลรหัสเป็นโปรตีนถูกต้องหรือไม่ โดยได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pNAY44 ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ค8 โดยพบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pNAY44 นั้นมีขนาด 1,827 คู่เบส ซึ่งรวมถึงส่วนที่เป็น signal sequence จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 โดยพลาสมิด pNAY44 ควบคุมการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสภายใต้โปรโมเตอร์ PGK หลังจากนั้นนำพลาสมิดดังกล่าวไปถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านยีสต์สำหรับแสดงออกต่อไป

4.5 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส

4.5.1 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็ง

4.5.1.1 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็งของเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย

นำพลาสมิด pETHis pNAH6 และ pNAH29 ทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS และ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS จากนั้นนำไปคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเพื่อให้ง่ายแก่การอธิบายผลได้ตั้งชื่อโคลนต่างๆ ของเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียเป็นดังนี้

- โคลน BE คือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETHis
- โคลน BN6 คือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH6
- โคลน BN29 คือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH29
- โคลน RE คือ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETHis
- โคลน RN6 คือ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH6

- โคลน RN29 คือ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH29

พลาสมิดทั้งสามชนิดมีความแตกต่างกันดังนี้

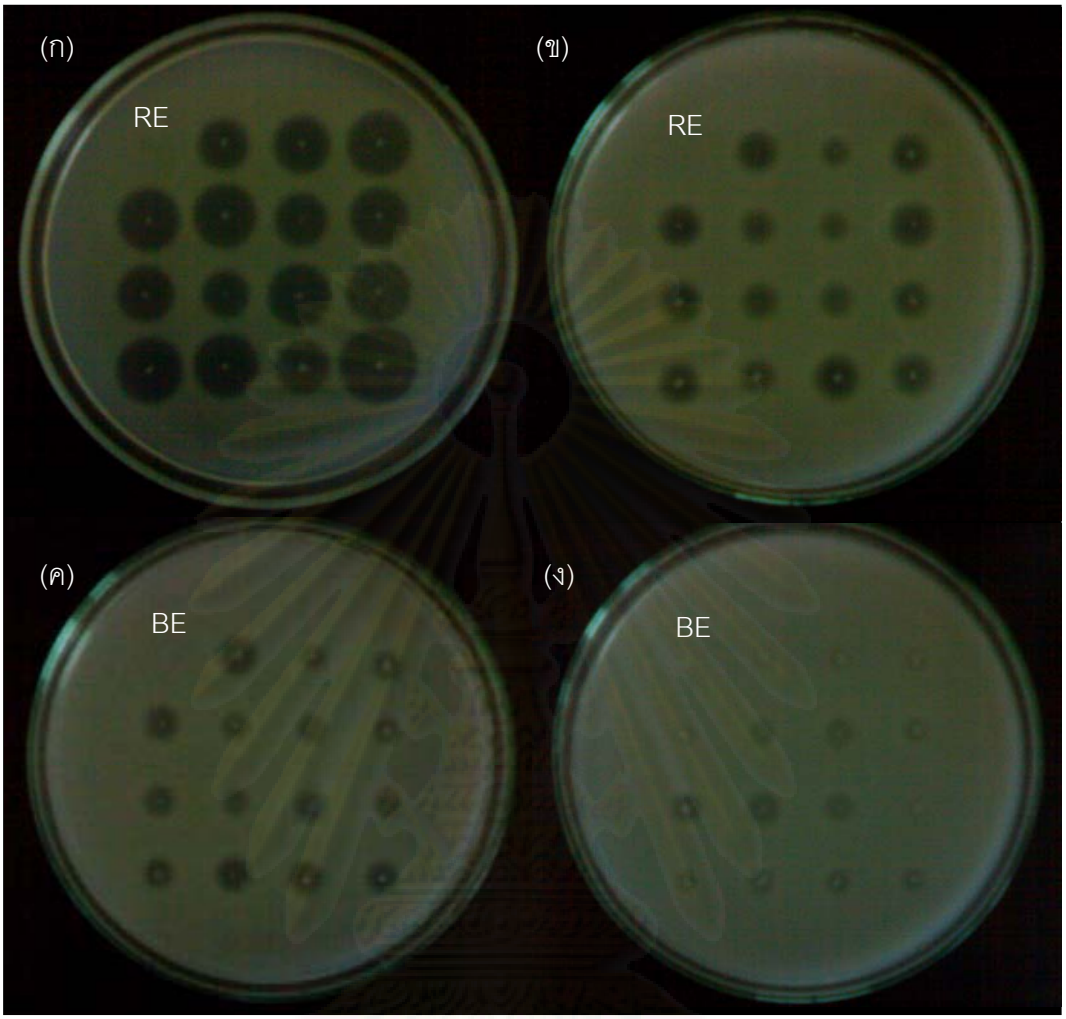
- พลาสมิด pETHis เป็นพลาสมิดที่ไม่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่

- พลาสมิด pNAH6 เป็นพลาสมิด pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ T7 โดยมีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' และมี signal sequence จากราทางด้านปลาย 5'

- พลาสมิด pNAH29 เป็นพลาสมิด pETHis ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ T7 โดยมีโคดอนสำหรับแปลรหัสเป็นฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' และตัดส่วน 101 คู่เบสทางด้าน 5' ซึ่งเป็น signal sequence และบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนสของราออก

จากนั้นนำโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกมาจุดลงบนอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกชนิดเดียวกันและมีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม 1% โดยก่อนจุดโคโลนีให้เกลี่ยด้วย IPTG 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ก่อนเพื่อเป็นตัวชักนำการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส และมีตัวควบคุมผลลบเป็นทรานสฟอร์แมนท์ของสายพันธุ์เดียวกันที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่ไม่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ (pETHis) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาราดเอทานอล 95% ลงบนผิวหน้าอาหาร รอจนกระทั่งเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจากโคลนต่างๆ และเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออก ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.15 ก-ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.15 การเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีแบคทีเรียหลังจากราดด้วยเอทานอล 95% (ก) RN6 เมื่อเทียบกับ RE (ข) RN29 เมื่อเทียบกับ RE (ค) BN6 เมื่อเทียบกับ BE (ง) BN29 เมื่อเทียบกับ BE

จากผลการทดลองโคลน RN6 และ RN29 สามารถสังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนีเมื่อเปรียบเทียบกับโคลน RE และโคลน BN6 และ BN29 สามารถสังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนีเมื่อเปรียบเทียบกับโคลน BE แสดงว่าทุกโคลนสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เมื่อชักนำด้วย IPTG เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตออกมาจะมาย่อยเดกซ์แทรนให้กลายเป็นโมเลกุลน้ำตาลสายสั้นๆ ซึ่งไม่สามารถตกตะกอนเมื่อราดด้วยเอทานอล แต่บริเวณที่เดกซ์แทรนไม่ถูกย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนสจะสามารถตกตะกอนได้เมื่อราดด้วยเอทานอลทำให้เกิดเป็นบริเวณขาวขุ่นรอบบริเวณใส

เมื่อเปรียบเทียบบริเวณใสรอบโคโลนีระหว่างเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS และ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS พบว่าสายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS เกิดบริเวณใส

รอบโคโลนีที่กว้างกว่าสายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ทั้ง RN6 และ RN29 แสดงว่าสายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากกว่าซึ่งเหมาะสมที่จะใช้เป็นเซลล์ผู้ผลิต และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง RN6 และ RN29 พบว่า RN6 เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่กว้างกว่า RN29 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง BN6 และ BN29 พบว่า BN6 เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่กว้างกว่า BN29 แสดงว่าเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH6 มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ปริมาณที่มากกว่าเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH29 หรืออาจเป็นเพราะ signal peptide จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 นั้นมีส่วนช่วยในการขนส่งเดกซ์แทรนเนสออกนอกเซลล์แบคทีเรียได้ หรือกรดอะมิโน 14 หมู่ ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่หายไปเป็นส่วนที่สำคัญต่อการแสดงแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนส ทำให้โคลนที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH6 มีขนาดบริเวณใสรอบโคโลนีกว้างมากกว่าโคลนที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH29 เนื่องจากเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นเพื่อที่จะผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียจึงควรเลือกพลาสมิด pNAH6 เป็นเวกเตอร์ในการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย และควรเลือก *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนเนส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกโคลน RN6 ไปใช้เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยแบคทีเรียต่อไป

4.5.1.2 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็งของเซลล์เจ้าบ้านยีสต์

นำพลาสมิด pYEX-S1 และ pNAY44 ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ BJ5462 จากนั้นนำไปคัดเลือกบนอาหารแข็ง SD ที่มีการเติมกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.11.2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 1-3 วัน สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเพื่อให้ง่ายแก่การอธิบายผลได้ตั้งชื่อโคลนต่างๆ ของเซลล์เจ้าบ้านยีสต์เป็นดังนี้

- โคลน YS1คือ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ BJ5462 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pYEX-S1
- โคลน YN44 คือ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ BJ5462 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAY44

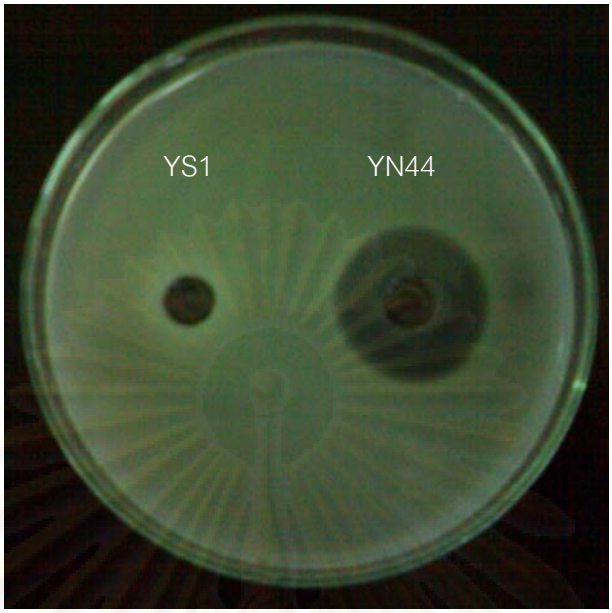
พลาสมิดทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันดังนี้

- พลาสมิด pYEX-S1 เป็นพลาสมิดที่ไม่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่
- พลาสมิด pNAY44 เป็นพลาสมิด pYEX-S1 ที่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์ PGK โดยมี signal sequence จากราทางด้านปลาย 5'

จากนั้นนำโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกมาจุดลงบนอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกชนิดเดียวกันและมีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม 1% โดยมีตัวควบคุมผลลบเป็นทรานสฟอร์แมนท์ของสายพันธุ์เดียวกันที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่ไม่มียีนเดกซ์แทรนเนสแทรกอยู่ (pYEX-S1) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 1-2 วัน นำมาราดเอทานอล 95% ลงบนผิวหน้าอาหาร รอจนกระทั่งเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.16

รูปที่ 4.16 การเกิดบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์ YN44 หลังจากราดด้วยเอทานอล 95% เมื่อเปรียบเทียบกับ YS1

จากรูปที่ 4.16 โคลน YN44 สามารถสังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนีเมื่อเปรียบเทียบกับโคลน YS1 แสดงว่าโคลน YN44 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้โดยไม่ต้องมีการชักนำและผลิตได้ตลอดเวลาที่เซลล์มีการเจริญเติบโต จากนั้นมีการทดสอบการหลั่งเดกซ์แทรนเนสออกนอกเซลล์ โดยนำโคลนทั้งสองไปเลี้ยงในอาหารเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนไปทดสอบแอกทิวิตีเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็งที่มีเดกซ์แทรน โดยนำอาหารที่มีการเติมเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม 1% มาเจาะช่องบนอาหารโดยใช้ cork borers เบอร์ 5 จากนั้นหยอดส่วนใสที่ได้ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำมาราดด้วยเอทานอล 95% เพื่อตรวจสอบการเกิดบริเวณใส โดยผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.17

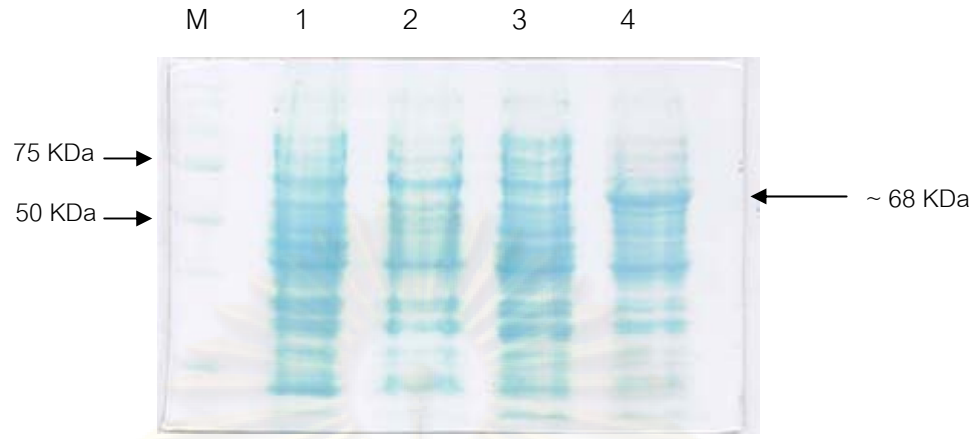


รูปที่ 4.17 การทดสอบแอกทิวิตีเดกซ์แทรนเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ YN44 บนอาหารแข็งที่มีเดกซ์แทรนเมื่อเปรียบเทียบกับ YS1

จากผลการทดลองพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของ YN44 มีแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสเนื่องจากสามารถย่อยเดกซ์แทรนและเกิดเป็นบริเวณใสรอบหลุมได้เมื่อราดด้วยเอทานอล ในขณะที่น้ำเลี้ยงเชื้อของ YS1 ไม่เกิดบริเวณใสรอบหลุมเมื่อราดด้วยเอทานอล แสดงว่าโคลน YN44 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสและหลั่งออกนอกเซลล์ได้ ดังนั้นการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ BJ5462 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAY44 เป็นเซลล์ผู้ผลิต สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้โดยตรงจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

4.5.2 การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE

จากการตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็งพบว่า RN6 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสและให้บริเวณใสรอบโคโลนีที่กว้างที่สุดเมื่อเทียบกับโคลนแบคทีเรียอื่นๆ ดังนั้นจึงนำโคลน RN6 มาใช้วิเคราะห์การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE โดยนำโคลน RE และ RN6 มาเลี้ยงในอาหารเหลวและชักนำให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยเติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 400 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์การแสดงออกเปรียบเทียบกับโคลน RE และ RN6 ที่ไม่ได้ชักนำให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสด้วย IPTG ตามวิธีในข้อ 3.12.2 ได้ผลการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ดังในรูปที่ 4.18



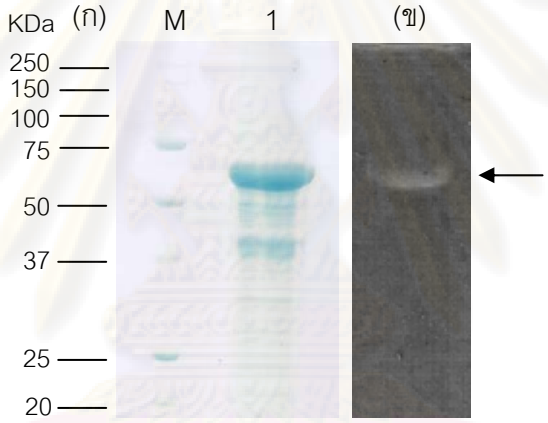
รูปที่ 4.18 การแสดงออกของ RN6 ในเจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250

ช่องที่ M	Molecular weight marker
ช่องที่ 1	RE ที่ไม่ได้ชักนำด้วย IPTG
ช่องที่ 2	RE ที่ชักนำด้วย IPTG
ช่องที่ 3	RN6 ที่ไม่ได้ชักนำด้วย IPTG
ช่องที่ 4	RN6 ที่ชักนำด้วย IPTG

จากผลการทดลองในช่องที่ 4 ซึ่งเป็น RN6 ที่มีการชักนำการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสด้วย IPTG มีแถบที่เพิ่มขึ้นมาตามตำแหน่งที่ลูกศรชี้ เมื่อเปรียบเทียบกับ RE ที่ไม่มีและมีการชักนำด้วย IPTG และ RN6 ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG ซึ่งคาดว่าเป็นแถบของเดกซ์แทรนเนสที่ RN6 ผลิตขึ้นมา และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pNAH6 ตั้งแต่บริเวณจุดเริ่มต้นการแปลรหัสจนถึงจุดสิ้นสุดการถอดรหัสไปทดลองแปลรหัสโดยใช้โปรแกรมสำหรับถอดรหัส (Translate tool) ในเว็บไซต์ 0http://br.expasy.org/tools/dna.html ซึ่งได้ลำดับเพปไทด์ของเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 629 หน่วย (ภาคผนวก ค9) จากนั้นนำลำดับเพปไทด์ที่ได้ไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้โปรแกรมสำหรับคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (molecular weight calculation form) ในเว็บไซต์ 1http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/comp_mw.shtml ได้น้ำหนักโมเลกุลของเดกซ์แทรนเนสจากการคำนวณประมาณ 68,404.78 ดาลตัน ซึ่งแถบของเดกซ์แทรนเนสที่ RN6 ผลิตขึ้นมามีขนาดใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากการคำนวณ และเพื่อยืนยันว่าแถบดังกล่าวเป็นเดกซ์แทรนเนสจริง จึงได้นำไปตรวจสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสใน Blue dextran SDS-PAGE ต่อไป

4.5.3 การแสดงแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสบน Blue dextran SDS-PAGE

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ของโคลน RN6 แล้วพบว่ามีแถบที่เพิ่มขึ้นมาบริเวณตำแหน่งขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน โดยคาดว่าแถบนี้คือเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตขึ้น ดังนั้นเพื่อยืนยันว่าแถบดังกล่าวเป็นเดกซ์แทรนเนสจริงจึงนำตัวอย่างโปรตีนหยาบของโคลน RN6 ที่ชักนำด้วย IPTG แยกบนเจล SDS-PAGE ควบคู่ไปกับเจล Blue dextran SDS-PAGE เมื่อผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าเสร็จเรียบร้อยแล้วนำเจล SDS-PAGE ไปย้อมด้วย Coomassie Blue G250 และล้างสีออกด้วย destaining solution ได้ผลดังในรูปที่ 4.19 (ก) สำหรับเจล Blue dextran SDS-PAGE นำไปทดสอบแอกทิวิตีตามวิธีในข้อ 3.12.3 ได้ผลดังในรูปที่ 4.19 (ข)



รูปที่ 4.19 แสดงเจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของโคลน RN6 ที่มีการชักนำด้วย IPTG (ก) และแอกทิวิตีบน Blue dextran SDS-PAGE ของตัวอย่างโปรตีนหยาบของโคลน RN6 ที่ชักนำด้วย IPTG (ข) (ลูกศรแสดงตำแหน่งของแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสบน Blue dextran SDS-PAGE)

ช่องที่ M	Molecular weight marker
ช่องที่ 1	โปรตีนหยาบของโคลน RN6 ที่ชักนำด้วย IPTG

จากผลการทดลองพบว่าบนเจลที่ผสม Blue dextran มีบริเวณใสที่เกิดจาก Blue dextran ถูกย่อย (รูปที่ 4.19 (ข)) เกิดขึ้น ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับแถบของเดกซ์แทรนเนสที่เห็นบนเจล

SDS-PAGE หลังจากย้อมด้วย Coomassie blue R250 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าแถบที่เห็นนั้นเป็นเดกซ์แทรนเนสจริงและเดกซ์แทรนเนสดังกล่าวสามารถทำงานโดยย่อย Blue dextran ได้

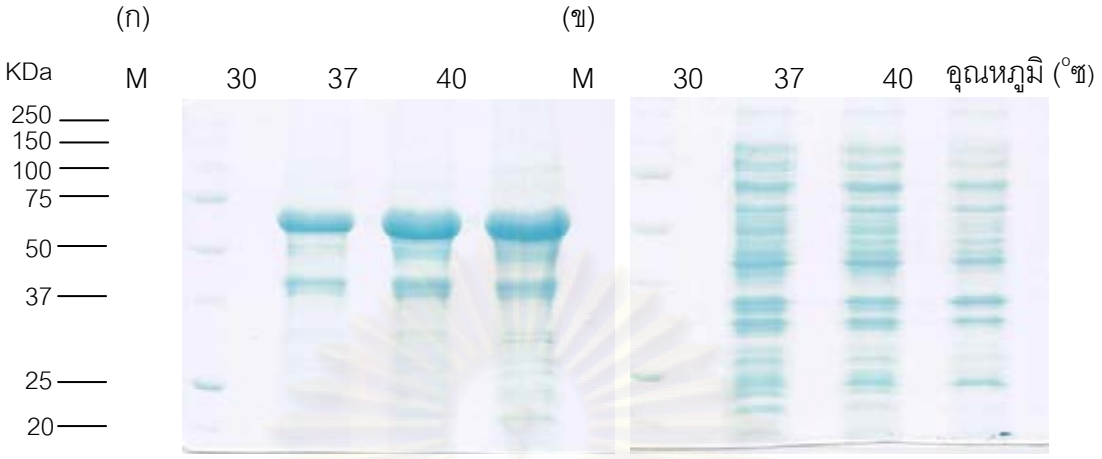
4.6 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

จากการทดลองเมื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียพบว่า RN6 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากที่สุด ดังนั้นเพื่อให้สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากที่สุดโดย RN6 จึงนำ RN6 มาใช้ในการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยมีการแปรผันอุณหภูมิในการผลิต ความเข้มข้นของ IPTG และเวลาในการผลิตหลังชักนำด้วย IPTG

4.6.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อ RN6 และชักนำให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยบ่มเขย่าที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 30, 37 และ 40°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตามวิธีในข้อ 3.13.1 จากนั้นเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.12.2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.20 จากผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้มีการสะสมอยู่ในอินคลูชันบอดี (insoluble fraction, รูปที่ 4.20(ก)) ในขณะที่ไม่พบโปรตีนขนาดดังกล่าวในชุดควบคุมผลลบ (ไม่ได้แสดงผลไว้) และใน soluble fraction (รูปที่ 4.20(ข)) โดยที่เมื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสที่อุณหภูมิ 30°ซ ให้ปริมาณเดกซ์แทรนเนสน้อยกว่าที่ผลิตที่อุณหภูมิ 37°ซ และ 40°ซ และที่อุณหภูมิ 37°ซ และ 40°ซ ให้ปริมาณเดกซ์แทรนเนสไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบขนาดความหนาของแถบที่เป็นเดกซ์แทรนเนส ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 37°ซ ไปใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากเป็นอุณหภูมิทั่วไปที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ และประหยัดพลังงานมากกว่าที่ 40°ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

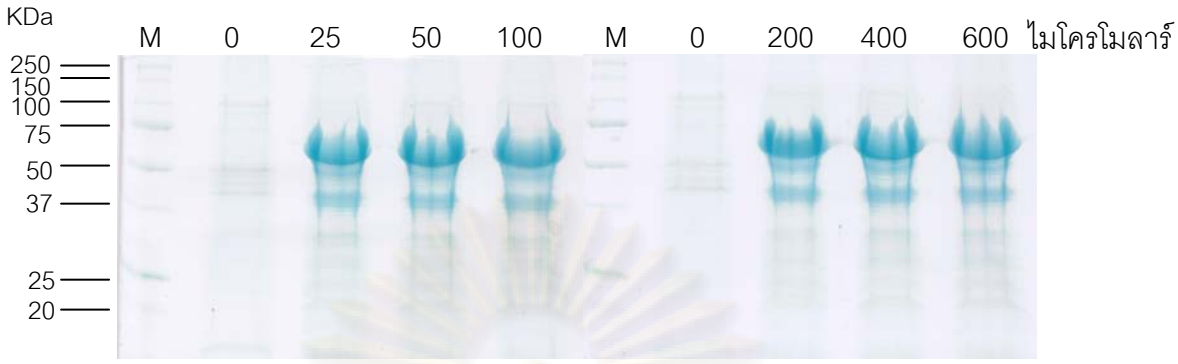


รูปที่ 4.20 เจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละอุณหภูมิ (ก) ตัวอย่าง insoluble fraction (ข) ตัวอย่าง soluble fraction (ช่องที่ M คือ Molecular weight marker)

4.6.2 ความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมในการชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เมื่อเลี้ยงเชื้อ RN ที่อุณหภูมิ 37°ซ และชักนำให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ความเข้มข้น IPTG ที่แตกต่างกันคือ 25, 50, 100, 200, 400 และ 600 ไมโครโมลาร์ และมีชุดควบคุมผลลบที่ไม่เติม IPTG ตามวิธีในข้อ 3.13.2 จากนั้นเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.12.2 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.21 โดยพบว่าที่ทุกความเข้มข้นของ IPTG ชักนำให้เกิดการผลิตเดกซ์แทรนเนสในอินคลูซันบอดีและสามารถชักนำให้เกิดการผลิตเดกซ์แทรนเนสในปริมาณที่เท่ากัน ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้น IPTG 25 ไมโครโมลาร์ ไปใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถชักนำให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

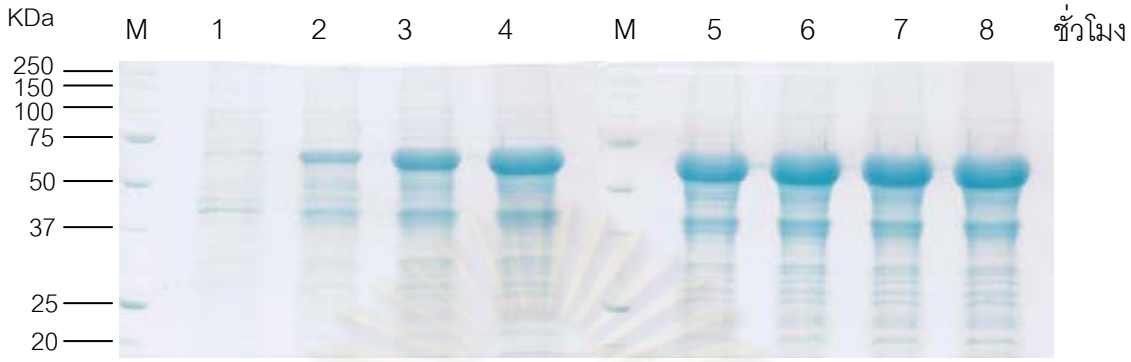


รูปที่ 4.21 เจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของตัวอย่าง (insoluble fraction) ที่ชักนำให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสที่ IPTG ความเข้มข้นต่างๆ (ช่องที่ M คือ Molecular weight marker)

4.6.3 เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสหลังการชักนำด้วย IPTG

เมื่อเลี้ยงเชื้อ RN ที่อุณหภูมิ 37°ซ และชักนำให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ความเข้มข้น IPTG ที่ 25 ไมโครโมลาร์ และเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงหลังจากชักนำด้วย IPTG ตามวิธีในข้อ 3.13.3 แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.12.2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.22 โดยพบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 6 การผลิตเดกซ์แทรนเนสมีปริมาณเพิ่มขึ้นแปรผันตามระยะเวลา และหลังจากชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป มีปริมาณของเดกซ์แทรนเนสคงที่ ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสให้ได้ปริมาณมากที่สุดคือ 6 ชั่วโมงหลังจากชักนำด้วย IPTG โดยที่ยังคงมีการผลิตในอินคลูชันบอดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.22 เจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของตัวอย่าง (insoluble fraction) ที่เก็บทุกชั่วโมงหลังจากชักนำด้วย IPTG (ช่องที่ M คือ Molecular weight marker)

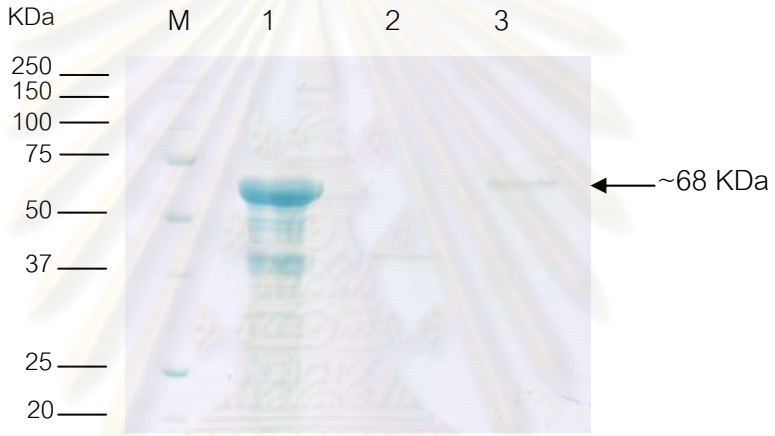
จากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยใช้เซลล์ผู้ผลิตแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-gami B(DE3)pLysS โคลน RN6 พบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสคือ ที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเข้มข้น IPTG 25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

4.7 ความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสหลังทำบริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์โปรตีน His Bind® Purification Kits

เมื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสจากเซลล์ผู้ผลิตแบคทีเรีย RN6 ได้แล้วจึงนำเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้มาทดสอบว่ามีการแปลรหัสให้ฮิสทิดีนได้ 6 หมู่ ทางด้าน 3' อย่างที่คาดไว้จริงหรือไม่ โดยการนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ ซึ่งหลักการทำโครมาโทรกราฟีดังกล่าวใช้ไอออนของโลหะนิกเกลเป็นตัวจับกับโปรตีนที่มีฮิสทิดีนเชื่อมต่อกัน 6-8 หมู่ เนื่องจากสายเพปไทด์บริเวณที่มีฮิสทิดีนเชื่อมต่อกันหลายหน่วยจะมีประจุของสายเพปไทด์บริเวณนั้นเป็นลบซึ่งจะจับกับไอออนของโลหะนิกเกลซึ่งเป็นบวกด้วยพันธะไอออนิก ดังนั้นโปรตีนอื่นที่อยู่ในสารละลายจะไม่สามารถจับกับไอออนของโลหะนิกเกลได้จะผ่านออกมาจากคอลัมน์ เมื่อผ่านคอลัมน์ด้วย wash buffer โปรตีนที่สามารถจับกับคอลัมน์ไม่ได้หรือจับกับคอลัมน์ได้ด้วยแรงอย่างอ่อนจะหลุดออกมาจากคอลัมน์ หลังจากนั้นจะชะโปรตีนซึ่งมีหมู่ฮิสทิดีนหลายหน่วยทางด้านปลายสายด้านใดด้านหนึ่งด้วย elute buffer โปรตีนดังกล่าวจะหลุดออกมาและไม่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนชนิดอื่นๆในสารละลาย ทำให้โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์

และเพื่อยืนยันว่าแถบหนาที่ปรากฏในเจล SDS-PAGE นั้นเป็นเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จริงจึงนำมาทำ SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนหยาบ (เซลล์) ด้วย

เมื่อเลี้ยงเชื้อ RN6 ที่อุณหภูมิ 37°ซ และชักนำให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ความเข้มข้น IPTG ที่ 25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำมาแยก fraction และนำส่วนอินคลูซันบอดีมาละลายด้วยยูเรีย ความเข้มข้น 6 โมลาร์ จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปทำเดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์ด้วย His Bind® Resin Chromatography ตามวิธีในข้อ 3.14 และนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสที่ได้โดยวิธี SDS-PAGE ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 เจล SDS-PAGE หลังการย้อมด้วย Coomassie Blue G250 ของผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ

ช่อง M	Molecular weight marker
ช่องที่ 1	โปรตีนหยาบ
ช่องที่ 2	ตัวอย่าง fraction ที่ล้างคอลัมน์
ช่องที่ 3	เดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์

หลังจากการทำรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพได้เดกซ์แทรนเนสบริสุทธิ์ที่มีขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับที่ได้คาดไว้ และสามารถยืนยันได้ว่าแถบที่หนาขึ้นในเจล SDS-PAGE ที่เห็นจากการตรวจสอบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธี SDS-PAGE (ข้อ 4.5.2) นั้นเป็นโปรตีนเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จริง และสามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพซึ่งเป็นการยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสมีการเชื่อมต่อกับฮิสทิดีน 6 หมู่ ทางด้าน 3'

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 พบว่า *P. pinophilum* SMCU 3-14 จะสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เมื่อมีการชักนำจากเดกซ์แทรนเท่านั้น เนื่องจากเมื่อเลี้ยง *P. pinophilum* SMCU 3-14 ในอาหารที่ใช้ซูโครส 5% เป็นแหล่งคาร์บอนและไม่มีการเติมเดกซ์แทรน จะไม่มีการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส ซึ่งการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยราและแบคทีเรียหลายชนิดนั้น พบว่าจำเป็นต้องมีการชักนำด้วยเดกซ์แทรนทั้งสิ้น เช่น การศึกษาที่พบใน *P. luteum*, *P. minioluteum*, *F. moniliforme*, *P. aculeatum*, *P. notatum* และเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas* UQM 733, *Arthrobacter globiformis* T-3044, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. downei*, *S. criceti*, *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp. และ *Fusobacterium* spp. สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ดีเมื่อมีการชักนำจากเดกซ์แทรน อย่างไรก็ตามก็มีแบคทีเรียจากดินบางชนิด เช่น *Actinomyces* sp. และพืชในสกุล *Avena* ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้โดยไม่ต้องมีการชักนำจากเดกซ์แทรน (Khalikova และคณะ, 2005)

จากการศึกษาผลการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 เมื่อมีการชักนำด้วยเดกซ์แทรน พบว่าวันที่ 3 และ 5 มีการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสที่ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นจึงลดลงในวันที่ 7 และตั้งแต่วันที่ 9-15 ไม่มีการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส ซึ่งแสดงว่าการผลิตเดกซ์แทรนเนสค่อยๆลดลง จนไม่มีการผลิตโดยคาดว่าเนื่องจากปริมาณของเดกซ์แทรนเนสในอาหารที่ใช้เป็นตัวชักนำนั้นค่อยๆ ลดลงจนหมดไป ดังนั้นจึงไม่มีเดกซ์แทรนเหลือมาชักนำให้ *P. pinophilum* SMCU 3-14 ผลิตเดกซ์แทรนเนส และจากการสังเกตระหว่างที่เลี้ยงเชื้อนั้นพบว่า หลังจากวันที่ 9 เป็นต้นไป เซลล์ของราเริ่มตาย โดยเมื่อนำตัวอย่างมากรองเพื่อเก็บเส้นใยนั้น เส้นใยมีลักษณะไม่เป็นแผ่นเหมือนกับวันที่ 3-7 ดังนั้นจึงคาดว่าอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อไม่มีการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนส

Kang และคณะ (2005) ได้โคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจากยีสต์ *Lipomyces starkeyi* KSM22 โดยได้คัดแยกอาร์เอ็นเอจากเชื้อตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง เพื่อนำยีนเดกซ์แทรนเนสดังกล่าวไปแสดงออกใน *S. cerevisiae* พบว่าสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *S. cerevisiae* และนำไปหาลักษณะสมบัติได้ นอกจากนี้ Garcia และคณะ (1996) โคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *P. minioluteum* จากคลังของ cDNA โดยเลี้ยงเชื้อ *P. minioluteum* เป็นเวลา 56 ชั่วโมงและเก็บตัวอย่างเส้นใยมาสกัดอาร์เอ็นเอ จากนั้นนำยีนเดกซ์แทรนเนสที่โคลนได้ไปแสดงออกใน *E. coli*

สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้มีขนาด 67 กิโลดาลตัน และสามารถจดจำได้ด้วยแอนติเดกซ์แทรนเนสแอนติบอดี (anti-dextranase antibody) โดยผู้วิจัยทั้งสองกลุ่มเลือกสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมเดกซ์แทรนเป็นตัวชักนำ โดยเลี้ยงเซลล์ไม่เกิน 3 วัน และยังไม่พบรายงานการโคลนยีนเดกซ์แทรนเนสจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่ใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเนสที่มีอายุมากกว่า 3 วันขึ้นไป

การเพิ่มปริมาณยีนเดกซ์แทรนเนสจาก cDNA ที่เตรียมได้โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และไพรเมอร์ Dex14F และ Dex14R แล้วโคลนเข้าในเวกเตอร์และคัดเลือกจนได้พลาสมิด pNA-1 จากนั้นตัดต่อยีนเดกซ์แทรนเนสออกมาจากพลาสมิด pNA-1 และนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก จนกระทั่งได้เป็นพลาสมิด pNAH6 และ pNAH29 แล้วนำพลาสมิดทั้งสองไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในพลาสมิดดังกล่าว พบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับกรอบอ่านรหัสเปิดที่พิมลรัตน์ (2549) ได้รายงานไว้ทุกประการ ยกเว้นนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,824 ซึ่งอยู่ก่อนรหัสหยุด ที่พิมลรัตน์รายงานไว้เป็นเบส C แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก pNAH6 และ pNAH29 นั้นนิวคลีโอไทด์นี้ได้ถูกเปลี่ยนเป็นจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ซึ่งมีการออกแบบไว้ในไพรเมอร์ และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI แล้วจึงนำไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ จะเปลี่ยนแปลงทำให้เกิดการแปลรหัสต่อไปได้โดยไม่หยุดแปลรหัสที่รหัสหยุด ซึ่งจะทำให้โปรตีนที่ผลิตได้มีการเชื่อมต่อเข้ากับฮิสทิดีน 6 หมู่ทางด้านปลายคาร์บอกซีของสายพอลิเพปไทด์ได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก cDNA นั้นเหมือนกันทุกประการกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโครโมโซม และจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า ยีนเดกซ์แทรนเนสของ *P. pinophilum* SMCU 3-14 ที่อยู่บนโครโมโซมนั้นไม่มีอินทรอน และน่าจะเป็นลักษณะเฉพาะของยีนเดกซ์แทรนเนสในราสกุล *Penicillium* เนื่องจากผลการวิจัยสอดคล้องกับรายงานการศึกษายีนเดกซ์แทรนเนสจากราในสกุล *Penicillium* ของ Garcia และคณะ (1996), Roca และคณะ (1996) และ Li และคณะ (2006) ที่พบว่ายีนเดกซ์แทรนเนสที่โคลนได้ไม่มีอินทรอน

เมื่อนำพลาสมิดสำหรับแสดงออกที่คัดเลือกได้ คือ pNAH6 และ pNAY44 ไปถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านสำหรับแสดงออกที่เหมาะสม พบว่าพลาสมิดทั้งสองสามารถแสดงออกเดกซ์แทรนเนสได้เมื่อนำไปทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมลงไป หลังจากการเลี้ยงเชื้อแล้วราดทับด้วยเอทานอล 95% โดยวิธีการตรวจสอบดังกล่าวเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานานแล้วเพื่อตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส เช่น Simonson และ Liberta (1975) ใช้วิธีดังกล่าวนี้ในการคัดแยกราที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ พบว่ามีรา 10 สายพันธุ์จากทั้งหมด 179 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ และ 10 สายพันธุ์ดังกล่าวคือราในสกุล *Fusarium* และ *Penicillium* และพบว่าราในคลาส

basidiomycetes 123 สายพันธุ์, ascomycetes 13 สายพันธุ์, zygomycetes 13 สายพันธุ์ และ deuteromycetes 20 สายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบไม่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ และอีกตัวอย่างหนึ่งคืองานวิจัยของ Tamura และคณะ (2007) ที่ใช้วิธีดังกล่าวตรวจสอบเชื้อในช่องปากหลายสายพันธุ์และพบว่า *S. ratti* BHT, *S. mutans* MT8148, *S. mutans* MT557, *S. sorbrinus* SL1, *S. sorbrinus* 6715DP และ *S. downei* MFe28 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสในแบคทีเรียระหว่าง *E. coli* สองสายพันธุ์ พบว่า *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากกว่า *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ทั้งนี้มีสาเหตุเนื่องมาจากสายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS เป็นสายพันธุ์ที่อนุพันธ์มาจาก *E. coli* สายพันธุ์ Tuner (B strain) ซึ่งในการแปลรหัสนั้นได้ถูกดัดแปลงให้มี tRNA ที่เป็น rare codon ที่จะประมวลรหัสให้กรดอะมิโนที่ปกติผลิตได้น้อยใน *E. coli* สามารถผลิตได้มากขึ้น (Gräslund และคณะ, 2008) ถึง 6 โคดอน คือ AUA, AGG, AGA, CUA, CCC และ GGA ทำให้การแปลรหัสจากโคดอนที่ไม่ค่อยพบใน *E. coli* มีประสิทธิภาพดีขึ้น ส่วนสายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS นั้นไม่มี rare tRNA supplement ทำให้ tRNA สำหรับกระบวนการแปลรหัสนั้นไม่เพียงพอ ทำให้ประสิทธิภาพในการสร้างสายเพปไทด์เกิดขึ้นได้ช้า หรือเกิดการนำเอากรดอะมิโนที่ผิดเข้าไปเชื่อมต่อกับสายเพปไทด์ (amino acid misincorporation) ดังนั้นในกระบวนการแปลหรัสเป็นโปรตีนจึงไม่สมบูรณ์ ทำให้กระบวนการแปลรหัสโดยอ่านโคดอนของราใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS จึงอาจทำได้ไม่เต็มที่ ปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้จึงมีน้อยกว่าสายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS (Brinkmann และคณะ, 1989; Kane, 1995; Kurland และ Gallant, 1996; Seidel และคณะ, 1992) ดังนั้นในกรณีที่ต้องการโคลนยีนที่มาจากยูแคริโอตแล้วให้มีการแสดงออกในโพรแคริโอต โดยเฉพาะในเซลล์ของ *E. coli* นั้นจึงนิยมใช้สายพันธุ์ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งจะทำให้การอ่านและการแปลรหัสโปรตีนเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยจากการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนมากมายจากยูแคริโอตโดยใช้ *E. coli* สองสายพันธุ์นี้ พบว่าผลการศึกษาเป็นไปในแนวทางเดียวกันคือ เมื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS นั้นสามารถผลิตโปรตีนเป้าหมายได้ในปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS (Liu และคณะ, 2007; Hou และคณะ, 2007; Madan และ Gopal (2007))

จากการศึกษาผลของ signal peptide จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 ต่อการแสดงออกใน *E. coli* พบว่าเมื่อผลิตรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสจากพลาสมิด pNAH6 ซึ่งมีส่วนของ signal peptide จากราเชื่อมต่ออยู่ทางด้านปลาย 5' ของยีนเดกซ์แทรนเนสนั้น พบว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสได้ปริมาณมากกว่าเมื่อผลิตจากพลาสมิด pNAH29 ที่ไม่มี signal peptide จากราติดมา รวมทั้งยังมีบางส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนส (กรดอะมิโน 14 หมู่)

หายไป ใน *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ (เปรียบเทียบจากวงใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้น, รูปที่ 4.15) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก signal peptide จากราสามารถจดจำได้ใน *E. coli* ทำให้สามารถส่งเดกซ์แทรนเนสออกสู่นอกเซลล์ได้มากกว่า ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบบริเวณใสรอบโคโลนีของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH6 จึงมีมากกว่า *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH29 ถึงแม้อาจจะผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในปริมาณที่เท่ากัน แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยจาก Humphreys และคณะ (2000) โดยผู้วิจัยดังกล่าวได้ศึกษาผลของ signal peptide จากยูแคริโอตหลายชนิดว่าสามารถขนส่งโปรตีนออกไปยังเพอริพลาซึมของ *E.coli* ได้หรือไม่ ซึ่งผลจากการวิจัยกล่าวไว้ว่า signal peptide ของยูแคริโอตส่วนใหญ่ไม่สามารถทำงานและขนส่งโปรตีนออกไปยังเพอริพลาซึมของ *E.coli* ได้ อีกทั้งยังไม่รายงานเกี่ยวกับ signal peptide จากราในสกุล *Penicillium* ที่สามารถจดจำและขนส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ *E. coli* ได้ หรืออาจเป็นเพราะส่วนของเดกซ์แทรนเนสทางด้านปลายกรดอะมิโนที่ขาดหายไปเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อการแสดงแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสทำให้ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH29 มีการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสน้อยกว่า *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pNAH6

เป็นที่ทราบกันว่าการนำเฮเทอโรโลกัสยีนมาแสดงออกใน *E. coli* นั้นมีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการ เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรีย, ชนิดของเวกเตอร์, ภาวะในการเลี้ยง ซึ่งประกอบรวมด้วย องค์ประกอบและความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิ, อัตราการเขย่า, ปริมาณความเข้มข้นของสารชักนำ, และระยะเวลาในการชักนำ ดังกล่าวมาแล้ว (Gräslund และคณะ, 2008; Sørensen และ Mortensen, 2005; Terpe, 2006) ดังนั้นสำหรับแต่ละยีนที่ต้องการแสดงออกจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องแปรผันปัจจัยเหล่านี้เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมและเพื่อให้การแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายที่สูงที่สุด จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-gami B(DE3)pLysS พบว่าต้องเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ และชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น IPTG 25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เนื่องจากการชักนำการแสดงออกของโปรโมเตอร์ T7 ด้วย IPTG นั้น ถ้าใช้ IPTG ความเข้มข้นสูงจะมีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงมาก เมื่อโปรตีนที่ผลิตขึ้นมีปริมาณมากและเกิดการ folding ได้ช้า โปรตีนอาจจะถูกย่อยสลายไปหรือเกิดการสะสมเป็นอินคลูชันบอดีภายในเซลล์ ข้อจำกัดอย่างหนึ่งของการ folding โปรตีนภายในเซลล์ *E. coli* นั้นขึ้นกับภาวะรีดิวซ์ภายในไซโทพลาซึม โดยโปรตีนส่วนใหญ่จะเกิดการ folding ได้ดีเมื่อถูกส่งออกไปอยู่ในเพอริพลาซึม แม้ว่า *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS จะมีการกลายพันธุ์ที่ยีนกลูตาไทโอนรีดักเทส (glutathione reductase; *gor*) และไทโอรีดอกซินรีดักเทส (thioredoxin reductase; *trxB*) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนที่อยู่ในไซโทพลาซึมได้ก็ตาม (Aslund และคณะ,

1999; Prinz และคณะ, 1997) แต่การผลิตรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสภายใน *E. coli* สายพันธุ์ดังกล่าวก็ยังพบว่าเกิดการสะสมในอินคลูชันบอดีได้เสมอเช่นกัน เช่น การผลิตแอลคีนโมโนออกซิจีเนส โดย Champreda และคณะ (2004), การผลิตคาร์บอกซิลเอสเทอเรส โดย Dominique และคณะ (2006), การผลิตเมทัลโลโพรทีเนส ADAMTS13 โดย Zanardelli และคณะ (2006), และการผลิตไทโรซีนฟอสฟาเทส โดย Madan และ Gopal (2007) เป็นต้น การผลิตรีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสใน *E. coli* สำหรับงานวิจัยนี้นั้น พบว่าเกิดการสะสมเป็นอินคลูชันบอดี ซึ่งแม้ว่าได้ลดปริมาณความเข้มข้นของ IPTG ลงแล้วก็ตามก็ยังคงพบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้ยังคงเกิดการสะสมเป็นอินคลูชันบอดีซึ่งเป็นรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแล้วมีการสะสมเป็นอินคลูชันบอดีก็มีข้อดีในแง่ของช่วยให้ง่ายต่อการแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากโปรตีนอื่นๆของเซลล์ รวมทั้งได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงและมีความเสถียร, ไม่ถูกย่อยโดยโปรตีเอสได้ง่าย จึงทำให้ประหยัดต้นทุนและเวลาในการผลิต (Kane และ Hartley, 1988)

สำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยใช้เซลล์ผู้ผลิตคือ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ BJ5462 สามารถผลิตและหลั่งออกสู่นอกเซลล์ได้เนื่องจากทางด้านปลายด้านกรดอะมิโนของสายพอลิเพปไทด์มีการเชื่อมต่อกับ leader peptide จาก *Kluyveromyces lactis* ทำให้เดกซ์แทรนเนสถูกส่งออกนอกเซลล์ได้ มีการศึกษามากมายที่แสดงว่า leader peptide จาก *Kluyveromyces lactis* สามารถจดจำโดย *S. cerevisiae* ได้และทำให้สามารถขนส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ *S. cerevisiae* ได้ ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Baldari และคณะ (1987) ได้ทดลองนำ leader peptide จาก *Kluyveromyces lactis* มาใช้ในการเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในยีสต์โดยเชื่อมต่อกับยีน human interleukin 1β (IL-1β) และนำเวกเตอร์ดังกล่าวไปแสดงออกใน *S. cerevisiae* สายพันธุ์ S150-2B พบว่า IL-1β ที่ผลิตขึ้นนั้นถูกขนส่งออกนอกเซลล์ได้และสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ประมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากอาหารเลี้ยงเชื้อ และงานวิจัยของ Wong และคณะ (2005) ได้โคลนยีนแอลฟาอะไมเลสจากข้าวบาร์เลย์และเชื่อมต่อกับ leader peptide จาก *Kluyveromyces lactis* จากนั้นนำไปแสดงออกใน *S. cerevisiae* พบว่าแอลฟาอะไมเลสที่ผลิตได้สามารถหลั่งออกนอกเซลล์ และสามารถทำบริสุทธิ์แอลฟาอะไมเลสได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตเดกซ์แทรนเนสใน *S. cerevisiae* นั้นยังมีส่วนของ signal peptide จากราติดมาด้วย ซึ่งแสดงว่า signal peptide ดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อการส่งเดกซ์แทรนเนสออกสู่นอกเซลล์ยีสต์ รวมทั้งไม่มีผลต่อแอกทิวิตีการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากยังสามารถตรวจพบเดกซ์แทรนเนสได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาจาก Kiiskinen และ Saloheimo (2004) ได้กล่าวว่า เมื่อแทนที่ signal sequence ยีนแลคเคส (laccase) จาก *Melanocarpus albomyces* ด้วยยีนแอลฟาแฟกเตอร์ซึ่งเป็น ledder peptide จาก *S. cerevisiae*

จะช่วยให้การผลิตรีคอมบิแนนท์แลคเคสใน *S. cerevisiae* สามารถผลิตแลคเคสและหลั่งออกมาสู่ภายนอกเซลล์ได้มากขึ้นถึง 200 เท่า ดังนั้นหากนำส่วนของ signal peptide ของเดกซ์แทรนเนสออกก็น่าจะส่งผลทำให้ได้ผลผลิตของเอนไซม์จากยีสต์เพิ่มสูงขึ้นได้

ดังนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเดกซ์แทรนเนสใน *S. cerevisiae* จึงควรศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของ signal peptide จากรา ที่มีผลต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส ซึ่งการตัดส่วนที่เป็น signal peptide จากราออกอาจมีส่วนช่วยในการเพิ่มผลผลิตเดกซ์แทรนเนสได้

จากการตรวจสอบเดกซ์แทรนเนสโดยการทำ SDS-PAGE พบว่าเดกซ์แทรนเนสมีขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ประเมินได้จากลำดับกรดอะมิโนที่ประมวลรหัสได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank Accession EU635729) ซึ่งคล้ายกับเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *P. minioluteum* (67 กิโลดาลตัน; Garcia และคณะ (1996)), *S. suis* (62 กิโลดาลตัน; Serhir และคณะ (1997)), และ *B. fuscum var. dextranolyticum* (68 กิโลดาลตัน; Mizuno และคณะ (1999))

วิธีที่ง่ายสำหรับการตรวจสอบแอกทิวิตีเดกซ์แทรนเนสคือการใช้วิธี Blue dextran SDS-PAGE ซึ่งเป็นการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ภายหลังการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีเดกซ์แทรน แล้วผ่านการรีเนเจอร์ด้วยบัฟเฟอร์ต่างๆ ซึ่งถ้าโปรตีนที่อยู่บนเจลเป็นเดกซ์แทรนเนสก็จะสามารถย่อยบลูเดกซ์แทรนทำให้มองเห็นเป็นแถบใสบนเจล ณ ตำแหน่งที่มีเดกซ์แทรนเนส วิธีดังกล่าวนี้มีผู้วิจัยหลายท่านได้ใช้ในการทดสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทนเนส เช่น Tamura และคณะ (2007) ได้ใช้วิธีดังกล่าวในการทดสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *Streptococcus* สายพันธุ์ต่างๆ, Ohnishi และคณะ (1995) ใช้วิธีดังกล่าวตรวจสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสจาก *S. salivarius* Barrett และ Curtiss (1986) ได้ใช้วิธีดังกล่าวในการทดสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *S. sobrinus* เป็นต้น สำหรับงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B(DE3)pLysS โดยใช้วิธีนี้เช่นกันและพบว่ารีคอมบิแนนท์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้สามารถย่อยบลูเดกซ์แทรนได้หลังจากผ่านการรีเนเจอร์แล้ว

เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยเซลล์ผู้ผลิตแบคทีเรียที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ และเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยเซลล์ผู้ผลิตยีสต์สามารถผลิตและหลั่งออกนอกเซลล์ได้ทำให้มีการปนเปื้อนจากโปรตีนเซลล์ชนิดอื่นมีน้อย ดังนั้นเพื่อนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาลหรือนำไปใช้ทางด้านสุขภาพฟัน สามารถนำโคลนที่ได้ไปเลี้ยงขยายขนาดโดยใช้ภาวะที่ได้จากงานวิจัยนี้เพื่อให้ได้เอนไซม์ในปริมาณที่มากเพียงพอต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จินตกร คูวัฒนสุชาติ. 2542. จุลชีววิทยาช่องปาก และที่มาของโรคฟันผุ โรคปริทันต์และโรคในช่องปาก. 2nd ed. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชราวดี บุตรทา. 2548. ภาวะการเก็บเดกซ์แทรนเนสให้เสถียร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรพิมล เมธีนุกูล. 2548. การแสดงออกของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจากพะยูงไทย (*Dalbergia cochinchinensis Pierre*) ในยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี. 2549. การโคลนและการหาลำดับของจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิโรจน์ ศรีสรากรณ์. 2547. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. 2nd ed. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวรรณา นพพรพันธ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. SMCU 3-14. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักบริหารการค้าสินค้าทั่วไป กระทรวงพาณิชย์. 2551. สถานการณ์น้ำตาลของไทย. [Online]. แหล่งที่มา : http://www.dft.moc.go.th/level4Frame.asp?sPage=the_files/$$10/level4/น้ำตาล51.xls [25 ส.ค. 2551]

เอก แสงวิเชียร. 2531. เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Addy, M. 1986. Plaque control as a scientific basis for the prevention of dental caries. J. Royal Soc. Med. Suppl. 79: 6-10.

Aslund, F., Bessette, P.H., Georgiou, G. and Beckwith, J. 1999. Efficient production of disulfide bonded proteins in the cytoplasm in “oxidizing” mutants of *E. coli*. InNovations. 10: 11-12.

Baldari, C., Murray, J.A.H., Ghiara, P., Cesareni, G. and Galeotti, C.L. 1987. A novel leader peptide which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1□ in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 6: 229-234.

Barrett, J.F. and Curtiss, R., III 1986. Renaturation of dextranase activity from culture supernatant fluids of *Streptococcus sobrinus* after sodium dodecylsulfate polyacylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 158: 365-370.

Block, P.L., Dooney, C.L. and Howe, E.E. 1969. The retardation of spontaneous periodontal disease and the prevention of caries in hamsters with dextranase. J. Periodont. 40: 105-110.

Brinkmann, U., Mattes, R.E. and Buckel, P. 1989. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. Gene. 85: 109-114.

Brown, T.A. 1999. Genomes. John Wiley & Sons, New York.

Champreda, V., Zhou, N.Y. and Leak, D.J. 2004. Heterologous expression of alkene monooxygenase components from *Xanthobacter autotrophicus* Py2 and reconstitution of the active complex. FEMS Microbiol. Lett. 239:309-318.

Cole, J.A. 1977. A biochemical approach to the control of dental caries. Biochem. Soc. Trans. 5: 1232-1239.

De-la-Re-Vega, E., García-Orozco, K.D., Calderón-Arredondo, S.A., Romo-Figueroa, M.G., Islas-Osuna, M.A., Yepiz-Plascencia, G.M. and Sotelo-Mundo, R.R. 2004. Recombinant expression of marine shrimp lysozyme in *Escherichia coli*. J. Biotechnol. 7: 298-304.

Dominique, B., Elke, B., Kai, D. and Uwe, T.B. 2006. Functional expression of the γ-isoenzyme of pig liver carboxyl esterase in *Escherichia coli*. Appl Microbiol. Biotechnol. 73: 1282-1289.

Drasar, B.S. and Hill, M.J., 1974. Human Intestinal Flora. Academic Press, New York, pp. 15-43.

Efstradiatis, A., Kafatos, F.C., Maxam, A.M. and Maniatis, T. 1976. Enzymatic *in vivo* synthesis of globin genes. Cell. 7: 279-288.

Fitzgerald, R.J., Keyes, P.H., Stoudt, T.H., and Spinell, D.M. 1968. The effect of a dextranase preparation on plaque and caries in hamster, a preliminary report. JADA. 76: 301-304.

Fukumoto, J., Tsuji, H., and Tsuru, D. 1971. *Penicillium luteum* dextranase: its production and some enzymatic properties. J. Biochem. 69: 1113-1121.

Fulcher, R.P. and Inkerman, P.A. 1976. Dextranase I. Characterization of the enzyme for use in sugar mills. Proc. Queensl. Soc. Sugar Cane Technol. 43rd Conf. 295-305.

2Garcia, B., Margolles, E., Roca, H., Mateu, D., Raices, M., Gonzales, M.E., Herrera, L. and Delgado, J. 1996. Cloning and sequencing of a dextranase-encoding cDNA from *Penicillium minioluteum*. FEMS Microbiol. Lett. 143: 175-183.

Gietz, D., Jean, A. St., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Res. 20: 1425.

Goulas, A.K., Fisher, D.A., Grimble, G.K., Grandison, A.S. and Rastall, R.A. 2004. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. Enzyme Microb. Technol. 35: 327-338.

Gräslund, S. et al. 2008. Protein production and purification. Nat. Methods. 5: 135-146.

Griffiths, A.J., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. 1993. An introduction to genetic analysis. Freeman and company. New York.

Gubler, U. and Hoffman, B.J. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene. 25: 263-269.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.

Harboe, E., Larsen, C., Johansen, M. and Olesen, H.P., 1989. Macromolecular prodrugs. XV. Colon targeted delivery–bioavailability of naproxen from orally

administered dextran-naproxen ester prodrugs varying in molecular size in the pig. Pharm. Res. 6: 919-923.

Henrissat, B. and Davies, G.J. 2000. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families, modules, and implications for genomics. Plant Physiol. 124: 1515-1519.

Hou, X., Hu, T.M. and Liu, J. 2007. Expression of functional human STK11 protein in *Escherichia coli*. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 47: 79-82.

Humphreys, D.P., Sehdev, M., Chapman, A.P., Ganesh, R., Smith, B.J., King, L.M., Glover, D.J., Reeks, D.G. and Stephens, P.E. 2000. High-level periplasmic expression in *Escherichia coli* using a eukaryotic signal peptide: importance of codon. Protein Expr. Purif. 20: 252-264.

Hutson, D.H. and Weigel, H. 1963. Studies on dextrans and dextranases. Mechanism of the actions of intra- and extracellular mould dextranases. Biochem. J. 88: 588-591.

Imrie, F.K.E. and Tilbury, R.H. 1972. Polysaccharides in sugar cane and its products. Sugar Technol. Rev. 1: 291-361.

Kane, J.F. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Biotechnol. 6: 494-500.

Kane, J.F. and Hartley, D.L. 1988. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol. 6: 95-101.

Kang, H.K., Kim, S.H., Park, J.Y., Jin, X.J., Oh, D.K., Kang, S.S. and Kim, D. 2005. Cloning and characterization of a dextranase gene from *Lipomyces starkeyi* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 22: 1239-1248.

Khalikova, E., Susi, P. and Korpela, T. 2005. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. Microb. Mol. Biol. Rev. 69: 306-325.

Kiiskinen, L.L. and Saloheimo, M. 2004. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 137-144.

Kim, D. and Day, D.F. 1994. A new process for the production of clinical dextran by mixed-culture fermentation of *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*. Enzyme Microb. Technol. 16: 844-848.

Kurland, C. and Gallant, J. 1996. Errors of heterologous protein expression. Curr. Opin. Biotechnol. 7: 489-493.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 277: 680-685.

Larsen, C., Harboe, E., Johansen, M. and Olsen, H.P., 1989. Macromolecular prodrugs XVI. Colon targeted delivery – a comparison of rate of release of naproxen from dextran ester prodrugs in homogenates of various segments of the pig gastrointestinal tract. Pharm. Res. 6: 995-999.

Larsen, C., Jensen, B.H. and Olesen, H.P., 1991. Bioavailability of ketoprofen from orally administered ketoprofen–dextran ester prodrug in the pig. Acta Pharm. Nord. 3: 71-76.

Leach, S.A. 1969. Dextranase and dental caries. Br. Dent. J. 20: 325-330.

Li, X., Millson, S.H., Coker, R.D. and Evans, I.H. 2006. Cloning and expression of *Penicillium minioluteum* dextranase in *Saccharomyces cerevisiae* and its exploitation as a reporter in the detection of mycotoxins. Biotechnol. Lett. 28: 1955-1964.

Liu, J., Hu, T. and Hou, X. 2007. High-level expression of functional tumor suppressor LKB1 in *Escherichia coli*. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 39: 779-786.

Marotta, M., Martino, A., Rosa, A., Farina, E., Carteni, M. and Rosa, M. 2002. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. Proc. Biochem. 38: 101-108.

Mizuno, T., Mori, H., Ito, H., Matsui, H., Kimura, A. and Chiba, S. 1999. Molecular cloning of isomaltotrio-dextranase gene from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 and its expression in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 1582-1588.

Monchois, V., Willemot, R.M. and Monsan, P. 1999. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. FEMS Microbiol. Rev. 23: 131-151.

Morawski, B., Lin, Z., Cirino, P., Joo, H., Bandara, G. and Arnold, F.H. 2000. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae and Pichia pastoris*. Protein Eng. 13: 377-384.

Ohnishi, Y., Kubo, S., Ono, Y., Nozaki, M., Gonda, Y., Okano, H., Matsuya, T., Matsushiro, A. and Morita, T. 1995. Cloning and sequencing of the gene coding for dextranase from *Streptococcus salivarius*. Gene. 156: 93-96.

Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. 1997. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. J. Biol. Chem. 272: 15661-15667.

Roca, H., Garcia, B., Rodriguez, E., Mateu, D., Coroas, L., Cremata, J., Garcia, R., Pons, T. and Delgado, J. 1996. Cloning of the *Penicillium minioluteum* gene encoding dextranase and its expression in *Pichia pastoris*. Yeast 12: 1187-1200.

Rosenfeld, E.L. and Lukomskaya. I.S. 1957. The splitting of dextran and isomaltose by animal tissues. Clin. Chim. Acta. 2): 105-114.

Rudolph, R. and Lilie, H. 1996. *In vitro* folding of inclusion body proteins. FASEB J. 10: 49-56.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Habor.

Sankpal, N. V., Joshi, A. P., Sainkar, S. R. and Kulkarni, B. D. 2001. Production of dextran by *Rhizopus* sp. immobilized on porous cellulose support. Process Biochem. 37: 395–403.

Schachtele, C.F., Staat, R.H. and Harlander, S.K. 1975. Dextranase from oral bacteria: inhibition of water-insoluble glucan production and adherence to smooth surface by *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 12: 309-317.

Seidel, H.M., Pompliano, D.L. and Knowles, J.R. 1992. Phosphonate biosynthesis: molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from *Tetrahymena pyriformis* and overexpression of the gene product in *Escherichia coli*. Biochemistry. 31: 2598-2608.

Serhir, B., Dugourd, D., Jacques, M., Higgins, R. and Harel, J. 1997. Cloning and characterization of a dextranase gene (*dexS*) from *Streptococcus suis*. Gene. 190: 257-261.

Sigma-Aldrich Co. 2008. Dextranase and dextrans. [Online]. http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis/Carbohydrate_AnalysisII.html#Dextranase. 25 August 2008.

Sims, I.M., Thomson, A., Hubl, U., Larasen, N.G. and Furneaux, R.H. 2001. Characterization of polysaccharides synthesized by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943. Carbohydr. Polym. 45: 285-292.

Simonson, L.G., and Liberta, A.E. 1975. A new source of fungal dextranases. Mycology. 67: 845-851.

Sinha, V.R. and Kumria, R. 2001. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. J. Pharm. 224: 19-38.

Sørensen, H.P. and Mortensen, K.K. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Microb. Cell Fact. 4: 1-8.

Sun, J., Cheng, X., Zhang, Y., Yan, Z. and ZHANG, S. 1988. A strain of *Paecilomyces lilacinus* producing high quality dextranase. Ann. N. Y. Acad. Sci. 542: 192-194.

Sutherland, I.W. 1996. Extracellular Polysaccharides. Biotechnology. edited by H.J., Rehm, G., Reed, A., Puhler, and P., Stadler, vol. 6, 2nd edition. Primary Metabolism, New York.

Tamura, H., Yamada, A. and Kato, H. 2007. Identification and characterization of a dextranase gene of *Streptococcus criceti*. Microbiol. Immunol. 51: 721-732.

Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 211-222.

Tillbury, R.H., Hollingworth, S., Graham, S.D. and Porttage, P. 1977. Mill sanitation : a fresh approach to biocide evaluation. Internat. Soc. Sugar Cane Technol. 3: 1277-1286.

Van Houte, J. and Russo, J. 1986. In Hamada, S., Michalek, S.M., Kiyono H., Menaker L., and McGhee, J.R. (eds.). Molecular Microbiology and Immunology of *Streptococcus mutans*. pp. 157-167. Netherland: Elsevier Science Publishers.

Walker, G.J. 1978. Dextrans. Int. Rev. Biochem. 16: 75-126.

Wong, D.W.S., Batt, S.B. and Robertson, G.H. 2001. Characterization of active barley α-amylase 1 expressed and secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Protein Chem. 20: 619-623.

Wynter, C. 1997. Screening method for dextranases and amylodextranases from anaerobic thermophiles. J. Gen. Appl. Microobiol. 42: 213-223.

Yamamoto, K., Yoshikawa, K. and Okada, S. 1993. Effective dextran production from starch by dextrin dextranase with debranching enzyme. J. Ferment. Bioeng. 76: 411-413.

Yano, S., Wakayama, M. and Tachiki, T. 2006. Cloning and expression of an alpha-1,3-glucanase gene from *Bacillus circulans* KA-304: the enzyme participates in protoplast formation of *Schizophyllum commune*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 1754-1763.

Zanardelli, S., Crawley, J.T., Chion, C.K., Lam, J.K., Preston, R.J. and Lane, D.A. 2006. ADAMTS13 substrate recognition of von willebrand factor A2 domain. J. Biol. Chem. 281: 1555-1563.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Fukumoto (1971)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2	กรัม
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.009	กรัม
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	10	กรัม
วุ้น	20	กรัม

ละลายสารทุกชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็น 4.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Fukumoto (1971) ที่ปรับปรุงโดย ศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ (2547)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.879	กรัม
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	0.82	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
กากน้ำตาล (molass)	15	มล.
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	9.4	กรัม

ละลายสารทุกชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็น 4.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ψb

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5	กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ψb

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ψb และละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10	กรัม
เพปโตน (peptone)	10	กรัม
กลูโคส (glucose)	20	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD และละลายวุ้น 20 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

9. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Synthetic dextrose minimal medium (SD agar)

ผงสกัดจากยีสต์ที่ปราศจากกรดอะมิโน (yeast nitrogen base without amino acid)	6.7	กรัม
กลูโคส (glucose)	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้ต้องเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิดและอะดีนีน (ภาคผนวก ก10) ลงไปด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. สารละลายกรดอะมิโนและอะดีนีน

- สารละลายลิวซีน (leucine)

ละลายลิวซีน 100 มิลลิกรัมในน้ำปลอดประจุปริมาตร 10 มล.

- สารละลายฮิสทิดีน (histidine)

ละลายฮิสทิดีน 100 มิลลิกรัมในน้ำปลอดประจุปริมาตร 10 มล.

- สารละลายทริปโตเฟน (tryptophane)

ละลายทริปโตเฟน 100 มิลลิกรัมในน้ำปลอดประจุปริมาตร 10 มล.

- สารละลายอะดีนีน (adenine)

ละลายอะดีนีน 20 มิลลิกรัมในน้ำปลอดประจุปริมาตร 10 มล.

สารละลายกรดอะมิโนทุกชนิดและอะดีนีนทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทต ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4°ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กลีเซอรอล 80%

นำกลีเซอรอล 87% ปริมาตร 92 มล. ผสมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 8 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบ

2. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ e-Zi RNA kit (sunolin corporation, Thailand)

ประกอบด้วย

บัฟเฟอร์ RA

บัฟเฟอร์ RB

บัฟเฟอร์ RC

บัฟเฟอร์ RD

บัฟเฟอร์ RE

สารละลายที่ต้องเตรียมเพิ่มคือ

- น้ำ DEPC

นำน้ำปลอดประจุปริมาตร 999 มล. ใส่ลงในขวดที่ปลอดเชื้อ เติม DEPC ลงไป 1 มล. นำไปเขย่าเป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

- เอทานอล 70%ที่เตรียมด้วย น้ำ DEPC

เจือจางเอทานอล 95% ด้วยน้ำ DEPC ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 70% และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ละลายเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มล.

4.10X MOPS buffer

ละลาย MOPS 41.8 กรัมในน้ำ DEPC จนหมด จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรดเบส ให้เป็น 7.0 เติมโซเดียมอะซีเทต (sodium acetate) 6.8 กรัม คนจนละลายหมด เติม EDTA 1.46 กรัม คนจนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองใสไม่มีตะกอน

5. สารละลาย 10X SSC

โซเดียมคลอไรด์	175.3	กรัม
โซเดียมซิเตรต	82.23	กรัม

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเบสเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. จะได้สารละลาย 20X SSC นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้ให้เจือจางด้วยน้ำปลอดประจุเป็น 10X

6. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

ประกอบด้วย

หลอดหมายเลข 1.	DIG-High Prime, 5X conc.
หลอดหมายเลข 2.	DIG-labeled control DNA 5 µg/ml
หลอดหมายเลข 3.	DNA dilution buffer
หลอดหมายเลข 4.	Anti-Digoxygenin-AP Conjugate 750 U/ml
หลอดหมายเลข 5.	NBT/BCIP, 50X conc.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขวดหมายเลข 6. Blocking solution, 10X

ขวดหมายเลข 7. DIG Easy Hyp Granules (add 64 ml sterile double distilled water, dissolve at 37OC)

และสารละลายที่ต้องเตรียมเพิ่มในการทดลองเป็นดังนี้

- Washing buffer

กรดมาเลอิก	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15	โมลาร์
Tween 20	0.3	%

ผสมกรดมาเลอิกและโซเดียมคลอไรด์เข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 700 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุเป็นจนเป็นปริมาตร 900 มล. จากนั้นเตรียมสารละลาย Tween 20 ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 100 มล. แล้วนำสารละลายที่เตรียมทั้งหมดไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

- Blocking solution

ละลาย 10X blocking solution ใน Maleic buffer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

- Detection buffer

Trizma base	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. สารละลาย 2X SSC/0.1%SDS

ละลาย 20X SSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 89 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

8. สารละลาย 0.5X SSC/0.1%SDS

ละลาย 20X SSC ปริมาตร 2.5 มล. ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 96.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

9. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรดเบส 8.0

Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
EDTA	1	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

10. ชุดแยก mRNA PolyATtract mRNA Isolation System III (Promega, USA)

ประกอบด้วย

Biotinylated oligo(dT) probe ความเข้มข้น 50 พิกโคโมลต่อไมโครลิตร

20X SSC solution

Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles

Nuclease-free water

MagneSphere® Magnetic Separation Stand สำหรับหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล.

11. สารละลายโซเดียมอะซีเทต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเทต น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

12. ชุดสร้างสาย cDNA Universal Riboclone cDNA Synthesis System (Promega, USA)

ประกอบด้วย

- cDNA Synthesis Reagents

First strand 5X buffer

Oligo(dT)15 primer

Random hexameric primers

Sodium pyrophosphate ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor

AMV reverse transcriptase (HC)

Second strand 2.5X buffer

RNase H

DNA polymerase I

T4 DNA polymerase

Nuclease-free water

13. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.0

ผสมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.0 ปริมาตร 2 มล. ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 3 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

ผสมสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน ฟีนอล: คลอโรฟอร์ม 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°ซ

15. สารละลายผสม dNTPs ที่มีความเข้มข้นของแต่ละนิวคลีโอไทด์ 10 มิลลิโมลาร์

ผสม dATP, dGTP, dCTP, dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรชนิดละ 10 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตรเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

16. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Trizma base	121	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

17. 10X Loading dye

Bromphenolblue	0.025	%
ซูโครส	40	%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer QG

Buffer PE

Qiaquick column

Buffer EB

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอให้เติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE โดยสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

19. ชุด GeneJET^{TM} PCR Cloning Kit (Fermentas, USA)

ประกอบด้วย

pJET1/blunt Cloning Vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)

2X Reaction Buffer

T4 DNA Ligase (5 หน่วยต่อไมโครลิตร)

DNA Blunting Enzyme

pJET 1 Forward Sequencing Primer (10 ไมโครโมลาร์)

pJET 1 Reverse Sequencing Primer (10 ไมโครโมลาร์)

Control PCR Product (24 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)

Nuclease free water

20. สารละลาย Tfbl

โพแทสเซียมอะซีเทต (CH_3COOK)	0.295	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.148	กรัม
มังกะนีสคลอไรด์ ($MnCl_2$)	0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายสารทุกชนิดเข้าด้วยกันด้วยน้ำปลอดประจุปริมาตร 70 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็น 5.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยขวดวัดปริมาตรและทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.22 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4°ซ

21. สารละลาย Tfbll

2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid]	0.290	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	1.103	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์	0.121	กรัม
กลีเซอรอล	15	มล.

ละลายสารทุกชนิดเข้าด้วยกันด้วยน้ำปลอดประจุปริมาตร 70 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็น 6.5 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยขวดวัดปริมาตรและทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.22 ไมครอน และเก็บรักษาไว้ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4°ซ

22. สารปฏิชีวนะ

- แอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20°ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นาน 1 เดือน

- กานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20°ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นาน 1 เดือน

- คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenical) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อเอทานอล 1 มล. เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20°ซ

23. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Buffer PE

RNase A

Collection tube

Qiaprep Spin column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE

24. สารละลายลิเธียมอะซีเทต (Lithium acetate) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งลิเธียมอะซีเทต 7 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุและปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรให้เป็น 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

25. สารละลาย 50% PEG (Polyethylene glycol)

ผสมสารละลาย PEG 50 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

26. สารละลาย Single stranded carrier DNA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายดีเอ็นเอที่มีมวลโมเลกุลสูง (Deoxyribonuclei acid sodium salt type III from salmon testes) น้ำหนัก 2 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มล.

นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกระทั่งนำมาใช้ ก่อนใช้ทุกครั้งให้นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยนำไปแช่ในกล่องน้ำแข็ง

27. สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายผง IPTG น้ำหนัก 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ปริมาตรเป็น 10 มล. กรองผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

28. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.8

Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$) 181.71 กรัม

ละลาย Trizma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นคนให้เข้ากัน และวัดค่าความเป็นกรดเบส ให้เท่ากับ 8.8 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

29. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8

Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$) 60.57 กรัม

ละลาย Trizma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นคนให้เข้ากันและวัดค่าความเป็นกรดเบส ให้เท่ากับ 6.8 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

30. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล.

31. สารละลาย 10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)

ชั่งแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 100 มิลลิกรัมใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อลงไป 1 มล. ละลายจนหมด

32. 2X Laemmli buffer

กลีเซอรอล (87%)	2.29	มล.
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรดเบส 6.8	1	มล.
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	2.71	มล.
Bromphenolblue	0.001	กรัม
10% SDS	4	มล.

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันและนำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4°ซ ก่อนนำมาใช้ให้ผสม 2-mercaptoethanol ในอัตราส่วน สารละลาย 950 ไมโครลิตรต่อ 50 ไมโครลิตร 2-mercaptoethanol

33. 10X SDS running buffer

Trizma base	30	กรัม
ไกลซีน (Glycine)	145	กรัม
SDS	10	กรัม

แยกละลายสารทั้งสามชนิดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมารวมกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

34. Coomassie blue staining

Coomassie brilliant blue R250	2	กรัม
เอทานอล	400	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรดอะซิติก	100	มล.

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

35. Destaining solution

เอทานอล	400	มล.
กรดอะซิติก	100	มล.

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

36. สารละลาย 5% บลูเดกซ์แทรน (blue dextran)

ชั่งบลูเดกซ์แทรน 50 มิลลิกรัมใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อลงไป 1 มล. ละลายจนหมด

37. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.0

Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42	มล

ละลาย Trizma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นคนให้เข้ากัน รอให้เย็นแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์

38. ชุดทำบริสุทธิ์โปรตีน His Bind® Purification Kits (Novagen, USA)

ประกอบด้วย

BugBuster® Protein Extraction Reagent

Benzonase® Nuclease ความบริสุทธิ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

rLysozyme™ Solution

Protease inhibitor

His Bind resin

Chromatography columns

- His Bind® Buffer Kit

- 8X Binding buffer (8X = NaCl ความเข้มข้น 4 โมลาร์, Tris-HCl ความเข้มข้น 160 มิลลิโมลาร์, imidazole ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์, ความเป็นกรดเบส 7.9)

- 8X Wash buffer (8X = NaCl ความเข้มข้น 4 โมลาร์, imidazole ความเข้มข้น 480 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl ความเข้มข้น 160 มิลลิโมลาร์, ความเป็นกรดเบส 7.9)

- 4X Elute buffer (4X = NaCl ความเข้มข้น 2 โมลาร์, imidazole ความเข้มข้น 4 โมลาร์, Tris-HCl ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์, ความเป็นกรดเบส 7.9)

- 4X Strip buffer (4X = NaCl ความเข้มข้น 2 โมลาร์, EDTA ความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์, ความเป็นกรดเบส 7.9)

- 8X Charge buffer (8X = $NiSO_4$ ความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์)

39. สารละลายยูเรียความเข้มข้น 6 โมลาร์

ยูเรีย 36.036 กรัม

ละลายยูเรียในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อและปรับปริมาตรให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

เวกเตอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์

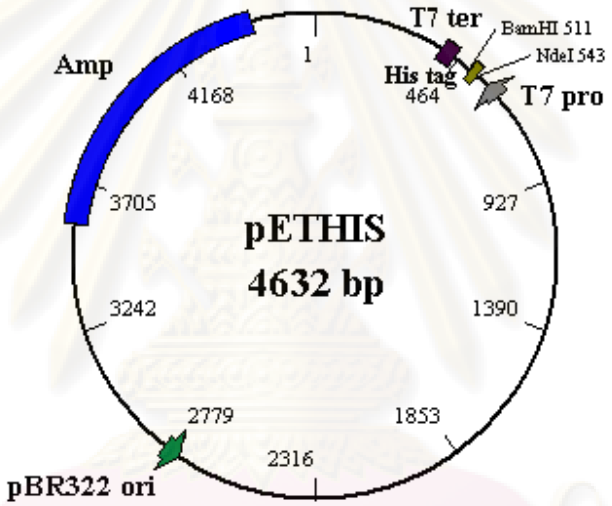
1. ลำดับกรอบอ่านรหัสเปิดยีนเดกซ์แทรนเนสของ *P. pinophilum* SMCU 3-14 และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากโคดอนเริ่มต้นที่ 1 (start codon : ATG1 codon)

```
1     ATG1 CCC ACA ATG2 CTA AAG CTA CTT GCG TTG ACC CTT GCA ATT AGC GAG    48
1      M   P   T   M   L   K   L   L   A   L   T   L   A   I   S   E     16

49    TCC GCC ATT GGA GCA GTC ATG3 CAC CCA CCT GGC AAT TCT CAT CCC GGT    96
17     S   A   I   G   A   V   M   H   P   P   G   N   S   H   P   G     32

97    ACC CAT ATG4 GGC ACT ACG AAT AAT ACC CAT TGC GGC GCC GAT TTC TGT   144
33     T   H   M   G   T   T   N   N   T   H   C   G   A   D   F   C     48

145   ACC TGG TGG CAT GAT TCA GGG GAG ATC AAT ACG CAG ACA CCT GTC CAA   192
49     T   W   W   H   D   S   G   E   I   N   T   Q   T   P   V   Q     64

193   CCA GGG AAC GTG CGC CAA TCT CAC AAG TAT TCC GTG CAA GTG AGC CTA   213
65     P   G   N   V   R   Q   S   H   K   Y   S   V   Q   V   S   L     80

214   GCT GGT ACA AAC AAT TTT CAT GAC TCC TTT GTA TAT GAA TCG ATC CCC   288
81     A   G   T   N   N   F   H   D   S   F   V   Y   E   S   I   P     96

289   CGG AAC GGA AAT GGT CGC ATC TAT GCT CCC ACC GAT CCA CCC AAC AGC   336
97     R   N   G   N   G   R   I   Y   A   P   T   D   P   P   N   S    112

337   AAC ACA CTA GAT TCA AGT GTG GAT GAT GGA ATC TCG ATT GAG CCT AGT   384
113    N   T   L   D   S   S   V   D   D   G   I   S   I   E   P   S    128

385   ATC GGC CTT AAT ATG GCA TGG TCC CAA TTC GAG TAC AGC CAC GAT GTA   432
129    I   G   L   N   M   A   W   S   Q   F   E   Y   S   H   D   V    144

433   GAT GTA AAG ATC CTG GCC ACT GAT GGC TCA TCG TTG GGC TCG CCA AGT   480
145    D   V   K   I   L   A   T   D   G   S   S   L   G   S   P   S    160

481   GAT GTT GTT ATT CGC CCC GTC TCA ATC TCC TAT GCG ATT TCT CAG TCT   528
161    D   V   V   I   R   P   V   S   I   S   Y   A   I   S   Q   S    176

529  GAC GAT GGT GGG ATT GTC ATC CGG GTC CCA GCC GAT GCG AAC GGC CGC    576
177   D   D   G   G   I   V   I   R   V   P   A   D   A   N   G   R     192

577   AAA TTT TCA GTT GAG TTC AAA ACT GAC CTG TAC ACA TTC CTC TCT GAT   624
193    K   F   S   V   E   F   K   T   D   L   Y   T   F   L   S   D    208

625   GGC AAT GAG TAC GTC ACA TCG GGA GGC AGC GTC GTC GGC GTT GAG CCT   672
209    G   N   E   Y   V   T   S   G   G   S   V   V   G   V   E   P    224

673   ACC AAC GCA CTT GTG ATC TTC GCA AGT CCG TTT CTT CCT TCT GGC ATG   720
225    T   N   A   L   V   I   F   A   S   P   F   L   P   S   G   M    240

721   ATT CCT CAT ATG ACA CCC GAC AAC ACG CAG ACC ATG ACG CCA GGT CCT   768
241    I   P   H   M   T   P   D   N   T   Q   T   M   T   P   G   P    256

769   ATC AAT AAC GGC GAC TGG GGC GCC AAG TCA ATT CTT TAC TTC CCA CCA   816
257    I   N   N   G   D   W   G   A   K   S   I   L   Y   F   P   P    272
```

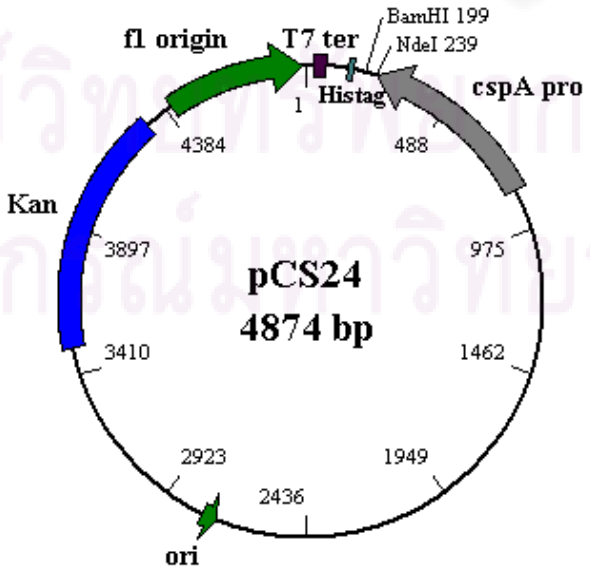
```
817   GGT GTA TAC TGG ATG AAC CAA GAT CAA TCG GGC AAC TCG GGG AAG TTA   864
273    G   V   Y   W   M   N   Q   D   Q   S   G   N   S   G   K   L    288


865   GGA TCT AAT CAT ATA CGT CTA AAC TCG AAC ACT TAC TGG GTC TAC CTT  912
289    G   S   N   H   I   R   L   N   S   N   T   Y   W   V   Y   L   304

913  GCC CCC GGT GCG TAC GTG AAG GGT GCT ATA GAG TAT TTT ACC AAG CAG   960
305   A   P   G   A   Y   V   K   G   A   I   E   Y   F   T   K   Q    320

961   AAC TTC TAT GCA ACT GGT CAT GGT ATC CTA TCG GGT GAA AAC TAT GTT 1008
321    N   F   Y   A   T   G   H   G   I   L   S   G   E   N   Y   V   336

1009  TAC CAA GCC AAT GCC GGC GAC AAC TAT GTT GCA GTC AAG AGC GAT TCA 1056
337    Y   Q   A   N   A   G   D   N   Y   V   A   V   K   S   D   S   352

1057  ACC AGC CTC CGG ATG TGG CAC AAT AAC CTT GGG GGT GGT CAA ACA TGG 1104
353    T   S   L   R   M   W   W   H   N   N   L   G   G   G   Q   T   368

1105  TGG TAC TGC GTT GGC CCG ACG ATC AAT GCG CCA CCA TTC AAC ACT ATG 1152
369    W   Y   C   V   G   P   T   I   N   A   P   P   F   N   T   M   384

1153  GAT TTC AAT GGA AAT TCT GGC ATC TCA AGT CAA ATT AGC GAC TAT AAG 1200
385    D   F   N   G   N   S   G   I   S   S   Q   I   S   D   Y   K   400

1201  CAG GTG GGA GCC TTC TTC TTC CAG ACG GAT GGG CCA GAA ATA TAT CCC 1248
401    Q   V   G   A   F   F   F   Q   T   D   G   P   E   I   Y   P   416

1249  AAT AGT GTC GTG CAC GAC GTC TTC TGG CAC GTC AAT GAT GAT GCA ATC 1296
417    N   S   V   V   H   D   V   F   W   H   V   N   D   D   A   I   432

1297  AAA ATC TAC TAT TCG GGA GCA TCT GTA TCG CGG GCA ACG ATC TGG AAA 1344
433    K   I   Y   Y   S   G   A   S   V   S   R   A   T   I   W   K   448

1345  TGT CAC AAT GAC CCA ATT ATC CAG ATG GGA TGG ACG TCT CGG GAT ATC 1392
449    C   H   N   D   P   I   I   Q   M   G   W   T   S   R   D   I   464

1393  AGT GGA GTG ACA ATC GAC ACA TTA AAT GTT ATT CAC ACC CGC TAC ATC 1440
465    S   G   V   T   I   D   T   L   N   V   I   H   T   R   Y   I   480

1441  AAA TCG GAG ACG GTG GTG CCT TCG GCT ATC ATT GGG GCC TCT CCA TTC 1488
481    K   S   E   T   V   V   P   S   A   I   I   G   A   S   P   F   496

1489  TAT GCA AGT GGG ATG AGT CCT GAT TCA AGA AAG TCC ATA TCC ATG ACG 1536
497    Y   A   S   G   M   S   P   D   S   R   K   S   I   S   M   T   512

1537  GTT TCA AAC GTT GTT TGC GAG GGT CTT TGC CCG TCC CTA TTC CGC ATC 1584
513    V   S   N   V   V   C   E   G   L   C   P   S   L   F   R   I   528

1585  ACA CCC CTA CAG AAC TAC AAA AAT TTT GTT GTC AAA AAT GTG GCT TTC  1632
529    T   P   L   Q   N   Y   K   N   F   V   V   K   N   V   A   F   544

1633  CCA GAC GGG CTA CAG ACG AAT AGT ATT GGC ACA GGA GAA AGC ATT ATT 1680
545    P   D   G   L   Q   T   N   S   I   G   T   G   E   S   I   I   560

1681  CCA GCC GCA TCT GGT CTA ACG ATG GGA CTG AAT ATC TCC AAC TGG ACT 1728
561    P   A   A   S   G   L   T   M   G   L   N   I   S   N   W   T   576

1729  GTT GGT GGA CAA AAA GTG ACT ATG GAG AAC TTT CAA GCC AAT AGC CTG 1776
577    V   G   G   Q   K   V   T   M   E   N   F   Q   A   N   S   L   592

1777  GGG CAG TTC AAT ATT GAC GTC AGC TAT TGG GGG GAG TGG CAG ATT AGC 1824
593    G   Q   F   N   I   D   V   S   Y   W   G   E   W   Q   I   S   608

1825  TGA
       *
```

หมายเหตุ : ตัวอักษร M ตัวแรก แสดงกรดอะมิโนเมไทโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (start codon) ATG_{1-4} เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนเมไทโอนีนซึ่งน่าจะเป็นจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย * แสดงโคดอนหยุด (stop codon) ลำดับกรดอะมิโนที่แสดงด้วยอักษรหนา 20 หมู่ (กรดอะมิโนตัวที่ 1-20) คือบริเวณที่คาดว่าเป็น signal peptide และลูกศรแสดงตำแหน่งของ signal peptidase cleavage site นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ที่ใช้เพื่อตัดนิวคลีโอไทด์ 101 คู่เบสออก (ที่มา : ดัดแปลงจากพิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี, 2549)

2. เวกเตอร์ pETHis (National BioResource Project, Japan)

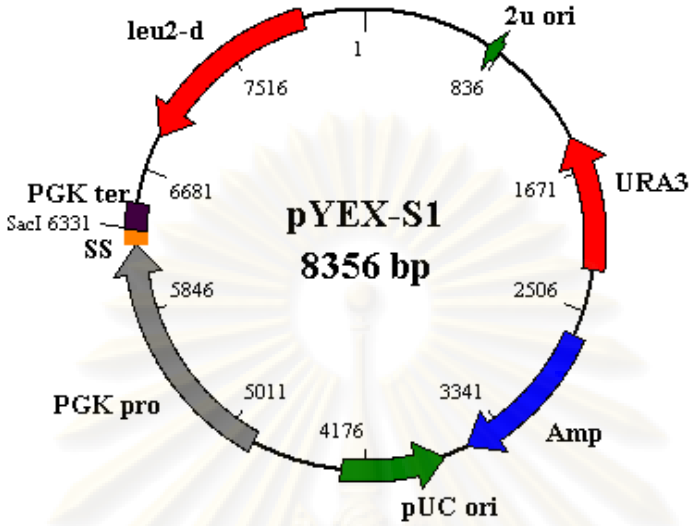


3. เวกเตอร์ pCS24 (National BioResource Project, Japan)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. เวกเตอร์ pYEX-S1 (Clontech, Laboratories, Canada)



5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ของ pNAT2

- ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์ของ pNAT2

T7promoter primer → *Nde*I

GAATAATTTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACAT **ATG CCC ACA ATG CTA AAG**
Met P T Met L K

CTA CTT GCG TTG ACC CTT GCA ATT AGC GAG TCC GCC ATT GGA GCA GTC
L L A L T L A I S E S A I G A V

ATGCACCCACCTGGCAATTCTCATCCCGGTACCCATATGGGCACTACGAATAATACCCATTGCGGCGCC
GATTTCTGTACCTGGTGGCATGATTCAGGGGAGATCAATACGCAGACACCTGTCCAACCAGGGAACGTG
CGCCAATCTCACAAGTATTCCGTGCAAGTGAGCCTAGCTGGTACAAACAATTTTCATGACTCCTTTGTA
TATGAATCGATCCCCCGGAACGGAAATGGTCGCATCTATGCTCCCACCGATCCACCCAACAGCAACACA
CTAGATTCAAGTGTGGATGATGGAATCTCGATTGAGCCTAGTATCGGCCTTAATATGGCATGGTCCCAA
TTCGAGTACAGCCACGATGTAGATGTAAAGATCCTGGCCACTGATGGCTCATCGTTGGGCTCGCCAAGT

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทางด้านเทอร์มิเนเตอร์ของ pNAT2

GGGGGTGGTCAAACATGGTACTGCGTTGGCCCGACGATCAATGCGCCACCATTCAACACTATGGATTTC
AATGGAAATTCTGGCATCTCAAGTCAAATTAGCGACTATAAGCAGGTGGGAGCCTTCTTCTTCCAGACG
GATGGGCCAGAAATATATCCCAATAGTGTCGTGCACGACGTCTTCTGGCACGTCAATGATGATGCAATC
AAAATCTACTATTCGGGAGCATCTGTATCGCGGGCAACGATCTGGAAATGTCACAATGACCCAATTATC
CAGATGGGATGGACGTCTCGGGATATCAGTGGAGTGACAATCGACACATTAAATGTTATTCACACCCGC
TACATCAAATCGGAGACGGTGGTGCCTTCGGCTATCATTGGGGCCTCTCCATTCTATGCAAGTGGGATG
AGTCCTGATTCAAGAAAGTCCATATCCATGACGGTTTCAAACGTTGTTTGCGAGGGTCTTTGCCCGTCC
CTATTCCGCATCACACCCCTACAGAACTACAAAAATTTTGTTGTCAAAAATGTGGCTTTCCCAGACGGG
CTACAGACGAATAGTATTGGCACAGGAGAAAGCATTATTCCAGCCGCATCTGGTCTAACGATGGGACTG
AATATCTCCAACTGGACTGTTGGTGGACAAAAAGTGACTATGGAGAACTTTCAAGCCAATAGCCTGGGG

*Bam*H1

CAG TTC AAT ATT GAC GTC AGC TAT TGG GGG GAG TGG CAG ATT AGG GAT CCG
N I D V S Y W G E W Q I R D P

GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG
A A N K A R K

หมายเหตุ : อักษรตัวพิมพ์หนาแสดงถึงส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนส และลูกศรแสดงทิศทาง 5’ ⟶ 3’ ของไพรเมอร์

6. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ของ pNAC9

- ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์ของ pNAC9

CCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGA
CAGAACTTAATGGGCCCGCAGTGTGATTTGAGGAGTTTTCAATGGAATATAAAGATCCAATGCATGAGC
TGTTGAGCAGCCTGGAACAGATTGTTTTTAAAGATGAAACGCAGAAAATTACCCTGACGCACAGAACAA
CGTCCTGTACCGAAATTGAGCAGTTACGAAAAGGGACAGGATTAAAAATCGATGATTTCGCCCGGGTTT
TGGGCGTATCAGTCGCCATGGTAAAGGAATGGGAATCCAGACGCGTGAAGCCTTCAAGTGCCGAACTAA
AATTGATGCGTTTGATTCAAGCCAACCCGGCATTAAGTAAGCAGTTGATGGAATAGACTTTTATCCACT
TTATTGCTGTTTACGGTCCTGATGACAGGACCGTTTTCCAACCGATTAATCATAAATATGAAAAATAAT
TGTTGCATCACCCGCCAATGCGTGGCTTAATGCACATCAACGGTTTGACGTACAGACCATTAAAGCAGT
GTAGTAAGGCAAGTCCCTTCAAGAGTTATCGTTGATACCCCTCGTAGTGCACATTCCTTTAACGCTTCA

*Nde*I

AAATCTGTAAAGCACGCCATATCGCCGAAAGGCACACTTAATTATTAAAGGTAATACCAT **ATG GGC**
M G

ACT ACG AAT AAT ACC CAT TGC GGC GCC GAT TTC TGT ACC TGG TGG CAT GAT
T T N N T H C G A D F C T W W H D

TCAGGGGAGATCAATACGCAGACACCTGTCCAACCAGGGAACGTGCGCCAATCTCACAAGTATTCCGTG
CAAGTGAGCCTATCTGGTACAAACAATTTTCATGACTCCTTTGTA

- ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ทางด้านเทอร์มิเนเตอร์ของ pNAC9

*Bam*H1

TAT TGG GGG GAG TGG CAG ATT AGG GAT CCG AAT TCG AGC TCC GTC GAC
Y W G E W Q I R D P N S S S V D

His Tag

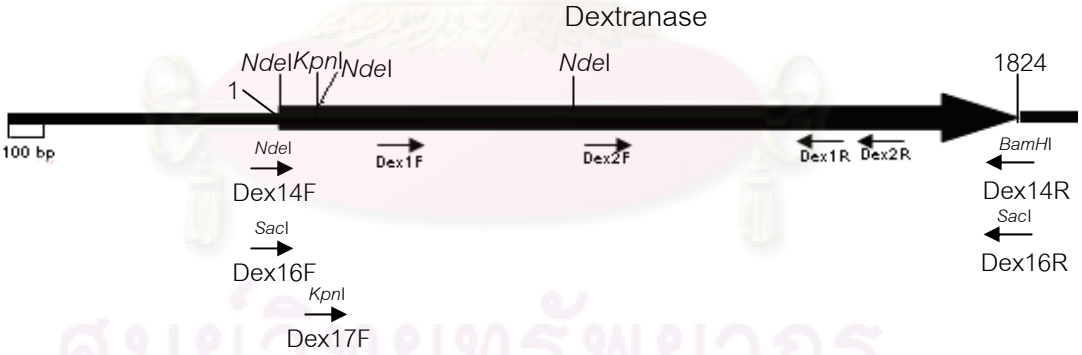
AAG CTT GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG
K L A A A L E H H H H H H *

GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG

T7 terminator primer

หมายเหตุ : อักษรตัวพิมพ์หนาแสดงถึงส่วนของยีนเดกซ์แทรนเนส เครื่องหมาย * แสดงถึงรหัสหยุด และลูกศรแสดงทิศทาง 5’ ⟶ 3’ ของไพรเมอร์

7. แผนที่ของยีนเดกซ์แทรนเนสแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ต่างๆ และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดกซ์แทรนเนสที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pNAY44

PGK promoter

AGTTCTTAGATGCtttcttttttctcttttttACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAAC

AAATATAAAACCAAAAGATCTATAAA *ATG AAT ATA TTT TAC ATA TTT TTG TTT TTG*
Met N I F Y I F L F L

CTG TCA TTC GTT CAA GGT TTG GAG CAT ACT CAT CGA AGA GGC TCC TTA GTC
L S F V Q G L E H T H R R G S L V
*Sac*I

AAA AGG AGC TCT ACA **ATG CCC ACA ATG CTA AAG CTA CTT GCG TTG ACC CTT**
K R S S T Met P T M L K L L A L T L

GCAATTAGCGAGTCCGCCATTGGAGCAGTCATGCACCCACCTGGCAATTCTCATCCCGGTACCCATATG
GGCACTACGAATAATACCCATTGCGGCGCCGATTTCTGTACCTGGTGGCATGATTCAGGGGAGATCAAT
ACGCAGACACCTGTCCAACCAGGGAACGTGCGCCAATCTCACAAGTATTCCGTGCAAGTGAGCCTAGCT
GGTACAAACAATTTTCATGACTCCTTTGTATATGAATCGATCCCCCGGAACGGAAATGGTCGCATCTAT
GCTCCCACCGATCCACCCAACAGCAACACACTAGATTCAAGTGTGGATGATGGAATCTCGATTGAGCCT
AGTATCGGCCTTAATATGGCATGGTCCCAATTCGAGTACAGCCACGATGTAGATGTAAAGATCCTGGCC
ACTGATGGCTCATCGTTGGGCTCGCCAAGTGATGTTGTTATTCGCCCCGTCTCAATCTCCTATGCGATT
TCTCAGTCTGACGATGGTGGGATTGTCATCCGGGTCCCAGCCGATGCGAACGGCCGCAAATTTTCAGTT
GAGTTCAAAACTGACCTGTACACATTCCTCTCTGATGGCAATGAGTACGTCACATCGGGAGGCAGCGTC
GTCGGCGTTGAGCCTACCAACGCACTTGTGATCTTCGCAAGTCCGTTTCTTCCTTCTGGCATGATTCCT
CATATGACACCCGACAACACGCAGACCATGACGCCAGGTCCTATCAATAACGGCGACTGGGGCGCCAAG
TCAATTCTTTACTTCCCACCAGGTGTATACTGGATGAACCAAGATCAATCGGGCAACTCGGGGAAGTTA
GGATCTAATCATATACGTCTAAACTCGAACACTTACTGGGTCTACCTTGCCCCCGGTGCGTACGTGAAG
GGTGCTATAGAGTATTTTACCAAGCAGAACTTCTATGCAACTGGTCATGGTATCCTATCGGGTGAAAAC
TATGTTTACCAAGCCAATGCCGGCGACAACTATGTTGCAGTCAAGAGCGATTCAACCAGCCTCCGGATG
TGGTGGCACAATAACCTTGGGGGTGGTCAAACATGGTACTGCGTTGGCCCGACGATCAATGCGCCACCA
TTCAACACTATGGATTTCAATGGAAATTCTGGCATCTCAAGTCAAATTAGCGACTATAAGCAGGTGGGA
GCCTTCTTCTTCCAGACGGATGGGCCAGAAATATATCCCAATAGTGTCGTGCACGACGTCTTCTGGCAC
GTCAATGATGATGCAATCAAAATCTACTATTCGGGAGCATCTGTATCGCGGGCAACGATCTGGAAATGT
CACAATGACCCAATTATCCAGATGGGATGGACGTCTCGGGATATCAGTGGAGTGACAATCGACACATTA
AATGTTATTCACACCCGCTACATCAAATCGGAGACGGTGGTGCCTTCGGCTATCATTGGGGCCTCTCCA
TTCTATGCAAGTGGGATGAGTCCTGATTCAAGAAAGTCCATATCCATGACGGTTTCAAACGTTGTTTGC
GAGGGTCTTTGCCCGTCCCTATTCCGCATCACACCCCTACAGAACTACAAAAATTTTGTTGTCAAAAAT
GTGGCTTTCCCAGACGGGCTACAGACGAATAGTATTGGCACAGGAGAAAGCATTATTCCAGCCGCATCT
GGTCTAACGATGGGACTGAATATCTCCAACTGGACTGTTGGTGGACAAAAAGTGACTATGGAGAACTTT
CAAGCCAATAGCCTGGGGCAGTTCAATATTGACGTCAGCTATTGGGGGGAGTGGCAGATTAGGGATCCG
GCTGCTAACAGAGCTCGAATTCCGATCTCCCATGTCTCTACTGGTGGTGGTGCTTCTTTGGGAATTATT
GGAAGTAAGGAATTGCCAGGTGTTGCTTTTCTTATCCGAAAAGAAATAAATTGAATTGAATTGAAATCG
ATAGATCAA

หมายเหตุ : ตัวพิมพ์เอียงแสดงส่วนของ signal sequence

9. ลำดับเพปไทด์ของเดกซ์แทรนเนส

```
1     ATG CCC ACA ATG CTA AAG CTA CTT GCG TTG ACC CTT GCA ATT AGC GAG     48
1      M   P   T   M   L   K   L   L   A   L   T   L   A   I   S   E     16

49    TCC GCC ATT GGA GCA GTC ATG CAC CCA CCT GGC AAT TCT CAT CCC GGT     96
17     S   A   I   G   A   V   M   H   P   P   G   N   S   H   P   G     32

97    ACC CAT ATG GGC ACT ACG AAT AAT ACC CAT TGC GGC GCC GAT TTC TGT    144
33     T   H   M   G   T   T   N   N   T   H   C   G   A   D   F   C     48

145   ACC TGG TGG CAT GAT TCA GGG GAG ATC AAT ACG CAG ACA CCT GTC CAA    192
49     T   W   W   H   D   S   G   E   I   N   T   Q   T   P   V   Q     64

193   CCA GGG AAC GTG CGC CAA TCT CAC AAG TAT TCC GTG CAA GTG AGC CTA    213
65     P   G   N   V   R   Q   S   H   K   Y   S   V   Q   V   S   L     80

214   GCT GGT ACA AAC AAT TTT CAT GAC TCC TTT GTA TAT GAA TCG ATC CCC    288
81     A   G   T   N   N   F   H   D   S   F   V   Y   E   S   I   P     96

289   CGG AAC GGA AAT GGT CGC ATC TAT GCT CCC ACC GAT CCA CCC AAC AGC    336
97     R   N   G   N   G   R   I   Y   A   P   T   D   P   P   N   S    112

337   AAC ACA CTA GAT TCA AGT GTG GAT GAT GGA ATC TCG ATT GAG CCT AGT    384
113    N   T   L   D   S   S   V   D   D   G   I   S   I   E   P   S    128

385   ATC GGC CTT AAT ATG GCA TGG TCC CAA TTC GAG TAC AGC CAC GAT GTA    432
129    I   G   L   N   M   A   W   S   Q   F   E   Y   S   H   D   V    144

433   GAT GTA AAG ATC CTG GCC ACT GAT GGC TCA TCG TTG GGC TCG CCA AGT    480
145    D   V   K   I   L   A   T   D   G   S   S   L   G   S   P   S    160

481   GAT GTT GTT ATT CGC CCC GTC TCA ATC TCC TAT GCG ATT TCT CAG TCT    528
161    D   V   V   I   R   P   V   S   I   S   Y   A   I   S   Q   S    176

529  GAC GAT GGT GGG ATT GTC ATC CGG GTC CCA GCC GAT GCG AAC GGC CGC    576
177   D   D   G   G   I   V   I   R   V   P   A   D   A   N   G   R    192

577   AAA TTT TCA GTT GAG TTC AAA ACT GAC CTG TAC ACA TTC CTC TCT GAT    624
193    K   F   S   V   E   F   K   T   D   L   Y   T   F   L   S   D    208

625   GGC AAT GAG TAC GTC ACA TCG GGA GGC AGC GTC GTC GGC GTT GAG CCT    672
209    G   N   E   Y   V   T   S   G   G   S   V   V   G   V   E   P    224

673   ACC AAC GCA CTT GTG ATC TTC GCA AGT CCG TTT CTT CCT TCT GGC ATG    720
225    T   N   A   L   V   I   F   A   S   P   F   L   P   S   G   M    240

721   ATT CCT CAT ATG ACA CCC GAC AAC ACG CAG ACC ATG ACG CCA GGT CCT    768
241    I   P   H   M   T   P   D   N   T   Q   T   M   T   P   G   P    256

769   ATC AAT AAC GGC GAC TGG GGC GCC AAG TCA ATT CTT TAC TTC CCA CCA    816
257    I   N   N   G   D   W   G   A   K   S   I   L   Y   F   P   P    272

817   GGT GTA TAC TGG ATG AAC CAA GAT CAA TCG GGC AAC TCG GGG AAG TTA    864
273    G   V   Y   W   M   N   Q   D   Q   S   G   N   S   G   K   L    288

865   GGA TCT AAT CAT ATA CGT CTA AAC TCG AAC ACT TAC TGG GTC TAC CTT    912
289    G   S   N   H   I   R   L   N   S   N   T   Y   W   V   Y   L    304

913  GCC CCC GGT GCG TAC GTG AAG GGT GCT ATA GAG TAT TTT ACC AAG CAG    960
305   A   P   G   A   Y   V   K   G   A   I   E   Y   F   T   K   Q    320

961   AAC TTC TAT GCA ACT GGT CAT GGT ATC CTA TCG GGT GAA AAC TAT GTT 1008
321    N   F   Y   A   T   G   H   G   I   L   S   G   E   N   Y   V    336

1009  TAC CAA GCC AAT GCC GGC GAC AAC TAT GTT GCA GTC AAG AGC GAT TCA 1056
```

```
337    Y   Q   A   N   A   G   D   N   Y   V   A   V   K   S   D   S   352

1057  ACC AGC CTC CGG ATG TGG CAC AAT AAC CTT GGG GGT GGT CAA ACA TGG 1104
353    T   S   L   R   M   W   W   H   N   N   L   G   G   G   Q   T   368

1105  TGG TAC TGC GTT GGC CCG ACG ATC AAT GCG CCA CCA TTC AAC ACT ATG 1152
369    W   Y   C   V   G   P   T   I   N   A   P   P   F   N   T   M   384

1153  GAT TTC AAT GGA AAT TCT GGC ATC TCA AGT CAA ATT AGC GAC TAT AAG 1200
385    D   F   N   G   N   S   G   I   S   S   Q   I   S   D   Y   K   400

1201  CAG GTG GGA GCC TTC TTC TTC CAG ACG GAT GGG CCA GAA ATA TAT CCC 1248
401    Q   V   G   A   F   F   F   Q   T   D   G   P   E   I   Y   P   416

1249  AAT AGT GTC GTG CAC GAC GTC TTC TGG CAC GTC AAT GAT GAT GCA ATC 1296
417    N   S   V   V   H   D   V   F   W   H   V   N   D   D   A   I   432

1297  AAA ATC TAC TAT TCG GGA GCA TCT GTA TCG CGG GCA ACG ATC TGG AAA 1344
433    K   I   Y   Y   S   G   A   S   V   S   R   A   T   I   W   K   448

1345  TGT CAC AAT GAC CCA ATT ATC CAG ATG GGA TGG ACG TCT CGG GAT ATC 1392
449    C   H   N   D   P   I   I   Q   M   G   W   T   S   R   D   I   464

1393  AGT GGA GTG ACA ATC GAC ACA TTA AAT GTT ATT CAC ACC CGC TAC ATC 1440
465    S   G   V   T   I   D   T   L   N   V   I   H   T   R   Y   I   480

1441  AAA TCG GAG ACG GTG GTG CCT TCG GCT ATC ATT GGG GCC TCT CCA TTC 1488
481    K   S   E   T   V   V   P   S   A   I   I   G   A   S   P   F   496

1489  TAT GCA AGT GGG ATG AGT CCT GAT TCA AGA AAG TCC ATA TCC ATG ACG 1536
497    Y   A   S   G   M   S   P   D   S   R   K   S   I   S   M   T   512

1537  GTT TCA AAC GTT GTT TGC GAG GGT CTT TGC CCG TCC CTA TTC CGC ATC 1584
513    V   S   N   V   V   C   E   G   L   C   P   S   L   F   R   I   528

1585  ACA CCC CTA CAG AAC TAC AAA AAT TTT GTT GTC AAA AAT GTG GCT TTC 1632
529    T   P   L   Q   N   Y   K   N   F   V   V   K   N   V   A   F   544

1633  CCA GAC GGG CTA CAG ACG AAT AGT ATT GGC ACA GGA GAA AGC ATT ATT 1680
545    P   D   G   L   Q   T   N   S   I   G   T   G   E   S   I   I   560

1681  CCA GCC GCA TCT GGT CTA ACG ATG GGA CTG AAT ATC TCC AAC TGG ACT 1728
561    P   A   A   S   G   L   T   M   G   L   N   I   S   N   W   T   576

1729  GTT GGT GGA CAA AAA GTG ACT ATG GAG AAC TTT CAA GCC AAT AGC CTG 1776
577    V   G   G   Q   K   V   T   M   E   N   F   Q   A   N   S   L   592

1777  GGG CAG TTC AAT ATT GAC GTC AGC TAT TGG GGG GAG TGG CAG ATT AGG 1824
593    G   Q   F   N   I   D   V   S   Y   W   G   E   W   Q   I   R   608

1825  GAT CCG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT GCG GCC GCA CTC GAG CAC 1872
609    D   P   N   S   S   S   V   D   K   L   A   A   A   L   E   H   624

1873  CAC CAC CAC CAC CAC TGA 1891
625    H   H   H   H   H   *   629
```

หมายเหตุ : เครื่องหมาย * แสดงถึงรหัสหยุด

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิลเนตร อัศวะศิริจินดา เกิดเมื่อวันที่ 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2548 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 ที่อยู่ปัจจุบัน 50/21 ถนนสุขาภิบาล 1 แขวง-เขต บางบอน กรุงเทพมหานคร 10150

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย