

ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟิโนสโทรบินจากกระชายเหลือง *Boesenbergia pandurata* ซึ่งเป็นสารยับยั้งวิถีสังเคราะห์ของแคลเซียมใน *Saccharomyces cerevisiae* และฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

นางสาวสิรินพร สุขสวัสดิ์อำนวย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOLOGICAL ACTIVITY OF PINOSTROBIN FROM *Boesenbergia pandurata*, A
CALCIUM SIGNALING PATHWAY INHIBITOR IN *Saccharomyces cerevisiae* AND
ACTIVITY AGAINST PROLIFERATION OF HUMAN CANCER CELL LINES

Miss Sirinporn Suksawatamnuay

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟิโนสโทรบินจากกระชายเหลือง
Boesenbergia pandurata ซึ่งเป็นสารยับยั้งวิถีสัญญาณ
ของแคลเซียมใน *Saccharomyces cerevisiae* และฤทธิ์
ด้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

โดย

นางสาวสิรินพร สุขสวัสดิ์อำนาจ

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. อภิญา เทียนธนะวัฒน์)

สิรินพร สุขสวัสดิ์อำนาจ : ฤทธิ์ทางชีวภาพของพิโนสโตรบินจากกระชายเหลือง
Boesenbergia pandurata ซึ่งเป็นสารยับยั้งวิถีสัญญาณของแคลเซียมใน
Saccharomyces cerevisiae และฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของ
 มนุษย์. (BIOLOGICAL ACTIVITY OF PINOSTROBIN FROM *Boesenbergia*
pandurata, A CALCIUM SIGNALING PATHWAY INHIBITOR IN *Saccharomyces*
cerevisiae AND ACTIVITY AGAINST PROLIFERATION OF HUMAN CANCER
 CELL LINES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. ชูดี ยมภักดี, อ.ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, 112 หน้า.

แคลเซียมไอออนเป็นสารส่งสัญญาณระดับที่สองในเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ยูแคริโอตในหลายกระบวนการตั้งแต่ในยีสต์ถึงมนุษย์ ในยีสต์การกระตุ้นสัญญาณของแคลเซียมที่มากเกินไปก่อให้เกิดความผิดปกติในการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเกิดการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G2 ในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ องค์ความรู้ดังกล่าวว่าวิธีการคัดกรองยาที่มีผลสัมฤทธิ์สูง เพื่อตรวจสอบหาสารโมเลกุลขนาดเล็กที่เป็นตัวยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมจึงได้ถูกพัฒนาขึ้น งานวิจัยก่อนหน้าได้ใช้ระบบคัดกรองดังกล่าว เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์จากสารสกัดสมุนไพรไทย และพบว่าพิโนสโตรบินซึ่งเป็นสารสกัดจากกระชายเหลืองสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ได้ สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาโมเลกุลเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของพิโนสโตรบิน ในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ ผลการทดลองพบว่า พิโนสโตรบินสามารถช่วยบรรเทาการเจริญที่บกพร่องของเซลล์ยีสต์ อันเนื่องมาจากการกระตุ้นยีน *SWE1* ได้ การวิเคราะห์หาระดับโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต แสดงให้เห็นว่าพิโนสโตรบินมีสมบัติในการยับยั้งการสะสมโปรตีน Swe1 ซึ่งอาศัยสื่อแคลเซียมในการสะสม และพบว่าพิโนสโตรบินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์สามารถเร่งอัตราการสลายตัวของโปรตีน Swe1 และยังลดระดับการแสดงออกของยีน *SWE1* ได้ นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบผลของพิโนสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ทั้ง 12 ชนิด ได้แก่ A375 SW620 Kato III HepG2 BT474 MDA-MB-231 THP-1 HL-60 Jurkat HeLa Ca-Ski และ SiHa โดยตรวจสอบจำนวนเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตเหลืออยู่ด้วยวิธี MTT proliferation assay ผลการทดลองพบว่า พิโนสโตรบินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง Jurkat, A375, Kato III และ Ca-Ski ด้วยค่า IC_{50} 56 67 86 และ 145 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิติ.....
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.....2552..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4972526623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : YEAST / Ca^{2+} -SIGNALING / PINOSTROBIN / *Boesenbergia pandurata*

SIRINPORN SUKSAWATAMNUAY : BIOLOGICAL ACTIVITY OF
PINOSTROBIN FROM *Boesenbergia pandurata*, A CALCIUM SIGNALING
PATHWAY INHIBITOR IN *Saccharomyces cerevisiae* AND ACTIVITY
AGAINST PROLIFERATION OF HUMAN CANCER CELL LINES. THESIS
ADVISOR : ASST. PROF. CHULEE YOMPAKDEE, Ph.D., THESIS CO-
ADVISOR : ASST. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., 112 pp.

Calcium ion (Ca^{2+}) is a universal second messenger that is important in the regulation of diverse biological processes in eukaryotic organisms from yeast to human. Hyperactivation of Ca^{2+} -signals in yeast causes a severe defect of growth through the inhibition of the cell-cycle engine in G2 phase. Because of the Ca^{2+} sensitivity observed a *zds1*-null yeast strain, a novel high throughput drug screening system to detect small-molecule inhibitors of the Ca^{2+} -dependent cell-cycle regulation was developed. Upon screening in Thai medicinal plant extract, pinostrobin, a pure compound from *Boesenbergia pandurata*, was identified as an inhibitor of Ca^{2+} -signal mediated growth regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. The aim of this study is to determine the molecule target of pinostrobin in the Ca^{2+} -signaling pathway in yeast. The result showed that pinostrobin suppressed the growth defect caused by the genetic activations of *SWE1*. Western blot analysis of Swe1 level indicated that the effect of pinostrobin was attributable to the inhibition of the Ca^{2+} -dependent accumulation of Swe1. Pinostrobin at 1 mM concentration could accelerate the rate of destabilization of Swe1 and also decreased the expression level of the *SWE1*. In addition, the effect of pinostrobin on proliferation of twelve human cancer cell lines (A375, SW620, Kato III, HepG2, BT474, MDA MB 231, THP-1, HL-60, Jurkat, HeLa, Ca-Ski and SiHa) was evaluated on the numbers of the viable cells by MTT proliferation assay. The result showed that pinostrobin inhibited proliferation of Jurkat, A375, KatoIII and Ca-Ski cell lines with IC_{50} value of 56, 67, 86 and 145 μM , respectively.

Department : Microbiology..... Student's Signature

Field of Study : Industrial Microbiology..... Advisor's Signature

Academic Year : 2009..... Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยม ภาคดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการสอบ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชกร และ ดร.อภิญา เทียนธนะวัฒน์ กรรมการจากภายใน และกรรมการจากภายนอกในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ ต่างๆแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

กราบขอบพระคุณ Prof. Tokichi Miyakawa Department of Molecular Biotchnology, Graduate School for Advanced Science and Matter, Hiroshima University Japan ที่กรุณาให้สายพันธุ์ยีสต์และพลาสมิดต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยนี้รวมทั้งให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.พรเทพ เทียนสิวกุล ที่กรุณาให้เซลล์ไลน์ HL-60 และกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ที่กรุณาให้เซลล์ไลน์ Ca-Ski กราบขอบพระคุณ ดร.อภิญา เทียนธนะวัฒน์ ที่กรุณาให้เซลล์ไลน์ MDA MB 231 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ชวศิริ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ ต่างๆ รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีต่างๆ และนางสาวสายพิน บุญเกิด ที่กรุณาช่วยสกัดสารจากกระชายเหลืองให้ รวมทั้งความห่วงใย และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอบคุณ คุณอำภา หลวงคล้ายโพธิ์ คุณวชิรศักดิ์ วั่งกังวาน พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการห้อง 452 และ 403 ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับทุก ความห่วงใย ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา น้องทั้งสอง ครอบครัว และ คุณเกียรติศักดิ์ พงษ์สุวินัย ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ยีสต์ (<i>S. cerevisiae</i>).....	7
2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์กับมนุษย์.....	8
2.3 การใช้ยีสต์เป็นเครื่องมือในการคัดกรองหารสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	9
2.4 วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม.....	11
2.5 กระจกหยด.....	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	17
3.2 เคมีภัณฑ์.....	19
3.3 ยีสต์.....	22
3.4 เซลล์ไลนัมะเร็งของมนุษย์.....	23
3.5 พลาสมีดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์.....	24
3.6 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต.....	25
3.7 สร้างยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mih1$ และ $\Delta hsl1$ โดยวิธีการทำลายยีน.....	26

บทที่	หน้า
3.8 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของพิโนสโทรบินในการยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์.....	30
3.9 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายของวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต.....	32
3.10 ผลของพิโนสโทรบินต่อความเสถียรของโปรตีนเป้าหมายของวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ในเซลล์ยีสต์โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต.....	36
3.11 ผลของพิโนสโทรบินต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ในเซลล์ยีสต์โดยวิธี real-time reverse transcription-PCR.....	36
3.12 ผลของพิโนสโทรบินต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ โดยวิธี MTT proliferation assay.....	40
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	44
4.1 สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายโดยวิธีทำลายยีน (gene disruption) <i>HSL1</i> และ <i>MIH1</i>	44
4.2 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของพิโนสโทรบินในการยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์.....	50
4.3 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายของวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต.....	57
4.4 ผลของพิโนสโทรบินต่อความเสถียรของโปรตีนเป้าหมายในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ในเซลล์ยีสต์โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต.....	59
4.5 ผลของพิโนสโทรบินต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ในเซลล์ยีสต์โดยวิธี real-time RT-PCR.....	61
4.6 ผลของพิโนสโทรบินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 12 ชนิดโดยวิธี MTT proliferation assay.....	63
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	71
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	87
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	112

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เวปไซต์ของฐานข้อมูลหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ <i>S. cerevisiae</i>	7
2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเป้าหมายกับฤทธิ์ทางชีวภาพในระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์สายกลาย $\Delta zds1$ เป็นเซลล์บ่งชี้.....	14
3.1	สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	22
3.2	ชนิดเซลล์ไลน์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	23
3.3	พลาสติกที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	24
3.4	โพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพโรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	24
3.5	แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต.....	25
3.6	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	26
3.7	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	39
4.1	ผลของฟินอสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์.....	70
ค1	วิเคราะห์ผลของฟินอสโตรบินต่อการแสดงออกของยีน <i>SWE1</i> ด้วย SPSS.....	104

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ความสัมพันธ์ของ essential gene ที่ทำหน้าที่หลักในมนุษย์และยีสต์.....	9
2.2	แบบจำลองวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling pathway) ใน <i>S. cerevisiae</i>	12
3.1	การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์.....	26
3.2	ขั้นตอนการทำลายยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	29
4.1	ผลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>URA3</i>	45
4.2	การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการยืนยันผลการทำลายยีน.....	47
4.3	ผลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน <i>MIH1</i>	48
4.4	แสดงลักษณะฟีโนไทป์ของ W303-1A ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมยูราซิล เมื่อยีน <i>URA3</i> ได้เข้าไปแทนที่ในโครโมโซมได้.....	49
4.5	ผลการทดสอบพิโนสโทรบินที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta hsl1$ ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง.....	52
4.6	ผลการทดสอบพิโนสโทรบินที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mih1$ ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง.....	54
4.7	ผลการทดสอบพิโนสโทรบินที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC2.....	56
4.8	ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Swe1 และ p-Cdc28 โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต.....	58
4.9	แสดงผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อความเสถียรของโปรตีน Swe1.....	60
4.10	ผลของพิโนสโทรบินต่อการแสดงออกของยีน <i>SWE1</i> ในเซลล์ยีสต์โดยวิธี real-time reverse transcription-PCR.....	62
4.11	ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ A375 โดยวิธี MTT proliferation assay.....	64
4.12	ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ SW620 โดยวิธี MTT proliferation assay.....	64

ภาพที่	หน้า
4.13 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ KATO III โดยวิธี MTT proliferation assay.....	65
4.14 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 โดยวิธี MTT proliferation assay.....	65
4.15 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ BT474 โดยวิธี MTT proliferation assay.....	66
4.16 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ MDA MB 231 โดยวิธี MTT proliferation assay.....	66
4.17 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HL-60 โดยวิธี MTT proliferation assay.....	67
4.18 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ jurkat โดยวิธี MTT proliferation assay.....	67
4.19 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ THP-1 โดยวิธี MTT proliferation assay.....	68
4.20 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HeLa โดยวิธี MTT proliferation assay.....	68
4.21 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Ca-Ski โดยวิธี MTT proliferation assay.....	69
4.22 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ SiHa โดยวิธี MTT proliferation assay.....	69
ง1 ผลวิเคราะห์โครงสร้างของพิโนสโทรบิน ด้วย NMR.....	110
ง2 ผลวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพิโนสโทรบิน ด้วย LC-MS.....	111
ง3 ผลวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพิโนสโทรบิน ด้วย GC.....	111

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สถานภาพของอุตสาหกรรมการผลิตยาในประเทศไทยเป็นอุตสาหกรรมชั้นปลายหรือขั้นที่ 3 (ขั้นที่ 1 คั้นคว่ำยาใหม่ ขั้นที่ 2 ผลิตวัตถุดิบ และขั้นที่ 3 ผลิตยาสำเร็จรูป) โดยนำเข้าวัตถุดิบยามาผสม (formulation) เป็นยาสำเร็จรูป ซึ่งเป็นการใช้ระดับเทคโนโลยีขั้นต้นเท่านั้น ส่วนการผลิตวัตถุดิบตัวยาเพื่อใช้ในประเทศมีค่อนข้างน้อย และมีศักยภาพต่ำในการผลิตวัตถุดิบตัวยาใหม่ เนื่องจากต้องลงทุนมาก และต้องได้รับความช่วยเหลือจากภาครัฐ และความร่วมมือจากภาคเอกชน ข้อมูลจากศูนย์วิจัยกสิกรไทย (<http://www.positioningmag.com>) ระบุว่าประเทศไทยขาดดุลการค้าทางด้านยารักษาโรคในมูลค่าสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากยารักษาโรคที่นำเข้ามาในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นยาที่ได้รับการคุ้มครองทางด้านสิทธิบัตร ซึ่งส่วนมาก คือ ยาที่มาจากประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศในทวีปยุโรป โดยปกติแล้วการผลิตยาต้นแบบ (Original Drug) ที่ได้มีการคิดค้นขึ้นเป็นรายแรกของโลกจะได้รับความคุ้มครองทางสิทธิบัตรประมาณ 20 ปี โดยที่ยาต้นแบบที่คิดค้นพัฒนาขึ้น และได้รับการคุ้มครองทางสิทธิบัตรจะมีราคาสูง ในปัจจุบันสหรัฐอเมริกา และประเทศในยุโรป ถือเป็นกลุ่มประเทศผู้ผลิตยาต้นแบบรายใหญ่ของโลก ส่วนของประเทศไทยนั้นการคิดค้นและพัฒนายาต้นแบบยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง ทั้งในเรื่องเงินลงทุนด้านเครื่องจักรและการวิจัย รวมทั้งการพัฒนาและติดตามผล ดังนั้นจึงยังจำเป็นต้องนำเข้ายาจากต่างประเทศในสัดส่วนที่สูง ปัจจุบันคนไทยจำนวนมากยังขาดโอกาสในการเข้าถึงยา เนื่องจากปัญหาความยากจน ในขณะที่ภาครัฐขาดแคลนงบประมาณสนับสนุนเนื่องจากปัญหาที่มีราคาแพง ส่งผลให้ภาครัฐไม่สามารถจัดสรรยาให้กับผู้ป่วยที่ต้องได้รับยาอย่างต่อเนื่อง ได้อย่างทั่วถึง เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ โรคหัวใจ และมะเร็ง เป็นต้น และจากข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุข ปี 2549 เผยว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 ของประเทศไทยโดยมีผู้เสียชีวิตปีละประมาณ 5.2 หมื่นคน อัตราเฉลี่ย 83 คนต่อประชากรแสนคน นอกจากนี้ในแต่ละปียังพบผู้ป่วยด้วยมะเร็งรายใหม่ประมาณ 1 แสนคน หรือเฉลี่ยวันละ 274 คน และมีแนวโน้มพบมากขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลทำให้ยาต้านมะเร็งที่ติดสิทธิบัตรคุ้มครอง สามารถผูกขาดตลาดได้จึงมีราคาสูงมาก ดังนั้นทุกฝ่ายทั้งภาครัฐและผู้ประกอบการต้องเร่งสร้างความยอมรับด้านคุณภาพมาตรฐานยาไทย ด้วยส่งเสริมการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตที่ทันสมัย รวมทั้งรณรงค์ให้คนไทยหันมาใช้ยารักษาโรคที่ผลิตในประเทศในส่วนที่มีคุณภาพเท่าเทียมและราคาถูกกว่าหรือใกล้เคียงกับต่างประเทศ เพื่อลด

การพึ่งพาการนำเข้ายารักษาโรคจากต่างประเทศ ทั้งยาแผนปัจจุบันและยาสมุนไพรซึ่งไทยมี วัตถุดิบในประเทศที่หลากหลายซึ่งสามารถนำมาใช้ผลิตเป็นยาแผนโบราณที่สามารถใช้ทดแทน ยาแผนปัจจุบันโดยมีผลข้างเคียงน้อยกว่า ประเทศไทยตั้งอยู่ในแถบร้อนชื้นของโลก ทำให้มีความ หลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตสูง พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร ได้สำรวจพรรณพืช ตั้งแต่ปีที่ก่อตั้งจนถึงปัจจุบัน พบว่ามีตัวอย่างพืช 62,000 ตัวอย่าง ประมาณ 14,000 ชนิด 230 วงศ์ และตามภูมิปัญญาไทยดั้งเดิมที่สืบทอดกันมา ได้นำพืชสมุนไพรมาใช้เพื่อป้องกันและรักษา โรคมากมาย อีกทั้งยังมีรายงานว่ายาที่ใช้ในปัจจุบันกว่าร้อยละ 25 นั้นได้มาจากพืช (Hamburger และ Hostettmann, 1991) ดังนั้นการศึกษาวิจัยและพัฒนาซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่ได้มาจากพืช จะเป็นการช่วยแก้ปัญหาการพึ่งพายานำเข้าที่ทำให้ไทยต้องขาดดุลการค้าปีละกว่า 20,000 ล้านบาทได้ และทำให้ประชาชนสามารถเข้าถึงยาอย่างทั่วถึง รวมทั้งยังเป็นการแก้ปัญหาหาราคาแพง ได้

ปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรค (Phongpaichit และคณะ, 2005) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Voravuthikunchai และ Kitpipit 2005) หรือฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Itharat และคณะ, 2004) แต่การศึกษาในเชิงลึกถึงกลไก ในระดับโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสมุนไพรยังมีน้อยมาก ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้คาดว่าจะ เป็นองค์ความรู้เพื่อการพัฒนาขึ้นใช้เองในประเทศ การทราบกลไกในระดับโมเลกุลของสารที่ สนใจจะทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพโดยละเอียด รวมทั้งผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นจากการใช้สาร บริสุทธิ์ดังกล่าวเป็นยา

วิถีสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling pathway) เป็นหนึ่งในวิถีที่สำคัญ ของการส่งสัญญาณภายในเซลล์ มีบทบาทต่อการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพมากมาย ได้แก่ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (cell proliferation) การกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด T-cell (T-cell activation) รวมถึงการหลั่งสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Clapham, 1995) ซึ่งถ้าหากสารที่ออกฤทธิ์ไปยับยั้งวิถีสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling inhibitor) จะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้หลายโรค ได้แก่ ยาต้านมะเร็ง ยาต้านการอักเสบ เป็นต้น (Shitamukai และคณะ, 2000)

กระบวนการทางชีวภาพที่เกิดขึ้นใน *Saccharomyces cerevisiae* เช่น การสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งตัว การสังเคราะห์และซ่อมแซมดีเอ็นเอ เป็นต้น นั้นคล้ายกันกับของใน เซลล์สิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Mager และ Winderickx 2005) และพบว่าประมาณร้อยละ 2 ของโปรตีน

ของยีสต์สามารถใช้เป็นเป้าหมายของยารักษาโรคได้ (Drews, 1996) และจากการเปรียบเทียบจีโนมของมนุษย์และยีสต์พบว่าประมาณร้อยละ 50 ของยีนที่ทราบแล้วว่าเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในมนุษย์คล้ายกันกับในยีสต์ (Hartwell, 2004) รวมทั้งผลการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างยาและโมเลกุลเป้าหมาย (drug target) ทั้งของในยีสต์และในมนุษย์มีความใกล้เคียงกันมาก ดังเช่น โมเลกุลเป้าหมายของสารกตุภูมิคุ้มกัน Rapamycin ถูกค้นพบในยีสต์ก่อนและถูกยืนยันผลในมนุษย์ ในเวลาต่อมา (Heitman และคณะ, 1991) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ยีสต์เหมาะสมที่จะถูกนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการค้นหาและศึกษาสมบัติของยาชนิดใหม่ๆ

วชิรศักดิ์ วังกังวาน (2550) ได้ใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งวิถีสัญญาณแคลเซียมจากพืชสมุนไพรไทย และได้พบว่าสารบริสุทธิ์ฟิโนสโทรบินที่เป็นสารหลักชนิดหนึ่ง ที่แยกได้จากส่วนรากของกระชายเหลืองมีฤทธิ์ดังกล่าว

กระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้าน ที่ได้มีการนำไปใช้ประกอบอาหารและเป็นยารักษาโรคตามภูมิปัญญาไทยดั้งเดิมโดยมีสรรพคุณเป็นยา ใช้แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้ลมจุกเสียด แก้โรคกระเพาะ รักษาแผลในปาก (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2547) ในกระชายเหลืองพบสารประกอบต่างๆมากมาย ได้แก่ กลุ่มไดไฮโดรซาลโคเน boesenbergin A กลุ่ม ฟลาโวน ฟลาวาโนน และฟลาโวนอยด์ (ได้แก่ alpinetin, pinostrobin) และ pinocembrin (Mongkolsuk และ Dean 1964; Jaipetch และคณะ, 1982) จากรายงานที่ผ่านมามีการค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพของฟิโนสโทรบินหลายด้าน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอักเสบ (Wu และคณะ, 2002) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Bharmapravati และคณะ, 2003) หรือฤทธิ์ต้านมะเร็งบางชนิด (Smolarz และคณะ, 2006; Ashidi และคณะ, 2007) แต่จนถึงปัจจุบันยังมีรายงานวิจัยน้อยมากในเชิงลึก ถึงกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารบริสุทธิ์จากกระชายเหลือง การทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของฟิโนสโทรบินที่ไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนใดโปรตีนหนึ่งในวิถีสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ จะเป็นข้อมูลที่สามารรถเชื่อมโยงไปสู่โปรตีนดังกล่าวในมนุษย์ ด้วยการนำเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ฐานข้อมูลของจีโนมในยีสต์และในมนุษย์ เพื่อนำไปสู่การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารดังกล่าวในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

งานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายต่อยอดงานวิจัยของ วชิรศักดิ์ วังกังวาน (2550) โดยเน้นศึกษาเพื่อหาโปรตีนในวิถีสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ ที่ถูกยับยั้งการทำงานโดยฟิโนสโทรบิน และศึกษาฤทธิ์ของฟิโนสโทรบินในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์บางชนิด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) ศึกษาลักษณะสมบัติการออกฤทธิ์ของฟิโนสโทรบินในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์
- 2) ศึกษาฤทธิ์ของฟิโนสโทรบินในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์
- 3) ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลเบื้องต้นของฟิโนสโทรบินในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดของมนุษย์

1.3 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ฟิโนสโทรบิน กระจายเหลือง วิธีสัญญาณของแคลเซียม มะเร็ง *Saccharomyces cerevisiae*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลของงานวิจัยนี้จะเป็นทั้งการสร้างองค์ความรู้ใหม่รวมทั้งต่อยอดองค์ความรู้เดิมในเชิงลึกของฟิโนสโทรบินจากกระจายเหลือง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรค เพื่อทดแทนการนำเข้ายาจากต่างประเทศต่อไป

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

- 1) สร้างยีสต์สายพันธุ์กลาย โดยวิธีเพิ่มหรือลดจำนวนยีน *MIH1*, *HSL1* และ *SWE1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีสัญญาณแคลเซียมใน *S. cerevisiae*
- 2) ศึกษาลักษณะสมบัติการออกฤทธิ์เบื้องต้นของพิโนสโทรบินในยีสต์โดยใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ของยีสต์
- 3) ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต
- 4) ศึกษาการแสดงออกของยีนประมวลรหัสโปรตีนเป้าหมายดังกล่าว ด้วยวิธี real-time reverse transcription-PCR
- 5) ศึกษาผลของพิโนสโทรบินต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ จำนวน 12 เซลล์ไลน์ได้แก่ เซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ (SW620) เซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) เซลล์ไลน์มะเร็งเต้านม (BT474 และ MDA MB 231) เซลล์ไลน์มะเร็งผิวหนัง (A375) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa, Ca-Ski และ SiHa) และเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (THP-1, HL-60 และ Jurkat) โดยวิธี MTT proliferation assay

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันงานวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และการวิจัยยาแผนโบราณแนวใหม่ เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรค ยังคงมีอย่างแพร่หลายและต่อเนื่อง ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ การเก็บรวบรวมตัวอย่าง การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของสาร การปรับเปลี่ยนโครงสร้างและการสังเคราะห์สารใหม่ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ การศึกษาด้านพิษวิทยา การศึกษาทางกลไกการออกฤทธิ์ของสาร เป็นต้น โดยงานวิจัยที่ศึกษาสารออกฤทธิ์จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์นั้นน่าจะนำสารออกฤทธิ์ที่ได้มาใช้โดยตรง หรือนำมาเป็นโครงสร้างต้นแบบเพื่อทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง ให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น หรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นที่ต่างไปจากเดิม หรือนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารชนิดอื่นๆ ในระดับอุตสาหกรรม ประเทศไทยจะได้รับประโยชน์จากการวิจัยด้านนี้เป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการวิจัยแนวนี้ตั้งอยู่บนพื้นฐานความหลากหลายทางชีวภาพที่มีมากมาย และจำเพาะในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ

วิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทั่วไป ใช้หลักการที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญของ เซลล์บ่งชี้ (indicator cell) เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ หรือ ปรีสิตก่อโรคต่างๆ หรือระบบการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์อื่นๆ ที่มีการใช้ทั่วไป เนื่องจากวิธีดังกล่าวนี้เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปทำให้มีความเป็นไปได้สูงที่จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดเดิมที่ได้มีการค้นพบก่อนหน้านี้แล้ว ดังที่ National Cancer Institute ของสหรัฐอเมริกา ได้รายงานว่าการทดสอบสาร 114,500 ชนิด ที่สกัดได้จากพืช 35,000 ชนิด นักวิจัยของสถาบันดังกล่าวไม่พบสารต่อต้านมะเร็งชนิดใหม่เลย (Richard, 1985) ดังนั้นการพัฒนาวิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีหลักการใหม่จะช่วยเพิ่มโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่อาจไม่ถูกค้นพบโดยวิธีการคัดกรองที่มีอยู่เดิมหรืออาจค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่จากสารออกฤทธิ์ที่มีการค้นพบแล้วได้

งานวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ยีสต์เป็นเซลล์บ่งชี้มีหลากหลาย เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่ถูกจัดเป็นยูแคริโอตชั้นพื้นฐาน ซึ่งได้ถูกใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism) ในการศึกษากระบวนการทางชีวภาพต่างๆ (biological processes) ในระดับโมเลกุลและระดับเซลล์ เช่น การศึกษากระบวนการควบคุมการแบ่งเซลล์ (regulation of cell cycle) ของยูแคริโอต และของเซลล์มะเร็ง (Botstein และคณะ, 1997; Hartwell, 2002)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยีสต์ (*S. cerevisiae*)

S. cerevisiae เป็นยีสต์ที่จัดอยู่ในแฟมิลี Saccharomycetaceae จีโนส *Saccharomyces* สปีชีส์ *S. cerevisiae* สามารถเลี้ยงได้ง่าย มีวัฏจักรการแบ่งเซลล์ (cell cycle) สั้นประมาณ 90 นาที เพิ่มจำนวนเร็ว เสียค่าใช้จ่ายน้อยเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์ ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีความปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) และสามารถดัดแปลงทางพันธุกรรมได้ง่ายและรวดเร็วกว่า เช่น การทำลายยีน (gene disruption) การติดตามยีน (gene marking) การกลายพันธุ์ (mutation) และการศึกษาผลของจำนวนชุดของยีน (gene-dosage effect) เหตุผลหนึ่งเนื่องมาจากเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในกลุ่มยูแคริโอต แล้วยีสต์มีอัตราการเกิดรีคอมบิเนชันสูง ทำให้การแทรกซิ่นดีเอ็นเอที่ต้องการสามารถทำได้โดยง่ายโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรส (Wach และคณะ, 1994) อีกทั้งข้อมูลลำดับเบสของทั้งจีโนม (Goffeau และคณะ, 1996) รวมทั้งลำดับเบสที่คาดว่าจะเปิดอ่าน (open reading frame (ORF) จำนวน 6,466 ORF (Kumar และคณะ, 2002) ได้ถูกรายงานอย่างสมบูรณ์ และข้อมูลที่เกี่ยวข้องก็สามารถเข้าถึงได้โดยทั่วไปดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เว็บไซต์ของฐานข้อมูลหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ *S. cerevisiae*

ฐานข้อมูลหรืองานวิจัย	เว็บไซต์
General yeast genome and proteome databases	
Saccharomyces Genome Database (SGD Stanford)	http://www.yeastgenome.org/
Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD-MIPS)	http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/index.jsp
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	http://www.genome.jp/kegg/
Yeast mutant collections	
Saccharomyces Genome Deletion Project	http://www.sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/
EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis (EUROSCARF)	http://web.unifrankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/

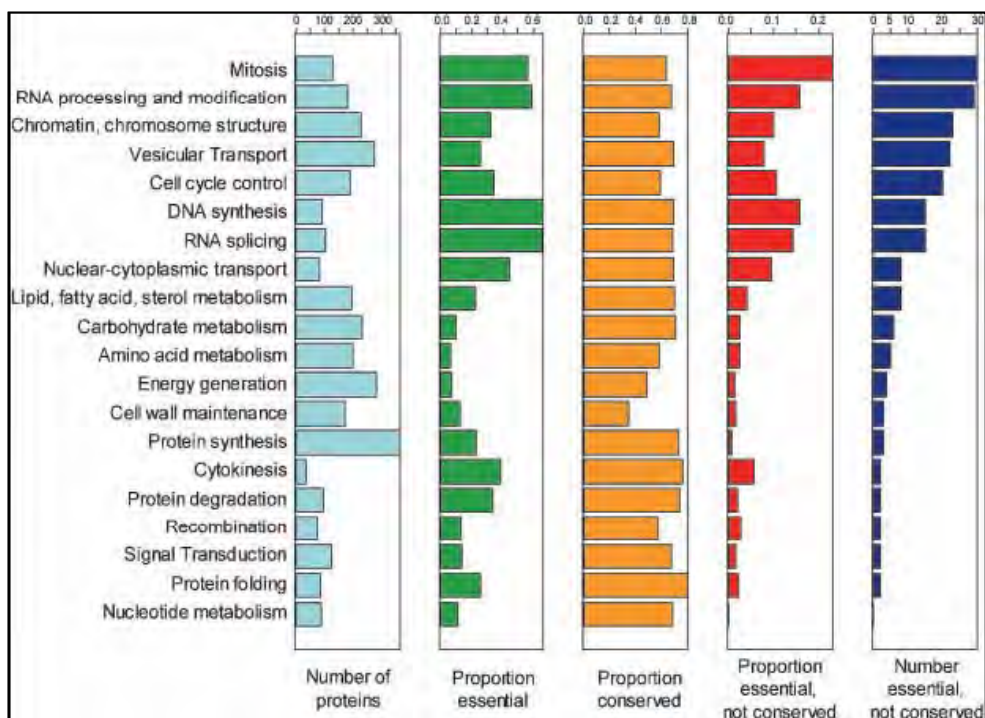
ตารางที่ 2.1 เว็บไซต์ของฐานข้อมูลหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ *S. cerevisiae* (ต่อ)

ฐานข้อมูลหรืองานวิจัย	เว็บไซต์
Yeast–mammalian or yeast–human homology searches	
Mammalian homology to yeast (SGD)	http://www.yeastgenome.org/mammal/
Clusters of orthologous groups of proteins (COGs)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/
Discover homologs (Homologene)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?dbZhomologene
Yeast–human diseases	
Mitochondria-related proteins, genes and diseases (MitoP)	http://ihg.gsf.de/mitop2/
Yeast homologs of human disease-associated genes	http://mips.gsf.de/proj/yeast/reviews/human_diseases.html

ที่มา: Mager และ Winderickx (2005)

2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์กับมนุษย์

กระบวนการทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในยีสต์ดังกล่าวเช่น การสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งตัว การสังเคราะห์และซ่อมแซมดีเอ็นเอ เป็นต้น นั้นคล้ายกับของในเซลล์สิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Mager และ Winderickx, 2005) ดังภาพที่ 2.1 พบว่าประมาณร้อยละ 2 ของโปรตีนทั้งหมดของมนุษย์สามารถใช้เป็นเป้าหมายของยารักษาโรคได้ (Drews, 1996) และจากการเปรียบเทียบจีโนมของมนุษย์และยีสต์พบว่าประมาณร้อยละ 50 ของยีนที่ทราบแล้วว่าเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในมนุษย์คล้ายกันกับในยีสต์ (Hartwell, 2004) รวมทั้งจากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างยาและโมเลกุลเป้าหมาย (drug target) ทั้งของในยีสต์และในมนุษย์มีความใกล้เคียงกันมาก ดังเช่น โมเลกุลเป้าหมายของสารกดภูมิคุ้มกัน Rapamycin ถูกค้นพบในยีสต์ก่อนและถูกยืนยันผลในมนุษย์ในเวลาต่อมา (Heitman และคณะ, 1991) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ *S. cerevisiae* เหมาะสมเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาหายาชนิดใหม่ๆ เช่นในขั้นตอนของงานวิจัยที่พัฒนาวิธีคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ใช้หลักการที่ต่างไปจากหลักการเดิมๆ ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน



ที่มา: Hughes (2002)

ภาพที่ 2.1 ความสัมพันธ์ของ essential gene ที่ทำหน้าที่หลักในเซลล์มนุษย์และยีสต์

2.3 การใช้ยีสต์เป็นเครื่องมือในการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบหาหน้าที่ของโปรตีนของมนุษย์ภายใต้ภาวะที่อยู่ในเซลล์ยีสต์และการทดลองหาหน้าที่ของแต่ละโปรตีนเป้าหมายของยาในสี่กลุ่มหลักได้แก่ ion channel, nuclear receptor, G-protein-coupled-receptors (GPCRs) และเอนไซม์ ทำให้สามารถนำผลที่ได้มาประยุกต์ใช้สำหรับการใช้ยีสต์เป็นเครื่องมือในการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ ดังนี้

M2 polypeptides ของไวรัสมีผลให้โปรตอนไหลจากเอนโดโซมเข้ามาในไวริออน ทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลงและกระตุ้นให้เกิดการปล่อยจีโนมไวรัสเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นช่วงแรกของวัฏจักรการติดเชื้อไวรัส คณะนักวิจัยพบว่าเมื่อนำโปรตีนดังกล่าวไปแสดงออกในยีสต์ จะทำให้ยีสต์มีการเจริญเติบโตลดลง การพัฒนาวิธีการคัดกรองจากหลักการนี้ทำให้สามารถพบสารที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสได้ใน plaque reduction assay โดยมีค่า IC_{50} คือ 0.26 ไมโครโมลาร์ (Kurtz และคณะ, 1995)

เนื่องจาก GPCRs ของมนุษย์มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับโปรตีน Ste2 ของยีสต์ซึ่งเป็น mating pheromone receptor ดังนั้นเมื่อนำมาแสดงออกในยีสต์ทำให้พบว่า ลิแกนด์ที่จับกับ GPCR สามารถกระตุ้นการทำงานของวิถีการส่งสัญญาณของฟีโรโมนและกระตุ้นยีนที่จำเพาะต่อ mating ได้เช่นเดียวกับการกระตุ้นการทำงานของ mating pheromone receptor ของยีสต์จาก ข้อมูลนี้ทำให้มีการพัฒนาการคัดกรองหาลิแกนด์ที่จำเพาะต่อ GPCR โดยใช้ยีสต์ซึ่งที่มีการเชื่อมโยงรายงานผลต่อเข้ากับโปรโมเตอร์ของยีนที่จำเพาะต่อ mating เช่น pFUS1- lacZ (Dowell และ Brown, 2002)

Perkins และคณะ (2001) รายงานว่า สามารถคัดกรองสารออกฤทธิ์ยับยั้ง human poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) โดยใช้ระบบยีสต์และพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ PARP1 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย้าย poly (ADP-ribose) ของโปรตีนหลายชนิดรวมทั้งโปรตีน p53 และการทำงานของ PARP1 จะถูกกระตุ้นเมื่อเกิดการทำลายดีเอ็นเอสายคู่ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ทำให้สามารถใช้ประโยชน์เป็นยาควบคุมการตอบสนองต่อการเกิดการทำลายดีเอ็นเอที่ใช้เป็นยาต้านมะเร็งได้ โดยเมื่อนำ PARP1 ไปแสดงออกในยีสต์เป็นผลทำให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ ถ้ามีสารไปยับยั้งการทำงานของ PARP1 ได้จะทำให้ยีสต์สามารถกลับมาเจริญเติบโตได้ตามปกติ

Bach และคณะ (2003) ได้ใช้ระบบยีสต์ในการคัดกรองหายาด้าน prion ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคควัวบ้า โดยทำการค้นหาสารยับยั้งโปรตีน [PSI⁺] และ [URE3] ซึ่งเป็นโปรตีนของยีสต์ที่มีลักษณะคล้าย prion ของมนุษย์และพบว่าสารยับยั้ง prion ชนิดใหม่ที่คัดแยกได้จากการทดลองนี้สามารถยับยั้ง prion ของมนุษย์ได้ทำให้สามารถสรุปเพิ่มเติมได้ว่ากลไกการเกิด prion มีการอนุรักษ์ (conserve) จากยีสต์สู่มนุษย์

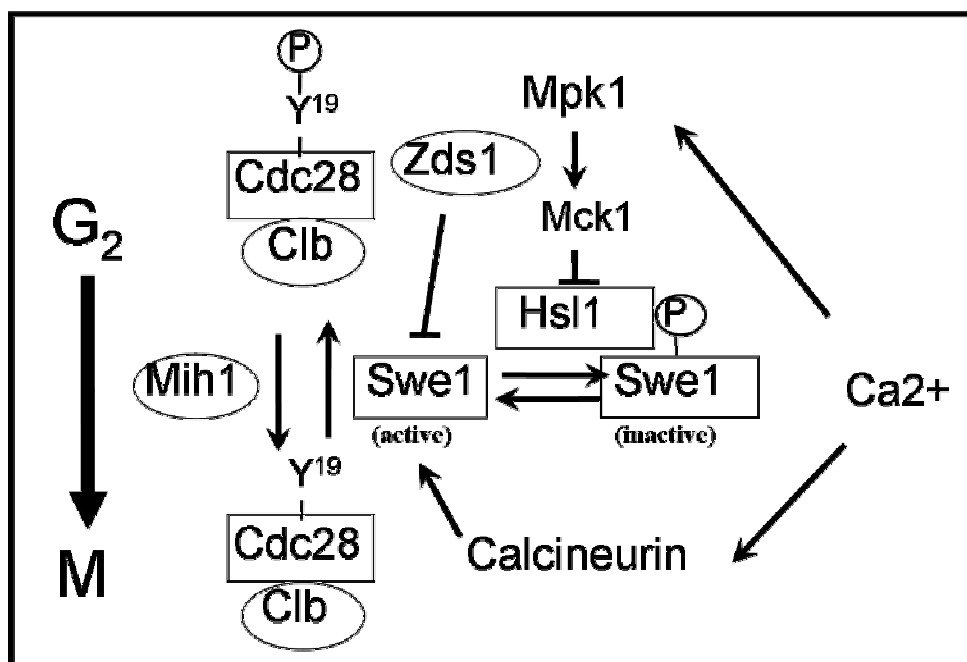
Middendorp และคณะ (2004) ทำการคัดกรองหาสารยับยั้ง β secretase โดยใช้ระบบยีสต์ β secretase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของเพปไทด์ amyloid- β ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรค Alzheimer และจากการคัดกรองพบสารที่สามารถลดการตกตะกอนของเพปไทด์ amyloid- β โดยมีค่า IC₅₀ ที่ 7 ไมโครโมลาร์ อีกทั้งสารดังกล่าวสามารถยับยั้ง β secretase ในระบบยีสต์ได้ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน แสดงว่าระบบยีสต์นี้สามารถใช้เป็นระบบคัดกรองหาสารยับยั้งการเกิดโรค Alzheimer ได้

Shitamukai และคณะ (2000) ศึกษายีสต์สายพันธุ์กลายที่ไม่มียีน ZDS1 (Δ Zds1) พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง เซลล์จะไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมถูกกระตุ้น และขาดโปรตีน Zds1 ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ

โปรตีน Swe1 จึงทำให้โปรตีน Swe1 อยู่ในภาวะที่สามารถทำงานได้ เป็นผลทำให้เซลล์หยุดหรือชะลอการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะ G2 Swe1 เป็นโปรตีนไคเนส (protein kinase) ในภาวะที่ทำงานได้ (active form) จะทำการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ไทโรซีนตำแหน่งที่ 19 บน Cdc28 ทำให้โปรตีนเชิงซ้อน Clb-Cdc28 ไม่อยู่ในภาวะที่ทำงานได้ เซลล์จึงหยุดอยู่ในระยะ G2 ของวัฏจักรการแบ่งเซลล์ ซึ่งควบคุมระยะการแบ่งเซลล์จาก G2 ไปสู่ระยะไมโทซิส (ดังภาพที่ 2.2) ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวจึงไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง แต่ถ้ามีสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กไปยับยั้งที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจะทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวสามารถเจริญในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูงได้

2.4 วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม

วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม เป็นหนึ่งในวิถีสำคัญที่มีบทบาทต่อการควบคุม การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (cell proliferation) การกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด T-cell (T-cell activation) กระบวนการหลั่งสาร (secretion) การหดตัวของกล้ามเนื้อ (muscle contraction) รวมถึงการหลั่งสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Clapham, 1995) สำหรับใน *S. cerevisiae* วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (ดังภาพที่ 2.2) ควบคุมขั้นตอนการแบ่งเซลล์ในระยะโดยการควบคุมการทำงานของโปรตีน Swe1 ซึ่งเป็นโปรตีนไคเนส โปรตีน Swe1 จะเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้โปรตีน Cdc28 ซึ่งเป็น cyclin-dependent protein kinase ซึ่งทำให้โปรตีน cyclin-Cdc28 ไม่มีแอกทิวิตีทำให้เซลล์หยุดหรือชะลอการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะ G2 (Booher และคณะ, 1993; Means, 1994) วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์เกิดขึ้นโดย 2 วิถีคู่ขนานได้แก่ วิถีที่ส่งสัญญาณของแคลเซียมผ่าน calcineurin และวิถีที่ส่งสัญญาณของแคลเซียมผ่าน Mpk1 โดยทั้งสองวิถีนี้ทำงานร่วมกันในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Swe1 (Mizunuma และคณะ, 1998) ในเซลล์ปกติจะมีโปรตีน Zds1 ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative regulator) (Bi และ Pringle, 1996) ทำให้เกิดความสมดุลระหว่างสัญญาณการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของโปรตีน Swe1



ที่มา: Mizunuma และคณะ (1998)

ภาพที่ 2.2 แบบจำลองวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมใน *S. cerevisiae*

Shitamukai และคณะ (2000) ได้เสนอว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ สามารถใช้เป็น เซลล์บ่งชี้ (indicator cell) ในระบบคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ โดยระบบนี้ใช้หลักการที่แตกต่างไปจากระบบที่ใช้กันอยู่ทั่วไป เป็นการเพิ่มโอกาสที่จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ และสารออกฤทธิ์ที่ได้จะมีความจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมายสูง ถ้าสารออกฤทธิ์ไปยับยั้งโปรตีน Mpk1 ซึ่งเป็นโปรตีน MAP kinase ชนิดหนึ่ง สารออกฤทธิ์นี้น่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งหรือสารต้านการอักเสบ เนื่องจากโปรตีน Mpk1 นี้มีความคล้ายคลึงกับ Erk1/Erk2 ในมนุษย์ (Sugiura และคณะ, 2002) ในเซลล์มะเร็งบางชนิดนั้น Erk1/Erk2 จะถูกกระตุ้นตลอดโดยไคเนส Ras เป็นผลให้เกิดการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในเซลล์มะเร็ง และ Erk1/Erk2 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยที่เมื่อ Erk1/Erk2 ถูกกระตุ้นนั้นจะไปควบคุมการทำงานของ transcription factor ในกลุ่ม AP-1 โดย AP-1 transcription factor ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างไซโตไคน์ IL-2 ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการแบ่งตัวของ T-cell ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารยับยั้งวิถี Erk1/Erk2 มีดังนี้

Duan และคณะ (2004) รายงานว่า U0126 ซึ่งเป็นสารยับยั้งวิถี Erk1/Erk2 สามารถยับยั้งแอนติเจนต้นแบบ Ovalalbumin (OVA) ในการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิลใน

กระแสเลือด และการเกิดเมือกที่ทางเดินหายใจ รวมทั้งการแสดงออกของ VCAM-1 ในเนื้อเยื่อปอดของหนูได้ และจากผลของการศึกษาปอดหนูที่กระตุ้นด้วย OVA และวิเคราะห์ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต พบว่า U0126 สามารถป้องกันการกระตุ้นวิถี Erk1/Erk2 อันเนื่องมาจาก OVA ได้ แสดงว่าการยับยั้งวิถี Erk1/Erk2 สามารถที่จะใช้เป็นแนวทางการรักษาโรคมะเร็งในระบบทางเดินหายใจได้

Sebolt-Leopold และคณะ (1999) รายงานว่า PD184352 (CL-1040) ซึ่งเป็นสารยับยั้งวิถี Erk1/Erk2 สามารถยับยั้งการเจริญของมะเร็งได้ โดยพบว่าจากการให้สารดังกล่าวโดยวิธีกิน พบว่าสารดังกล่าวสามารถป้องกันการเจริญของมะเร็งลำไส้ในสัตว์ทดลองได้ ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการกระตุ้นวิถี Erk1/Erk2 ซึ่งแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่ให้

ถ้าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีโมเลกุลเป้าหมายเป็น Calcineurin สารออกฤทธิ์ที่จะได้นำจะเป็นสารออกฤทธิ์ด้านการอักเสบหรือสารกดภูมิคุ้มกันเป็นต้น เนื่องจาก Calcineurin ในยีสต์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมนี้มีความคล้ายคลึงกับ Calcineurin ในมนุษย์ มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อแคลเซียม มีโมเลกุลเป้าหมายที่สำคัญอย่างหนึ่งได้แก่ transcription factor ในกลุ่ม Nuclear factor of activated T cells (NFAT) ซึ่งปกติอยู่ในไซโทพลาซึม แต่ถ้า Calcineurin ถูกกระตุ้น จะเกิดการขนส่ง NFAT เข้าไปยังนิวเคลียสเพื่อไปกระตุ้นยีนประมวลรหัสไซโทไคน์ ได้แก่ *IL-2* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น T-cell (Sugiura และคณะ, 2002) ตัวอย่างยาที่ยับยั้ง Calcineurin ได้แก่ FK506 และ cyclosporin A ซึ่งเป็นยากดภูมิคุ้มกันที่มีการใช้กันอยู่ทั่วไป

ถ้าสารออกฤทธิ์ไปยับยั้งที่โปรตีนไคเนส Mck1 สารออกฤทธิ์ที่ได้นำจะเป็นสารออกฤทธิ์ด้านโรคเบาหวานประเภทที่ 2 (Diabetes type 2) และหรืออาจเป็นสารต้านโรค Alzheimer เนื่องจากโปรตีน Mck1 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในวิถีส่งสัญญาณแคลเซียมนี้มีความคล้ายคลึงกับ GSK-3 β ในมนุษย์ (Kassir และคณะ, 2006) GSK-3 β มีกลไกการทำงานตรงกันข้ามกับกระบวนการสร้างไกลโคเจน (Nikoulina และคณะ, 2000) ในผู้ป่วยโรคเบาหวานพบว่ามีระดับของ GSK-3 β ผิดปกติ ดังนั้นการยับยั้ง GSK-3 β อาจจะสามารถนำไปรักษาโรคเบาหวานได้ นอกจากนี้ในระบบประสาทส่วนกลางของผู้ป่วยโรค Alzheimer ได้ถูกพบการเกิดการตกตะกอนของโปรตีน Tau สาเหตุเนื่องมาจากระดับของ GSK-3 β ที่ผิดปกติ โดยมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีน Tau มากจนเป็นผลให้โปรตีนสูญเสียโครงสร้างและจับตัวตกตะกอนเกิดเป็นแอมิลลอยด์ในระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลให้เซลล์สมองหรือระบบประสาทส่วนกลางเสียหาย (Bhat และคณะ, 2004)

ดังนั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าจะได้จากวิธีการคัดกรองในระบบยีสต์นี้ ได้แก่ สารต้านการอักเสบ สารกดภูมิคุ้มกัน และสารต้านมะเร็ง เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเป้าหมายกับฤทธิ์ทางชีวภาพในระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์สายกลาย $\Delta zds1$ เป็นเซลล์บ่งชี้

โมเลกุลเป้าหมาย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ
Calcineurin	Immunosuppressants, Allergy remedy
MPK1 (ERK1, ERK2)	Anticancer agent, Anti-inflammatory
MCK1 (GSK-3)	Alzheimer disease, Type II diabetes

ยาที่ใช้ในปัจจุบันกว่าร้อยละ 25 ได้มาจากพืช (Hamburger และ Hostettmann, 1991) และจากการที่ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นของโลก ทำให้มีความหลากหลายของพันธุ์พืชสูง จากรายงานของธนาคารโลกในปี 1992 พบว่าประเทศไทยมีพืชไม่ต่ำกว่า 14,000 ชนิด ดังนั้น การศึกษาวิจัยและพัฒนายาซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่ได้มาจากพืชจะเป็นการช่วยแก้ปัญหาการพึ่งพาการนำเข้ายาที่ทำให้ไทยต้องขาดดุลการค้าปีละกว่า 20,000 ล้านบาทได้ และทำให้ประชาชนสามารถเข้าถึงยาได้อย่างทั่วถึง รวมทั้งยังเป็นการแก้ปัญหาหายที่มีราคาแพงได้ ปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรค (Phongpaichit และคณะ, 2005) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Voravuthikunchai และ Kitpipit, 2005) หรือฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Itharat และคณะ, 2004) แต่การศึกษาในเชิงลึกถึงกลไกในระดับโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสมุนไพรยังมีน้อยมาก ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้คาดว่าจะเป็นอย่างน้อยความรู้เพื่อการพัฒนายาขึ้นใช้เองในประเทศ การทราบกลไกในระดับโมเลกุลของสารที่สนใจจะทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพโดยละเอียด รวมทั้งผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นจากการใช้สารบริสุทธิ์ดังกล่าวเป็นยา

วชิรศักดิ์ วังกังวาน (2550) ได้ใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งวิถีสัญญาณแคลเซียมจากพืชสมุนไพรไทย และได้พบว่าสารบริสุทธิ์พิโนสโทรบินที่เป็นสารหลักชนิดหนึ่ง ที่แยกได้จากส่วนรากของกระชายเหลืองมีฤทธิ์ดังกล่าว

2.5 กระชายเหลือง

กระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้าน ที่ได้มีการนำไปใช้ประกอบอาหารและเป็นยารักษาโรคตามภูมิปัญญาไทยดั้งเดิมโดยมีสรรพคุณเป็นยา ใช้แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้อลมจุกเสียด แก้อาการระคายเคือง รักษาแผลในปาก (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2547) ในกระชายเหลืองพบสารประกอบต่างๆ มากมาย ได้แก่ กลุ่มไดไฮโดรซาลโคน boesenbergin A กลุ่ม ฟลาโวน ฟลาโวนอน และฟลาโวนอยด์ (ได้แก่ alpinetin, pinostrobin) และ pinocembrin (Mongkolsuk และ Dean, 1964; Jaipetch และคณะ, 1982) จากรายงานที่ผ่านมา มีการค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพของพิโนสโทรบินหลายด้าน ได้แก่

Wu และคณะ (2002) รายงานว่าพิโนสโทรบินสามารถยับยั้ง Cyclooxygenase (COX) I และ COX II ในหลอดทดลองได้ โดย COX I/II เป็นเอนไซม์ที่เป็นส่วนหนึ่งของวิถีการสร้างโพรสตาแกลนดินซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเกิดกระบวนการอักเสบ

Bharmapravati และคณะ (2003) รายงานว่าพิโนสโทรบินมีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Helicobacter pylori* ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าเป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหาร

Trakoontivakorn และคณะ (2001) รายงานว่าพิโนสโทรบินมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ (antimutagenic activity) จากสาร 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) โดยมีค่า IC_{50} คือ 5.3 ± 1.0 ไมโครโมลาร์

Fahey และ Stephenson (2002) ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากพืชในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ใช้กำจัดสารพิษ (phase 2 detoxification enzyme) ในมะเร็งตับของหนู พบว่าพิโนสโทรบินสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ quinone reductase ที่ใช้กำจัดสารพิษในตับได้

Smolarz และคณะ (2006) คัดกรองหาสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ พบว่าพิโนสโทรบินมีฤทธิ์ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat และ HL-60) มีการตายแบบอะพอพโทซิส โดยมีการตายเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของพิโนสโทรบิน โดย

พบว่าที่ 10 นาโนโมลาร์ ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 25-60 ที่ 100 นาโนโมลาร์ทำให้เซลล์ตาย ร้อยละ 45-76 และที่ 1 ไมโครโมลาร์ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 70-88 ตามลำดับ

Ashidi และคณะ (2007) ทดสอบฤทธิ์พิโนสโทรบินในมะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ (CCRF-CEM) พบว่าสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของมะเร็งเม็ดเลือดขาว และยังทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ที่ไปทำลายเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียที่มีบทบาทสำคัญในการตายแบบอะพอพโทซิส

แต่จนถึงปัจจุบันยังมีรายงานวิจัยน้อยมากในเชิงลึก ถึงกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารบริสุทธิ์จากกระชายเหลือง การทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของพิโนสโทรบิน ที่ไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนใดโปรตีนหนึ่งในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ จะถูกใช้เป็นข้อมูลที่สามารถเชื่อมโยงไปสู่โปรตีนดังกล่าวในมนุษย์ได้ ด้วยการใช้ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ฐานข้อมูลของจีโนมในยีสต์และในมนุษย์ เพื่อนำไปสู่การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารดังกล่าวในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

งานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายต่อยอดงานวิจัยของ วชิรศักดิ์ วัจกัฏวาน (2550) โดยเน้นศึกษาเพื่อหาโปรตีนในวิถีสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ ที่ถูกยับยั้งการทำงานโดยพิโนสโทรบิน และศึกษาฤทธิ์ของพิโนสโทรบินในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดของมนุษย์ต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
3. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S-20K ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea
6. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Geniell G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan
9. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 2600 ของบริษัท Denville, Germany
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น NST 2000 ของบริษัท EYELA, Japan
11. เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator) รุ่น RK100 บริษัท BANDELIN, Germany
12. เครื่องนับจำนวนเม็ดเลือด (Haemocytometer)
13. ชุดเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-1NW บริษัท EYELA, Japan
14. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
15. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
16. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร Restek, Thailand
17. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
 - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA

18. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-ex, Japan
19. เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) ยี่ห้อ Clifton Ceraplate
20. เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbera รุ่น MW-2020
21. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 ของบริษัท Bio-tek instrument
22. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น S20-K ของบริษัท Mettler Toldo
23. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รุ่น ULT 1786 ของบริษัท FORMA Scientific, USA
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 ของบริษัท SANYO Electric, Japan
25. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส รุ่น Tiara บริษัท Mitsubishi electric
26. ชุดเครื่องมือทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Protein III System) ของบริษัท Biorad, USA
27. ชุดเครื่องมือทำ semi-dry electrophoretic transfer cell รุ่น Trans-Blot® SD ของบริษัท Bio-Rad, USA
28. แผ่นกระจกสไลด์
29. กระจกปิดสไลด์
30. ตะเกียงแอลกอฮอล์
31. ถาดประกบฟิล์ม ของบริษัท OKAMOTO
32. ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (Kodak Medical x-ray film)
33. กระดาษกรอง (filter paper)
34. กล้อง inverted microscope ของบริษัท Olympus
35. ปิเปตต์แก้ว (seropipette) 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
36. ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (Tissue culture Flask ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ยี่ห้อ Corning Incorporation, USA
37. จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร x 10 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Corning Incorporation, USA
38. ถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (tissue culture plate 24 well) ยี่ห้อ NUNC™ , Denmark
39. ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well) ยี่ห้อ NUNC™ , Denmark
40. Cane ใส่หลอดเก็บเซลล์

41. ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) รุ่น 34 HC ยี่ห้อ Taylor-Wharton
42. หัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
43. ปีกเกอร์
44. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
45. หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Corning Incorporation, USA
46. เครื่องปั๊มอากาศ (air pump)
47. ทิปปลอดอาร์เอ็นเอส (RNase-free tip) ปริมาตร 2 , 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
48. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
49. พาราฟิล์ม (Parafilm)
50. กระบอกตวง (cylinder)
51. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
52. หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
53. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, USA
54. เครื่องดูดจากปิเปตต์ (Pipette aid) ยี่ห้อ Drummond
55. พลาสติกใส (Wrap membrane)
56. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane ของบริษัท Amersham Biosciences, UK

3.2 เคมีภัณฑ์

1. yeast extract ของบริษัท Difco Laboratories, USA
2. glucose ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. agarose gel ของบริษัท Prondisa, Spain
4. Sodium hydroxide (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany
5. Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
6. Acetic acid (glacial CH₃COOH) ของบริษัท E Merck, Germany
7. Glycerol ของบริษัท Carlo ERBA, France
8. Lithium acetate (LiAc) ของบริษัท Merck, Germany

9. carrier DNA ดีเอ็นเอที่มีมวลโมเลกุลสูง (Deoxyribonuclei acid Sodium salt Type III from salmon testes) ของบริษัท Sigma, USA
10. phenol ของบริษัท Merck, Germany
11. Polyethylene glycol (PEG) ของบริษัท Sigma, USA
12. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), (C₄H₁₁NO₃) ของบริษัท Sigma, USA
13. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂) ของบริษัท Sigma, USA
14. EGTA (Ethylene-bis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid tetrasodium) (C₁₄H₂₀N₂O₁₀Na₄) ของบริษัท Sigma, USA
15. Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
16. Potassium chloride (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
17. Potassium di-hydrogen phosphate (KH₂PO₄) ของบริษัท Merck, Germany
18. Sodium di-hydrogen phosphate (Na₂HPO₄) ของบริษัท Merck, Germany
19. Sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) ยี่ห้อ Anala® ของบริษัท BDH, UK
20. Trypsin-EDTA ของบริษัท Hyclone
21. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) ของบริษัท Hyclone
22. Sodium pyruvate ของบริษัท Hyclone
23. MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
24. DEPC (diethylpyrocarbonate) ของบริษัท Sigma, USA
25. Random hexamer ของบริษัท Fermentus, Canada
26. Ribonuclease inhibitor ของบริษัท Fermentus, Canada
27. HPLC water ของบริษัท Merck, Germany
28. Tag polymerase ของบริษัท Fermentus, Canada
29. M-MuLV reverse transcriptase ของบริษัท Fermentus, Canada
30. dNTP mix ของบริษัท Fermentus, Canada
31. SDS (sodium dodecyl sulfate), (C₁₂H₂₅OSO₃) ของบริษัท Sigma, USA
32. Tween20 ของบริษัท Sigma, USA
33. Cycloheximide ของบริษัท Sigma, USA
34. α -factor ของบริษัท Sigma, USA

35. เอนไซม์ตัดจำเพาะทุกชนิดของบริษัท New England Biolabs, UK
36. 100 bp และ 1 kb DNA ladder ของบริษัท Fermentas, USA
37. Phusion polymerase ของบริษัท New England Biolabs, UK
38. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, UK
39. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA
40. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA Absolute alcohol ของบริษัท Merck, Germany
41. Isopropanol ของบริษัท Merck, Germany
42. Protease inhibitor ของบริษัท Sigma, USA
43. Buffer A สำหรับสกัดโปรตีน (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
44. Buffer B สำหรับสกัดโปรตีน (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
45. Chloroform ของบริษัท Lab-scan, Thailand
46. Acrylamide/Bisacrylamide 40% solution ของบริษัท Sigma, USA
47. TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylenediamide) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
48. Amonium persulfate ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
49. β -mercapto-ethanol ของบริษัท Sigma, USA
50. Dithiothreitol (DTT) ของบริษัท USB corporation, USA
51. ECL western blotting ของบริษัท Amersham biosciences, UK
52. Absolute methanol ของบริษัท Merck, Germany
53. Tris buffer pH 8.8 (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข)
54. Tris buffer pH 6.8 (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข)
55. Prestain molecular weight marker ของบริษัท Fermentus, Canada
56. Bromphenol blue ของบริษัท Sigma, USA
57. น้ำยาล้างฟิล์ม ของบริษัทเจเนเซน
58. Fetal Bovine Serum (FBS) ของบริษัท Hyclone
59. อาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI 1640) ของบริษัท Hyclone
60. อาหารเลี้ยงเซลล์ (MEM) ของบริษัท Hyclone
61. BCATM protein assay ของบริษัท PIERCE
62. Dimethylsulfoxide (DMSO) ของบริษัท Sigma, USA
63. Trypan blue 0.5%w/v ของบริษัท Biochrom AG, Germany

64. Rabbit anti-c-myc; catalog# sc-789 (A-14) ของบริษัท Sata cruz Biotechnology
 65. Rabbit anti-p-Cdc2; catalog# sc-7989 (Tyr15) ของบริษัท Sata cruz Biotechnology
 66. Rabbit anti-Cdc2; catalog# sc-53 (PSTAIRE) ของบริษัท Sata cruz Biotechnology
 67. Donkey anti-rabbit IgG-HRP ของบริษัท Amersham biosciences, UK
 68. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
 69. ชุดไลเกชันคิต Rapid DNA Ligation Kit ของบริษัท Fermentas, USA
 70. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE, USA
 71. น้ำยา real-time PCR LightCycler^R 480 SYBR Green I Master ของบริษัท Roche, Germany

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 ยีสต์

รายละเอียดของยีสต์ที่ใช้ในการทดลองได้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สายพันธุ์ยีสต์	จีโนมไทป์/ ฟีนোটป์	เอกสารอ้างอิง/ แหล่งที่มา
W303	<i>trp1-1 leu2-3 ade2-1 ura3-1 112 his3-11 can1-100</i>	R. Rothstein
$\Delta zds1$	เหมือนกับ W303 ยกเว้น <i>zds1::TRP1 syr1::HIS3 pdr1::hisG-URA3-hisG pdr3::hisG-URA3-hisG</i>	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima University; YNS17 (Chanklan และคณะ, 2008)
$\Delta hsl1$	เหมือนกับ W303 ยกเว้น <i>hsl1::URA3</i>	สร้างในงานวิจัยนี้
$\Delta mih1$	เหมือนกับ W303 ยกเว้น <i>mih1::URA3</i>	สร้างในงานวิจัยนี้
<i>swe1::GAL1p-SWE1</i>	เหมือนกับ W303 ยกเว้น <i>TRP1 swe1::GAL-SWE1-HA::LEU2 TRP1 syr1::HIS3 pdr1::hisG-URA3-hisG pdr3::hisG-URA3-hisG</i>	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima University;

		YRC2 (Chanklan และคณะ, 2008)
$\Delta zds1$ <i>swe1-MYC</i>	เหมือนกับ W303 ยกเว้น <i>swe1::HIS3::SWE1-9xmyc::URA3 CLN2-3xHA::LEU zds1::Gen^f erg3::HIS3 pdr1::hisG pdr3::hisG TRP1</i>	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima University; YRC3 (Chanklan และคณะ, 2008)

3.4 เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

รายละเอียดของเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลองได้แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ชนิดเซลล์ไลน์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ชนิดเซลล์ไลน์ (cell line)	รหัส (ATCC number)
Jurkat (Human acute T cell leukemia)	CRL-2063
HL-60 (Human acute promyelocytic leukemia)	CCL-240
THP-1 (Human acute monocytic leukemia)	TIB-202
HepG2 (Human liver hepatoblastoma)	HB-8065
A375 (Human malignant melanoma)	CRL-1619
SW620 (Human colorectal adenocarcinoma)	CCL-227
KATO III (Human gastric carcinoma)	HTB-103
BT474 (Human breast ductal carcinoma)	HTB-20
MDA-MB-231 (Human breast adenocarcinoma)	HTB-26
HeLa (Human cervical adenocarcinoma)	CCL-2
Ca-Ski (Human cervical epidermoid carcinoma)	CRL-1550
SiHa (Human cervical squamous cell carcinoma)	HTB-35

3.5 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้

พลาสมิด	จีโนไทป์/ ฟีนไทป์	หมายเหตุ
pYES2	<i>Amp^R URA3</i>	บริษัท Invitrogen

ตารางที่ 3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	T _m (°C)	หมายเหตุ
Δ hsl1	Fwd: 5'-CTTTATTATTTGTTATTAATATTTTTTA TTTTTACCACACGACCATCGATAAGCTAGTT TTC-3' Rev: 5'-CAAATTATTGTTGTATAATTATATAAC ATCTATATAGAATTGCATTTACTTATAATACA G-3'	50	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
Δ mih1	Fwd: 5'-GAATATATACTTCTTTTTTTCATAATA CTTCATGCACATGTAGTACATCGATAAGCA GCTTTTC-3' Rev: 5'-GTGGACAAACCAGGATTGAAGTCA GCGAGGGTGAAGAAACCTGCATTTACTTAT AATACAG-3'	57	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (amplify gene)
pYES2_ FW	Fwd: 5'-GTATTGTTAGCGGTTTGAAG-3'	52	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confrim disruption)
hsl1_ FW	Fwd: 5'-CAACCAACTATATTTCACTCC-3'	51	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confrim disruption)
mih1_ FW	Fwd: 5'-CATAATACTTCATGCACATGTAG-3'	51	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confrim disruption)
hsl1_ Rev	Rev: 5'-CAAATTATTGTTGTATAATTATATAAC	50	ออกแบบในงานวิจัยนี้

RV-30	ATC-3'		(confrim disruption)
ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	T_m(°C)	หมายเหตุ
mih1_ RV-30	Rev: 5'-GACAAACCAGGATTGAAGTC-3'	52	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confrim disruption)
hsl1_ RV-500	Rev: 5'-CTGGAACAAGGATTTTAAGC-3'	51	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confrim disruption)
mih1_ RV-500	Rev: 5'-CATCGTACAAAAGCAAGAGG-3'	52	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (confrim disruption)
SWE1	Fwd: 5'-AGTGTTCATTGTCATAGCGT-3' Rev: 5'-AAATAGAGAGCTAACAAACAGTTTA C-3'	55	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (real time RT-PCR)
ACT1	Fwd: 5'-TGAAGCTCCAATGAACCCT-3' Rev: 5'-AACACCATCACCGGAAT-3'	55	ออกแบบในงานวิจัยนี้ (real time RT-PCR)

3.6 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต

แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอตที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.5

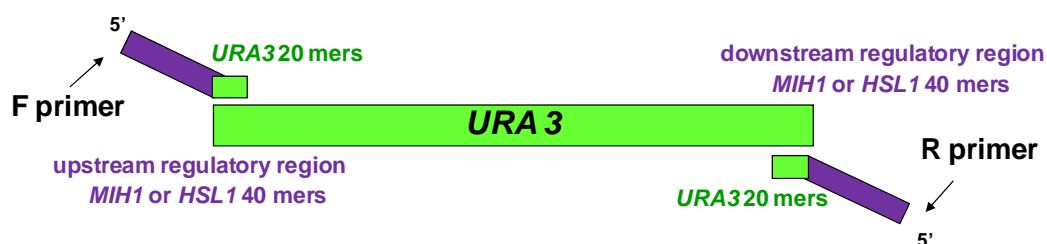
ตารางที่ 3.5 แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต

แอนติเจน	อัตราส่วนแอนติบอดีปฐมภูมิต่อ Blocking solution	อัตราส่วนแอนติบอดีทุติยภูมิต่อ Blocking solution
Swe1-myc	Rabbit anti-c-myc 1:500	Donkey anti-rabbit IgG-HRP 1:4,000
p-Cdc2	Rabbit anti-p-Cdc2 1:1000	Donkey anti-rabbit IgG-HRP 1:4,000
Cdc2	Rabbit anti-Cdc2 1:1000	Donkey anti-rabbit IgG-HRP 1:4,000

3.7 สร้างยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mih1$ และ $\Delta hsl1$ โดยวิธีการทำลายยีน

3.7.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *URA3* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำพลาสมิด pYES2 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ โดยออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* ขนาด 20 mers โดยด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์ประกอบด้วย upstream regulatory region ของยีน *MIH1* หรือ *HSL1* ขนาด 40 mers และรีเวิร์สไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *URA3* ขนาด 20 mers โดยด้านปลาย 5' ของไพรเมอร์ประกอบด้วย downstream regulatory region ของยีน *MIH1* หรือ *HSL1* ขนาด 40 mers เพื่อสามารถแทนที่ตำแหน่งยีน *MIH1* หรือ *HSL1* ในโครโมโซมของยีสต์ได้ (Wendland, 2003) โดยใช้ภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังตารางที่ 3.6



ภาพที่ 3.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

ตารางที่ 3.6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Phusion HF 5x Buffer	5 เท่า	10 ไมโครลิตร	1 เท่า
dNPT mix	25 มิลลิโมลาร์	0.4 ไมโครลิตร	200 ไมโครโมลาร์
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	10 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
รีเวิร์สไพรเมอร์	10 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
Phusion DNA polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.2 ไมโครลิตร	1 ยูนิต
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		33.9 ไมโครลิตร	
พลาสมิด pYES2		0.5 ไมโครลิตร	
ปริมาตรสุทธิ		50 ไมโครลิตร	

โดยใช้ภาวะของปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 15 นาที; 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที; 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที; 72 องศาเซลเซียส 1 นาที; 35 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์ที่ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสร้อยละ 1 ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE (ภาคผนวก ข) เกล่งในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางขึ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทปบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับดีดีตาม (ภาคผนวก ข) ให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอหรือหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส Mupid ตั้งความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมไฟีนอลบลูเคลื่อนลงมาจนเกือบสุดของอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA)

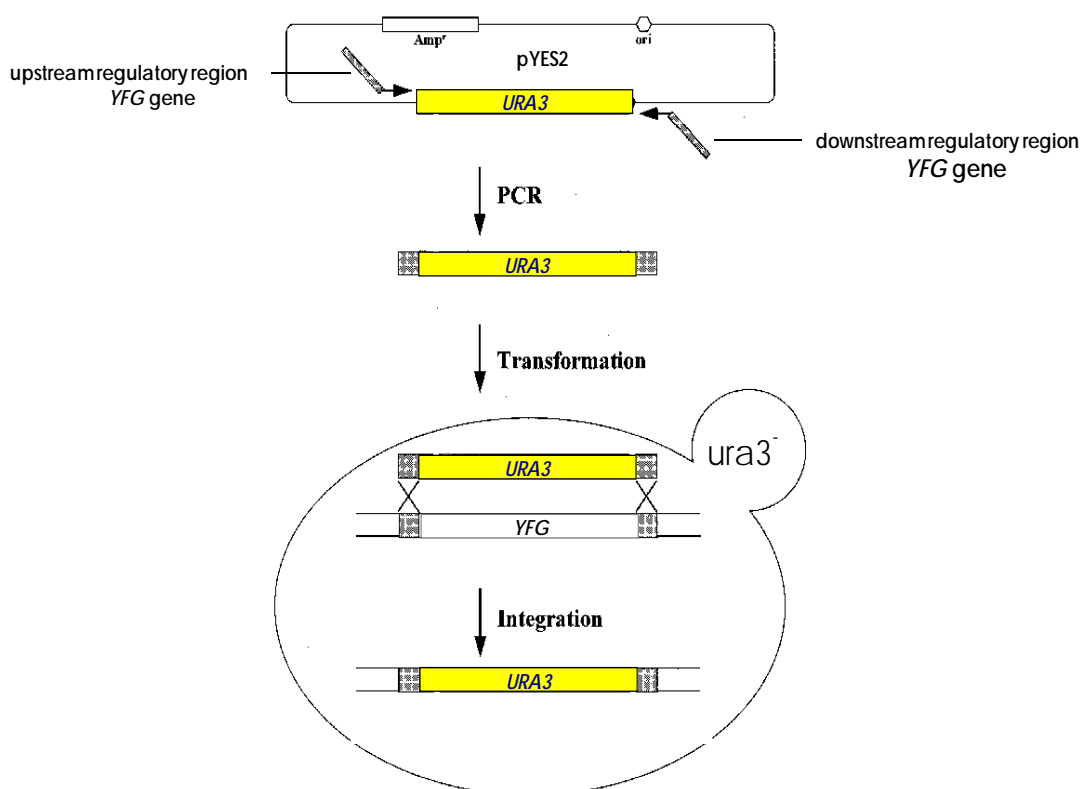
3.7.2 ทำผลิตภัณฑ์ถูกใช้พอลิเมอร์ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

สกัดผลิตภัณฑ์จากอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดสกัดพลาสมิดออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยตัดชิ้นอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล (น้ำหนักอะกาโรสเจล 100 มิลลิกรัม มีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายจนหมด นำส่วนสารละลายที่เหลือใส่ลงใน QIAquick spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใส่ทิ้งก่อนที่จะหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใส่ที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิพจี้ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส

3.7.3 ทรานสฟอร์มผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 3.5.2 เข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ W303-1A

นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 3.5.2 มาชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ W303-1A ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) (Gietz และคณะ, 1995) โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ W303-1A ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสข้ามคืน (16-20 ชั่วโมง) จากนั้นถ่ายเชื้อใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD 50 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยเป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเป็น 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิวค์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีอีกครั้งเพื่อแยกเซลล์ เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง จากนั้นเติม 0.1 โมลาร์ LiAc ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และถ่ายใส่หลอดไมโครพิวค์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วย LiAc ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ระหว่างที่ปั่นแยกเซลล์ให้บ่ม carrier DNA (ภาคผนวก ข) ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการแช่ในน้ำแข็งทันที ถ่ายเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ใส่หลอดไมโครพิวค์หลอดละ 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ที่ได้โดยการเติมร้อยละ 50 ของ PEG (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 240 ไมโครลิตร, LiAc เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 36 ไมโครลิตร, carrier DNA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตรและดีเอ็นเอที่ต้องการ ชักนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามลำดับผสมเข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และ heat shock ที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีตามลำดับ นำมาปั่นเพื่อแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที แล้วดูดส่วนน้ำใสออก ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำเซลล์มาเกลี่ยในอาหาร synthetic complete (SC) medium ที่ขาดยูราซิล (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับยีน *URA3* จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 วัน ซึ่งทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 3.5.2 เข้าไปแทรกแทนที่ยีนที่ต้องการ ทำลายในโครโมโซมอยู่จริง จึงได้ทำปฏิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอยีสต์ W303-1A เป็นชุดควบคุมผลบวก

และผลลบตามลำดับ และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามวิธีที่ได้กล่าวในข้อ 3.7.1 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.1



YFG : your favorite gene

ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการทำลายยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.8 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของพิโนสโทรบินในการยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์

3.8.1 การตรวจสอบผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อ Hsl1 หรือ Mih1

3.8.1.1 กรณีอาหารแข็ง

นำยีสต์สายพันธุ์กลาย ($\Delta hsl1$) หรือ ($\Delta mih1$) ที่ได้จากข้อ 3.5.3 มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง YPAUD และนำไปป่มในตู้ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD แล้วป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง exponential phase ($2-5 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เตรียม YPAUD soft agar (ร้อยละ 0.7) ปริมาณ 8 มิลลิลิตรต่อหลอด ที่ทำการหลอมจนเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นนับเซลล์เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ เติมเซลล์แขวนลอยใส่อาหาร YPAUD soft agar โดยให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายของยีสต์สายพันธุ์กลาย เป็น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย CaCl_2 โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยมีค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ CaCl_2 เป็น 300 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม เทราดลงบนจานเพาะเชื้อ แล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ปราศจากเชื้อ จากนั้นหยดพิโนสโทรบินที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรตามลำดับ โดยมี FK506 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง calcineurin ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตรและเอทานอลปริมาตร 5 ไมโครลิตรเป็นสารควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการเจริญของยีสต์

3.8.1.2 กรณีอาหารเหลว

นำยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta hsl1$ หรือ $\Delta mih1$ ที่ได้จากข้อ 3.5.3 มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง YPAUD และนำไปป่มในตู้ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD แล้วป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early log phase ($0.5-1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 50

มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิวค์ นำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อ ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร และเติมพิโนสโทรบินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้สาร FK506 ความเข้มข้น 500 นาโนโมลาร์และร้อยละ 1.5 ของ DMSO เป็นชุดควบคุมผลบวกและชุดควบคุมผลลบตามลำดับ จากนั้นจึงเติม CaCl_2 ความเข้มข้น 4 โมลาร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 มิลลิโมลาร์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการนับเซลล์ทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 14 ชั่วโมงนับเซลล์เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์

3.8.2 การตรวจสอบผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อ Swe1

3.8.2.1 กรณีอาหารแข็ง

นำยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC2 มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง YPAUD และนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง exponential phase ($2-5 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เตรียม YPGalactose soft agar (ร้อยละ 0.7) ปริมาตร 8 มิลลิลิตรต่อหลอด ที่ทำการหลอมจนเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นับเซลล์เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ เติมเซลล์แขวนลอยใส่อาหาร YPGalactose soft agar โดยให้มีความหนาแน่นเซลล์สุดท้ายของยีสต์สายพันธุ์กลาย เป็น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม เทราดลงบนจานเพาะเชื้อ แล้วทิ้งไว้ให้แข็งในตู้ปราศจากเชื้อ จากนั้นหยดพิโนสโทรบินที่ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรตามลำดับ โดยมี Radicol ซึ่งเป็นสารยับยั้งโปรตีน Swe1 (Chanklan และคณะ, 2008) ความเข้มข้น 500 นาโนโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตรและเอทานอลปริมาตร 5 ไมโครลิตรเป็นสารควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการเจริญของยีสต์

3.8.2.2 กรณีอาหารเหลว

นำยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC2 มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง YPAUD และนำไปป่มในตู้ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD แล้วป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early log phase ($0.5-1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิวค์ นำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อ ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YP ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตรและเติมฟิโนสโทรบินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 3 มิลลิโมลาร์ป่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้สาร Radicol ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์และร้อยละ 1.5 ของ DMSO เป็นชุดควบคุมผลบวกและชุดควบคุมผลลบตามลำดับ จากนั้นจึงเติมน้ำตาลกาแลคโตส ความเข้มข้นร้อยละ 20 (w/v) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 1 แล้วป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ ทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์

3.9 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายของวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

3.9.1 การสกัดโปรตีนสำหรับวิเคราะห์โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

นำยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC3 มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง YPAUD และนำไปป่มในตู้ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD 50 มิลลิลิตร แล้วป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อ

นาที่ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early log phase ($0.5-1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิวค์ นำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออก และละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อ ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตรและเติมฟิโนสโทรบินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ร้อยละ 0.5 ของ DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ จากนั้นจึงเติม CaCl_2 ความเข้มข้น 4 โมลาร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 1 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง โดยถ่ายลงหลอดไมโครพิวค์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ใช้หัวเคาะหลอดไมโครเซนตริฟิวส์เบาๆ ให้ตะกอนเซลล์กระจาย ปั่นล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ปั่นล้างด้วย buffer A (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง เติม buffer B (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20-80 ไมโครลิตรทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.9.2 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ชุดทดสอบ BCATM protein assay kit ของบริษัท PIERCE ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้ เตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน A:B = 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA และสารตัวอย่าง โดยทำการเจือจางสารมาตรฐาน BSA 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุในภาตเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ซึ่งจะเจือจางลง 2 เท่าด้วยน้ำปลอดประจุทำให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0 31.25 62.5 125 250 500 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเข้มข้น 1:10 จำนวน 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ (ทำสองหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง)

เติม working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่างหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่ากรดแล็กติกเซลล์ 96 หลุม เบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำกรดแล็กติกเซลล์ 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง microplate reader

3.9.3 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมเจล SDS-polyacrylamide gel ขนาด 8.3x8.3 เซนติเมตร หนา 1.5 มิลลิเมตร โดย separating gel และ stacking gel ใช้ acrylamide ความเข้มข้น 7.5-12% และ 5% ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) เตรียมตัวอย่างทดสอบปริมาณ 50 ไมโครกรัม โดยปรับให้มีปริมาตร 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ เติม staining buffer 10 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน หยอดสารละลายโปรตีนแต่ละตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในช่อง SDS-polyacrylamide gel ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที ใน Western blot running buffer (ภาคผนวก ข) โดยใช้ชุดเครื่องมือ Protein III System ของบริษัท Bio-Rad, USA

3.9.4 การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane

หลังจากแยกโปรตีนด้วยวิธีข้างต้นแล้ว ตัดบริเวณ stacking gel ที่ วัดขนาดของเจล นำเจลไปแช่ใน transfer buffer (ภาคผนวก ข) วางบนเครื่องเขย่าประมาณ 5 นาที ตัดกระดาษกรองและ PVDF membrane ให้มีขนาดเท่ากับเจลจำนวน 6 แผ่น และ 1 แผ่นตามลำดับ นำแผ่น PVDF membrane แช่ในเมทานอลสัมบูรณ์ (absolute methanol) ให้ชุ่มทั่วทั้งแผ่น ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ 2 ครั้ง แล้วนำมาแช่ใน transfer buffer จากนั้นนำกระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น PVDF membrane เจล และ กระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น วางบนเครื่อง Semi-dry transfer apparatus ตามลำดับ ทำการไล่ฟองอากาศโดยกึ่งหลอดแก้วบนกระดาษกรองและ PVDF membrane เบาๆ 3 ครั้งไปในทิศทางเดียวกัน หยด transfer buffer ปริมาตรเพียงเล็กน้อย ปิดฝาเครื่อง semi-dry Western blot ทำการส่งถ่ายโปรตีน

จากเจลไปยัง PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 80 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาที ต่อ เจลหนึ่งแผ่น

3.9.5 การวิเคราะห์การแสดงผลโดยวิธีเวสเทิร์นบลอตโดยใช้แอนติบอดีที่ จำเพาะต่อ c-myc, p-Cdc2 และ Cdc2

ปิดสวิทช์ power supply ของเครื่อง semi-dry Western blot จากนั้นเปิดฝา เครื่องแกะ PVDF membrane มาแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง นำมาแช่ในแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบซึ่งเจือ จางใน blocking solution (ภาคผนวก ข) ตามตารางที่ 3.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที เทแอนติบอดีปฐม ภูมิใส่ในหลอดทดลองล้าง PVDF membrane ด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 2 ครั้ง เท PBST ที่เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่มี Horse-radish peroxidase ติด ฉากอยู่ ซึ่งเจือจางใน blocking solution ตามตารางที่ 3.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางบนเครื่อง เขย่าเป็นเวลา 60 นาที ล้าง PVDF membrane ด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 3 ครั้ง

3.9.6 การตรวจสัญญาณด้วยวิธี chemiluminescence และ การทำให้เกิดสัญญาณ บนแผ่นฟิล์ม X-ray

เตรียมซัสเตรตของ Horse-radish peroxidase โดยใช้ ECL Western Blot Reagent โดยผสมรีเอเจนต์ 1 กับ รีเอเจนต์ 2 ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) นำ PVDF membrane แช่ลง ไปในซัสเตรต นาน 1 นาที ใช้ปากคีบคีบเมมเบรนวางลงบนพลาสติกใส (wrap membrane) และปิดทับเมมเบรน ใช้กรรไกรตัดพลาสติกใสให้ห่างจากเมมเบรนเล็กน้อย นำไปวางบนถาด ประกอบฟิล์ม ใช้เทปกาวติดทั้งสี่มุม ปิดฝาถาด นำไปประกอบฟิล์ม X-ray และล้างฟิล์ม X-ray ใน ห้องมืด

3.10 ผลของพิโนสโทรบินต่อความเสถียรของโปรตีนเป้าหมายของวิธีการส่งสัญญาณของ แคลเซียม ในเซลล์ยีสต์โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

นำยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC3 มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง YPAUD และนำไปบ่มในตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD 50 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็น เวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early log phase ($0.5-1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิพซ์ นำไปปั่น แยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออกและละลาย ตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อ ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ แขวนลอยให้เป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตรและ เติมพิโนสโทรบินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ร้อยละ 0.5 ของ DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบตามลำดับ จากนั้นจึงเติม CaCl_2 ความ เข้มข้น 4 โมลาร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์พร้อมกับเติมไซโคลเฮกซีไมด์ความ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 15 นาทีเป็นเวลา 75 นาที จากนั้นสกัด โปรตีน และตรวจสอบผลตามวิธีดังข้อที่ 3.9.1-3.9.6

3.11 ผลของพิโนสโทรบินต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายในวิธีการส่งสัญญาณของ แคลเซียม ในเซลล์ยีสต์โดยวิธี real-time reverse transcription-PCR

3.11.1 การสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

สกัด RNA ด้วยชุดสกัด RNA MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit (EPICENTRE, USA) โดยนำยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC3 มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง YPAUD และ นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร เหลว YPAUD 50 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early

log phase ($0.5-1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นจึงเติม α -factor ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลานาน 160 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อ ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง และเทส่วนน้ำใสออกและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตรและเติมพิโนสโตรบินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ร้อยละ 0.5 ของ DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ จากนั้นจึงเติม CaCl_2 ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 15 นาทีเป็นเวลานาน 150 นาที โดยถ่ายลงหลอดไมโครพิวจ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ใช้หัวเคาะหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เบาๆ ให้ตะกอนเซลล์กระจาย ปั่นล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อปลอด RNAase ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 2 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง เติม Extraction Reagent for RNA 300 ไมโครลิตร ที่ผสม Proteinase K 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารนาน 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม MPC 175 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanal 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายทิ้ง เติม DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที เติม 2XT&C 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง เติม MPC 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 60 ครั้ง ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายทิ้ง เติมร้อยละ 70 เอทานอล ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาที

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำ DEPC 20 ไมโครลิตรที่ผสม RNAase inhibitor 0.57 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.11.2 การวัดปริมาณ RNA

เจือจางสารละลาย RNA ที่สกัดได้ 50 เท่า ด้วยน้ำปลอดประจุปลอด RNAase โดยปิเปตต์สารละลาย RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในน้ำปลอดประจุปลอด RNA ปริมาตร 98 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้ น้ำปลอดประจุปลอด RNA เป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) คำนวณหาค่าความเข้มข้นของ RNA จากสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณ RNA (ไมโครกรัมต่อลิตร)} = A_{260} \times 40 \times \text{dilution factor}$$

เมื่อกำหนดให้

A_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

RNA 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 (Ausubel และคณะ, 1999) ความบริสุทธิ์ของ RNA คำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามี DNA ปนเปื้อนสูง

3.11.3 การสังเคราะห์คอมพลีเมนต์เอ (cDNA) โดยรีเวอร์สทรานสคริปเทส

ใช้ RNA ตัวอย่างที่เตรียมได้ตามข้อ 3.11.1 จำนวน 1 ไมโครกรัมต่อปฏิกิริยาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์คอมพลีเมนต์เอโดยใส่ในหลอดพีซีอาร์ จากนั้นเติม random hexamer ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอด RNAase จนปริมาตรครบ 12.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารและปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกลงที่ก้นหลอดพีซีอาร์ประมาณ 2-3 วินาที นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler; Perkin Elmer, USA) โดยตั้งอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำมาเติม 5X Reverse Transcriptase buffer ปริมาตร 4

ไมโครลิตร dNPT mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Ribonuclease inhibitor ความเข้มข้น 40 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสาร และปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกลงที่ก้นหลอดพีซีอาร์ประมาณ 2-3 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติม Reverse Transcriptase ความเข้มข้น 200 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เก็บรักษาคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันต่อไป

3.11.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

ดำเนินปฏิกิริยา Real time RT-PCR โดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอจากข้อ 3.11.3 เป็นต้นแบบ ในปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์ ACT1 และ SWE1 ตามตารางที่ 3.4 โดยมี ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (RT-PCR)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
SYBR Green I Master Mix	2 เท่า	5 ไมโครลิตร	1 เท่า
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	10 ไมโครโมลาร์	0.25 ไมโครลิตร	0.25 ไมโครโมลาร์
รีเวิร์สไพรเมอร์	10 ไมโครโมลาร์	0.25 ไมโครลิตร	0.25 ไมโครโมลาร์
คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ	1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร	1 ไมโครกรัม
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		3.5 ไมโครลิตร	
ปริมาตรสุทธิ		10 ไมโครลิตร	

และดำเนินภาวะการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

Pre-incubation 1 รอบ

Amplification 45 รอบ

Melting 1 รอบ

Cooling 1 รอบ

Pre-incubation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที
Amplification	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	10 วินาที
	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	15 วินาที
	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	20 วินาที
Melting	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	5 วินาที
	ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส	1 นาที
	ที่อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส	continuous
Cooling	ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	10 วินาที

ดำเนินการปฏิกิริยาถูกใช้พอร์ลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (LightCycler^R 480 Multiwell Plate96, Roche) ตามภาวะการทำปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอร์ลิเมอเรสด้วยโปรแกรม LightCycler^R 480 software, Roche และคำนวณค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Version16.0) ด้วยค่า $P \leq 0.05$ และ 0.001

3.12 ผลของฟินอสโตรบินต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ โดยวิธี MTT proliferation assay

3.12.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

นำเซลล์มะเร็งทั้ง 12 ชนิด (HepG2, SW620, KATO III, A375, BT474, MDA-MB-231, HeLa, Ca-Ski, SiHa, THP-1, HL-60 และ Jurkat) ซึ่งแช่แข็งอยู่ในถังไนโตรเจนเหลว ออกมาเลี้ยง โดยแช่หลอดเก็บเซลล์ในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียสทันที แก้วหลอดไปมาให้ น้ำแข็งละลายอย่างรวดเร็ว โดยให้รอยต่อของฝาหลอดอยู่เหนือระดับน้ำเสมอ เช็ดหลอดด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 ใช้ปิเปตต์แก้วดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (serum free media) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มี fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ของHEPES ความเข้มข้นร้อยละ 1 ของโซเดียมไพลูเวทความเข้มข้นร้อยละ 1 ของเพนนิซิลินจีความเข้มข้น 10^4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

สเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ complete media ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์แก้วดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นดูดใส่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ตรวจดูสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ นำไปบ่มให้เซลล์เจริญในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO₂ 5% ตรวจดูสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับทุกวัน เมื่อเซลล์เจริญหนาแน่นทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน (กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์, 2547) ดังนี้

3.12.2 การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เกาะผิว (HepG2, SW620, KATO III, A375, BT474, MDA-MB-231, HeLa, Ca-Ski และ SiHa) ด้วยทริปซิน

ใช้ปิเปตต์แก้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS (ปลอด Ca²⁺ และ Mg²⁺) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ทั่วผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ 5-6 ครั้งแล้วดูดทิ้ง เติม trypsin-EDTA ความเข้มข้น 0.25% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนานประมาณ 3-5 นาที (ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์) สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์เริ่มหดตัวจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมปริมาตร 5 มิลลิลิตรและดูดสารละลายเซลล์ให้หลุดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นดูดใส่หลอดเซนตริฟิวจ์นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม complete media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเบาๆ ดูดเซลล์ใส่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ขวดใหม่ เพื่อเพิ่มจำนวนหรือนำไปใช้ในการทดลองต่อไป หรือนำกลับไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ การนำไปใช้ต่อไป หรือถ้าต้องการเลี้ยงในภาชนะเดิมหลังจากเซลล์ให้หลุดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ แล้วให้เหลือเซลล์ไว้ประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม complete media ให้มีปริมาตรครบ 8 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO₂ 5% ต่อไป

3.12.3 การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (THP-1, Jurkat และ HL-60)

ใช้ปิเปตต์แก้วดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ที่จับกลุ่มเป็นก้อนให้หลุดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ ดูดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม complete media ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเบาๆ ดูดเซลล์ใส่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนหรือ

นำไปใช้ในการทดลองต่อไป หรือนำกลับไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การนำไปใช้ต่อไป หรือถ้าต้องการเลี้ยงในภาชนะเดิมให้ใช้ปิเปตต์แก้วดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง ดูดทิ้ง โดยเหลือสารละลายไว้ประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม complete media ให้มีปริมาตรครบ 8 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสบรรยากาศ CO₂ 5% ต่อไป

3.12.4 การเก็บรักษาเซลล์แบบระยะยาวในไนโตรเจนเหลว

นำหลอดเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการปั่นในข้อ 3.12.2 และ 3.12.3 มาเทส่วนใส่ทิ้งและใช้นิวเคาะหลอดเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัว เติมอาหารสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็งปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) ดูดขึ้นลงเบาๆ แล้วดูดใส่ในหลอดเก็บเซลล์แช่เยือกแข็ง (cryotube) เก็บในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส นาน 1 วันแล้วนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

3.12.5 การนับจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่มีชีวิต โดยย้อมด้วยสี trypan blue

นำหลอดเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการปั่นในข้อ 3.12.2 และ 3.12.3 มาเทส่วนใส่ทิ้งและใช้นิวเคาะหลอดเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัว เติม complete media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆ ปิเปตต์เซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม Trypan blue ความเข้มข้น 0.5%(w/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปตต์เซลล์ปริมาตร 11 ไมโครลิตรลงตรงช่องว่างระหว่างตัวฮีมาไซโทมิเตอร์กับกระจกปิดสไลด์ นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับโดยนับเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ 1 มุม (16 ช่องเล็ก) และคำนวณจำนวนเซลล์ตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/มิลลิลิตร)} = (\text{จำนวนเซลล์ไม่ติดสี trypan blue ทั้งหมด} / 4) \times 10^4 \times 2$$

3.12.6 ศึกษาผลของฟินอสโทรบินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 12 ชนิด โดยวิธี MTT proliferation assay

เตรียมเซลล์ HepG2, SW620, KATO III, A375, BT474, MDA-MB-231, HeLa, Ca-Ski และ SiHa ความเข้มข้น 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยอดลงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สำหรับเซลล์เกาะผิว นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 5% นาน 18 ชั่วโมง ยกเว้นเซลล์ HepG2, BT474, HeLa, Ca-Ski และ SiHa ที่ใช้นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ผสมฟินอสโทรบินที่ความเข้มข้นต่างๆซึ่งละลายใน DMSO 100% ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปแทน นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 5% นาน 4 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ส่วนเซลล์ THP-1, HL-60 และ Jurkat เตรียมให้มีความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยอดลงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมฟินอสโทรบินที่ความเข้มข้นต่างๆซึ่งละลายใน DMSO 100% ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไป นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 5% นาน 4 วัน ในวันที่ 4 เติม MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Mosmann, 1983) ซึ่งละลายใน PBS ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 5% นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม HCl ความเข้มข้น 0.04 นอร์มัลไนไฮโซโพรพานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมโดยใช้ปิเปตต์หลายช่อง (multi channel pipette) ดูดขึ้นลงให้ตะกอนสีม่วงละลายจนหมด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (%viability) โดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\%Viability = \frac{(OD_{\text{test average}} - OD_{\text{blank average}}) \times 100}{OD_{\text{control cell average}} - OD_{\text{blank average}}}$$

ODtest average = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่เติมฟินอสโทรบิน หรือ DMSO

ODcontrol cell average = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์

ODblank average = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

บทที่ 4

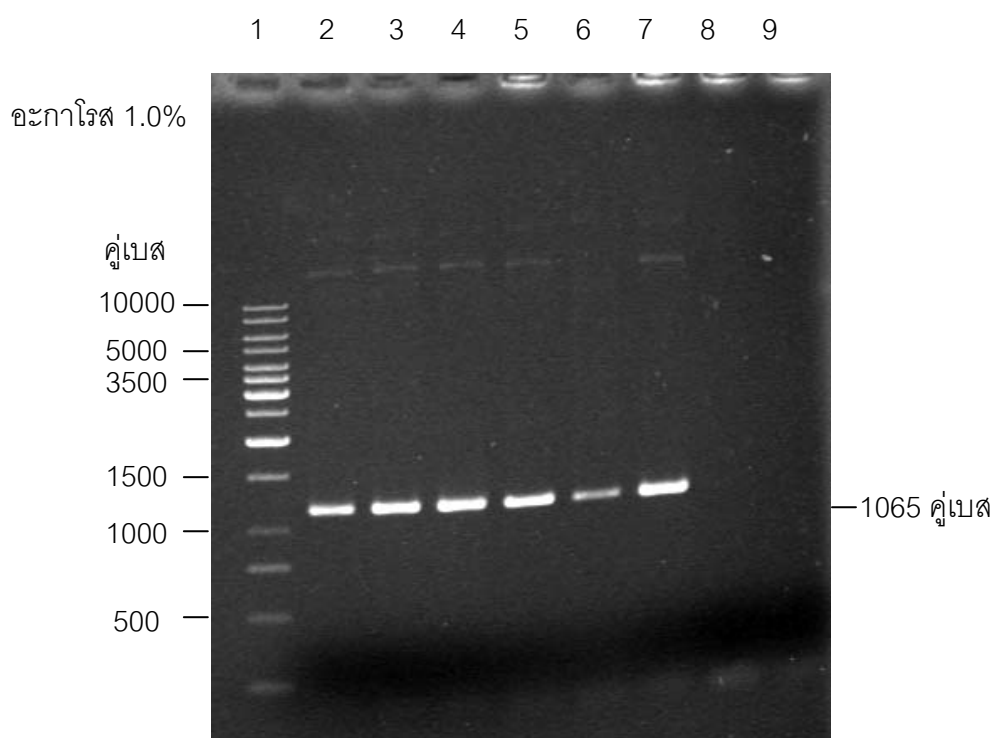
ผลการทดลอง

จากผลงานวิจัยของวชิรศักดิ์ วังกังวาน (2550) ซึ่งศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นถึงโมเลกุลเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของพิโนสโทรบิน ในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์พบว่า พิโนสโทรบินไม่ได้ออกฤทธิ์โดยการลดระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ และไม่ได้ยับยั้งโปรตีน Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1 จึงคาดว่าอาจมีผลไปยับยั้งที่โมเลกุลเป้าหมายที่เหลือคือ Hsl1, Mih1 และ Swe1 ซึ่ง Mih1 เป็นโปรตีนฟอสฟาเทส (phosphatase) ส่วน Hsl1 และ Swe1 เป็นโปรตีนไคเนส ตามลำดับดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของพิโนสโทรบินในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์ โดยวิธีทางพันธุศาสตร์ของยีสต์ เพื่อศึกษาถึงผลของพิโนสโทรบินที่อาจมีผลไปกระตุ้นหรือยับยั้งโปรตีนเป้าหมายที่เหลือว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ซึ่งจะใชยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีการเพิ่มและลดการแสดงออกยีน

4.1 สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายโดยวิธีทำลายยีน (gene disruption) *HSL1* และ *MIH1*

4.1.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *URA3* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้พลาสมิด pYES2 เป็นต้นแบบในปฏิกิริยาโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ $\Delta hsl1_FW$ และ $\Delta hsl1_RV$ หรือ $\Delta mih1_FW$ และ $\Delta mih1_RV$ เพื่อทำลายยีน *HSL1* หรือ *MIH1* ตามลำดับ ดังตารางที่ 3.4 จากการตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้งสองชนิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส บนเจลอะกาโรสเข้มข้นร้อยละ 1.0 ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเท่ากันคือ 1065 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดของยีน *URA3* (ดังภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ผลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอร์ส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *URA3*

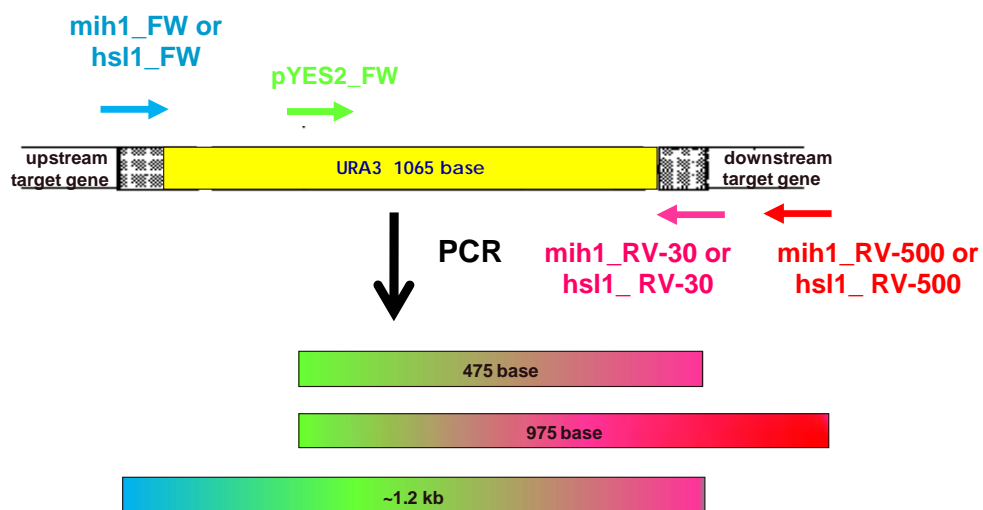
- 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder
- 2-4 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ $\Delta hsl1$
- 5-7 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ $\Delta mih1$
- 8 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ $\Delta hsl1$
- 9 คือ ชุดควบคุมผลลบของไพรเมอร์ $\Delta mih1$

4.1.2 ทรานสפור์มผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 4.1.1 เข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ W303-1A

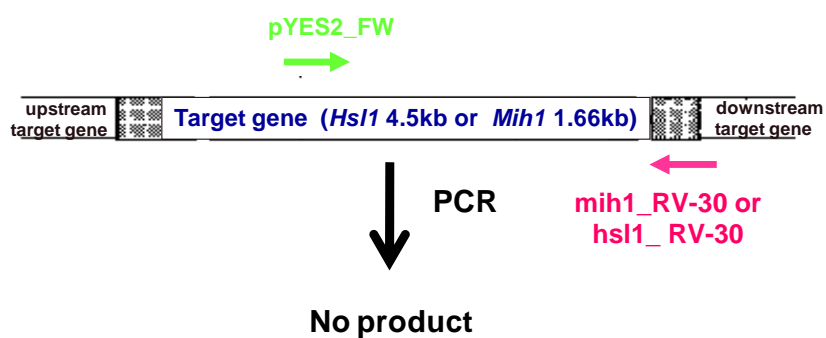
นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากข้อ 4.1.1 มาชักนำเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ W303-1A ด้วยวิธี Lithium acetate (LiAc) (Gietz และคณะ, 1995) และคัดเลือกทรานสפור์มแมนต์บน synthetic complete medium ที่ไม่เติมยูราซิล (SC-Ura) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ยืนยันผลการทำลายยีน ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ โดยไพรเมอร์คู่แรกออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ upstream regulatory region ของยีน *HSL1* หรือ *MIH1* (hsl1_FW หรือ mih1_FW) และรีเวิร์สไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ downstream regulatory region ของยีน *MIH1* หรือ *HSL1* ที่อยู่ปลายน้ำลงไป 30 mers (hsl1_RV-30 หรือ mih1_RV-30) ส่วนไพรเมอร์คู่ที่สองออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรโมเตอร์ยีน *URA3* (pYES2_FW) และรีเวิร์สไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ downstream regulatory region ของยีน *MIH1* หรือ *HSL1* ที่อยู่ปลายน้ำถัดลงไป 500 mers (hsl1_RV-500 หรือ mih1_RV-500) (ดังภาพที่ 4.2)

ตรวจสอบผลการทำลายยีนจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยถ้าหากทำลายยีน *Hsl1* หรือ *MIH1* ได้สำเร็จจะได้ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสทั้งหมด 3 ชิ้นซึ่งมีขนาด 475, 975 และ 1200 คู่เบส ตามลำดับ แต่ถ้าทำลายยีน *HSL1* หรือ *MIH1* ไม่สำเร็จ จะไม่สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ และจากผลการตรวจสอบ พบว่าสามารถทำลายยีนได้สำเร็จโดยสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดตามที่คาดไว้ (ดังภาพที่ 4.3)

ก.



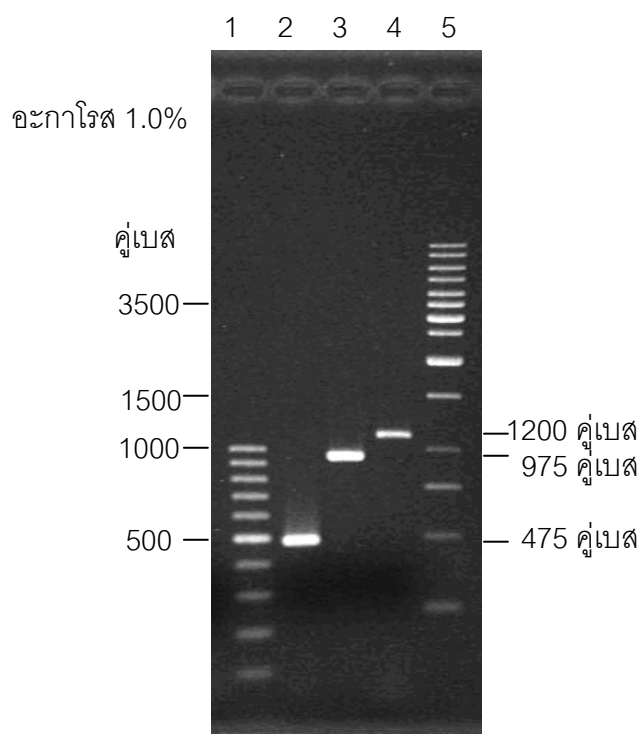
ข.



ภาพที่ 4.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการยืนยันผลการทำลายยีน

ก. กรณีทำลายยีนได้

ข. กรณีที่ทำลายยีนไม่ได้

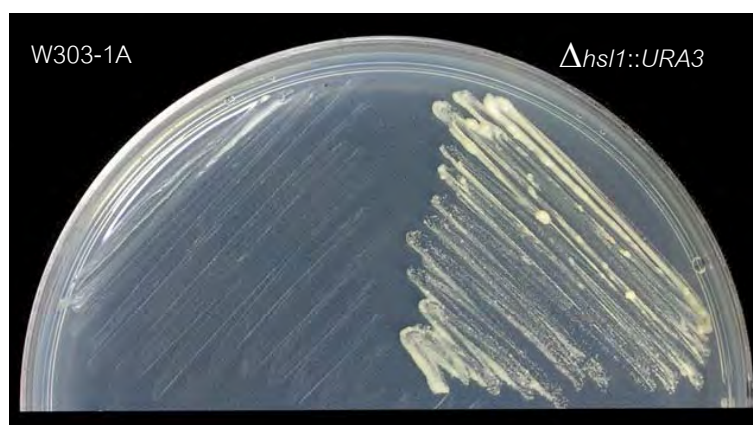


ภาพที่ 4.3 ผลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อยืนยันการทำลายยีน *MIH1*

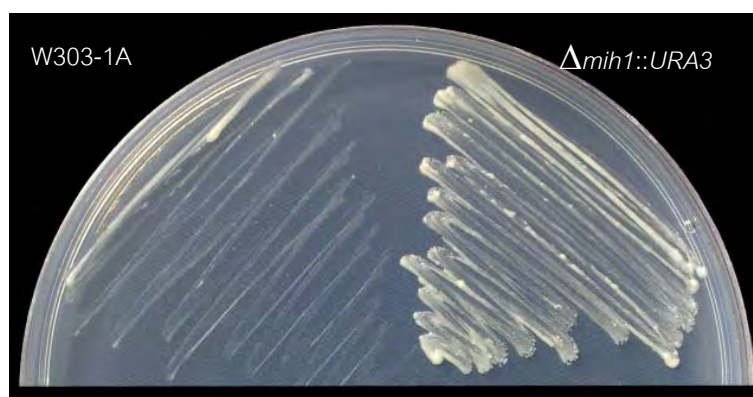
- 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder
- 5 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder
- 2 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ pYES2_FW และ mih1_RV-30
- 3 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ pYES2_FW และ mih1_RV-500
- 4 คือ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ mih1_FW และ mih1_RV-30

ดังนั้นจะได้ yeast disruptant สายพันธุ์ $\Delta hsl1::URA3$ และ $\Delta mih1::URA3$ ซึ่ง yeast disruptant ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมยูราซิล (ดังภาพที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่ายีน *URA3* ได้เข้าไปแทนที่ในโครโมโซมของยีสต์ดังกล่าวได้

ก.



ข.



ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะฟีโนไทป์ของ W303-1A ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมยูราซิล เมื่อยีน *URA3* ได้เข้าไปแทนที่ในโครโมโซมได้

- ก. ยีน *URA3* เข้าไปแทนที่ในโครโมโซมตรงตำแหน่งยีน *HSL1*
- ข. ยีน *URA3* เข้าไปแทนที่ในโครโมโซมตรงตำแหน่งยีน *MIH1*

4.2 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของพิโนสโทรบินในการยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์

วชิรศักดิ์ วังกังวาน (2550) ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นถึงโมเลกุลเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของพิโนสโทรบิน ในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์พบว่า พิโนสโทรบินไม่ได้ออกฤทธิ์โดยการลดระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ และไม่ได้ยับยั้งโปรตีน Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1 จึงคาดว่าอาจมีผลไปยับยั้งที่โมเลกุลเป้าหมายที่เหลือคือ Hsl1, Mih1 และ Swe1 ซึ่ง Mih1 เป็นโปรตีนฟอสฟาเทส ส่วน Hsl1 และ Swe1 เป็นโปรตีนไคเนส ตามลำดับ

4.2.1 การเตรียมพิโนสโทรบิน

นำพิโนสโทรบินบริสุทธิ์ (ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography ดังภาคผนวก ง) ที่สกัดจากกระชายเหลืองจากวิทยานิพนธ์ของนางสาวสายพิน บุญเกิด นิสิตปริญญาเอก ภาคเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ดำเนินการวิจัยใน พ.ศ. 2548 มาละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล หรือ DMSO ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.2.2 การคัดกรองโดยใช้ระบบยีสต์ (ดัดแปลงจาก Shitamukai และคณะ, 2000)

4.2.2.1 การตรวจสอบผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อโปรตีน Hsl1

เพื่อศึกษาว่าพิโนสโทรบินมีผลยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์ โดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน Hsl1 หรือไม่ โดยอาศัยหลักการที่ว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta hsl1$ จะมีลักษณะคล้ายกับ $\Delta zds1$ เนื่องจากว่าเมื่อมีการส่งสัญญาณแคลเซียมมาจะกระตุ้นโปรตีน Hsl1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นโปรตีนไคเนส เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน Swe1 ทำให้โปรตีน Swe1 อยู่ในรูปไม่ทำงาน แต่เมื่อขาดโปรตีน Hsl1 ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน Swe1 จึงทำให้โปรตีน Swe1 อยู่ในภาวะที่สามารถทำงานได้ เป็นผลทำให้เซลล์หยุดหรือชะลอการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะ G2 (Shitamukai และคณะ, 2000) ดังนั้นเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta hsl1$ จึงสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียม แต่จะไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคลเซียม ดังเช่นในชุดควบคุมผลลบที่หยุดตัวทำละลาย แต่อย่างไรก็ตามหากมีการ

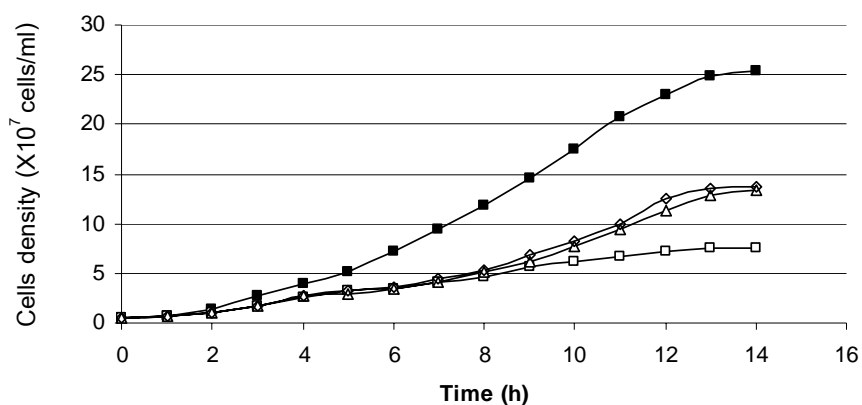
ขัดขวางการส่งสัญญาณของแคลเซียม ยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวจะสามารถกลับมาเจริญได้ในอาหารที่มีการเติมแคลเซียม ดังเช่นในชุดควบคุมผลบวกที่หยุด FK506 ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ Calcineurin ทำให้เซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta hsl1$ สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคลเซียม

จากการตรวจสอบพบว่าเมื่อเติมพิโนสโทรบิน เซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta hsl1$ จะมีการเจริญเติบโตขึ้นได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว (ดังภาพที่ 4.5 ก และ ข) ซึ่งในอาหารแข็งจะเห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพิโนสโทรบินสูงขึ้นเซลล์ก็จะเจริญได้มากขึ้น และในอาหารเหลวจะเห็นได้ชัดว่าพิโนสโทรบินสามารถบรรเทาการเจริญที่ผิดปกติได้พอๆกับชุดควบคุมผลบวก ถึงแม้ว่าเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวนี้ได้ถูกทำลายยีน *HSL1* ไปแล้วก็ตาม แต่ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมเมื่อเติมพิโนสโทรบิน แสดงให้เห็นว่าพิโนสโทรบินสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม โดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนตัวอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน Hsl1 ดังนั้นพิโนสโทรบินจึงไม่ได้มีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Hsl1

ก.



ข.



ภาพที่ 4.5 ผลการทดสอบพิโนสโตรบินที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ $\Delta hs1$ ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง

ก.) การเจริญของเซลล์ยีสต์บนอาหารแข็ง YPD ที่เติม CaCl_2 ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 ชั่วโมง ชุดควบคุมผลบวก FK506 0.5 ไมโครโมลาร์ และชุดควบคุมผลลบ เอทานอล

ข.) ผลของพิโนสโตรบินในอาหารเหลว YPD ที่เติม CaCl_2 ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ (■, YPD; □, YPD+ CaCl_2 200 มิลลิโมลาร์; △, YPD+ CaCl_2 200 มิลลิโมลาร์ + พิโนสโตรบิน 3 มิลลิโมลาร์; ◇, YPD+ CaCl_2 200 มิลลิโมลาร์ + FK506 0.5 ไมโครโมลาร์)

4.2.2.2 การทดสอบผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อโปรตีน Mih1

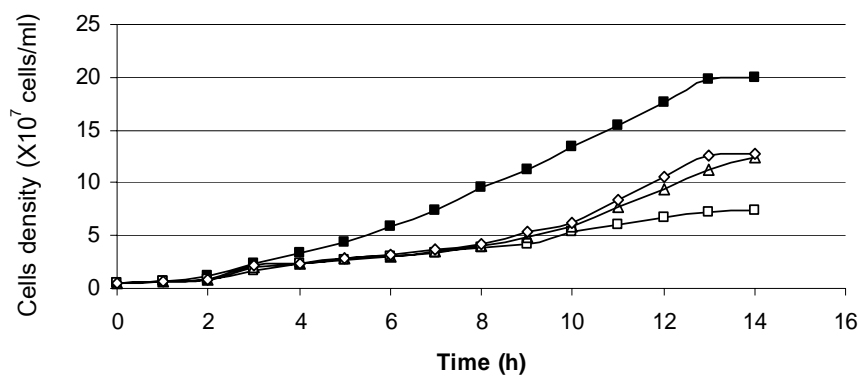
จากการทดสอบข้างต้นพบว่าพิโนสโทรบินไม่มีผลต่อโปรตีน Hsl1 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาว่า พิโนสโทรบินมีผลยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์ โดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน Mih1 หรือไม่ โดยอาศัยหลักการที่ว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mih1$ มีลักษณะคล้ายกับ $\Delta zds1$ เนื่องจากว่าโปรตีน Mih1 ทำหน้าที่เป็นโปรตีนฟอสฟาเทสตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากไทโรซีนตำแหน่งที่ 19 บนโปรตีน Cdc28 ทำให้โปรตีนเชิงซ้อน Cib-Cdc28 อยู่ในภาวะที่ทำงานได้ เซลล์จึงสามารถเคลื่อนจากระยะ G2 ไปสู่ระยะไมโทซิสได้ (Shitamukai และคณะ, 2000) แต่เมื่อขาดโปรตีน Mih1 ทำให้โปรตีนเชิงซ้อน Cib-Cdc28 ไม่อยู่ในภาวะที่ทำงานได้ เซลล์จึงหยุดหรือชะลอการแบ่งเซลล์ที่ในระยะ G2 ดังนั้นเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mih1$ จะไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคลเซียม ดังเช่นในชุดควบคุมผลลบ แต่อย่างไรก็ตามหากมีการขัดขวางการส่งสัญญาณของแคลเซียม ยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวจะสามารถกลับมาเจริญได้ในอาหารที่มีการเติมแคลเซียม ดังเช่นในชุดควบคุมผลบวก

จากการทดลองพบว่าพิโนสโทรบินสามารถช่วยทำให้มีการเจริญของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mih1$ ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว (ดังภาพที่ 4.6 ก และ ข)) ซึ่งในอาหารแข็งจะเห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพิโนสโทรบินสูงขึ้นเซลล์ก็จะเจริญได้มากขึ้น และในอาหารเหลวจะเห็นได้ชัดว่าพิโนสโทรบินสามารถบรรเทาการเจริญที่ผิดปกติได้ และแม้ว่าเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวนี้ได้ถูกทำลายยีน *MIH1* ไปแล้วแต่ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมเมื่อเติมพิโนสโทรบิน แสดงให้เห็นว่าพิโนสโทรบินสามารถยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ในเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mih1$ โดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนตัวอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน Mih1 ดังนั้นพิโนสโทรบินจึงไม่ได้มีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Mih1

ก.



ข.



ภาพที่ 4.6 ผลการทดสอบพิโนสโตรบินที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ $\Delta mih1$ ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง

ก.) การเจริญของเซลล์ยีสต์บนอาหารแข็ง YPD ที่เติม CaCl_2 ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 ชั่วโมง ชุดควบคุมผลบวก FK506 0.5 ไมโครโมลาร์ และชุดควบคุมผลลบ เอทานอล

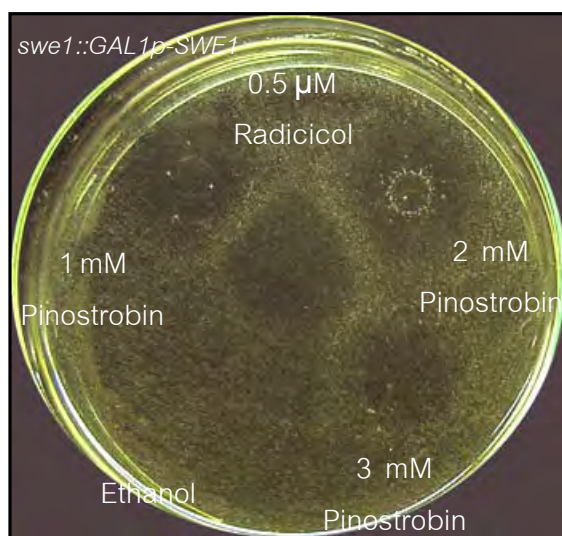
ข.) ผลของพิโนสโตรบินในอาหารเหลว YPD ที่เติม CaCl_2 ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ (■, YPD; □, YPD+ 200 มิลลิโมลาร์ CaCl_2 ; △, YPD+ 200 มิลลิโมลาร์ CaCl_2 + 3 มิลลิโมลาร์ พิโนสโตรบิน; ◇, YPD+ 200 มิลลิโมลาร์ CaCl_2 + 0.5 ไมโครโมลาร์ FK506)

4.2.2.3 การทดสอบผลของพิโนสโทรบินต่อช่วงปลายน้ำจากโปรตีน Swe1

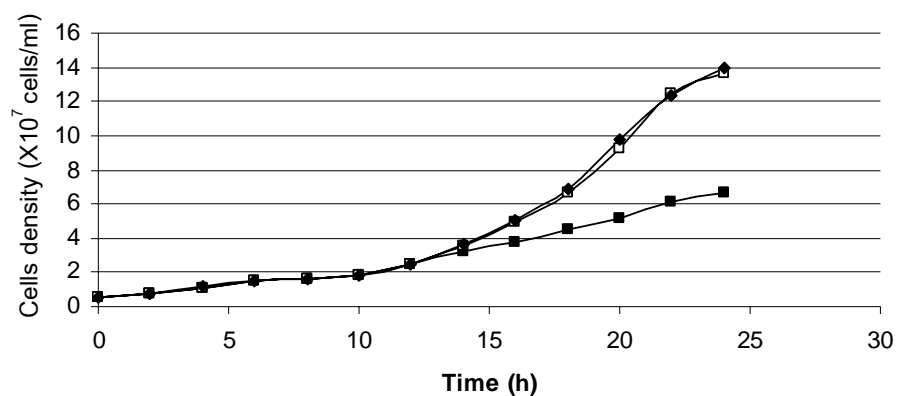
เนื่องจากการทดลองข้างต้นพบว่าการยับยั้งวิถีสัญญาณแคลเซียมของพิโนสโทรบินไม่ได้เป็นเพราะยับยั้งการทำงานของโปรตีน Hsl1 หรือ Mih1 (ดังภาพที่ 4.5-4.6) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาถึงผลของพิโนสโทรบินในการยับยั้งวิถีสัญญาณแคลเซียมในช่วงปลายน้ำจากโปรตีน Swe1 เมื่อทำให้มีการแสดงออกมากเกินไปของยีน *SWE1* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *GAL1* ที่ซึ่งแทรกอยู่ในโครโมโซมตรงตำแหน่งข้างหน้ายีน *SWE1* ในยีสต์ที่มีจีโนไทป์เป็น $\Delta zds1$ ถ้ามีการกระตุ้นให้มีการแสดงออกมากเกินไปของยีน *SWE1* โดยเติมน้ำตาลกาแลคโทสลงไป จะชักนำให้ยีน *SWE1* มีการแสดงออกที่มากเกินไป ทั้งยังไม่ขึ้นกับระดับของแคลเซียมในเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ และระดับโปรตีน Swe1 ที่มากขึ้นนี้ จะเป็นผลให้เกิดลักษณะที่คล้ายกันกับการเติมแคลเซียม หรือ การแสดงออกมากเกินไปของยีน *CMP42C* ในเซลล์ยีสต์ที่มีการแสดงออกของยีน *SWE1* ปกติ กล่าวคือเซลล์จะหยุดการเจริญ และชะลอระยะเวลาแบ่งเซลล์สะสมอยู่ที่ระยะ G2 (G2 delay) (Mizunuma และคณะ, 1998; Miyakawa และ Mizunuma, 2007) แต่ถ้ามีการขัดขวางการส่งสัญญาณที่เกิดจากการทำให้มีการแสดงออกมากเกินไปของยีน *SWE1* จะทำให้สามารถยับยั้งการเจริญที่ผิดปกติได้ดังเช่น จากการศึกษากของ Chanklan และคณะ (2008) พบว่าการทำให้มีการแสดงออกมากเกินไปของยีน *SWE1* ในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่เติม Radicicol สามารถบรรเทาการเจริญที่ผิดปกติ รวมทั้งยังลดการชะลอการแบ่งเซลล์ที่สะสมอยู่ระยะ G2 ลงได้ ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตขึ้น

จากผลการทดลองพบว่า ในอาหารแข็งบริเวณที่มีการหยุดพิโนสโทรบิน ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิโมลาร์ลงไปในนั้นมีลักษณะรูปแบบที่คล้ายกันกับบริเวณที่มีการหยุด Radicicol ความเข้มข้น 500 นาโนโมลาร์ซึ่งต่างจากบริเวณที่หยุดเอทานอล ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบ (ดังภาพที่ 4.7 ก) และเมื่อมาทดสอบในอาหารเหลว พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมพิโนสโทรบินลงไปในนั้นมีอาการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับชุดควบคุมผลบวกที่เติม Radicicol และในชุดควบคุมผลลบที่เติม DMSO ซึ่งมีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่า (ดังภาพที่ 4.7 ข) แสดงว่าพิโนสโทรบินสามารถยับยั้งความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการแสดงออกมากเกินไปของยีน *SWE1* ลงได้เหมือน Radicicol ดังนั้นพิโนสโทรบินจึงน่าจะมีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Swe1 คล้ายกันกับ Radicicol (Chanklan และคณะ, 2008)

ก



ข.



ภาพที่ 4.7 ผลการทดสอบพิโนสโตรบินที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ กลายYRC2

ก.) การเจริญของเซลล์ยีสต์บนอาหารแข็ง YPGalactose บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง ชัดควบคุมผลบวก Radicol 500 นาโนโมลาร์ และชัดเจนผลลบ เอทานอล

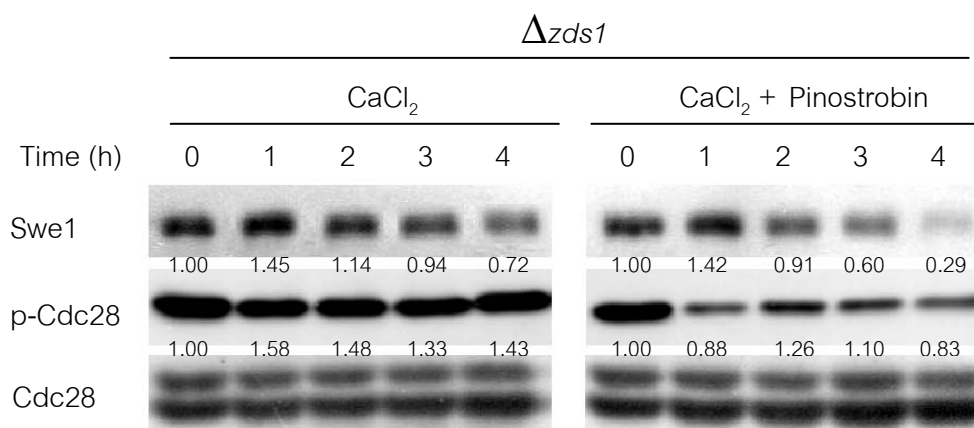
ข.) ผลของพิโนสโตรบินในอาหารเหลวภายใต้ภาวะที่มีการแสดงออกของยีน SWE1 มากเกิน (■, YPGalactose; □, YPGalactose + พิโนสโตรบิน 3 มิลลิโมลาร์; ◆, YPGalactose + Radicol 1 ไมโครโมลาร์)

4.3 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

เนื่องจากเมื่อมีแคลเซียมเข้ามาภายในเซลล์ เซลล์จะส่งสัญญาณโดยการกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีน *SWE1* มากขึ้นส่งผลให้เซลล์นั้นมีลักษณะที่ผิดปกติไป เช่น หยุดการเจริญเติบโต เซลล์มีลักษณะยี่ดยาว หรือหยุดการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G2 (Chanklan และคณะ, 2008) และจากการทดลองข้างต้นซึ่งเป็นหลักฐานทางพันธุศาสตร์ พบว่าการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมของฟอสโฟไลเปสที่ 2 (PLC2) จะทำให้มีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Swe1 ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงศึกษาหลักฐานทางชีวเคมีถึงผลของฟอสโฟไลเปสที่ 2 ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Swe1 โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ติดแท็ก myc ที่ส่วนปลายด้านหมู่คาร์บอกซีของโปรตีน Swe1 ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *SWE1* ภายในเซลล์ยีสต์ที่มีจีโนมที่ $\Delta zds1$ และสามารถตรวจสอบติดตามระดับการแสดงออกของโปรตีน Swe1 ได้ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ myc เพื่อยืนยันว่าฟอสโฟไลเปสที่ 2 นั้นสามารถควบคุมวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้จริง โดยมีเป้าหมายโมเลกุลเป็นโปรตีน Swe1 ในเซลล์ยีสต์

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม และไม่เติมฟอสโฟไลเปสที่ 2 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงเติมแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ และเก็บโปรตีนทันที และเก็บทุกๆ ชั่วโมง เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง พบว่าในชั่วโมงที่ 1 ระดับการแสดงออกของโปรตีน Swe1 นั้นมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นทั้งในเซลล์ที่เติมและไม่เติมฟอสโฟไลเปสที่ 2 เนื่องจากแคลเซียมนั้นจะไปกระตุ้นการถอดรหัสยีน *SWE1* (Chanklan และคณะ, 2008) แต่เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์ที่มีการเติมฟอสโฟไลเปสที่ 2 มีระดับการแสดงออกของโปรตีน Swe1 ลดลงเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมฟอสโฟไลเปสที่ 2 (ดังภาพที่ 4.8) และนอกจากนี้ เพื่อยืนยันเอกลักษณ์ของโปรตีน Swe1 ว่าถูกกระตุ้นการทำงานโดยฟอสโฟไลเปสที่ 2 จริง จึงได้ทำการตรวจสอบโปรตีน Cdc28 ในรูปที่เติมหมู่ฟอสเฟต (p-Cdc28, Phosphorylated form) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของโปรตีน Swe1 เนื่องจากโปรตีน Swe1 นั้นทำหน้าที่เป็นโปรตีนไคเนสเติมหมู่ฟอสเฟตที่ไทรโอนีนตำแหน่งที่ 19 บนโปรตีน Cdc28 ทำให้โปรตีนเชิงซ้อน Cib-Cdc28 อยู่ในภาวะที่ทำงานได้ (Shitamukai และคณะ, 2000) จากการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้เติมฟอสโฟไลเปสที่ 2 นั้นมีระดับการแสดงออกของโปรตีน Cdc28 ในรูปที่เติมหมู่ฟอสเฟตนั้นคงที่ เมื่อเวลาผ่านไป แต่ในทางตรงกันข้ามเซลล์ที่เติมฟอสโฟไลเปสที่ 2 กลับมีระดับการแสดงออกของโปรตีน Cdc28 ในรูปที่เติมหมู่ฟอสเฟตลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (ดังภาพที่ 4.8) ดังนั้นเมื่อเซลล์ได้รับฟอสโฟไลเปสที่ 2 แล้ว วิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมจะถูกกด ส่งผลให้มีระดับการแสดงออกลดลงของทั้งโปรตีน Swe1 และ

p-Cdc28 แสดงให้เห็นว่าพิโนสโตรบินนั้นสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้จริง โดยมีโปรตีนเป้าหมายคือ Swe1



ภาพที่ 4.8 ผลของพิโนสโตรบินที่มีต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Swe1 และ p-Cdc28 โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

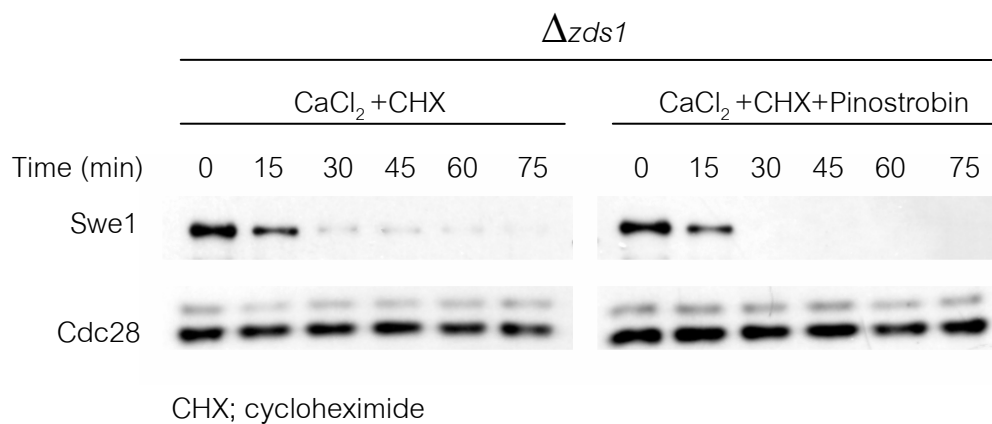
ยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC3 ที่แทรกยีน *SWE1* ที่ติดยีน *C-MYC* จำนวน 9 ชุดตรงตำแหน่ง 3' ของยีน *SWE1* ลงไปในโครโมโซมของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ $\Delta zds1$ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ผสมแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ ที่เติมและไม่เติมพิโนสโตรบินความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเซลล์จะถูกเก็บหลังจากเติมแคลเซียมทุก 1 ชั่วโมง และโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ยีสต์จะถูกหยอดลงในเจล SDS-polyacrylamide 7.5% และ 12% และตรวจสอบโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์นบลอต โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Myc และ p-Cdc2 (Tyr15) และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PSTAIR หรือ โปรตีน Cdc28 เป็นตัวควบคุมปริมาณการหยอดโปรตีน และภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ

4.4 ผลของพิโนสโทรบินต่อความเสถียรของโปรตีนเป้าหมายในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ในเซลล์ยีสต์โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

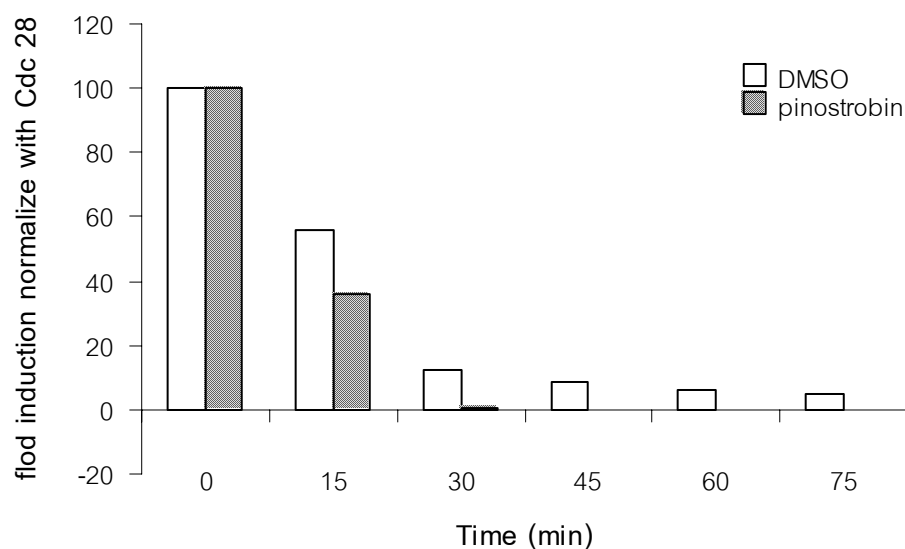
จากผลการทดลองทางพันธุศาสตร์ของ วชิรศักดิ์ วังกังวาน (2550) ซึ่งให้เห็นว่า พิโนสโทรบินนั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม เช่น สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีแคลเซียมสูง ลดการยืดยาว หรือการแตกหน่อที่ผิดปกติ และลดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่หยุดอยู่ระยะ G2 ได้ นอกจากนี้การทดลองข้างต้นยังพบว่า พิโนสโทรบินนั้นมีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Swe1 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาต่อไปว่าพิโนสโทรบินมีผลต่อความเสถียรของโปรตีน Swe1 หรือไม่ โดยการเติมไซโคลเฮกซีไมด์ เพื่อหยุดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เนื่องจาก ไซโคลเฮกซีไมด์จะเข้าไปจับที่บริเวณ 60S ไรโบโซม ส่งผลให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้น (Baliga และคณะ, 1969) ทำให้สามารถตรวจสอบอัตราการสลายตัวของโปรตีนได้ ซึ่งการทดลองนี้จะใช้ยีสต์สายพันธุ์กลายเป็นเช่นเดียวกับข้อ 4.3

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายเป็น YRC3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม และไม่เติมพิโนสโทรบินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงเติมแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ พร้อมกันกับไซโคลเฮกซีไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บโปรตีนทันที โดยเก็บตัวอย่างเซลล์ยีสต์ทุก 15 นาที พบว่าความเข้มของแถบโปรตีน Swe1 เมื่อเติมพิโนสโทรบินนั้นลดหายไปเร็วกว่า ชุดที่ไม่ได้เติมพิโนสโทรบิน (ดังภาพที่ 4.9) แสดงว่าพิโนสโทรบินนั้นชักนำให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน Swe1

ก.



ข.



ภาพที่ 4.9 แสดงผลของพิโนสโตรบินที่มีต่อความเสถียรของโปรตีน Swe1

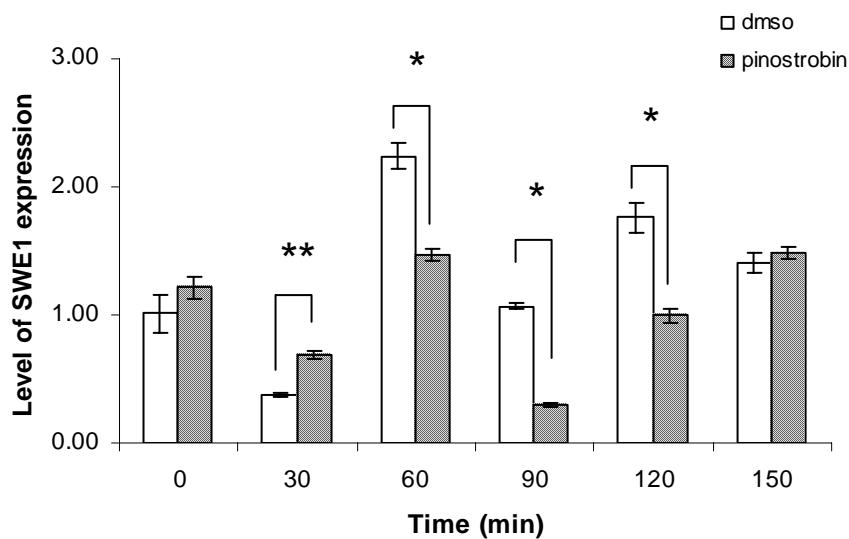
ก.) ยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC3 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่เติมและไม่เติมพิโนสโตรบินความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 30 นาทีแล้วจึงเติมแคลเซียมความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์ และไซโคลเฮกซิมิด์ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างเซลล์ยีสต์จะถูกเก็บทันทีทุก 15 นาที และโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างเซลล์ยีสต์จะถูกหยดลงในเจล SDS-polyacrylamide 7.5% และตรวจสอบโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์นบลอต โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Myc และ p-Cdc2 (Tyr15) และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PSTAIR หรือ โปรตีน Cdc28 เป็นตัวควบคุมปริมาณการหยดโปรตีน

ข.) ความเข้มของแถบโปรตีน Swe1 ถูกปรับให้มีการแสดงออกของโปรตีน Cdc28 สม่่าเสมอกันด้วยโปรแกรม Quantity One (ภาคผนวก ค) และภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ

4.5 ผลของพิโนสโทรบินต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ในเซลล์ยีสต์โดยวิธี real-time reverse transcription-PCR

จากการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่า พิโนสโทรบินนั้นไปเร่งการสลายตัวของโปรตีน Swe1 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาว่า พิโนสโทรบินนั้นมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Swe1 โดยไปกดที่ระดับการถอดรหัส (transcription) ของยีน *SWE1* หรือไม่ โดยจะทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *SWE1* ซึ่งการทดลองนี้ใช้ยีสต์สายพันธุ์คล้ายเช่นเดียวกับข้อ 4.3 ที่ได้ทำการหยุดการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 ด้วยการเติม α -factor

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์คล้าย YRC3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม และไม่เติมพิโนสโทรบินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงเติมแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ และเก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อสกัดและเก็บอาร์เอ็นเอทันที ทุกๆ 15 นาทีนาน 150 นาที พบว่าเซลล์ที่มีการเติมพิโนสโทรบินนั้น มีระดับการแสดงออกของยีน *SWE1* ที่ลดลง ต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้เติมพิโนสโทรบินอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.05$ และ 0.001 แต่ในช่วงเวลา 30 นาที และ 150 นาที การแสดงออกของยีนที่มีพิโนสโทรบินอยู่นั้นไม่ถูกกดน่าจะเป็นเพราะว่าปกติแล้วการแสดงออกของยีน *SWE1* นั้นจะขึ้นลงตามระยะการแบ่งตัวของเซลล์ โดยในระยะ G1/S จะมีระดับการแสดงออกที่สูง แต่ในระยะ G2/M จะมีระดับการแสดงออกที่ต่ำ (Sia และคณะ, 1998) ดังนั้นเมื่อเซลล์ยีสต์ได้รับพิโนสโทรบินแล้ว วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจะถูกกด ทั้งนี้เนื่องจากพิโนสโทรบินกดการถอดรหัสยีน *SWE1*



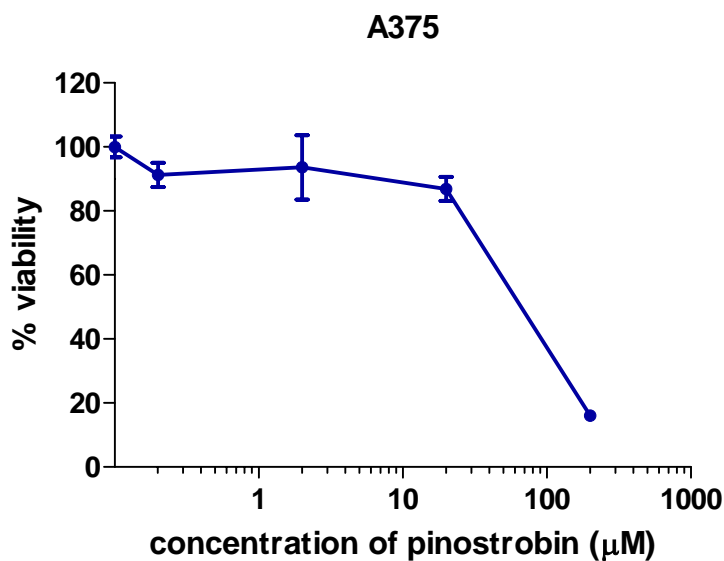
ภาพที่ 4.10 ผลของพิโนสโตรบินต่อการแสดงออกของยีน *SWE1* ในเซลล์ยีสต์ โดยวิธี real-time reverse transcription-PCR

ยีสต์สายพันธุ์กลาย YRC3 ที่ผ่านการชักนำด้วย α -factor แล้ว ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่เติมและไม่เติมพิโนสโตรบินความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วจึงเติมแคลเซียมความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์ และ อาร์เอ็นเอจะถูกเก็บทันทีทุก 15 นาที และตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real time RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *SWE1* และใช้ *ACT1* เป็นตัวควบคุม และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16.0 (* คือ $P \leq 0.05$ และ ** คือ $P \leq 0.001$) และภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ

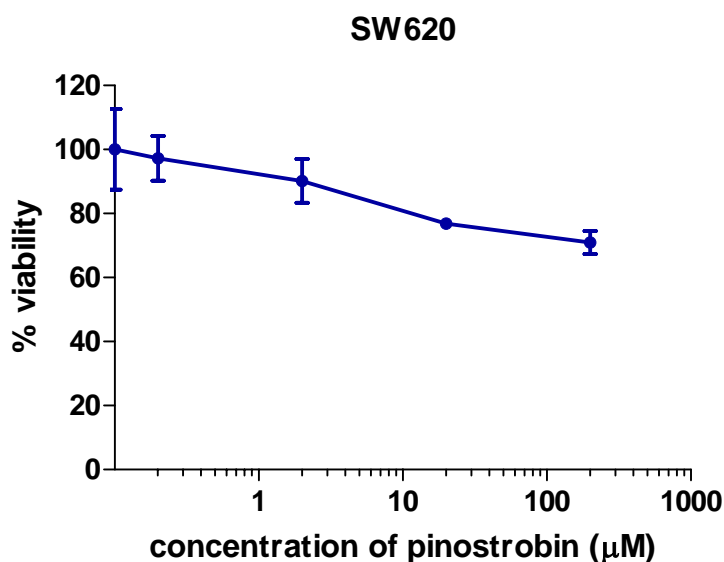
4.6 ผลของพิโนสโทรบินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 12 ชนิดโดยวิธี MTT proliferation assay

จากการศึกษาของ (Widmann และคณะ, 1999) พบว่าในระหว่างวิวัฒนาการตั้งแต่ยีสต์ถึงมนุษย์มีการอนุรักษ์ลำดับเบส (conserve sequence) ที่สำคัญไว้สูง เช่น โปรตีนไคเนสที่มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพโดยทำหน้าที่กระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของโปรตีน ซึ่งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ล้วนเกี่ยวข้องกับโปรตีนไคเนส และการเกิดความผิดปกติของโปรตีนไคเนสหลายๆชนิดมีส่วนความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง (Hughes, 2002) โดยผลจากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าพิโนสโทรบินสามารถต่อต้าน และป้องกันการเกิดมะเร็งบางชนิดได้ เช่น มะเร็งเต้านม และมะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งหมายศึกษาผลของพิโนสโทรบินต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

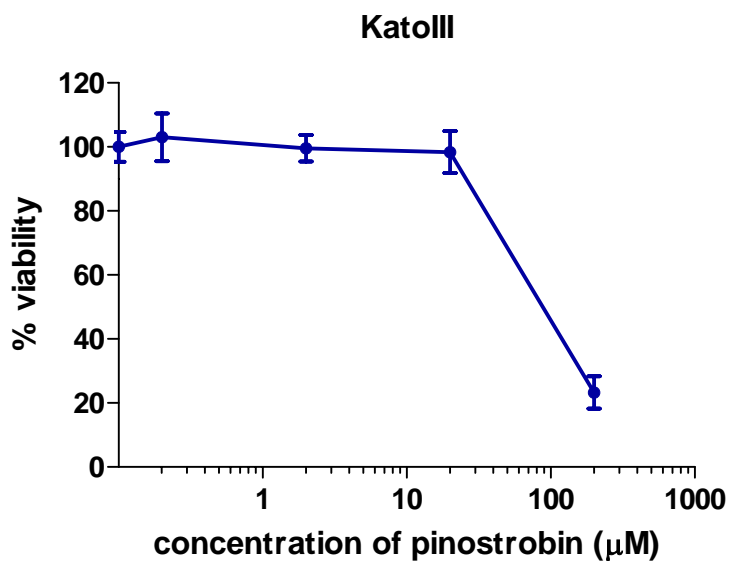
การศึกษาผลของพิโนสโทรบินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 12 ชนิด คือ HepG2, SW620, KATO III, A375, BT474, MDA-MB-231, HeLa, Ca-Ski, SiHa, THP-1, HL-60 และ Jurkat โดยวิธี MTT proliferation assay พบว่า พิโนสโทรบินสามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์บางชนิด ได้แก่ A375, KATO III, Jurkat และ Ca-Ski แสดงผลดังภาพที่ 4.11-4.22 โดยมีค่า IC_{50} ดังตารางที่ 4.1



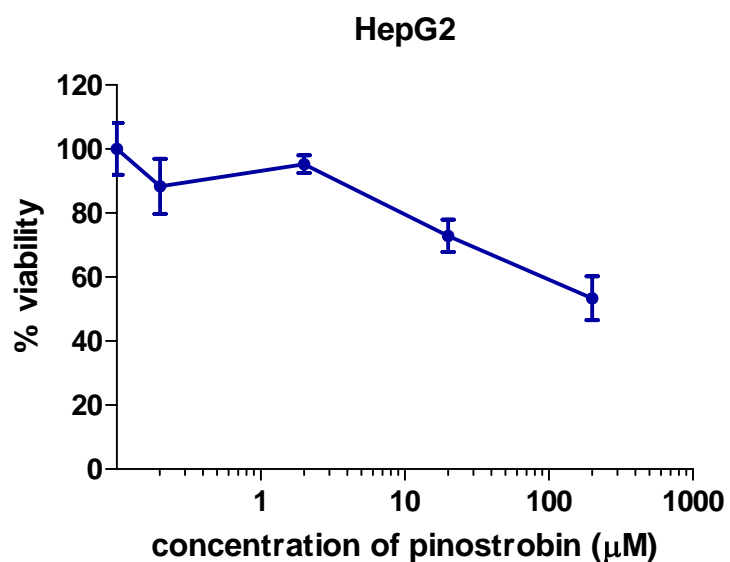
ภาพที่ 4.11 ผลของพินอสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ A375 โดยวิธี MTT proliferation assay



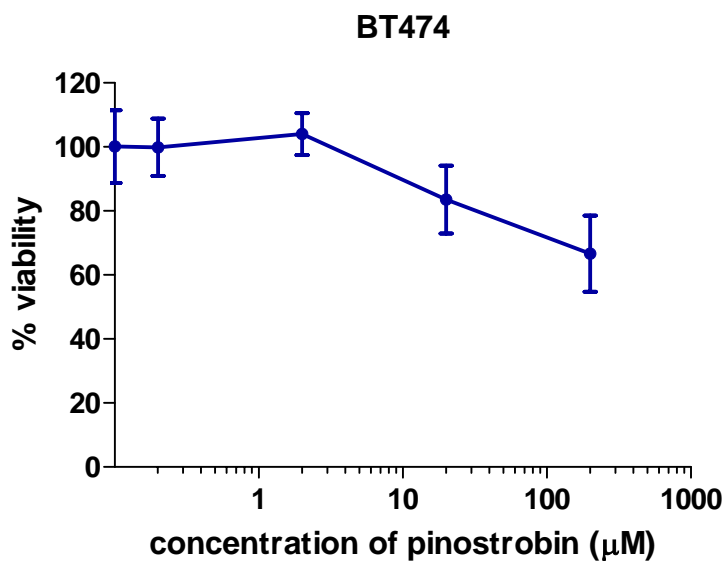
ภาพที่ 4.12 ผลของพินอสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ SW620 โดยวิธี MTT proliferation assay



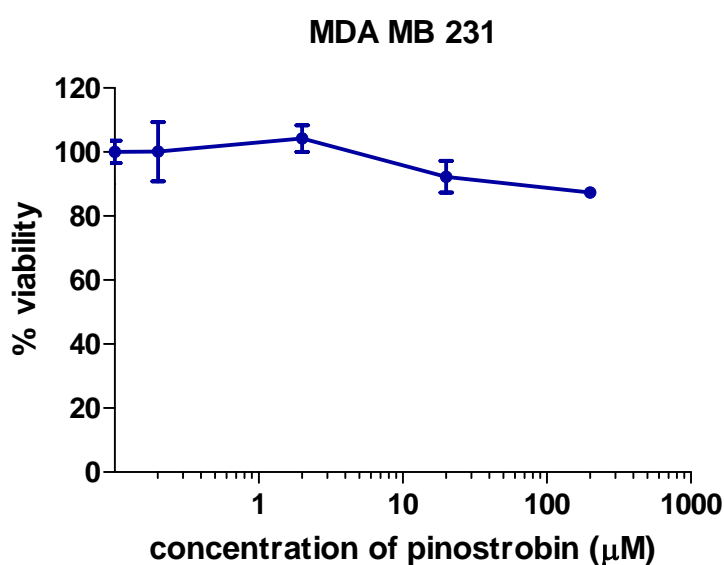
ภาพที่ 4.13 ผลของพิโนสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ KATO III โดยวิธี MTT proliferation assay



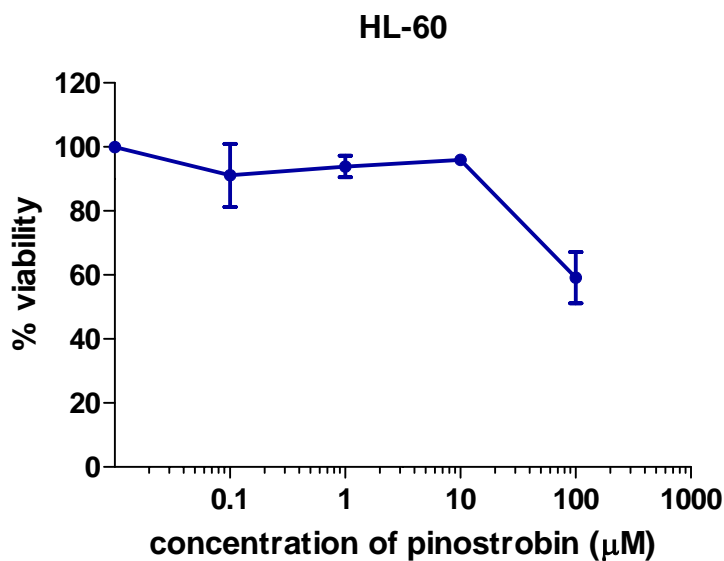
ภาพที่ 4.14 ผลของพิโนสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HepG2 โดยวิธี MTT proliferation assay



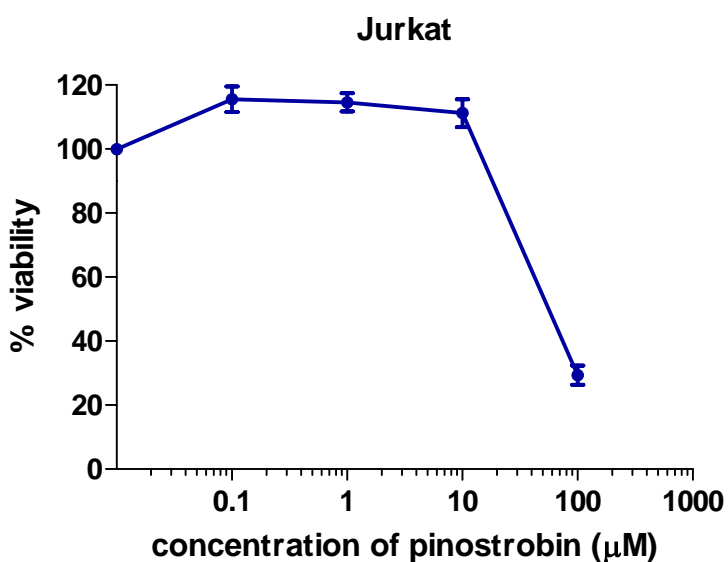
ภาพที่ 4.15 ผลของพิโนสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ BT474 โดยวิธี MTT proliferation assay



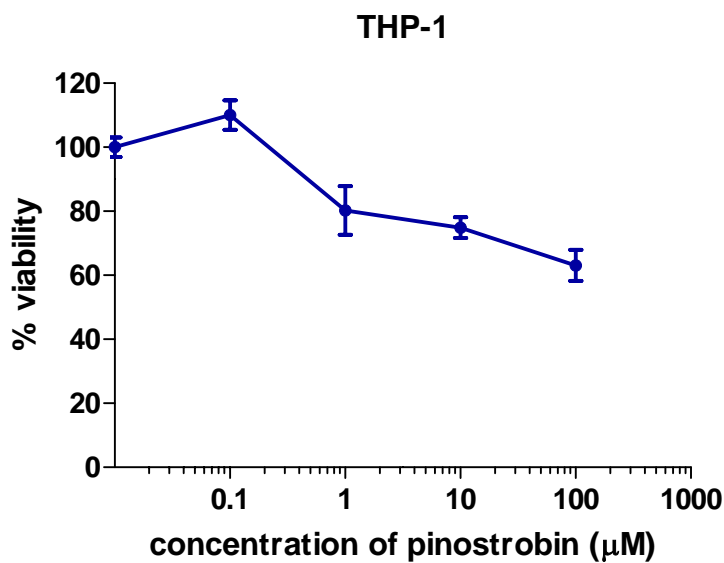
ภาพที่ 4.16 ผลของพิโนสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ MDA MB 231 โดยวิธี MTT proliferation assay



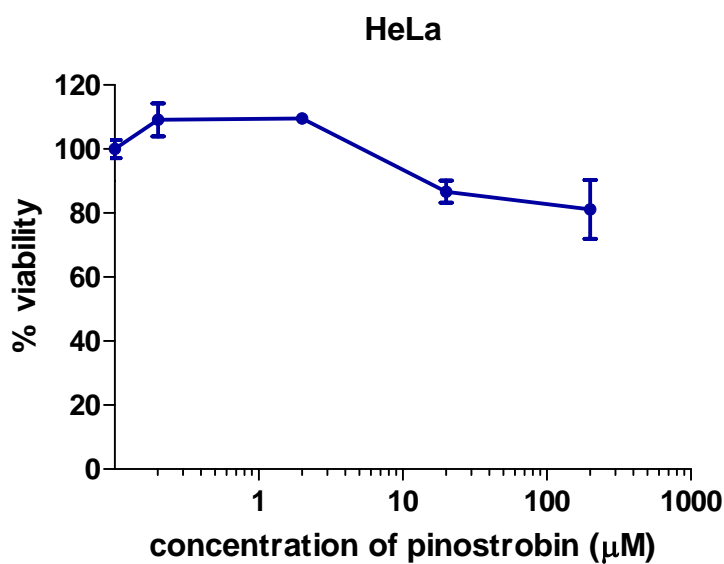
ภาพที่ 4.17 ผลของพิโนสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HL-60 โดยวิธี MTT proliferation assay



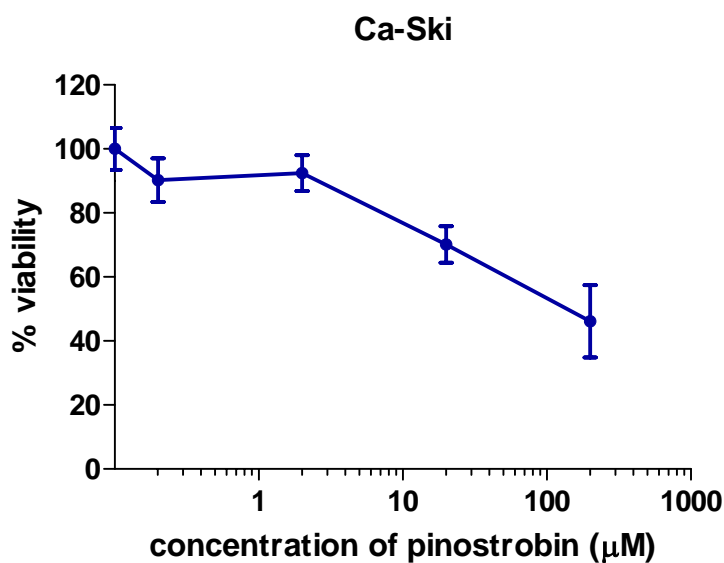
ภาพที่ 4.18 ผลของพิโนสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat โดยวิธี MTT proliferation assay



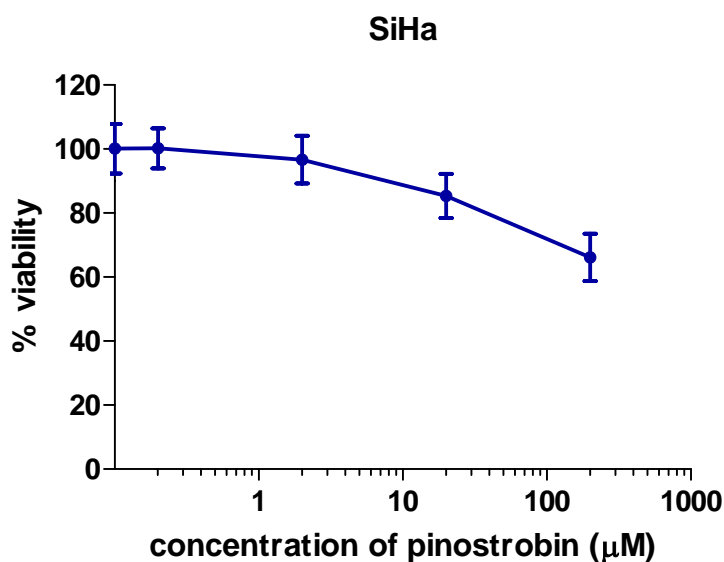
ภาพที่ 4.19 ผลของพินอสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ THP-1 โดยวิธี MTT proliferation assay



ภาพที่ 4.20 ผลของพินอสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ HeLa โดยวิธี MTT proliferation assay



ภาพที่ 4.21 ผลของพิโนสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Ca-Ski โดยวิธี MTT proliferation assay



ภาพที่ 4.22 ผลของพิโนสโตรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ SiHa โดยวิธี MTT proliferation assay

ตารางที่ 4.1 ผลของฟิโนสโทโรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

ชนิด	เซลล์ไลน์	IC ₅₀ (ไมโครโมลาร์)
มะเร็งผิวหนัง	A375	67
มะเร็งกระเพาะอาหาร	KATOIII	86
มะเร็งลำไส้	SW620	>200
มะเร็งตับ	HepG2	>200
มะเร็งเต้านม	BT474	>200
	MDA MB 231	>200
มะเร็งปากมดลูก	HeLa	>200
	Ca-Ski	145
	SiHa	>200
มะเร็งเม็ดเลือดขาว	THP-1	>100
	HL-60	>100
	Jurkat	56

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. สามารถเพิ่มจำนวนยีน *URA3* ที่มีส่วนต้นเป็น upstream regulatory region ของยีน *HSL1* หรือ *MIH1* ขนาด 40 mers และส่วนปลายเป็น downstream regulatory region ของยีน *HSL1* หรือ *MIH1* ขนาด 40 mers
2. สามารถทำลายยีน *MIH1* หรือ *HSL1* ได้สำเร็จโดยการนำยีน *URA3* เข้าไปแทรกแทนที่ในโครโมโซมของยีน *HSL1* หรือ *MIH1*
3. ได้ yeast disruptant สายพันธุ์ $\Delta hsl1::URA3$ และ $\Delta mih1::URA3$ ซึ่ง yeast disruptant ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมยูราซิล
4. พิโนสโทรบินไม่ได้มีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Hsl1 และ Mih1 แต่น่าจะมีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Swe1
5. พิโนสโทรบินนั้นสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้จริง โดยลดการสะสมโปรตีนเป้าหมายคือ Swe1
6. พิโนสโทรบินนั้นชักนำให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน Swe1 เร็วขึ้น
7. พิโนสโทรบินมีผลต่อการแสดงออกของยีน *SWE1* ในระดับการถอดรหัสของยีน
8. พิโนสโทรบินสามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์บางชนิด ได้แก่ A375, KATO III, Jurkat และ Ca-Ski โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 67, 86, 56 และ 145 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาระบบการคัดกรองเชิงบวก เพื่อตรวจสอบกลไกเชิงลึกของพิโนสโทรบินที่สามารถดัดลักษณะที่ผิดปกติ เช่นการแตกหน่อที่ผิดปกติ หรือการชะลอการแบ่งเซลล์ในระยะ G2 ของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ในภาวะที่มีแคลเซียมสูงได้นั้น จะทำให้ทราบว่าพิโนสโทรบินสามารถยับยั้งที่ช่วง หรือโมเลกุลเป้าหมายใดในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ซึ่งจะช่วยให้สามารถทราบหรือคาดเดาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารได้ อย่างเช่น การออกฤทธิ์ต้านอักเสบ ต้านมะเร็ง เป็นต้น (ดังตารางที่ 2.2) จากการศึกษาของ วชิรศักดิ์ วังกังวาน (2550) พบว่าพิโนสโทรบิน

ไม่ได้ออกฤทธิ์โดยการลดระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ และไม่ได้ยับยั้งโปรตีน Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1 แต่น่าจะมีผลไปยับยั้งที่โมเลกุลเป้าหมายที่เหลือคือ Hsl1, Mih1 และ Swe1 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาว่าพิโนสโทรบินนั้นไปยับยั้งที่ช่วงหรือโมเลกุลเป้าหมายที่เหลือในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม เพื่อต่อยอดจากงานวิจัยของ วชิรศักดิ์ วังกังวาน (2550)

จากผลการทดลองในรูป 4.5 และ 4.6 พบว่าพิโนสโทรบินสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ในเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta hsl1$ หรือ $\Delta mih1$ ซึ่งยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวนี้จะมีลักษณะคล้ายกับ $\Delta zds1$ ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียม แต่จะไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคลเซียม แต่อย่างไรก็ตามหากมีการขัดขวางการส่งสัญญาณของแคลเซียม ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ จะสามารถกลับมาเจริญได้ในอาหารที่มีการเติมแคลเซียม (Shitamukai และคณะ, 2000) ในทำนองเดียวกันเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ $\Delta hsl1$ หรือ $\Delta mih1$ นี้ได้ถูกทำลายยีน *HSL1* หรือ *MIH1* แล้ว แต่กลับสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมเมื่อเติมพิโนสโทรบิน แสดงให้เห็นว่าพิโนสโทรบินสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ และไม่ได้มีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Hsl1 หรือ Mih1 จากนั้นจึงมาทำการศึกษาถึงผลของพิโนสโทรบินต่อโปรตีน Swe1 และในช่วงปลายน้ำจากโปรตีน Swe1 โดยการทำให้มีการแสดงออกเกินของยีน *SWE1* ในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ พบว่าพิโนสโทรบินสามารถยับยั้งการเจริญที่ผิดปกติได้ ดังนั้นโมเลกุลเป้าหมายของพิโนสโทรบินจึงน่าจะเป็นโปรตีน Swe1 เนื่องจากเป็นโปรตีนตัวสุดท้ายในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมที่มีผลต่อโปรตีนเชิงซ้อน Clb-Cdc28 (Mizunuma และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาต่อมาถึงผลของพิโนสโทรบินต่อการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับพิโนสโทรบิน วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจะถูกกด ส่งผลให้มีระดับการแสดงออกลดลงของทั้งโปรตีน Swe1 และ p-Cdc28 (ดังภาพที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่าพิโนสโทรบินนั้นสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้จริง โดยมีโปรตีนเป้าหมายคือ Swe1

และจากผลการทดลองในภาพที่ 4.9 และ 4.10 แสดงให้เห็นว่าพิโนสโทรบินนั้นสามารถกวดการแสดงออกของโปรตีน Swe1 ได้ทั้งในระดับหลังการแปลรหัส (ความเสถียรของโปรตีน) และระดับการถอดรหัสของยีน โดยไปเร่งให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน Swe1 ให้เกิดเร็วขึ้น และลดการสังเคราะห์ปริมาณ mRNA ของยีน *SWE1* ให้น้อยลง แต่น่าจะมีผลที่ระดับหลังการแปลรหัสมากกว่า เนื่องจากโปรตีน Swe1 นั้นหายไปเร็วมากภายใน 30 นาทีแรก ขณะที่การแสดงออกของยีน *SWE1* นั้นยังคงแสดงออกอยู่ แต่แสดงออกในระดับที่ต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ได้เติมพิโนสโทรบิน

วิธีสัญญาณแคลเซียมนั้นจะกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน Swe1 ผ่านการทำงานของโปรตีน Calcineurin ที่ควบคุม 3 วิธีคือ 1) ควบคุม transcription factor ที่กระตุ้นการถอดรหัสของยีน SWE1 2) ยับยั้งการทำงานของโปรตีน Hs1 ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงลบของโปรตีนไคนเนส Swe1 3) ยับยั้งการทำงานของโปรตีน Yap1 ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของโปรตีนเอไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน Swe1 (Miyakawa และ Mizunuma, 2007) และจากการศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าพิโนสโทรบินน่าจะมีบทบาทต่อโปรตีน Swe1 ผ่านระบบ ubiquitin-proteasome ท่ามกลางที่วิธีสัญญาณแคลเซียมถูกกระตุ้น

นอกจากนี้การหาโมเลกุลเป้าหมายของพิโนสโทรบินสามารถทำได้โดย วิธีการทางชีวเคมี เช่น Photo-crosslinking และ Radiolabeled ligand binding และ Affinity chromatography (Becker และคณะ, 2004) หรือวิธีที่ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโคลนนิ่ง cDNA library เช่นวิธี yeast three-hybrid (Licitra และ Liu 1996; Becker และคณะ, 2004) วิธี Phage display (Sche และคณะ, 1999) วิธี Drug western (Tanaka และคณะ, 1999) วิธี mRNA display (McPherson และคณะ, 2002) และ การแสดงออก cDNA library เพื่อหาโคลนที่กดลักษณะการต่ออายุของยีสต์ที่เกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ต่ออายุ (Kobayashi และคณะ, 2006) เป็นต้น

จากรายงานที่ผ่านมามีสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม แต่ที่ได้จำแนกว่ามีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Swe1 มีเพียงหนึ่งชนิดเท่านั้นคือ Radicicol (Chanklan และคณะ, 2008) ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน Hsp90 (Schulte และคณะ, 1998; Shamma และคณะ, 1998; Ki และคณะ, 2001) ที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง (Schulte และคณะ, 1999; Soga และคณะ, 2003) ดังนั้นพิโนสโทรบินจึงน่าจะมีศักยภาพที่จะใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า พิโนสโทรบินมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิด (Sukardiman และคณะ, 2000; Fahey และ Stephenson, 2002; Smolarz และคณะ, 2006)

ดังนั้นในการทดลองต่อมาก็ได้ทำการศึกษาผลของพิโนสโทรบินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ทั้ง 12 ชนิดได้แก่ มะเร็งผิวหนัง (A375) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) มะเร็งลำไส้ (SW620) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (BT474 และ MDA MB 231) มะเร็งปากมดลูก (HeLa, Ca-Ski และ SiHa) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (THP-1, HL-60 และ Jurkat) พบว่า พิโนสโทรบินสามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์บางชนิด ได้แก่ A375, KATO III, Jurkat และ Ca-Ski โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 67, 86, 56 และ 145 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งขัดแย้งกับรายงานก่อนหน้านี้ ว่าพิโนสโทรบินสามารถยับยั้ง มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ และมะเร็งเม็ดเลือด

ชาวที่ความเข้มข้นต่ำกว่าที่ได้ในการศึกษานี้ (Sukardiman และคณะ, 2000; Fahey และ Stephenson, 2002; Smolarz และคณะ, 2006) สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่า 1) เซลล์ไลน์มะเร็งที่เลี้ยงแม้ว่าจะมาจากแหล่งเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแต่ละห้องปฏิบัติการอาจจะแตกต่างกัน ทำให้เซลล์ไลน์ที่ได้นั้นอาจจะมีสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไป 2) เซลล์ไลน์มะเร็งต้น และมะเร็งเต้านมที่ใช้ศึกษาในรายงานก่อนหน้านี้นี้เป็นชนิดที่ต่างกัน และ 3) มะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นแม้ว่าจะใช้ชนิดเดียวกันแต่วิธีการตรวจสอบผลนั้นใช้วิธีแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าฟิโนสโทรบินจะสามารถกดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์บางชนิดได้ก็ตาม แต่ต้องใช้ความเข้มข้นที่สูง ซึ่งจะสังเกตได้จากเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไลน์จะต่ำลงเป็นอย่างมาก แสดงว่าการใช้ฟิโนสโทรบินที่ความเข้มข้นสูงนั้น อาจจะทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ได้ ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายของฟิโนสโทรบินในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ด้วยเวสเทิร์นบลอต แต่อาจจะใช้ฟิโนสโทรบินเป็นสารตั้งต้น (lead compound) ในการปรับเปลี่ยนสายข้าง (side chain) ด้วยวิธีทางเคมีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสาร และลดความเป็นพิษของสารลง

เมื่อเร็ว ๆ นี้ มีงานวิจัยอื่นที่สนับสนุนว่าการใช้ตัวยับยั้งต่อโปรตีน Wee1 ในมนุษย์ซึ่งเป็น ortholog ของโปรตีน Swe1 ในยีสต์ (Booher และคณะ, 1993) คือ PD0166283 และ MK-1775 โดยสารเหล่านี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาโรคมะเร็งได้ (Wang และคณะ, 2001; Mizuarai และคณะ, 2009) โดยโปรตีนไคเนส Wee1 ทำหน้าที่ควบคุมการเข้าสู่กระบวนการไมโทซิส ด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตที่โปรตีนเชิงซ้อน Cdc2/cyclin B (Nurse, 1997) ในไทโรซีนตำแหน่งที่ 15 ส่งผลทำให้อยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ แต่ถูกตัดหมู่ฟอสเฟตออกไปด้วยโปรตีนฟอสฟาเทส Cdc25C ซึ่งเป็น ortholog ของโปรตีน Mih1 ในยีสต์ (Russell และคณะ, 1989) ทำให้เกิดสมดุลในการเคลื่อนของเซลล์จากระยะ G2 ไป M ในกระบวนการแบ่งเซลล์ แอ็กทิวิตีของ Wee1 ไคเนสเพิ่มสูงขึ้นในระหว่างระยะ S และ G2 ในทางคู่ขนานก็เพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วย แต่แอ็กทิวิตีนี้จะลดเมื่อเซลล์เคลื่อนตัวเข้าสู่ระยะไมโทซิส รวมทั้งระดับโปรตีนที่แสดงออกมาก็ลดลงตามไปด้วยในระยะ M ถึง G1 (McGowan และ Russell, 1995; Watanabe และคณะ, 1995)

ในเซลล์สิ่งมีชีวิตชั้นสูงกระบวนการแบ่งเซลล์จะชะลอตัวลง เพื่อตอบสนองต่อการทำลายดีเอ็นเอ เนื่องจากกระบวนการตรวจสอบความผิดปกติ (checkpoint) ถูกกระตุ้น ซึ่งหนึ่งในกลไกที่ตอบสนองต่อการตรวจสอบความผิดปกตินั้นคือ การหยุดหรือชะลอเซลล์อยู่ที่ระยะ G1 ที่ซึ่งในเซลล์มะเร็งส่วนมาก กว่าร้อยละ 50 นั้นสูญเสียกระบวนการนี้ไป ด้วยการการเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีนกดมะเร็ง P53 แต่อย่างไรก็ตามมักพบว่าเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ ชะลอการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G2

แทนเมื่อเกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ ด้วยการกระตุ้นกลไกตรวจสอบความผิดปกติอื่นๆ เพื่อป้องกันไม่ให้โปรตีนเชิงซ้อน Cdc2/cyclin B สามารถทำงานได้ โดยยับยั้งการทำงานของโปรตีน Cdc25 ด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตจากโปรตีนไคเนส Chk1 (Furnari และคณะ, 1999) และกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Wee1 ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่สำคัญในการเกิดกระบวนการชะลอการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G2 โดยเติมหมู่ฟอสเฟตโปรตีน Cdc2 ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ (Heald และคณะ, 1993; Leach และคณะ, 1998) ดังนั้นเซลล์จึงชะลออยู่ที่ระยะ G2 เพื่อให้เกิดการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Wee1 และ Chk1 ในเซลล์มะเร็งที่มีความบกพร่องในกระบวนการตรวจสอบในระยะเวลา G1 (G1 checkpoint) ร่วมกับการใช้ยา หรือ สารเคมีที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอแล้วเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยในการรักษาโรคมะเร็ง

Wang และคณะ (2001); Li และคณะ (2002) รายงานว่า การใช้ตัวยับยั้ง PD0166283 ต่อโปรตีน Wee1 ร่วมกันกับการให้รังสี จะทำให้เซลล์ไลน์ที่มียีน P53 กลายพันธุ์ไปตายเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ไลน์ที่มียีน P53 ปกติ

Wang และคณะ (2004) รายงานว่าการใช้เทคนิค siRNA ที่ทำให้ปริมาณ mRNA ของยีน WEE1 ลดน้อยลง ส่งผลให้เซลล์ที่มียีน P53 กลายพันธุ์ที่ได้รับ Adriamycin เกิดอะพอพโทซิสมากขึ้น

Mizuarai และคณะ (2009) แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวยับยั้ง MK-1775 ต่อโปรตีน Wee1 ร่วมกันกับการให้สารเคมี Gemcitabine ในเซลล์ไลน์มะเร็งรังไข่ที่มี P53 ปกติและผิดปกติ พบว่าการให้ Gemcitabine เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อเซลล์ทั้งสองชนิด แต่เมื่อให้ MK-1775 ร่วมด้วย กลับพบว่าเซลล์ไลน์ที่มี P53 ผิดปกติเท่านั้นที่มีการเกิดอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ MK-1775 เพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์ที่มี P53 ปกตินั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นจะหลักฐานสนับสนุนว่า การยับยั้งโปรตีน Wee1 จะเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษามะเร็งที่ใช้ยาอยู่ทั่วไปไม่ว่าจะเป็นการฉายรังสี หรือการให้ยาเคมีบำบัดแก่ผู้ป่วยมะเร็งชนิดที่ยีนกดมะเร็ง P53 เกิดการกลายพันธุ์ โดยการไปยกเลิกการชะลอเซลล์ที่ระยะ G2

งานวิจัยครั้งนี้ใช้ยีสต์สายพันธุ์กลายทำหน้าที่เป็นเซลล์บ่งชี้เพื่อหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นในเซลล์ยีสต์ แม้ว่าสารที่ใช้ในการศึกษาคือพิโนสโทรบินที่เคยมีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพบ้างแล้ว แต่ยังไม่มียานวิจัยใดที่ศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัดของพิโนสโทรบิน ฉะนั้นผลจากงานวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่นำไปสู่การเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวได้

ต่อไป เพื่อประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งในมนุษย์จากวิธีการรักษาเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการศึกษา ChIP assay เพื่อดูว่า transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *SWE1* นั้นถูกจับด้วยพิโนสโทรบินหรือไม่ เนื่องจากพิโนสโทรบินนั้นไปกดการแสดงออกยีน *SWE1* ที่ในระดับ mRNA ด้วย

2. ทำการศึกษารวมของพิโนสโทรบินร่วมกับการใช้ยารักษามะเร็งในเซลล์ไลน์ KATOIII, BT474, MDA MB 231, HL-60, THP-1 และ Jurkat เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตด้วยวิธี MTT proliferation assay เนื่องจากเมื่อตรวจสอบเซลล์ไลน์มะเร็งที่ใช้ในงานวิจัยนี้ว่าชนิดไหนมียีน *p53* เกิดการกลายพันธุ์บ้างเมื่อเทียบกับฐานข้อมูล cell line *p53* handbook พบว่า เซลล์เหล่านั้นมียีน *p53* เกิดการกลายพันธุ์ไป (Bartek และคณะ, 1990; Cheng และ Haas, 1990; Sugimoto และคณะ, 1992; O'Connor และคณะ, 1997) แต่เซลล์ A375, HepG2, HeLa, Ca-Ski และ SiHa นั้นมียีน *p53* ที่เป็นปกติ (Lin และคณะ, 1996; Jia และคณะ, 1997) ส่วนเซลล์ SW620 ยังไม่พบรายงาน

3. ทำการศึกษารวมของพิโนสโทรบินและศึกษาถึงประสิทธิภาพความเป็นพิษและผลข้างเคียงในระดับสัตว์ทดลอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปใช้ในมนุษย์ต่อไป โดยทำการฉีดเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดใดก็ได้ที่เป็น P53 negative เข้าไปได้ผิวหนังของหนูทดลอง nude mice เพื่อปลูกก้อนมะเร็ง หลังจากนั้นฉีดพิโนสโทรบินร่วมกับยาฆ่ามะเร็ง แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้อนมะเร็ง ซึ่งคาดว่าก้อนมะเร็งจะมีขนาดเล็กลงเนื่องจากพิโนสโทรบินอาจไปยับยั้งการชะลอการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G2 ทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อยาฆ่ามะเร็งมากขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์. 2547. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2547. ผักพื้นบ้านภาคอีสาน. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สามเจริญพาณิชย์.

มาตรการบังคับใช้สิทธิเหนือสิทธิบัตรยา. [Online]. Available from:

<http://www.positioningmag.com/prnews/prnews.aspx?id=57401>[2009, May 21]

วชิรศักดิ์ วงศ์วาน. 2550. การคัดกรองเชิงบวกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Ashidi, J.S., Houghton, P.J., Hylands, P.J., Sieber, S., and Efferth, T. 2007. Molecular mechanism of action of the flavanone pinostrobin from *Cajanus cajan* leaves in cancer cells. Planta medica 73: 855.

Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidan, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4rd ed. New York: John Wiley & Sons.

Bach, S., Talarek, N., Andrieu, T., Vierfond, J.M., Mettey, Y., Galons, H., Dormont, D., Meijer, L., Cullin, C., and Blondel, M. 2003. Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. Nature biotechnology 21: 1075-1081.

Baliga, B.S., Pronczuk, A.W., and Munro, H.N. 1969. Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver. The Journal of biological chemistry 244: 4480-4489.

- Bartek, J., Bartkova, J., Vojtesek, B., Staskova, Z., Rejthar, A., Kovarik, J., and Lane, D.P. 1990. Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. International journal of cancer 46: 839-844.
- Becker, F., Murthi, K., Smith, C., Come, J., Costa-Roldan, N., Kaufmann, C., Hanke, U., Degenhart, C., Baumann, S., Wallner, W., et al. 2004. A three-hybrid approach to scanning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors. Chemistry & biology 11: 211-223.
- Bharmapravati, S., Mahady, G.B., and Pendland, S.L. 2003. In vitro susceptibility of Helicobacter pylori to extracts of Boesenbergia pandurata and pinostradin. In The 3 rd world congress on medicinal plants and aromatic plants for human welfare. Feb 3-7, Chiang Mai, Thailand.
- Bhat, R.V., Budd Haeberlein, S.L., and Avila, J. 2004. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. Journal of neurochemistry 89: 1313-1317.
- Bi, E., and Pringle, J.R. 1996. ZDS1 and ZDS2, genes whose products may regulate Cdc42p in Saccharomyces cerevisiae. Molecular and cellular biology 16: 5264-5275.
- Booher, R.N., Deshaies, R.J., and Kirschner, M.W. 1993. Properties of Saccharomyces cerevisiae wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. The EMBO journal 12: 3417-3426.
- Botstein, D., Chervitz, S.A., and Cherry, J.M. 1997. Yeast as a model organism. Science (New York, N.Y) 277: 1259-1260.
- Chanklan, R., Aihara, E., Koga, S., Takahashi, H., Mizunuma, M., and Miyakawa, T. 2008. Inhibition of Ca²⁺-signal-dependent growth regulation by radicicol in budding yeast. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 72: 132-138.

- Cheng, J., and Haas, M. 1990. Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. Molecular and cellular biology 10: 5502-5509.
- Clapham, D.E. 1995. Calcium signaling. Cell 80: 259-268.
- Dowell, S.J., and Brown, A.J. 2002. Yeast assays for G-protein-coupled receptors. Receptors & channels 8: 343-352.
- Drews, J. 1996. Genomic sciences and the medicine of tomorrow. Nature biotechnology 14: 1516-1518.
- Duan, W., Chan, J.H., Wong, C.H., Leung, B.P., and Wong, W.S. 2004. Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. J.Immunol 172: 7053-7059.
- Fahey, J.W., and Stephenson, K.K. 2002. Pinostrobin from honey and Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): a potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes. Journal of agricultural and food chemistry 50: 7472-7476.
- Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M.N., McGowan, C.H., and Russell, P. 1999. Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. Molecular biology of the cell 10: 833-845.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. Yeast (Chichester, England) 11: 355-360.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. 1996. Life with 6000 genes. Science (New York, N.Y) 274: 546, 563-547.

- Hamburger, M., and Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry 30: 3864-3874.
- Hartwell, L.H. 2002. Nobel Lecture. Yeast and cancer. Bioscience reports 22: 373-394.
- Hartwell, L.H. 2004. Yeast and cancer. Bioscience reports 24: 523-544.
- Heald, R., McLoughlin, M., and McKeon, F. 1993. Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. Cell 74: 463-474.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science (New York, N.Y) 253: 905-909.
- Hughes, T.R. 2002. Yeast and drug discovery. Functional & integrative genomics 2: 199-211.
- Itharat, A., Houghton, P.J., Eno-Amooquaye, E., Burke, P.J., Sampson, J.H., and Raman, A. 2004. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. Journal of ethnopharmacology 90: 33-38.
- Jaipetch, T., Kanghae, S., Pancharoen, O., Patrick, V.A., Reutrakul, V., Tantiwachwuttikul, P., and White, A.H. 1982. Constituents of *Boesenbergia pandurata* (syn. *Kaempferia pandurata*): isolation, crystal structure and synthesis of (\pm)-boesenbergin. Australian journal of chemistry 35: 351-361.
- Jia, L.Q., Osada, M., Ishioka, C., Gamo, M., Ikawa, S., Suzuki, T., Shimodaira, H., Niitani, T., Kudo, T., Akiyama, M., et al. 1997. Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay. Molecular carcinogenesis 19: 243-253.
- Kassir, Y., Rubin-Bejerano, I., and Mandel-Gutfreund, Y. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* GSK-3 beta homologs. Current drug targets 7: 1455-1465.

- Ki, S.W., Kasahara, K., Kwon, H.J., Ishigami, K., Kitahara, T., Beppu, T., Yoshida, M., and Horinouchi, S. 2001. Radicicol binding to Swo1/Hsp90 and inhibition of growth of specific temperature-sensitive cell cycle mutants of fission yeast. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 65: 2528-2534.
- Kobayashi, Y., Mizunuma, M., Osada, H., and Miyakawa, T. 2006. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L3 as a target of curvularol, a G1-specific inhibitor of mammalian cells. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 70: 2451-2459.
- Kumar, A., Harrison, P.M., Cheung, K.H., Lan, N., Echols, N., Bertone, P., Miller, P., Gerstein, M.B., and Snyder, M. 2002. An integrated approach for finding overlooked genes in yeast. Nature biotechnology 20: 58-63.
- Kurtz, S., Luo, G., Hahnenberger, K.M., Brooks, C., Gecha, O., Ingalls, K., Numata, K., and Krystal, M. 1995. Growth impairment resulting from expression of influenza virus M2 protein in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a novel inhibitor of influenza virus. Antimicrobial agents and chemotherapy 39: 2204-2209.
- Leach, S.D., Scatena, C.D., Keefer, C.J., Goodman, H.A., Song, S.Y., Yang, L., and Pietsenpol, J.A. 1998. Negative regulation of Wee1 expression and Cdc2 phosphorylation during p53-mediated growth arrest and apoptosis. Cancer research 58: 3231-3236.
- Li, J., Wang, Y., Sun, Y., and Lawrence, T.S. 2002. Wild-type TP53 inhibits G(2)-phase checkpoint abrogation and radiosensitization induced by PD0166285, a WEE1 kinase inhibitor. Radiation research 157: 322-330.
- Licitra, E.J., and Liu, J.O. 1996. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. Proceedings of the national academy of sciences of the United states of America 93: 12817-12821.

- Lin, Y., Shi, C.Y., Li, B., Soo, B.H., Mohammed-Ali, S., Wee, A., Oon, C.J., Mack, P.O., and Chan, S.H. 1996. Tumour suppressor p53 and Rb genes in human hepatocellular carcinoma. Annals of the academy of medicine, Singapore 25: 22-30.
- Mager, W.H., and Winderickx, J. 2005. Yeast as a model for medical and medicinal research. Trends in pharmacological sciences 26: 265-273.
- McGowan, C.H., and Russell, P. 1995. Cell cycle regulation of human WEE1. The EMBO journal 14: 2166-2175.
- McPherson, M., Yang, Y., Hammond, P.W., and Kreider, B.L. 2002. Drug receptor identification from multiple tissues using cellular-derived mRNA display libraries. Chemistry & biology 9: 691-698.
- Means, A.R. 1994. Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. FEBS letters 347: 1-4.
- Middendorp, O., Ortler, C., Neumann, U., Paganetti, P., Luthi, U., and Barberis, A. 2004. Yeast growth selection system for the identification of cell-active inhibitors of beta-secretase. Biochimica et biophysica acta 1674: 29-39.
- Miyakawa, T., and Mizunuma, M. 2007. Physiological roles of calcineurin in *Saccharomyces cerevisiae* with special emphasis on its roles in G2/M cell-cycle regulation. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 71: 633-645.
- Mizuarai, S., Yamanaka, K., Itadani, H., Arai, T., Nishibata, T., Hirai, H., and Kotani, H. 2009. Discovery of gene expression-based pharmacodynamic biomarker for a p53 context-specific anti-tumor drug Wee1 inhibitor. Molecular cancer 8: 34.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T. 1998. Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. Nature 392: 303-306.

- Mongkolsuk, S., and Dean, F.M. 1964. Pinostrobin and alpinetin from *Kaempferia pandurata*. Journal of the chemical society 4654-4655.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods 65: 55-63.
- Nikoulina, S.E., Ciaraldi, T.P., Mudaliar, S., Mohideen, P., Carter, L., and Henry, R.R. 2000. Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. Diabetes 49: 263-271.
- Nurse, P. 1997. Checkpoint pathways come of age. Cell 91: 865-867.
- O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., et al. 1997. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. Cancer research 57: 4285-4300.
- Perkins, E., Sun, D., Nguyen, A., Tulac, S., Francesco, M., Tavana, H., Nguyen, H., Tugendreich, S., Barthmaier, P., Couto, J., et al. 2001. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast. Cancer research 61: 4175-4183.
- Phongpaichit, S., Subhadhirasakul, S., and Wattanapiromsakul, C. 2005. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. Mycoses 48: 333-338.
- Richard, W.S. 1985. Limitations of a random screen: Search for new anticancer drugs in higher plants Economic botany 39: 266-288.
- Russell, P., Moreno, S., and Reed, S.I. 1989. Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. Cell 57: 295-303.

- Sche, P.P., McKenzie, K.M., White, J.D., and Austin, D.J. 1999. Display cloning: functional identification of natural product receptors using cDNA-phage display. Chemistry & biology 6: 707-716.
- Schulte, T.W., Akinaga, S., Murakata, T., Agatsuma, T., Sugimoto, S., Nakano, H., Lee, Y.S., Simen, B.B., Argon, Y., Felts, S., et al. 1999. Interaction of radicicol with members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. Molecular endocrinology (Baltimore, Md) 13: 1435-1448.
- Schulte, T.W., Akinaga, S., Soga, S., Sullivan, W., Stensgard, B., Toft, D., and Neckers, L.M. 1998. Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. Cell stress & chaperones 3: 100-108.
- Sebolt-Leopold, J.S., Dudley, D.T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R.C., Teclé, H., Barrett, S.D., Bridges, A., Przybranowski, S., et al. 1999. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. Nature medicine 5: 810-816.
- Shamma, A., Doki, Y., Shiozaki, H., Tsujinaka, T., Inoue, M., Yano, M., Kimura, Y., Yamamoto, M., and Monden, M. 1998. Effect of cyclin D1 and associated proteins on proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. International journal of oncology 13: 455-460.
- Shitamukai, A., Mizunuma, M., Hirata, D., Takahashi, H., and Miyakawa, T. 2000. A positive screening for drugs that specifically inhibit the Ca²⁺-signaling activity on the basis of the growth promoting effect on a yeast mutant with a peculiar phenotype. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 64: 1942-1946.
- Sia, R.A., Bardes, E.S., and Lew, D.J. 1998. Control of Swe1p degradation by the morphogenesis checkpoint. The EMBO journal 17: 6678-6688.

- Smolarz, H.D., Mendyk, E., Bogucka-Kocka, A., and Kocki, J. 2006. Pinostrobin--an anti-leukemic flavonoid from *Polygonum lapathifolium* L. ssp. *nodosum* (Pers.) Dans. Zeitschrift fur naturforschung 61: 64-68.
- Soga, S., Shiotsu, Y., Akinaga, S., and Sharma, S.V. 2003. Development of radicicol analogues. Current cancer drug targets 3: 359-369.
- Sugimoto, K., Toyoshima, H., Sakai, R., Miyagawa, K., Hagiwara, K., Ishikawa, F., Takaku, F., Yazaki, Y., and Hirai, H. 1992. Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. Blood 79: 2378-2383.
- Sugiura, R., Sio, S.O., Shuntoh, H., and Kuno, T. 2002. Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. Genes Cells 7: 619-627.
- Sukardiman, Darwanto, A., Tanjung, M., and Darmadi, M.O. 2000. Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. Clinical hemorheology and microcirculation 23: 185-190.
- Tanaka, H., Ohshima, N., and Hidaka, H. 1999. Isolation of cDNAs encoding cellular drug-binding proteins using a novel expression cloning procedure: drug-western. Molecular pharmacology 55: 356-363.
- Trakoontivakorn, G., Nakahara, K., Shinmoto, H., Takenaka, M., Onishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Nagata, T., and Tsushida, T. 2001. Structural analysis of a novel antimutagenic compound, 4-Hydroxypanduratin A, and the antimutagenic activity of flavonoids in a Thai spice, fingerroot (*Boesenbergia pandurata* Schult.) against mutagenic heterocyclic amines. Journal of agricultural and food chemistry 49: 3046-3050.
- Voravuthikunchai, S.P., and Kitpipit, L. 2005. Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin microbiol Infect 11: 510-512.

- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast (Chichester, England) 10: 1793-1808.
- Wang, Y., Decker, S.J., and Sebolt-Leopold, J. 2004. Knockdown of Chk1, Wee1 and Myt1 by RNA interference abrogates G2 checkpoint and induces apoptosis. Cancer biology & therapy 3: 305-313.
- Wang, Y., Li, J., Booher, R.N., Kraker, A., Lawrence, T., Leopold, W.R., and Sun, Y. 2001. Radiosensitization of p53 mutant cells by PD0166285, a novel G(2) checkpoint abrogator. Cancer research 61: 8211-8217.
- Watanabe, N., Broome, M., and Hunter, T. 1995. Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. The EMBO journal 14: 1878-1891.
- Wendland, J. 2003. PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. Current genetics 44: 115-123.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiological reviews 79: 143-180.
- Wu, D., Nair, M.G., and DeWitt, D.L. 2002. Novel compounds from *Piper methysticum* Forst (Kava Kava) roots and their effect on cyclooxygenase enzyme. Journal of agricultural and food chemistry 50: 701-705.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone dextrose (YPD)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Glucose	20 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 4.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone adenine uracil dextrose (YPAUD)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Glucose	20 กรัม
Adenine	400 มิลลิกรัม
Uracil	200 มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast peptone adenine uracil dextrose (YPAUD agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD ละลายอะการ์ 20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast peptone adenine uracil dextrose soft agar (YPAUD soft agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ละลายอะการ์ 7 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว synthetic complete medium (SC medium)

Yeast nitrogen base without amino acid	6.7 กรัม
Glucose	20 กรัม
10 x amino acid without uracil	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 4.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Synthetic complete medium (SC medium agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SC medium ละลายอะการ์ 20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone galactose (YPGal)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Galactose	20 กรัม
Raffinose	10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 4.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone (YP)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Raffinose	10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

20% galactose

Galactose	20 กรัม
H ₂ O	100 มิลลิลิตร

10 x amino acid without uracil

Adenine sulfate	200 มิลลิกรัม
L-Tryptophan	200 มิลลิกรัม
L-Histidine HCl	200 มิลลิกรัม
L-Argine HCl	200 มิลลิกรัม
L-Methionine	200 มิลลิกรัม
L-Tyrosine	300 มิลลิกรัม
L-Leucine	1000 มิลลิกรัม
L-Isoleucine	300 มิลลิกรัม
L-Lysine HCl	300 มิลลิกรัม
L-Phenylalanine	500 มิลลิกรัม
L-Glutamic acid	1000 มิลลิกรัม
L-Aspartic acid	1000 มิลลิกรัม
L-Valine	1500 มิลลิกรัม
L-Threonine	2000 มิลลิกรัม
L-Serine	4000 มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ผงสำเร็จรูป	10.4 กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1N ปรับให้ได้ ปริมาตร 1 ลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านหัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมครอนเมตร ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อขวดละ 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพัน พาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10% (working reagent) สำหรับเลี้ยงเซลล์มะเร็ง A375, SW620, Kato III, HepG2, BT474, THP-1, Jurkat and Ca-Ski

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (stock reagent)	90 มิลลิลิตร
ซีรัม (inactivated fetal bovine serum)	10 มิลลิลิตร
penicillin G (10^6 U/ml)	10 ไมโครลิตร
streptomycin (500 mg/ml)	50 ไมโครลิตร
HEPES	1 มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 High glucose ที่มี Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10% (working reagent) สำหรับเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HL-60

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 High glucose	90 มิลลิลิตร
ซีรัม (inactivated fetal bovine serum)	10 มิลลิลิตร
Penicillin G (10^6 U/ml)	10 ไมโครลิตร
Streptomycin (500 mg/ml)	50 ไมโครลิตร
HEPES	1 มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ผงสำเร็จรูป	9.5 กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1N ปรับให้ได้
ปริมาตร 1 ลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านหัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อขนาด 0.22
ไมโครเมตร ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อขวดละ 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพัน
พาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10% (working reagent)

สำหรับเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HeLa และ SiHa

อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (stock reagent)	90 มิลลิลิตร
ซีรัม (inactivated fetal bovine serum)	10 มิลลิลิตร
Penicillin G (10^6 U/ml)	10 ไมโครลิตร
Streptomycin (500 mg/ml)	50 ไมโครลิตร
HEPES	1 มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM + NAA ที่มี Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10% (working reagent)

สำหรับเลี้ยงเซลล์มะเร็ง MDA MB 231

อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (stock reagent)	90 มิลลิลิตร
ซีรัม (inactivated fetal bovine serum)	10 มิลลิลิตร
Penicillin G (10^6 U/ml)	10 ไมโครลิตร
Streptomycin (500 mg/ml)	50 ไมโครลิตร
HEPES	1 มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1 มิลลิลิตร
Non essential amino acid	1 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง

อาหารเลี้ยงเซลล์ (working reagent)	9 มิลลิลิตร
DMSO	1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมาหนึ่งชาม่าเชื่อมด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหนึ่งชาม่าเชื่อมซ้ำอีก 2 รอบ

สารละลาย Tris-HCl 1 M ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Trisma base	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มิลลิลิตร

ละลาย Trisabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งชาม่าเชื่อมด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA 0.5 M ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

EDTA	186.1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งชาม่าเชื่อมด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Tris-HCl	10 มิลลิโมลาร์
EDTA	1 มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งชาม่าเชื่อมด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242 กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1 มิลลิลิตร

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 100 มิลลิลิตร ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุ จนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

High extraction buffer

Tris-HCl, pH 8.0	250 มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA, pH 8.0	50 มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	125 มิลลิโมลาร์
น้ำปลอดประจุ	

สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมผงไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ดูดชั้นฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-เบสให้ได้เท่ากับ 7.8 (ใช้ pH paper วัด) ถ้ายังไม่ได้ให้ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8.0 ลงไปอีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง เติบบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25 : 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Loading dye

Bromphenolblue 0.025%

ซูโครส 40%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายโซเดียมอะซีเตท 3 M ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย RNase A 10 mg/ml

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

70% เอทานอล

99% เอทานอล 700 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปลอดประจุ 300 มิลลิลิตร

สารละลาย 50% PEG

ผสมสารละลาย PEG 50 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อกับน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย carrier DNA 2 mg/ml

ละลาย ดีเอ็นเอที่มีมวลโมเลกุลสูง (Deoxyribonuclei acid Sodium salt Type III from salmon testes) น้ำหนัก 2 มิลลิกรัมในน้ำให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

บัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS, Ca^{2+} , Mg^{2+} Free) ความเป็นกรด-เบส 7.4

NaCl	8.0 กรัม
KCl	0.2 กรัม
NaHPO ₄	1.44 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย MTT 5 mg/ml ใน PBS

MTT 50 มิลลิกรัม

PBS (สำหรับทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่านั้น) 10 มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อผสมให้เข้ากัน กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ที่ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มด้วยแผ่นฟอยด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ MTT เป็นสารก่อมะเร็ง ต้องสวมถุงมือก่อนชั่งหรือเตรียมสารทุกครั้ง

สารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol

นำ volume metric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมไอโซโพรพานอล จำนวน 80 มิลลิลิตร เติม HCl 0.331 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยไอโซโพรพานอล เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 0.5 M EGTA

ละลาย EGTA จำนวน 9.52 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 5 M NaCl

ละลาย NaCl จำนวน 14.625 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 1 M Dithiothreitol (DTT)

ละลาย DTT จำนวน 3.09 กรัม ใน Sodium acetate ความเข้มข้น 0.01 M pH 5.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรอง (filter disc) ขนาด 0.22 ไมโครเมตรแบ่งใส่หลอดไมโครเซนติพีทจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย 1 M Tris-HCl (ค่าความเป็นกรด-เบส 7.2)

ละลาย Tris-HCl จำนวน 15.76 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 7.2 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Buffer A สำหรับสกัดโปรตีน

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	0.5 มิลลิลิตร
0.1 M EDTA (pH 8.0)	0.5 มิลลิลิตร
0.5 M EGTA (pH 8.0)	0.2 มิลลิลิตร
5 M NaCl	0.05 มิลลิลิตร

100% Tween20	0.005 มิลลิลิตร
100% glycerol	1 มิลลิลิตร
ddH ₂ O	7.745 มิลลิลิตร

สารละลาย Buffer B สำหรับสกัดโปรตีน

Buffer A	690 ไมโครลิตร
10% SDS	200 ไมโครลิตร
10x protease inhibitor	100 ไมโครลิตร
Phosphatase	10 ไมโครลิตร
1 M DTT	1 ไมโครลิตร

สารละลาย BCATM protein assay

สารละลาย A	50 ส่วน
สารละลาย B	1 ส่วน

สารละลาย 1.5 M Tris ความเป็นกรด-เบส 8.8

ละลาย trisma base จำนวน 90.855 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 8.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น เวลา 15 นาที

สารละลาย 1 M Tris ความเป็นกรด-เบส 6.8

ละลาย trisma base จำนวน 12.114 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 6.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 10% SDS

ละลาย SDS (Sodium dodecyl sulfate) จำนวน 5 กรัมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 40 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.2 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 50 มิลลิลิตร

สารละลาย 10% Ammonium persulfate (APS)

ละลาย Ammonium persulfate จำนวน 0.5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.5% Separating gel

ddH ₂ O	3.836 มิลลิลิตร
40% Acrylamide	1.5 มิลลิลิตร
1.5 M Tris pH 8.8	2.0 มิลลิลิตร
10% SDS	0.08 มิลลิลิตร
10% APS	0.08 มิลลิลิตร
TEMED	0.004 มิลลิลิตร

5% stacking gel

ddH ₂ O	1.204 มิลลิลิตร
40% Acrylamide	0.25 มิลลิลิตร
1 M Tris pH 6.8	0.504 มิลลิลิตร
10% SDS	0.02 มิลลิลิตร
10% APS	0.02 มิลลิลิตร
TEMED	0.002 มิลลิลิตร

สารละลาย 5x Running buffer

trisma base	15.1 กรัม
glycine	94 กรัม
SDS	5 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกระบอกลงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 2x loading buffer

10% SDS	4 มิลลิลิตร
Glycerol 87%	2.29 มิลลิลิตร
1.0 M Tris pH 6.8	1 มิลลิลิตร
ddH ₂ O	2.71 มิลลิลิตร
Bromphenol blue	0.001 กรัม

สารละลาย Staining buffer

β -mercapto ethanol	100 ไมโครลิตร
2x loading buffer	900 ไมโครลิตร

สารละลาย Transfer buffer

Glycine	2.9 กรัม
Trisma base	15.1 กรัม
SDS	0.37 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ 700 มิลลิลิตร เติมนิโคตอแลนอแลนจำนวน 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 10x Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	80.0 กรัม
KCl	2.0 กรัม
NaHPO ₄	14.4 กรัม
KH ₂ PO ₄	2.4 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกลงจน

ครบ 1000 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Phosphate buffer saline tween20 (PBST)

1x Phosphate buffer	1 ลิตร
Tween 20	0.5 มิลลิลิตร

สารละลาย Blocking solution (PBST in 3% non-fat dry milk)

PBST	200 มิลลิลิตร
skim milk	6 กรัม

ECL Western blot reagent

สารละลาย 1	2 มิลลิลิตร
สารละลาย 2	2 มิลลิลิตร

น้ำยาล้างฟิล์ม

Developer	1 ส่วน : น้ำ 4 ส่วน
Fixer	1 ส่วน : น้ำ 4 ส่วน

น้ำปลอด RNAase (DEPC water)

เติมสารละลาย Diethylpyrocarbonate (DEPC) 10 ไมโครลิตรลงในน้ำ HPLC ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 70% Ethanol in DEPC water

Absolute Ethanol	70 มิลลิลิตร
DEPC water	30 มิลลิลิตร

สารละลาย 50x TAE buffer

Tris base acetate	48.4 กรัม
-------------------	-----------

Garcial acetic acid	11.42 มิลลิลิตร
---------------------	-----------------

0.5 M EDTA pH 8.0	20 มิลลิลิตร
-------------------	--------------

นำแต่ละส่วนค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1% Agarose gel

สารละลาย 1x TAE buffer	20 มิลลิลิตร
------------------------	--------------

Agarose gel	0.2 กรัม
-------------	----------

2% Agarose gel

สารละลาย 1x TAE buffer	20 มิลลิลิตร
------------------------	--------------

Agarose gel	0.4 กรัม
-------------	----------

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ผล

1. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Swe1 ด้วย Western blot

การคำนวณ

1. นำฟิล์ม X-ray ที่ต้องการวิเคราะห์ผลมาสแกนรูปโดยเซฟในรูป TIF ไฟล์
2. นำรูปที่ได้มาคำนวณหาความเข้มแบนโปรตีน ด้วยโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.1.4 ของบริษัท Bio-Rad, USA จะได้ค่า Adjust Volume ($\text{INT} \cdot \text{mm}^2$)
3. ทำการปรับค่าความเข้มแบนให้มีการแสดงออกของ reference gene เท่าๆกัน เพื่อสามารถเปรียบเทียบค่าความเข้มได้ ดังสมการ

$$\text{Intensity} = \text{Adjust Volume Swe1 (target)} / \text{Adjust Volume Cdc28 (reference)}$$

4. เปรียบเทียบค่าการแสดงออกของโปรตีน target ระหว่างชุดควบคุม และชุดทดลอง ดังสมการ

$$\text{Fold induction} = \text{Intensity pinostrobin (sample)} / \text{Intensity DMSO (control)}$$

2. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน SWE1 ด้วย real-time RT-PCR

การคำนวณ

1. ทำการปรับค่า CP ให้มีการแสดงออกของ reference gene เท่าๆกัน เพื่อสามารถเปรียบเทียบค่า CP target gene ได้ ดังสมการ

$$\Delta \text{CP} = \text{CP SWE1 (target)} - \text{CP ACT1 (reference)}$$

2. ทำการหาค่า CP ที่แตกต่างกันระหว่างชุดควบคุม และชุดทดลอง ดังสมการ

$$\Delta\Delta \text{CP} = \Delta \text{CP pinostrobin (sample)} - \Delta \text{CP DMSO (control)}$$

3. นำ $\Delta\Delta$ CP ที่ได้มาเข้าสู่สูตร 2^n ซึ่งเป็นค่า โดยที่ n คือ จำนวนรอบของการทำ PCR
 ดังนั้นจะได้

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์ของ} = 2^{(-\Delta\Delta \text{ CP})}$$

ตารางที่ ค1 วิเคราะห์ผลของพินอสโตรบินต่อการแสดงออกของยีน SWE1 ด้วย SPSS v16.0

Group Statistics					
time=0 min	cell	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
expression	DMSO	3	1.0085	0.15195	0.08773
	Pinostrobin	3	1.2145	0.08958	0.05172

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	1.606	0.274	-2.02	4	0.113	-0.20606	0.10184	-0.489	0.0767
	Equal variances not assumed			-2.02	3.24	0.129	-0.20606	0.10184	-0.517	0.1049

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	99.9% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	1.606	0.274	-2.02	4	0.113	-0.20606	0.10184	-1.083	0.6708
	Equal variances not assumed			-2.02	3.24	0.129	-0.20606	0.10184	-1.369	0.9567

Group Statistics

Time=30min	cell	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
expression	DMSO	3	0.3763	0.01308	0.00755
	Pinostrobin	3	0.692	0.03227	0.01863

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	4.708	0.096	-15.7	4	0	-0.31565	0.0201	-0.371	-0.26
	Equal variances not assumed			-15.7	2.64	0.001	-0.31565	0.0201	-0.385	-0.246

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	99.9% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	4.708	0.096	-15.7	4	0	-0.31565	0.0201	-0.489	-0.143
	Equal variances not assumed			-15.7	2.64	0.001	-0.31565	0.0201	-0.644	0.0128

Group Statistics

Time=60min	cell	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
expression	DMSO	3	2.2393	0.10481	0.06051
	Pinostrobin	3	1.4658	0.04923	0.02842

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	2.493	0.189	11.57	4	0	0.77353	0.06686	0.5879	0.9592
	Equal variances not assumed			11.57	2.841	0.002	0.77353	0.06686	0.5539	0.9932

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	99.9% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	2.493	0.189	11.57	4	0	0.77353	0.06686	0.1979	1.3492
	Equal variances not assumed			11.57	2.841	0.002	0.77353	0.06686	-0.177	1.7237

Group Statistics

Time=90min	cell	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
expression	DMSO	3	1.0698	0.02359	0.01362
	Pinostrobin	3	0.2949	0.01951	0.01126

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	0.128	0.739	43.85	4	0	0.77488	0.01767	0.7258	0.824
	Equal variances not assumed			43.85	3.864	0	0.77488	0.01767	0.7251	0.8246

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	99.9% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	0.128	0.739	43.85	4	0	0.77488	0.01767	0.6227	0.927
	Equal variances not assumed			43.85	3.864	0	0.77488	0.01767	0.6163	0.9334

Group Statistics

Time=120min	Cell	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
expression	DMSO	3	1.7623	0.11725	0.06769
	Pinostrobin	3	0.9937	0.05837	0.0337

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	3.09	0.154	10.17	4	0.001	0.76868	0.07562	0.5587	0.9786
	Equal variances not assumed			10.17	2.934	0.002	0.76868	0.07562	0.5249	1.0124

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	99.9% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	3.09	0.154	10.17	4	0.001	0.76868	0.07562	0.1176	1.4198
	Equal variances not assumed			10.17	2.934	0.002	0.76868	0.07562	-0.247	1.784

Group Statistics

Time=150min	cell	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
expression	DMSO	3	1.4099	0.0772	0.04457
	Pinostrobin	3	1.4872	0.04217	0.02434

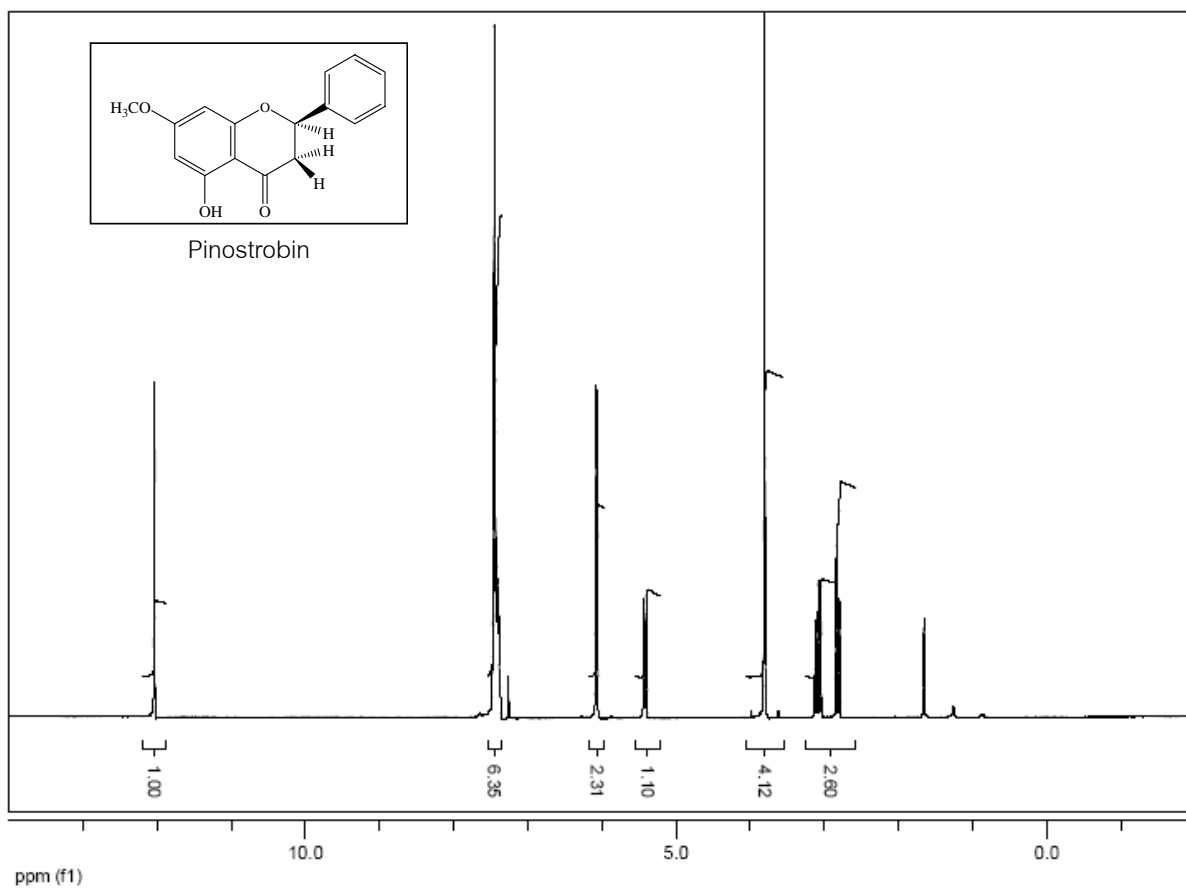
Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	2.136	0.218	1.52	4	0.203	-0.07727	0.05078	-0.218	0.0637
	Equal variances not assumed			1.52	3.096	0.223	-0.07727	0.05078	-0.236	0.0816

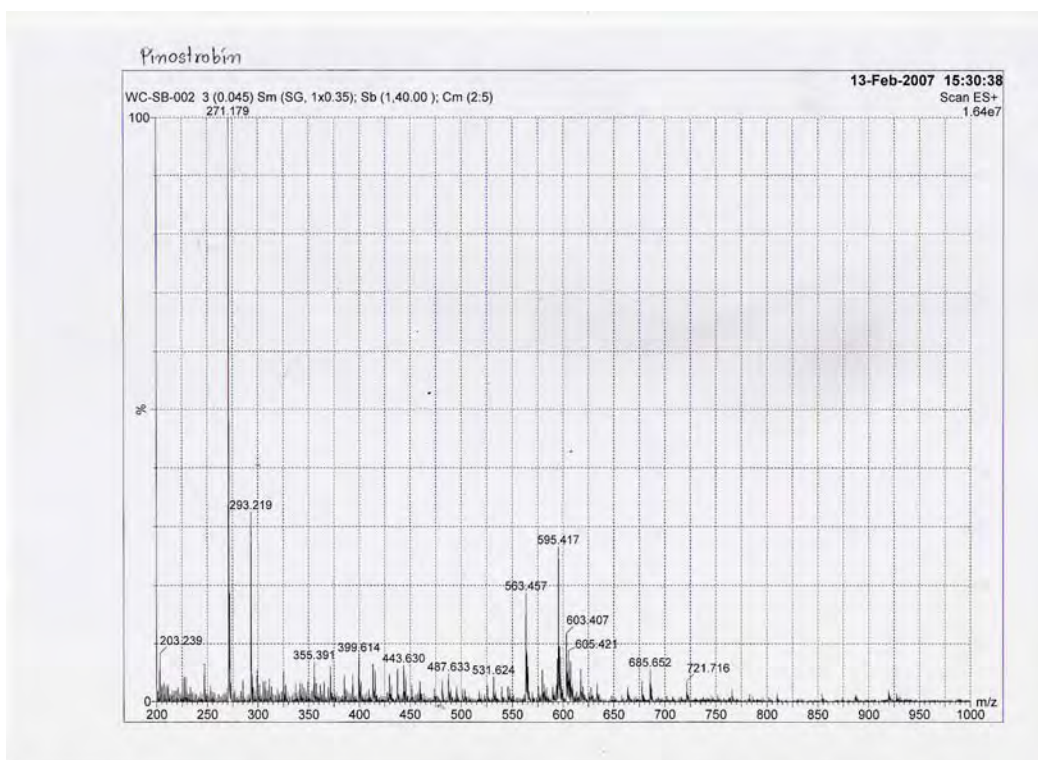
Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	99.9% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
expression	Equal variances assumed	2.136	0.218	1.52	4	0.203	-0.07727	0.05078	-0.515	0.36
	Equal variances not assumed			1.52	3.096	0.223	-0.07727	0.05078	-0.7	0.5458

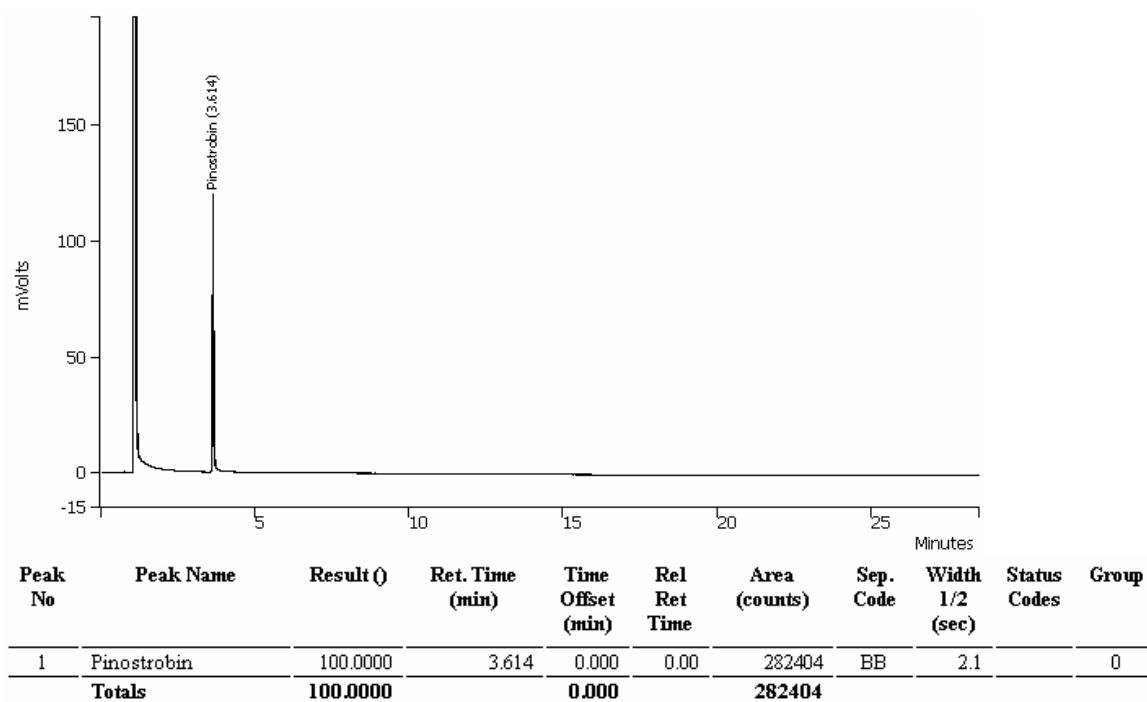
ภาคผนวก ง



ภาพที่ ง1 ผลวิเคราะห์โครงสร้างของพิโนสโตรบิน ด้วย NMR



ภาพที่ ๓2 ผลวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพินอสโตรบิน ด้วย LC-MS



ภาพที่ ๓3 ผลวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพินอสโตรบิน ด้วย GC

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสิรินพร สุขสวัสดิ์อำนาจ เกิดเมื่อวันที่ 21 ธันวาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2548 และเข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549

ผลงานทางวิชาการ

Suksawatamnuay, S., Wangkangwan, W., Palaga, T., Boonkerd, S., Chavasiri, W., Miyakawa, T. and Yompakdee, C. Mode of action of pinostrobin from *Boesenbergia pandurata* that suppresses the Ca²⁺-signal mediated cell-cycle regulation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. The 20th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology: Biotechnology for Health Care; 2008 October 14-17, Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand.

Yompakdee, C., Suksawatamnuay, S., Wangkangwan, W., Palaga, T., Boonkerd, S., Chavasiri, W., and Miyakawa, T. Pinostrobin from *Boesenbergia pandurata* inhibits Ca²⁺-signal-dependent growth regulation in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by inhibition of Swe1 kinase accumulation. The 27th Annual Meeting of the International Specialized Symposium on Yeasts; 2009 September 26-29, Institute Pasteur, Paris, France.