

การแสดงออกของยีนไกลโคซิเลชันเอนไซม์ของคนในยีสต์
Expression of Human Glycosylation Enzyme Gene in Yeast

วรรณิ ชยานันต์นุกูล
Wanne Chayanunnukul

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Biological Sciences
Prince of Songkla University

2541

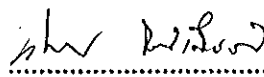
๐

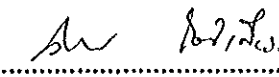
เลขที่	๐๕๔๓๑	๐๓๑	๒๕๔๑	๘.๒
Bib Key	1528๓๒			

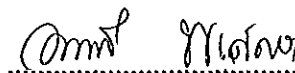
ชื่อวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนไกลโคซิเลชันเอนไซม์ของคนในยีสต์
ผู้เขียน นางสาววรรณิ ชยานันต์นุกูล
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

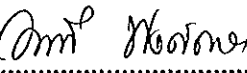
คณะกรรมการที่ปรึกษา

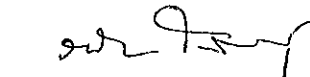
คณะกรรมการสอบ



.....ประธานกรรมการ
(ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ)


.....ประธานกรรมการ
(ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

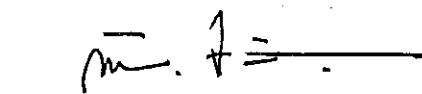

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์คารา)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์คารา)


.....กรรมการ
(ดร. รพีพร สอดธิพันธุ์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศร รัตนพันธ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้แนบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนไกลโคซิเลชันเอนไซม์ของคนในยีสต์
ผู้เขียน นางสาววรรณิ ชยานันต์นุกูล
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

Sialic acid ที่ปลายของสายโพลิไกลิโคแซคคาไรด์ของไกลโคโปรตีนมีหน้าที่สำคัญหลายชนิด ตัวอย่างเช่น ปฏิกริยาทางชีวภาพ receptor binding และยึดอายุของไกลโคโปรตีนในร่างกาย เนื่องจากการผลิต recombinant glycoproteins จากยีสต์จะไม่มี sialic acid ดังนั้นการโคลนยีนของ Sialyltransferase จากคนเพื่อมาแสดงออกในยีสต์จะเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยในการแก้ปัญหา ยีนของ Sialyltransferase ขนาดประมาณ 1.34 กิโลเบสได้ถูกโคลนเข้าดีเอ็นเอพลาสมิด 2 ชนิด คือ pPIC9 และ pPIC3.5 แล้วนำมาแสดงออกในยีสต์ ยีน Sialyltransferase ที่เข้าสู่สอคแทรกในโครโมโซมของยีสต์ได้วิเคราะห์โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Southern blotting การแสดงออกของยีนชนิดนี้ได้วิเคราะห์โดยการหาอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Northern blotting พบว่ามีขนาด 1.9 กิโลเบส ปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase ที่ได้จากการแสดงออกของยีนได้ค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1.02 pmol/min/mg.protein ในน้ำเลี้ยงยีสต์ ST-pPIC9 ที่เหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการแสดงออก สำหรับยีสต์ ST-pPIC3.5 มีค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.37 pmol/min/mg.protein ในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้เอนไซม์ Sialyltransferase ยังมีความสามารถในการย้าย fluoresceinyl-NeuAc เข้าสู่ไกลโคโปรตีนของยีสต์ ST-pPIC9 และยีสต์ ST-pPIC3.5 มีค่าเท่ากับ 20.85 และ 36.9 pmol/mg.protein ตามลำดับ

Thesis Title Expression of Human Glycosylation Enzyme Gene in Yeast
Author Miss. Wanne Chayanunnukul
Major Program Biological Sciences
Academic Year 1998

Abstract

Terminal sugar, namely sialic acid in oligosaccharide of glycoprotein plays several important roles on glycoprotein function for example biological activity, receptor binding and prolong metabolic half-life. Since recombinant glycoproteins produced from yeast lack of sialic acid therefore manipulation of yeast cell to have ability to transfer sialic acid to glycoprotein whereby cloning of Sialyltransferase gene (ST) into yeast is one way to approach the problem. Human Sialyltransferase gene which is 1.34 kbs in length was cloned into two expression vectors; pPIC9 and pPIC3.5 then expressed in *Pichia pastoris*. The integrated Sialyltransferase gene in *Pichia pastoris* was detected by Polymerase Chain Reaction and Southern blotting. In addition, RNA of the enzyme gene in yeast analysed by Northern blotting was found about 1.9 kbs in length. The activity of Sialyltransferase enzyme in culture medium of *Pichia* ST-pPIC9 was 1.02 pmol/min/mg.protein, while the activity of the enzyme in cytoplasm of *Pichia* ST-pPIC3.5 was 0.37 pmol/min/mg.protein. Moreover, the Sialyltransferase enzyme in the cytoplasm of both *Pichia* ST-pPIC9 and *Pichia* ST-pPIC3.5 had the ability to transfer fluoresceinyl-NeuAc into the glycoproteins of the cells of yeast as 20.85 and 36.9 pmol/mg.protein, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่
กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไป
ด้วยดี ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์คารา กรรมการที่ปรึกษา
ร่วมที่ได้ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ
ดร. รพีพร โสคติพันธุ์ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีวเคมี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
อดิศร รัตนพันธ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทาน
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุน
ในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและ
เป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุก ๆ ท่านที่กรุณาให้คำ
แนะนำและอบรมสั่งสอน ขอขอบคุณเพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่มีได้กล่าวนามไว้ ณ. ที่นี้
ที่ให้กำลังใจและมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

วรรณิ ชยานันต์นุกูล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(3)
Abstract.....	(4)
กิตติกรรมประกาศ.....	(5)
สารบัญ.....	(6)
รายการรูป.....	(7)
รายการตาราง.....	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์.....	(10)
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	4
วัตถุประสงค์.....	25
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ.....	26
อุปกรณ์.....	29
วิธีการ.....	30
3. ผลการทดลอง.....	47
4. อภิปรายผลการทดลอง.....	72
5. สรุปผลการทดลอง.....	81
เอกสารอ้างอิง.....	83
ภาคผนวก.....	91
ประวัติผู้เขียน.....	103

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1.1 การแปลรหัสพันธุกรรมจากอาร์เอ็นเอส่งข่าวเป็นลำดับของโปรตีน	5
1.2 โครงสร้างทางเคมีแบบ N-glycosidic linkage ต่อกับกรดอะมิโน Asparagine	9
1.3 โครงสร้างทางเคมีแบบ O-glycosidic linkage ต่อกับกรดอะมิโน Serine และ 5-hydroxylysine	10
1.4 โครงสร้างของ N-linked oligosaccharide แบบ high mannose	12
1.5 โครงสร้างของ N-linked glycosylation แบบ Complex	13
1.6 โครงสร้างของ N-linked glycosylation ชนิด Hybrid type	14
3.1 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน Sialyltransferase ในเวกเตอร์ pBluescript SK เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ วิเคราะห์บน 1% agarose gel	56
3.2 แสดงแบบแผนโครงสร้างของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ที่ได้จากการโคลนยีน Sialyltransferase เข้าเชื่อมกับเวกเตอร์ pPIC9	57
3.3 ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 จากการโคลนยีน Sialyltransferase ในแบคทีเรีย <i>E.coli</i> วิเคราะห์บน 1 % agarose gel electrophoresis	58
3.4 แสดงแบบแผนโครงสร้างของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ที่ได้จากการโคลนยีน Sialyltransferase เข้าเชื่อมกับเวกเตอร์ pPIC3.5	59
3.5 ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 จากการโคลนยีน Sialyltransferase ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> วิเคราะห์บน 1 % agarose gel electrophoresis	60
3.6 แสดงขนาดดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 โดยย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ <i>XbaI</i> กับ <i>AccIII</i>	61
3.7 แสดงลำดับเบสของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 โดยมีตำแหน่ง start codon (ATG) บนยีน Sialyltransferase ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC9	62

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.8 แสดงลำดับเบสของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 โดยมีตำแหน่ง start codon (ATG) บนยีน Sialyltransferase ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC3.5	63
3.9 ลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ที่เข้าสู่อดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ GS 115 โดยปลายทั้งสองด้านของยีน HIS4 ของ ST-pPIC9 จะเข้าสู่อดแทรกในตำแหน่ง his4 ของยีสต์ GS 115	64
3.10 โครงสร้างของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ที่เข้าสู่อดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ GS 115 โดยปลายทั้งสองด้านของยีน HIS4 ของ ST-pPIC3.5 จะเข้าสู่อดแทรกในตำแหน่ง his4 ของยีสต์ GS 115	65
3.11 ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 ที่แทรกอยู่ในโครโมโซมของยีสต์ วิเคราะห์โดยวิธี PCR	66
3.12 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant Sialyltransferase gene) ในยีสต์โดยวิธี Southern blotting	67
3.13 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant Sialyltransferase gene) ในยีสต์ โดยวิธี Northern blotting	68
3.14 แบบแผนการแยก Asialofetuin-fluoresceinyl-NeuAc ของยีสต์ ST-pPIC9 ออกจาก CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc โดยคอลัมน์ Sephadex G-50 ขนาด 0.4X12.5 ซม. และชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6 อัตราการชะ 0.5 มล/นาที	69
3.15 แบบแผนการแยก Asialofetuin-fluoresceinyl-NeuAc ของยีสต์ ST-pPIC3.5 ออกจาก CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc โดยคอลัมน์ Sephadex G-50 ขนาด 0.4X12.5 ซม. และชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6 อัตราการชะ 0.5 มล/นาที	70

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 หน้าที่และตัวอย่างของไกลโคโปรตีน	6
1.2 ตัวอย่างของไกลโคโปรตีนที่มีลักษณะแบบ O-glycosidic linked	12
1.3 ไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วย Sialic acid ในโครงสร้างสายโซ่น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์	17
1.4 ปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase ในเนื้อเยื่อหลายชนิดของหนู	18
1.5 สารประกอบโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่ผลิตเป็นคีเอ็นเอลูกผสมได้โดยการเลี้ยงในเซลล์สัตว์	24
2.1 ปฏิริยาการย่อยคีเอ็นเอ Sialyltransferase (ST) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด และ 2 ชนิด	31
2.2 ปฏิริยาการย่อย Recombinant DNA (ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด	36
2.3 การเตรียม reaction mixture ของคีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)	40
2.4 สภาวะที่ทำปฏิริยา PCR	40
3.1 ปริมาณของ fluoresceinyl-NeuAc ของ ยีสต์ GS 115, ยีสต์ ST-pPIC9 และยีสต์ ST-pPIC3.5	71

ตัวย่อและสัญลักษณ์

α	=	alpha
β	=	beta
γ	=	gamma
μM	=	micromolar
μl	=	microlitre
pmole	=	picomole
bp	=	basepair
kb	=	Kilobase
Asn	=	Asparagine
Fuc	=	Fucose
Gal	=	Galactose
Glc	=	Glucose
GlcNAc	=	N-acetylglucosamine
GalNAc	=	N-acetylgalactosamine
Man	=	Mannose
Sial	=	Sialic acid
Hyl	=	Hydroxylysine
Hpr	=	Hydroxyproline
Thr	=	Threonine
Ser	=	Serine
Are	=	Arabinose
Xyl	=	Xylose

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

DIG	=	Digoxigenin
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
RNA	=	Ribonucleic acid
mRNA	=	Messenger ribonucleic acid
tRNA	=	Transfer ribonucleic acid
NeuAc	=	N-acetylneuraminic acid
CMP	=	Cytidine-5'-monophosphate
CTP	=	Cytidine-5'-triphosphate
NBT	=	Nitroblue tetrazolium
BCIP	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
PMSF	=	Phenylmethylsulfonylfluoride
DEPC	=	Diethylpyrocarbonate
DTT	=	Dithiothreitol
tPA	=	Tissue plasminogen activator
FSH	=	Follicle stimulating hormone
PBS	=	Phosphate buffer saline

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำตั้งเรื่อง

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางวิชาการด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์เข้ามามีบทบาทต่อการพัฒนาความรู้ทุกสาขาวิชาทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มีการประยุกต์ใช้เทคนิคด้านนี้เพื่อศึกษากลไกหรือกระบวนการต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการแพทย์ จากกลไกการตัดต่อยีนหรือการโคลนยีนนั้น วัตถุประสงค์อย่างหนึ่งคือพยายามให้ยีนนั้นแสดงออกหรือสร้างผลผลิตได้ในเซลล์ผู้รับ (เซลล์เจ้าบ้าน) เช่นแบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและพืช ซึ่งผลผลิตจากยีนเดียวกันที่ได้จากเซลล์แบคทีเรียจะแตกต่างจากเซลล์ยีสต์ เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและพืช ในแบคทีเรียไม่มีกระบวนการ Post-translation modification โดยเฉพาะกระบวนการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งในกลุ่มกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายหลังการแปลรหัสโปรตีน ส่วนในยีสต์ พืช และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบกระบวนการ Post-translation modification โดยเฉพาะกระบวนการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) ซึ่งเป็นขั้นตอนการเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในสายโซ่น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์บนสายโพลีเปปไทด์ที่บริเวณด้านนอก (side chain) โดยในยีสต์จะมีการเติมน้ำตาล Mannose (Man) (Herscovics and Orlean, 1993) ขณะที่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีการเติมน้ำตาลหลายชนิด เช่น Glucose (Glu) Fucose (Fuc) Galactose (Gal) และ Sialic acid (Sial) ในสายโซ่น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์บนสายโพลีเปปไทด์ (Komfeld, 1985) ได้เป็นสารประกอบไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) และไกลโคลิปิด (Glycolipid) ที่สมบูรณ์ ไกลโคโปรตีนหลายชนิดในปัจจุบันได้ถูกใช้ในการรักษาโรค เช่น Factor VIII เป็นสารซึ่งใช้ในการทำให้เลือดแข็งตัว (Toole et al., 1986) Erythropoietin จะใช้กระตุ้นให้มีการสร้างเม็ดเลือดแดงมากขึ้น (Dube et al, 1988)

Tissue plasminogen activator (tPA) ช่วยละลายก้อนเลือดเมื่อมีการอุดตันในกระแสเลือด (Collen *et al.*, 1986) การทำงานของไกลโคโปรตีนเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสายโซ่น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์โดยเฉพาะ Sialic acid ตัวอย่าง เช่น Follicle stimulating hormone (FSH) จะสูญเสียความสามารถทางชีวภาพ (biological activity) ไปเมื่อไม่มี Sialic acid (Vaitukaitis and Ross, 1971)

ในปัจจุบันถึงแม้ว่าเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมสามารถผลิตไกลโคโปรตีนลูกผสม ซึ่งเป็นการผลิตจากเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นเซลล์สัตว์ได้ โดยไกลโคโปรตีนที่ได้สามารถมีปฏิกิริยาทางชีวภาพเหมือนสภาพธรรมชาติ โดยไม่จำเป็นต้องสกัดสารไกลโคโปรตีนชนิดนั้น ๆ จากพืชและสัตว์ในธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ดีการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (animal cell culture) จะต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญสูง ความระมัดระวังมากและค่าใช้จ่ายในการผลิตจำนวนมาก การหาเซลล์เจ้าบ้านชนิดใหม่ที่มีการดูแลและค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำ หากแต่สามารถนำไปผลิตสารไกลโคโปรตีนที่มีประสิทธิภาพได้จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ยืดหยุ่นโดยทั่วไปสามารถเกิดกระบวนการไกลโคซิเลชันได้ แต่ไม่มีน้ำตาล Sialic acid (Puhler, 1993) แต่เนื่องจาก Sialic acid มีความสำคัญและจำเป็นสำหรับปฏิกิริยาทางชีวภาพของสารไกลโคโปรตีนต่าง ๆ หลายชนิด เช่น Follicle stimulating hormone (Vaitukaitis and Ross, 1971) Hormone chorionic gonadotropin (Green *et al.*, 1988) Thyroid stimulating hormone (Fasman, 1989) และ Tissue plasminogen activator (Collen *et al.*, 1988) ดังนั้นการปรับปรุงยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่มีกระบวนการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) และมีน้ำตาล Sialic acid อยู่ จึงควรมีประโยชน์สำหรับการผลิตไกลโคโปรตีนลูกผสมในอนาคตต่อไป

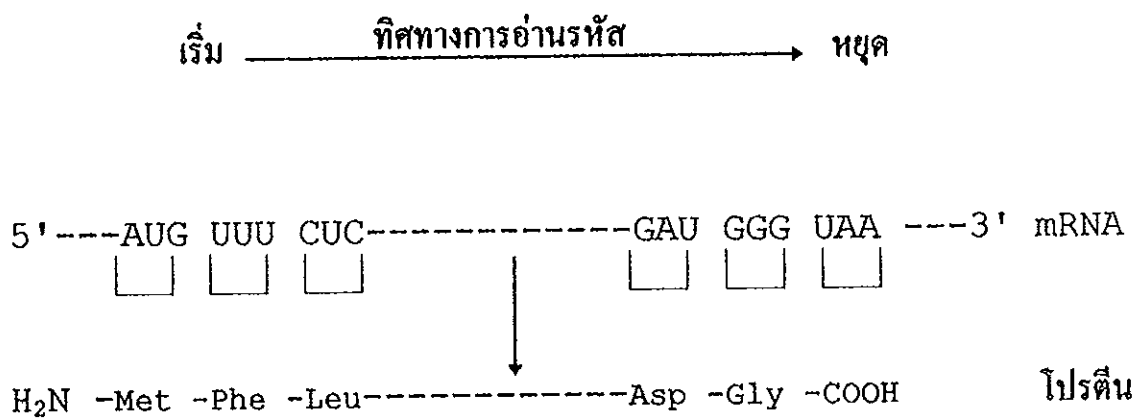
งานวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนในกระบวนการไกลโคซิเลชันโดยเฉพาะ Sialyltransferase gene ซึ่งเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ Sialyltransferase ที่ใช้ในการย้าย Sialic acid ไปยังโอลิโกแซคคาไรด์ในยีสต์ เพื่อจะได้ยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่มีการสอดแทรกยีนของกระบวนการไกลโคซิเลชันเอนไซม์คือ Sialyltransferase gene เข้าไปในโครโมโซมของยีสต์ ยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้นี้จะสามารถใช้เป็นแหล่งผลิตสารไกลโคโปรตีนชนิดต่างๆที่ใช้ในทางการแพทย์ โดยไกลโคโปรตีนที่ได้จะมี Sialic acid

บนสายโซ่น้ำตาลของไกลโคโปรตีน คล้ายคลึงกับไกลโคโปรตีนที่ผลิตจากคนและสัตว์
อันจะเป็นผลทำให้สารไกลโคโปรตีนนั้นมีปฏิกิริยาทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ เหมือน
ที่สกัดได้จากธรรมชาติ การผลิตสารไกลโคโปรตีนที่มีคุณภาพจากยีสต์ได้ ทำให้
ประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้มากกว่าการผลิตจากเซลล์สัตว์ ผลจากการวิจัยนี้ นอก
จากได้ยีสต์สายพันธุ์ใหม่แล้วยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำไปใช้ในการผลิต
สารโปรตีนชนิดต่าง ๆ หรือนำไปประยุกต์ ใช้ในงานทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่
สำคัญต่อไปในอนาคตได้

1.2 บทตรวจเอกสาร

การสังเคราะห์โปรตีนเป็นการแปลรหัสพันธุกรรม (translation) โดยมีการสร้างพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนที่มาเรียงต่อกัน โดยลำดับของกรดอะมิโนนั้นจะถูกกำหนดด้วยรหัสพันธุกรรมหรือลำดับเบสของอาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) ซึ่งถ่ายทอดมาจากลำดับเบสของดีเอ็นเอหรือยีน การแปลรหัสจะเริ่มต้นที่ตำแหน่ง Start codon ที่มีลำดับเบสคือ AUG แปลแต่ละ codon จากด้าน 5' ไปยัง 3' หรือด้านปลาย $-NH_2$ ไปยังปลาย $-COOH$ การสังเคราะห์โปรตีนจะสิ้นสุดลงที่ตำแหน่ง Stop codon ที่มีลำดับเบสคือ UAA (รูปที่ 1.1)

การแปลรหัสพันธุกรรมและสร้างพันธะเปปไทด์ นอกจากต้องการอาร์เอ็นเอส่งข่าว และกรดอะมิโนต่างๆ แล้ว ยังต้องการองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ อาร์เอ็นเอขนย้าย (tRNA) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวแปลรหัสพันธุกรรม และไรโบโซม (ribosome) ที่ทำหน้าที่ยึดอาร์เอ็นเอขนย้ายกับอาร์เอ็นเอส่งข่าวไว้ด้วยกัน จึงสรุปได้ว่า กลไกการสังเคราะห์โปรตีนจะเริ่มจากการแปลรหัสพันธุกรรม แล้วมีการนำกรดอะมิโนเข้ามาเพื่อสร้างโปรตีน ต่อมาจะมีการสร้างพันธะเปปไทด์ให้ยาวออกไป สุดท้ายจะยุติการสร้างโปรตีนเมื่อสิ้นสุดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ อาทิเช่น จะมีการตัดกรดอะมิโน Methionine ตัวแรกออกจากปลาย $-NH_2$ ทำให้โปรตีนต่าง ๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่มีปลาย $-NH_2$ ที่แตกต่างกัน มีการเติมซัลเฟต ฟอสเฟต และมีขั้นตอนการต่อคาร์โบไฮเดรตให้แก่โปรตีนที่ตำแหน่งกรดอะมิโน Asparagine Serine หรือ Threonine ทำให้ได้สารประกอบไกลโคโปรตีน



รูปที่ 1.1 การแปลรหัสพันธุกรรมจากอาร์เอ็นเอส่งข่าว เป็นลำดับของโปรตีน
ที่มา Stryer (1981)

1.2.1 ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein)

ไกลโคโปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่พบทั่วไปในสิ่งมีชีวิตตั้งแต่ไวรัส พืช และสัตว์ โดยมีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง อาทิเช่น เป็นโมเลกุลโครงสร้างของสารประกอบภายในเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นสารหล่อลื่นและปกป้อง (Lubricants and protective agents) เป็นตัวยึดจับระหว่างเซลล์ (Cell attachment) เป็นตัวจดจำ (Recognition sites) ทำหน้าที่ในระบบป้องกัน (Immunological system) ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมน (Hormone) และเป็นเอนไซม์ (Enzyme) ตัวอย่างของไกลโคโปรตีน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1.1

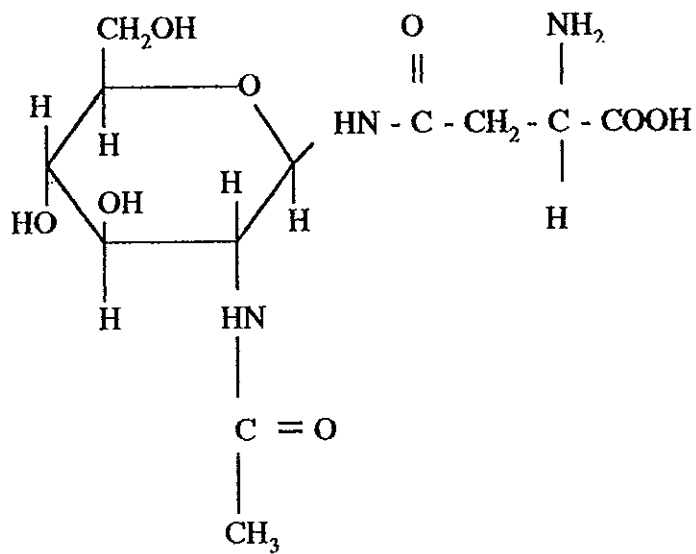
ไกลโคโปรตีนเป็นโปรตีนที่มีสายโซ่น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) เกาะยึดอยู่ด้วยพันธะไกลโคเปปไทด์ (Glycopeptide bond) มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงตั้งแต่ 15,000 ถึง 1 ล้านดาลตัน (Dalton) โดยทั่วไปในแต่ละโมเลกุลของไกลโคโปรตีนอาจมีโอลิโกแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบอยู่ 1 - 85 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโมเลกุล โอลิโกแซคคาไรด์แต่ละสายที่ยึดติดอยู่กับสายโพลีเปปไทด์จะประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลไม่เกิน 15 หน่วย การเติมน้ำตาลในสายโอลิโกแซคคาไรด์จะเกิดขึ้นภายใน Endoplasmic reticulum ของเซลล์ สายโอลิโกแซคคาไรด์ได้ถูกเติมเข้าไปบนสายโพลีเปปไทด์ตรงบริเวณที่เป็นกรดอะมิโน Asparagine หรือ Threonine หรือ Serine ที่มีลักษณะของการเรียงตัว คือ Asparagine-X-Serine/Threonine ซึ่ง X จะเป็นกรดอะมิโนชนิดใดก็ได้ โดยเติมพวก N-Acetylglucosamine Mannose และ Glucose จาก Endoplasmic reticulum จะส่งต่อไปยัง Golgi complex ซึ่งมีเอนไซม์ Glycosyltransferase ชนิดต่าง ๆ เช่น เอนไซม์ Fucosyltransferase เติมน้ำตาล Fucose เอนไซม์ Galactosyltransferase เติม Galactose และเอนไซม์ Sialyltransferase เติมน้ำตาล Sialic acid เป็นต้น ไกลโคโปรตีนที่ได้จะส่งออกนอกเซลล์ต่อไปทำให้เข้าใจว่าการที่ไกลโคโปรตีนมีคาร์โบไฮเดรตเข้าไปเกาะรวมอยู่ด้วยนั้นก็เพื่อช่วยในการขนส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ และกำหนดหน้าที่เฉพาะของโปรตีน หรืออาจมีส่วนช่วยให้โปรตีนมีความเสถียรเพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 1.1 หน้าทีและตัวอย่างของไกลโคโปรตีน (Cole et al., 1988)

หน้าที่	ตัวอย่าง
โมเลกุลโครงสร้าง (Structural molecules)	Collagen Elastin Bone matrix glycoprotein
สารหล่อลื่นและปกป้อง (Lubricating and protective agents)	Mucous secretion
ระบบภูมิคุ้มกัน (Immunological)	Complement Histocompatibility antigens γ -globulins Interferon
ฮอร์โมน (Hormones)	Thyrotropin Thyroglobulin Chorionic gonadotropin
เอนไซม์ (Enzymes)	Ribonuclease Prothrombin β -glucuronidase
ยึดจับระหว่างเซลล์ (Cell attachment)	Glycophorin Fibronectin Hormone receptors
ตัวขนส่ง (Transport)	Ceruloplasmin Transferrin

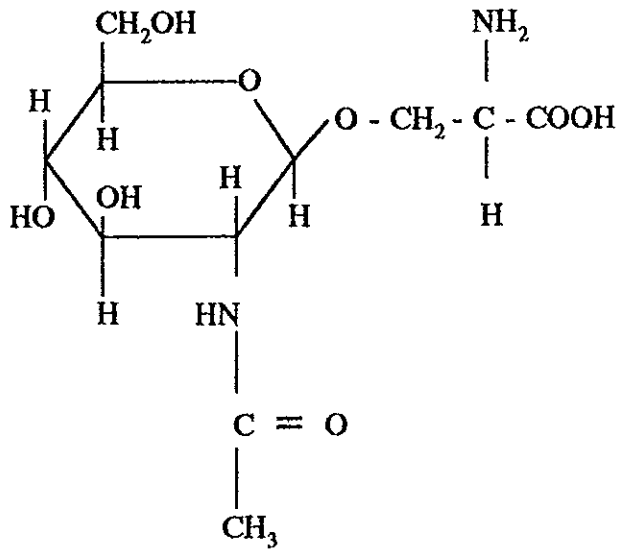
น้ำตาลที่พบในสายโซ่โอลิโกแซคคาไรด์ที่ยึดติดกับโปรตีนมี 9 ชนิดคือ Glucose (Glu) Galactose(Gal) Mannose(Man) Fucose(Fuc) Sialic acid(Sial) Arabinose (Ara) Xylose(Xyl) N-Acetylgalactosamine(GalNAc) และ N-Acetylglucosamine (GlcNAc) โดยเฉพาะน้ำตาล N-Acetylglucosamine (GlcNAc) มักพบที่ตำแหน่งปลายด้านที่เชื่อมติดกับสายโพลีเปปไทด์ (proximal site)

สายน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์จะเชื่อมยึดติดกับสายโพลีเปปไทด์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ คือ Asparagine (Asn) Serine (Ser) Threonine (Thr) และ Hydroxylysine (Hyl) ด้วยพันธะไกลโคเปปไทด์ 2 แบบ คือ N-glycosidic links และ O-glycosidic links โอลิโกแซคคาไรด์ที่เชื่อมกับสายโปรตีนที่ตำแหน่งหมู่อะมิโน (NH_2 -group) ของ Asparagine เรียกว่า N-linked Oligosaccharides (รูปที่ 1.2) ส่วนโอลิโกแซคคาไรด์ที่เชื่อมต่อกับหมู่ไฮดรอกซี (Hydroxy group) ของ Serine Threonine หรือ Hydroxylysine เรียกว่า O-linked Oligosaccharides (รูปที่ 1.3)

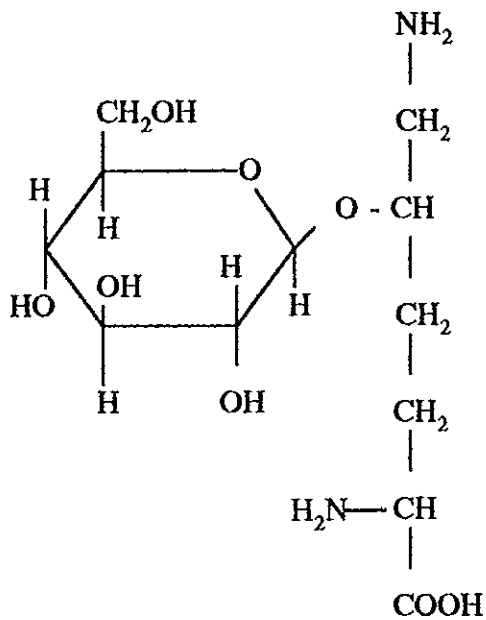


N-Glycosyl linkage to asparagine

รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีแบบ N-glycosidic linkage ต่อกับกรดอะมิโน Asparagine



O-Glycosyl linkage to serine



O-Glycosyl linkage to 5-hydroxylysine

รูปที่ 1.3 โครงสร้างทางเคมีแบบ O-glycosidic linkage ต่อกับกรดอะมิโน Serine และ 5-Hydroxylysine

1.2.1.1 N-linked glycoprotein

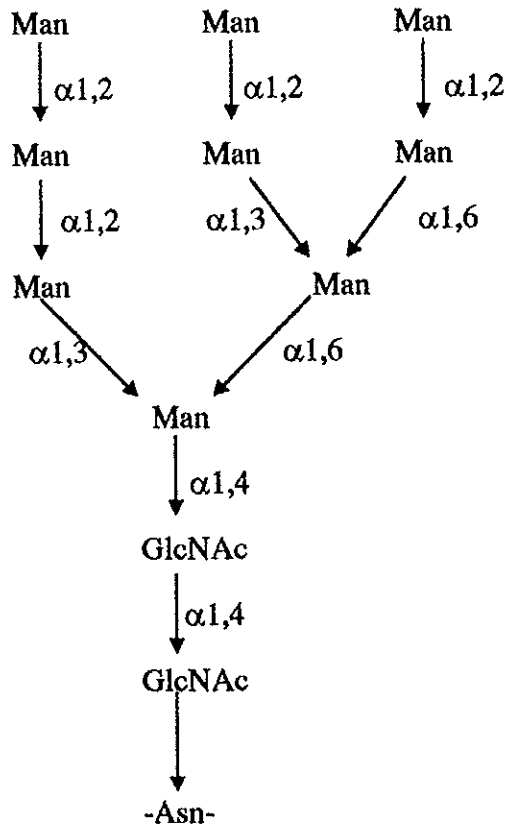
ใน N-linked glycoprotein พบว่าน้ำตาล N-Acetylglucosamine ด้านปลายสุดของสายโอลิโกแซคคาไรด์ จะเชื่อมยึดติดกับสายโพลีเปปไทด์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนชนิด Asparagine (Asn) โดยพันธะ N-glycosidic ให้ได้โครงสร้างเฉพาะของ N-linked glycoprotein ซึ่งมีส่วนแกนสำคัญที่มีลำดับของน้ำตาลคือ $\text{Man}\beta 1,4\text{-GlcNAc-}\beta 1,4\text{-GlcNAc-Asn}$

N-linked glycoprotein มี 3 ชนิด คือ High-mannose type Complex type และ Hybrid type โกลโคโปรตีนแต่ละชนิดอาจประกอบด้วยสายโอลิโกแซคคาไรด์แบบใดแบบหนึ่งหรือทั้งหลายแบบเกาะปะปนอยู่ได้

สายโซ่น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ใน N-linked glycoprotein แบบ High-mannose ประกอบด้วยหน่วยน้ำตาลชนิด Man เท่านั้น (รูปที่ 1.4) โกลโคโปรตีนทุกสายจะมีโครงสร้างแกน $\beta 1,4\text{-GlcNAc}\beta 1,4\text{-GlcNAc-Asn}$ เหมือนกัน แต่จะต่างกันเล็กน้อยที่รูปแบบการแตกกิ่งของหน่วยน้ำตาล $\alpha\text{-Man}$ ในรอบนอก กิ่งสายโซ่น้ำตาลรอบนอกนี้จะเชื่อมต่อกับส่วนแกนที่ตำแหน่ง C6 และ C3 ของโมเลกุลน้ำตาล $\beta\text{-Man}$

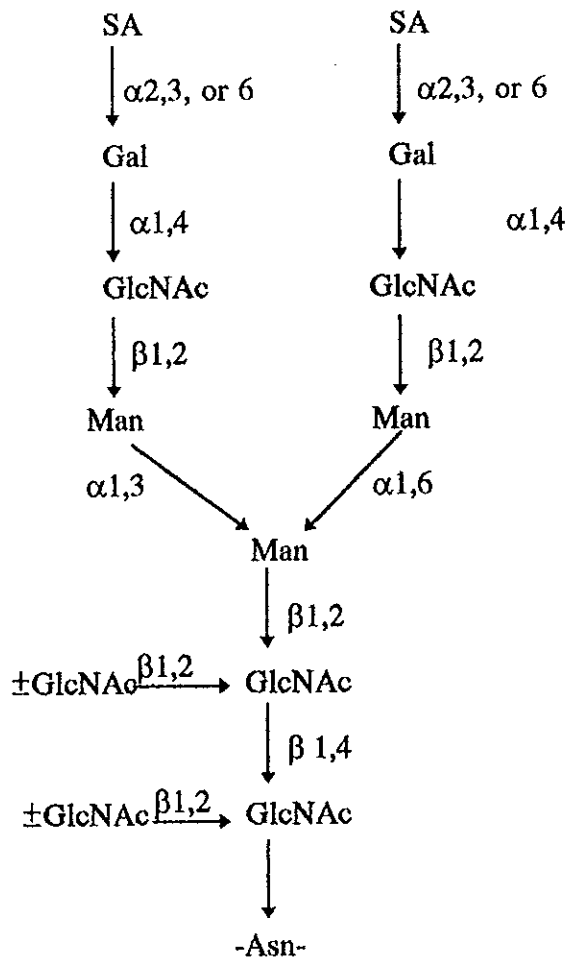
สายโซ่น้ำตาลใน N-linked glycoprotein แบบ Complex ประกอบด้วยโครงสร้างส่วนแกนเช่นเดียวกับ High-mannose type แต่มีสายโซ่น้ำตาลรอบนอกของ Mannose ถูกแทนที่ด้วย Sialic acid Galactose Fucose หรือ N-Acetylglucosamine เชื่อมต่ออยู่กับส่วนแกน (รูปที่ 1.5) ส่วน Hybrid type นั้นเป็นแบบผสมระหว่าง High-mannose type และ Complex type (รูปที่ 1.6)

สายโซ่น้ำตาลชนิด Complex พบได้เฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Higher Eukaryote) ส่วนสายโซ่น้ำตาลชนิด High-mannose จะพบมากในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ (Lower Eukaryote) เช่น ยีสต์ (Puhler, 1993)



รูปที่ 1.4 โครงสร้างของ N-linked oligosaccharide แบบ high mannose

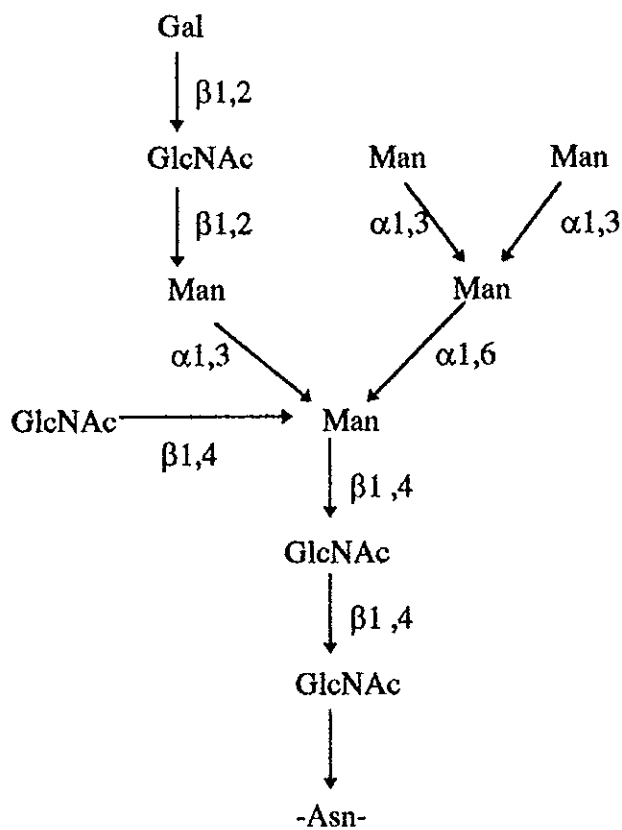
Mannose (Man), N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ Asparagine(Asn)



รูปที่ 1.5 โครงสร้าง N-linked glycoprotein แบบ Complex

Sialic acid (SA) Galactose (Gal) Mannose (Man)

Asparagine(Asn) และ N-acetylglucosamine (GlcNAc)



รูปที่ 1.6 โครงสร้าง N-linked glycoprotein ชนิด Hybrid type
Galactose (Gal), Mannose (Man), Asparagine (Asn)
และ N-acetylglucosamine (GlcNAc)

1.2.1.2 O-linked glycoprotein

ลักษณะ O-linked glycoprotein พบว่าสายโซ่น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์จะเชื่อมต่อกับสายโพลีเปปไทด์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน เช่น Serine Threonine และ Hydroxylysine ด้วยพันธะไกลโคเบปไทด์ชนิด O-glycosidic linked ซึ่งมีตัวอย่างของ O-linked glycoprotein ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างของไกลโคโปรตีนที่มีลักษณะแบบ O-glycosidic linked (Beeley, 1985)

ลักษณะ O-glycosidic linked	ตัวอย่างไกลโคโปรตีน
Xyl-Ser	Animal connective tissue
GalNAc-Ser/Thr	Mucous glycoproteins Keratan Sulphate type II
Gal-Ser	Potato lectin
Gal-Ser/Thr	Earthworm cuticle collagen
Man-Ser/Thr	Yeast fungal and Nerei cuticle glycoprotein
Gal-Hly	Collagen
Are-Hpr	plant cell wall
Gal-Hpr	plant glycoprotein

ได้เริ่มมีการศึกษา O-linked glycoprotein ใน mucus substrate ที่เรียกว่า mucin พบว่าไกลโคโปรตีนจะมีโครงสร้างของ N-Acetylgalactosamine เชื่อมอยู่กับกรดอะมิโน Serine หรือ Threonine ชนิดของ mucin glycoprotein ที่พบใน plasma membrane ได้แก่ glycophorin A และ leukosialin (CD43) ซึ่งเป็น Sialoglycoproteins บนเซลล์เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม leukosialin ทำหน้าที่ป้องกันการทำลายที่ผิวของเม็ดเลือดขาวในระบบไหลเวียนเลือด

และลักษณะโครงสร้างของ leukosialin ในคนปกติมีลักษณะดังนี้ NeuNAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -Ser/Thr แต่ลักษณะโครงสร้างของ leukosialin (CD43) ในคนไข้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunodeficiency) และการเกิดเนื้องอก (tumour cell) พบว่ามี น้ำตาลในสายโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นดังนี้คือ NeuNAc α 2,3Gal β 1,3 (NeuNAc α 2,3Gal β 1,4GalNAc β 1,6)GalNAc α -Ser/Thr ซึ่งเชื่อว่าการเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ T lymphocytes (Fukuda และ Hindsgaul, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Carlsson และ คณะ (1986) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ Sialoglycoprotein ใน T lymphocyte ของคนและหนูเมื่อมีการกระตุ้นของ T-cell ในภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในร่างกาย จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของขนาดของไกลโคโปรตีนจาก 100 กิโลดาลตันเป็น 130 กิโลดาลตัน

1.2.2 ความสำคัญของกรดไซอะลิก (Sialic acid) ของไกลโคโปรตีน

Sialic acid เป็นน้ำตาลในสายโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งพบในสารประกอบไกลโคโปรตีนและไกลโคลิปิด ดังแสดงในตารางที่ 1.3 ซึ่งมีความสำคัญและมีบทบาทในชีวโมเลกุลของเซลล์ เช่น เมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cells) ในกระแสเลือดหมดอายุลงจะพบว่าปริมาณ Sialic acid บนผิวเซลล์จะลดจำนวนลงเป็นผลทำให้มีการทำลายเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุนั้น (Stryer, 1981) ในทางตรงกันข้ามจะพบว่า Sialic acid ในพืชจะทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนที่ป้องกันการทำลายที่ผิวเซลล์ได้ โดยการกระตุ้นให้มี Sialic acid เพิ่มขึ้นในระหว่างที่มีการทำลายที่ผิวเซลล์ ส่วนในเซลล์มะเร็งหลาย ๆ ชนิดในเซลล์สัตว์จะพบปริมาณ Sialic acid ในเนื้อเยื่อเซลล์มะเร็งมีปริมาณสูงกว่าในเซลล์ปกติในทางการแพทย์จึงวิเคราะห์ Sialic acid ในเลือดเพื่อการทำนายและพยากรณ์ภาวะโรคมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งในตับ (Paszowska et al., 1997)

นอกจากนี้ยังพบว่า Sialic acid ที่เป็นน้ำตาลในโอลิโกแซคคาไรด์บนสายโพลีเปปไทด์ของสารประกอบไกลโคลิปิด (Glycolipid) เช่น gangliosides ซึ่งจะประกอบด้วยหนึ่งหน่วยโมเลกุลของ Sialic acid เป็นส่วนประกอบ gangliosides ใน

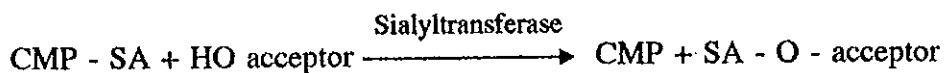
เนื้อเยื่อเซลล์สมองเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผิวเซลล์ที่บริเวณค้ำรับ (Receptor site) จำเพาะต่อสารโคสารหนึ่งเช่นฮอร์โมน (Hormone) สารพิษ (toxin) และสารส่งสัญญาณประสาท (Neurotransmitter)

ตารางที่ 1.3 ไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วย Sialic acid ในโครงสร้างสายโซ่น้ำตาล
โอลิโกแซคคาไรด์ (Fasman, 1989)

ชนิดของไกลโคโปรตีน	แหล่งที่พบ	ปริมาณ sialic acid (กรัม /100กรัมคาร์โบไฮเดรต)
Follicle Stimulating Hormone	Human pitutary	5.1
Chorionic gonadotropin (α -subunit)	Human Urine	8.8
Chorionic gonadotropin (β -Subunit)	Human Urine	10.2
Erythropoietin	Ovine anemic plasma	10.8
Cholinesterase	Human Serum	6.0
Pleural fluid glycoprotein	Human	11.9
Synovial fluid glycoprotein	Human	4.9
Glycophorin	Human erythrocytes	25.4
Lipopolysaccharide receptor	Human erythrocytes	16.3
α -Antitrypsin	Human plasma	12.1
Ceruloplasmin	Human plasma	2.4
Haptoglobin	Human plasma	5.8
Transferrin	Human plasma	1.4

1.2.3. บทบาทของเอนไซม์ Sialyltransferase

เอนไซม์ Sialyltransferase เป็นหนึ่งในกลุ่มของเอนไซม์ Glycosyltransferase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการนำ Sialic acid ไปเติมให้กับส่วนปลายของสายโกลิโกแซคคาไรด์บนสายโพลีเปปไทด์ของไกลโคโปรตีนและไกลโคลิปิด โดยปฏิกิริยาดังสมการ



จากการศึกษาเอนไซม์ Sialyltransferase ที่มีผลต่อผู้ป่วยหลายโรค เช่น โรค Alzheimer และโรค Down's Syndrome พบว่าปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase ต่ำลง ส่วนระดับของเอนไซม์จะสูงขึ้นประมาณ 10 เท่าในภาวะที่มีการอักเสบเรื้อรัง (Maguire และคณะ, 1994)

จากการศึกษาเนื้อเยื่อหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตโดย Paulson และคณะ (1989) พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ Sialyltransferase ชนิด Gal α 2,6-ST มีปริมาณสูงสุดในเนื้อเยื่อตับ และไม่พบเอนไซม์ชนิดนี้ในเนื้อเยื่อหัวใจ ชนิด Gal α 2,3-ST พบสูงสุดในส่วนของรังไข่ และชนิด Gal α 2,3(O)-ST พบสูงสุดในปอด ดังตารางที่ 1.4 ตารางที่ 1.4 ปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase ในเนื้อเยื่อหลายชนิดของหนู

ชนิดของเนื้อเยื่อ	Sialyltransferase activity (pmol/h./mg)		
	Gal α 2,6-ST	Gal α 2,3-ST	Gal α 2,3(O)-ST
ตับ	6,600	1,900	2,500
สมอง	0	390	140
รังไข่	120	3,900	2,950
ไต	600	2,100	440
ม้าม	590	740	1,600
ปอด	260	270	3,700
หัวใจ	0	65	100

Weinstein และคณะ (1987) ได้ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase จากตับหนู (Rat liver) พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในส่วนของ golgi apparatus เมื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ชนิดนี้พบ 3 ตำแหน่งที่เป็น N-linked glycosylation

1.2.4. การผลิต Recombinant Proteins โดยใช้เทคโนโลยีทาง พันธุวิศวกรรม

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) เพื่อผลิต Recombinant Proteins โดยนำยีนที่สนใจจากสิ่งมีชีวิตมาใส่ในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดที่เติบโตเร็ว เช่น แบคทีเรียหรือยีสต์ เพื่อที่จะผลิตโปรตีนที่มีคุณค่าได้อย่างรวดเร็ว การแสดงออกหรือการผลิตโปรตีนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น แบคทีเรีย ไม่สามารถผลิตโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ โดยเฉพาะในขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนจะไม่มีกระบวนการ Post-translation modification ไม่มีการเติมน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ให้กับสายโปรตีนที่สร้างเสร็จ ส่วนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่น ยีสต์มีกระบวนการ Post-translation modification ซึ่งมีส่วนคล้ายคลึงกับของเซลล์สัตว์ชั้นสูง แต่พบว่ามีข้อดีกว่า อาทิเช่น สามารถผลิตโปรตีนได้ปริมาณมาก ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตในเซลล์สัตว์ชั้นสูง การผลิต Recombinant proteins ในเซลล์สัตว์ชั้นสูง ได้ผลผลิตในปริมาณต่ำ ต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากต้องเลี้ยงเซลล์ใน Fetal Calf Serum และอาหารซึ่งมีราคาแพง อีกทั้งขบวนการผลิตค่อนข้างซับซ้อน (Tabor, 1989)

1.2.4.1 การโคลนยีนในยีสต์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีเซลล์เดียวมีการสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบที่ใช้เพศและไม่ใช้เพศ โดยทั่วไปจะมีการเพิ่มปริมาณโดยการแตกหน่อ เลี้ยงในอาหารเหลวหรือบนอาหารแข็งก็ได้ การเจริญเติบโตบนอาหารแข็งจะมีลักษณะโคโลนีคล้ายกับแบคทีเรีย

จีโนมของยีสต์มีขนาด 1.4×10^7 คู่เบส ประมาณ 3 เท่าของแบคทีเรีย ประกอบด้วยโครโมโซม 17 โครโมโซม และชิ้นส่วนดีเอ็นเออีก 3 ชิ้น ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้ทันทีโดยใช้เทคนิค Pulse field gel electrophoresis จีโนมของยีสต์มีส่วนที่เป็นลำดับเบสซ้ำอยู่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าในยูคาริโอทชนิดอื่น ๆ ในส่วนของจีโนมนี้มีการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ แต่การศึกษาในปัจจุบันพบว่ามีเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ของจีโนมเท่านั้นที่เป็นยีนที่จำเป็น สำหรับการแปลรหัสเป็นโปรตีน (Goeddel, 1991)

เมื่อนำยีสต์มาใช้ในงานพันธุวิศวกรรมเพื่อผลิต Recombinant Proteins โดยพบว่ายีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกเซลล์ในยีสต์นั้น มักใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการขาดเซลล์กษณะที่ขาด โดยใช้เซลล์ผู้รับที่เป็นจุลินทรีย์กขาดพันธุซึ่งไม่สามารถสร้างสารบางชนิดได้ด้วยตัวเอง (auxotroph) จะเจริญเติบโตได้ในอาหารที่เติมสารดังกล่าวแล้วเท่านั้น ตัวอย่างยีนที่ใช้ได้แก่ *LEU 2* , *TRP 1* , *HIS3* และ *URA3* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน Leucine, Tryptophan, Histidine และ Uracil ตามลำดับ (Puhler, 1993)

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ยีสต์นั้น ทำโดยให้เซลล์ยีสต์สูญเสียผนังเซลล์ไปบางส่วน โดยย่อยด้วยเอนไซม์ β -glucuronidase หรือ Zymolyase (Hinnen et al., 1978) ส่วนของเซลล์ที่ได้ยังคงมีผนังเซลล์ติดอยู่บ้างเรียกว่า Spheroplast แล้วจึงนำ Spheroplast นั้นมาบ่มรวมกับพลาสมิด โดยมีสาร polyethylene glycol (PEG) อยู่ด้วย จะทำให้พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้ แล้วจึงนำเซลล์นี้ไปเลี้ยงเพื่อให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ที่สมบูรณ์ขึ้นใหม่

การผลิต recombinant proteins จากยีสต์พบว่ามีปัจจัยหลายชนิดที่ส่งเสริมให้ยีสต์สามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ในปริมาณสูง เมื่อเลือกใช้โปรโมเตอร์ซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอ และมีตำแหน่งที่เป็นที่จับของเอนไซม์ RNA polymerase เพื่อการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอที่ดีและเสถียรในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม จากการศึกษาของ Kingsman (1988) พบว่ายีสต์สามารถผลิต recombinant proteins ได้เพิ่มขึ้นถึง

100 เท่า เมื่อมีการกระตุ้นด้วยการ Methanol หรือ Galactose เพื่อเหนี่ยวนำให้ยีสต์สามารถแสดงออกได้ดี

1.2.4.2 การโคลนยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่นำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ สามารถจะรับยีนจากภายนอกได้เช่นเดียวกับเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ และยีนที่ได้รับนี้ก็สามารถแสดงออกได้ ถ้าต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ที่ทำงานได้ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ใช้ มีรายงานจากการศึกษาของ Strachan (1992) แสดงถึงการถ่ายยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเลี้ยงเซลล์กลายพันธุ์ชนิดหนึ่งที่มาจกเซลล์ของคน (human cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเซลล์แล้วถ่ายยีนเอ็นเอที่ได้มาจากเซลล์ของคนที่มีเอนไซม์ดังกล่าว แล้วคัดเลือกเซลล์ที่เลี้ยงอยู่นั้น โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่เติมสาร hypoxanthine aminopterin และ thymidine (HAT medium) พบว่าเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารสังเคราะห์ HAT medium ได้ ต้องเป็นเซลล์ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT ได้เท่านั้น และวิธีการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี 3 วิธี คือ ใช้แคลเซียมฟอสเฟตเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนรวมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนก่อนแล้วนำมาใส่ลงในเซลล์ที่เลี้ยง หรือเตรียมดีเอ็นเอในสารละลาย DEAE-dextran แล้วนำมาใส่ลงในเซลล์ที่เลี้ยง หรืออีกวิธีหนึ่งคือใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อทำให้เกิดช่องขนาดเล็กที่เยื่อหุ้มเซลล์ (electroporation) โดยผสมเซลล์และดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน จากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 2-3 วัน แล้วจึงทดสอบว่ามีการแสดงออกของยีนที่ใส่ลงไปหรือไม่ ซึ่งอาจทำได้โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ เช่น hygromycin ในกรณีที่ยีนที่นำเข้ามาเป็นตัวบ่งชี้ (selectable marker) ที่เป็นยีนที่ต้านต่อ hygromycin เข้าไปด้วย หรือเลี้ยงในอาหาร เช่น HAT medium (Hypoxanthine Aminopterin Thymidine medium) หรือในกรณีที่ใช้ยีน HGPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase) เป็นตัวบ่งชี้ในการนำ

ยีนเข้าเซลล์ เมื่อคัดลอกเซลล์ที่รับยีนแล้วจึงทดสอบหาการแสดงออกของยีนที่ต้องการที่ใส่ร่วมไปด้วย

ในปัจจุบันมีโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนของคีเอ็นเอลูกผสมจำนวนมากที่ผลิตจากการเลี้ยงเซลล์สัตว์ ตัวอย่างดังแสดงไว้ในตารางที่ 1.5 อนึ่งถึงแม้ว่ามีโปรตีนมากมายผลิตได้จากการทำคีเอ็นเอลูกผสม และนำเข้าสู่เซลล์สัตว์เพื่อผลิตโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่ต้องการได้ หากแต่ค่าใช้จ่ายในการผลิตค่อนข้างสูง เนื่องจากเซลล์สัตว์โตช้า และมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ได้ง่าย อีกทั้งปริมาณสารที่ผลิตได้มักมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์เจ้าบ้านชนิดอื่น เช่น การผลิต Interferon (IFN) จากการเลี้ยงในเซลล์สัตว์จะได้ผลผลิตน้อย หากแต่การผลิตในแบคทีเรียสามารถให้ผลผลิตได้มากกว่าการผลิตจากเซลล์สัตว์ (Remaut et al., 1980)

นอกจากนั้นได้มีผู้ทดลองผลิต factor IX ซึ่งเป็นสารไกลโคโปรตีนที่ช่วยในกระบวนการแข็งตัวของเลือด เพื่อใช้ในการรักษาโรคโลหิตไหลไม่หยุดแบบบี (hemophilia B) ซึ่งเดิมผลิตโดยการเลี้ยงเซลล์สัตว์แต่เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง และได้ผลผลิตในปริมาณน้อยมาก (Tabor, 1989) ดังนั้น Kingsman และคณะ (1988) ได้ทดลองนำยีนสำหรับสร้าง factor IX มาต่อกับโปรโมเตอร์ (promotor) ซึ่งเป็นส่วนควบคุมการทำงานของยีนของ β -lactoglobulin (BLG) ซึ่งเป็นยีนของโปรตีนในน้ำนมของแกะ จากนั้นจึงฉีดยีนลูกผสมเข้าไปในไข่ของแกะแล้วย้ายไปฝากในท้องแม่ เพื่อให้ได้แกะ (Transgenic lamb) ที่สามารถสร้าง factor IX ของยีนออกมากับน้ำนม จากการทดลองได้แกะตัวเมีย 2 ตัว หลังจากผสมพันธุ์และมีลูกแล้ว แกะทั้งสองให้น้ำนมที่มี factor IX ได้เป็นผลสำเร็จ แต่พบว่าการผลิต factor IX โดยวิธีนี้ได้ผลผลิตน้อยมาก และต้องใช้เวลาในการผลิตนานอีกทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงด้วย

ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาโดยการโคลนยีนชนิดต่าง ๆ จากเซลล์สัตว์เข้ายีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสม (Recombinant proteins) เช่น การโคลนยีน Acetylcholinesterase จากสมองหนูเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน 2 ชนิดคือ ยีสต์ *Pichia pastoris* และแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อเปรียบเทียบผลผลิตของ Recombinant enzyme ที่ได้ ผลจากการศึกษาพบว่า Recombinant enzyme ที่ได้มี

ปริมาณสูง ทั้งในยีสต์และแบคทีเรีย แต่เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางด้านเคมี และด้านสรีระพบว่า Recombinant enzyme ที่ได้จากยีสต์ *P. pastoris* มีส่วนคล้ายกับยีน Acetylcholinesterase ที่สกัดได้จากธรรมชาติ (Heim et al., 1998)

จากการศึกษาที่ผ่านมามีการผลิต Recombinant proteins ในยีสต์ *Pichia pastoris* สามารถให้ Recombinant proteins ในปริมาณสูง และมีคุณสมบัติ เหมือนสภาพธรรมชาติ จากการศึกษาของ Vailes และคณะ (1998) และการทำให้บริสุทธิ์ของ Recombinant protein (human glutamate decarboxylase) ที่สามารถทำได้ โดยผลิตจากยีสต์ *P. pastoris* โดยมีความบริสุทธิ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Raymond et al., 1998)

แต่อย่างไรก็ดีการผลิตไกลโคโปรตีนใน *P. pastoris* จะมีการเติมน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์แบบ high-mannose เช่นเดียวกับ *Saccharomyces cerevisiae* หากแต่ใน *P. pastoris* จะเติมน้ำตาล mannose เพียง 8 - 14 โมเลกุลเท่านั้น ส่วนใน *S. cerevisiae* จะมีสายโอลิโกแซคคาไรด์แบบ high-mannose โดยมีการเติม mannose มากกว่า 100 โมเลกุล (Grinna and Tschopp, 1989; Tschopp et al., 1987)

อนึ่งได้มีผู้ทำการทดลองโดยเอายีน Sialyltransferase จากตับหนู (Rat-liver) เข้าสู่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ายีน Sialyltransferase สามารถเชื่อมติดกับ membrane ของยีสต์ตรงบริเวณ Golgi apparatus และกลไกการทำงาน เกิดร่วมกันในระหว่าง lower eukaryote กับ higher eukaryote (Schwientek et al., 1995)

ในขณะเดียวกัน Borsig et al., 1995 ได้ศึกษาอัตราการแสดงออกของยีน α 2,6-Sialyltransferase ของคนในยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ค่าแอกติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ α 2,6-Sialyltransferase 0.8 mU/mg.protein ค่าความสามารถของเอนไซม์ (K_m) ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่า K_m ของเอนไซม์ α 2,6-Sialyltransferase ของตับหนูในสภาพธรรมชาติ

จากการนำยีน Sialyltransferase ของคนเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* แสดงถึงความเป็นไปได้ในการปรับเปลี่ยนในเซลล์ของยีสต์ให้มีการสร้างเอนไซม์

Sialyltransferase สำหรับในยีสต์ *P. pastoris* ซึ่งมีสายโกลิโกแซคคาไรด์แบบ high-mannose ขนาดสั้นหากเมื่อมีการนำเข้าเอ็นไซม์ Sialyltransferase ทำให้อาจจะสามารถที่จะเติม Sialic acid ให้กับสายโกลิโกแซคคาไรด์บนไกลโคโปรตีนอันจะส่งผลให้โกลิโกแซคคาไรด์มีลักษณะใกล้เคียงกับของคนหรือสัตว์มากที่สุด

ตารางที่ 1.5 สารประกอบโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่ผลิตเป็นคีเอ็นเอลูกผสมได้โดยการเลี้ยงในเซลล์สัตว์

ชนิดของไกลโคโปรตีน	เซลล์เจ้าบ้านชนิดเซลล์สัตว์
Macrophage activating factor (MAF)	CHO cells (Chinese Hamster Ovary cells)
Human chorionic gonadotrophin	Mouse pituitary cells
Erythropoietin	COS cells (monkey kidney epithelial cells)
Bovine luteinizing hormone	Hamster cells
Enkephalin	Mouse pituitary cells
Somatostatin	COS cells
Follicle stimulating hormone (FSH)	CHO cells
Luteintrophin (LH)	CHO cells
Thyrotropin (TH)	CHO cells
Tissue plasminogen activator (tPA)	CHO cells

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาพันธุวิศวกรรมของยีน Sialyltransferase
2. ศึกษาวิธีการโคลนยีน Sialyltransferase จากคนเข้าสู่ยีสต์
3. ศึกษาวิธีการตรวจสอบยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้โดยใช้เทคนิคทางอนุวิทยา
4. ศึกษาและหาปริมาณของเอนไซม์ Sialyltransferase ที่แสดงออกได้จากยีสต์

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Acetic acid	Merck
Ammonium acetate	Merck
Calcium chloride	BDH
Chloroform	Merck
Formaldehyde	Merck
Isoamyl alcohol	Merck
Isopropanol	Merck
Magnesium chloride	Merck
Methanol	Merck
Potassium acetate	Fluka
Potassium chloride	Fluka
Sodium acetate	Analytical
Sodium chloride	Analytical
Sodium dodecyl sulfate	Merck
Sodium hydroxide	Merck
Yeast extract	Difco

2.1.1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Sigma
Ampicillin	Sigma
Asialofetuin	Sigma
Biotin	Sigma
Bromophenol blue	Sigma
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethidium bromide	Sigma
Formamide	Sigma
Histidine	Sigma
Igepal CA-630	Sigma
L-Isoleucine	Sigma
N-Lauroylsarcosine	Sigma
L-leucine	Sigma
L-lysine	Sigma
Phenyl methyl sulfonyl fluoride	Sigma
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate	Sigma
Restriction endonuclease	Promega, Bio-Lab
Ribonuclease A	Sigma
Taq DNA polymerase	Promega
T ₄ DNA ligase	Promega
Zymolyase	Sigma

2.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้คือ *E. coli* (Top10F') มีลักษณะ Genotype : F' {*proAB*, *lacI^B*, *lacZΔM15*, Tn10(Tet^R) *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), φ80*lacZΔM15*, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araΔ139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str^R), *end A1*, *nupGλ* ซึ่งจากบริษัท Invitrogen, The Netherlands

2.1.2.2 ยีสต์

เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Pichia pastoris* ชนิด GS 115 ลักษณะ Genotype คือ *his4* ลักษณะ Phenotype คือ *mut⁺* ซึ่งจากบริษัท Invitrogen, The Netherlands

2.1.3 อณูชีวโมเลกุล (Molecular Biology molecule)

2.1.3.1 พลาสมิดเวกเตอร์

pPIC3.5 เวกเตอร์สำหรับสังเคราะห์โปรตีนแล้วอยู่ภายในเซลล์ยีสต์

pPIC9 เวกเตอร์สำหรับสังเคราะห์โปรตีนแล้วส่งออกนอกเซลล์ยีสต์

2.1.3.2 Oligonucleotide primer ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี

Polymerase Chain Reaction (PCR)

5'-AOX1 sequencing primer(5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3')

3'-AOX1 sequencing primer(5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3')

α-Factor sequencing primer (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3')

2.1.3.3 ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา

ยีน Sialyltransferase ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor James C. Paulson, Department of Biological Chemistry and the Molecular Biological Institute, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California

2.2 อุปกรณ์

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต รุ่น Ultraspec III (Pharmacia)

เครื่องวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ รุ่น 204 (Hitachi)

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น Junior 2000 C (Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorius)

เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline)

เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น Z 382K (TLG)

เครื่องวัดพีเอช รุ่น 109 (Action)

ตู้อบเชื้อ 37 °C (Heraeus)

ตู้อบเชื้อ 30 °C (Clayson IM 550R)

ตู้เย็นแช่แข็ง -70 °C (REVCO)

เครื่อง UV light transilluminator (UVP)

เครื่องปั่นเซลล์ให้แตกด้วยความถี่ (MSE)

หม้อนึ่งความดัน รุ่น HA - 300 M II (Founday)

กล้องถ่ายรูป Polaroid (Fotodyn)

เครื่องเขย่าหลอด (Scientific Industries)

คอลลัมน์โครมาโตกราฟฟี ขนาด 0.4 x 12.5 ซม.

เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis (Advance)

ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow (Nerair)

ตู้ Hybridization (Robbins Scientific Corporation)

เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction (Hybrid)

เครื่องเขย่าความเร็วต่ำรุ่น PR-12 (Taitec)

เครื่องถ่ายกระแสไฟฟ้า (Gelman)

2.3 วิธีการ

2.3.1 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ (Birnboim และ Doly, 1979)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มียีน Sialyltransferase บนเวกเตอร์ pBluescript SK ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB (Luria Bertaini) 5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย Ampicillin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 18 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงแบคทีเรียมาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง ที่ความเร็ว 3,000xg นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ นำมาละลายใน 100 ไมโครลิตรของสารละลาย I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 200 ไมโครลิตรของสารละลาย II (0.2 N NaOH, 1% SDS) ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม 150 ไมโครลิตร ของสารละลาย III (5 M Potassium acetate 60 มิลลิลิตร, glacial acetic acid 11.8 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 28.5 มิลลิลิตร) ตั้งหลอดไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000xg นาน 15 นาที ดูคเอาส่วนใสที่ได้ซึ่งมีดีเอ็นเอใสในหลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนใสที่ได้ โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปปั่นที่ ความเร็ว 12,000xg นาน 15 นาที เก็บส่วนตะกอนและนำไปล้างด้วย 70% แอลกอฮอล์ 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000xg นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนที่ได้แห้ง แล้วละลายตะกอนในน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร เติม 1 ไมโครลิตรของสารละลาย RNaseA ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตั้งหลอดไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ.

2.3.2 การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิก (Sambrook *et al.*, 1989)

สารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.1 นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:100 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

ตามลำดับ คำนวณปริมาณดีเอ็นเอโดยนำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ไปคูณกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่า $OD_{260} = 1$ หมายถึง มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) คุณภาพของกรดนิวคลีอิกที่สามารถหาได้โดยการหาอัตราส่วนของค่า A 260/A 280 ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่บริสุทธิ์

2.3.3 ตรวจสอบยีน Sialyltransferase (ST) โดยการย่อยด้วยเอนไซม์

ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

ยีน Sialyltransferase ที่เชื่อมต่อกับกับเวกเตอร์ pBluescript SK ที่เตรียมได้จาก ข้อ 2.3.1 นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด (single digestion) คือ เอนไซม์ *EcoRI* และย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด (double digestion) 2 แบบ คือ เอนไซม์ *EcoRI* กับ *Bgl II* และเอนไซม์ *EcoRI* กับ *AccIII* ส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1 สารละลายดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วถูกนำไปตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% agarose gel

ตารางที่ 2.1 ปฏิกิริยาการย่อยยีน Sialyltransferase (ST) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด และ 2 ชนิด

ชนิดของเอนไซม์	ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้(μl)
เอนไซม์ <i>EcoRI</i>	1. ดีเอ็นเอ ST (1 μg)	2
	2. บัฟเฟอร์ <i>EcoRI</i> (10X)	2
	3. เอนไซม์ <i>EcoRI</i> (1 unit/μg)	1
	4. น้ำกลั่น	15
	ปริมาตรรวม	20
	ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 2 ชั่วโมง	

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของเอนไซม์	ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้(μl)
เอนไซม์ <i>EcoRI</i> กับ <i>BglIII</i>	1. ดีเอ็นเอ ST (1 μg)	2
	2. บัฟเฟอร์ <i>EcoRI</i> (10X)	1
	3. เอนไซม์ <i>EcoRI</i> (1 unit/μg)	0.5
	4. น้ำกลั่น	6.5
	ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 1 ชั่วโมง	
	5. บัฟเฟอร์ <i>BglIII</i> (10X)	2
	6. เอนไซม์ <i>BglIII</i> (1 unit/μg)	1
	7. น้ำกลั่น	7
	ปริมาตรรวม	20
	ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 1 ชั่วโมง	
เอนไซม์ <i>EcoRI</i> กับ <i>AccIII</i>	1. ดีเอ็นเอ ST (1 μg)	2
	2. บัฟเฟอร์ <i>EcoRI</i> (10X)	1
	3. เอนไซม์ <i>EcoRI</i> (1 unit/μg)	0.5
	4. น้ำกลั่น	6.5
	ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 1 ชั่วโมง	
	5. บัฟเฟอร์ <i>AccIII</i> (10X)	2
	6. เอนไซม์ <i>AccIII</i> (1 unit/μg)	1
	7. น้ำกลั่น	7
	ปริมาตรรวม	20
	ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 1 ชั่วโมง	

2.3.4 การ Subclone ยีน Sialyltransferase (ST) จากเวกเตอร์ pBluescript SK เข้าสู่เวกเตอร์ pPIC9 และ pPIC 3.5

2.3.4.1 การเตรียมดีเอ็นเอ ST ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIA quick (QIAGEN)

นำดีเอ็นเอของเวกเตอร์ pBluescript SK ที่มียีน ST ที่เตรียมจากข้อ 2.3.1 มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตามวิธีในข้อ 2.3.2 แยกดีเอ็นเอ ST โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วส่องดูด้วย UV light transilluminator ตัดส่วนของเจลที่ต้องการเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวน 200 มิลลิกรัมในหลอด microcentrifuge เติม 600 ไมโครลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ QX1 (QIAGEN) นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50° ซ. เป็นเวลา 10 นาที (ระหว่างการอุ่นให้พลิกหลอดกลับไปกลับมา 2-3 ครั้ง) เมื่อเจลละลายหมดให้ตรวจสอบสารละลายเจลที่ได้ต้องเป็นสีเหลือง แล้วเติม isopropanol 200 ไมโครลิตร เติสารละลายลงในคอลัมน์ QIAquick Spin นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วยการเติม 50 ไมโครลิตรของบัฟเฟอร์ PE (QIAGEN) และตั้งทิ้งไว้ 2 - 5 นาที ก่อนนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ย้ายคอลัมน์ QIAquick Spin ลงในหลอด microcentrifuge จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่สะอาด 50 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์เพื่อชะดีเอ็นเอที่อยู่ในคอลัมน์ออกมา ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis และหาปริมาณของดีเอ็นเอโดยวิธี Spectrophotometry

2.3.4.2 การเชื่อมชิ้นยีน ST เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pPIC9 และ pPIC3.5

เตรียมดีเอ็นเอพาหะ 2 ชนิด คือ pPIC 9 และ pPIC 3.5 เช่นเดียวกับการเตรียมในข้อ 2.3.1 และนำดีเอ็นเอพาหะที่เตรียมได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตามวิธีในข้อ 2.3.2 แล้วนำไปกำจัด 5'-phosphate group (dephosphorylation) ที่ปลายดีเอ็นเอพาหะ ให้เป็นปลาย 5'-OH โดยใช้ 1 ไมโครลิตรของเอนไซม์ CIP (Calf intestine alkaline phosphatase) และ 3 ไมโครลิตรของ (10X) CIP buffer โดยการทำให้ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 30 นาที จากนั้นให้ทำความสะอาดดีเอ็นเอพาหะโดยเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol ที่มีอัตราส่วนของสารละลาย 25 : 24 : 1 ปริมาตร 0.5 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา 2 -3 ครั้ง

นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที นำส่วนใสด้านบนมาเติม 0.5 เท่าของ chloroform:isoamyl alcohol อัตราส่วนของสารละลาย 24 : 1 นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที นำส่วนใสด้านบนมาเติม 3M Sodium acetate, pH 5.3 ปริมาตร 1 ใน 10 ของสารละลายดีเอ็นเอ และเติม Absolute ethanol ปริมาตรเป็น 2 เท่า ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางไว้ที่ตู้เย็นแช่แข็ง -70°C . เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้มาล้างด้วย 70% เอทานอล ทำให้แห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C .

นำสารละลายดีเอ็นเอพาหะ pPIC9 และ pPIC 3.5 ที่เตรียมได้จากข้างต้นปริมาณ 10 นาโนกรัมเชื่อมกับชิ้นดีเอ็นเอ ST โดยใช้ 10 นาโนกรัมของดีเอ็นเอ ST ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3.4.1 (โดยใช้อัตราส่วน 1:1 ในการทำปฏิกิริยา) เติม 1 ไมโครลิตรของ (10x) ligation buffer เติม 1 ไมโครลิตรของเอนไซม์ T4 ligase และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยปั่นด้วยเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 5 วินาที นำส่วนผสมของปฏิกิริยาไปแช่ในตู้เย็น เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.3.4.8 การเตรียม Competent cell จาก *E. coli* (Top10F')

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (Top10F') บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria Bertaini) ที่อุณหภูมิ 37°C . เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เชื้อเชื้อ 1 โคลนนิ่งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C . นาน 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C . นาน 2-3 ชั่วโมง จนได้ความขุ่นที่วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ค่า 0.5-0.6 ถ่ายเชื้อลงหลอดปั่นแล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C . เทส่วนใสทิ้ง และนำตะกอนมาละลายด้วย 10 มิลลิลิตรของ 0.1 M CaCl_2 (ที่เย็นจัด) ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C . ละลายตะกอนด้วย 2 มิลลิลิตร ของ 0.1 M CaCl_2 (ที่เย็นจัด) แบ่งลงในหลอด microcentrifuge หลอดละ 200 ไมโครลิตร ที่มี glycerol 35 ไมโครลิตร และเก็บ Competent cell ไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C .

2.3.4.4 การย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* (Top10F')

นำ Competent cell ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.4.3 ออกจากตู้เย็น แช่แข็ง -70°C . ทิ้งไว้ให้ละลายบนน้ำแข็ง ใช้ 5 ไมโครลิตรของส่วนผสมของปฏิกิริยา การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอ (ligation reaction) ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3.4.2 ลงไปในหลอด microcentrifuge ที่มี competent cell เขย่าหลอดเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง นาน 30 นาที จากนั้นนำหลอดไปอุ่นที่อุณหภูมิ 42°C . นาน 90 วินาที จากนั้นรับนำ หลอดมาแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB ลงในหลอด 800 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C . นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm นาน 1 นาที ตูดอาหารเหลวส่วนบนทิ้ง 800 ไมโครลิตร ส่วนที่เหลือใน หลอดผสมให้เข้ากัน ใช้ 50 และ 150 ไมโครลิตร ของเชื้อแบคทีเรียมาเกลี่ย (spread) บนอาหาร LB agar ที่มี Ampicillin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C . เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.3.5 ตรวจสอบหายีน Sialyltransferase ในเวกเตอร์ pPIC9 และเวกเตอร์ pPIC 3.5

นำแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ampicillin ที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.3.4.4 นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C . นาน 18 ชั่วโมง แล้วสกัดพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) โดยวิธีของ Birnboim และ Doly (1979) นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตรวจสอบหายีน Sialyltransferase ที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

2.3.6 ตรวจสอบแผนที่ยีน (restriction map) ของพลาสมิดลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

พลาสมิดลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 ที่ได้นำมาตรวจสอบแผนที่ยีนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ เอนไซม์ *XbaI* กับ เอนไซม์ *AccIII* ซึ่งส่วน

ประกอบของปฏิกิริยาในหลอดทดลองดังตารางที่ 2.2 ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis นำ recombinant DNA ที่มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้องใช้ในการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 2.2 ปฏิกิริยาการย่อย Recombinant DNA (ST-pPIC 9 และ ST-pPIC 3.5) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด

ชนิดของเอนไซม์	ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้(μl)
เอนไซม์ <i>Xba</i> I กับ <i>Acc</i> III	1. ดีเอ็นเอ ST-pPIC9 หรือ ST-pPIC3.5 (1 μg)	2
	2. บัฟเฟอร์ <i>Xba</i> I (10X)	1
	3. เอนไซม์ <i>Xba</i> I (1 unit/μg)	1
	4. น้ำกลั่น	6
	ปริมาตรรวม	10
	ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 1 ชั่วโมง	
	5. บัฟเฟอร์ <i>Acc</i> III (10X)	2
	6. เอนไซม์ <i>Acc</i> III (1 unit/μg)	1
	7. น้ำกลั่น	7
	ปริมาตรรวม	20
	ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ. นาน 1 ชั่วโมง	

2.3.7 การเตรียม Spheroplasts ของยีสต์สายพันธุ์ *Pichia pastoris*

(GS 115)

เลี้ยงเชื้อยีสต์ (GS 115) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD (Yeast Peptone Dextrose) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 28-30° ซ. นาน 48 ชั่วโมง นำโคลนนี้เดี่ยวของยีสต์ที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว YPD 10 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 28-30° ซ. นาน 24 ชั่วโมง ใช้ 10 ไมโครลิตร ของเชื้อยีสต์ที่ได้ถ่ายลงอาหารเหลว YPD 200 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 28-30° ซ. นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบเชื้อยีสต์ (GS 115) ที่ได้จากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.2-0.3 ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 1,500xg นาน 10 นาที เก็บส่วนตะกอนและล้างด้วย น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 20 มิลลิลิตรของสารละลาย SBD (ภาคผนวก) และใน 20 มิลลิลิตร ของ 1 M Sorbitol ตามลำดับ และละลายตะกอนใน 20 มิลลิลิตรของสารละลาย SCE (ภาคผนวก) เติม 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของเอนไซม์ Zymolyase เพื่อย่อยผนังเซลล์ยีสต์ โดยนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30° ซ. จนกระทั่งได้ 70% Spheroplasts ของยีสต์ ปั่นเก็บเซลล์ Spheroplasts ที่ความเร็ว 750xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ Spheroplasts ด้วย 10 มิลลิลิตรของ 1 M Sorbitol และล้างด้วย 10 มิลลิลิตรของสารละลาย CaS (ภาคผนวก) ตามลำดับ ละลายตะกอน Spheroplasts ด้วยสารละลาย CaS 0.6 มิลลิลิตร แบ่งเซลล์ Spheroplasts 100 ไมโครลิตรใส่หลอด microcentrifuge แช่หลอดทั้งหมดในน้ำแข็งเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3.8 การย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ยีสต์ (GS 115)

ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 ที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.3.6 นำไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SaII* เพื่อให้ดีเอ็นเอลูกผสมอยู่ในลักษณะสายตรง แล้วนำ 100 ไมโครลิตรของเซลล์ Spheroplasts ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.7 ผสมกับ 10 ไมโครกรัมของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 หรือ ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 โดยเติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย PEG/CaT (ภาคผนวก) ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็วที่ 750xg นาน

10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนผสมด้านบนทิ้งให้หมด ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 150 ไมโครลิตร ของสารละลาย SOS (ภาคผนวก) โดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 850 ไมโครลิตรของ 1 M Sorbitol ผสมให้เข้ากันแล้วแบ่ง 300 ไมโครลิตร ของส่วนผสม spheroplast-DNA ใส่ลงใน 10 มิลลิลิตร ของวุ้น RD ที่หลอมเหลว (Molten RD agar) (ภาคผนวก ข้อ 1.4) ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ เทส่วนผสมทั้งหมดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RDB plate (ภาคผนวก ข้อ 1.4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ. นาน 4-6 วัน จะได้โคโลนีของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 หรือ ST-pPIC3.5 ในยีสต์ GS115 (Transformants) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3.9 คัดเลือกโคโลนีของ Transformants โดยศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ที่เป็น Mut⁺ (Methanol utilization)

โคโลนีของยีสต์จากการทดลองในข้อ 2.3.8 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM (Minimal Methanol) และ MD (Minimal Dextrose) (ภาคผนวก ข้อ 1.5-1.6) โดยเชื้อที่ได้จากข้างต้นครั้งละ 1 โคโลนีแต่ละลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MM plate ก่อนแล้วแต่จะข้ลงใน MD plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์ GS 115/ His⁺ Mut⁺ β-gal ที่ใช้เป็น positive control เลือกโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตได้ใน MD plate และ MM plate เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3.10 การสกัด genomic DNA จากยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.3.9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MD (Minimal Dextrose) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 1,500xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตะกอนเซลล์ที่ได้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำตะกอนที่ได้จากการล้างมาละลายใน 2 มิลลิลิตรของสารละลาย SCED (ภาคผนวก ข้อ 2.2) เติม 0.2 มิลลิกรัมของเอนไซม์ Zymolyase บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 50 นาที จนกระทั่งได้เซลล์ 70% Spheroplasts นำมาเติม

2 มิลลิลิตรของ 1% SDS เขย่าหลอดเบา ๆ และแช่ไว้ใน น้ำแข็งนาน 5 นาที เติม 1.5 มิลลิลิตรของ 5 M Potassium acetate, pH 8.9 เขย่า หลอดเบา ๆ และแช่ไว้ในน้ำ แข็งนาน 30 นาที ปั่นแยกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. แยกส่วนใสที่ได้ลงในหลอด microcentrifuge ใหม่ เติม 2 เท่าของเอทานอล ลงในส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเก็บ ตะกอนด้วยความเร็ว 10,000xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. นำตะกอนที่ได้มาละลาย ด้วย 0.7 มิลลิลิตร ของสารละลาย TE, pH 7.4 (ภาคผนวก) เติม phenol : chloroform (1:1 v/v) ปริมาตร 0.5 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา 2-3 ครั้ง เติม 0.5 เท่าของ chloroform : isoamyl alcohol (24:1 v/v) นำไปปั่นที่ ความเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. นำส่วนใสด้านบนที่ได้มาเติม 0.5 เท่า ของสารละลาย 7.5 M ammonium acetate, pH 7.5 นำไปวางไว้ที่ตู้เย็นแช่แข็ง -70° ซ. เป็นเวลา 10 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 10,000xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. นำส่วนตะกอนที่ได้มาล้างด้วย 70% เอทานอล ทำให้แห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลาย genomic DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ.

2.3.11 วิเคราะห์หายีน Sialyltransferase (ST) ที่เข้าสู่อดแทรกใน โครโมโซมของยีสต์ (GS 115) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

Genomic DNA ของยีสต์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 9 และ ST-pPIC 3.5 ที่สกัดได้จากข้อ 2.3.10 นำไปหาปริมาณความเข้มข้นโดยวิธี spectrophotometry แล้ว สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ 5' AOX 1 primer กับ 3' AOX 1 primer สำหรับดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 3.5 และใช้ α -Factor primer กับ 3' AOX 1 primer สำหรับดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 9 โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสดงในตารางที่ 2.3 และสถานะที่ทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.3 การเตรียม reaction mixture ของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	PCR ของ ST-pPIC9 (μl)	PCR ของ ST-pPIC3.5 (μl)
ดีเอ็นเอ ST-pPIC9(100 ng/μl)	1	-
ดีเอ็นเอ ST-pPIC3.5(100 ng/μl)	-	1
10 x buffer Taq polymerase	1	1
25 mM MgCl ₂	0.25	0.25
10 mM dNTPs	0.25	0.25
α-factor primer (0.1 ng/μl)	0.25	-
5' AOX1 primer (0.1 ng/μl)	-	0.25
3' AOX1 primer (0.1 ng/μl)	0.25	0.25
น้ำกลั่นที่ sterile	6.8	6.8
Taq polymerase(5 unit/μl)	0.25	0.25
ปริมาตรรวม	10	10

ตารางที่ 2.4 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hot Start	94° ซ.	2 นาที	1
2. Denature	94° ซ.	1 นาที	25
3. Annealing	55° ซ.	1 นาที	
4. Extension	72° ซ.	1 นาที	
5. Final Extension	72° ซ.	7 นาที	1

วิเคราะห์ดีเอ็นเอจาก PCR product ที่ได้โดยนำไปตรวจสอบด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis

2.3.12 วิเคราะห์หาดีเอ็นเอด้วยวิธี Southern blotting

2.3.12.1 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจจับ (Sialyltransferase probe) โดยวิธีติดฉลากดีเอ็นเอด้วย DIG (digoxigenin) (ตามวิธีของบริษัท Boehringer Mannheim)

ดีเอ็นเอ Sialyltransferase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วตามวิธีการข้างต้น จำนวน 2 ไมโครกรัม เติม 2 ไมโครลิตรของสารละลาย Hexanucleotide mixture (Boehringer Mannheim) และเติม 2 ไมโครลิตรของสารละลาย dNTP labelling mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP และ 0.35 mM DIG-dUTP, pH 7.5) เติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร และเติม 1 ไมโครลิตรของ เอนไซม์ Klenow (2 units/ μ l) ในหลอด microcentrifuge ผสมให้เข้ากันโดยการปั่นเบาๆ 5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. ประมาณ 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 2 ไมโครลิตรของ 0.2 M EDTA และเติม 2.5 ไมโครลิตรของ 4 M LiCl₂ และ 75 ไมโครลิตรของ Absolute ethanol นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20° ซ. นาน 2 ชั่วโมง ปั่นที่ความเร็ว 12,000xg นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% เอทานอล ทำให้แห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe) ที่อุณหภูมิ -20° ซ.

2.3.12.2 การย้ายดีเอ็นเอลงแผ่นไนลอนเมมเบรน (Nylon membrane) ด้วยเทคนิค Southern blotting (Sambrook *et al.*, 1989)

Genomic DNA จากยีสต์ *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 ที่สกัดได้จากข้อ 2.3.10 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ดังเช่นปฏิกิริยาในตารางที่ 2.1 แยกดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย ethidium

bromide แล้วล้างแผ่นเจลให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย 0.2 N HCl นาน 10 นาที ล้างแผ่นเจลอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น นำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย denaturation (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) นาน 15 นาที และสารละลาย neutralization (3 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8) นาน 30 นาที ตามลำดับ ย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลลงแผ่นไนลอนเมมเบรนตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) โดยนำเจลวางบนกระดาษ 3 MM ซึ่งเป็นสะพานเชื่อมบนกล่องพลาสติก 2 ชั้น ซึ่งชั้นนอกบรรจุสารละลาย 10X SSC (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate, pH 7.0) วางแผ่นไนลอนเมมเบรน (Boehringer) บนแผ่นเจล วางแผ่นกระดาษ 3 MM ซึ่งชุ่มด้วยสารละลาย 10 x SSC ทับบนแผ่นไนลอนเมมเบรน วางกระดาษทิชชูทับด้านบน และวางของหนักทับบนกระดาษทิชชู ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้นำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกมาล้างเบาๆ ด้วยสารละลาย 2xSSC แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80° ซ. นาน 2 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3.12.8 การทำ Hybridization และตรวจสอบผลของ Hybridization ด้วยแอนติบอดีต่อ DIG (ตามวิธีของบริษัท Boehringer Mannheim)

แผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอติดอยู่จากการทดสอบที่ 2.3.12.2 นำมาอุ่นในสารละลาย prehybridization (5xSSC, 1% blocking reagent, 0.1% N-lauroyl sarcosine, 0.02% SDS) ที่อุณหภูมิ 42° ซ. นาน 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนมาอุ่นในสารละลาย hybridization (ส่วนผสมเช่นเดียวกับสารละลาย prehybridization แต่เติมดีเอ็นเอตรวจจับ จากการเตรียมในข้อ 2.3.12.1 จำนวน 10 นาโนกรัม ที่ผ่านการ denature ด้วยความร้อนแล้ว) ที่อุณหภูมิ 42° ซ. นาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลาย Washing I (2xSSC, 0.1% SDS) 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้องและล้างด้วยสารละลาย Washing II (0.1xSSC, 0.1% SDS) 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 68° ซ. จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลาย Maleic acid buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 3% Tween 20) แช่ในสารละลาย 1% Blocking นาน 30 นาที แล้วนำมาบ่มในสารละลาย Anti-DIG-AP (Anti-digoxigenin alkaline phosphatase) นาน 30 นาที ล้างออกด้วยสารละลาย

Maleic acid buffer สองครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างด้วยสารละลาย Detection buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂) นาน 2 นาที แล้วแช่ในสารละลาย Color substrate (เตรียมก่อนใช้ โดยผสมสารละลาย 100 ไมโครลิตร ของ (10X) NBT/BCIP ใน 5 มิลลิลิตร ของสารละลาย Detection buffer) วางแผ่นไนลอนเมมเบรนในที่มืด แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นเมื่อเห็นแถบสีม่วงของดีเอ็นเอ

2.3.13 การวิเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) จากยีส *Sialyltransferase* ในยีสต์ ด้วยวิธี Northern blotting (ตามวิธีของบริษัท Boehringer Mannheim)

2.3.13.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอ (Total RNA) จากยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ 2 ชนิด (*Pichia* ST-pPIC 9 และ *Pichia* ST-pPIC 3.5) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMGY medium (ภาคผนวก) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30° ซ. นาน 48 ชั่วโมง ปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 1,500xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย 400 ไมโครลิตรของสารละลาย AE (50 mM Sodium acetate, pH 5.3; 1 mM EDTA) เติม 40 ไมโครลิตรของ 10% SDS ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixture นาน 20 นาที เติมสารละลายอิมตัด phenol ปริมาตร 0.5 เท่า นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65° ซ. นาน 4 นาที นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70° ซ. ใส่น้ำมันส่วนใสด้านบนผสมกับ phenol : chloroform (ปริมาตร 1:1) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture ประมาณ 20 วินาที ปั่นด้วยความเร็วข้างต้นและดูดเฉพาะส่วนใส เติม 40 ไมโครลิตรของ 3 M Sodium acetate, pH 5.3 และเติม 2.5 เท่าของเอทานอล นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -70° ซ. นาน 30 นาที ปั่นเก็บตะกอนด้วยความเร็ว 10,000xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ. ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งและละลายตะกอนอาร์เอ็นเอใน 20 ไมโครลิตรของน้ำกลั่น

2.3.13.2 การย้ายอาร์เอ็นเอ (RNA) ลงแผ่นไนลอนเมมเบรน และการทำ Hybridization (ตามวิธีของบริษัท Boehringer Mannheim)

ใช้อาร์เอ็นเอ 15 ไมโครกรัมที่ได้จากการทดลองที่ 2.3.13.1 แล้วเติม 2 ไมโครลิตรของสารละลาย 5XMOP (0.1 M MOPS, 40 mM Sodium acetate, 5 mM EDTA, pH 8.0) เติม 3.5 ไมโครลิตรของ Formaldehyde และ 10 ไมโครลิตรของ Formamide นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65° ซ. นาน 15 นาที เมื่อครบเวลานำออกมาแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปแยกอาร์เอ็นเอด้วย 1.2% Agarose/Formaldehyde gel (Plusubel, 1989) และย้ายอาร์เอ็นเอจากแผ่นเจลลงแผ่นไนลอนเมมเบรน โดยใช้วิธีการทดสอบวิธีเดียวกับ Southern blot hybridization จากการทดลองที่ 2.3.12.2 - 2.3.12.3 ข้างต้น

2.3.14 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase โดยใช้ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc (ดัดแปลงจากวิธีของ Gross และคณะ, 1990)

เลี้ยงเชื้อยีสต์ ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMYG medium 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30° ซ. นาน 48 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 2-6 นำสารละลายเชื้อไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500xg นาน 10 นาที ส่วนของตะกอนเชื้อนำไปละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMMY medium (ภาคผนวก) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 1.0 บ่มเชื้อโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30° ซ. นาน 24 ชั่วโมง เติม 0.5% Methanol เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง และที่เวลา 48 ชั่วโมงมาปั่นที่ความเร็ว 1,500xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ.

ใช้ 20 ไมโครลิตรของส่วนน้ำใส (supernatant) ของยีสต์ ST-pPIC9 ทำปฏิกิริยากับ 8 ไมโครลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ I (50 mM Sodium cacodylate, pH 6.0 ; 0.1% Triton-X 100 ; 1 mg/ml BSA) และ 1 ไมโครลิตรของ Asialofetuin (1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และเติม 1 ไมโครลิตรของ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc (20

ไมโครโมล/ลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 4 ไมโครลิตรของ 0.1 M CTP

ส่วนตะกอนของเซลล์ยีสต์ ST-pPIC3.5 นำมาละลายด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์โปรตีน (50 mM Sodium phosphate; 1 mM EDTA; 0.2% Triton X-15; 1 mM PMSF) และทำให้เซลล์ยีสต์ ST-pPIC3.5 แยกด้วย 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 โดยการเติม glassbead ขนาด 0.5 มิลลิเมตร นำไปเขย่าด้วย vortex mixture นาน 30 วินาที สลับกับการแช่ในน้ำแข็งประมาณ 7 ครั้ง นำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000xg นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เก็บส่วนใสตอนบนเพื่อใช้หาปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase เช่นเดียวกับวิธีดังกล่าวข้างต้น ส่วนวิธีที่ 2 เป็นการทำให้เซลล์แตกโดยการ Sonication สามครั้ง ๆ ละ 30 วินาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000x g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เก็บส่วนใสตอนบนเพื่อใช้หาปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase

ภายหลังหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ นำส่วนผสมของปฏิกิริยาไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ขนาด 0.4 x 12.5 ซม. ใช้สารละลาย 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6 เป็นตัวชะคอลัมน์โดยใช้อัตราไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที เก็บสารละลายที่จุดชะในหลอด microcentrifuge หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 24 หลอด จากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดการเรืองแสง Fluorescence ด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer (Hitachi 204) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (Excitation) และ 520 นาโนเมตร (Emission) วัดค่า ความเข้มของ fluorescence ของ fluoresceinyl-NeuAc เพื่อนำไปคำนวณค่าแอกติวิตีของเอนไซม์

2.3.15 การหาปริมาณ fluoresceinyl-NeuAc บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound) ของยีสต์ ST-pPIC 9 และ ST-pPIC 3.5

เลี้ยงเชื้อยีสต์ (GS 115) ยีสต์ ST-pPIC 9 และยีสต์ ST-pPIC 3.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMGY medium 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30° ซ. นาน 48 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 2-6 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นที่ความเร็ว 1,500xg นาน 10 นาที ส่วนของตะกอนเชื้อนำไป

ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMMY medium โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 1.0 บ่มเชื้อโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30°C. นาน 24 ชั่วโมง เติมน้ำ 0.5% Methanol เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง คูลสารละลายเชื้อทั้ง 3 ชนิดลงในหลอดเลี้ยงเชื้อใหม่ชนิดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1 ไมโครลิตรของ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc (20 ไมโครโมล/ลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C. นาน 2 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ของยีสต์ (GS115) ยีสต์ ST-pPIC 9 และยีสต์ ST-pPIC 3.5 ที่ความเร็ว 1,500xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C. ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลาย 1xPBS (ภาคผนวก) ประมาณ 5 ครั้ง แล้วนำตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ได้มาละลายใน 100 ไมโครลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Igepal CA-630, 0.5% Deoxycholic acid, 0.1% SDS และ 150 mM NaCl) แล้วนำสารละลายเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ชนิดไปปั่นที่ความเร็ว 600xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C. นำตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โปรตีน (50 mM Sodium phosphate; 1 mM EDTA; 0.2% Triton X-15; 1 mM PMSF) แล้วนำไปทำให้เซลล์ยีสต์แตกโดยวิธีการใช้ความถี่เสียง (sonication) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 600xg นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์อีกครั้งด้วยสารละลาย 1xPBS (ภาคผนวก) ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 ไมโครลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์โปรตีน (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Igepal CA-630, 0.5% Deoxycholic acid, 0.1% SDS และ 150 mM NaCl) แล้วนำสารละลายเซลล์ยีสต์ GS115 ยีสต์ ST-pPIC 9 และ ยีสต์ ST-pPIC 3.5 จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 490 ไมโครลิตรของสารละลาย 50 mM Tris-HCl ที่มี 1% Igepal CA-630, 0.5% Deoxycholic acid, 0.1% SDS และ 150 mM NaCl และใช้ตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผสมกับ 480 ไมโครลิตรของสารละลาย 50 mM Tris-HCl ที่มี 1% Igepal CA-630, 0.1% SDS, 5% Deoxycholic acid และ 150 mM NaCl จากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดการเรืองแสง Fluorescence ด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer (Hitachi 204) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (Excitation) และ 520 นาโนเมตร (Emission) วัดค่าความเข้มของ fluorescence ของเอนไซม์ Sialyltransferase แล้วคำนวณปริมาณ Fluoresceinyl-NeuAc เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีน

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน Sialyltransferase (ST) และตรวจแบบแผนของยีนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผลจากการสกัดพลาสมิด pBluescript (SK) ที่มียีน Sialyltransferase เชื่อมอยู่ โดยพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 1.8 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วตรวจสอบขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีขนาด 4,300 bp เวกเตอร์ pBluescript SK มีขนาดประมาณ 2,958 bp (Promega, 1997) จากข้อมูลลำดับเบสของยีน Sialyltransferase ที่ได้รับบริจาค (ภาคผนวก ข ข้อ 1) จะมีขนาดประมาณ 1,342 bp โดยผู้บริจาคระบุว่ายีน Sialyltransferase เชื่อมอยู่กับพลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript SK ที่ตำแหน่ง EcoRI site ดังนั้น เวกเตอร์ pBluescript SK ที่มียีน Sialyltransferase เชื่อมอยู่จึงควรมีขนาดประมาณ 4,300 bp ตรงตามที่ตรวจสอบด้วย agarose gel ข้างต้น ยีน Sialyltransferase เป็นยีนที่จะนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป ควรตรวจสอบแบบแผนของยีนให้ถูกต้องซึ่งสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวคือ EcoRI สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาด 4,300 bp ได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ ขนาด 2,958 bp และ 1,342 bp ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอของเวกเตอร์ pBluescript SK และยีน Sialyltransferase ตามลำดับ และเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ EcoRI กับ Bgl II สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาด 4,300 bp ซึ่งเป็นเวกเตอร์ pBluescript SK ที่มียีน Sialyltransferase อยู่ ได้ดีเอ็นเอ 4 ชิ้น คือ ขนาด 2,958 bp คือ พลาสมิด pBluescript SK ชิ้นที่ 2, 3 และ 4 มีขนาด 621 bp, 519 bp และ 202 bp ตามลำดับ คือชิ้นยีน Sialyltransferase ซึ่งสอดคล้องกับการเรียงตัวของกรดนิวคลีอิกของยีน Sialyltransferase ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข ข้อ 1 และเมื่อย่อยด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะอีก 2 ชนิด คือ *EcoRI* กับ *Acc III* สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอได้ ดีเอ็นเอ 3 ชิ้น คือ ขนาด 2,958 bp คือ พลาสมิด pBluescript SK ชิ้นที่ 2 และ 3 มีขนาด 1,071 bp และ 271 bp คือชิ้นดีเอ็นเอของยีน Sialyltransferase ดังแสดงไว้ใน รูปที่ 3.1

3.2 การตัดต่อยีน Sialyltransferase (ST) เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC9 และเวกเตอร์ pPIC3.5 โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* (Top10F') เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host)

การทดลองนี้ได้ตัดต่อยีน Sialyltransferase เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC9 และเวกเตอร์ pPIC3.5 โดยเวกเตอร์ pPIC9 นั้นมีคุณสมบัติเป็นเวกเตอร์ที่สร้างโปรตีนแล้วส่งออกภายนอกเซลล์ยีสต์ สำหรับเวกเตอร์ pPIC3.5 นั้นสร้างโปรตีนแล้วจะไม่ขับออกนอกเซลล์ ซึ่งจากการสกัดพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC9 ที่มีขนาด 8,000 bp (Invitrogen, 1997) และเมื่อนำเวกเตอร์มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะทำให้เวกเตอร์ pPIC9 มีลักษณะเป็นวงกลมปลายเปิด ตรงตำแหน่งที่ถูกย่อยและเป็นตำแหน่งของ cloning site เพื่อที่จะนำยีน Sialyltransferase ที่มีขนาด 1,342 bp เข้าเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC9 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ *EcoRI* 1223 แล้วนำเข้าแบคทีเรีย *E. coli* (Top10F') เพื่อให้เวกเตอร์ pPIC9 ที่มียีน Sialyltransferase เชื่อมต่ออยู่มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ที่สมบูรณ์และสามารถนำไปเพิ่มจำนวนต่อไปได้ ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ที่ได้มีขนาด 9,342 bp ที่มีลักษณะแบบแผนโครงสร้างดังแสดงไว้ใน รูปที่ 3.2 เมื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis จะได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้นที่มีขนาด 1,342 bp และ 8,000 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีน Sialyltransferase ก่อนโคลนเข้าเวกเตอร์ pPIC9 (รูปที่ 3.3)

ส่วนพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC3.5 มีขนาด 7,800 bp (Invitrogen, 1997) เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้เวกเตอร์ pPIC3.5 มีลักษณะเป็นวงกลมปลายเปิด ซึ่งเป็นตำแหน่งของ cloning site เมื่อนำยีน Sialyltransferase ที่มีขนาด 1,342 bp เข้าเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC3.5 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ *EcoRI* 951 แล้วนำเข้าแบคทีเรีย

E. coli (Top10F') เพื่อให้เวกเตอร์ pPIC3.5 ที่มียีน Sialyltransferase เชื่อมต่ออยู่มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ที่สมบูรณ์ โดยดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 3.5 มีขนาด 9,142 bp และมีลักษณะแบบแผนโครงสร้างดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.4 การตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis จะได้ดีเอ็นเอ ที่มีขนาด 1,342 bp และ 7,800 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีน Sialyltransferase และเวกเตอร์ pPIC 3.5 ตามลำดับ (รูปที่ 3.5)

3.8 ตรวจสอบแผนที่ยีนของดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) 2 ชนิด คือ ST-pPIC 9 และ ST-pPIC 3.5 โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการโคลนยีน Sialyltransferase เข้าเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC9 และเวกเตอร์ pPIC 3.5 ในแบคทีเรีย *E. coli* จะได้ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ที่มีขนาด 9,342 bp และดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ที่มีขนาด 9,142 bp ซึ่งดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 2 ชนิดนี้จะนำไปโคลนเข้ายีสต์ เพื่อให้มีการแสดงออกหรือผลิตโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์และภายนอกเซลล์ และให้ได้ชนิดของโปรตีนที่ต้องการ จึงจำเป็นต้องศึกษาแผนที่ยีนของดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 2 ชนิดนี้ การตรวจสอบทิศทางของยีนที่ต้องการแสดงออกให้อยู่ในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ (promotor) สำหรับให้จุดเริ่มต้นสำหรับการแปลรหัสจากอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่เกิดจากยีน Sialyltransferase เป็นไปด้วยความถูกต้อง โดยใช้วิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากข้อมูลการหาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction site) ของเวกเตอร์ pPIC9 ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข ข้อที่ 3 เมื่อเลือกใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *AccIII* พบว่าสามารถตัดเวกเตอร์ pPIC 9 ได้ที่ตำแหน่ง 3,845 ของเวกเตอร์ และตัดยีน Sialyltransferase ได้ที่ตำแหน่ง 1,071 ของยีน ส่วนเอนไซม์ชนิดที่ 2 คือ *XbaI* ตัดได้เฉพาะเวกเตอร์ pPIC 9 ที่ตำแหน่ง 2,033 และเมื่อนำดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 9 ไปย่อยด้วยเอนไซม์ *AccIII* กับ *XbaI* ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีทิศทางที่ต่อกับโปรโมเตอร์ (promotor) ที่ถูกต้องตามแผนที่ยีน โดยจะได้ดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 6,450 bp 1,812 bp และ 1,080 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.6) สำหรับดีเอ็นเอลูกผสม

ST-pPIC9 ที่มีทิศทางการเชื่อมของยีน Sialyltransferase ผิดทิศ เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดเหมือนเดิม พบว่าจะได้ดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 5,649 bp 1,812 bp และ 1,881 bp ส่วนดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AccIII* กับ *XbaI* เช่นกัน โดยเอนไซม์ *Acc III* สามารถตัดเวกเตอร์ pPIC 3.5 ได้ที่ตำแหน่ง 3,573 ของยีน และตัดยีน Sialyltransferase ได้ที่ตำแหน่ง 1,071 ของยีน สำหรับเอนไซม์ชนิดที่ 2 คือ *XbaI* ตัดได้เฉพาะเวกเตอร์ pPIC3.5 ที่ตำแหน่ง 1,761 เท่านั้น ดังนั้นเมื่อนำดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ไปย่อยด้วยเอนไซม์ *AccIII* กับ *XbaI* และตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีทิศทางการเรียงของยีน Sialyltransferase ไปในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ ถูกต้องตามแผนที่ยีน โดยจะได้ดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 6,250 bp 1,812 bp และ 1,080 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.6) และดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 3.5 ที่มีทิศทางการเรียงของยีน Sialyltransferase ผิดทิศ เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดเหมือนเดิม พบว่าจะได้ดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 5,450 bp 1,812 bp และ 1,880 bp

3.4 การศึกษาลำดับเบส (DNA sequencing) ของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 โดยใช้เครื่อง Automated DNA Sequencer

การหาลำดับเบส (DNA Sequencing) ของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC 3.5 เพื่อตรวจสอบการเรียงตัวของกรดนิวคลีอิกของยีน Sialyltransferase กับเวกเตอร์ pPIC9 และเวกเตอร์ pPIC3.5 โดยทำการศึกษาดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 2 สาย ใช้ primer 2 ชนิด คือ 5'AOX1 และ 3'AOX1 จากผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 9 ใช้ primer 5'AOX1 ในการสังเคราะห์ การหาลำดับเบสนั้นไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ทั้งสาย และสังเคราะห์ได้เพียง 848 bp โดยพบว่าลำดับเบสของเวกเตอร์ pPIC9 เชื่อมต่อกับยีน Sialyltransferase ตรงตำแหน่งของ *EcoRI* (ลำดับเบส GAATTC) และมีรหัสที่เป็นสัญญาณเริ่มสังเคราะห์โปรตีน (Start Codon) คือ ATG (รูปที่ 3.7)

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ใช้ primer 2 ชนิด ในการสังเคราะห์ คือ 5' AOX1 และ 3' AOX1 จากผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่สังเคราะห์

ได้มีลำดับเบส 865 bp และ primer 5' AOX1 สามารถสังเคราะห์ลำดับเบสของเวกเตอร์ pPIC3.5 ที่เชื่อมต่อกับยีน Sialyltransferase ตรงตำแหน่งของ EcoRI (ลำดับเบส GAATTC) และมีรหัสที่เป็นสัญญาณเริ่มสังเคราะห์โปรตีน (Start Codon) คือ ATG (รูปที่ 3.8)

3.5 การโคลนดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 เข้าสู่ยีสต์ (GS 115) โดยศึกษาลักษณะ genotype และ phenotype ของยีสต์ชนิดใหม่ที่มีการสอดแทรกของยีน ST-pPIC9 หรือ ยีน ST-pPIC3.5

ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 9 และ ST-pPIC 3.5 มีลักษณะ genotype คือ *HIS4* ซึ่งหมายความว่าดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิด มียีนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอาหาร histidine ได้เอง ทำให้เซลล์ที่มียีน *HIS4* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี histidine เมื่อนำดีเอ็นเอลูกผสมไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SalI* เอนไซม์จะเข้าไปตัดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดที่ตำแหน่งของ *HIS4* ดีเอ็นเอลูกผสมจะมีลักษณะเป็นดีเอ็นเอสายตรง เมื่อโคลนเข้าสู่ยีสต์ GS 115 ที่มีลักษณะ genotype คือ *his4* ยีสต์ GS115 มียีนที่ใช้สังเคราะห์สารอาหาร histidine เพียงบางส่วนหากแต่ไม่สามารถสังเคราะห์ Histidine ทำให้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี histidine จากการทดลองพบว่ายีนของ ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 สามารถเข้าแทรก (integrated) ในโครโมโซมของยีสต์ GS 115 ได้ โดยดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 ที่มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอสายตรง เมื่อตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง *HIS4* โดยด้านปลายของ *HIS4* ทั้ง 2 ด้านจะเข้าแทรกโครโมโซมของยีสต์ดังภาพที่แสดงไว้ในรูปที่ 3.9 และรูปที่ 3.10 จากการทดลองจะได้ยีสต์สายพันธุ์ใหม่คือ *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 ที่มีลักษณะ genotype คือ *HIS 4* และยีสต์ชนิดใหม่ที่ได้ทั้ง 2 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MD (สูตรอาหารที่ไม่มี histidine) พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้

เมื่อศึกษาลักษณะ phenotype ของยีสต์ GS 115 พบว่าเป็นชนิด *Mut⁺* (Methanol utilization plus) ซึ่งเป็นยีสต์ที่เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Methanol จากผลการทดลองข้างต้นพบว่ามียีสต์จำนวน 10 โคลนี ของ *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-

pPIC3.5 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะ phenotype โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ MD agar และ MM agar (สูตรอาหารที่มี Methanol) พบว่า *Pichia* ST-pPIC9 จำนวน 5 โคโลนี สามารถเจริญได้ทั้งใน MD agar และ MM agar ส่วนอีก 5 โคโลนี เจริญได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ MD agar เท่านั้น ส่วน *Pichia* ST-pPIC3.5 มี 9 โคโลนี เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MD agar และ MM agar แสดงว่า 9 โคโลนี ที่ได้นี้มีลักษณะ phenotype คือ Mut⁺ ส่วนอีก 1 โคโลนี เจริญได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ MD agar แสดงว่ามีลักษณะ phenotype เป็น Mut^s (เป็นยีสต์ที่เจริญได้ไม่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Methanol)

3.6 การวิเคราะห์ยีน Sialyltransferase ที่เข้าสู่อดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ GS 115

3.6.1 วิเคราะห์โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

Pichia ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 เป็นยีสต์ที่มียีน Sialyltransferase เข้าสู่อดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ GS 115 การวิเคราะห์ *Pichia* ST-pPIC9 ด้วยวิธี PCR นั้น จะใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (primer) 2 ชนิด คือ α -factor primer (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3') และ 3' AOX1 primer (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') จากผลการทดลองจะได้ PCR product ของยีสต์ ST-pPIC9 และเมื่อวิเคราะห์ผลด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ได้ดีเอ็นเอชิ้นเดียว ที่มีขนาด 1,537 bp ซึ่งประกอบด้วยส่วนของเวกเตอร์ pPIC9 ที่มีขนาด 195 bp และยีน Sialyltransferase ที่มีขนาด 1,342 bp เพราะฉะนั้นดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 เมื่อวิเคราะห์ด้วย PCR แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,537 bp (รูปที่ 3.12)

ส่วนการวิเคราะห์ *Pichia* ST-pPIC3.5 จะใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ 5' AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') และ 3' AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') สังเคราะห์ยีน Sialyltransferase จากจีโนมดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ของ *Pichia* ST-pPIC3.5 ผลจากการทดลองจะได้ PCR product ของยีสต์ ST-pPIC3.5 เมื่อวิเคราะห์ผลด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis

จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ ดีเอ็นเอขนาด 2,200 bp ซึ่งเป็นส่วนของ AOX 1 gene และชิ้นที่ 2 มีขนาด 1,556 bp ซึ่งเป็นชิ้นของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ซึ่งประกอบด้วยส่วนของเวกเตอร์ pPIC3.5 ที่มีขนาด 214 bp และยีน Sialyltransferase ที่มีขนาด 1,342 bp เพราะฉะนั้นดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 เมื่อวิเคราะห์ด้วย PCR แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,556 bp (รูปที่ 3.11)

3.6.2 วิเคราะห์โดยวิธี Southern blotting

การวิเคราะห์ยีน Sialyltransferase ที่เข้าสู่สอคแทรกในโครโมโซมของยีสต์ โดยวิธี Southern blotting นั้น โดยสกัดจีโนมดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของ *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 ให้ได้ปริมาณ 10 ไมโครกรัม และนำไปย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อให้จีโนมดีเอ็นเอมีลักษณะสายตรงแล้วนำไปแยกด้วย เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และทำการย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วนำไป hybridized กับดีเอ็นเอตรวจจับ (Sialyltransferase probe) ผลจากการทดลองพบว่ายีน Sialyltransferase สามารถสอคแทรกในโครโมโซมของยีสต์ได้ และตรวจพบ *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 ได้ โดยพบแถบที่ให้ผลบวกบนเมมเบรนตรงตำแหน่งของจีโนมดีเอ็นเอของ *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 มีขนาด 1.34 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับดีเอ็นเอ Sialyltransferase ที่ใช้เป็น positive control (รูปที่ 3.12)

3.7 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน Sialyltransferase ในยีสต์

3.7.1 การวิเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) จากยีน Sialyltransferase ในยีสต์ด้วยวิธี Northern blotting

ศึกษาการแสดงออกของยีน Sialyltransferase นั้นสามารถทดสอบได้โดยการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นก่อน จากยีน Sialyltransferase โดยกระบวนการที่เรียกว่า Transcription แล้วอาร์เอ็นเอ (RNA) จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน (Translation) ฉะนั้นการตรวจสอบอาร์เอ็นเอ (RNA) ใน *Pichia*

ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 โดยการสกัด Total RNA ได้ปริมาณ 15 ไมโครกรัม และนำมาแยกอาร์เอ็นเอด้วย 1.2% agarose/formaldehyde gel โดยย้อมด้วย ethidium bromide พบว่า 28 S rRNA มีขนาดประมาณ 4.3 กิโลเบส และ 18S rRNA มีขนาด 1.8 กิโลเบส นำแผ่นเจลที่มีอาร์เอ็นเอไปย้ายอาร์เอ็นเอลงบนแผ่นเมมเบรนแล้วจึงทำการตรวจจับ (hybridization) กับดีเอ็นเอตรวจจับ (Sialyltransferase probe) ผลจากการทดลองพบว่า Total RNA ของ *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 สามารถทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอตรวจจับ (Sialyltransferase probe) ได้ โดยขนาดของซีเอ็นอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่ได้ประมาณ 1.9 กิโลเบส (รูปที่ 3.13)

3.7.2 การหาปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase โดยใช้ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc

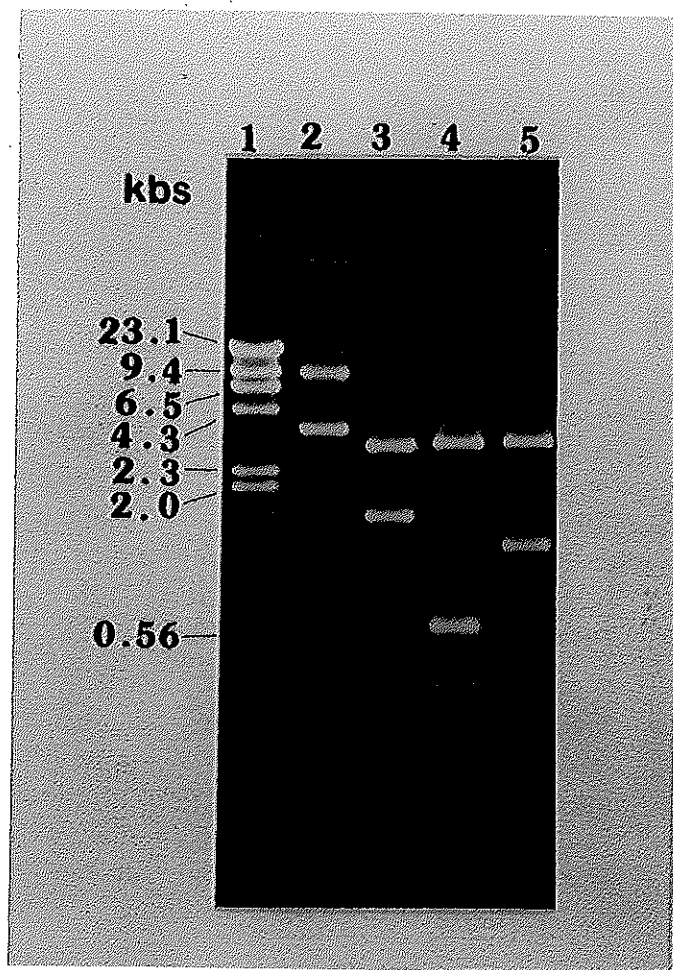
จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMMY medium และเติม 0.5% Methanol เพื่อเหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการแสดงออก โดยจะเติม 0.5% Methanol ทุก 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ปั่นสารละลายเชื้อที่ความเร็ว 1,500 xg นาน 10 นาที สำหรับ *Pichia* ST-pPIC9 จะเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) เนื่องจากเวกเตอร์ pPIC9 โดยทั่วไปเป็นเวกเตอร์ที่มีคุณสมบัติสังเคราะห์โปรตีนแล้วส่งออกภายนอกเซลล์ยีสต์ โดยโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จะอยู่ในส่วนน้ำใส และเมื่อนำไปหาความว่องไว (activity) ของเอนไซม์ โดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย Asialofetuin และสารละลาย CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc ซึ่งใช้เป็นสับสเตรท (substrate) พบว่าเมื่อ *Pichia* ST-pPIC9 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.5% Methanol ครบ 24 ชั่วโมง ความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase มีค่าเท่ากับ 1.02 pmol/min/mg. protein และที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.43 pmol/min/mg. protein ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.14

ส่วน *Pichia* ST-pPIC3.5 จะใช้ส่วนของตะกอน (pellet) ซึ่งเป็นส่วนเซลล์ของยีสต์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ Sialyltransferase ด้วย 0.5 % Methanol เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากเวกเตอร์ pPIC 3.5 เป็นเวกเตอร์ที่มีคุณสมบัติสังเคราะห์

โปรตีนแล้วอยู่ภายในเซลล์ยีสต์ การศึกษาโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จะอยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงต้องทำให้เซลล์แตกและเอาสารละลายภายในเซลล์ออกมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Asialofetuin และสารละลาย CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc ที่ใช้เป็นสับสเตรท (substrate) โดยการทำให้เซลล์แตกนั้นเลือกใช้ 2 วิธีเปรียบเทียบกัน คือ ใช้ glassbead และการ sonication แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 x g นาน 5 นาที ผลจากการทดลองเมื่อใช้ glassbead ค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase เท่ากับ 0.26 pmol/min/mg.protein ดังผลที่แสดงไว้ในรูปที่ 3.15 และเมื่อทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication ปั่นที่ความเร็ว 15,000xg นาน 5 นาทีเช่นกัน พบว่าค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase มีค่าเท่ากับ 0.37 pmol/min/mg.protein ดังผลที่แสดงไว้ในรูปที่ 3.15

3.8 การหาความสามารถของเอนไซม์ Sialyltransferase ในการย้าย CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc เข้าสู่ผนังเซลล์ ของยีสต์ GS115 ยีสต์ ST-pPIC9 และยีสต์ ST-pPIC3.5

จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ GS 115 ยีสต์ ST-pPIC9 และยีสต์ ST-pPIC3.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMMY ใช้ 0.5% Methanol สำหรับเหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการแสดงออกในเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ชนิด มาบ่มรวมกับ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28° ซ. ปั่นและล้างส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ชนิดแล้วละลายตะกอนเซลล์ยีสต์ จากนั้นทำให้ตะกอนเซลล์ยีสต์แตก นำส่วนตะกอนเซลล์มาละลายในบัฟเฟอร์ละลายโปรตีน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ ด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer (Hitachi 204) ผลจากการทดลองจะได้ปริมาณ fluoresceinyl-NeuAc ของยีสต์ GS115 เท่ากับ 5.25 pmol/mg. protein ในขณะที่ใช้ผนังเซลล์ยีสต์ ST-pPIC9 ได้ปริมาณ fluoresceinyl-NeuAc เท่ากับ 20.85 pmol/mg. protein และโปรตีนของผนังเซลล์ยีสต์ ST-pPIC 3.5 มีปริมาณ fluoresceinyl-NeuAc เท่ากับ 36.9 pmol/mg. protein ดังแสดงผลในตารางที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน Sialyltransferase (ST) ในเวกเตอร์ pBluescript SK เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ วิเคราะห์บน 1% agarose gel electrophoresis

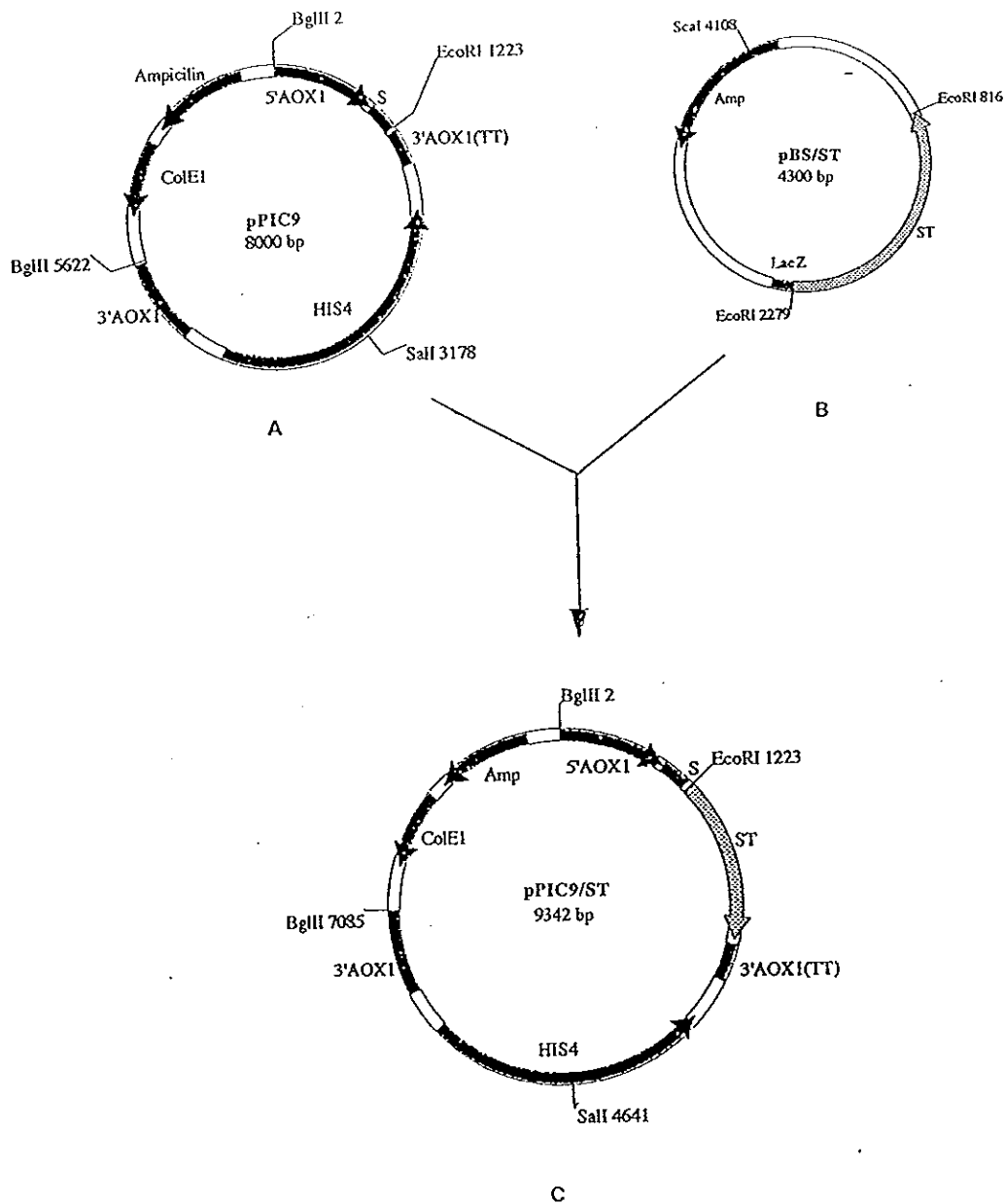
แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hind* III

แถวที่ 2 แถบดีเอ็นเอของยีน ST ใน pBluescript SK ที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แถวที่ 3 แถบดีเอ็นเอของยีน ST ใน pBluescript SK ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

แถวที่ 4 แถบดีเอ็นเอของยีน ST ใน pBluescript SK ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI กับ *Bgl* II

แถวที่ 5 แถบดีเอ็นเอของยีน ST ใน pBluescript SK ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI กับ *Acc*III



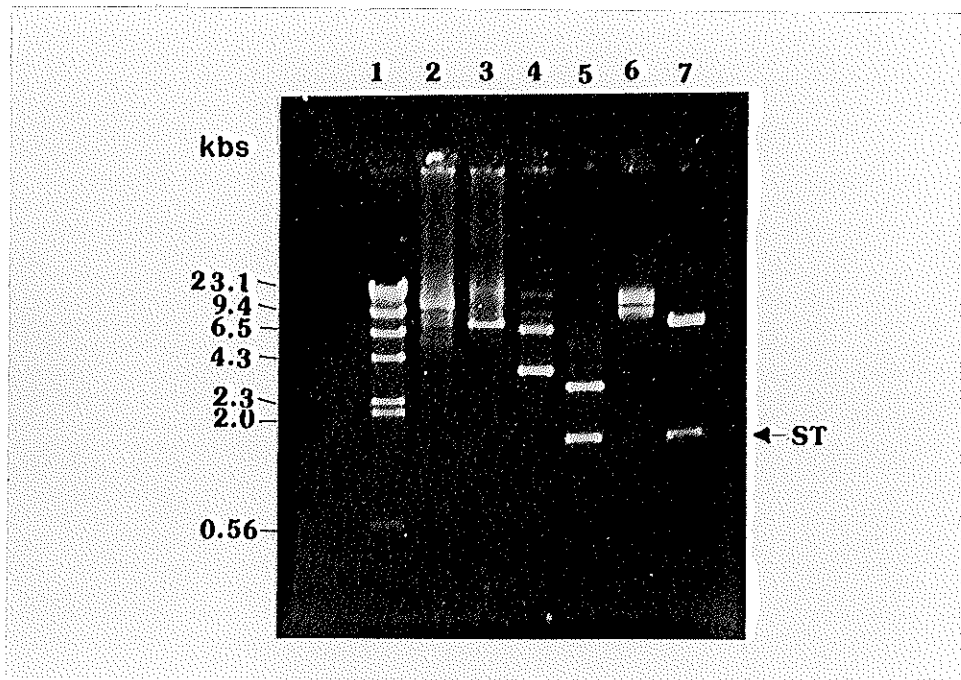
รูปที่ 3.2 แสดงแบบแผนโครงสร้างของ ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ที่ได้จากการโคลน

ยีน Sialyltransferase (ST) เข้าเชื่อมกับเวกเตอร์ pPIC9

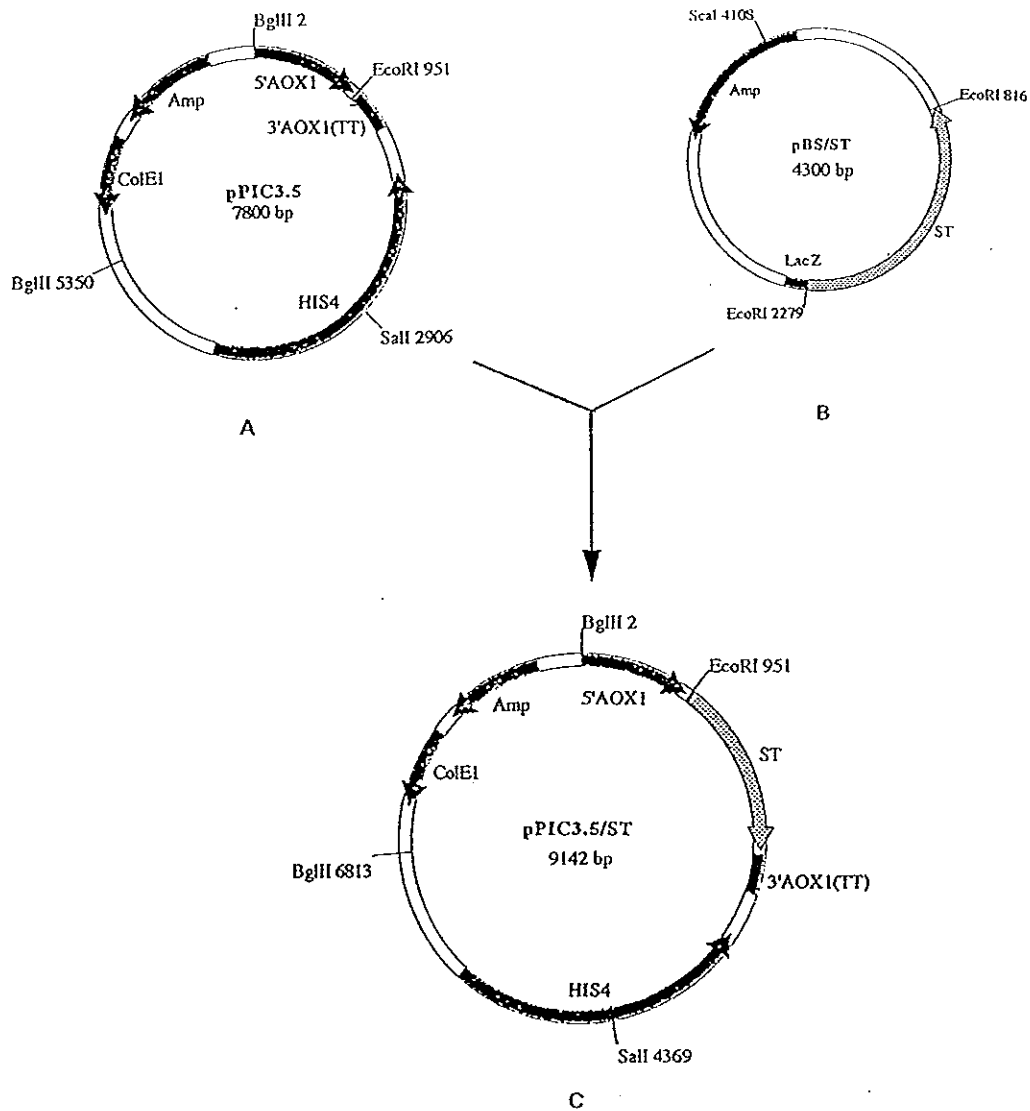
A. พลาสมิดเวกเตอร์ pPIC9

B. ดีเอ็นเอ Sialyltransferase (ST) ในเวกเตอร์ pBluescript SK

C. ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9



รูปที่ 3.3 แแถบดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 จากการโคลนยีน Sialyltransferase (ST) กับ
 เวกเตอร์ pPIC9 ในแบคทีเรีย *E.coli* วิเคราะห์บน 1% agarose gel
 แถวที่ 1 แแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hind* III
 แถวที่ 2 แแถบพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC9
 แถวที่ 3 แแถบพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC9 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI
 แถวที่ 4 แแถบดีเอ็นเอ ST ใน pBluescript SK
 แถวที่ 5 แแถบดีเอ็นเอ ST ใน pBluescript SK ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI
 แถวที่ 6 แแถบดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9
 แถวที่ 7 แแถบดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

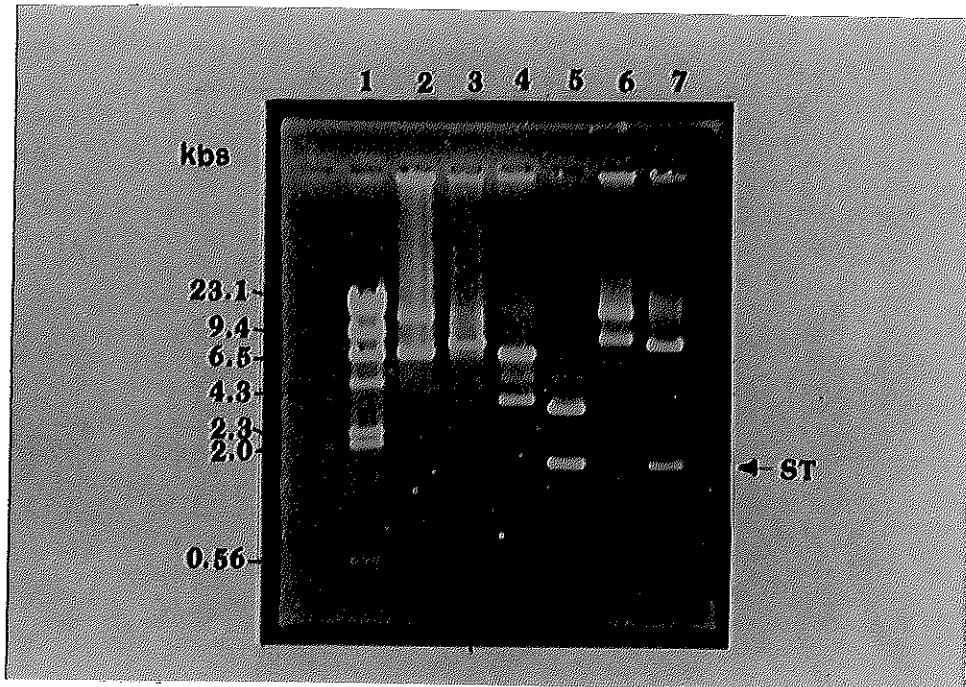


รูปที่ 3.4 แสดงแบบแผนโครงสร้างของ ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ที่ได้จากการโคลนยีน Sialyltransferase (ST) เข้าเชื่อมกับเวกเตอร์ pPIC3.5

A. พลาสมิดเวกเตอร์ pPIC3.5

B. ดีเอ็นเอ Sialyltransferase (ST) ในเวกเตอร์ pBluescript SK

C. ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5



รูปที่ 3.5 แสดงแถบดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 จากการโคลนยีน Sialyltransferase (ST) กับเวกเตอร์ pPIC3.5 ในแบคทีเรีย *E.coli* วิเคราะห์บน 1% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hind* III

แถวที่ 2 แถบพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC3.5

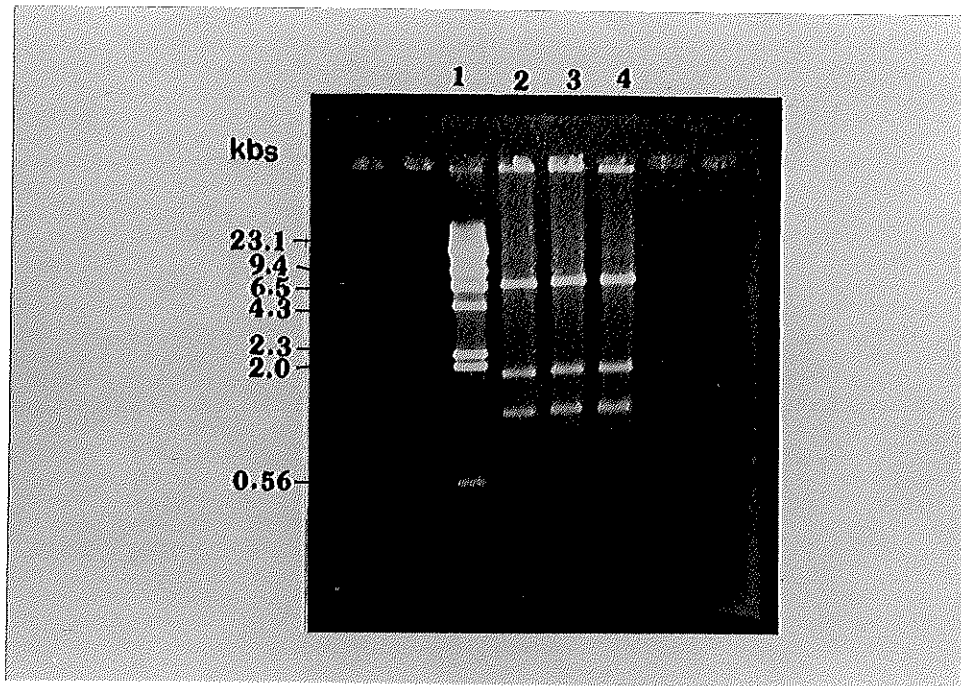
แถวที่ 3 แถบพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC3.5 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

แถวที่ 4 แถบดีเอ็นเอ ST ใน pBluescript SK

แถวที่ 5 แถบดีเอ็นเอ ST ใน pBluescript SK ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

แถวที่ 6 แถบดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5

แถวที่ 7 แถบดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI



รูปที่ 3.6 แสดงขนาดดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 โดยย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *XbaI* กับ *AccIII* เพื่อตรวจสอบแผนที่ยีนของดีเอ็นเอ

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hind III*

แถวที่ 2 แถบดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ย่อยด้วยเอนไซม์ *XbaI* กับ *AccIII*

แถวที่ 3 แถบดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ย่อยด้วยเอนไซม์ *XbaI* กับ *AccIII*

แถวที่ 4 แถบดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ย่อยด้วยเอนไซม์ *XbaI* กับ *AccIII*

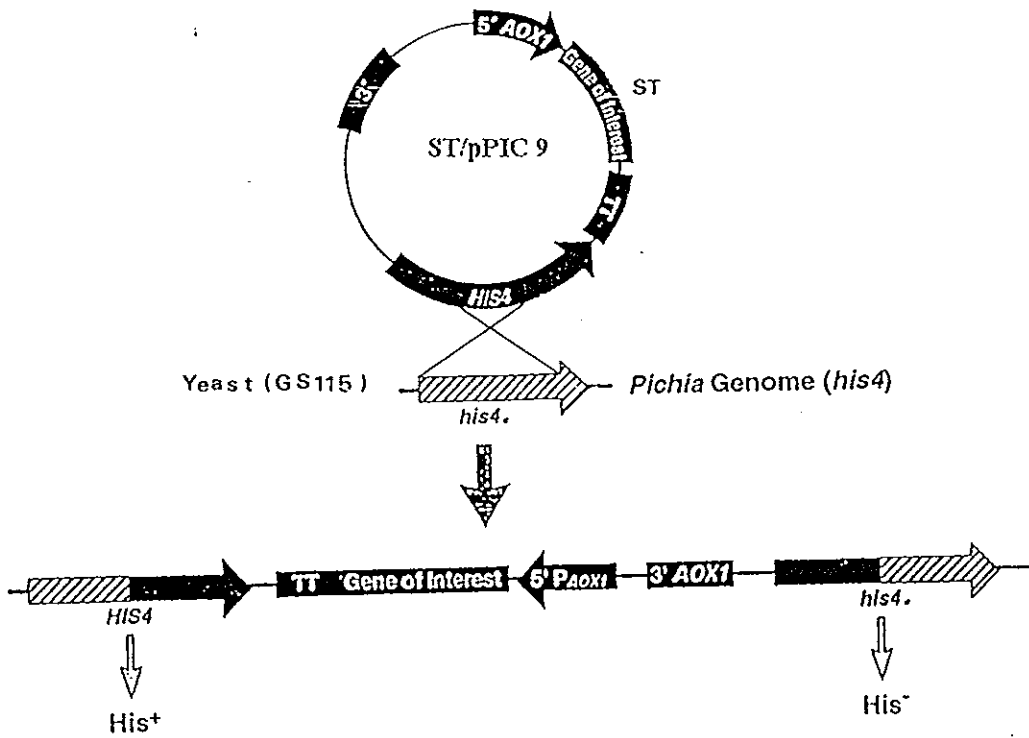
ANNTCNCCCA	CTNGATAAGA	TNCCCACCTG	CTCANTATTC	GAAGGATCCA	50
AACGATGAGA	TTTCCTTCAA	TTTTTTNNTG	AGTTTTTATTC	GCAGCATCCT	100
CCGCATTAGC	TGCTCCAGTC	AACACTACAA	CAGAAGATGA	AACGGCACAA	150
ATTCCGGCTG	AAGCTGTCAT	CGGTTACTCA	GATTTAGAAG	GGGATTTCGA	200
pPIC9					
TGTTGCTGTT	TTGCCATTTT	CCAACAGCAC	AAATAACGGG	TTATTGTTTA	250
TAAATACTAC	TATTGCCAGC	ATTGCTGCTA	AAGAAGAAGG	GGTATCTCTC	300
EcoR I					
GAGAAAAGAG	AGGCTGAAGC	TTACGTAGAA	TTCCCTGGAC	GATTGATTAT	350
codon					
GATTCATACC	AACTTGAAGA	AAAAGTTCAG	CCTCTTCATC	CTGGTCTTTC	400
TCCTGTTCGC	AGTCATCTGT	GTTTGGGAAGA	AAGGGAGCGA	CTATGAGGCC	450
Sialyltransferase					
CTTACACTGC	AAGCCAAGGA	GTTCCAGATG	CCCAAGAGCC	AGGAGAAAGT	500
GGCCATGGGG	TCTGCTTCCC	AAGGTGTGTG	TCTCAAACCA	GCAAGGCNAA	550
GGACCCTAAN	GGAAAGACAT	TCCCAATTCC	TTNAGTTTAC	CCCACAGGGG	600
TTCACNAGCC	CAAAGGGTCA	AAACCAACAG	CCCTTTCCTT	TTCCAAGGTN	650
GTTGGGGACA	AAAGGGAAC	TCCNNCNTTT	NCTTCAAAAA	ANTTTTAACC	700
CNCNANGGAA	TTGGAATNNC	CCCCAANNNN	NTTNNCCTN	NGGGGNNATT	750
TTTNNTTGTN	NTNAANAANN	NNNANNNNCN	NNNNNNGNNN	TTTTTTTTTN	800
GGNNAANCNN	CCNTNTTTTN	GNANAACAAA	AANCCCAAAA	TTTTTTTTT..	850

รูปที่ 3.7 แสดงลำดับเบสของจีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 โดยมีตำแหน่ง start codon (ATG)

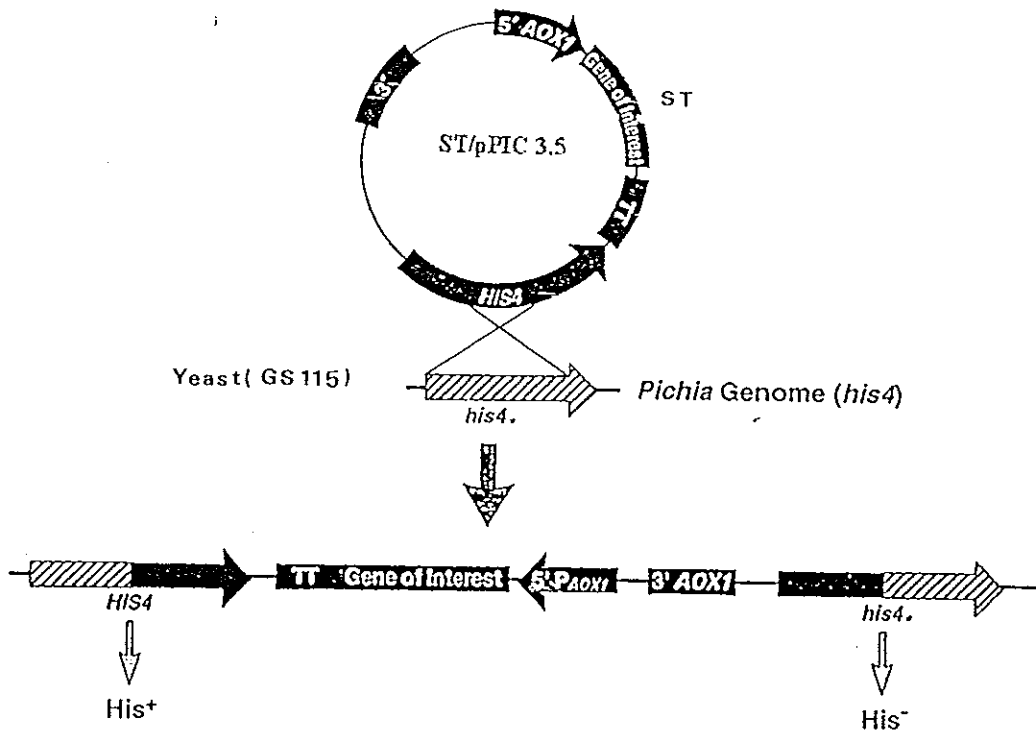
บนยีน Sialyltransferase ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC9

pPIC3.5					
ANGCTGCCCCG	GTCTTCNTTA	AGATCAAAAA	ACAAC TAATT	ATTCGAAGGA	50
	<i>EcoR</i> I				
TCCTACGTAG	AATTC CCTGG	ACGATTGATT	TTGATTCATA	CCAACTTGAA	100
GAAAAAGTTC	AGCCTCTTCA	TCCTGGTCTT	TCTCCTGTTC	GCAGTCATCT	150
		start codon			
GTGTTTGAA	NAAAGGGAGC	GACTATGAGG	CCCTTACACT	GCAAGCCAAG	200
GAGTTCCAGA	TGCCCAAGAG	CCAGGAGAAA	GTGGCCATGG	GGTCTGCTTC	250
CCAGGTTGTG	TTCTCAAACA	GCAAGCAAGA	CCCTAAGGAA	GACATTCCAA	300
	<i>Sialyltransferase</i>				
TCCTCAGTTA	CCACAGGGTC	ACAGCCAAGG	TCAAACCACA	GCCTTCCTTC	350
CAGGTGTGGG	ACAAGGACTC	CACATACTCA	AAACTTAACC	CCAGGCTGCT	400
GAAGATCTGG	AGAAACTAT	CTGAACATGA	ACAAATTTAA	AGTATCCTTG	450
CAAGGGACCG	GGGCCAGGAG	TCAAGTTCAN	CCGTAGAAGC	ACTGCGTTGN	500
CACCTTCGAA	TACCATTGTG	AACCGTGTCT	ATGGATAGAG	GTCACANAGT	550
TTCCCTTTCA	ACACCACTTG	ANTGGGAAGG	GTTACCCTGC	CCAAGGGANA	600
ACTTTNNAAC	CCAAANGGTT	GGGGCCCTTT	GGNCNAAAAA	GGTGNTGGCC	650
CNNACGTCTT	TNTTTTCTNG	CANNANATTC	TTNTTNAAAA	AACNTCCCCA	700
AANCTTTGGG	GTCCGNAAAA	CCNCNCNGGN	NNTNCCCCCC	GGGAAAAGGG	750
GAAATTTGGG	NGGGGAAACN	NNATTTTNNN	GGNGCCNTTT	NNANANAAAA	800
TTTNNNCCCC	NCAATATTNN	GNCCNCNNN	NNTTAAAAAA	ACCCCNTTTT	850
TTNATATCNN	NTTN.....				900

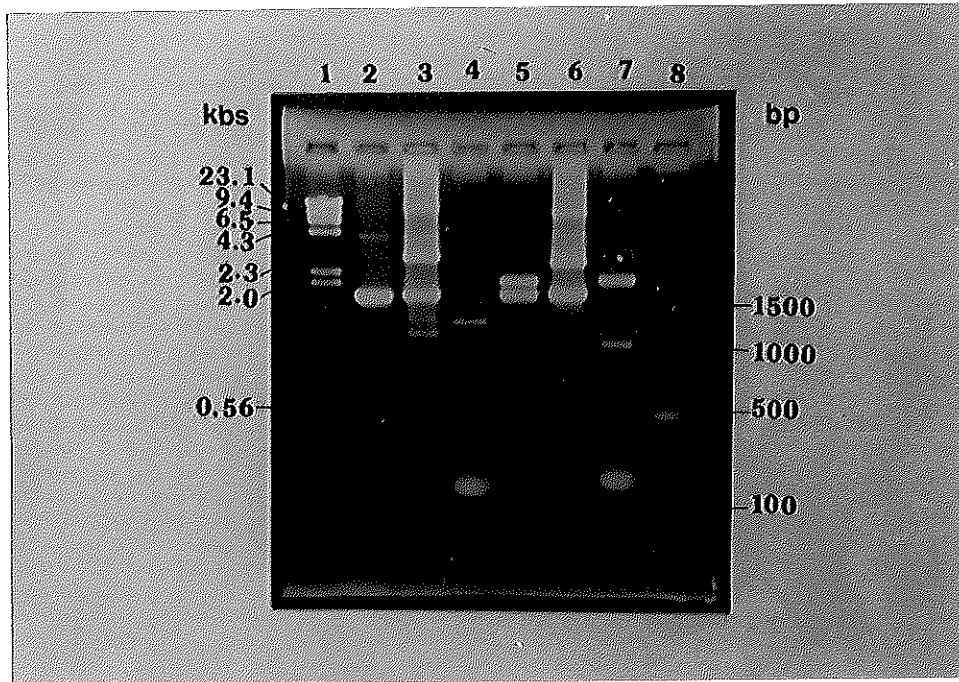
รูปที่ 3.8 แสดงลำดับเบสของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 โดยมีตำแหน่ง start codon (ATG) บนยีน Sialyltransferase ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC3.5



รูปที่ 3.9 ลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ที่เข้าสอดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ GS 115 โดยปลายทั้งสองด้านของยีน *HIS4* ของ ST-pPIC9 จะเข้าสอดแทรกในตำแหน่ง *his4* ของยีสต์ GS 115



รูปที่ 3.10 ลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ที่เข้าสู่ดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ GS 115 โดยปลายทั้งสองด้านของยีน HIS4 ของ ST-pPIC3.5 จะเข้าสู่ดแทรกในตำแหน่ง *his4* ของยีสต์ GS 115



รูปที่ 3.11 แสดงผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 ที่แทรกอยู่ในโครโมโซมของยีสต์ โดยวิธี PCR

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hind* III

แถวที่ 2 แถบ PCR product ของ ST-pPIC9 ในโครโมโซมของยีสต์ GS115

แถวที่ 3 แถบ Control PCR product ของ ST-pPIC9 ใน *E.coli*

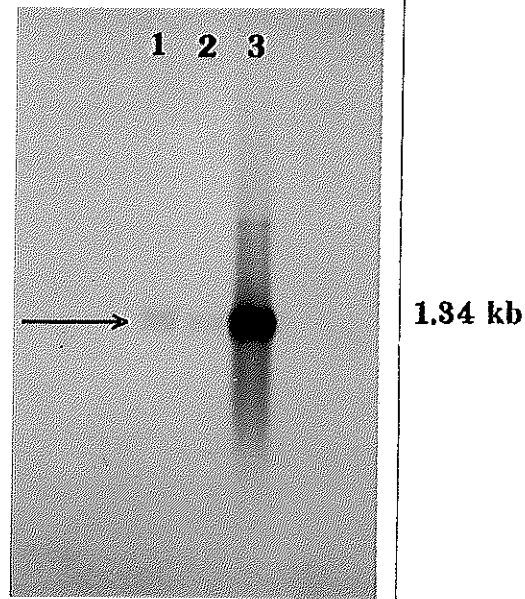
แถวที่ 4 แถบ Control PCR product ของเวกเตอร์ pPIC9

แถวที่ 5 แถบ PCR product ของ ST-pPIC3.5 ในโครโมโซมของยีสต์

แถวที่ 6 แถบ Control PCR product ของ ST-pPIC3.5 ใน *E.coli*

แถวที่ 7 แถบ Control PCR product ของเวกเตอร์ pPIC3.5

แถวที่ 8 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (ladder)



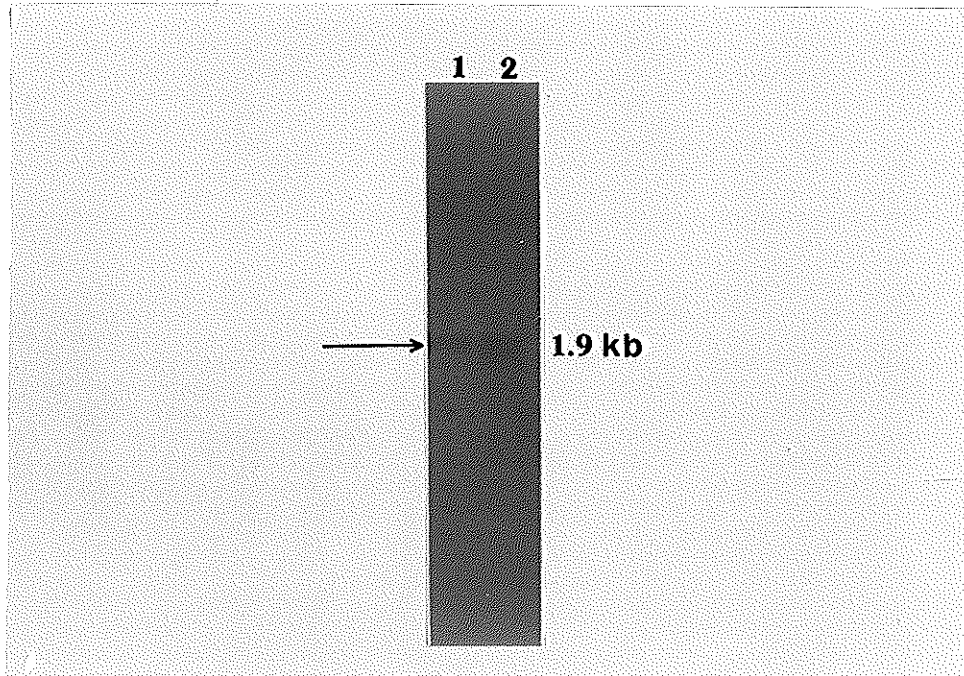
รูปที่ 3.12 แสดงผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant Sialyltransferase gene)

ในยีสต์ โดยวิธี Southern blotting

แถวที่ 1 ST-pPIC3.5 ที่สอดแทรกในโครโมโซมของยีสต์

แถวที่ 2 ST-pPIC9 ที่สอดแทรกในโครโมโซมของยีสต์

แถวที่ 3 Positive control ของ Sialyltransferase gene

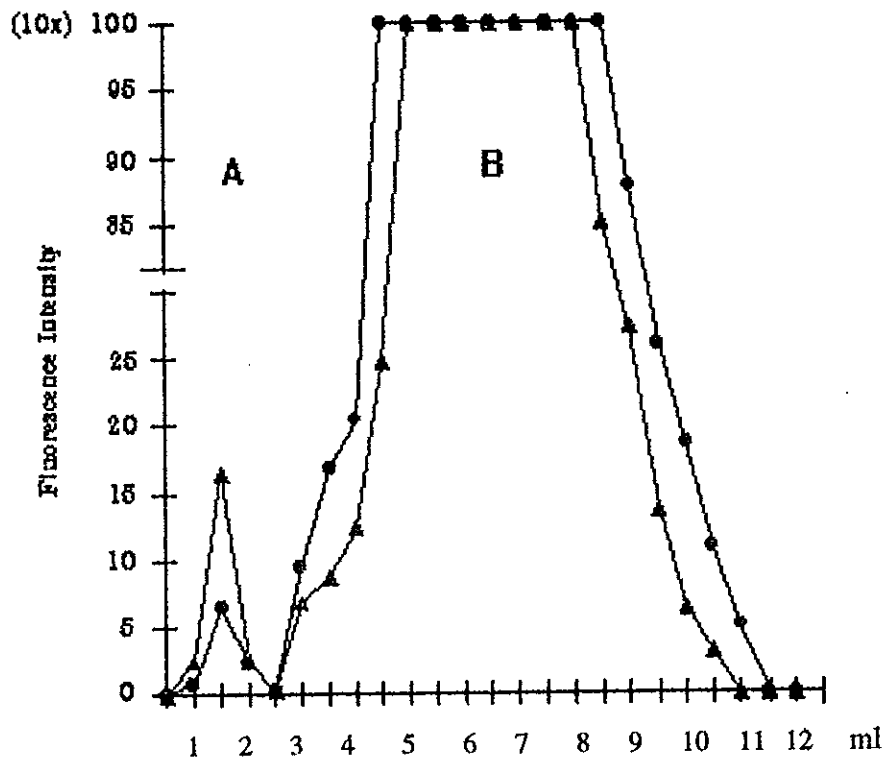


รูปที่ 3.13 แสดงผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant Sialyltransferase gene)

ในยีสต์ โดยวิธี Northern blotting

แถวที่ 1 Total RNA ของ ST-pPIC9 ในยีสต์

แถวที่ 2 Total RNA ของ ST-pPIC3.5 ในยีสต์



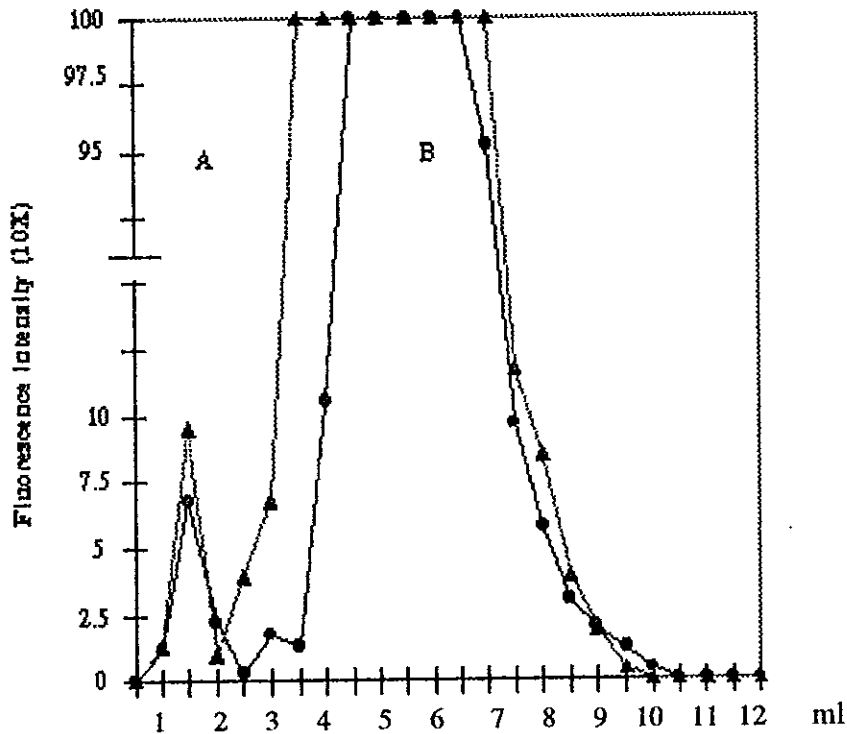
รูปที่ 3.14 แบบแผนการแยก Asialofetuin- fluoresceinyl-NeuAc ของยีสต์ ST-pPIC9 ออกจาก CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc โดยคอลัมน์ Sephadex G-50 ขนาด 0.4 x 12.5 เซนติเมตรและชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6 โดยอัตรา 0.5 มล/นาที

▲ = แบบแผนการแยก Asialofetuin- fluoresceinyl-NeuAc ที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ ST-pPIC9 ภายหลังถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก ด้วย 0.5% methanol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

● = แบบแผนการแยก Asialofetuin- fluoresceinyl-NeuAc ที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ ST-pPIC9 ภายหลังถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก ด้วย 0.5% methanol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

A = Asialofetuin เมื่อมีการเกาะติดของ fluoresceinyl-NeuAc

B = สารละลาย CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc



รูปที่ 3.15 แบบแผนการแยก Asialofetuin fluoresceinyl-NeuAc ของบีสต์ ST-pPIC3.5 ออกจาก CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc โดยคอลัมน์ Sephadex G-50 ขนาด 0.4 x 12.5 เซนติเมตรและชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6 ด้วยอัตรา 0.5 มล/นาที

- ▲ = แบบแผนการแยก Asialofetuin- fluoresceinyl-NeuAc ที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้ไซโตพลาสซึมของเซลล์ยีสต์ ST-pPIC3.5 โดยทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication ภายหลังถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก ด้วย 0.5% methanol
- = แบบแผนการแยก Asialofetuin- fluoresceinyl-NeuAc ที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้ไซโตพลาสซึมของเซลล์ยีสต์ ST-pPIC3.5 โดยทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี glassbead ภายหลังถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก ด้วย 0.5% methanol

A = Asialofetuin เมื่อมีการเกาะติดของ fluoresceinyl-NeuAc

B = สารละลาย CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc

ตารางที่ 3.1 ปริมาณของ fluoresceinyl-NeuAc ของยีสต์ GS 115 ยีสต์ ST-pPIC9 และยีสต์ ST-pPIC3.5

ชนิดของยีสต์	ปริมาณตัวอย่าง (μl)	Glycoprotein-fluoresceinyl-NeuAc (nM)	ปริมาณโปรตีน (mg)	Glycoprotein-fluoresceinyl-NeuAc (pmol/mg.protein)	ค่าเฉลี่ย Glycoprotein-fluoresceinyl-NeuAc (pmol/mg.protein)
GS 115	10	100	0.20	5.0	5.25
GS 115	20	210	0.38	5.5	
ST-pPIC 9	10	290	0.14	20.7	20.85
ST-pPIC 9	20	590	0.28	21.0	
ST-pPIC 3.5	10	350	0.096	36.5	36.9
ST-pPIC 3.5	20	710	0.19	37.3	

บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบแผนที่ยีนของจีเอ็นเอ Sialyltransferase โดยใช้เอนไซม์ตัด

จำเพาะ

ยีน Sialyltransferase ที่ใช้ในการศึกษาจะเชื่อมอยู่กับพลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript SK เมื่อนำพลาสมิดเวกเตอร์ชนิดนี้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าเอนไซม์ *EcoRI* สามารถตัดพลาสมิดเวกเตอร์ชนิดนี้ได้จีเอ็นเอ 2 ชิ้น โดยพลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript SK จะมีขนาด 2,958 bp (Promega, 1996) จีเอ็นเออีกชิ้นคือ ยีน Sialyltransferase จะมีขนาดประมาณ 1,342 bp เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีน Sialyltransferase โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* กับ *Bgl II* ซึ่งเอนไซม์ *Bgl II* สามารถย่อยจีเอ็นเอ Sialyltransferase ได้ 2 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง 823 และ 202 บนยีนยีน Sialyltransferase และเมื่อตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าจะได้ชิ้นจีเอ็นเอ Sialyltransferase 3 ชิ้น โดยมีขนาดประมาณ 3.0 kb 0.6 kb และ 0.2 kb ซึ่งโดยหลักการแล้วควรจะได้ชิ้นของแถบจีเอ็นเอ 4 แถบ โดยแถบที่ 1 คือ ส่วนของเวกเตอร์ pBluescript SK ขนาด 2,958 bp โดยชิ้นที่ 2 มีขนาด 202 bp ซึ่งจะเป็นชิ้นยีนที่อยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 1 ถึง 202 ของยีน Sialyltransferase ชิ้นที่ 3 มีขนาด 621 bp จะเป็นชิ้นยีนที่อยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 202 ถึง 823 ของยีน Sialyltransferase และชิ้นที่ 4 จะมีขนาด 519 bp ซึ่งเป็นชิ้นยีนที่อยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 823 ถึง 1,342 bp ของยีน Sialyltransferase แต่เนื่องจากตรวจสอบชิ้นจีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1 % agarose gel จึงส่งผลให้ชิ้นจีเอ็นเอขนาด 621 bp และ 519 bp ไม่สามารถแยกขนาดที่แตกต่างกันได้ เนื่องจากความเข้มข้นของเนื้อเจลที่เปอร์เซ็นต์ต่ำไม่สามารถแยกขนาดของจีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กที่ใกล้เคียงกันได้ จึงเห็นเป็นชิ้นจีเอ็นเอแถบเดียวและอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน ส่งผลให้เห็นเพียงแค่ 3 แถบของจีเอ็นเอดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.1

และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะอีก 2 ชนิด คือ *EcoRI* กับ *Acc III* พบว่าเอนไซม์ *Acc III* ย่อยดีเอ็นเอ Sialyltransferase ได้ที่ตำแหน่ง 1,071 เพราะฉะนั้นเมื่อตรวจสอบด้วย เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้น โดยชิ้นแรกจะมีขนาด 1,071 bp ซึ่งเป็นชิ้นยีนที่อยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 1 ถึงลำดับเบสที่ 1,071 บนชิ้นยีน Sialyltransferase และชิ้นที่สองมีขนาด 271 bp เป็นชิ้นยีนที่อยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 1,071 ถึงลำดับเบสที่ 1,342 บนชิ้นยีน Sialyltransferase เช่นกัน ส่วนชิ้นที่สาม คือ ส่วนของเวกเตอร์ที่ถูกตัดออกจากยีน Sialyltransferase ได้โดยเอนไซม์ *EcoRI* (รูปที่ 3.1) จากการตรวจสอบแผนที่ยีนของดีเอ็นเอ Sialyltransferase โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ชิ้นยีนที่ย่อยได้จะมีขนาดที่ถูกต้อง นั่นแสดงว่ายีน Sialyltransferase ที่ใช้ในการทดลองมีแบบแผนของยีนที่สอดคล้องกับยีน Sialyltransferase จริง

4.2 การตรวจสอบแผนที่ยีนของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 9 และ ST-pPIC

3.5 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และการหาตำแหน่ง Start codon

การโคลนยีน Sialyltransferase เข้าพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC 9 ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ใช้สังเคราะห์โปรตีนแล้วส่งออกนอกเซลล์ จะได้ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC 9 ที่มีขนาด 9,342 bp เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นที่มีขนาด 8,000 bp และ 1,342 bp ซึ่งเป็นขนาดของเวกเตอร์ pPIC 9 และขนาดของยีน Sialyltransferase ตามลำดับ จากลักษณะแผนที่ยีนของดีเอ็นเอลูกผสม ตำแหน่งของยีน Sialyltransferase ที่ต้องการแสดงออกจะต้องอยู่ในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ ฉะนั้นเมื่อนำดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *AccIII* และ *Xba I* ซึ่งเอนไซม์ *AccIII* นี้สามารถตัดยีน Sialyltransferase ได้ที่ตำแหน่ง 1,071 และตัดเวกเตอร์ pPIC9 ได้ที่ตำแหน่ง 3,845 สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดที่สอง คือ *Xba I* ตัดได้เฉพาะเวกเตอร์ pPIC9 ที่ตำแหน่ง 2,033 และเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดพร้อมกัน สามารถย่อยดีเอ็นเอได้ 3 ชิ้น ที่มีขนาด 6,450 bp 1,812 bp และ 1,080 bp (รูปที่ 3.6) ซึ่งเป็นลักษณะแบบแผนของยีนที่ถูกต้อง สำหรับตำแหน่งของยีน Sialyltransferase ที่มีทิศทางตรงกันข้ามกับโปรโมเตอร์ เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด

เช่นเดิม แต่ยีน Sialyltransferase ถูกโคลนเข้าเวกเตอร์ pPIC9 โดยทิศทางของยีนอยู่ตรงข้ามกับทิศทางของโปรโมเตอร์ ทำให้ยีนเอถูกย่อยเป็น 3 ชิ้นเช่นกัน ซึ่งมีขนาด 5,649 bp 1,812 bp และ 1,881 bp ซึ่งเป็นลักษณะแบบแผนยีนที่ไม่ถูกต้อง และไม่นำไปใช้เพื่อการทดลองเนื่องจากการศึกษาการแสดงออกของยีนเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นชนิดเดียวกับยีนที่ใช้ในการทดลองเท่านั้น

ส่วนยีนเอถูกผสม ST-pPIC 3.5 ที่มีขนาด 9,142 bp เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* จะได้ยีนเอ 2 ชิ้นที่มีขนาด 7,800 bp และ 1,342 bp ซึ่งเป็นขนาดของเวกเตอร์ pPIC3.5 และของยีน Sialyltransferase ตามลำดับ จากลักษณะแผนที่ยีนของยีนเอถูกผสม ตำแหน่งของยีน Sialyltransferase ที่ต้องการแสดงออกภายในเซลล์ต้องอยู่ในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ เมื่อยีนเอถูกผสมถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *AccIII* กับ *Xba I* โดยเอนไซม์ *AccIII* นี้สามารถตัดยีน Sialyltransferase ได้ที่ตำแหน่ง 1,071 และตัดเวกเตอร์ pPIC3.5 ได้ที่ตำแหน่ง 3,573 สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดที่สอง คือ *XbaI* จะตัดได้เฉพาะเวกเตอร์ pPIC3.5 ที่ตำแหน่ง 1,761 เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดพร้อมกัน สามารถย่อยยีนเอได้ 3 ชิ้น ที่มีขนาด 6,250 bp 1,812 bp และ 1,080 bp ซึ่งเป็นลักษณะแบบแผนของยีนที่ถูกต้อง สำหรับตำแหน่งของยีน Sialyltransferase ที่มีทิศทางตรงกันข้ามกับโปรโมเตอร์ เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในข้างต้น จะได้ยีนเอ 3 ชิ้นเช่นกัน แต่มีขนาด 5,450 bp 1,812 bp และ 1,880 bp ซึ่งเป็นลักษณะแบบแผนของยีนที่ไม่ถูกต้อง และไม่นำไปใช้เพื่อการทดลองเนื่องจากการศึกษาการแสดงออกของยีนเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนต้องเป็นชนิดเดียวกับยีนที่ใช้ในการทดลองเท่านั้น

จากการตัดต่อยีน Sialyltransferase เข้าในเวกเตอร์ pPIC9 และนำเข้าเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *E.coli* (Top10F') จะได้ยีนเอถูกผสม ST-pPIC9 เช่นเดียวกับการตัดต่อยีน Sialyltransferase เข้าในเวกเตอร์ pPIC3.5 จะได้ยีนเอถูกผสม ST-pPIC3.5 เมื่อศึกษาลำดับเบสของยีนเอถูกผสมทั้ง 2 ชนิด จะพบลำดับเบส ATG (Start codon) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีนบนยีน Sialyltransferase ของยีนเอถูกผสมทั้ง 2 ชนิด นั้นแสดงว่ายีนเอถูกผสมทั้ง 2 ชนิด คือ ยีนเอถูกผสม ST-pPIC9 และ

ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 สามารถนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน Sialyltransferase ต่อไปได้

4.8 การโคลนดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 เข้ายีสต์ GS 115

ลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และ ST-pPIC3.5 มีลักษณะของยีน *HIS4* ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่จะใช้สำหรับการตรวจสอบเมื่อนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้ายีสต์ โดยดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SaII* เอนไซม์ชนิดนี้จะตัดตรงตำแหน่ง *HIS 4* ของดีเอ็นเอลูกผสม จะได้ดีเอ็นเอที่มีลักษณะสายตรง (Invitrogen, 1997) และเมื่อโคลนเข้ายีสต์ GS115 (ที่มียีนชนิด *his 4*) ซึ่งคือส่วนของยีน histidine ที่ไม่สามารถสร้างกรดอะมิโน histidine ได้ ดีเอ็นเอลูกผสมที่มีลักษณะสายตรงจะสอดแทรกเข้าไปเชื่อมต่อกับโครโมโซมของยีสต์ (รูปที่ 3.9) และรูปที่ 3.10) ซึ่งดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 2 ชนิดนี้ จะไม่มีจุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุลในเซลล์ของยีสต์ ดังนั้นเมื่อดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์แล้ว จะต้องแทรกเข้าไปอยู่ในส่วนของโครโมโซมของยีสต์เท่านั้นจึงจะคงอยู่ได้ การแทรกตัวของดีเอ็นเอลูกผสมเข้าไปในโครโมโซมของยีสต์แล้ว จะเกิดการเข้าคู่กันของส่วนของยีนที่มาจากยีสต์และเวกเตอร์ เกิดเป็นจีโนมดีเอ็นเอของยีสต์ที่มียีน *HIS 4* จากดีเอ็นเอลูกผสม ทำให้สามารถใช้ในการคัดเลือกยีสต์ ST-pPIC9 และยีสต์ ST-pPIC3.5 ที่มียีน *HIS 4* ได้ โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี histidine (Cregg และคณะ, 1985) และพบว่ายีสต์ทั้งสองชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มี histidine

ยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้ คือ *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 ที่มีลักษณะ Genotype คือ *HIS 4* ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และยังมีลักษณะ phenotype คือ *Mut⁺* (Methanol utilization plus) ซึ่งเป็นยีสต์ที่เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Methanol เมื่อนำยีสต์ ST-pPIC9 และ ยีสต์ ST-pPIC3.5 ทั้ง 2 ชนิดมาวิเคราะห์หาดีเอ็นเอ Sialyltransferase โดยวิธี PCR ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มขยายจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอแม่พิมพ์เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้น จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบที่สำคัญต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และโอลิโก

นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ α -Factor primer กับ 3' AOX1 primer ที่ใช้ใน *Pichia* ST-pPIC9 พบว่าผลของการสังเคราะห์โดยวิธี PCR ของ *Pichia* ST-pPIC9 มีขนาด 1,537 bp ซึ่งจากการทำ Control โดยนำเวกเตอร์ pPIC9 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR ผลจากการสังเคราะห์พบว่าเวกเตอร์ pPIC9 มีขนาด 195 bp โดยที่ α -Factor primer จะเข้าไปจับกับลำดับเบสของ *Pichia* ST-pPIC9 ที่ตำแหน่ง 1,152 ของจีนีน ส่วน 3' AOX 1 primer จะเข้าไปจับกับลำดับเบสของ *Pichia* ST-pPIC9 ตำแหน่ง 2,689 ของจีนีน โดยจีนีน Sialyltransferase ที่มีขนาด 1,342 bp นั้นจะอยู่ระหว่างโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ฉะนั้นผลจากการทดลองจะได้ชิ้นดีเอ็นเอเพียงชิ้นเดียวที่มีขนาด 1,537 bp ที่เกิดจากจีนีน Sialyltransferase ที่มีขนาด 1,342 bp เชื่อมติดกับเวกเตอร์ pPIC9 ที่มีขนาด 195 bp

ส่วนใน *Pichia* ST-pPIC3.5 ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ 5' AOX1 และ 3' AOX 1 ซึ่งจะแตกต่างจาก *Pichia* ST-pPIC9 ที่มีส่วนของไพรเมอร์จีนีน α -Factor จีนีน 3' AOX1 และจีนีน 5' AOX1 ส่วนใน *Pichia* ST-pPIC3.5 จะมีเฉพาะจีนีนของ 5' AOX1 และ 3' AOX 1 เท่านั้น พบว่าผลของการสังเคราะห์ด้วยวิธี PCR ของ *Pichia* ST-pPIC3.5 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น (PCR product) ที่มีขนาด 2,200 bp เป็นชิ้นดีเอ็นเอของจีนีน AOX 1 และชิ้นที่สอง คือ *Pichia* ST-pPIC3.5 จะมีขนาด 1,556 bp ซึ่งจากการทำ Control ในเวกเตอร์ pPIC3.5 จะสังเคราะห์ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 214 bp (Invitrogen, 1997) โดยลำดับเบสของ 5' AOX 1 primer จะเข้าไปจับกับลำดับเบสของ *Pichia* ST-pPIC3.5 ที่ตำแหน่ง 855 ของจีนีน Sialyltransferase ส่วนลำดับเบสของ 3' AOX 1 primer จะเข้าไปจับกับลำดับเบสของ *Pichia* ST-pPIC3.5 ที่ตำแหน่ง 2,411 ของจีนีน Sialyltransferase โดย *Pichia* ST-pPIC3.5 ที่สังเคราะห์ได้จะมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,556 bp นั้น ซึ่งเกิดจากจีนีน Sialyltransferase ที่มีขนาด 1,342 bp รวมกับขนาดของเวกเตอร์ pPIC3.5 ขนาด 214 bp ซึ่งจะเท่ากับขนาดของ *Pichia* ST-pPIC 3.5

แสดงว่าในยีสต์ ST-pPIC 9 และยีสต์ ST-pPIC 3.5 จะมีจีนีนของดีเอ็นเอ Sialyltransferase ที่สามารถเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ GS 115 ได้ เช่น

เกี่ยวกับการวิเคราะห์ยีน Sialyltransferase ที่สอดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ โดยวิธี Southern blotting ซึ่งให้ผล positive เช่นกัน

4.4 การแสดงออกของยีน Sialyltransferase ภายนอกเซลล์ยีสต์ ST-pPIC 9 และภายในเซลล์ยีสต์ ST-pPIC 3.5

การแสดงออกของยีน Sialyltransferase โดยการวิเคราะห์หาอาร์เอ็นเอ (RNA) ด้วยวิธี Northern blotting พบว่ายีสต์ ST-pPIC 9 และยีสต์ ST-pPIC 3.5 เมื่อทำปฏิกิริยากับคิเอ็นเอตรวจจับ จะได้จีนอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่มีขนาด 1.9 kb (รูปที่ 3.13) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ายีน Sialyltransferase ที่มีขนาด 1,342 bp เนื่องจากมีการถอดรหัสจากคิเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอที่ได้พบว่าทางด้านปลาย 3' จะมีการเติมลำดับเบสของ poly A ที่ได้มาจากเวกเตอร์ ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีนตรงบริเวณนี้อีกประมาณ 300-400 นิวคลีโอไทด์ จึงทำให้ขนาดของอาร์เอ็นเอที่ทดสอบได้มีขนาดใหญ่กว่ายีน Sialyltransferase

จากการศึกษาของ Kurosawa และคณะ (1996) ได้ทำการโคลนยีน α 2,6-Sialyltransferase จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของหนูเข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (COS-7 cells) พบว่ามีการแสดงออกของยีน α 2,6-Sialyltransferase เช่นเดียวกับการศึกษาวิจัยในครั้งนี โดยเมื่อวิเคราะห์หาอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Northern blotting พบว่าอาร์เอ็นเอจะมีขนาด 2.0 kb ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการวิจัยในครั้งนี แต่พบว่าความสามารถในการแสดงออกของยีน α 2,6-Sialyltransferase ในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kitagawa และคณะ (1996) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน α 2,3-Sialyltransferase จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของคน และเมื่อวิเคราะห์หาอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Northern blotting พบว่าอาร์เอ็นเอจะมีขนาด 2.0 kb เช่นกัน และความสามารถในการแสดงออกของยีน Sialyltransferase ในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดของคนก็มีความแตกต่างกัน

สำหรับการแสดงออกของยีน Sialyltransferase ภายนอกเซลล์ยีสต์ ST-pPIC 9 นั้นต้องมีการเหนี่ยวนำให้ยีสต์แสดงออกโดยใช้ Methanol เป็นตัวเหนี่ยวนำ เนื่องจาก *Pichia pastoris* เป็นยีสต์ชนิด Methylophilic ที่มี alcohol oxidase promoter หรือ

AOX 1 gene และจากคุณสมบัติของเวกเตอร์ pPIC 9 จะสังเคราะห์โปรตีนแล้วส่งออกภายนอกเซลล์ยีสต์ เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ ST-pPIC9 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Sialyltransferase ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Methanol และจะต้องใช้ Methanol เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อยีสต์แสดงออกหรือให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ Sialyltransferase เป็นเวลา 24 ชม. โดยจะนำเอาส่วนน้ำใสของเชื้อยีสต์ ST-pPIC9 ไปหาความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase โดยทำปฏิกิริยากับ Asialofetuin และ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc ซึ่งใช้เป็นสับสเตรท พบว่าสามารถตรวจสอบความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase ได้ $1.02 \text{ pmol/min/mg.protein}$ ซึ่งพบว่าการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ ST-pPIC 9 มีการสังเคราะห์เอนไซม์ Sialyltransferase เป็นเวลา 24 ชม. จะได้ค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase สูงกว่าการเหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการสังเคราะห์โปรตีนภายในเวลา 48 ชม. ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากสภาพของเอนไซม์ Sialyltransferase ในเวลา 48 ชม. อาจจะสลายไปเร็วกว่าในเวลา 24 ชม. และเนื่องมาจากปริมาณโปรตีนอื่นที่เพิ่มมากขึ้นในช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้ค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase ในช่วงเวลา 48 ชม. มีค่าลดลงได้ นอกจากนี้ อาจจะเป็นไปได้ว่ายีสต์ในระหว่างเวลา 24 ชม. จะอยู่ในระหว่างการเจริญเติบโต (log phase) และเมื่อเวลา 48 ชม. นั้นยีสต์อยู่ในสภาวะคงตัวแล้ว (stationary phase)

สำหรับการแสดงออกของยีน Sialyltransferase แล้วอยู่ภายในเซลล์ยีสต์ ST-pPIC 3.5 ซึ่งจำเป็นต้องใช้ Methanol เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน Sialyltransferase เช่นเดียวกับยีสต์ ST-pPIC 9 แต่จะต่างกันที่ยีสต์ ST-pPIC 3.5 นั้น เมื่อสังเคราะห์โปรตีน แล้วจะอยู่ภายในเซลล์ยีสต์จึงต้องใช้สารละลายภายในเซลล์ยีสต์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้เซลล์ยีสต์แตกเปรียบเทียบกับ 2 วิธี คือ ใช้ glassbead (ขนาด 0.5 มม.) และการทำให้เซลล์ยีสต์แตกโดยใช้ความถี่สูง (sonication) แล้วไปหาความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase โดยทำปฏิกิริยากับ Asialofetuin และ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc พบว่าในไซโตพลาสซึมของยีสต์ ST-pPIC 3.5 มีค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase เท่ากับ 0.26 และ 0.37 $\text{pmol/min/mg.protein}$ ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ยีสต์แตกเพื่อที่จะศึกษาสารต่าง ๆ ในไซโตพลาสซึม คือ วิธีการทำให้เซลล์ยีสต์แตกโดยใช้ความถี่สูง ๆ

จากการศึกษาวิจัยของ Borsig และคณะ (1995) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีน Sialyltransferase จากตับหนู (Rat liver) ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมีการแสดงออกและสังเคราะห์โปรตีนแล้วส่งออกภายนอกเซลล์ยีสต์ พบว่าค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase มีค่าเท่ากับ 0.8 mU/mg.protein (หรือเท่ากับ 800 pmol/min/mg.protein)

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงว่าการแสดงออกของยีน Sialyltransferase แล้วส่งออกภายนอกเซลล์ยีสต์ ST-pPIC9 มีการแสดงออกของยีนมากกว่าในยีสต์ ST-pPIC3.5 ที่สังเคราะห์โปรตีนแล้วอยู่ภายในเซลล์ถึง 3 เท่า แต่อย่างไรก็ดีการทดลองนี้แสดงว่า Intracellular expression vector pPIC 3.5 ของ *Pichia* สามารถใช้เป็นตัวพาหะในการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน โดยที่โปรตีนนั้นมีตำแหน่งธรรมชาติอยู่ที่ golgi ได้ ซึ่งโดยบริษัท Invitrogen เองก็มีการระบุได้ว่าควรจะใช้เวกเตอร์ประเภทใดในการเป็นพาหะสำหรับยีนที่ใช้ในการสร้างโปรตีนเพื่อทำงานใน organelle ต่าง ๆ การทดลองในครั้งนี้จึงใช้เวกเตอร์ทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ Extracellular expression vector และ Intracellular expression vector และได้ผลการทดลองดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

4.5 การติดฉลาก CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc บนยีสต์ ST-pPIC9 และยีสต์ ST-pPIC3.5

ยีสต์สายพันธุ์ใหม่ทั้ง 2 ชนิด คือ ยีสต์ ST-pPIC9 และยีสต์ ST-pPIC3.5 เมื่อเหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการสร้างเอนไซม์ Sialyltransferase ในเวลา 24 ชั่วโมง โดยนำสารละลายเชื้อยีสต์ทั้ง 2 ชนิดมาทำปฏิกิริยากับ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc ปั่นและล้างส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์ เพื่อกำจัดโปรตีนส่วนที่ไม่ต้องการทิ้งไป จากนั้นทำเซลล์ให้แตก ปั่นและล้างตะกอนเซลล์ยีสต์อีกครั้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วยบัฟเฟอร์ละลายโปรตีน พบว่าปริมาณ 9-fluoresceinyl-NeuAc ในโปรตีนของยีสต์ ST-pPIC9 มีค่าเท่ากับ 20.85 pmol/mg.protein และในยีสต์ ST-pPIC3.5 มีค่าเท่ากับ 36.9 pmol/mg.protein แสดงว่าเอนไซม์ Sialyltransferase ที่ถูกสร้างขึ้นภายในพันธุวิศวกรรมของยีสต์ มีความสามารถในการย้าย CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc เข้าสู่ไกลโคโปรตีน

ของยีสต์ ST-pPIC9 และไกลโคโปรตีนยีสต์ ST-pPIC3.5 ได้มากขึ้นถึง 4 - 7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ GS 115 ก่อนถูกทำพันธุวิศวกรรมซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.25 pmol/mg.protein

จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการทำพันธุวิศวกรรมยีสต์โดยการนำเข้ายีน Sialyltransferase สามารถที่จะได้ยีสต์ลูกผสมที่มีความสามารถในการย้าย sialic acid หรือ N-acetylneuraminic acid เข้าสู่ไกลโคโปรตีนที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ได้ โดยเฉพาะยีสต์ ST-pPIC3.5 ซึ่งเอนไซม์ Sialyltransferase ถูกสร้างอยู่ภายในเซลล์ โดยอาจจะอยู่ที่ golgi complex ที่เป็นแหล่งที่อยู่ของเอนไซม์นี้โดยธรรมชาติ (Weinstein *et al.*, 1987) ทำให้มีความเป็นไปได้ในการใช้ยีสต์ ST-pPIC3.5 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) ในการผลิตไกลโคโปรตีนที่มีความสำคัญอื่น ๆ และจำเป็นต้องมี sialic acid เพื่อการทำงานของโปรตีนนั้น ๆ ในอนาคต

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองศึกษาการแสดงออกของยีนไกลโคซิเลชันเอนไซม์ของคนในยีสต์ ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. เมื่อตัดต่อยีน Sialyltransferase เข้าพลาสมิดเวกเตอร์ pPIC9 และ pPIC3.5 โดยใช้แบคทีเรีย *E.coli* (Top10F) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จะได้ดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 ขนาด 9,342 bp และดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 ขนาด 9,142 bp โดยดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 2 ชนิด มีแบบแผนของดีเอ็นเอที่มีทิศทางการเรียงของยีน Sialyltransferase ไปในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์
2. ลำดับเบส (DNA Sequencing) ของดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC9 และดีเอ็นเอลูกผสม ST-pPIC3.5 จะพบลำดับเบสของเวกเตอร์ pPIC9 และ เวกเตอร์ pPIC3.5 ที่เชื่อมต่อกับยีน Sialyltransferase โดยมีรหัสที่เป็นสัญญาณเริ่มการสังเคราะห์โปรตีน (Start codon) คือ ATG บนยีน Sialyltransferase ซึ่งแสดงว่ายีนชนิดนี้สามารถนำไปศึกษาแสดงออกของยีนได้
3. ยีน Sialyltransferase สามารถสอดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ได้ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR พบว่า *Pichia* ST-pPIC9 มีขนาด 1,537 bp ส่วน *Pichia* ST-pPIC3.5 มีขนาด 2,200 bp และ 1,556 bp และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Southern blotting จะตรวจพบยีน Sialyltransferase ได้ที่ตำแหน่ง 1.34 kb
4. *Pichia* ST-pPIC9 และ *Pichia* ST-pPIC3.5 มีการแสดงออกของยีน Sialyltransferase ได้เมื่อวิเคราะห์หาอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Northern blotting จะได้ชั้นอาร์เอ็นเอขนาด 1.9 kb

5. การแสดงออกของยีน Sialyltransferase ใน *Pichia* ST-pPIC9 ซึ่งมีการสังเคราะห์โปรตีนแล้วส่งออกภายนอกเซลล์ยีสต์ จะมีค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase เท่ากับ 1.02 pmol/min/mg.protein ส่วน *Pichia* ST-pPIC3.5 ที่มีการสังเคราะห์โปรตีนแล้วอยู่ในเซลล์ยีสต์ จะมีค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ Sialyltransferase เท่ากับ 0.37 pmol/min/mg. protein
6. เอนไซม์ Sialyltransferase มีความสามารถในการย้าย CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc เข้าสู่ผนังเซลล์ยีสต์ได้ โดยในยีสต์ GS 115 ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม จะพบปริมาณ fluoresceinyl-NeuAc เท่ากับ 5.25 pmol/mg. protein *Pichia* ST-pPIC9 จะมีปริมาณ fluoresceinyl-NeuAc เท่ากับ 20.85 pmol/mg. protein ส่วนใน *Pichia* ST-pPIC3.5 มีปริมาณ fluoresceinyl-NeuAc เท่ากับ 36.9 pmol/mg. protein

เอกสารอ้างอิง

- Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7 : 1513-1523.
- Boehringer Mannheim Biochemeca. 1997. Protocol of CMP-9-fluoresceinyl-AcNeu. United States of America.
- Boehringer Mannheim. 1997. Protocol of DIG DNA Labeling and Detection Kit. United States of America.
- Borsig, L., Ivanov, S. X., Herrmann, G. F., Kragl, U., Wandrey, C. and Berger, E. G. 1995. Scaled-up expression of human alpha 2,6(N)Sialyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 : 14-20.
- Collen, D., Bounameux, H., Decock, F., Lijnen, H. R. and Verstraete, M. 1986. Analysis of coagulation and fibrinolysis during intravenous infusion of recombinant human tissue-type plasminogen activator in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 73 : 511-517.
- Cregg, J. M., Barringer, K. J. and Hessler, A. Y. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5 : 3376-3385.

Dube, S., Fisher, J. W. and Powell, J. S. 1988. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function. *J. Biol. Chem.* 263 : 17516-17521.

Fasman, G. D. 1989. Practical handbook of biochemistry and molecular biology. CRC Press. Florida. pp. 130-148.

Grinna, L. S. and Tschopp, J. F. 1989. Size Distribution and general structure features of N-linked oligosaccharide from the Methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast.* 5 : 107-115.

Goeddel, D. V. 1991. Gene Expression Technology. Academic Press, inc. San Diego, California.

Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R. and Seebury, P.H., 1979. Direct expression in *E. coli* of a DNA Sequencing Coding for human growth hormone. *Nature.* 281 : 544-548.

Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. and Riggs, A. D., 1979. Expression in *E. coli* of chemically synthesized genes for human insulins. *Proc. Nat. Acad. Sci, USA.* 76 : 106-110.

- Green, E. D., Boime, I. and Boenziger, J. U. 1986. Differential processing of Asn-linked oligosaccharides on pituitary glycoprotein hormone : implications for biologic function. *Molecular and cellular Biochemistry*. 72 : 81-100.
- Green, E. D. and Baenziger, J. U. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem. Biophys. Acta*. 947 : 287-306.
- Gross, H. J., Sticher, U. and Brossmer, R. 1990. Highly sensitive Fluorometric Assay for Sialyltransferase Activity using CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc as doner. *Anal. Biochem*. 186 : 127-134.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol*. 166 : 557-562.
- Harris, R. J., Leonard, C. K., Guzzetta, A. W. and Spellman, M. W. 1991. Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to Threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry*. 30 : 2311-2316.
- Heim, J., Schmidt, D.C., Atomi, H. and Schmid, R.D. 1998. Functional expression of a mammalian a acetylcholinesterase in *Pichia pastoris* : Comparision to acetylcholinesterase, expressed and reconstituted from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta*. 1396 : 306-319.

- Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R. 1978. Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 1929-1933.
- Invitrogen. 1997. A Manual of Methods for Expression of Recombination Proteins in *Pichia pastoris* (Version F). The Netherlands.
- Irimura, T., Tsuji, T., Tagami, S., Yamamoto, K. and Oswa, T. 1981. Structure of a complex-type sugar chain of human glycophorin A. Biochemistry. 20 : 560-566.
- Kingsman, S. M. and Kingsman, A. J. 1988. Genetic engineering. An introductory to gene analysis and exploitation in eukaryotes. Blackwell scientific publications, Oxford.
- Kitagawa, H., Mattei, M.G. and Paulson, J. C. 1996. Genomic Organization and chromosomal Mapping of Gal β 1,3GalNA α Gal β 1,4GlcNA α 2,3-Sialyltransferase. J. Biol. Chem. 271 : 931-938.
- Kurosawa, N., Inoue, M., Yosshida, Y. and Tsuji, S. 1996. Molecular cloning and genomic analysis of mouse Galbeta1,3GalNAc alpha2,6-Sialyltransferase. J. Biol. Chem. 271 : 15109-15116.
- Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

- Maguire, T. M., Mahony, D. O., Gillian, A. M., Dennihan, A. and Breen, K. 1994. The serum Expression of Sialoglycoproteins and Sialyltransferase in Alzheimer's Disease : Evidence for the Altered Expression of Individual Isoform. *Neurodegeneration*. 3 : 129-133.
- Martin, D.W., Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. 1983. Glycoproteins, Proteoglycans & Glycosaminoglycans. *Harpur's Review of Biochemistry* 18 th Ed, pp 430-445. Losaltos, California.
- Mulligan, R. C. and Berg, P., 1980. Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science*, 209 : 1422-1427.
- Paszowska, A., Berbec, H. and Cybulski, M. 1997. Level of sialic acid in blood serum as a tumor marker. *Przegl. Lek.* 54 : 851-853.
- Paulson, J. C. and Colley, K. J. 1989(a). Terminal Glycosyltransferase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85 : 17615-17618.
- Paulson, J. C., Weinstein, J. and Schauer, A. 1989(b). Tissue specific expression of Sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* 264 : 10931-10934.
- Puhler, A. 1993. *Genetic Engineering of Microorganisms* . pp. 136-151. Weinheim. New York.
- QIAGEN. 1997. *QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*. Germany.

- Raymond, C. K., Bukowski, T., Holderman, S. D., Ching, A.F., Vanaja, E. and Stamm, M. R. 1998. Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 kilodalton isoform of human glutamate decarboxylase. *Yeast*. 14 : 11-23.
- Remaut, E., Derynck, R., Saman, E., Stansses, P., De Clercq, E., Content, J., and Fiers, W. 1980. Expression of human fibroblast interferon gene in *E. coli*. *Nature*. 287: 193-197.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Press; New York.
- Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. and Fukuda, M. 1987. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J. Biol. Chem.* 262 : 12059-12064.
- Schaffner, W., 1980. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Nat. Acad. Sci, USA.* 77 : 2163-2166.
- Schwientek, T., Lorenz, C. and Ernst, J. F. 1995. Golgi localization in Yeast is mediated by the membrane anchor region of rat liver sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* 270 : 5483- 5489.

- Schwientek, T., Narimatsu, H. and Joachim, F. E. 1996. Golgi localization and in Vivo Activity of a mammalian Glycosyltransferase (Human β 1,4-Galactosyltransferase) in Yeast. *J. Biol. Chem.* 271 : 3398-3405.
- Spiro, R.C. 1970. Glycoprotein. *Ann. Rev. Biochem.* 38 : 599-637.
- Strachan, T. 1992. *The human genome*. BIOS. Scientific publishers, Oxford. Stryer, L. 1981. *Biochemistry*. 2nd ed., W. H. Freeman & Co., San Francisco.
- Tabor, J. M. 1989. *Genetic engineering technology in industrial pharmacy*. Marcel Dekker, inc. New York.
- Timble, R. B., Maley, F. and Chu, F. K. 1983. Glycoprotein biosynthesis in yeast : protein conformation affects processing of high mannose oligosaccharides on carboxypeptidase Y and invertase. *J. Biol. Chem.* 282 : 2562-2567.
- Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. and Grinna, L. 1987. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Bio. Technology.* 5 : 1305-1308.
- Vailes, L. D., Kinter, M. T., Arruda, L. K. and Chapman, M. D. 1998. High-level expression of cockroach allergen, Bla g 4, in *Pichia pastoris*. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 101 : 274-280.

- Vaitukaitis, J. L. and Ross, G. T. 1971. Altered biologic and immunologic activities of progressively desialylated human urinary FSH. *J. Clin. Endocr.* 33 : 308-311.
- Weinstein, J., Lee, E. U., McEntee, K., Lai, P. H. and Paulson, J. C. 1987. Primary structure of β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* 262 : 17735-17743.

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ YPD (Yeast Peptone Dextrose) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ MGY (Minimal Glycerol Medium) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast Nitrogen Base	13.4	กรัม
Biotin	0.4	มิลลิกรัม
Glycerol	1.0	มิลลิลิตร

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ RD (Regeneration Dextrose Medium) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast Nitrogen Base	13.4	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Biotin	0.4	มิลลิกรัม
Amino acid	50	มิลลิกรัม
Sorbitol	186	กรัม

1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ MD (Minimal Dextrose Medium) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast Nitrogen Base	13.4	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Biotin	0.4	มิลลิกรัม

1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ MM (Minimal Methanol Medium) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast Nitrogen Base	13.4	กรัม
Biotin	0.4	มิลลิกรัม
Methanol	5.0	มิลลิลิตร

1.7 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ BMGY (Buffer Glycerol-complex Medium)

ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Yeast Nitrogen Base	13.4	กรัม
Biotin	0.4	มิลลิกรัม
Glycerol	1.0	มิลลิลิตร

100 mM Potassium phosphate, pH 6.0 100 มิลลิลิตร

1.8 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ BMMY (Buffer Methanol-complex Medium)

ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Yeast Nitrogen Base	13.4	กรัม
Biotin	0.4	มิลลิกรัม
Methanol	1.0	มิลลิลิตร

100 mM Potassium phosphate, pH 6.0 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายและบัฟเฟอร์ต่างๆ

2.1 สารละลายสำหรับการเตรียม Spheroplast และการ Transform เข้าสู่ยีสต์

SE	:	1 M Sorbitol 25 mM EDTA, pH 8.0
SCE	:	1 M Sorbitol 1 mM EDTA 10 mM Sodium citrate buffer, pH 5.8
CaS	:	1 M Sorbitol 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 10 mM CaCl ₂
CaT	:	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 20 mM CaCl ₂
SOS	:	1 M Sorbitol 0.3 มิลลิลิตร YPD medium 10 mM CaCl ₂
SED	:	10 มิลลิลิตรของ SE 1 มิลลิลิตรของ 1 M DTT
PEG/CaT	:	1 เท่าของ 40% PEG 1 เท่าของบัฟเฟอร์ CaT

2.2 สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากยีสต์

SCED	:	1 M Sorbitol 10 mM Sodium Citrate, pH 7.5 10 mM EDTA 10 mM DTT
TE buffer	:	10 mM Tris-HCl, pH 7.4 1 mM EDTA, pH 8.0

2.3 สารละลายสำหรับสก็คอาร์เอ็นเอ

AE buffer	:	50 mM Sodium acetate, pH 5.3 1 mM EDTA
1X PBS buffer	:	1.15 กรัม Na_2HPO_4 0.2 กรัม KH_2PO_4 8.0 กรัม NaCl 0.2 กรัม KCl

2.4 บัฟเฟอร์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ

10X <i>Eco</i> RI buffer	:	50 mM NaCl 10 mM MgCl_2 90 mM Tris-HCl, pH 7.5
10X <i>Bgl</i> II buffer	:	150 mM NaCl 6 mM MgCl_2 6 mM Tris-HCl, pH 7.9 1 mM DTT
10X <i>Acc</i> III buffer	:	100 mM NaCl 10 mM MgCl_2 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 1 mM DTT
10X <i>Xba</i> I buffer	:	50 mM NaCl 10 mM MgCl_2 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 1 mM DTT
10X <i>Taq</i> polymerase	:	100 mM Tris-HCl, pH 8.3 100 mM KCl

3. การเตรียมเอนไซม์

3.1 RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง RNase A 100 มิลลิกรัม มาละลายในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 15 mM Sodium chloride ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คัมในน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20° ซ.

3.2 Zymolyase (3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง Zymolyase 3 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20° ซ.

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry (ดัดแปลงจาก Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Reagent A : Alkaline copper tartate Solution (บริษัท BIO-RAD)

Reagent B : Folin Reagent (บริษัท BIO-RAD)

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง
1. เติม Reagent A (Alkaline copper tartate Solution) ลงไป 60 ไมโครลิตร
2. เติม Reagent B (Folin Reagent) ลงไป 500 ไมโครลิตร
3. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ Reagent Solution เป็น blank
4. กำหนดค่าปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน สารละลายโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

5. การตรวจสอบคุณภาพของ Gel filtration (Sephadex G-50)

ส่วนผสมของปฏิกิริยาของสารละลาย CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc นำมาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ขนาด 0.4 x 12.5 ซม. โดยตรวจสอบคุณภาพของคอลัมน์ก่อนโดยใช้สารที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล 2 ชนิด คือ Blue dextran และ $K_2Cr_2O_7$ โดยมี Blue dextran เป็นตัวบอกค่าปริมาตร void volume ชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.6 ด้วยอัตราเร็วคงที่ 0.5 มิลลิลิตร/นาที เก็บสารละลายที่ถูกชะลงในหลอด microcentrifuge หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยพบว่าสารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดถูกชะออกมาด้วยปริมาตรชะที่แตกต่างกันคือ

สารมาตรฐาน	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
Blue dextran	2.0
$K_2Cr_2O_7$	7.0

ภาคผนวก ข

1. ข้อมูลลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีน Sialyltransferase

ATGATTCATA	CCAACTTGAA	GAAAAAGTTC	AGCCTCTTCA	TCCTGGTCTT	50
TCTCCTGTTC	GCAGTCATCT	GTGTTTGGAA	GAAAGGGAGC	GACTATGAGG	100
CCCTTACACT	GCAAGCCAAA	GAATTCAGAA	TGCCCAAGAG	CCAGGAGAAA	150
GTGGCCATGG	GGTCTGCTTC	CCAGGTTGTG	TTCTCAAACA	GCAAGCAAGA	200
CCCTAAGGAA	GACATTCCAA	TCCTCAGTTA	CCACAGGGTC	ACAGCCAAGG	250
TCAAACCACA	GCCTTCCTTC	CAGGTGTGGG	ACAAGGATCT	CACATACTCA	300
AAACTTAACC	CCAGGCTGCT	GAAGATCTGG	AGAAACTATC	TGAACATGAA	350
CAAATATAAA	GTATCCTACA	AGGGTCCGGG	GCCAGGAGTC	AAGTTCAGCG	400
TAGAAGCACT	GCGTTGCCAC	CTTCGAGACC	ATGTGAACGT	GTCTATGATA	450
GAGGCCACAG	ATGTTCCCTT	CAACACCACT	GAGTGGGAGG	GTTACCTGCC	500
CAAGGAGAAC	TTTAGAACCA	AGGTTGGGCC	TTGGCAAAGG	TGTGCCGTCG	550
TCTCTTCTGC	AGGATCTCTG	AAAAACTCCC	AGCTTGGTCG	AGAGATTGAT	600
AATCATGATG	CAGTCTGAG	GTTTAATGGG	GCCCCTACCG	ACAACTTCCA	650
ACAGGATGTG	GGCTCAAAAA	CTACCATTCTG	CCTAATGAAC	TCTCAGTTAG	700
TCACCACAGA	AAAGCGGTTT	CTCAAGGACA	GTTTGTACAC	CGAAGGAATC	750
CTAATTGTAT	GGGACCCATC	CGTGGATCAT	GCAGATATCC	CAAAGTGGTA	800
TCAGAAACCA	GACTACAATT	TCTTCGAAAC	CTATAAGAGT	TACCGAAGGC	850
TGAACCCAG	CCAGCCATTT	TATATCCTCA	AGCCCCAGAT	GCCATGGGAA	900
CTGTGGGACA	TCATTCAGGA	AATCTCTGCA	GATCTGATTC	AGCCAAATCC	950
CCCATCCTCC	GGCATGCCGG	GTATCATCAT	CATGATGACG	CTGTGTGACC	1000
AGGTAGATAT	TTACGAGTTC	CTCCCATCCA	AGCGCAAGAC	GGACGTGTGC	1050
TATTATCACC	AAAAGTTCTT	TGACAGCGCT	TGCACGATGG	GTGCCTACGA	1100
CCCGCTCCTC	TTCGAGAAGA	ATATGGTGAA	GCATCTCAAT	GAGGGAACAG	1150
ATGAAGACAT	TTATTTGTTT	GGGAAAGCCA	CCCTTCTGG	CTTCCGGAAC	1200
ATTCTGTTGTT	GAGTACCTAG	CCAGGCACCC	TTATCCTTCT	CCATACGTCA	1250
TTTTATGGCT	ACTCTCCTGG	TTACCGCTGC	TTGAAGGAGT	GTTTTTATTC	1300
AACACGCCCA	GCCTGCTTCC	TGCGCTCTAG	GGAATTTTGT	TGGCAAGAGT	1350
TCTGGGGCCT	CCAGCCTGCC	TCCCTGGGGC	CACCGAGGAT	GGGAGTCCAG	1400
ATTCTTGCCA	CACTCATTCC	TCCTAGACAG	CGTCTCTTCC	TCCTTCAGCA	1450
TGGGTAGGGA	AAG.....				1500

2. ข้อมูลการหาคำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ของยีน
Sialyltransferase

ชื่อเอนไซม์	ลำดับเบส	จำนวนตำแหน่ง ที่ย่อยได้	ตำแหน่ง			
<i>Acc</i> III	TCCGGA	1	1071			
<i>Apa</i> I	GGGCCC	1	629			
<i>Bgl</i> II	AGATCT	2	823	202		
<i>Dsa</i> I	CCRYGG	2	155	892		
<i>Eco</i> RI	GAATTC	1	121			
<i>Eco</i> RV	GATATC	1	784			
<i>Nco</i> I	CCATGG	2	155	892		
<i>Pst</i> I	CTGCAG	2	557	926		
<i>Sau</i> I	CCTNAGG	1	81			
<i>Sec</i> I	CCNNGG	13	116	155	170	245
			310	376	500	518
			529	892	1371	1372
			1382			
<i>Xho</i> II	RCATCY	2	323	562		

3. ข้อมูลการหาดำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ของพลาสมิด
เวกเตอร์ pPIC 9

ชื่อเอนไซม์	ลำดับเบส	จำนวนตำแหน่ง ที่ย่อยได้	ตำแหน่งที่	
<i>Acc</i> III	TCCGGA	1	3845	
<i>Bal</i> I	TGGCCA	2	2071	3658
<i>Bgl</i> II	AGATCT	2	2	5622
<i>Bam</i> HI	AGATCT	1	939	
<i>Cla</i> I	ATCGAT	2	1589	7950
<i>Eco</i> RI	GAATTC	1	1223	
<i>Nco</i> I	CCATGG	1	3633	
<i>Not</i> I	GCGGCCGC	1	1236	
<i>Pst</i> I	CTGCAG	2	976	7172
<i>Sac</i> I	GACCTC	1	209	
<i>Sal</i> I	GTCGAC	1	3178	
<i>San</i> I	CCTNAGG	1	2089	
<i>Sca</i> I	AGTACT	1	7407	
<i>Sna</i> I	GTATAC	1	5804	
<i>Stu</i> I	AGGCCT	1	3263	
<i>Xba</i> I	TCTAGA	1	2033	
<i>Xho</i> II	CTCGAG	1	1193	

4. ข้อมูลการหาคำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ของพลาสมิด
เวกเตอร์ pPIC 3.5

ชื่อเอนไซม์	ลำดับเบส	จำนวนตำแหน่ง ที่ย่อยได้	ตำแหน่ง	
<i>Acc</i> III	TCCGGA	1	3573	
<i>Bam</i> HI	GGATCC	1	939	
<i>Bgl</i> II	AGATCT	2	2	5350
<i>Cla</i> I	ATCGAT	2	1317	7678
<i>Eco</i> RI	GAATTC	1	951	
<i>Nhe</i> I	GCTAGC	2	1522	2469
<i>Not</i> I	GCGGCCGC	1	964	
<i>Pst</i> I	CTGCAG	1	6900	
<i>Sac</i> I	GAGCTC	1	209	
<i>Sal</i> I	GTCGAC	1	2906	
<i>San</i> I	CCTNAGG	1	1817	
<i>Sca</i> I	AGTACT	1	7135	
<i>Spl</i> I	CGTACG	2	1161	1894
<i>Xba</i> I	TCTAGA	1	1761	

5. ปริมาณ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc จากส่วนใส (supernatant) ของสารละลาย เซื้อยีสต์ ST-pPIC 9 โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ในการเหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการแสดงออก เมื่อเติม 0.5% Methanol

หลอดระอออก จากคอลัมน์	ปริมาณ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc (nM)x10					
	แสดงออกใน 24 ชั่วโมง			แสดงออกใน 48 ชั่วโมง		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
1	0	0	0	0	0	0
2	1.0	4.0	2.5	1.0	0.5	0.75
3	17	15	16.5*	7.0	6.0	6.5*
4	1.0	4.0	2.5	3.0	2.0	2.5
5	0	1.0	0.5	1.0	0.5	0.5
6	12.0	15.0	13.5	17.0	21.0	19.0
7	14.0	21.0	17.5	28.0	39.0	33.5
8	20.0	30.0	25.0	34.0	48.0	41.0
9	44.0	55.0	49.5	60	>100	>100
10	>100	>100	>100	>100	>100	>100
11	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12	>100	>100	>100	>100	>100	>100
13	>100	>100	>100	>100	>100	>100
14	>100	>100	>100	>100	>100	>100
15	>100	>100	>100	>100	>100	>100
16	>100	>100	>100	>100	>100	>100
17	50	90	70	>100	98	>100
18	40	69	54.5	70	80	75.5
19	20	33	27.5	55	49	52.0
20	8	17	12.5	42	32	37.0
21	1	11	6.0	28	15	21.5
22	0	0	0	13	7	10.0
23	0	0	0	0	0	0

6. ปริมาณ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc จากตะกอนเซลล์ของยีสต์ ST-pPIC3.5
เปรียบเทียบการทำให้เซลล์ยีสต์แตกโดยใช้ glassbead และวิธี sonication

หลอดที่หะจาก จากคอลัมน์ (นาที่)	ปริมาณ CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc (nM)x10					
	ใช้ glassbead			ใช้วิธี sonication		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
1	0	0	0	0	0	0
2	0.5	1.0	0.75	1.0	1.5	1.25
3	5.0	4.0	4.5*	7.0	12.0	9.5*
4	2.0	1.0	1.5	0	2.0	1.0
5	1.0	1.0	1.0	7.0	24.0	15.5
6	10.0	5.0	7.5	12.0	42.0	27.0
7	59.0	25.0	42.0	32.0	>100	>100
8	>100	>100	>100	>100	>100	>100
9	>100	>100	>100	>100	>100	>100
10	>100	>100	>100	>100	>100	>100
11	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12	>100	>100	>100	>100	>100	>100
13	>100	>100	>100	>100	>100	>100
14	80	82	81	72.0	>100	>100
15	36	41	38.5	43.0	51.0	47.0
16	21	25	23.0	35.0	33.0	34.0
17	11	13	12.0	19.0	12.0	16.0
18	9	7	8.0	8.0	7.0	7.5
19	4.0	5.0	4.5	2.0	1.0	1.5
20	2.0	1.0	1.5	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาววรรณิ ชยานันต์นุกูล
วัน เดือน ปีเกิด 18 เมษายน 2501
วุฒิการศึกษา
วุฒิ ชื่อสถาบัน ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต วิทยาลัยครูสงขลา 2535