

การศึกษาลักษณะหน้าที่ของโปรตีนร่วมทำงานกับโปรตีน
อาร์โกนีออต 4 (*PmAGO4*) ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์
เพศผู้ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

Functional study of Argonaute 4 (*PmAGO4*)
interacting proteins in spermatogenesis of
black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)



สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Functional study of Argonaute 4 (*PmAGO4*)
interacting proteins in spermatogenesis of
black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)



A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การศึกษาลักษณะหน้าที่ของโปรตีนร่วมทำงานกับโปรตีนอาร์โกนีออต 4 (PmAGO4) ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)
Functional study of Argonaute 4 (PmAGO4) interacting proteins in spermatogenesis of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

ชื่อนักศึกษา

นางสาวศศิณีภา นิลพันธ์ รหัสนักศึกษา 62050651

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2565


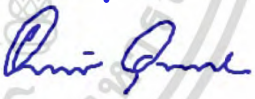

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รศ.ดร.อภินันท์ อุดมกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วรภฤต วรรณพกิจ ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.อภินันท์ อุดมกิจ กรรมการ	
ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาลักษณะหน้าที่ของโปรตีนร่วมทำงานกับโปรตีนอาร์โกนีออต 4 (<i>PmAGO4</i>) ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกิ้งกูดดำ (<i>Penaeus monodon</i>)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศศิณีภา นิลพันธ์ รหัสนักศึกษา 62050651
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ.ดร.อภิรักษ์ อุดมกิจ

บทคัดย่อ

โปรตีนอาร์โกนีออต 4 (*PmAGO4*) มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนกระโดด (transposon) ภายในจีโนมและการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในกิ้งกูดดำให้เป็นปกติ โดยโปรตีนอาร์โกนีออตทำงานร่วมกับอาร์เอ็นเอสายสั้นๆ เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านกระบวนการ RNA interference (RNAi) นอกจากนี้การทำงานของโปรตีนอาร์โกนีออตถูกควบคุมได้ด้วยการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) จากเอนไซม์ในกลุ่ม kinase ดังนั้นงานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อทำการสร้างโปรตีนลูกผสม Arginine kinase (His-Ark) และ Serine/Threonine protein kinase (His-STK) ที่บริสุทธิ์เพื่อนำมาศึกษาปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอาร์โกนีออต 4 จากผลการทดลองเพื่อสร้างโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน Ark และ STK จาก cDNA ของกิ้งกูดดำได้ตามขนาดที่ต้องการและสร้างพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark และ pET28-STK ได้สำเร็จ และสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ให้อยู่ในรูปแบบละลายได้ในแบคทีเรียคือการใส่ IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และเลี้ยงที่ 18 องศาเซลเซียส ซึ่งยืนยันขนาดของแถบโปรตีน His-Ark และ His-STK ที่ 40 และ 70 kDa ตามลำดับ ได้ด้วยแอนติบอดีจำเพาะ (anti-His6X antibody) นอกจากนี้วิธีที่เหมาะสมในการทำให้โปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK บริสุทธิ์คือการใช้ Nickel Sepharose beads และชะล้างด้วยสารละลาย imidazole ความเข้มข้น 100-300 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 (GFP-Ago4) ทำได้สำเร็จโดยการนำส่งพลาสมิด HplEXGFP-Ago4 เข้าสู่เซลล์ Sf9 ด้วย FuGene และ Mirus แต่ไม่สามารถตรวจพบโปรตีนดังกล่าวได้ด้วยแอนติบอดีจำเพาะ (anti-His6X

antibody) เมื่อเปลี่ยนวิธีการผลิตโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 (GST-Ago4) มาใช้ระบบแบคทีเรียไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวรัส พบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียไวรัสลูกผสมในเซลล์ Sf9 หลังจากการนำส่งแบคทีเรียผสม หมายเลข 12 และ 14 ที่ถูกสร้างขึ้นได้สำเร็จ แต่อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังคงต้องการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีน GST-Ago4 ในเซลล์ Sf9 ต่อไป การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนอาร์โกนีต 4 และโปรตีน His-Ark หรือ His-STK เป็นการทดลองที่ทำให้เข้าใจกลไกพื้นฐานการทำงานของโปรตีนอาร์โกนีตและสามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนากระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของกิ้งให้มีคุณภาพได้ในอนาคต

คำสำคัญ : โปรตีนอาร์โกนีต, โปรตีนไคเนส, ยีนกระโดด, กิ้งกุลาดำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Functional study of Argonaute 4 (<i>PmAGO4</i>) interacting proteins in spermatogenesis of black tiger shrimp (<i>Penaeus monodon</i>)
Students	Miss Sasinipa Nillaphan Student ID 62050651
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Assist.Prof.Wipawee Dejtsakdi
Co-advisor	Assoc.Prof.Apinunt Udomkit

Abstract

Argonaute 4 (*PmAGO4*) plays a crucial role in controlling transposons in the genome and gametogenesis in shrimp. Normally, AGO protein works with small RNAs for regulating gene expression through RNA interference (RNAi). Moreover, the function of AGO protein is controlled by phosphorylation, depending on the kinase. Therefore, this study aims to express and purify the recombinant Arginine kinase (His-Ark) and Serine/Threonine protein kinase (His-STK) for investigating protein-protein interaction of *PmAGO4*. To express the recombinant protein His-Ark and His-STK, both *Ark* and *STK* genes were amplified from cDNA of *P. monodon* with the proper length and used for constructing the recombinant plasmid pET28-Ark and pET28-STK. The optimal condition for soluble His-Ark and His-STK expression were induction with a final concentration of 0.2 mM IPTG and incubation at 18°C. Sizes of His-Ark and His-STK were 40 kDa and 70 kDa respectively, confirmed by western blotting with an anti-His6X antibody. In addition, the purification of His-Ark และ His-STK was accomplished by Ni²⁺ Sepharose beads and eluted with 100-300 mM of imidazole. Expression of a recombinant GFP-Ago4 was achieved by transfection of HpiEXGFP-Ago4 into Sf9 cells with FuGene and Mirus transfection reagents; however, they could not be detected by anti-His6X antibody. When a recombinant GST-Ago4 was expressed by the baculovirus system, the recombinant baculoviruses were multiplied in Sf9 cells after transfecting recombinant bacmids #12 and #14. Moreover, confirmation of GST-Ago4 expression in

insect cells needs more investigation. A study of the interaction between *PmAGO4* and His-Ark or His-STK will provide the basic knowledge in functional control of *PmAGO4* which was able to apply in the development or improvement in quality and quantity of gametogenesis in shrimp.

Keywords: Argonaute protein, Protein kinase, Transposons, *Penaeus monodon*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการศึกษาลักษณะหน้าที่ของโปรตีนร่วมทำงานกับโปรตีนอาร์โกนีออต 4 (PmAGO4) ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกิ้งกูดดำ (*Penaeus monodon*) สำเร็จ ลุล่วงได้ด้วยความสำเร็จจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.อภิรักษ์ อุดมกิจ ดร.ธีระพงษ์ โห และ ดร.ธนิยา นันทาพจน์ รวมถึงบุคลากรของศูนย์วิจัยประยุกต์และพัฒนานวัตกรรมกึ่งในสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ เสนอแนวคิด ให้ความรู้อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ และใส่ใจทุกขั้นตอนการทำงานของงานวิจัย ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์ และทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ในการทำงานวิจัย ถ่ายทอดความรู้ให้แก่ผู้วิจัย คอยให้กำลังใจ จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิภาวี เดชตีสักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาในการเตรียมตัวในการฝึกปฏิบัติสหกิจศึกษา และให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือทุกอย่างด้วยดีเสมอมา หากมีสิ่งใดบกพร่องผู้วิจัยขอน้อมรับไว้ และขอภัยไว้ ณ โอกาสนี้

ศศินิภา นิลพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 กุ้งกุลาดำ (<i>Penaeus monodon</i>).....	3
2.2 การรบกวนการแสดงออกของอาร์เอ็นเอ (RNA interference, RNAi).....	3
2.2.1 small – interfering RNA (siRNA).....	4
2.2.2 microRNA (miRNA).....	4
2.2.3 piwi – interacting RNA (piRNA).....	5
2.3 โปรตีนอาร์โกน็อต (Argonaute protein).....	5
2.3.1 AGO subfamily.....	6
2.3.2 PIWI subfamily	6
2.3.3 WAGO subfamily	7
2.4 โปรตีนอาร์โกน็อตในกุ้ง.....	7
2.5 การควบคุมการทำงานของโปรตีนอาร์โกน็อต.....	8
2.5.1 Ubiquitylation.....	8
2.5.2 Phosphorylation.....	10
2.6 โปรตีนไคเนส (Protein kinase).....	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
2.7 ยีนกระโดด(Transposons).....	11
2.7.1 Retrotransposons.....	11
2.7.2 DNA transposons.....	12
2.7.3 ยีนกระโดดในกุ้ง (Transposons shrimps).....	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	14
3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	14
3.2 เอนไซม์ สารเคมี และบัฟเฟอร์.....	14
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	16
3.4 สารอื่นๆ.....	17
3.5 เวกเตอร์ (Vector).....	18
3.6 การสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีน Arginine kinase และ Serin/Threonine protein kinase (pET28-Ark และ pET28-STK).....	19
3.6.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน Ark และ STK ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR).....	19
3.6.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis).....	20
3.6.3 การเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด.....	21
3.6.4 การตัดชิ้นส่วนยีน Ark STK และพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme).....	21
3.6.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation).....	22
3.6.6 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation).....	23
3.6.7 การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม (screening of the positive clone).....	24
3.7 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein expression)	25
3.7.1 การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG.....	25
3.7.2 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	26
3.8 การสกัดโปรตีนลูกผสมจากเซลล์แบคทีเรีย (Extraction of recombinant protein from bacterial cells).....	27
3.8.1 การสกัดโปรตีนด้วยวิธีการแช่แข็ง-ละลาย (Freeze thaw).....	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ 3.8.2 การสกัดโปรตีนด้วยวิธีการใช้คลื่นความถี่สูง (Sonication) ที่ประโยชน์ด้าน 28 ราคา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
3.9 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยแอนติบอดีจำเพาะ (Western blot analysis).....	28
3.10 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้นิกเกิล (Nickel Sepharose beads)	29
3.11 การแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนีออต 4 (<i>PmAGO4</i> protein) แบบชั่วคราว (Transient expression) ในเซลล์แมลง <i>Spodoptera frugiperda</i> ovary (Sf9).....	30
3.11.1 การสกัดพลาสมิด HplEXGFP และ HplEXGFP-Ago4.....	30
3.11.2 การนำส่งพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แมลง (Transfection).....	31
3.12 การแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนีออต 4 ในเซลล์แมลง Sf9 ด้วยระบบแบคทีริโอไวรัส (Baculovirus).....	32
3.12.1 การสร้างแบคมิดลูกผสม (recombinant bacmid).....	32
3.12.2 การคัดเลือกแบคมิดลูกผสมโดยเทคนิคพีซีอาร์.....	33
3.12.3 การสร้างแบคทีริโอไวรัสลูกผสม.....	34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	36
4.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีน Ark และ STK ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR).....	36
4.2 การเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด pET28a.....	36
4.3 การตัดชิ้นยีนและพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme).....	38
4.4 การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม (screening of the positive clones).....	39
4.4.1 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีแยกตามขนาด (size screening)	39
4.4.2 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีจัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	39
4.5 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein).....	40
4.5.1 การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG.....	41
4.5.2 การกระตุ้นให้โปรตีนลูกผสมแสดงออกในรูปแบบที่ละลายน้ำได้.....	41
4.6 การทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้นิกเกิล (Nickel Sepharose beads)	44
4.7 การแสดงออกของโปรตีน <i>PmAGO4</i> แบบชั่วคราว (Transient expression)	45
4.7.1 การเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด HplEXGFP และ HplEXGFP-Ago4	45
4.7.2 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 ในเซลล์ Sf9.....	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
4.7.3 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GFP-Ago4 แบบชั่วคราวจากเซลล์ Sf9.....	47
4.8 การแสดงออกของโปรตีนลูกลมสมอาร์โกนีออต 4 (GST-Ago4) ด้วยระบบ Baculovirus.....	48
4.8.1 การสร้างแบคมิดลูกลมสม (Recombinant bacmid).....	48
4.8.2 การสร้าง Baculovirus ลูกลมสม.....	50
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	52
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	52
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	53
เอกสารอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก.....	61
ภาคผนวก ก.....	62
ภาคผนวก ข.....	63



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงโปรตีนอาร์โกนีนอตและหน้าทีในกึ่งกลูตาต้า.....	9
3.1 ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร.....	20
3.2 ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์ของซันยีน Ark และ STK.....	20
3.3 ส่วนประกอบปฏิกิริยาการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	22
3.4 ขนาดและความเข้มข้นโดยประมาณของยีน Ark STK และพลาสมิด pET28a.....	22
3.5 ส่วนประกอบปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ.....	23
3.6 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบพลาสมิด pET28-Ark และ pET28-STK.....	25
3.7 ส่วนประกอบเพื่อเตรียมเจลอะครีลาไมด์ปริมาตรต่อ 1 เจล.....	27
3.8 ปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียโคลน.....	34
3.9 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแบคทีเรียโคลน.....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
3.1 แสดงโครงสร้างพลาสมิด pET28a พร้อมจุดตัดจำเพาะ (Novagen®).....	18
3.2 แสดงโครงสร้างพลาสมิด pLEX-1 พร้อมจุดตัดจำเพาะ (Novagen®).....	18
3.3 แสดงโครงสร้างพลาสมิด pACEBac I พร้อมจุดตัดจำเพาะ (MultiBac™ Geneva Biotech).....	19
4.1 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน Ark และ STK จากดีเอ็นเอต้นแบบของกิ้งกูด้า cDNA1 และ cDNA2 ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	37
4.2 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิด pET28a ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	37
4.3 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ STK-(E/X) Ark-(B/X) และ pET28a-(B/X) หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีอะกาโรส อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	38
4.4 แสดงการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark และ pET28-STK โดยวิธีการแยกตามขนาด (size screening).....	40
4.5 แสดงการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark และ pET28-STK ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	40
4.6 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	42
4.7 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	43
4.8 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	43
4.9 การตรวจสอบโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Sepharose beads.....	44
4.10 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิด HplEXGFP-Ago4 ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	45
4.11 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 ในเซลล์ Sf9 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์.....	46
4.12 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 แบบชั่วคราวในเซลล์ Sf9 ด้วย SDS-PAGE.....	47
4.13 การคัดเลือกแบคทีเรียลูกผสมด้วยสีฟ้า-ขาวของโคลน <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH10 ที่ได้รับพลาสมิด pACEBal-GST และ pACEBal-Ago4/1 และ pACEBal-Ago4/2.....	49

รูปที่	หน้า
4.14 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียกลุ่มผสมด้วยวิธีอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	50
4.15 การแสดงออกของโปรตีนกลุ่มผสม GST-Ago4 ในเซลล์ Sf9 ด้วยระบบแบคทีริโอไล ไวรัส.....	51



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
PmAGO	Argonaute protein of <i>P. monodon</i>
AGO	Argonaute
PIWI	PIWI domain of Argonaute
Ark	Arginine kinase
STK	Serine/Threonine-protein kinase TOR
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranositol
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-D-galactoside
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathione S-transferase
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจและเป็นสินค้าส่งออกสร้างรายได้หลักที่สำคัญของประเทศไทย ปัจจุบันมีการส่งออกน้อยลงเนื่องจากประสบปัญหาจำนวนผลผลิตกุ้งที่ลดลง และกุ้งที่ไม่ได้คุณภาพ เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม โรคติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียในกุ้ง รวมถึงผลผลิตพ่อพันธุ์แม่พันธุ์กุ้งและลูกกุ้งที่ไม่ได้คุณภาพ

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตจะพบยีนกระโดด (jumping gene or transposon elements, TEs) ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถย้ายที่หรือแทรกตัวในจีโนมได้อย่างอิสระเพื่อทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่การแทรกตัวในจีโนมยังสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ไม่พึงประสงค์ได้ อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานผ่านทางเซลล์สืบพันธุ์ได้อีกด้วย (Slotkin and Martienssen., 2007) จากการศึกษาพบว่าโปรตีนในกลุ่มอาร์โกนีออตทำหน้าที่สำคัญในการยับยั้งการแสดงออกของยีนกระโดดและมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต อีกทั้งการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้แก่โปรตีนอาร์โกนีออตส่งผลต่อการเข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีนเป้าหมาย ทำให้มีผลต่อการร่วมทำงานของโปรตีนอาร์โกนีออตกับอาร์เอ็นเอสายสั้นๆ ในกระบวนการ RNA interference (Huberdeau et al., 2017)

จากงานวิจัยเบื้องต้นในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) มีการค้นพบโปรตีนในกลุ่มอาร์โกนีออตซึ่งมีแสดงออกเฉพาะในอวัยวะสืบพันธุ์ คือ *PmAGO4* PIWI1 และ PIWI2 และเมื่อทำการลดระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีผลทำให้จำนวนของอสุจิและขนาดของอวัยวะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังทำให้การแสดงออกของยีนกระโดด mariner และ Gypsy-like element เพิ่มมากขึ้นในกุ้งกุลาดำเพศผู้ (Ho et al., 2021; Leebonoi et al., 2015; Sukthaworn et al., 2019) จากการศึกษาโครมาทอสอมของโปรตีนอาร์โกนีออต 4 ในกุ้งกุลาดำด้วยวิธี Immunoprecipitation พบว่ามีโปรตีนในกลุ่ม kinase หลายชนิดที่คาดว่าทำงานร่วมกับโปรตีนอาร์โกนีออต 4 (Ho et al., unpublished data) ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจทำการยืนยันปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนอาร์โกนีออต 4 และเอนไซม์ในกลุ่ม kinase เพื่อทำให้เข้าใจถึงกลไกขั้นพื้นฐานในการควบคุมการทำงานของโปรตีนอาร์โกนีออตในกุ้งกุลาดำ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาและสร้างโปรตีนลูกผสมที่บริสุทธิ์ซึ่งสามารถนำมาทดสอบการปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนอาร์โกนีต 4 และโปรตีนในกลุ่ม kinase ที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนอาร์โกนีต 4 ในหลอดทดลองได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) การสร้างและผลิตโปรตีนลูกผสมของโปรตีนไคเนส (Serin/Threonine protein kinase, His-STK และ Arginine kinase, His-Ark) ในเซลล์แบคทีเรีย
- 2) การทำให้โปรตีนลูกผสมบริสุทธิ์ด้วย Nickel Sepharose beads
- 3) การสร้างและผลิตโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีต 4 ในเซลล์แมลง ด้วยการแสดงออกแบบชั่วคราว (transient protein expression) และการใช้ไวรัสลูกผสม (Baculovirus system)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถสร้างและผลิตโปรตีนลูกผสมที่บริสุทธิ์ของโปรตีนในกลุ่ม kinase และ โปรตีนอาร์โกนีต 4 ของกิ้งกูด้าได้ ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดใช้ยืนยันปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนได้ และเป็น การสร้างองค์ความรู้พื้นฐานและความเข้าใจต่อการผลิตโปรตีนดังกล่าว เพื่อศึกษาการควบคุมการทำงาน ของโปรตีนอาร์โกนีต 4 ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งสามารถนำไปใช้พัฒนา และปรับปรุงกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อกิ้งกูด้าให้ผลิตลูกกึ่งที่มีปริมาณมากและมีคุณภาพมากขึ้นในอนาคต

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

กุ้งกุลาดำจัดอยู่ในแฟมิลี Penaeidae มีการกระจายตัวอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลอาหรับ ออสเตรเลีย อินโดนีเซีย แอฟริกาใต้ เอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย มีแหล่งที่อยู่ เช่น ปากแม่น้ำ ป่าโกงกาง ทะเลสาบ นอกจากนี้กุ้งกุลาดำยังทนต่อความเค็มตั้งแต่ 2-30 ส่วนต่อพัน (Duda Jr and Palumbi, 1999; FAO, 2006) กุ้งกุลาดำเป็นหนึ่งในสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของไทย อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งประสบปัญหาการลดลงของผลผลิตกุ้งและกุ้งที่ไม่ได้คุณภาพ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554-2564) เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม โรคติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียในกุ้ง รวมถึงผลผลิตพ่อพันธุ์แม่พันธุ์กุ้งและลูกกุ้งที่ไม่ได้คุณภาพ

พ่อพันธุ์แม่พันธุ์กุ้งอาจได้จากการเพาะเลี้ยงหรือนำเข้าจากต่างประเทศ แต่นิยมจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เนื่องจากกุ้งมีขนาดใหญ่และสมบูรณ์ ในการผสมพันธุ์กุ้งในฟาร์มเพาะเลี้ยงใช้การตัดตากุ้งเพศเมียซึ่งมีฮอร์โมนที่ยับยั้งการเจริญของรังไข่ ทำให้กระตุ้นการเจริญของรังไข่เพิ่มความถี่ในการวางไข่ได้มากกว่าการไม่ตัดตาถึงเท่าตัว แต่วิธีนี้ทำให้แม่พันธุ์กุ้งอ่อนแอ มีอัตราการตายจากการติดเชื้อกรรมิที่ผู้ตัดตาไม่ชำนาญ ปริมาณของไข่และอัตราการฟักลดลง รวมถึงลูกกุ้งที่ได้อ่อนแอ มีความต้านทานโรคต่ำ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่ายและไม่ต้องอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูง (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2565)

2.2 การรบกวนการแสดงออกของอาร์เอ็นเอ (RNA interference, RNAi)

เป็นกระบวนการทางชีววิทยาที่ใช้สายอาร์เอ็นเอขนาดเล็กในการควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะที่ระดับการถอดรหัสหรือหลังการถอดรหัส (transcription and post-transcription) ส่งผลให้เกิดยับยั้งการสร้างโปรตีนเป้าหมาย กระบวนการนี้พบได้ใส่สิ่งมีชีวิตยูคาริโอต มีบทบาทหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆในเซลล์ เช่น อะพอพโทซิส (apoptosis) การพัฒนาของเซลล์ (cell development) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปทำหน้าที่เฉพาะ (cell differentiation) หรือระบบภูมิคุ้มกัน (immunity) เป็นต้น โดยกระบวนการ RNAi สามารถกระตุ้นด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ที่อาจได้รับมาจากภายนอกหรือเกิดขึ้นภายในเซลล์ และเกิดเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ช่วยระบุนยีนเป้าหมาย คือ small-interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA) และ piwi-interacting RNA (piRNA) ซึ่งจะเข้าจับกับโปรตีนอาร์โกนีออต และโปรตีนร่วมทำงานอื่นๆ เรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนลิขสิทธิ์อื่น ๆ เมื่อผู้ผู้ใดเห็นใจหรือประสงค์ในการคัดลอกหรือเผยแพร่เอกสารนี้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์หรือผู้ที่เกี่ยวข้อง กรุณาแจ้งให้ทราบล่วงหน้า

RNA-induced silencing complex หรือ RISC ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่อไป

2.2.1 small-interfering RNA (siRNA)

กระบวนการ RNAi ที่ใช้อาร์เอ็นเอขนาดเล็กชนิด siRNA จะถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์ได้รับอาร์เอ็นเอเกลียวคู่สายยาวซึ่งอาจได้รับจากภายนอก เช่น จากติดเชื้อไวรัส (viral genome) หรือเกิดขึ้นภายในเซลล์จากยีนกระโดด (jumping genes or transposons) จากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ Dicer ในไซโตพลาสซึมซึ่งตัดจำเพาะกับอาร์เอ็นเอสายคู่เท่านั้น (dsRNA-specific RNase III) (Bernstein et al., 2001) ได้เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่สั้นๆขนาดประมาณ 21-25 คู่เบส ที่มี 2 นิวคลีโอไทด์ยื่นออกมาที่บริเวณปลาย 3' เมื่ออาร์เอ็นเอหนึ่งสายจะถูกลดสลายไปและเส้นอาร์เอ็นเอที่เหลือจะเรียกว่า “ไกด์” (guide strand) ถูกเลือกไปทำหน้าที่ระบุยีนเป้าหมายโดยเข้าจับกับโปรตีนอาร์โกนีออตทำให้เกิดกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า RNA-induced silencing complex หรือ RISC โดย siRNA จะจับกับบริเวณ mRNA เป้าหมายด้วยเบสคู่สมอย่างสมบูรณ์ (perfect complementary mRNA target) และโปรตีนอาร์โกนีออตจะใช้คุณสมบัติเอนไซม์ RNaseH ทำหน้าที่ในการตัดสาย mRNA เป้าหมายนั้นอย่างจำเพาะเจาะจง และส่งผลให้ไม่สามารถเกิดการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายได้ (Zamore et al., 2000) ส่วนใหญ่โปรตีนอาร์โกนีออตชนิดที่ 2 (argonaute 2) ทั้งในแมลงหวี่ (*D. melanogaster*) มนุษย์ (*Homo sapiens*) รวมทั้งกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ Dicer ชนิดที่ 2 (dicer2) ในการสร้าง siRNA (Horwich et al., 2007) มีการศึกษาพบว่า siRNA สามารถทำงานในระบบภูมิคุ้มกันไวรัส ทำลายสายอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่มีการแสดงออกมากเกินไป หรือมีความผิดปกติ และป้องกันจีโนมจากการแทรกของยีนกระโดด

2.2.2 microRNA (miRNA)

กระบวนการ RNAi ที่ใช้อาร์เอ็นเอขนาดเล็กชนิด miRNA จะถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์ได้รับอาร์เอ็นเอเกลียวคู่ที่มีการจับกันแบบไม่สมบูรณ์ (mismatched or imperfectly-matched dsRNA) จากรายงานพบว่าในจีโนมมียีนต้นตอของ miRNA ซึ่งจะถูกลดรหัสด้วย RNA polymerase II ได้เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ขนาดยาว (primary-miRNA) ในนิวเคลียส ก่อนจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ Drosha ซึ่งตัดจำเพาะกับอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA-specific RNase III) ให้มีขนาดเล็กประมาณ 60-80 นิวคลีโอไทด์ (pre-miRNA) ก่อนส่งออกสู่ไซโตพลาสซึม และถูกตัดให้สั้นลงอีกครั้งด้วย Dicer ให้มีขนาดประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ จะมีเพียงอาร์เอ็นเอสายเดียวที่ถูกเลือกให้ไปทำหน้าที่ระบุเป้าหมายเข้าจับโปรตีนอาร์โกนีออต อาร์เอ็นเอเส้นที่เหลือจะถูกลดสลายหรืออาจทำหน้าที่เช่นเดียวกับ “ไกด์” ได้เช่นกัน (Han et al., 2006) ส่วนมากอาร์เอ็นเอขนาดเล็กชนิด miRNA เข้าจับกับ mRNA เป้าหมายบริเวณปลาย 3' ที่ไม่มีการแสดงออกเป็นโปรตีน (3' untranslated region, 3' UTR) อย่างจำเพาะเจาะจงด้วยเบสคู่สมอย่างไม่สมบูรณ์ (imperfect complementary mRNA target) ทำให้ mRNA

เป้าหมายนั้นไม่ถูกทำลาย แต่เพียงรบกวนขั้นตอนในการแสดงออกของโปรตีนอันเนื่องมาจากโปรตีนไม่ทำงานใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่นๆใน RISC ทำให้การแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายลดลง โดยส่วนมากโปรตีนอาร์โกนีออตชนิดที่ 1 (argonaute 1) ทั้งในแมลงหวี่ (*D. melanogaster*) มนุษย์ (*Homo sapiens*) รวมทั้งกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จะทำงานร่วมกับ Dicer1 ในการสร้าง miRNA ก่อนจะรวมกับ RISC (Ghildiyal and Zamore, 2009) มีการศึกษาพบว่า miRNA เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆในเซลล์ เช่น ระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อไวรัส อะพอพโทซิส และการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ เป็นต้น (Dong et al., 2013)

2.2.3 piwi-interacting RNA (piRNA)

กระบวนการ RNAi ที่ใช้อาร์เอ็นเอขนาดเล็กชนิด piRNA (มีขนาดประมาณ 24-30 นิวคลีโอไทด์) ส่วนมากจะพบในเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์เท่านั้น ทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนกระโดดต่างๆ เพื่อรักษาความเสถียรของจีโนมและควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Onishi et al., 2021) โปรตีนอาร์โกนีออตที่จับกับอาร์เอ็นเอขนาดเล็กชนิด piRNA ถูกจัดอยู่ใน PIWI subfamily ซึ่งอาจจะพบได้ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของเซลล์สืบพันธุ์ แม้ว่ากระบวนการสร้าง piRNA จะยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่จากการศึกษาพบว่า piRNA มีกระบวนการเพิ่มจำนวนแบบทุติยภูมิ (secondary generation) เรียกว่า ping-pong model (Naqvi et al., 2009) โดยอาศัยทั้งโปรตีน AGO3 และ โปรตีน PIWI/Aub และการเข้าคู่กันกับเบสคู่สมของยีนเป้าหมาย (ซึ่งมักพบว่าเป็น transposable elements) และตัดก่อนจะนำอาร์เอ็นเอดังกล่าวมาเพื่อเพิ่มจำนวนอีกครั้ง ทำให้สามารถสร้าง piRNA ได้จำนวนมากและเพียงพอต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมาย

2.3 โปรตีนอาร์โกนีออต (Argonaute protein)

อาร์โกนีออตพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต และทำหน้าที่สำคัญในหลายกระบวนการ เช่น การพัฒนาของเอ็มบริโอ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะ การตอบสนองต่อความเครียด และการยับยั้งการแสดงออกของยีนกระโดด โปรตีนอาร์โกนีออตสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มคือ AGO subfamily และ PIWI subfamily การแสดงออกของโปรตีน AGO subfamily พบได้ในทุกเนื้อเยื่อ และเกี่ยวข้องกับกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของ RNA โดยจับกับ small interfering RNA (siRNA) และ microRNA (miRNA) ในขณะที่โปรตีน PIWI subfamily จะแสดงออกเฉพาะในอวัยวะสืบพันธุ์ และยับยั้งการแสดงออกของ RNA โดยจับกับ piwi-interacting RNA (piRNA) นอกจากนี้ยังมี WAGO subfamily ซึ่งเป็นอีกหนึ่งกลุ่มของอาร์โกนีออตที่พบได้ในหนอน *Caenorhabditis elegans* (Gu et al., 2009; Yigit et al., 2006).

จำนวนของอาร์โกนีออตในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีจำนวนแตกต่างกันไป โดยพบได้ตั้งแต่ 1 ชนิดในยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* จนถึง 27 ชนิด ในหนอน *C. elegans* โปรตีนอาร์โกนีออต

ประกอบไปด้วย 4 โดเมน คือ N-terminal, PAZ, MID และ PIWI สำหรับ N-terminal โดเมน เอกสารนี้เป็นเอกสารทบทวนเนื้อหาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เกี่ยวข้องกับการคลายเกลียวของ small RNA duplex ส่วน PAZ และ MID โดเมน จะช่วยในการจับ ไม่วุ่นวายใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุตบแต่งเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มาแก้ไข

ที่ปลาย 3' และ 5' ฟอสเฟต ของ small RNA ตามลำดับ สุดท้ายคือ PIWI โดเมน จะมีคุณสมบัติของ เอนไซม์ RNaseH-like domain ซึ่งจะมีกรดอะมิโนอนุรักษ์ Asp-Aps-Glu/Asp (DDH) โมทีฟ ที่จำเป็นสำหรับการตัด mRNA เป้าหมาย

2.3.1 AGO subfamily

โปรตีนอาร์โกนีออตค้นพบครั้งแรกในพืช *Arabidopsis thaliana* ซึ่งชื่อนี้ได้มาจาก ลักษณะของพืชที่แสดงออกหลังจากยีนนี้ไม่ทำงาน (Bohmert et al., 1998) AGO subfamily ได้รับการระบุโดยอ้างอิงจากความเหมือนกับ AGO1 ของ *A. thaliana* โปรตีน AGO พบได้ทั้งในไซโตพลาสซึม และนิวเคลียส ของทั้งพืช สัตว์ และยีสต์ ซึ่งทำหน้าที่หลายอย่าง คือ การยับยั้งการแสดงออกของ ยีนที่ระดับกระบวนการถอดรหัส (transcription) กระบวนการหลังถอดรหัส (post transcription) และการควบคุมการแสดงออกของจีโนม โปรตีน AGO ในไซโตพลาสซึมทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ระดับ post transcription มีความสำคัญต่อการพัฒนาของเซลล์ ภูมิคุ้มกันไวรัส และภูมิคุ้มกันแบคทีเรีย ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ (Dechklar et al., 2008; Ding et al., 2004; Van Rij et al., 2006; Yang et al., 2014) ส่วนโปรตีน AGO ในนิวเคลียสทำงานในหลายกระบวนการ เช่น DNA methylation, heterochromatin modification ในพืช และเชื้อรา (Law and Jacobsen, 2010) หรือกระบวนการ DNA elimination ในระหว่างการพัฒนาโครโมโซมในสาหร่าย (Duharcourt et al., 2009)

2.3.2 PIWI subfamily

PIWI ได้รับการตั้งชื่อหลังจากถูกค้นพบในแมลงหวี่ *D. melanogaster* จากการศึกษา *P-element induced wimpy testis* หรือยีนที่ทำให้เกิดอัมพาตผิดปกติ PIWI subfamily จะพบได้ในอวัยวะเพศของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์สืบพันธุ์ โปรตีน PIWI ทำหน้าที่ในการรักษาสภาพเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (germline stem cells, GSC) และเซลล์ทดแทนเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (stem cell self-renewal) (Cox et al., 2000) โปรตีน PIWI มีปฏิสัมพันธ์กับ piRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 24 - 32 นิวคลีโอไทด์ ที่สร้างมาจาก RNA สายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำๆ ในจีโนม (repetitive intergenic sequence) นอกจากนี้ PIWI ยังทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนกระโดดซึ่งสำคัญในการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ (Tian et al., 2011)

มีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน PIWI ในการรักษาสภาพเซลล์สืบพันธุ์ในหลายสิ่งมีชีวิต ในแมลงหวี่ *D. melanogaster* โปรตีน PIWI จะพบในนิวเคลียสหลังจากมีการเกิดของเซลล์ต้นกำเนิด (Primordial germ cells) และมีการแสดงออกทั้งในเซลล์ร่างกายและเซลล์สืบพันธุ์ของแมลงหวี่เพศผู้และเพศเมีย การแสดงออกของโปรตีน PIWI จะกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ GSC มีการแบ่งตัว ในโปรตีน PIWI ที่กลายพันธุ์จะไม่สามารถรักษาสภาพเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ GSC ได้ นอกจากนี้การแสดงออกของโปรตีน PIWI ที่มากเกินไปในส่วน germlarium ของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่างกาย ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ GSC มีอัตราการแบ่งตัวเร็วขึ้นและมีปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Cox et al., 1998)

ในจีโนมของหนู (*M. musculus*) มียีนสร้างโปรตีน PIWI 3 ชนิด คือ MIWI MILI และ MIWI2 โปรตีนทั้งสามชนิดนี้มีการแสดงออกแตกต่างกันในแต่ละระยะการพัฒนาของเซลล์อสุจิ (spermatogenesis) โปรตีน PIWI มีความสำคัญในการยับยั้งการแสดงออกของยีนกระโดดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ขึ้นอยู่กับการเติมหมู่เมทิล ในหนูที่ไม่มียีน *Miwi2* จะไม่มีการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 (long interspersed nuclear element) retrotransposon ในอณูหะ แสดงให้เห็นว่าโปรตีน MIWI2 สำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนกระโดดในเซลล์สืบพันธุ์ (Carmell et al., 2007) นอกจากนี้ในหนูที่ไม่มียีน *Miwi2* และ *Mili* ยังทำให้เกิดความผิดปกติในการเกิด DNA methylation เพื่อควบคุมการแสดงออกของ LINE-1 และ IAP (intracisternal A particle) retrotransposons (Kuramochi-Miyagawa et al., 2008)

2.3.3 WAGO subfamily

WAGO subfamily เป็นโปรตีน Argonaute ที่พบได้ในหนอน *C. elegans* มีจำนวน 18 - 27 ชนิด แตกต่างจาก AGO และ PIWI subfamily คือ WAGO ไม่มี catalytic DDH motif ใน PIWI โดเมน จึงไม่สามารถทำหน้าที่ตัด mRNA ได้ โปรตีน WAGO มีความสำคัญในการยับยั้งการแสดงออกของ dsRNA ที่ได้รับจากภายนอก และทำหน้าที่ในการแยกตัวของโครโมโซมโดยยับยั้งยีนนั้นโดยตรง (Yigit et al., 2006)

2.4 โปรตีนอาร์โกนีออตในกุ้ง

โปรตีนอาร์โกนีออต AGO1 (*PmAGO1* และ *PemAGO*) เป็นโปรตีนที่มี 2 โดเมนที่ถูกระบุได้ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับแมลงหวี่ *D. melanogaster* (Dechklar et al., 2008; Unajak et al., 2006) และยังมี ความคล้ายคลึงกับ *MjAGO1* ของกุ้งครุระหรือกุ้งกุลาดำญี่ปุ่น (*M. japonicus*) และ *MrAGO1* ของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) (Phetrungnapha and Thammason, 2015) จากการศึกษาในสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ยีสต์ *S. pombe*, แมลงหวี่ และมนุษย์ ซึ่งมีจำนวนโปรตีนอาร์โกนีออตตั้งแต่ 1, 5 และ 8 ชนิด ตามลำดับ เช่นกันกับกุ้งในกลุ่ม Penaeid ที่มีจำนวนโปรตีนอาร์โกนีออต มากกว่า 1 ชนิด ดังตารางที่ 2.1 มีรายงานการระบุโปรตีน LvAgo 1 และ LvAgo 2 ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) (Chen et al., 2011) และ *PmAGO2* (Yang et al., 2014) ซึ่งยีนเหล่านี้มีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อและมีกรดอะมิโนอนุรักษ์เหมือนกับ AGO subfamily นั่นคือ PAZ โดเมน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจับ dsRNA และ PIWI โดเมนที่ทำหน้าที่ RNase แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ค้นพบดังกล่าวเกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNAi ข้อสันนิษฐานนี้ยืนยันได้จากการลดการแสดงออกของ *PemAGO* แล้วส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยใช้ dsRNA นั้นแยลง (Dechklar et al., 2008) อีกทั้งยังพบว่า LvAgo2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งได้รับ dsRNA และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้จำนวนหนึ่งเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้ในเชิงพาณิชย์ การอ้าง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน LvDcr2 และ LvTRBP1 จึงกล่าวได้ว่า LvAgo2 ทำงานในกระบวนการ RNAi โดย siRNA (Chen et al., 2011) นอกจากนี้ยังค้นพบ PmAGO3 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ MjAGO2 ตอบสนองต่อการฉีด dsRNA และการติดเชื้อไวรัส (Phetrungnapha et al., 2013) สำหรับ PIWI subfamily มีการรายงานในกิ้งกูดมากถึงสามชนิด คือ PmAGO4 PIWI1 และ PIWI2 ซึ่งพบการแสดงออกได้เฉพาะในอวัยวะสืบพันธุ์เท่านั้น นอกจากนี้ยังไม่มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสหรือการฉีด dsRNA นอกจากนี้การยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าวทำให้มีการเพิ่มขึ้นของยีนกระโดดในอวัยวะ และทำให้จำนวนของอสุจิและขนาดของอวัยวะลดลง จึงกล่าวได้ว่าโปรตีนดังกล่าวทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนกระโดดในเซลล์สืบพันธุ์ และควบคุมการสร้างอสุจิในกิ้งให้เป็นปกติ ดังตารางที่ 2.1 (Ho et al., 2021; Leebonoi et al., 2015; Sukthaworn et al., 2019)

2.5 การควบคุมการทำงานของโปรตีนอาร์โกนีออต

โปรตีนอาร์โกนีออตมีการปรับปรุงหลังการแปลรหัส (post translational modification) เช่นเดียวกับโปรตีนชนิดอื่นๆ การปรับปรุงมีได้หลายรูปแบบ ซึ่งมีผลต่อการทำงานของโปรตีนอาร์โกนีออต เช่น จากการใช้ mass spectrometry วิเคราะห์พบโปรตีน AGO2 ของมนุษย์จับอยู่กับโปรตีน type I collagen prolyl-4 hydroxylase ทำหน้าที่ในการเติมหมู่ -OH (hydroxylate) และจำเป็นต่อความเสถียรของโปรตีน (Qi et al., 2008) ภายใต้สภาวะกดดันโปรตีน AGO ของมนุษย์จะถูกเติมด้วย Poly (ADP-ribose) ซึ่งบรรเทาผลจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกิดจาก miRNA-guided repression (Leung et al., 2011)

2.5.1 Ubiquitylation

การเกิด Ubiquitylation เป็นสัญญาณเกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีน และเกี่ยวข้องกับการนำโปรตีน AGO กลับมาใช้ใหม่มากกว่าการควบคุมการทำงาน มีการรายงานว่า TRIM71 (หรือ LIN41) ทำหน้าที่ E3 ubiquitin ligase สำหรับนำ AGO2 กลับมาใช้ใหม่ (Rybak et al., 2009) นอกจากนี้ TRIM71 ใน *Caenorhabditis elegans* (ชื่อว่า TRIM71-NLH-2) ยังช่วยให้ miRISC-mRNA เป้าหมายจับกันได้ดียิ่งขึ้น (Hammell et al., 2009) ในเซลล์หนูโปรตีน TRIM-NHL ปฏิสัมพันธ์กับ AGO1 และกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ miRNA (Schwamborn et al., 2009) แม้จะทราบว่าโปรตีน TRIM-NHL เป็นหนึ่งในโปรตีนที่ร่วมทำงานกับโปรตีนอาร์โกนีออต แต่กลไกที่ส่งเสริมการทำงานของโปรตีนอาร์โกนีออต ยังคงไม่แน่ชัด โปรตีน AGO2 ที่ได้รับการเติม Polyubiquitylated จะจับกับโปรตีน NDP52 (Gibbins et al., 2012) ซึ่งเป็นโปรตีนรับสัญญาณของออโตฟาจี (autophagy receptor) โดยมีโปรตีน GEMIN3 and GEMIN4 (Mourelatos et al., 2002) ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม (adaptor) จากสัญญาณออโตฟาจีต่อ AGO2 ทำให้โปรตีนเป็นเป้าหมายในการถูกสลายซึ่งเกี่ยวข้องกับการรักษาระดับของการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วย miRNA ในไซโตพลาสซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงโปรตีนอาร์โกนีต และหน้าที่ในกิ่งกุลาดำ

<i>Pm</i> AGOs	<i>Pm</i> AGO1	<i>Pm</i> AGO2	<i>Pm</i> AGO3	<i>Pm</i> AGO4	<i>Pm</i> PIWI1	<i>Pm</i> PIWI2
ความเหมือนกับ Ago ในกิ่งชนิดอื่น	LvAgo1, MjAgo1 MrAgo1	ND	LvAgo2, MjAgo2	ND	ND	ND
การแสดงออก	All tissue	All tissue	All tissue	Germ cell (testis, ovary)	Germ cell (testis, ovary)	Germ cell (testis, ovary)
การตอบสนองต่อการ ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	Yes	Yes	WSSV	No	No	No
การตอบสนองต่อ dsGFP	No	Yes	Yes	No	No	No
หน้าที่	Antiviral defense	ND	YHV replication	Transposon invasion	Transposon invasion, spermatogenesis	Transposon invasion, spermatogenesis
อ้างอิง	Unajak et al., 2006	Ho et al, unpublished data	Phetrungnapha et al., 2013	Leebonoi et al., 2015	Sukthaworn et al., 2019	Sukthaworn et al., 2019

หมายเหตุ ND: Nondetermined

2.5.2 Phosphorylation

จากการศึกษาพบหลายตำแหน่งบนโปรตีนอาร์โกนีออตของมนุษย์ที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของโปรตีน (Zeng et al., 2008) หรือควบคุมการจับกับ small RNA (Rüdel et al., 2010) แต่ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด การส่งสัญญาณเป็นทอดๆภายในและภายนอกเซลล์ รวมถึงการแปลสัญญาณในกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนล้วนเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟต (kinase) โปรตีนอาร์โกนีออต ซึ่งอยู่ในกระบวนการนั้นจึงกลายเป็นหนึ่งในตัวส่งสัญญาณ มีรายงานว่าการแสดงออกของโปรตีน AGO2 ถูกควบคุมผ่านกระบวนการส่งสัญญาณด้วย MAP kinase (Adams et al., 2009) ซึ่งการศึกษาเครือข่ายความสัมพันธ์ของโปรตีนส่งสัญญาณและการทำงานของ small RNA น่าจะทำให้กระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้เข้าใจมากขึ้น

2.6 โปรตีนไคเนส (Protein kinase)

ไคเนส คือ เอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับการปฏิกิริยา phosphorylation หรือการย้ายหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) จาก adenosine triphosphate (ATP) หรือ GTP ให้แก่โมเลกุลอื่นๆ สิ่งมีชีวิตยูคาริโอตมีเอนไซม์ไคเนสอยู่ไม่ต่ำกว่า 500 ยีน เป้าหมายในการเติมหมู่ฟอสเฟตอาจเป็นได้ทั้งไขมัน กรดนิวคลีอิก และโปรตีน (Rauch et al., 2011) การเติมหมู่ฟอสเฟตของโมเลกุลไขมันเพื่อความจำเป็นในการควบคุมองค์ประกอบระดับโมเลกุลของเยื่อหุ้มต่างๆภายในเซลล์ ซึ่งช่วยในการแยกแยะเยื่อหุ้มต่างๆ อย่างจำเพาะทั้งอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมี ตัวอย่างเช่น อินอซิทอล (inositol) มีโครงสร้างคล้ายคาร์โบไฮเดรต เมื่อได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟตจะกลายเป็น phosphoinositol และ phosphoinositide lipids ซึ่งทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณทุติยภูมิในเซลล์ (Cooper, 2018) สำหรับกรดนิวคลีอิกทั้งอาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid, RNA) และดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) ต่างประกอบไปด้วยโมเลกุลฟอสเฟตที่ติดอยู่กับโครงสร้างน้ำตาล (ribonucleoside) เอนไซม์ไคเนสสามารถเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ nucleoside ได้ตั้งแต่ 1-3 โมเลกุล กลายเป็น nucleotide mono-, di- และ triphosphate และในกระบวนการนำเบสพิวรีนกลับมาใช้ใหม่

ในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตมีเอนไซม์ไคเนสประมาณ 2% ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ 30% ของโปรตีนในเซลล์ (Ubersax and Ferrell Jr, 2007) โดยเอนไซม์ไคเนสทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนที่ตำแหน่งกรดอะมิโน serine, threonine (serine/ threonine kinase) และ tyrosine (tyrosine kinase) เนื่องจากกรดอะมิโนทั้งสามชนิดมีหมู่เคมีที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับฟอสเฟตได้ (hydroxyl moiety, OH) (Roskoski, 2012) บางครั้งยังพบการเติมหมู่ฟอสเฟตที่กรดอะมิโน histidine และ aspartrate แต่การเติมนี้ไม่เสถียร การเติมหมู่ฟอสเฟตสำคัญต่อการกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งตัวของเซลล์ การส่งสัญญาณ การเจริญเติบโต และพัฒนาของเซลล์ ซึ่งมีเอนไซม์และโปรตีนรับสัญญาณหลายตัวที่ถูกกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงาน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟต และปฏิกิริยาสามารถผันกลับได้โดยอาศัยเอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatases) ที่สามารถนำหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีนเป้าหมายได้ (dephosphorylation)

Arginine kinase คือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) โดยอาศัยฟอสเฟตจาก ATP ซึ่งพบในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Kang et al., 2011) และยังพบในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เช่น โพรติสและแบคทีเรีย ช่วยในการควบคุมปริมาณ ATP และกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ เช่น การย่อยสลายของโปรตีน และการตอบสนองของสิ่งเร้า ในแบคทีเรียพบเอนไซม์ Arginine kinase (McsB) มากที่สุด และทำหน้าที่เมื่อมีอุณหภูมิสูง (heat shock stress) (Fuhrmann et al., 2009) โมเลกุลเดี่ยวของเอนไซม์มีขนาดประมาณ 40 kDa และค่อนข้างทนความร้อน แต่จะพบเป็นโมเลกุลคู่ (dimer) ในสัตว์จำพวกปลา ตา นอกจากนี้ยังมีรายงานตรวจพบหมู่น้ำตาล (glycoprotein) และตำแหน่งที่คาดว่าน่าจะมีการเติมบนโครงสร้างของ Arginine kinase (Mao et al., 2013) ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพบว่า arginine kinase ทำหน้าที่เช่นเดียวกับ creatine kinase (dimeric molecule) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Kang et al., 2011) เมื่อมีไอออนของสังกะสีที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (1 mM Zn²⁺) arginine kinase จะเสียสภาพจับตัวตกตะกอนและไม่สามารถทำงานได้ (Liu and Wang, 2010) นอกจากนี้พบว่า arginine kinase เป็นหนึ่งในสารก่อภูมิแพ้ที่พบได้ในอาหารจำพวก กุ้ง (ทั้งกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ) กุ้ง ปู หรือสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) (Binder et al., 2001; García-Orozco et al., 2007; Mao et al., 2013) เอนไซม์นี้มีการอนุรักษ์ทั้งโครงสร้างและหน้าที่ (structural and functional conservation) ในสัตว์มีข้อปล้องและยังมีปฏิกิริยาข้ามกันได้ (cross-reactivity) ในสัตว์กลุ่มแมลงและครัสเตเชียน (Yu et al., 2003)

2.7 ยีนกระโดด (Transposons)

ยีนกระโดดเป็นชิ้น DNA ที่สามารถเคลื่อนที่และแทรกตัวลงตำแหน่งอื่นบนจีโนม พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้งแบคทีเรีย พืช และสัตว์ การแทรกตัวของยีนกระโดด อาจทำให้เกิดอันตรายต่อจีโนมเจ้าบ้าน เช่น การทำให้เกิดยีนกลายพันธุ์ จากการแทรก การขาดหายไป การเพิ่มจำนวน การย้ายตำแหน่ง บริเวณที่มีการแทรก แต่อย่างไรก็ตามยีนกระโดดมีผลอย่างมากต่อโครงสร้างของจีโนมและความเสถียร ซึ่งส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม และวิวัฒนาการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยูคาริโอตมียีนกระโดดอยู่เป็นจำนวนมาก ยีนกระโดด แบ่งได้ 2 ชนิด คือ RNA retrotransposons และ DNA transposons (Slotkin and Martienssen, 2007)

2.7.1 Retrotransposons

Retrotransposons ใช้กระบวนการคัดลอก และเพิ่มจำนวน โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ LTR - retrotransposons และ Non - LTR retrotransposons สำหรับ LTR - retrotransposons จะมี long terminal repeat (LTR) อยู่ที่ปลายทั้ง 2 ข้าง ซึ่งใช้ไม่วากรณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเคลื่อนที่ ยีนมีโครงสร้างที่สามารถสร้าง gag - like protein (โปรตีนโครงสร้างของ retroviruses ที่สามารถประกอบเป็นอนุภาคเหมือนไวรัสได้) และ Polprotein (DNA polymerase ของ retroviruses ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็น reverse transcriptase และ integrase) ทำให้มีความสามารถในการจำลอง DNA โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ ก่อนจะแทรกตัวเข้าตำแหน่งใหม่ในจีโนม

Non - LTR retrotransposons มีทั้ง widespread long interspersed nuclear element (LINEs) และ short interspersed nuclear elements (SINEs) ยีนกระโดด LINEs มีความยาวประมาณ 3 - 7 กิโลเบส (Deininger and Batzer, 1999) และสามารถแทรกตัวได้เอง โดยจะสร้างโปรตีนจาก ORF1 และ ORF2 ซึ่งจำเป็นในการเคลื่อนที่ ในมนุษย์พบ LINE element (L1) ในเซลล์มะเร็งที่ได้รับมาจากเซลล์เยื่อบุ (epithelial cell) (Carreira et al., 2014) มีหลายรายงานแสดงให้เห็นว่าการเติมหมู่เมทิลใน L1 มาก จะกระตุ้นให้ยีนกลายก่อมะเร็ง (proto-oncogene) (Antelo et al., 2012; Lamprecht et al., 2010; Takai et al., 2000) ในทางตรงกันข้าม SINE สร้างจาก DNA polymerase III มีขนาดไม่เกิน 600 คู่เบส ไม่สามารถแทรกตัวได้เองเพราะไม่มี ORF การเคลื่อนที่ของ SINEs ขึ้นอยู่กับกลุ่มโปรตีนที่ทำงานร่วมกับ LINEs ยีน Alu เป็นตัวอย่างของ SINE ในมนุษย์ที่มีส่วนสำคัญในหลายโรค โดยการแทรกตัวในจีโนมของเซลล์ร่างกายและเซลล์สืบพันธุ์ (Deininger and Batzer, 1999)

2.7.2 DNA transposons

DNA transposons จะอาศัยกระบวนการตัดและแทรกใหม่ในจีโนม โดยยีนจะประกอบด้วยตัวยีนกระโดดที่มี terminal inverted repeats (TIRs) อยู่ที่ปลายทั้งสองด้าน Transposase จะจดจำ TIRs และตัดยีนกระโดดเพื่อนำไปแทรกยังจุดอื่นๆในจีโนม DNA transposons อาจมีขนาดได้ถึง 10 กิโลเบส และมี TIRs ยาว 10 - 500 คู่เบส (Burt and Trivers, 2006) Tc1/mariner และ *P-element* ในแมลงหวี่ *D. drosophila* เป็น DNA transposons ที่มีการศึกษามากที่สุด โดย Tc1/mariner เป็นยีนกระโดดที่มีความหลากหลายและพบได้มากที่สุด มีความยาวตั้งแต่ 1 - 5 กิโลเบส สามารถแปลรหัสให้ transposase ที่มีขนาดประมาณ 282-345 กรดอะมิโน และมี TIRs ที่อาจยาวประมาณ 17 - 1100 คู่เบส Tc1/mariner สามารถถ่ายทอดได้จากเจ้าบ้านที่ต่างกัน (Horizontal transfer) ยกตัวอย่าง เช่น ระหว่างแมลงต่างอันดับกัน (order) และสัตว์น้ำครึ่งเตี๋ย (crustaceans) (Plasterk et al., 1999) ยีนกระโดดสามารถถ่ายทอดได้โดยอาศัยพาหะเป็นตัวนำส่งอาจเป็นปรสิตภายนอกในร่างกาย เช่น เห็บ ซึ่งเป็นพาหะส่งยีนกระโดด *P-element* หรือปรสิตภายในร่างกาย เช่น ไวรัส (Munoz-Lopez and Garcia-Perez, 2010)

นอกจากนี้ยังมีการค้นพบ DNA transposons ที่ไม่สามารถแทรกตัวได้เอง เรียก Miniature Inverted-repeat Transposable Elements (MITEs) หรือ short DNA transposons-element ซึ่งมีขนาดประมาณ 80 - 500 คู่เบส และพบได้ในยูคาริโอตหลายชนิด ยีนเหล่านี้ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถสร้างโปรตีนที่จำเป็นในการเคลื่อนที่ได้ตั้งนั้นการเคลื่อนที่จึงขึ้นอยู่กับกลุ่มโปรตีนที่ทำงานร่วมกับ DNA transposons ที่เคลื่อนที่ได้เอง (Feschotte et al., 2007)

2.7.3 ยีนกระโดดในกุ้ง (Transposons in shrimps)

มีการค้นพบยีนกระโดดหลายชนิดในครัสเตเชียน ยีนกระโดดตัวแรกที่ถูกค้นพบคือ mariner ในปู *Bythograea therydron* (Casse et al., 2006) หลังจากนั้นจึงค้นพบยีนกระโดดตัวอื่นๆ ที่มีลักษณะคล้าย mariner จากการศึกษานำใน Expressed Sequence Tag (EST) ของ cDNA library ของเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) นอกจากนี้ยังมี Penelope-like element ซึ่งถูกระบุได้ในกุ้งญี่ปุ่น (*Marsupenaeus japonicus*) (Koyama et al., 2013) การศึกษาโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของครัสเตเชียน 15 - 18 ชนิด ด้วยคอมพิวเตอร์ (*in silico* approach) ค้นพบ Copia 35 ชนิด และ Gypsy 46 ชนิด โดย 2 ใน 3 เป็น LTR-retrotransposon Gypsy-like element นั่นคือ GyPemo1 และ GyPemo2 ในกุ้งกุลาดำ (Piednoël et al., 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1.1 Luria-Bertani broth (LB broth)
- 3.1.2 Luria-Bertani (LB) agar
- 3.1.3 Sf-900TM II SFM
- 3.1.4 Grace's media

3.2 เอนไซม์ สารเคมี และบัฟเฟอร์

- 3.2.1 InstantBlue® Coomassie Protein Stain
- 3.2.2 Sodium chloride (NaCl)
- 3.2.3 Peptone
- 3.2.4 Yeast Extract
- 3.2.5 Agarose
- 3.2.6 Distilled water (ddH₂O)
- 3.2.7 10x TBE buffer
- 3.2.8 Magnesium Chloride (MgCl₂)
- 3.2.9 Ethidium Bromide (EtBr)
- 3.2.10 5x Phusion HF Buffer
- 3.2.11 DNA loading dye (6x)
- 3.2.12 Acrylamide solution
- 3.2.13 Glycine
- 3.2.14 Glycerol
- 3.2.15 Methanol
- 3.2.16 *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- 3.2.17 Tris base
- 3.2.18 Agarose
- 3.2.19 Ampicillin
- 3.2.20 Kanamycin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นได้ขออนุญาตและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.21 Chloramphenicol

- 3.2.22 *Bam*HI
- 3.2.23 *Eco*RI
- 3.2.24 *Xho*I
- 3.2.25 Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranositol (IPTG)
- 3.2.26 Lysozyme
- 3.2.27 Taq DNA polymerase
- 3.2.28 10x Fastdigest buffer
- 3.2.29 Transfer buffer
- 3.2.30 2x Laemmli Sample Buffer
- 3.2.31 β -mercaptoethanol
- 3.2.32 Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 3.2.33 Ammonium sulfate (APS)
- 3.2.34 10x Running Buffer
- 3.2.35 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.2.36 40% Acrylamide/Bis Solution (37.5:1)
- 3.2.37 Imidazole
- 3.2.38 Triton x-100
- 3.2.39 Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)
- 3.2.40 Liquid Nitrogen
- 3.2.41 RQ1 (RNase-Free DNase)
- 3.2.42 Phosphate Buffered Saline (PBS)
- 3.2.43 Isopropanol Alcohol (C₃H₈O)
- 3.2.44 Edetate Disodium (EDTA)
- 3.2.45 Dithiothreitol (DTT)
- 3.2.46 Elution buffer
- 3.2.47 FuGene transfection reagent
- 3.2.48 Gentamycin sulfate
- 3.2.49 Tetracycline
- 3.2.50 TAE buffer
- 3.2.51 TBE buffer
- 3.2.52 Anti-6x His Tag (mAb-His6) Antibody
- 3.2.53 Goat anti-mouse (GAM) Antibody

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่วางไว้สำหรับการใช้งานที่ถูกต้องเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.54 Anti-Glutathione S-transferases (mAb-GST) Antibody
- 3.2.55 Nikle (Ni^{2+}) Sepharose beads
- 3.2.56 Glutathione Sepharose beads
- 3.2.57 Mirus transfection reagent
- 3.2.58 Trypan blue stain

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.3.1 หลอดไมโครเซนตริฟูกพลาสติก (Micro Centrifuge Tube)
- 3.3.2 หลอดพีซีอาร์ (PCR Tube)
- 3.3.3 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction Machine)
- 3.3.4 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 (T75 Cell Culture Flask)
- 3.3.5 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 (T25 Cell Culture Flask)
- 3.3.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน (Autoclave)
- 3.3.7 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับสำหรับงานเพาะเลี้ยงเซลล์ (Inverted Microscope)
- 3.3.8 ปีเปต (Serological Pipette)
- 3.3.9 เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ (Pipette Boy)
- 3.3.10 จานเพาะเชื้อพลาสติก (Sterile Plastic Petri Dish)
- 3.3.11 เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker)
- 3.3.12 ไม้จิ้มฟัน (Toothpick)
- 3.3.13 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 3.3.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)
- 3.3.15 หลอดเซนตริฟูกพลาสติก ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Centrifuge Tube)
- 3.3.16 เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance 4 digits)
- 3.3.17 ไมโครเพลท ขนาด 96 หลุม (96-well plate)
- 3.3.18 เครื่องดูดจ่ายสารละลายไมโครปีเปต (Micropipette)
- 3.3.19 ปีเปตทิป (Pipette Tip)
- 3.3.20 กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent Microscope)
- 3.3.21 คีมคีบ (Forcep) ยี่ห้อ SPHINX
- 3.3.22 สไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer)
- 3.3.23 เครื่องนับจำนวนแบบกด (Manual Counter)
- 3.3.24 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 3.3.25 เครื่องรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวตั้ง (Vertical Gel Electrophoresis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับครูผู้สอนที่ขอความรู้จากท่านนี้ ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.26 เครื่องรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวนอน (Horizontal Gel Electrophoresis)
- 3.3.27 เครื่องถ่ายภาพรูปเจลและวิเคราะห์เจล (Manual gel documentation systems InGenius3)
- 3.3.28 เครื่องซีลถุงพลาสติก (Bag Sealer)
- 3.3.29 ดิสก์ประกบฟิล์ม X-RAY (Hypercassette)
- 3.3.30 แผ่นฟิล์ม X-RAY (FUJI Medical X-RAY Film) ยี่ห้อ FUJIFILM
- 3.3.31 เครื่องเขย่าสารแนวราบ (Rotator/Orbital Shaker) รุ่น KJ-201 BS Rotating
- 3.3.32 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 3.3.33 คิวเวทท์ (Cuvettes)
- 3.3.34 เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer) ยี่ห้อ Scientific Industries
- 3.3.35 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Mini Centrifuge)
- 3.3.36 เครื่องเขย่าแบบหมุนหลายทิศทาง (Rotators)
- 3.3.37 กล่องพลาสติกใสสี่เหลี่ยมมีฝาปิด (Plastic Box) รุ่น D Size(cm.):10 x 7.5 x 5.5
- 3.3.38 ถุงพลาสติกทนร้อน (Hot Plastic Bag)
- 3.3.39 เครื่องส่งถ่ายสารพันธุกรรม (Trans-Blot SD cell) ยี่ห้อ BioRad, USA
- 3.3.40 แผ่นเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) ขนาด 8x6 cm.
- 3.3.41 กระดาษซับ (Blotting Paper) ขนาด 8x6 cm.
- 3.3.42 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม (6-well plate)
- 3.3.43 เครื่องให้ความร้อนตลอดทดลอง (Heating Box)
- 3.3.44 หม้อมีด้ามจับและฝาปิด
- 3.3.45 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
- 3.3.46 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic Sonicator)
- 3.3.47 ไมโครเวฟ (Microwave)
- 3.3.48 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop Spectrophotometer)
- 3.3.49 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Hood)
- 3.3.50 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.3.51 กระบอกตวง (cylinder)
- 3.3.52 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic Stirring Bar)

3.4 สารอื่นๆ

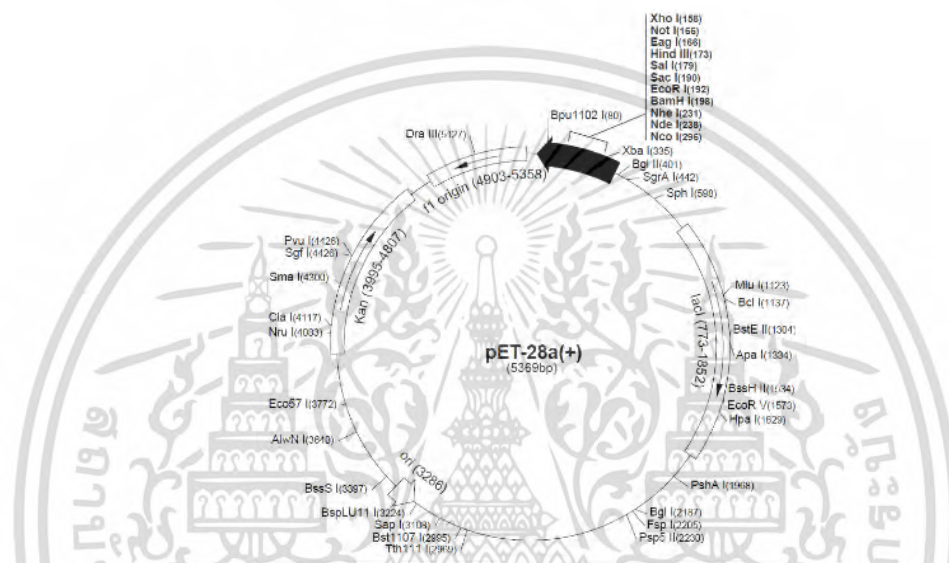
- 3.4.1 ชุดสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini kit) ยี่ห้อ FAVORGEN
- 3.4.2 ชุดสกัดพลาสมิด (QIAGEN Plasmid Mini)
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 ชุดสกัดสารพันธุกรรมจากเจล (FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit) ยี่ห้อ FAVORGEN

3.4.4 ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents ยี่ห้อ cytiva

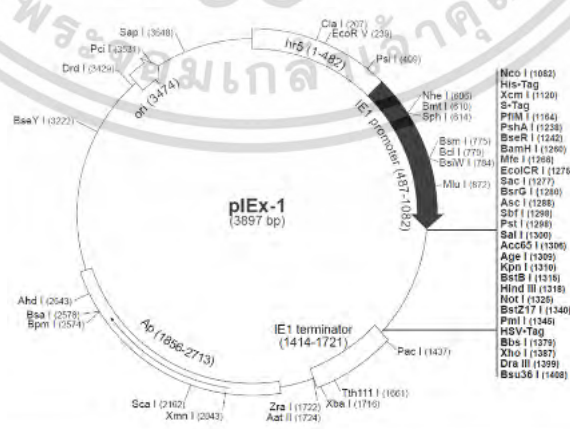
3.5 เวกเตอร์ (Vector)

3.5.1 pET28a



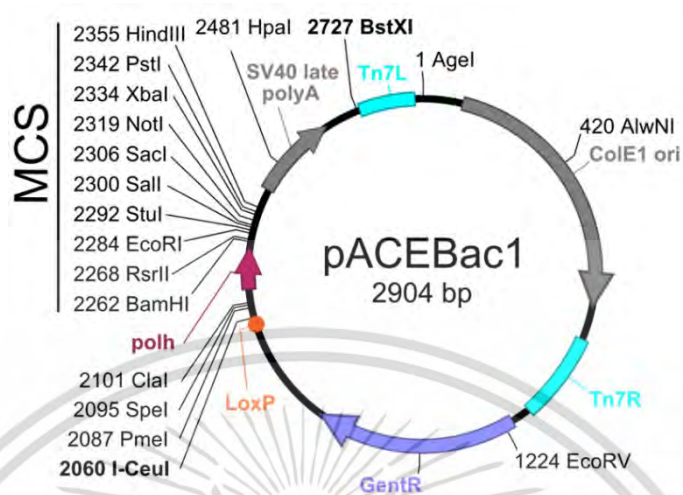
รูปที่ 3.1 แสดงโครงสร้างพลาสมิด pET28a พร้อมจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ Novagen®

3.5.2 pIEX-eGFP



เอกสารนี้เป็นรูปที่ 3.2 แสดงโครงสร้างพลาสมิด pIEX-1 พร้อมจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ Novagen® การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3 pACEBac I



รูปที่ 3.3 แสดงโครงสร้างพลาสมิด pACEBac I พร้อมจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (MultiBac™ Geneva Biotech)

3.6 การสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีน Arginine kinase และ Serine/Threonine protein kinase (pET28-Ark และ pET28-STK)

3.6.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน Ark และ STK ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน Ark และ STK โดยใช้คู่ไพรเมอร์ (primers) ที่จำเพาะกับยีน Ark หรือ STK และทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนทั้งสองด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (Phusion tag DNA polymerase) จากดีเอ็นเอต้นแบบของกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ตัว (cDNA1 และ cDNA2) เริ่มต้นโดยทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน Ark คือ Ark-F และ Ark-R สำหรับคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน STK คือ STK-F และ STK-R จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง (spin down) หลอดพีซีอาร์ที่มีสารผสม (PCR mixture) ก่อนนำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสดังแสดงในตารางที่ 3.2 หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X Phusion HF buffer	5.0
10 mM dNTPs	0.5
10 μ M Forward Primer	1.0
10 μ M Reward Primer	1.0
Milli-Q water	16.25
Phusion Taq	0.25
cDNA	1.0

ตารางที่ 3.2 ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์ของซันยีน Ark และ STK

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	ทำซ้ำ
Initial denaturation	98	3 นาที	30 รอบ
Denaturation	98	30 วินาที	
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 นาที	
Final extension	72	30 นาที	

3.6.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

เตรียมสารละลายเจลอะกาโรสที่อัตราส่วน 1% และให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นทำการเทสารละลายลงบนถาดเตรียมเจล (tray) และวางหวี (comb) เพื่อให้เกิดช่องสำหรับโหลดตัวอย่าง และทิ้งเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที ทำการเตรียมตัวอย่างโดยทำการผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 10 ไมโครลิตรต่อสี (6x DNA loading dye) 2 มิลลิลิตร เมื่อทำการประกอบเจลลงในตัวถังพร้อมบัฟเฟอร์เสร็จแล้ว ทำการโหลดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แต่ละตัวอย่างลงในช่องโหลดเจลและทำการแยกสารพันธุกรรมโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ทำการย้อมเจลด้วย Ethidium bromide และแช่น้ำกลั่น 15 นาที ก่อนนำเจลไปถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Manual gel documentation systems InGenius3) นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop Spectrophotometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3 การเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด pET28a

3.6.3.1 การเพิ่มจำนวนพลาสมิด pET28a

เลือกโคลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (DH5 α) ที่มีพลาสมิด pET28a จากจานเพาะเชื้อต้นฉบับ (master plate) เพื่อทำการเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ผสมยาปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าเป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง

3.6.3.2 การสกัดพลาสมิด pET28a

ทำการเก็บเซลล์ *E. coli* ด้วยการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 1 นาที และสกัดพลาสมิด pET28a ด้วยชุดสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit) ละลายเซลล์ในบัฟเฟอร์ P1 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยการใส่บัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส ทำให้พลาสมิดคืนสภาพ (renature) โดยการใส่บัฟเฟอร์ P3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนปั่นแยกโปรตีนและเศษเซลล์ด้วยความเร็ว 18,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่มีพลาสมิดใสในคอลัมน์ที่สามารถจับกับพลาสมิดได้ จากนั้นปั่นล้างคอลัมน์ด้วย 70 % แอลกอฮอล์ก่อนจะชะพลาสมิดออกด้วยน้ำบริสุทธิ์ หลังจากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของพลาสมิด pET28a ที่สกัดได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และ เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Nanodrop ดังแสดงในหัวข้อ 3.6.2

3.6.4 การตัดชิ้นส่วนยีน Ark STK และพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ สำหรับการเกิดปฏิกิริยาการตัดชิ้นส่วนยีน Ark STK และพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยชิ้นส่วนยีน Ark และ pET28a จะทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I ในขณะที่ชิ้นส่วนยีน STK และ pET28a จะทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Xho*I นำสารผสมปริมาตร 30 มิลลิลิตรของแต่ละตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นทำการแยกแถบชิ้นส่วนยีน Ark หรือ STK และพลาสมิด pET28a ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เมื่อทำการย้อมเจลด้วย Ethidium bromide และนำเจลไปถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล ทำการตัดเจลบริเวณที่มีแถบชิ้นส่วนยีน Ark หรือ STK และพลาสมิด pET28a ตามขนาดที่ต้องการ และทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม (FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit) สุดท้ายทำการวัดความเข้มข้นชิ้นส่วนยีน Ark หรือ STK และพลาสมิด pET28a ที่สกัดได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Nanodrop ดังแสดงในหัวข้อ 3.6.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะในการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัด Ark และ pET28a		การตัด STK และ pET28a	
ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Milli-Q water	13	Milli-Q water	13
Ark หรือ pET28a	12	STK หรือ pET28a	12
10x Fastdigest buffer	3	10x Fastdigest buffer	3
<i>Bam</i> HI	1	<i>Eco</i> RI	1
<i>Xho</i> I	1	<i>Xho</i> I	1
Total	30	Total	30

3.6.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation)

ทำการเชื่อมต่อยีนเข้ากับพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อให้ได้พลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ด้วยเอนไซม์ไลเกส (T4 ligase) โดยความเข้มข้นและขนาดของชิ้นส่วนยีนและพลาสมิดที่ได้จากหัวข้อ 3.6.4 แสดงในตารางที่ 3.4 และทำการคำนวณปริมาณยีนและพลาสมิดที่เหมาะสมเพื่อใช้สำหรับปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ โดยจะใช้พลาสมิดที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัม และใช้อัตราส่วนยีนต่อพลาสมิดที่ 3:1

ตารางที่ 3.4 ขนาดและความเข้มข้นโดยประมาณของยีน Ark STK และพลาสมิด pET28a

ยีนและพลาสมิด (เอนไซม์ตัดจำเพาะ)	ขนาด (กิโลเบส, kb)	ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)
Ark (<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)	1.1	22.1
pET28a (<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)	5.369	9
STK (<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I)	1.9	27.2
pET28a (<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I)	5.369	6

สูตรคำนวณปริมาณยีนที่ใช้ มีหน่วยนาโนกรัม (ng) ที่ใส่ต่อส่วนยีนต่อพลาสมิด 3:1

$$\text{ปริมาณของ insert (ng)} = \frac{\text{Insert size (kb)} \times \text{vector (ng)} \times \text{molar ratio of inset : vector}}{\text{Vector size (kb)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณของ Ark ที่ต้องใช้

$$\text{ปริมาณของ Ark (ng)} = \frac{1.1 \text{ (kb)} \times 20 \text{ (ng)} \times 3:1}{5.3 \text{ (kb)}}$$

$$\text{ปริมาตรที่ต้องใช้} = 12.45/22.1 \text{ นาโนกรัม} = 0.6 \text{ ไมโครลิตร}$$

ปริมาณของ STK ที่ต้องใช้

$$\text{ปริมาณของ STK (ng)} = \frac{1.9 \text{ (kb)} \times 20 \text{ (ng)} \times 3:1}{5.3 \text{ (kb)}}$$

$$\text{ปริมาตรที่ต้องใช้} = 21.50/27.2 \text{ นาโนกรัม} = 0.8 \text{ ไมโครลิตร}$$

หลังจากนั้นทำการผสมส่วนประกอบต่างๆลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และนำสารผสมไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หรือ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง สุดท้ายทำการเพิ่มจำนวนและคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมในแบคทีเรีย *E. coli* (DH5 α) ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x T4 ligation buffer	1.0	10x T4 ligation buffer	1.0
pET28a (B/X) (20 ng)	2.2	pET28a (E/X) (20 ng)	3.3
Ark (B/X) (12.45 ng)	0.6	STK (E/X) (21.25 ng)	0.8
ddH ₂ O	5.7	ddH ₂ O	4.4
T4 ligase	0.5	T4 ligase	0.5
Total	10	Total	10

3.6.6 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation)

ทำการนำส่งพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5- α ด้วยวิธี heat shock โดยเริ่มจากการนำสารผสมการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอจากหัวข้อ 3.6.5 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์แบคทีเรียที่ถูกทำให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมในการนำส่งดีเอ็นเอจากภายนอก (competent cell) ที่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock โดยนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสโดยทันที ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) เป็นเวลา 45 วินาที และรีบนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที ทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ลงในหลอดทดลองปริมาตร 950 ไมโครลิตร ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมง แบ่งเซลล์แบคทีเรียออกเป็น 2 ส่วนคือ 10% และ 90% เพื่อนำไปทำให้เชื้อกระจายบนจานเพาะเชื้อ (spread

plate) อาหารแข็ง (LB agar) ที่มีส่วนผสมยาปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร สูดถ่ายนำงานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

3.6.7 การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม (screening of the positive clones)

3.6.7.1 การทำงานเพาะเชื้อต้นฉบับ (Master Plate)

ทำการเลือกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 30 โคโลนี บนงานเพาะเชื้อจากหัวข้อ 3.6.6 โดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีเดี่ยว ๆ ของแบคทีเรียและนำมาจิ้มลงงานเพาะเชื้ออาหารแข็งอันใหม่ ที่มีส่วนผสมยาปฏิชีวนะ Kanamycin จนครบตามจำนวนที่ต้องการ หลังจากนั้นทำการบ่มงานเพาะเชื้ออาหารแข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

3.6.7.2 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีแยกตามขนาด (size screening)

ใช้ปิเปตต์หีบเขี่ย 15 โคโลนีของแบคทีเรียจากงานเพาะเชื้อต้นฉบับในหัวข้อ 3.6.7.1 และทำการบดในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ Size screening (Size screening Buffer) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที หรือจนสารละลายเหนียวหนืด จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีสารละลายไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 5 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังแสดงในหัวข้อ 3.6.2 เมื่อทำการย้อมเจลด้วย Ethidium bromide และนำเจลไปถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล ทำการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดลูกผสมที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยการวิเคราะห์เทียบกับพลาสมิดเปล่าและแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker)

3.6.7.3 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

หลังจากการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีแยกตามขนาดแล้ว ยังต้องทำการยืนยันพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีอื่นๆ อีกครั้ง การทดลองนี้ทำการเลือกโคโลนีแบคทีเรียหมายเลข 2-5 จากงานเพาะเชื้อต้นฉบับมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนผสมยาปฏิชีวนะ Kanamycin บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วยชุดสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit) ตามหัวข้อ 3.6.3.2 และวัดค่าความเข้มข้นของพลาสมิดลูกผสมด้วยเครื่อง Nanodrop จากนั้นนำพลาสมิด pET28-Ark ประมาณ 500 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ BamHI และ XhoI สำหรับพลาสมิด pET28-STK ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI และ XhoI โดยเตรียมปฏิกิริยาตามที่แสดงดังตารางที่ 6 และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอจากพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเทียบกับพลาสมิดเปล่าและแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังแสดงในหัวข้อ 3.6.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบพลาสมิด pET28-Ark และ pET28-STK

ส่วนประกอบ	หมายเลขโคโลนี			
	Ark2	Ark3	Ark4	Ark5
10x Fastdigest buffer	1.0	1.0	1.0	1.0
pET28-STK (500 ng)	7.0	4.2	5.0	6.2
<i>EcoRI</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>XhoI</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
ddH ₂ O	-	2.8	2.0	0.8
Total	10 ng/μl Reaction			

ส่วนประกอบ	หมายเลขโคโลนี			
	STK2	STK3	STK4	STK5
10x Fastdigest buffer	1.0	1.0	1.0	1.0
pET28-STK (500 ng)	5.1	5.0	6.1	3.6
<i>EcoRI</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>XhoI</i>	1.0	1.0	1.0	1.0
ddH ₂ O	1.9	2.0	0.9	3.4
Total	10 ng/μl Reaction			

3.7 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein expression)

3.7.1 การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG

จากการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมในหัวข้อ 3.6.7.2 และ 3.6.7.3 นำพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark หมายเลข 4 และ 5 (Ark4 และ Ark5) และ พลาสมิดลูกผสม pET28-STK หมายเลข 4 และ 5 (STK4 และ STK5) ความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัม ส่งเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta ตามวิธีทดลองในหัวข้อ 3.6.6 และนำไปทำให้เชื้อกระจายบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง (LB agar) ที่มีส่วนผสมยาปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Chloramphenicol ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการบ่มจานเพาะเชื้ออาหารแข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากทำจานเพาะเชื้อต้นฉบับ (Master Plate) เลือก 2 โคโลนีของแบคทีเรียจากจานเพาะเชื้อ pET28-Ark4 (Ark4/1 และ Ark4/2) และ pET28-Ark5 (Ark5/1 และ Ark5/2) รวมทั้ง pET28-STK4 (STK4/1 และ STK4/2) และ pET28-STK5 (STK5/1 และ STK5/2) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB broth ที่มีส่วนผสมยาปฏิชีวนะ

ไม่วางกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Chloramphenicol ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (starter) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรีย starter ที่ปริมาตร 1 ส่วน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวใหม่ 100 ส่วน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า จนมีค่าความขุ่นของเซลล์เมื่อวัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) อยู่ในช่วง 0.4-0.6 จากนั้นใส่สารละลาย IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์เพื่อทำการกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนลูกผสมในเซลล์แบคทีเรีย และทำการบ่มพร้อมเขย่าเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการบันทึกความขุ่นของเซลล์และเก็บเซลล์ที่ความเข้มข้น 1 OD_{600} โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg นาน 10 นาที หลังจากเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งและทำการเก็บตะกอนเซลล์ (cell pellet) ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.7.2 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ในเซลล์แบคทีเรียจากหัวข้อ 3.7.1 ด้วยเจลอะคริลาไมด์ เริ่มด้วยทำการเตรียมเจล SDS-PAGE ที่ความเข้มข้น 10% (separating gel) โดยผสมส่วนประกอบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.7 ก่อนเทลงระหว่างกระจกที่เตรียมไว้ ทำการคลุมผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่นและทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จากนั้นทำการเตรียมเจลชั้นบน (stacking gel) ที่ความเข้มข้น 5% และเททับด้านบนของ separating gel พร้อมใส่หัวเพื่อทำให้เกิดช่องใส่ตัวอย่างและปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที ก่อนนำมาประกอบกับขั้วไฟฟ้าและบรรจุใส่ถังบัฟเฟอร์

ทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนเพื่อนำไปโหลดเจลอะคริลาไมด์ โดยนำเซลล์แบคทีเรียจากหัวข้อ 3.7.1 ผสมกับ 2X Laemmli sample buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ 1 OD_{600} ของตะกอนเซลล์ หลังจากผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) และนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง (spin down) ก่อนโหลดตัวอย่างใส่ในหลุมใส่ตัวอย่างของเจลอะคริลาไมด์ โดยคิดเทียบเป็นปริมาณเซลล์ประมาณ 0.2 OD_{600} ทำการแยกขนาดโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า 130 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หรือจนกว่าสีของตัวอย่างอยู่ห่างจากขอบล่างของเจลประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จึงย้อมเจลด้วยสี InstantBlue™ Coomassie เป็นเวลา 15 นาที ถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเจลด้วยน้ำกลั่นก่อนนำเจลไปถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลด้วยการเทียบขนาดของโปรตีนลูกผสมที่ต้องการกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (Protein marker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบเพื่อเตรียมเจลอะคริลาไมด์ปริมาตรต่อ 1 เจล

เจลชั้นล่าง (separating gel)		เจลชั้นบน (stacking gel)	
ความเข้มข้น 10%		ความเข้มข้น 5%	
ส่วนประกอบ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ส่วนประกอบ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
Deionized water	3.3	Deionized water	3.675
1M Tris-HCl pH 8.8	3.75	1M Tris-HCl pH 6.8	0.625
40% acrylamide/bis	2.4	40% acrylamide/bis	0.65
10% SDS	0.1	10% SDS	0.05
10% APS	0.05	10% APS	0.025
TEMED	0.075	TEMED	0.004
Total	10	Total	5

3.8 การสกัดโปรตีนลูกผสมจากเซลล์แบคทีเรีย (Extraction of recombinant protein from bacterial cells)

3.8.1 การสกัดโปรตีนด้วยวิธีการแช่แข็ง-ละลาย (Freeze thaw)

โดยทั่วไปรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมในเซลล์แบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้ 2 ลักษณะคือ 1) โปรตีนที่อยู่ในรูปละลายได้ (soluble protein) และ 2) โปรตีนที่อยู่ในรูปไม่ละลาย (insoluble protein) ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ในเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน โดยทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG ตามวิธีการทดลองหัวข้อ 3.7.1 โดยหลังใส่ IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์ จะแยกนำเซลล์แบคทีเรียไปเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg นาน 10 นาที จากนั้นผสมสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (lysis buffer) ที่มีส่วนผสมของ 1 มิลลิโมลาร์ PMSF และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร lysozyme ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อตะกอนเซลล์แบคทีเรีย 1 OD₆₀₀ และทำการแช่น้ำแข็งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นทำให้เชื้อหุ้มเซลล์แบคทีเรียถูกทำลายมากขึ้นด้วยวิธี freeze-thaw โดยนำตัวอย่างที่เตรียมไว้แช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายเกิดเป็นผลึกน้ำแข็ง จากนั้นนำตัวอย่างมาแช่น้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทันทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำการละลายน้ำแข็ง ทำการแช่แข็งและละลายตัวอย่างซ้ำวนไปอย่างน้อย 5 ครั้ง ก่อนทำการใส่เอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (DNase I, RQ1 Promega™) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4-1 ยูนิตต่อตัวอย่าง และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่ต่ำกว่าครึ่งชั่วโมง ทุกครั้ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกโปรตีนออกจากกันที่ความเร็วรอบ 12,000 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการดูดเก็บส่วนของเหลวใส (ส่วนโปรตีนที่อยู่ในรูปละลายน้ำได้) ใส่หลอดทดลองอันใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับตะกอนโปรตีน (ส่วนโปรตีนที่อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ) จะนำมาละลายในสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (lysis buffer) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนและวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีทดลองหัวข้อ 3.7.2 ต่อไป

3.8.2 การสกัดโปรตีนด้วยวิธีการใช้คลื่นความถี่สูง (Sonication)

จากข้อจำกัดในการสกัดโปรตีนด้วยวิธีแช่แข็ง-ละลาย (freeze-thaw) ที่มีเหมาะสมกับปริมาณเซลล์แบคทีเรียไม่เกิน 2 OD₆₀₀ ดังนั้นในการสกัดโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีปริมาณมากๆ จึงเปลี่ยนมาใช้วิธีที่เหมาะสมมากขึ้นคือการใช้คลื่นความถี่สูงเพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย การทดลองนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 5 OD₆₀₀ ละลายในสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ดังแสดงในหัวข้อ 3.8.1 หลังจากแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งไว้ 30 นาที ทำการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโดยใช้คลื่นความถี่สูง (Sonicator) ที่ความถี่ 40-50 % โดยตั้งเวลาเปิดทำงานทั้งหมดเป็นเวลา 2 นาที (pulse on 5 วินาที และ pulse off 10 วินาที) หรือจนกระทั่งสารละลายเซลล์แบคทีเรียใส จากนั้นทำการแยกโปรตีนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำตามวิธีการทดลองหัวข้อ 3.8.1 สุดท้ายทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนและวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีทดลองหัวข้อ 3.7.2 ต่อไป

3.9 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยแอนติบอดีจำเพาะ (Western blot analysis)

เมื่อทำการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยเจลอะครีลาไมด์ (SDS-PAGE) เสร็จแล้ว จากนั้นทำการยีนย่นแถบโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK บนเจลอะครีลาไมด์ ด้วยวิธี western blot analysis จากการทดลองในหัวข้อ 3.8.2 นำเจลอะครีลาไมด์ที่ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วแช่ในบัฟเฟอร์ (Transfer buffer) จากนั้นทำการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลอะครีลาไมด์ไปยังเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนชนิดกึ่งแห้ง (Trans-Blot SD cell) โดยมีลำดับการจัดวางส่วนประกอบต่างๆ จากด้านล่างขึ้นบนดังนี้ 1) กระดาษซับจำนวน 3 แผ่น วางแนบกับขั้วลบ 2) เมมเบรนไนโตรเซลลูโลส โดยวางซ้อนทับบนกระดาษซับ 3) เจลอะครีลาไมด์ที่มีขนาดเท่ากับเมมเบรนวางทับด้านบน 4) กระดาษซับจำนวน 3 แผ่น วางปิดทับเป็นชั้นสุดท้าย โดยส่วนประกอบในทุกชั้นตอนต้องผ่านการแช่ใน transfer บัฟเฟอร์ที่เย็นจัดก่อนทำการประกอบเครื่องและใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 0.30 มิลลิแอมป์ ในการส่งถ่ายโปรตีนไปยังเมมเบรนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตประสิทธิภาพการส่งโปรตีนได้จากสีของแถบโปรตีนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ย้ายจากเจดมาติคอยู่บนเมมเบรน
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนต่อไปนำแผ่นเมมเบรนแช่ในกล่องพลาสติกที่มี Blocking บัฟเฟอร์ (5 % ของ skim milk ใน PBS บัฟเฟอร์ผสมกับ tween 20 ความเข้มข้น 0.1 %) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและทำการเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเท Blocking บัฟเฟอร์ทิ้งและใส่แอนติบอดีตัวที่ 1 (mouse anti-His6X antibody) ที่มีความจำเพาะกับ His-tagged ที่ความเจือจาง 1 ต่อ 10,000 ใน blocking บัฟเฟอร์และเขย่าต่ออีกเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเทแอนติบอดีตัวที่ 1 ทิ้งและล้างเมมเบรนด้วย PBS บัฟเฟอร์ผสม tween 20 ความเข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นใส่แอนติบอดีตัวที่ 2 (goat anti-mouse, GAM) ที่จับจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่ 1 และมีการติดเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ที่ความเจือจาง 1 ต่อ 10,000 ใน blocking บัฟเฟอร์พร้อมเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้างเมมเบรนอีกครั้งด้วย PBS บัฟเฟอร์ผสม tween 20 ความเข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นทำการติดตามตำแหน่งของโปรตีนลูกผสมเป้าหมายโดยการนำเมมเบรนวางลงบนแผ่นพลาสติกให้ด้านที่มีโปรตีนขึ้นด้านบน ทำการหยดสารตั้งต้น (substrate, ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents) ที่จำเพาะกับเอนไซม์ HRP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ทั่วแผ่นเมมเบรนและวางทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเช็ดสารตั้งต้นบนเมมเบรนออก ก่อนทำการปิดผนึกถุงพลาสติกทั้ง 4 ด้านและนำไปติดในชุดประกบฟิล์ม (Hypercassette) สุดท้ายทำการประกบแผ่นฟิล์ม X-RAY ลงบนเมมเบรนในห้องมืดเพื่อตรวจสอบสัญญาณเคมีเรืองแสง (chemiluminescence) จากนั้นล้างฟิล์ม X-RAY ด้วยเครื่องล้างฟิล์ม โปรตีนลูกผสมที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีจะให้สัญญาณแถบขึ้นบนแผ่นฟิล์มเพื่อทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมต่อไป

3.10 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้นิกเกิล bead (Nickel Sepharose beads)

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pET28a (ควบคุม) pET28-Ark5/1 และ pET28-STK5/1 ในอาหารเหลว LB และทำการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG ตามวิธีการทดลองหัวข้อ 3.7.1 โดยหลังใส่ IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์ จะนำเซลล์แบคทีเรียไปเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg นาน 10 นาที และนำมาสกัดโปรตีนลูกผสมที่อยู่ในรูปละลายได้ด้วยวิธีการใช้คลื่นความถี่สูงตามการทดลองที่ 3.8.2 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนลูกผสมไปทำให้บริสุทธิ์ในลำดับต่อไป

ทำการเตรียม Nickel Sepharose beads (50 % ในสารละลายแอลกอฮอล์) โดยการดูดสารละลาย Nickel Sepharose beads ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยก Nickel Sepharose beads ออกจากสารละลาย 20 % แอลกอฮอล์ที่ใช้ในการเก็บรักษาด้วยความเร็วรอบ 1000 xg เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นดูดสารละลาย 20 % แอลกอฮอล์ทิ้งและทำการล้าง Nickel Sepharose beads ด้วย PBS

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 xg เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ Nickel Sepharose beads ผสมกับสารละลายโปรตีนลูกผสม (soluble protein fraction) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และนำไปหมุน (rotation) ด้วยเครื่องแกนหมุน (rotator) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยก Nickel Sepharose beads และทำการเก็บส่วนใส (โปรตีนที่ไม่จับกับ Nickel Sepharose beads, unbound protein) ทำการล้าง Nickel Sepharose beads ด้วยสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จำนวน 3 รอบ ทำการเก็บส่วนใสทุกครั้ง (โปรตีนที่หลุดออกหลังจากทำการล้าง beads, washing fraction) จากนั้นทำการชะล้างโปรตีนลูกผสมที่ติดอยู่กับ Nickel Sepharose beads ด้วยสารละลาย imidazole (โปรตีนที่เกาะติดกับ beads, Eluted protein) ที่ความเข้มข้น 100 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ สุดท้ายทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนและวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนลูกผสมด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีทดลองหัวข้อ 3.7.2 และทำการยืนยันแถบโปรตีนลูกผสมด้วยวิธีแอนติบอดีจำเพาะตามวิธีการหัวข้อ 3.9 เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการทำให้โปรตีนลูกผสมบริสุทธิ์ได้สำเร็จด้วย Nickel Sepharose beads

3.11 การแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนีออต 4 (*PmAGO4* protein) แบบชั่วคราว (Transient expression) ในเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda* ovary (Sf9 cell)

การทดลองจะใช้พลาสมิดที่มีส่วนของโปรโมเตอร์ (promotor sequence) ของไวรัส ซึ่งสามารถทำการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 ได้ในเซลล์แมลง (Sf9 cell) โดยพลาสมิด HpiEXGFP สามารถผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green fluorescent protein, GFP) ที่สามารถทำการตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent microscope) ดังนั้นเพื่อให้สะดวกในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 จึงทำการออกแบบให้มีการติดฉลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณด้านปลายเอ็น (N-terminus) ของโปรตีนอาร์โกนีออต 4

3.11.1 สกัตพลาสมิด HpiEXGFP และ HpiEXGFP-Ago4

ทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดเปล่า (HpiEXGFP) และพลาสมิดลูกผสม (HpiEXGFP-Ago4) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha โดยการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation) ตามวิธีการทดลองหัวข้อ 3.6.6 จากนั้นเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็งผสมยาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำจานเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ก่อนจะทำการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมโดยการเปรียบเทียบจากขนาด (size screening) ตามวิธีทดลองที่ 3.6.7.2 จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม HpiEXGFP-Ago4 จำนวน 2 โคโลนี (HpiEXGFP-Ago4/1 และ Ago4/2) ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว LB ผสมยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ในเชิงพาณิชย์โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิชีวนะ Ampicillin ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเก็บเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 xg เป็นเวลา 5 นาที และทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วยชุดสกัดพลาสมิด (QIAGEN® plasmid mini kits) ขั้นตอนสุดท้ายทำการละลายพลาสมิดลูกผสมในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) จากนั้นทำการเจือจางพลาสมิดตัวอย่างด้วยน้ำบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 10 และ 100 เท่าก่อนทำการตรวจสอบขนาดและความสมบูรณ์ของพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังแสดงในหัวข้อ 3.6.2 สุดท้ายทำการ วัดความเข้มข้นของพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Nanodrop ดังแสดงในหัวข้อ 3.6.2 ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.11.2 การนำส่งพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แมลง (Transfection)

การแสดงออกของโปรตีนลูกผสมในเซลล์แมลง ตัวนำพา (Transfection reagent) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโซมที่มีประจุบวกสามารถจับกับประจุลบของสารพันธุกรรมหรือพลาสมิดดีเอ็นเอ และทำหน้าที่ในการนำพาพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แมลง ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ transfection reagent 2 ชนิด เพื่อให้นำพาพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แมลง Sf9 คือ TransIT®-Insect (Mirus) และ FuGENE® โดยเริ่มต้นจากแบ่งเซลล์ Sf9 จากพลาสเลียงเซลล์ (T75 flask) มาทำการเจือจางด้วยสีย้อม 0.4% Trypan blue ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 100 ในตู้ชีวนิรภัย (Biological safety cabinet) ก่อนทำการนับจำนวนเซลล์ Sf9 ด้วย hemocytometer จากนั้นทำการ seed เซลล์ Sf9 จำนวน 1×10^6 เซลล์ ในอาหาร Sf-900 II SFM ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อหนึ่งหลุมของ 6-well plate นำเซลล์ Sf9 ไปเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เซลล์ Sf9 เกาะที่บริเวณก้นหลุม ระหว่างนั้นทำการเตรียมสารเพื่อใช้ในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ Sf9 ด้วย TransIT®-Insect (Mirus) transfection reagent โดยการผสมพลาสมิด HplEXGFP หรือ HplEXGFP-Ago4 (Ago4/1 และ Ago4/2) ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมใน TransIT®-Insect (Mirus) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และอาหาร Grace's media ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ในขณะที่การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ Sf9 ด้วย FuGENE® transfection reagent จะทำการเตรียมส่วนผสม 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1) นำพลาสมิด HplEXGFP หรือ HplEXGFP-Ago4 (Ago4/1 และ Ago4/2) ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม ผสมเข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ Sf-900 II SFM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ส่วนที่ 2) ผสม FuGENE® transfection reagent ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ Sf-900 II SFM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการผสมส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2 ให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15-30 นาที เมื่อครบเวลาทำการหยดสารละลายผสมลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ Sf9 ที่เตรียมไว้ข้างต้นให้ทั่ว ทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มสำหรับเซลล์แมลงที่อุณหภูมิ 28 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GFP และไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GFP-Ago4 ด้วยการส่องเซลล์ Sf9 ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) จากนั้นเก็บเซลล์ Sf9 ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 300 xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS บัฟเฟอร์ 1 ครั้ง ก่อนทำการสกัดโปรตีนลูกผสมด้วยสารละลาย RIPA บัฟเฟอร์ (RIPA lysis buffer) ที่มีส่วนผสมของสารละลาย PMSF 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ก่อนทำการใส่เอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (DNase I, RQ1 Promega™) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4-1 ยูนิตต่อตัวอย่าง และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิธีการทดลองหัวข้อ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกโปรตีนที่อยู่ในรูปละลายน้ำได้ออกจากเศษเซลล์ (cell debris) ที่ความเร็วรอบ 12,000 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการดูดส่วนของเหลวใส่หลอดทดลองอันใหม่ จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนและวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีทดลองหัวข้อ 3.7.2 และทำการยืนยันแถบโปรตีนลูกผสมด้วยการใช้แอนติบอดีจำเพาะกับ His-tagged (mouse anti-His antibody) ตามวิธีทดลองหัวข้อ 3.9

3.12 การแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนีออต 4 ในเซลล์แมลง Sf9 ด้วยระบบแบคทีเรียไวรัส (Baculovirus)

การทดลองจะใช้พลาสมิด pACEBacI-GST-Ago4 ที่มีลำดับเบสของ Tn7R และ Tn7L ที่สามารถนำพาชิ้นส่วนของยีนอาร์โกนีออต 4 เข้าไปรวมกับจีโนม (Bacmid) ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10 เพื่อสร้าง Bacmid ลูกผสม (Recombinant Bacmid) และเมื่อทำการนำส่ง Bacmid ลูกผสมเข้าไปยังเซลล์แมลง จะทำให้เกิดการสร้างแบคทีเรียไวรัสลูกผสม (Recombinant Baculovirus) พร้อมกับการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 ในเซลล์แมลง อีกทั้งแบคทีเรียไวรัสลูกผสมยังสามารถผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green fluorescent protein, GFP) ซึ่งสามารถทำการตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ และเพื่อให้สะดวกในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 จึงทำการออกแบบให้มีการติดฉลากด้วยโปรตีน Glutathione S transferase (GST) ที่บริเวณด้านปลายเอ็น (N-terminus) ของโปรตีนอาร์โกนีออต 4

3.12.1 การสร้างแบคทีเรียลูกผสม (Recombinant bacmid)

ทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดเปล่า (HpiEXGFP) และพลาสมิดลูกผสม (HpiEXGFP-Ago4) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha โดยการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation) ดังแสดงในหัวข้อ 3.6.6 จากนั้นเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็งผสมยาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำจานเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ก่อนจะทำการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมโดยการเปรียบเทียบจากขนาด (size screening) ตามวิธีทดลองที่ 3.6.7.2 จากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่วนวิศวกรรมชีวภาพเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ago4/1 และ Ago4/2) ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว LB ผสมยาปฏิชีวนะ Ampicillin ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเก็บเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 xg เป็นเวลา 5 นาที และทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วยชุดสกัดพลาสมิด (QIAGEN® plasmid mini kits) ขั้นตอนสุดท้ายทำการละลายพลาสมิดลูกผสมในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) จากนั้นทำการเจือจางพลาสมิดตัวอย่างด้วยน้ำบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 10 และ 100 เท่าก่อนทำการตรวจสอบขนาดและความสมบูรณ์ของพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังแสดงในหัวข้อ 3.6.2 สุดท้ายทำการ วัดความเข้มข้นของพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Nanodrop ดังแสดงในหัวข้อ 3.6.2 ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ทำการสกัดและวัดความเข้มข้นของพลาสมิด pACEBacI-GST และ pACEBacI-GST-Ago4 ก่อนทำการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10 ตามวิธีการทดลองหัวข้อ 3.6.6 จากนั้นเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็งที่ผสมยาปฏิชีวนะ (gentamycin kanamycin และ tetracycline ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 50 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และสารละลายผสม X-gal/IPTG (IPTG ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ และ x-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำการบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมมาทำงานเพาะเชื้อต้นฉบับ (Master Plate) ตามวิธีทดลองหัวข้อ 3.6.7.1 ก่อนจะทำการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป

3.12.2 การคัดเลือกแบคทีเรียลูกผสมโดยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการสกัดแบคทีเรียลูกผสมจากโคโลนีแบคทีเรียสีขาวบนจานเพาะเชื้อต้นฉบับในหัวข้อที่ 3.12.1 ด้วยชุดสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini kit) จากนั้นนำแบคทีเรียลูกผสมที่สกัดได้มาทำการเจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 300 ก่อนนำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนอาร์โกนีด 4 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตามวิธีทดลองหัวข้อ 3.6.1 โดยทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ตามที่แสดงในตารางที่ 3.8 และดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังแสดงในตารางที่ 3.9 หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อทำการยืนยันการแทรกตัวของยีน GST และ GST-Ago4 ที่มีอยู่ในแบคทีเรียลูกผสม

ตารางที่ 3.8 ปฏิกริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคมิตลูกผสม

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
Milli-Q H ₂ O	6.35
10x buffer	1.0
10 mM dNTPs	0.2
10 mM Forward primer	0.2
10 mM Reward primer	0.2
5 Unit / μ l <i>Tag</i> (NEB)	0.05
Bacmid (1:300)	2
Total	10

ตารางที่ 3.9 ปฏิกริยาพีซีอาร์ของแบคมิตลูกผสม

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	ทำซ้ำ
Initial denaturation	98	3 นาที	30 รอบ
Denaturation	98	30 วินาที	
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 นาที	
Final extension	72	30 นาที	

3.12.3 การสร้าง Baculovirus ลูกผสม

ทำการสกัดแบคมิตลูกผสมที่คัดเลือกแล้วจากหัวข้อ 3.12.2 จำนวน 2 โคลน (โคลน GST หมายเลข 11 และ 13 และ โคลน GST-Ago4 หมายเลข 12 และ 14) โดยใช้สารละลายจากชุดสกัดพลาสมิด FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini kit เริ่มจากการละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ FAPD1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลายบัฟเฟอร์ FAPD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และทำการกลับด้านหลอดขึ้นลงช้าๆ 5-10 รอบ ก่อนตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นใส่สารละลายบัฟเฟอร์ FAPD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับด้านหลอดขึ้นลงช้าๆ 5-10 รอบก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนและเศษเซลล์ที่ความเร็วรอบ 18,000 xg นาน 10 นาที ดูดส่วนใสย้ายใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และทำการตกตะกอนแบคมิตลูกผสมโดยใส่ไอโซโพรพานอล ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ของส่วนใส ทำการปั่นเพื่อเก็บตะกอนแบคมิตลูกผสมที่ความเร็วรอบ 12,000 xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจะล้างตะกอนด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 75% ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 xg เป็นเวลา 5 นาที หลังจากเทเอทานอล ความเข้มข้น 75% ทิ้ง ทำการใส่เอทานอล ความเข้มข้น 75% ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนที่มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมายและจะดำเนินการตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องต่อไป

50 ไมโครลิตร ก่อนนำหลอดทดลองที่มีตะกอนแบคทีเรียผสมเข้าไปตากภายในตู้ชีวนิรภัย (Biological safety cabinet) เพื่อทำการละลายและนำส่งเข้าเซลล์ Sf9 ต่อไป

ทำการนับจำนวนเซลล์ Sf9 และ seed เซลล์ Sf9 จำนวน 1×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Sf-900 II SFM ปริมาตร 3 มิลลิตร ต่อหนึ่งหลุมของ 6-well plate จากนั้นทำการนำส่งแบคทีเรียผสมเข้าสู่เซลล์ Sf9 ด้วย FuGENE[®] transfection reagent ตามวิธีการทดลองหัวข้อ 3.11.2 โดยละลายตะกอนแบคทีเรียผสมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการผสม FuGENE[®] transfection reagent ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งสารละลายทั้งสองส่วนไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำสารละลายแบคทีเรียผสมและสารละลาย FuGENE[®] transfection reagent ผสมเข้าด้วยกันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15-30 นาที ก่อนนำไปหยดลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ให้ทั่ว ทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มสำหรับเซลล์แมลงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนีออต 4 ด้วยการส่องเซลล์ Sf9 ที่มีการผลิต Baculovirus ลูกผสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) จากนั้นทำการแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมี Baculovirus ลูกผสม (P0) ใส่ในหลอดทดลองและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน Baculovirus ลูกผสม (P1) พร้อมกับการแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนีออต 4 โดยการนำ Baculovirus ลูกผสม P0 มาทำให้ติดเชื้อ (infection) ในเซลล์ Sf9 เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ Sf9 ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 300 xg เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสที่มี Baculovirus ลูกผสม (P1) ใส่ในหลอดทดลองและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำตะกอนเซลล์ Sf9 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนีออตด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีการทดลองหัวข้อ 3.7.2 และทำการยืนยันแถบโปรตีนอาร์โกนีออตด้วยการใช้แอนติบอดีจำเพาะกับ GST-tagged (Anti-Glutathione S-transferases Antibody) ตามวิธีทดลองหัวข้อ 3.9 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

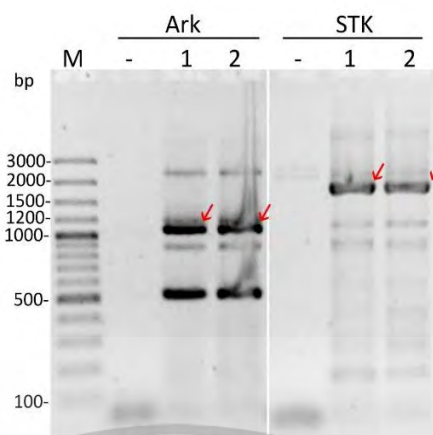
4.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน Ark และ STK ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน Ark และ STK ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสจากดีเอ็นเอต้นแบบของกิ้งกูดาคำ cDNA1 และ cDNA2 โดยใช้คู่มือที่จำเพาะกับยีน Ark และ STK หลังจากทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน Ark และ STK เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของทั้งสองยีนจาก cDNA1 และ cDNA2 ให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 ขนาดเมื่อเทียบกับตัวอย่างปฏิกิริยาควบคุม (Negative PCR) แม้สามารถพบแถบดีเอ็นเอของยีน Ark ได้หลายขนาด แต่จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า cDNA ของกิ้งกูดาคำมีขนาด 1,071 คู่เบส (Yu et al., 2003) ดังนั้นจึงเลือกศึกษาแถบดีเอ็นเอของยีน Ark มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอของยีน STK มีขนาดประมาณ 1,900 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของ polo-like kinase 1 (PLK1) หรืออีกชื่อหนึ่งคือ Serine/threonine-protein kinase PLK1 ของกิ้งกูดาคำในฐานข้อมูล NCBI ที่มีหมายเลขจำเพาะของลำดับเบส KT868944 (GenBank accession number) จากนั้นทำการตัดแถบดีเอ็นเอของยีน Ark และ STK ดังแสดงด้วยลูกศรสีแดงในรูปที่ 4.1 ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล จากนั้นเมื่อวัดค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ Ark และ STK ด้วยเครื่อง Nanodrop พบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 33.3 และ 38.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

4.2 การเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด pET28a

จากการลงเชื้อด้วยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (DH5-alpha) ที่มีพลาสมิด pET28a จากงานเพาะเชื้อต้นฉบับพบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ kanamycin และเมื่อทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit และตรวจสอบคุณภาพพลาสมิดด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส จากผลการทดลองรูปที่ 4.2 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5,000 คู่เบส จากทั้ง 2 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาสกัด จากนั้นเมื่อวัดค่าความเข้มข้นของพลาสมิดทั้ง 2 ตัวอย่างด้วยเครื่อง Nanodrop พบว่าพลาสมิดที่ได้มีความเข้มข้น 104 และ 155 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่ได้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและคุณภาพดีเหมาะสำหรับนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน Ark และ STK จากดีเอ็นเอต้นแบบของกุ่มกุ่มดำ cDNA1 และ cDNA2 ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA ladder 100 bp plus ตัวเลข 1 และ 2 คือ ดีเอ็นเอต้นแบบของกุ่มกุ่มดำ cDNA1 และ cDNA2 ตามลำดับ และสัญลักษณ์ - คือปฏิกิริยาควบคุม (Negative PCR) ลูกศรสีแดง แสดงให้เห็นถึงแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน Ark และ STK ตามขนาดที่ต้องการ (Ark มีขนาด 1,071 คู่เบส และ STK มีขนาด 1,851 คู่เบส)

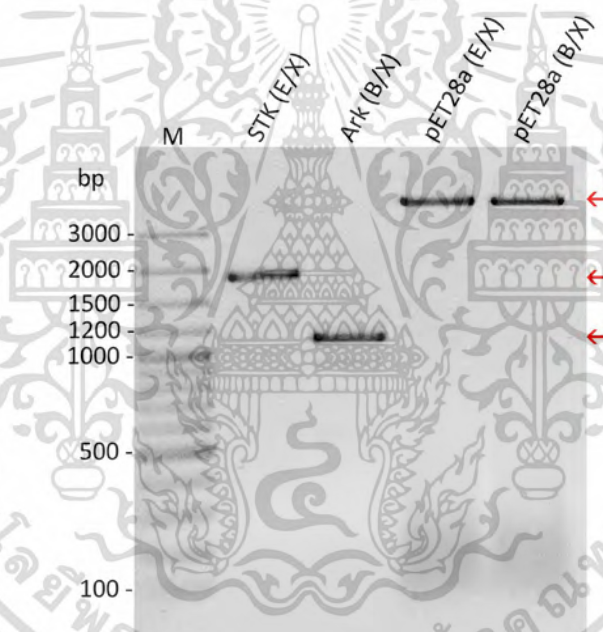


รูปที่ 4.2 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิด pET28a ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-log DNA ladder (0.1-10.0 kb) ตัวเลข 1 และ 2 คือ โคลนที่ 1 และ โคลนที่ 2 ของเชื้อแบคทีเรีย โดยพลาสมิด pET28a มีขนาด 5,369 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตัดชิ้นส่วนยีนและพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

การสร้างพลาสมิดลูกผสมต้องทำการตัดชิ้นส่วนยีนและพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เข้าคู่กันได้ โดยการทดลองนี้ชิ้นส่วนยีน Ark และ pET28a ทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I ในขณะที่ชิ้นส่วนยีน STK และ pET28a ทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Xho*I จากผลการทดลองรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นถึงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้องตามที่ต้องการของชิ้นส่วนยีน Ark หรือ STK และพลาสมิด pET28a หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบนเจลอะกาโรส สามารถอภิปรายผลได้ว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้นั้นเหมาะสมและไม่สามารถตัดภายในชิ้นยีนได้ เมื่อวัดค่าความเข้มข้นของชิ้นส่วนยีน STK-(E/X) Ark-(B/X) pET28a-(E/X) และ pET28a-(B/X) ด้วยเครื่อง Nanodrop พบว่ามีความเข้มข้น 27.2 22.1 6 และ 9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ STK-(E/X) Ark-(B/X) pET28a-(E/X) และ pET28a-(B/X) หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA ladder 100 bp plus และลูกศรสีแดงแสดงขนาดของแถบชิ้นส่วนของ STK-(E/X) Ark-(B/X) pET28a-(E/X) และ pET28a-(B/X) ตามขนาดที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม (screening of the positive clones)

เมื่อทำการเชื่อมต่อกันส่วนของยีน STK-(E/X) เข้ากับพลาสมิด pET28a-(E/X) และ ชิ้นส่วนของยีน Ark-(B/X) เข้ากับพลาสมิด pET28a-(B/X) เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสมและนำส่งเข้าเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha จากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อมาทำการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมด้วย 2 ขั้นตอนดังนี้

4.4.1 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีแยกตามขนาด (size screening)

เมื่อทำการบด 15 โคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม pET28a-STK หรือ pET28a-Ark ในสารละลายบัฟเฟอร์ size screening และทำการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดลูกผสมที่แตกต่างด้วยการวิเคราะห์เทียบกับพลาสมิดเปล่าและแถบดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากผลการทดลองรูปที่ 4.4 พบว่ามี 11 โคโลนีจากทั้งหมด 15 โคโลนีให้แถบพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark ขนาดใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับพลาสมิด pET28a เปล่า (รูปที่ 4.4ก) ซึ่งสามารถอธิบายผลขั้นต้นได้ว่าโคโลนีดังกล่าวมีชิ้นส่วนของยีน Ark แทรกอยู่ในพลาสมิด pET28a ในขณะที่รูปที่ 4.4ข พบว่ามี 6 โคโลนีจากทั้งหมด 15 โคโลนีให้แถบพลาสมิดลูกผสม pET28-STK ขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด pET28a เปล่า เพื่อทำการยืนยันผลการทดลองนำพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark และ pET28-STK โคโลนีที่ 2-5 ทำการตรวจสอบด้วยวิธีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

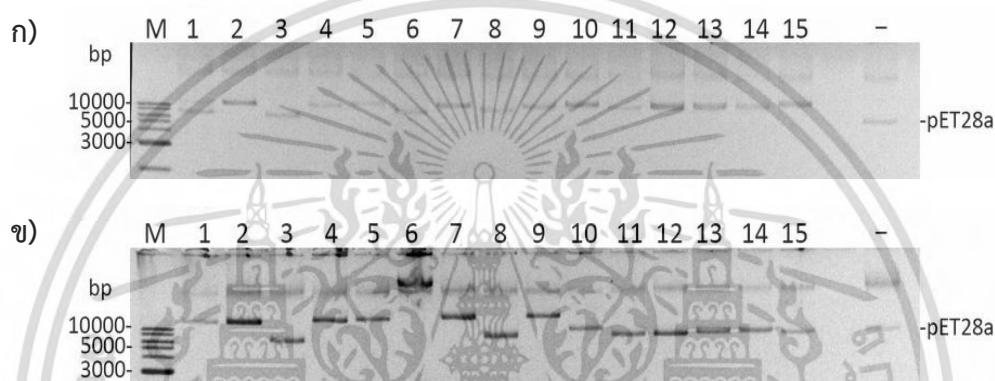
4.4.2 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพื่อทำการยืนยันว่าพลาสมิดลูกผสมมีชิ้นส่วนของยีน Ark หรือ STK แทรกอยู่ในพลาสมิด pET28a จึงนำพลาสมิดลูกผสมโคโลนีที่ 2-5 จากหัวข้อ 4.4.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I สำหรับพลาสมิด pET28-Ark ในขณะที่พลาสมิด pET28-STK ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Xho*I จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากผลการทดลองรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดสอดคล้องกับยีน Ark และยีน STK จากโคโลนีหมายเลข 2 4 และ 5 หลังจากทำการตัดพลาสมิด pET28-Ark และ pET28-STK ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในขณะที่พลาสมิดจากโคโลนีหมายเลข 3 ของทั้ง pET28-Ark และ pET28-STK ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดสอดคล้องกับยีน Ark และยีน STK ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับข้อมูลในหัวข้อ 4.4.1 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการสร้างพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark และ pET28-STK ได้สำเร็จและเหมาะสมในการนำไปทำการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมในเซลล์แบคทีเรียต่อไป

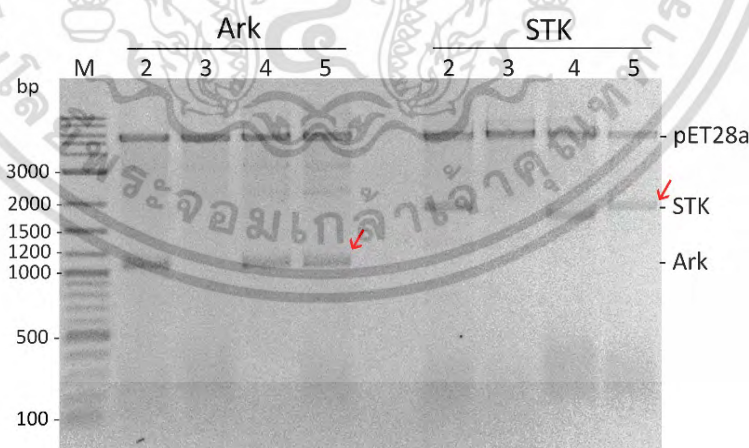
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein)

การแสดงออกของโปรตีนลูกผสมในเซลล์แบคทีเรีย เริ่มต้นด้วยการนำพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark หมายเลข 4 และ 5 (Ark4 และ Ark5) และ พลาสมิดลูกผสม pET28-STK หมายเลข 4 และ 5 (STK4 และ STK5) ย้ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta ซึ่งมีเหมาะสมต่อการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน จากนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว LB และทำการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม จากนั้นจึงทำการสกัดโปรตีนลูกผสมที่ต้องการเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้ในการทดลองที่เหมาะสมต่อไป



รูปที่ 4.4 แสดงการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark (ก) และ pET28-STK (ข) โดยวิธีการแยกตามขนาด (size screening) M คือ แลบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA ladder 100 bp plus และสัญลักษณ์ - คือพลาสมิด pET28a เปลา (Negative control)



รูปที่ 4.5 แสดงการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark และ pET28-STK ด้วยวิธีเอนไซม์ตัดจำเพาะ M คือ แลบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA ladder 100 bp plus ตัวเลข 2, 3, 4 และ 5 คือ พลาสมิดลูกผสมโคลนที่ 2-5 ตามลำดับ ลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นถึงแถบชิ้นส่วนของยีน Ark หรือ STK โดย pET28-Ark ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI/*Xho*I และ pET28-STK ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI/*Xho*I

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.1 การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG

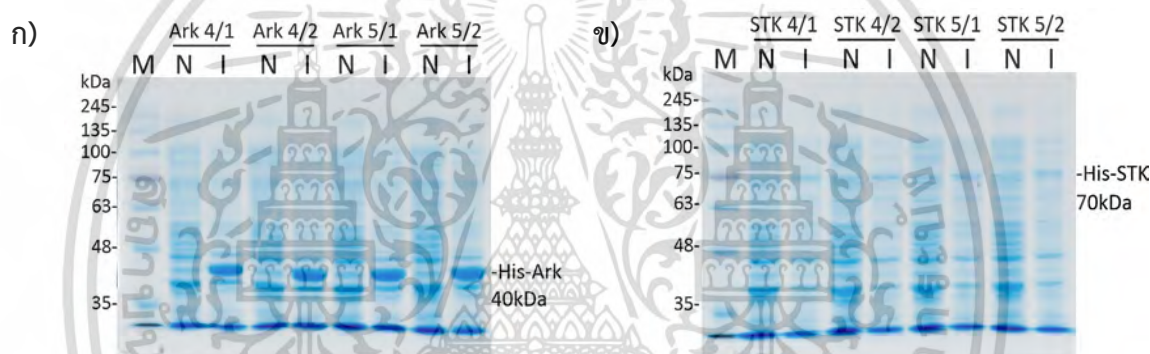
จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta ที่มีพลาสมิด pET28-Ark4 pET28-Ark5 pET28-STK4 และ pET28-STK5 จำนวนอย่างละ 2 โคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB broth แล้วทำการกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK จากเซลล์แบคทีเรียด้วยเจลอะคริลาไมด์ (SDS-PAGE) ผลการทดลองรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าพบแถบโปรตีนลูกผสม His-Ark ขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของ Ark ในกุ้งขาว *L. vannamei* (LvArk) (López-Zavala et al., 2013) และ His-STK ขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน ตรงกับขนาดที่ทำนายได้จาก Serine/threonine-protein kinase PLK1 ของกุ้งกุลาดำในฐานข้อมูล NCBI ที่มีหมายเลขจำเพาะของลำดับกรดอะมิโน AMO03195 (GenBank accession number) จากเซลล์แบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG (รูปที่ 4.6 เลน I) เมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย IPTG (รูปที่ 4.6 เลน N) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถทำการแสดงออกโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ได้สำเร็จในเซลล์แบคทีเรีย

4.5.2 การกระตุ้นให้โปรตีนลูกผสมแสดงออกในรูปแบบที่ละลายน้ำได้

รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมในเซลล์แบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้ 2 ลักษณะ คือ โปรตีนที่อยู่ในรูปละลายได้ (soluble protein) และโปรตีนที่อยู่ในรูปไม่ละลาย (insoluble protein) ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง อาทิเช่น ขนาดของโปรตีนลูกผสม กระบวนการตัดแปลงโปรตีนหลังจากถอดรหัส (protein modification) และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน ดังนั้นการทดลองนี้ทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหลังจากกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เมื่อทำการสกัดโปรตีนลูกผสมด้วยวิธีการแช่แข็ง-ละลายและวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยเจลอะคริลาไมด์ ผลการทดลองรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นได้ว่าพบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark (Ark4/1 และ Ark5/1) และ His-STK (STK4/1 และ STK5/1) เมื่อทำการกระตุ้นด้วย IPTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.7ก เลน T) แต่อยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (รูปที่ 4.7ก เลน I) โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการยืนยันแถบโปรตีนลูกผสมด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ His6X-tagged protein พบว่าไม่สามารถตรวจพบโปรตีนลูกผสม His-Ark ในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำ (รูปที่ 4.7ข เลน S) อย่างไรก็ตามการแสดงออกของโปรตีน His-STK ไม่สามารถทำการยืนยันแถบโปรตีนลูกผสมได้ด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ His6X-tagged protein (รูปที่ 4.7ข) อาจจะเป็นเนื่องด้วยการไหลดปริมาณโปรตีน His-STK น้อยเกินไปที่จะสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี western blot จากรูปที่ 4.7 สามารถสรุปได้ว่าการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK อยู่ในรูปแบบไม่ละลายน้ำเมื่อทำการกระตุ้นด้วย IPTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

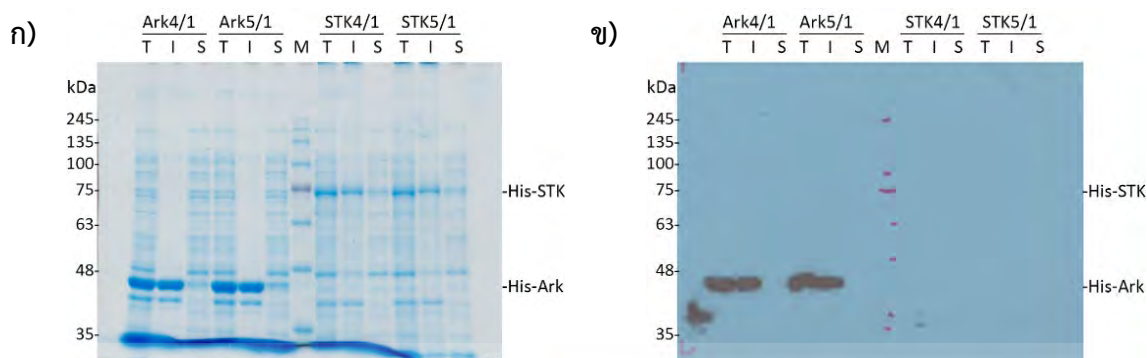
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้เพื่อการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงสภาวะการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์และวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยเจลอะคริลาไมด์ ผลการทดลองรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นได้ว่าโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK มีการแสดงออกทั้งในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำและรูปแบบละลายน้ำ (รูปที่ 4.8ก เลน I และ S ตามลำดับ) และเมื่อทำการยืนยันแถบโปรตีนลูกผสมด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ His6X-tagged protein แสดงให้เห็นแถบของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ในทั้งรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำและรูปแบบละลายน้ำ (รูปที่ 4.8ข เลน I และ S) ดังนั้นจากรูปที่ 4.8 สามารถสรุปได้ว่าการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ทำให้โปรตีนลูกผสมมีการแสดงออกอยู่ในรูปแบบละลายน้ำได้ดีขึ้นและเหมาะต่อการนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

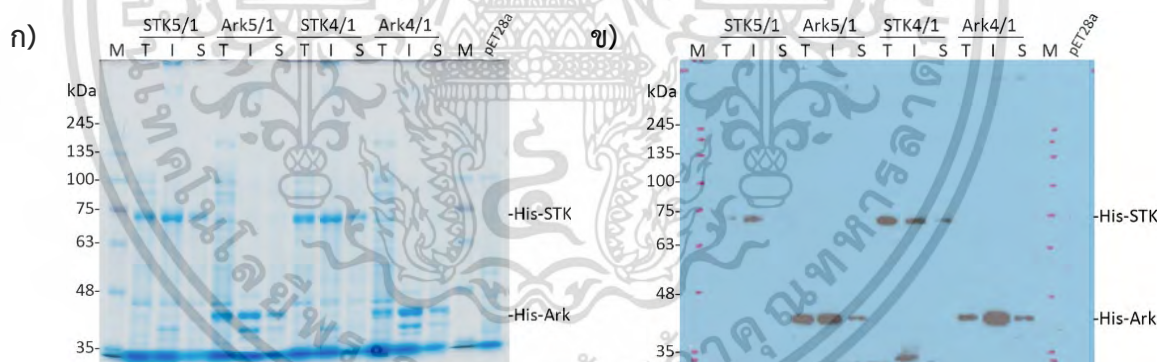


รูปที่ 4.6 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark (ก) และ His-STK (ข) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE เมื่อทำการกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนลูกผสมในเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark และ pET28-STK พบการแสดงออกของโปรตีน His-Ark และ His-STK ที่ขนาดประมาณ 40 และ 70 กิโลดาลตัน ตามลำดับ M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน BluEye prestained protein ladder I คือ เซลล์แบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG และ N คือ เซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย IPTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ก) และวิธี western blot analysis (ข) สกัดโปรตีนลูกผสมด้วยวิธีการแช่แข็ง-ละลายจากเชื้อแบคทีเรียหลังจากกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยเจลอะคริลาไมด์ M คือ แลบบรตีนมาตรฐาน BluEye prestained protein ladder T คือ โปรตีนทั้งหมด (Total protein) I คือ โปรตีนที่อยู่ในรูปแบบไม่ละลายน้ำ (insoluble protein) และ S คือ โปรตีนที่อยู่ในรูปแบบละลายน้ำได้ (soluble protein)



รูปที่ 4.8 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ก) และวิธี western blot analysis (ข) สกัดโปรตีนลูกผสมด้วยวิธีการแช่แข็ง-ละลายจากเชื้อแบคทีเรียหลังจากกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วยเจลอะคริลาไมด์ M คือ แลบบรตีนมาตรฐาน BluEye prestained protein ladder T คือ โปรตีนทั้งหมด (Total protein) I คือ โปรตีนที่อยู่ในรูปแบบไม่ละลายน้ำ (insoluble protein) และ S คือ โปรตีนที่อยู่ในรูปแบบละลายน้ำได้ (soluble protein)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้ निकเกิล (Nickel Sepharose beads)

จากความสำเร็จในการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK อยู่ในรูปแบบละลายน้ำได้ จากนั้นจึงนำโปรตีนลูกผสมดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้ในการศึกษา protein-protein interaction หลังจากผสม Nickel Sepharose beads กับสารละลายโปรตีนลูกผสม (soluble protein fraction) เป็นเวลา 6-18 ชั่วโมง ทำการล้าง beads ด้วยบัฟเฟอร์และชะล้างโปรตีนลูกผสม (eluted protein) ด้วยสารละลาย imidazole ก่อนทำการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนลูกผสมด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากผลการทดลองรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่า Nickel Sepharose beads สามารถจับได้กับ His6X-tagged protein ที่ติดอยู่บริเวณ N-terminus ของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK และสามารถทำให้โปรตีนลูกผสมมีความบริสุทธิ์มากขึ้นหลังจากชะล้างด้วยสารละลาย imidazole ความเข้มข้น 100 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (eluted protein fractions, รูปที่ 4.9 เสน E1 E2 และ E3 ตามลำดับ) จึงทำให้ไม่พบแถบโปรตีนลูกผสมในเลนโปรตีนที่เหลือหลังจากบ่มกับ bead (unbound protein, รูปที่ 4.9 เสน un) และเลนหลังจากล้าง beads ด้วยบัฟเฟอร์ (washing fraction, รูปที่ 4.9 เสน w) ดังนั้นการทดลองนี้สรุปได้ว่าโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วย Nickel Sepharose beads และเหมาะสมที่จะนำโปรตีนลูกผสมดังกล่าวไปใช้ในการศึกษาและยืนยันปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอาร์โกนีออต 4 ด้วยวิธี pull-down assay อีกด้วย



รูปที่ 4.9 การตรวจสอบโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel Sepharose beads ทำการผสม Nickel Sepharose beads กับสารละลายโปรตีนลูกผสม (input) และนำไปหมุนด้วยเครื่องแกนหมุน (rotator) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการล้าง bead ด้วยบัฟเฟอร์ก่อนทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนและวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนลูกผสมด้วยเทคนิค SDS-PAGE M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน BluEye prestained protein ladder un คือโปรตีนที่ไม่จับกับนิกเกิล beads (unbound protein) w คือ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง (washing fraction) และ E คือ โปรตีนที่ถูกชะด้วย Imimidazole (Eluted protein) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

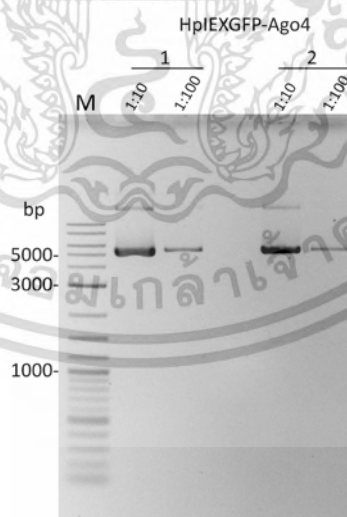
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การแสดงออกของโปรตีน PmAGO4 แบบชั่วคราว (Transient expression) ใน เซลล์แมลง

การทดลองใช้พลาสมิดที่มีส่วนของโปรโมเตอร์ (promotor sequence) ของไวรัสซึ่งสามารถทำการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 ได้ในเซลล์แมลง (Sf9 cell) โดยพลาสมิด HplEXGFP สามารถผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green fluorescent protein, GFP) ที่สามารถทำการตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent microscope) ดังนั้นเพื่อให้สะดวกในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 จึงทำการออกแบบให้มีการติดฉลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณด้านปลายเอ็น (N-terminus) ของโปรตีนอาร์โกนีออต 4

4.7.1 การเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด HplEXGFP และ HplEXGFP-Ago4

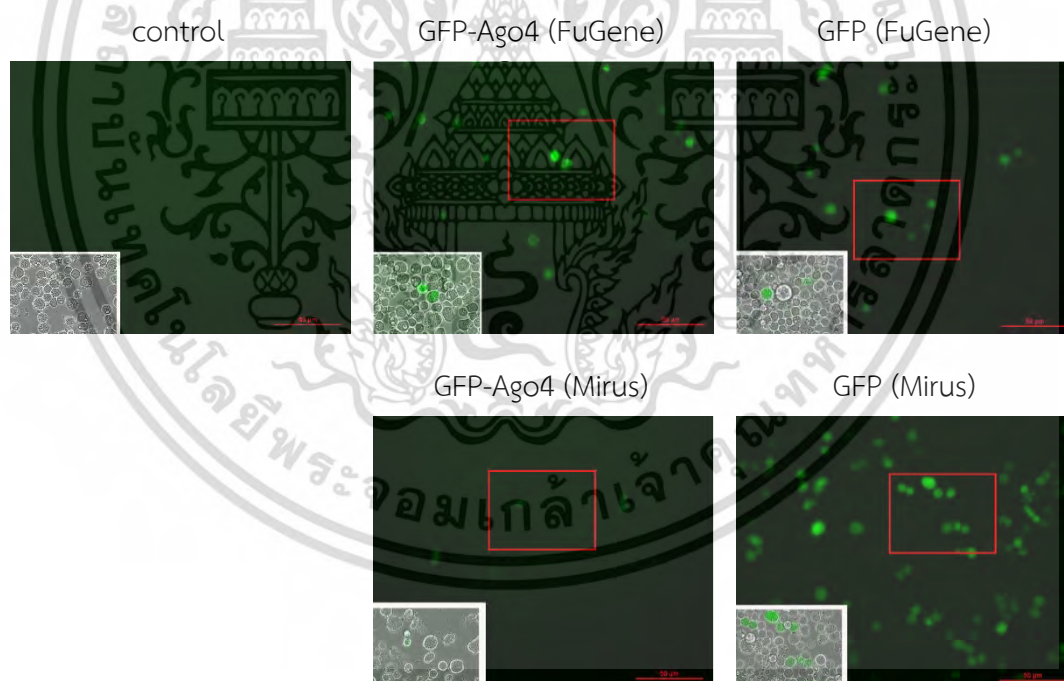
ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม HplEXGFP-Ago4 จำนวน 2 โคลนี (HplEXGFP-Ago4/1 และ Ago4/2) และสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAGEN® plasmid mini kits เมื่อทำการเจือจางพลาสมิดในอัตราส่วน 10 และ 100 เท่าก่อนทำการตรวจสอบขนาดและความสมบูรณ์ของพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากผลการทดลองรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นแถบพลาสมิดลูกผสมของทั้ง 2 ตัวอย่างมีขนาดประมาณ 5,000 คู่เบส และอยู่ในรูปร่าง (form) ที่สมบูรณ์ เมื่อวัดค่าความเข้มข้นของพลาสมิดลูกผสมทั้ง ด้วยเครื่อง Nanodrop พบว่า พลาสมิดที่ได้มีความเข้มข้น 104 และ 155 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.10 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิด HplEXGFP-Ago4 ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA ladder 100 bp plus ตัวเลข 1 และ 2 คือ พลาสมิด HplEXGFP-Ago4 ที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียโคลนีที่ 1 และ 2 และทำการเจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 10 และ 100 ตามลำดับ โดยพลาสมิด HplEXGFP-Ago4 มีขนาด 6,861 คู่เบส

4.7.2 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 ในเซลล์ Sf9

การแสดงออกของโปรตีน GFP-Ago4 แบบชั่วคราวเกิดขึ้นได้โดยการนำส่งพลาสมิดลูกผสมที่มีส่วนโปรโมเตอร์และสามารถทำการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนได้ในเซลล์ Sf9 ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ transfection reagent 2 ชนิด เพื่อนำส่งพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ Sf9 คือ TransIT[®]-Insect (Mirus) และ FuGENE[®] จากผลการทดลองรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าพบการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว GFP และโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 (จุดสีเขียว) จากเซลล์ Sf9 ที่ได้รับพลาสมิด HpIEXGFP หรือพลาสมิดลูกผสม HpIEXGFP-Ago4 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ Sf9 ควบคุม (control) หลังจากส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้การนำส่งพลาสมิดลูกผสม HpIEXGFP-Ago4 เข้าสู่เซลล์ Sf9 ด้วย FuGENE[®] มีการแสดงออกของโปรตีน GFP-Ago4 (จุดสีเขียว) มากกว่าการนำส่งพลาสมิดลูกผสมด้วย Mirus ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า transfection reagent ทั้ง 2 ชนิดสามารถนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์และมีการแสดงออกของโปรตีนได้สำเร็จ โดยที่ FuGENE[®] มีประสิทธิภาพในการนำส่งพลาสมิดลูกผสมเข้าเซลล์ Sf9 ได้ดีกว่า Mirus



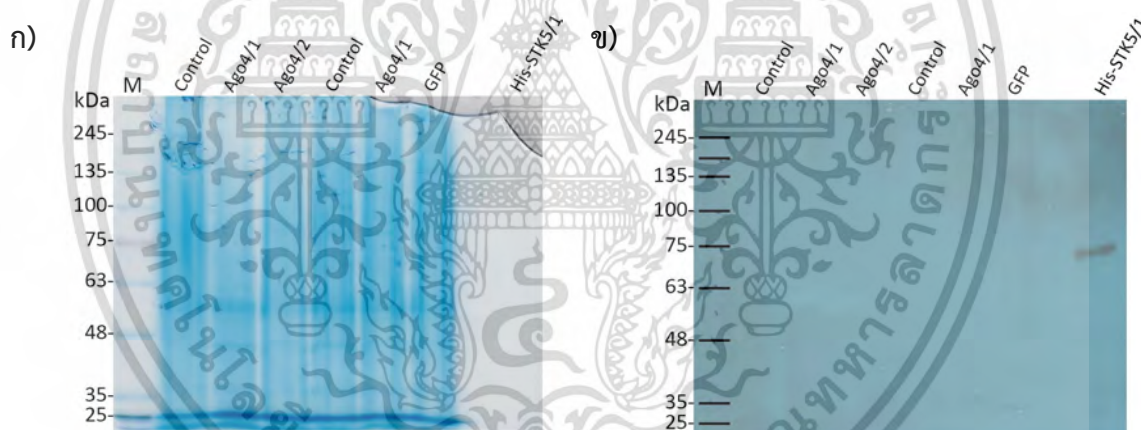
รูปที่ 4.11 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 ในเซลล์ Sf9 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ การนำพลาสมิด HpIEXGFP และ HpIEXGFP-Ago4 เข้าสู่เซลล์ Sf9 ด้วย FuGENE[®] หรือ Mirus และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงที่กำลังขยาย 10 เท่า control คือ ตัวอย่างเซลล์ Sf9 ควบคุมไม่ได้รับการนำส่งพลาสมิด GFP และ GFP-Ago4 คือ เซลล์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
Sf9 ที่ได้รับการนำส่งพลาสมิด HpIEXGFP และ HpIEXGFP-Ago4 ตามลำดับ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7.3 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GFP-Ago4 แบบชั่วคราวจากเซลล์ Sf9

เมื่อทำการเก็บเซลล์ Sf9 ที่ได้รับพลาสมิด HplEXGFP และ HplEXGFP-Ago4 จากหัวข้อ 4.7.2. มาทำตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากผลการทอกรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของโปรตีน (protein pattern) ที่สกัดได้จากเซลล์ Sf9 บนเจลอะคริลาไมด์มีลักษณะไม่ชัดเจน แถบโปรตีนมีลักษณะลากยาวตั้งแต่ต้นเลนจนถึงปลายเลน (รูปที่ 4.11ก) อาจเนื่องมาจากการใช้อัตราส่วนของสารละลาย RIPA บัฟเฟอร์ต่อปริมาณเซลล์ที่ไม่เหมาะสม อีกทั้งโหลดปริมาณโปรตีนที่มากเกินไปอาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถเห็นแถบโปรตีนได้อย่างชัดเจน และเมื่อทำการยืนยันแถบโปรตีนลูกผสมด้วยการใช้แอนติบอดีจำเพาะกับ His6X-tagged protein ที่ติดอยู่บริเวณปลาย N-terminus จากรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถตรวจพบแถบโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 ที่ขนาดประมาณ 124 กิโลดาลตันได้ แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีดังกล่าวสามารถตรวจจับกับโปรตีนลูกผสม His-STK (positive control) ได้ ดังนั้นจากผลการทดลองอาจจะสรุปได้ว่าโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 อาจมีการแสดงออกในปริมาณน้อยมาก จึงทำให้ไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีแอนติบอดีจำเพาะ



รูปที่ 4.12 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม GFP-Ago4 แบบชั่วคราวในเซลล์ Sf9 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ก) และการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ His6X-tagged protein (ข) โดยทำการสกัดโปรตีนลูกผสมจากเซลล์ Sf9 ที่ได้รับพลาสมิด HplEXGFP และ HplEXGFP-Ago4 M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน BluEye prestained protein ladder control คือ เซลล์ Sf9 ที่ไม่ได้รับพลาสมิด Ago4/1 และ Ago4/2 คือ เซลล์ Sf9 ที่ได้รับพลาสมิด HplEXGFP-Ago4 ของโคลนที่ 1 และ 2 ตามลำดับ GFP คือ เซลล์ที่ได้รับพลาสมิด HplEXGFP His-STK5/1 คือ โปรตีนลูกผสมที่แสดงออกในแบคทีเรีย (ใช้สำหรับเป็น positive control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

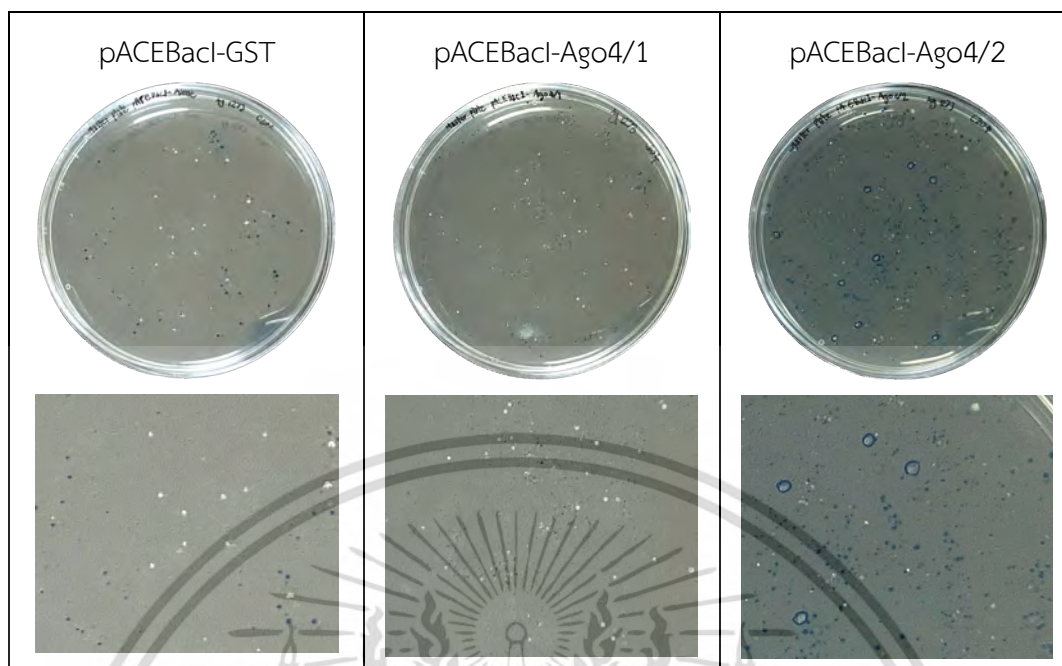
4.8 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 (GST-Ago4) ด้วยระบบ Baculovirus

การทดลองนี้ใช้พลาสมิด pACEBacI-GST-Ago4 ที่มีลำดับเบสของ Tn7R และ Tn7L ที่สามารถนำพาชิ้นส่วนของยีนอาร์โกนีออต 4 เข้าไปรวมกับจีโนม (Bacmid) ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10 เพื่อสร้าง Bacmid ลูกผสม (Recombinant bacmid) และเมื่อทำการนำส่ง Bacmid ลูกผสมเข้าไปยังเซลล์แมลง จะทำให้เกิดการสร้างแบคคิโวลไวรัสลูกผสม (Recombinant baculovirus) พร้อมกับการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 ในเซลล์แมลง อีกทั้งแบคคิโวลไวรัสลูกผสมยังสามารถผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green fluorescent protein, GFP) ซึ่งสามารถทำการตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ และเพื่อความสะดวกในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 จึงทำการออกแบบให้มีการติดฉลากด้วยโปรตีน Glutathione S transferase (GST) ที่บริเวณด้านปลายเอ็น (N-terminus) ของโปรตีนอาร์โกนีออต 4

4.8.1 การสร้างแบคมิดลูกผสม (Recombinant bacmid)

4.8.1.1 การคัดเลือกแบคมิดลูกผสมด้วยวิธีการสังเกตสีฟ้า-ขาวของโคโลนี (Blue-white colony)

เมื่อทำการนำพลาสมิด pACEBacI-GST และ pACEBacI-GST-Ago4/1 และ pACEBacI-GST-Ago4/2 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10 และทำการคัดเลือกแบคมิดลูกผสมบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็งที่ผสมยาปฏิชีวนะ gentamycin kanamycin และ tetracycline และสารละลายผสม X-gal/IPTG ผลการทดลองจากรูปที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่าสามารถพบโคโลนีสีฟ้าของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10 ซึ่งโดยปกติแล้วจีโนมแบคมิดจะมีชิ้นส่วนของยีน LacZ ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ β -galactisidase ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลาย X-gal และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าหรือน้ำเงิน และสามารถพบโคโลนีสีขาวของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10 ที่คาดว่าน่าจะมีจีโนมแบคมิดลูกผสม ซึ่งเกิดจากที่พลาสมิด pACEBacI-GST และ pACEBacI-GST-Ago4 มีส่วนของ Tn7R และ Tn7L ที่สามารถนำพาชิ้นส่วนของยีนอาร์โกนีออต 4 เข้าไปแทรกตรงบริเวณส่วนของยีน LacZ ของจีโนมแบคมิด ซึ่งทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ β -galactisidase มาทำปฏิกิริยากับ X-gal ได้ จึงทำให้แบคทีเรียที่มีแบคมิดลูกผสมจะมีโคโลนีสีขาวดังรูปที่ 4.13

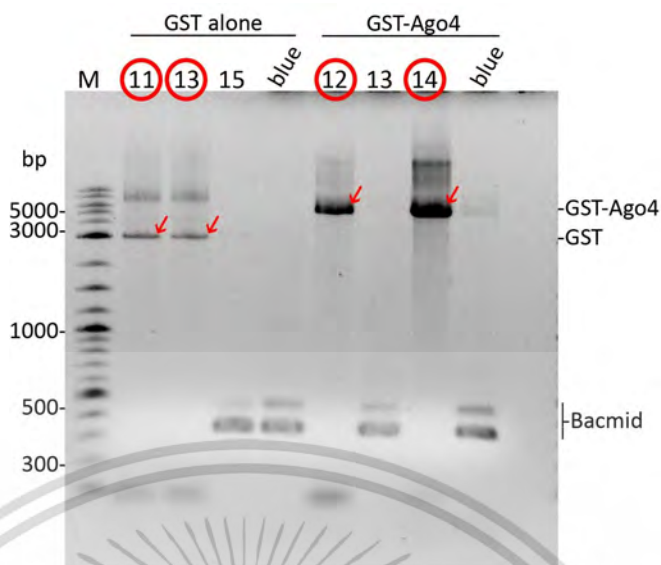


รูปที่ 4.13 การคัดเลือกแบคทีเรียผสมด้วยสีฟ้า-ขาวของโคโลนี *E. coli* สายพันธุ์ DH10 ที่ได้รับพลาสมิด pACEBacl-GST และ pACEBacl-Ago4/1 และ pACEBacl-Ago4/2

4.8.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียผสมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพื่อยืนยันการแทรกตัวของยีน GST และ GST-Ago4 ในแบคทีเรียผสม จึงทำการเพาะเลี้ยงและสกัดแบคทีเรียผสมจากโคโลนีแบคทีเรียสีขาว 3 โคโลนี และโคโลนีสีฟ้า 1 โคโลนี บนจานเพาะเชื้อต้นฉบับในหัวข้อที่ 4.8.1.1 ด้วยชุดสกัดพลาสมิด แต่เนื่องด้วยแบคทีเรียผสมที่ได้รับการนำส่งพลาสมิด pACEBacl-Ago4/1 ไม่สามารถโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ผสมยาปฏิชีวนะ gentamycin kanamycin และ tetracycline ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียผสมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เฉพาะแบคทีเรียผสมที่ได้พลาสมิด pACEBacl-GST และ pACEBacl-Ago4/2 เท่านั้น หลังจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเจลอะกาโรส ผลการทดลองรูปที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่าสามารถพบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส จากแบคทีเรียผสมที่ได้รับพลาสมิด pACEBacl-GST หมายเลข 11 และ 13 ในขณะที่แบคทีเรียผสมที่ได้รับพลาสมิด pACEBacl-Ago4/2 หมายเลข 12 และ 14 จะพบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 6,000 คู่เบส นอกจากนั้นแบคทีเรียผสมที่ได้รับพลาสมิด pACEBacl-GST หมายเลข 15 และแบคทีเรียผสมที่ได้รับพลาสมิด pACEBacl-Ago4/2 หมายเลข 13 ให้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ขนาดประมาณ 300-500 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากโคโลนีสีฟ้า (negative control) ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรียผสม GST-alone หมายเลข 11 และ 13 และแบคทีเรียผสม GST-Ago4 หมายเลข 12 และ 14 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน GST และ GST-Ago4 แทรกอยู่ในจีโนมตามลำดับ จากนั้นจึงเลือกแบคทีเรียโคโลนีดังกล่าวมาเข้าเซลล์ Sf9 เพื่อผลิตไวรัสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ไปนอกระบบงานวิชาการโดยไม่ขออนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



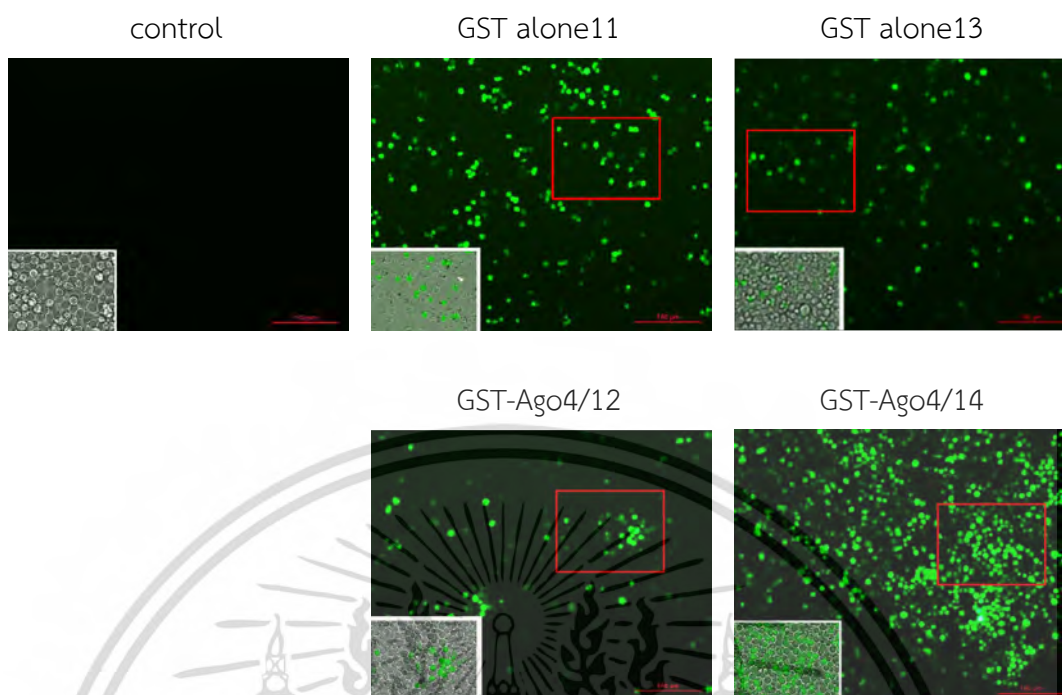
รูปที่ 4.14 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียจากโคลนด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการสกัดแบคทีเรียจากโคลนจำนวน 3 โคลน ที่ได้รับพลาสมิด pACEBacl-GST และ pACEBacl-GST-Ago4 และทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนบริเวณ insert M คือ แอปดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-log DNA ladder (0.1-10.0 kb) ตัวเลข 11 13 และ 15 คือ แบคทีเรียจากโคลนนี้สีขาวของ pACEBacl-GST ตัวเลข 12 13 และ 14 คือ แบคทีเรียจากโคลนนี้สีขาวของ pACEBacl-GST-Ago4 ลูกศรสีแดงคือแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คาดว่ามีส่วนของยีน GST หรือ GST-Ago4 วงกลมสีแดงคือแบคทีเรียจากโคลนนี้สีขาวของแบคทีเรียที่เลือกไปนำส่งเข้าเซลล์ Sf9 blue คือแบคทีเรียจากโคลนนี้สีขาวของแบคทีเรียที่เรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10

4.8.2 การสร้าง Baculovirus ลูกผสม

เพื่อทำการแสดงออกโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีออต 4 (GST-Ago4) ในเซลล์ Sf9 ทำการนำส่งแบคทีเรียจากโคลนที่คัดเลือกแล้ว จำนวน 2 โคลน (โคลน GST หมายเลข 11 และ 13 และ โคลน GST-Ago4 หมายเลข 12 และ 14) เข้าเซลล์ Sf9 ด้วย transfection reagent FuGENE[®] จากผลการทดลองรูปที่ 4.15 พบว่าสามารถเห็นการแสดงออกของ baculovirus ลูกผสมที่ติดโปรตีนเรืองแสงสีเขียว GFP (จุดสีเขียว) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์จากทั้งเซลล์ Sf9 ที่ได้รับแบคทีเรียจากโคลน GST-alone และแบคทีเรียจากโคลน GST-Ago4 เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (control) ที่ไม่ได้รับแบคทีเรียจากโคลน ดังนั้นการทดลองนี้ สรุปได้ว่าสามารถนำส่งแบคทีเรียจากโคลนเข้าสู่เซลล์ Sf9 ได้สำเร็จ และมีการผลิต baculovirus ลูกผสม ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้เองในเซลล์ จากนั้นทำการแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมี baculovirus ลูกผสม (P0) ใส่ในหลอดทดลองและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เพื่อทำการเพิ่มจำนวน baculovirus ลูกผสม (P1) ต่อไป และทำการเก็บเซลล์ Sf9 เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GST และ GST-Ago4 ในขั้นตอนต่อไปอีกด้วย

ไม่ว่าการณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม GST-Ago4 ในเซลล์ Sf9 ด้วยระบบแบคทีริโอไลไวรัส การนำส่งแบคทีเรียผสมเข้าสู่เซลล์ Sf9 ด้วย FuGENE® และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงของ baculovirus ลูกผสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 10 เท่า control คือ ตัวอย่างเซลล์ Sf9 ควบคุม ไม่ได้รับการนำส่งแบคทีเรียผสม GST alone 11 และ GST alone 13 คือ เซลล์ Sf9 ที่ได้รับแบคทีเรียผสมที่มียืน GST GST-Ago4/12 และ GST-Ago4/14 คือ เซลล์ Sf9 ที่ได้รับแบคทีเรียผสมที่มียืน GST-Ago4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

เพื่อศึกษาและยืนยันปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนอาร์โกนีต 4 และ Serine/Threonine protein kinase (STK) หรือ Arginine kinase (Ark) จึงทำการสร้างโปรตีนลูกผสมที่บริสุทธิ์เพื่อนำมาทดสอบการปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนดังกล่าวในหลอดทดลอง จากการทดลองสามารถทำการเพิ่มจำนวนขึ้นยืน Ark ขนาด 1,071 คู่เบส และ STK ขนาด 1,851 คู่เบส จากซีดีเอ็นเอของกิ้งกูด้า ก่อนนำมาสร้างพลาสมิดลูกผสม pET28-Ark และ pET28-STK ได้สำเร็จ เมื่อนำพลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ที่อยู่ในรูปแบบละลายได้ด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่ 18 องศาเซลเซียส และทำให้โปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK บริสุทธิ์ได้ด้วยการใช้ निकเกล (Ni²⁺ Sepharose beads) เมื่อชะล้างด้วยสารละลาย imidazole ความเข้มข้น 100-300 มิลลิโมลาร์

ด้านการผลิตโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีต 4 แบบชั่วคราว (Transient expression) ในเซลล์แมลงโดยใช้พลาสมิด HpiEXGFP-Ago4 เมื่อทำการนำส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วย transfection reagent 2 ชนิด คือ Mirus และ FuGENE[®] พบว่าสามารถนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์และมีการแสดงออกของโปรตีน GFP-Ago4 ได้สำเร็จภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ โดยที่ FuGENE[®] มีประสิทธิภาพในการนำส่งพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ Sf9 ได้ดีกว่า Mirus แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบโปรตีนดังกล่าวได้ด้วยวิธีการใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อ His6X-tagged protein

นอกจากนี้ยังได้ทำการผลิตโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีต 4 ด้วยระบบแบคทีโอโลไวรัส (Baculovirus system) จากการทดลองสามารถสร้างแบคทีโอโลไวรัสแบบคิมิตลูกผสม GST-alone และแบคทีโอโลไวรัสแบบคิมิตลูกผสม GST-Ago4 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน GST และ GST-Ago4 แทรกอยู่ในจีโนมได้สำเร็จ และเมื่อนำส่งแบคทีโอโลไวรัสดังกล่าวเข้าสู่เซลล์แมลง สามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของแบคทีโอโลไวรัสลูกผสม (Recombinant baculovirus) ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นเก็บเซลล์ Sf9 เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GST และ GST-Ago4 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไป ในส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมี Baculovirus ลูกผสม (P0) ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเพิ่มจำนวน Baculovirus ลูกผสม (P1) และกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนีต 4 ในครั้งต่อไป

จากงานวิจัยนี้สามารถผลิตโปรตีนลูกผสม His-Ark และ His-STK ที่บริสุทธิ์และเหมาะสมต่อ
เอกสารนี้เป็นการนำไปใช้ทดสอบการปฏิสัมพันธ์ในหลอดทดลอง ในขณะที่การสร้างโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีต 4
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเซลล์แมลงยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติม เมื่อทำการสร้างโปรตีนลูกผสมอาร์โกนีต 4 และทำให้บริสุทธิ์ได้สำเร็จจะทำการทดสอบการปฏิสัมพันธ์ระหว่างอาร์โกนีต 4 และโปรตีน His-Ark หรือ His-STK ในหลอดทดลองต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของโปรตีน GFP-Ago4 ด้วยวิธีแบบชั่วคราว โดยการหาปริมาณพลาสมิด HplEXGFP-Ago4 ที่เหมาะสมในการนำส่งที่ให้ได้ประสิทธิภาพการนำส่งมากกว่า 80 % จากเซลล์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์
2. เพื่อให้สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนอาร์โกนีต 4 ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ His6X-tagged protein ได้ ควรเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการตรวจสอบให้มากขึ้น หรือเปลี่ยนไปใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GFP-tagged protein แทน
3. เมื่อทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีน GST-Ago4 ในเซลล์ Sf9 ด้วยแบคทีเรียไวรัสลูกผสม (Recombinant baculovirus) และทำให้บริสุทธิ์ได้แล้ว ควรทดสอบการปฏิสัมพันธ์ระหว่างอาร์โกนีต 4 และโปรตีน His-Ark หรือ His-STK ในหลอดทดลองต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2565. ฟอพันธุ์และแม่พันธุ์ (Broodstock). คลังข้อมูลสารสนเทศระดับภูมิภาค (ภาคใต้), ออนไลน์, เข้าถึงได้จาก <https://www.arda.or.th/kasetinfo/south/shrimp/controller/01-02.php>.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554-2564. สถิติการส่งออก หมวดสินค้ากุ้ง

Adams, B.D., Claffey, K.P. and White, B.A., 2009. Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. *Endocrinology* 150, 14-23.

Antelo, M., Balaguer, F., Shia, J., Shen, Y., Hur, K., Moreira, L., Cuatrecasas, M., Bujanda, L., Giraldez, M.D., Takahashi, M., Cabanne, A., Barugel, M.E., Arnold, M., Roca, E.L., Andreu, M., Castellvi-Bel, S., Llor, X., Jover, R., Castells, A., Boland, C.R. and Goel, A., 2012. A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLOS ONE* 7, e45357.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

Binder, M., Mahler, V., Hayek, B., Sperr, W.R., Schöller, M., Prozell, S., Wiedermann, G., Valent, P., Valenta, R. and Duchêne, M., 2001. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the indian meal moth, *plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen1. *The Journal of Immunology* 167, 5470-5477.

Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. and Benning, C., 1998. *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *The EMBO Journal* 17, 170-180.

Burt, A. and Trivers, R., 2006. Selfish genetic elements, *Genes in Conflict*. Harvard University Press, pp. 1-18.

Carmell, M.A., Girard, A., Van de Kant, H.J.G., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G. and Hannon, G.J., 2007. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Developmental Cell* 12, 503-514.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Carreira, P.E., Richardson, S.R. and Faulkner, G.J., 2014. L1 retrotransposons, cancer stem cells and oncogenesis. *The FEBS Journal* 281, 63-73.
- Casse, N., Bui, Q.T., Nicolas, V., Renault, S., Bigot, Y. and Laulier, M., 2006. Species sympatry and horizontal transfers of Mariner transposons in marine crustacean genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40, 609-619.
- Chen, Y.-H., Jia, X.-T., Zhao, L., Li, C.-Z., Zhang, S., Chen, Y.-G., Weng, S.-P. and He, J.-G., 2011. Identification and functional characterization of Dicer2 and five single VWC domain proteins of *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* 35, 661-671.
- Contreras, E.F., Criscitiello, M.F., Brieba, L.G., Rudiño-Piñera, E. and Sotelo-Mundo, R.R., 2013. Crystal structure of shrimp arginine kinase in binary complex with arginine - a molecular view of the phosphagen precursor binding to the enzyme. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 45, 511-518.
- Cox, D.N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D. and Lin, H., 1998. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes & Development* 12, 3715-3727.
- Cox, D.N., Chao, A. and Lin, H., 2000. Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* 127, 503-514.
- Dechklar, M., Udomkit, A. and Panyim, S., 2008. Characterization of Argonaute cDNA from *Penaeus monodon* and implication of its role in RNA interference. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367, 768-774.
- Deininger, P.L. and Batzer, M.A., 1999. Alu repeats and human disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 67, 183-193.
- Ding, S.-W., Li, H., Lu, R., Li, F. and Li, W.X., 2004. RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Research* 102, 109-115.
- Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H. and Zhang, X., 2013. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chemical Reviews* 113, 6207-6233.
- Duda Jr, T.F. and Palumbi, S.R., 1999. Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. *Marine Biology* 134, 705-710.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Duharcourt, S., Lepère, G. and Meyer, E., 2009. Developmental genome rearrangements in ciliates: a natural genomic subtraction mediated by non-coding transcripts. *Trends in Genetics* 25, 344-350.
- FAO, 2006. Fishery and aquaculture statistics. FAO year book
- Feschotte, C., Zhang, X. and Wessler, S.R., 2007. Miniature inverted-repeat transposable elements and their relationship to established DNA transposons, *Mobile DNA II*, pp. 1145-1158.
- Fuhrmann, J., Schmidt, A., Spiess, S., Lehner, A., Turgay, K., Mechtler, K., Charpentier, E. and Clausen, T., 2009. McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. *Science* 324, 1323-1327.
- García-Orozco, K.D., Aispuro-Hernández, E., Yepiz-Plascencia, G., Calderón-de-la-Barca, A.M. and Sotelo-Mundo, R.R., 2007. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Archives of Allergy and Immunology* 144, 23-28.
- Ghildiyal, M. and Zamore, P.D., 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 10, 94-108.
- Gibbins, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P. and Voinnet, O., 2012. Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nature Cell Biology* 14, 1314-1321.
- Gu, W., Shirayama, M., Conte, D., Vasale, J., Batista, P.J., Claycomb, J.M., Moresco, J.J., Youngman, E.M., Keys, J., Stoltz, M.J., Chen, C.-C.G., Chaves, D.A., Duan, S., Kasschau, K.D., Fahlgren, N., Yates, J.R., Mitani, S., Carrington, J.C. and Mello, C.C., 2009. Distinct Argonaute-mediated 22G-RNA pathways direct genome surveillance in the *C. elegans* germline. *Molecular Cell* 36, 231-244.
- Hammell, C.M., Lubin, I., Boag, P.R., Blackwell, T.K. and Ambros, V., 2009. *nhl-2* modulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 136, 926-938.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T. and Kim, V.N., 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.
- Ho, T., Panyim, S. and Udomkit, A., 2021. Assessment of the function of gonad-specific *PmAgo4* in viral replication and spermatogenesis in *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology* 114, 103824.

- Horwich, M.D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P. and Zamore, P.D., 2007. The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Current Biology* 17, 1265-1272.
- Kang, L., Shi, H., Liu, X., Zhang, C., Yao, Q., Wang, Y., Chang, C., Shi, J., Cao, J., Kong, J. and Chen, K., 2011. Arginine kinase is highly expressed in a resistant strain of silkworm (*Bombyx mori*, Lepidoptera): Implication of its role in resistance to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 158, 230-234.
- Koyama, T., Kondo, H., Aoki, T. and Hirono, I., 2013. Identification of two penelope-like elements with different structures and chromosome localization in kuruma shrimp genome. *Marine Biotechnology* 15, 115-123.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., Hata, K., Li, E., Matsuda, Y., Kimura, T., Okabe, M., Sakaki, Y., Sasaki, H. and Nakano, T., 2008. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MIL1 and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes & Development* 22, 908-917.
- Lamprecht, B., Bonifer, C. and Mathas, S., 2010. Repeat element-driven activation of proto-oncogenes in human malignancies. *Cell Cycle* 9, 4276-4281.
- Law, J.A. and Jacobsen, S.E., 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* 11, 204-220.
- Leebonoi, W., Sukthaworn, S., Panyim, S. and Udomkit, A., 2015. A novel gonad-specific Argonaute 4 serves as a defense against transposons in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 42, 280-288.
- Leung, Anthony K.L., Vyas, S., Rood, Jennifer E., Bhutkar, A., Sharp, Phillip A. and Chang, P., 2011. Poly (ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Molecular Cell* 42, 489-499.
- Liu, T. and Wang, X., 2010. Zinc induces unfolding and aggregation of dimeric arginine kinase by trapping reversible unfolding intermediate. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 42, 779.

López-Zavala, A.A., García-Orozco, K.D., Carrasco-Miranda, J.S., Sugich-Miranda, R., Velázquez-Contreras, E.F., Criscitiello, M.F., Brieba, L.G., Rudiño-Piñera, E. and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sotelo-Mundo, R.R., 2013. Crystal structure of shrimp arginine kinase in binary complex with arginine - a molecular view of the phosphagen precursor binding to the enzyme. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 45, 511-518.
- Mao, H.-Y., Cao, M.-J., Maleki, S.J., Cai, Q.-F., Su, W.-J., Yang, Y. and Liu, G.-M., 2013. Structural characterization and IgE epitope analysis of arginine kinase from *Scylla paramamosain*. *Molecular Immunology* 56, 463-470.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G., 2002. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & Development* 16, 720-728.
- Munoz-Lopez, M. and Garcia-Perez, L.J., 2010. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Current Genomics* 11, 115-128.
- Naqvi, A.R., Islam, M.N., Choudhury, N.R. and Haq, Q.M.R., 2009. The fascinating world of RNA interference. *International Journal of Biological Sciences* 5, 97-117.
- Onishi, R., Yamanaka, S. and Siomi, M.C., 2021. piRNA- and siRNA-mediated transcriptional repression in *Drosophila*, mice, and yeast: new insights and biodiversity. *EMBO reports* 22, e53062.
- Peng, J. and Shi, Y., 2008. Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* 455, 421-424.
- Phetrungnapha, A., Ho, T., Udomkit, A., Panyim, S. and Ongvarrasopone, C., 2013. Molecular cloning and functional characterization of Argonaute-3 gene from *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 35, 874-882.
- Phetrungnapha, A. and Thammason, R., 2015. Cloning and characterization of the Argonaute-1 gene from *Macrobrachium rosenbergii*. *NU. International Journal of Science* 12, 39-49.
- Piednoël, M., Donnart, T., Esnault, C., Graça, P., Higuete, D. and Bonnivard, E., 2013. LTR-retrotransposons in *R. exoculata* and other crustaceans: the outstanding success of GalEa-like Copia elements. *PLOS ONE* 8, e57675.
- Plasterk, R.H.A., Izsvák, Z. and Ivics, Z., 1999. Resident aliens: the Tc1 mariner superfamily of transposable elements. *Trends in Genetics* 15, 326-332.
- Qi, H.H., Ongusaha, P.P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S.W., Peng, J. and Shi, Y., 2008. Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* 455, 421-424.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญาดให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Rauch, J., Volinsky, N., Romano, D. and Kolch, W., 2011. The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Communication and Signaling* 9, 23.
- Roskoski, R., 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66, 105-143.
- Rüdel, S., Wang, Y., Lenobel, R., Körner, R., Hsiao, H.-H., Urlaub, H., Patel, D. and Meister, G., 2010. Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic Acids Research* 39, 2330-2343.
- Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E.A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D. and Wulczyn, F.G., 2009. The let-7 target gene mouse *lin-41* is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nature Cell Biology* 11, 1411-1420.
- Schwamborn, J.C., Berezikov, E. and Knoblich, J.A., 2009. The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* 136, 913-925.
- Slotkin, R.K. and Martienssen, R., 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics* 8, 272-285.
- Sukthaworn, S., Panyim, S. and Udomkit, A., 2019. Functional characterization of a cDNA encoding Piwi protein in *Penaeus monodon* and its potential roles in controlling transposon expression and spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 229, 60-68.
- Takai, D., Yagi, Y., Habib, N., Sugimura, T. and Ushijima, T., 2000. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 30, 306-309.
- Tian, Y., Simanshu, D.K., Ma, J.-B. and Patel, D.J., 2011. Structural basis for piRNA 2'-O-methylated 3'-end recognition by Piwi PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 903-910.
- Ubersax, J.A. and Ferrell Jr, J.E., 2007. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 530-541.
- Unajak, S., Boonsaeng, V. and Jitrapakdee, S., 2006. Isolation and characterization of cDNA encoding Argonaute, a component of RNA silencing in shrimp (*Penaeus monodon*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 145, 179-187.

- Van Rij, R.P., Saleh, M.-C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C. and Andino, R., 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* 20, 2985-2995.
- Yang, L., Li, X., Jiang, S., Qiu, L., Zhou, F., Liu, W. and Jiang, S., 2014. Characterization of Argonaute2 gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and its responses to immune challenges. *Fish & Shellfish Immunology* 36, 261-269.
- Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.-C.G., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J. and Mello, C.C., 2006. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 127, 747-757.
- Yu, C.-J., Lin, Y.-F., Chiang, B.-L. and Chow, L.-P., 2003. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *The Journal of Immunology* 170, 445-453.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X. and Graves, Paul R., 2008. Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochemical Journal* 413, 429-436.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria-Bertani broth (LB broth)

0.5% w/v NaCl	5.0	กรัม
0.5% w/v Yeast extract	5.0	กรัม
1.0% w/v Peptone	10.0	กรัม

2. Luria-Bertani agar (LB agar)

0.5% w/v NaCl	5.0	กรัม
0.5% w/v Yeast extract	5.0	กรัม
1.0% w/v Peptone	10.0	กรัม
1.5% w/v Agar	15.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. 10% APS (1 มิลลิลิตร)

APS	0.1	กรัม
H ₂ O	1	มิลลิลิตร

2. 10% SDS

SDS	10	กรัม
H ₂ O	100	มิลลิลิตร

3. 10x Running Buffer

SDS	10.0	กรัม
Tris Base	30.3	กรัม
Glycine	144	กรัม
H ₂ O	1,000	มิลลิลิตร

4. 1M Tris-HCl pH 8.8

Tris Base	121.14	กรัม
H ₂ O	800	มิลลิลิตร
ปรับเป็น pH 8.8 ด้วย HCl		

5. 1M Tris-HCl pH 6.8

Tris Base	60.57	กรัม
H ₂ O	400	มิลลิลิตร
ปรับเป็น pH 6.8 ด้วย HCl		

7. Lysis Buffer

Stock	Final concentration	
500 mM Imidazole	5	mM
1M Tris-HCl pH 8.8	20	mM
2M NaCl	500	mM
Triton X-100	0.2%	
Glycerol	10%	
100 mM PMSF	2	mM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Transfer Buffer

Tris Base	5.80	กรัม
Glycine	2.90	กรัม
SDS	0.37	กรัม
H ₂ O	800	มิลลิลิตร
Methanol	200	มิลลิลิตร

9. 1x PBS + 0.1% tween

10x PBS	50	มิลลิลิตร
H ₂ O	450	มิลลิลิตร
0.1% tween	0.50	มิลลิลิตร

10. Lysis Buffer for GST (buffer A)

Stock	Final concentration	
1M Tris-HCl pH8.8	20	mM
0.5M EDTA	2.0	mM
2M NaCl	1.0	mM
1M DTT	2.0	mM

11. Elution Buffer

Stock	Final concentration	
10x PBS	1X	
1M Tris pH8.0	50	mM
Reduced Glutathione	30	mM

12. 10X PBS Recipe (pH 7.4)

1.37 M NaCl	8.0	กรัม
27 mM KCl	0.2	กรัม
1 M Na ₂ HPO ₄	1.44	กรัม
20 mM KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม
H ₂ O	500	มิลลิลิตร
ปรับเป็น pH 7.4 ด้วย HCl		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. 70% Ethanol

เตรียมได้จากเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยการเตรียมเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้คำนวณดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\
 95\% \times V_1 &= 70\% \times 1,000 \text{ มิลลิลิตร} \\
 V_1 &= 736.842 \text{ มิลลิลิตร} \\
 &\approx 737 \text{ มิลลิลิตร}
 \end{aligned}$$

วิธีการเตรียม

ผสมเอทานอลความเข้มข้น 95% ปริมาตร 737 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 263 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน

14. 10X TAE buffer

Tris Base	48.5	กรัม
Acetic acid	11.40	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0	20.0	มิลลิลิตร

15. 10X TBE buffer

Tris Base	108	กรัม
Boric acid	55.0	กรัม
Double-distilled H ₂ O	900	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH8.0	40.0	มิลลิลิตร

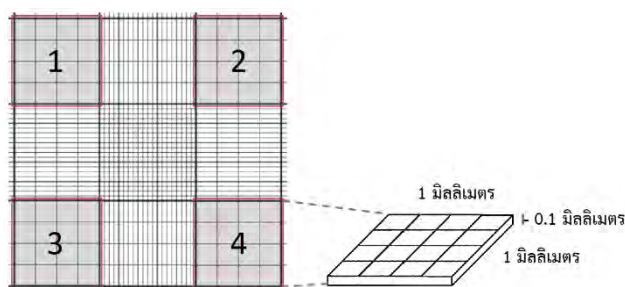
16. 1X laemmlli sample buffer

2X laemmlli sample buffer	475	ไมโครลิตร
β-mercaptoethanol	25.0	ไมโครลิตร
H ₂ O	500	ไมโครลิตร

17. การนับเซลล์แมลง

โดยการย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย Trypan Blue ความเข้มข้น 0.4% ซึ่งเซลล์ที่ตายหรือผนังเซลล์เสียหายจะติดสีน้ำเงิน และเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถขับสีออกจากเซลล์ได้เห็นเป็นสีใส โดยเจือจางเซลล์แขวนลอยอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ด้วย สารละลาย Trypan Blue ความเข้มข้น 0.4% และตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 5 นาที ก่อนนำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) ทำการนับจำนวนเซลล์จากสไลด์ 4 ช่องตั้งภาพประกอบ และหาค่าเฉลี่ยของเซลล์ เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพแสดงสไลด์นับเซลล์ หรือ Hemocytometer พร้อมปริมาตรและจำนวนช่องที่นับเซลล์

ปริมาตรของสไลด์นับเซลล์ต่อช่อง (กว้าง x ยาว x สูง) = 1 มม. x 1 มม. x 0.1 มม. = 0.1 ลบ.มม.³

แปลงหน่วยปริมาตร 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ลบ.มม.³) = 10⁻⁴ มิลลิลิตร

ดังนั้นคำนวณจำนวนเซลล์ดังนี้

$$\frac{(\text{จำนวนเซลล์จาก 4 ช่อง}) \times \text{ค่าระดับการเจือจาง} \times 10^4 \text{ มิลลิลิตร}}{4 \text{ ช่อง}} = \text{จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร}$$

ยกตัวอย่าง นับเซลล์จาก 4 ช่อง ได้จำนวน ดังนี้ 48+50+52+46 = 196

$$\frac{196 \times 10 \times 10^4}{4} = 49 \times 10^5 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร}$$

ในการทดลองใช้เซลล์ 1 x 10⁶ เซลล์ต่อหลุม ของ 6-well plate

ดังนั้น 1 หลุม ต้องใช้เซลล์

$$\frac{1 \times 10^6 \text{ เซลล์}}{49 \times 10^5 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร}} = 0.204 \text{ มิลลิลิตร}$$

ในการทดลองใช้อาหาร Sf-900 II SFM ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อหลุม ของ 6-well plate

ดังนั้น 1 หลุม ต้องใช้อาหาร 3 - 0.204 มิลลิลิตร = 2.796 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 20 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2565

ข้าพเจ้า นางสาวศศินิภา นิลพันธ์ รหัสประจำตัว 62050651

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา
ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การศึกษาลักษณะหน้าที่ของโปรตีนร่วมทำงานกับโปรตีนอาร์โกนีออต 4 (*PmAGO4*)
ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

ชื่อภาษาอังกฤษ Functional study of Argonaute 4 (*PmAGO4*) interacting proteins in
spermatogenesis of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยของข้าพเจ้าแต่เพียงผู้เดียวโดยมิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการ
ตรวจสอบความซ้ำซ้อนโดยใช้โปรแกรมเรียบร้อยแล้วและได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียน
งานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์แล้วโปรแกรมอักษราวิสูทธิ์ 0.16 %

ลงชื่อ.....ศศินิภา นิลพันธ์.....

(นางสาวศศินิภา นิลพันธ์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วิภาวี เดชตติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษาได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษา
ข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็น
หลักฐาน

ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.วิภาวี เดชตติศักดิ์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต
อาจารย์ที่ปรึกษา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้