การศึกษาการแสดงออกของยีน SNAREs ที่ส่งเสริมการหลั่งโปรตีนในรา *Aspergillus oryzae*

Studying the SNAREs for protein secretion in *Aspergillus oryzae*

ณัฏฐ์ณริณ รัชญน์ธนโชติ

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDYING THE SNARES FOR PROTEIN SECRETION IN *ASPERGILLUS ORYZAE*

NATNARIN RATTHANACHOT

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT’S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาการแสดงออกของยีน SNAREs ที่ส่งเสริมการหลั่งโปรตีนในรา *Aspergillus oryzae* Studying the SNAREs for protein secretion in *Aspergillus oryzae*
ชื่อนักศึกษา	ณัฏฐ์ณริณ รัชญน์ธนโชติ รหัสนักศึกษา 63050386
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.อิงครัต กิ่งแก้ว

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. ชนิกุล ชูตระกูร ประธานกรรมการ	
คุณสโรชา ปัญจนวพร กรรมการ	สโรชา ปัญจนวพร
ดร.อิงครัต กิ่งแก้ว กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	อิงครัต กิ่งแก้ว

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาการแสดงออกของยีน SNAREs ที่ส่งเสริมการหลั่งโปรตีนในรา *Aspergillus oryzae*
ชื่อนักศึกษา	ณัฏฐ์ณริณ รัชญน์ธนโชติ รหัสนักศึกษา 63050386
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.อิงครัต กิ่งแก้ว

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein) ได้รับความสนใจอย่างมากในอุตสาหกรรมต่างๆ เพราะมีความแม่นยำสูง ควบคุมการผลิตได้ อีกทั้งไม่ขึ้นกับฤดูกาล การใช้ราเส้นใย *Aspergillus oryzae* เป็นโฮสต์ในการผลิตโปรตีนลูกผสม เนื่องจากราเส้นใยดังกล่าวมีความปลอดภัย สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ทนต่อสภาวะที่รุนแรงได้ ใช้สับสเตรทได้หลากหลาย มีระบบ post translation ที่มีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามการหลั่งโปรตีนลูกผสมออกนอกเซลล์ราเจ้าบ้านยังมีข้อจำกัดอยู่ กระบวนการของยีน SNAREs ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนรีเซ็บเตอร์บนโปรตีน vesicle ในกระบวนการขนส่งโปรตีน (protein trafficking) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการฟิวชันเมนเบรนในเซลล์ ซึ่งมีการแสดงออกในหลายออร์แกเนลล์ ได้แก่ endoplasmic reticulum (ER), Golgi apparatus (GA), plasma membrane (PM) และ vesicle จะสามารถส่งเสริมการหลั่งโปรตีนได้ ดังนั้นในการศึกษานี้ได้เพิ่มการแสดงออกของยีน SNAREs ทั้งหมด 2 กลุ่ม ที่ความจำเพาะในออร์แกเนลล์ GA ได้แก่ SNARE 1, SNARE 2 และ SNARE 3 และใน PM ได้แก่ SNARE 4, SNARE 5, และ SNARE 6 โดยใช้โปรตีนเรืองแสงสีเขียวชนิด GFP เป็นโปรตีนรายงานผล เมื่อทำการประเมินการหลั่งโปรตีนเรืองแสงสีเขียวออกนอกเซลล์โดยการวัดค่าการเรืองแสง (fluorescent intensity, FI) พบว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีน SNAREs ชนิด SNARE 4 สามารถเพิ่มการหลั่งโปรตีนได้ 30% เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่มีการเพิ่มยีน SNAREs ลำดับรองลงมาได้แก่ SNARE 6 และ SNARE 3 ซึ่งเพิ่มการหลั่ง 20% และ 6% ตามลำดับซึ่งผลของการศึกษานี้สามารถคัดเลือกยีน SNAREs ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปพัฒนาการผลิตโปรตีนลูกผสมชนิดอื่นๆ ได้ในอนาคต

คำสำคัญ : โปรตีนลูกผสม (Recombinant protein), *Aspergillus oryzae,* SNAREs, GFP, การหลั่งโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Studying the SNARES for protein secretion in *Aspergillus oryzae*
Students	Miss Natnarin Ratthanachot Student ID 63050386
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Dr. Engkarat Kingkaew

Abstract

Nowadays, the microorganisms have been utilized for recombinant protein production in the industry. Because of high accuracy, easy to control the production and not related to the season. Using *Aspergillus oryzae* as hosts to produce the recombinant protein due to safety, rapid growth, living in extreme environmental conditions, using various substrates, and having an efficient post-translation system. Nevertheless, the secretion of recombinant protein outside the host fungi cell is also a limitation. SNAREs gene process is related to receptor proteins in vesicle proteins in the protein trafficking process and related to the membrane fusion process, which is expressed in many organelles including endoplasmic reticulum (ER), Golgi apparatus (GA), plasma membrane (PM) and vesicle. These components can promote protein secretion. Thus, in this study, we study about overexpression of SNARE protein that specific in the Golgi apparatus, namely SNARE 1, SNARE 2 SNARE 3 and the Plasma membrane, namely SNARE 4, SNARE 5 and SNARE 6. Using GFP protein as the reporter protein to evaluate the protein. The GFP protein secretion was assessed by measuring the fluorescent intensity (FI). We found that the over-expression of SNARE 4 gene can increase protein secretion by 30% when compared with the strain without increasing the SNARE gene. Followed by SNARE 3 and SNARE 6 which increase protein secretion at 20% and 6%. From this study, we can select effective SNARE gene to enhance other recombinant protein productions in the future.

Keywords: Recombinant protein, *Aspergillus oryzae*, SNAREs, GFP, Protein secretion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัย เรื่อง “การศึกษาการแสดงออกของยีน SNAREs ที่ส่งเสริมการหลั่งโปรตีนในรา *Aspergillus oryzae*”สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและคำแนะอย่างดียิ่งจากผู้ให้คำปรึกษาสหกิจคือคุณคุณสโรชา ปัญจนวพร ทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวกระบวนการอุตสาหกรรม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ความรู้และคำปรึกษา ตลอดจนการตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง จนรายงานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์ได้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาในการทำสหกิจในครั้งนี้ ดร. อิงครัต กิ่งแก้ว อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งมีส่วนร่วมในการให้คำปรึกษาและแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานในสหกิจศึกษาในครั้งนี้

ในท้ายที่สุดนี้ผู้จัดทำหวังว่ารางานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจและผู้ที่ต้องการศึกษาเกี่ยวกับการหลั่งโปรตีนในราเส้นใย *A. oryzae* ไม่มากก็น้อย หากมีข้อแนะนำหรือข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำขอน้อมรับไว้และขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ณัฏฐ์ณริณ รัชญน์ธนโชติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	2
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขต	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 การหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ในราเส้นใย	3
2.1.1 การขนส่งพอลิเปปไทด์จากไรโบโซมไปยัง ER	3
2.1.2 การม้วนพับและการดัดแปลงโปรตีนใน ER	4
2.1.3 การขนส่งโปรตีนไปยัง GA และการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์	4
2.2 เชื้อรา Aspergillus oryzae	5
2.3 การรวมชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Yeast Assembly	5
2.4 โปรตีน SNARE	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	7
3.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม	7
3.1.1 การสร้างส่วนประกอบของพลาสมิดลูกผสม	7
3.1.2 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิค Yeast assembly	8
3.2 การเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E.coli*	9
3.3 การถ่ายโอนดีเอ้นเอสู่ราโดยวิธี PEG-mediated protoplast transformation (PMT)	10
3.4 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์รา	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การประเมินการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์.. 11
3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ 11
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.. 12
4.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม 12
4.2 การคัดเลือกราลูกผสม 13
4.3 การหลั่งโปรตีนเรืองแสงออกนอกเซลล์ราลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 15
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ... 16
5.1 สรุปผลการวิจัย... 16
5.2 ข้อเสนอแนะ 16
เอกสารอ้างอิง 17
ภาคผนวก... 20
ภาคผนวก ก... 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเปิดวงพลาสมิด........ 7
3.2 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR........ 8
3.3 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา Yeast colony PCR........ 9
3.4 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการตรวจสอบพลาสมิด........ 9
3.5 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการเตรียมพลาสมิดสำหรับถ่ายสู่รา........ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 กระบวนการหลั่งโปรตีนในราเส้นใย 4

4.1 การวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ 12

4.2 ตัวอย่างการวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อคัดเลือก Yeast colony PCR 13

4.3 ตัวอย่างการวิเคราะห์พลาสมิดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *SfaAI* 13

4.4 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อราบนอาหารคัดเลือก 14

4.5 ตัวอย่างการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GFP ภายใต้กล้อง Fluorescent 14

4.6 กราฟแสดงปริมาตรการหลั่งโปรตีน GFP 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
GFP	green fluorescent protein
PCR	polymerase chain reaction
SNAREs	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor proteins
GRAS	generally recognized as safe
ER	endoplasmic reticulum
GA	golgi apparatus
PM	plasma membrane
PMT	PEG-mediated protoplast transformation
FI	fluorescence intensity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การผลิตโปรตีนลูกผสมมีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งทางด้าน เทคโนโลยีชีวภาพ เภสัชกรรมและวัสดุศาสตร์ ปัจจุบันการใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งในการผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant proteins) ซึ่งโปรตีนลูกผสม หมายถึง โปรตีนที่ผลิตโดยเซลล์เจ้าบ้านที่ปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อการผลิตโปรตีนในปริมาณสูง และสามารถพัฒนากระบวนการผลิตในภาคอุตสาหกรรมได้ (นิรันดร์ รุ่งสว่าง, 2566) การใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งในการผลิตโปรตีนลูกผสม ได้รับความสนใจเป็นอย่างต่อเนื่องจากสามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้แม่นยำกว่าการผลิตจากแหล่งผลิตดั้งเดิม ใช้ระยะเวลาที่รวดเร็ว และใช้พื้นที่น้อย โดยราเส้นใยมีประสิทธิภาพสำหรับการผลิตในทางอุตสาหกรรม เช่น การหมักซีอิ๊ว การผลิตเอนไซม์ (xylanase, amylase, cellulose, glucanase) และการผลิตยาปฏิชีวนะ เป็นต้น ราเส้นใยชนิด *Aspergillus oryzae* ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัย (generally recognized as safe: GRAS) (Qin Wang et al., 2020) มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ทนต่อสภาวะการเลี้ยงที่รุนแรงได้ดี (อุณหภูมิ/pH/ออกซิเจน) ใช้สับสเตรทได้หลากหลาย มีระบบการส่งถ่ายยีน (transformation system) และมีเครื่องมือในการดัดแปลงพันธุกรรมที่เหมาะสม (genetic materials) คือมีการถ่ายทอดยีนที่ต้องการจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งเข้าสู่อีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งเพื่อสร้างสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการได้อย่างเหมาะสม (มหาวิทยาลัยนเรศวร, ม.ป.ป., หน้า 1) รวมทั้งมีความสามารถในการหลั่งโปรตีนสูง จากรายงานที่มีมาก่อนพบว่าโปรตีนกลุ่ม soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor proteins (SNAREs) เป็นองค์ประกอบสำคัญในกลไกการขนส่งโปรตีน (protein-trafficking) และมีความจำเป็นในกระบวนการฟิวชัน เมนเบรนภายในเซลล์ โดยโปรตีนกลุ่ม SNAREs มีการแสดงออกในหลายอวัยวะภายในเซลล์ได้แก่ Endoplasmic reticulum (ER), Golgi apparatus (GA) และ Plasma membrane (PM) ซึ่งในรา *A. oryzae* มีการศึกษาโปรตีนกลุ่มดังกล่าวเพื่อส่งเสริมการหลั่งโปรตีนเป้าหมายออกนอกเซลล์น้อยอยู่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะเพิ่มการแสดงออกของยีนกลุ่ม SNAREs ที่จำเพาะใน GA ได้แก่ SNARE 1, SNARE 2 และ SNARE 3 และที่จำเพาะใน PM ได้แก่ SNARE 4, SNARE 5 และ SNARE 6 และประเมินการหลั่งโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) ซึ่งเป็นยีนรายงานผลเปรียบเทียบกับราควบคุม เนื่องจาก GFP มีคุณสมบัติในการเรืองแสงอัตโนมัติโดยไม่ต้องจำเป็นต้องอาศัยสารตั้งต้นถือว่าเป็นข้อได้เปรียบกว่าวิธีทดสอบที่ใช้ตัวรายงานชนิดอื่น ๆ (ชาติชาย แจ้งเสน, 2546) โดยโปรตีนกลุ่ม SNAREs ที่มีประสิทธิภาพจะนำไปเพิ่มการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านเพื่อส่งเสริมการผลิตโปรตีนลูกผสมอื่นๆ ในลำดับต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อคัดเลือกยีน SNAREs ที่สามารถเพิ่มการหลั่งโปรตีน GFP ออกนอกเซลล์ โดยทำการคัดเลือกยีนกลุ่ม SNAREs ที่จำเพาะต่อ Golgi apparatus และ plasma membrane (PM) โดยศึกษาการเพิ่มการแสดงออกของยีน SNAREs ดังกล่าวและประเมินความสัมพันธ์กับการหลั่งโปรตีนรายงานผล

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) การสร้างพลาสมิดลูกผสม จำนวน 3 ชนิด
2) การสร้างสายพันธุ์ราลูกผสม ที่มีการแสดงออกของยีน SNAREs จำนวน 6 สายพันธุ์
3) การตรวจสอบการหลั่งโปรตีน GFP ในน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 8 สายพันธุ์
4) การจัดทำรายงานพร้อมทั้งการนำเสนอผลงาน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้รับความรู้ภาคทางทฤษฎีและปฏิบัติทางด้าน Synthetic biology
2) สามารถคัดเลือกยีนกลุ่ม SNAREs ที่จำเพาะต่อ Golgi apparatus (GA) และ plasma membrane (PM) เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากโปรตีนอย่างกว้างขว้างและมีความต้องการในการใช้โปรตีนสูงขึ้นทั้งทางเทคโนโลยีชีวภาพ ทางเภสัชกรรม และทางอุตสาหกรรรมทางการค้า ทำให้การผลิตโปรตีนลูกผสมจากราเส้นใยนั้นได้รับความสนใจ เพราะ ราเส้นใยหลายสปีชีส์ได้รับการยอมรับว่าเป็นเชื้อที่มีความปลอดภัยโดยได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) ว่าสามารถใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับอาหารได้ เช่น การผลิตเอนไซม์ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ด้วยความต้องการที่มากขึ้นทำให้การผลิตโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein) ด้วยราเส้นใยได้รับความน่าสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากราเส้นใยนั้นมีความสามารถในการหลั่งโปรตีนสูงและมีความสามารถในการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการถอดรหัส (Post-Translational Modification: PTM) ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของโปรตีน (Qin Wang et. Al., 2020) แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในการหลั่งโปรตีนที่เป็น heterologous protein ออกนอกเซลล์อยู่ ทำให้ต้องมีการศึกษาวิธีที่จะพัฒนาการหลั่ง heterologous protein ของราเส้นใย เช่น ระบบกระบวนการฟิวชันเมนเบรนภายในเซลล์ (Iwashita, 2002)

2.1 การหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ในราเส้นใย

วิธีการหลั่งโปรตีนในราเส้นใย ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

2.1.1 การขนส่งพอลิเปปไทด์จากไรโบโซมไปยัง Endoplasmic reticulum (ER)

กระบวนการ Post-translational translocation หรือ การเคลื่อนย้ายโปรตีนที่เกิดหลังจากการสังเคราะห์โปรตีนเสร็จสิ้น จะทำหน้าที่เคลื่อนย้าย polypeptide จาก ribosome ไปยัง ER ส่วนที่จดจำเปปไทด์ (signal recognition particle: SRP) จะจับกับเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ที่ด้าน N-terminus เพื่อที่จะบล็อกการแปลรหัส SRP (Halic et al., 2006) และ ribosome-mRNA-nascent peptide complex จะถูกส่งไปยังเยื่อหุ้มของ ER และจับกับ SRP receptor จากนั้น SRP ก็จะถูกตัดออก การแปลรหัสดำเนินต่อไป nascent polypeptide ก็จะเข้าไปยัง ER lumen ผ่าน Sec61p transport complex และ ในกระบวนการเคลื่อนย้ายโปรตีนหลังจากการสังเคราะห์โปรตีนเสร็จสิ้น nascent polypeptide จะถูกแปลรหัสใน cytosol และ โปรตีนที่ยังไม่ถูกพับจะรวมกับ Hsp70 chaperone และ co-chaperone (Conesa et al., 2001) จากนั้นถูกส่งไปยัง ER ผ่าน membrane receptor ER luminal chaperone จับกับ immunoglobulin protein (BiP) และ โปรตีน Sec63p จะช่วยให้โปรตีนเข้าไปยัง ER (Haßdenteufel et al., 2018)

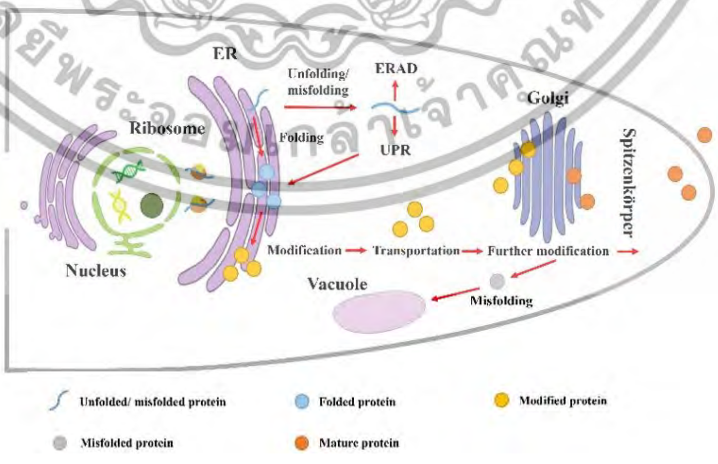
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 การม้วนพับและการดัดแปลงโปรตีนใน ER

การม้วนพับและการดัดแปลงโปรตีนใน ER ต้องใช้ chaperone, folding enzyme, calnexin (ClxA), immunoglobulin protein (BiP) และ protein disulfide isomerase (PDI) เป็นตัวช่วยในกระบวนการ (Saloheimo and Pakula, 2012) สำหรับโปรตีนที่เกิดการม้วนพับที่ถูกต้องจะถูกนำไปผ่านการดัดแปลงโปรตีน เช่น glycosylation ซึ่งเป็นหนึ่งกระบวนการที่สำคัญหลังจากการสังเคราะห์โปรตีนเสร็จสิ้น กระบวนการ glycosylation มีผลต่อความเสถียร ตำแหน่งและการหลั่งของโปรตีน (Mitra et al., 2006) หลังผ่านกระบวนการ glycosylation โปรตีนจะถูกส่งออกไปยังนอกเซลล์ จากนั้น unfolded protein response (UPR) จะทำหน้าที่กระตุ้นให้เซลล์สร้างเอนไซม์ที่ทำให้โปรตีนที่ยังไม่เกิดการม้วนพับเกิดการม้วนพับ และ ER-associated protein degradation (ERAD) จะทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนที่มีการพับที่ผิดปกติ (Bernasconi and Molinari, 2011; Wang et al., 2014)

2.1.3 การขนส่งโปรตีนไปยัง Golgi apparatus และการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์

โปรตีนที่มีการม้วนพับจะถูกขนส่งไปยัง Golgi apparatus ผ่านกระบวนการฟิวชันเมมเบรนเป้าหมายหุ้มเซลล์และหลั่งออกนอกเซลล์ (Spang, 2008) ในราเส้นใยโปรตีนจะถูกเก็บในถุงเวสิเคิล (vesicle) และถูกส่งไปยัง apical plasma membrane ด้วยถุงเวสิเคิล ที่มีชื่อว่า Spitzenkörper (Virag and Harris, 2006) การฟิวชันของเวสิเคิลกับ Golgi apparatus มีโปรตีนจำนวนมากเป็นสื่อกลาง เช่น Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)



รูปที่ 2.1 กระบวนการหลั่งโปรตีนในราเส้นใย

(ที่มา: Qin Wang et al., 2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เชื้อรา *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae เป็นราที่มีเส้นใย สามารถสร้างสปอร์ได้ มีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกับ *A. flavus* ซึ่งสามารถสร้างสารพิษ ที่เรียกว่า อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) แต่ *A. oryzae* นั้นทั่วไปไม่สร้างสารพิษ เจริญเติบโตได้ในดินและพืช เช่น ข้าว ในบริเวณที่มีออกซิเจนและความชื้นเพียงพอ อุณหภูมิที่เหมาะสมและสร้างเอนไซม์ได้ดี คือ 30-40 องศาเซลเซียส *A. oryzae* มีบทบาทสำคัญในการผลิตอาหารและเครื่องดื่ม เช่น ซอสถั่วเหลือง โดยใช้เป็นกล้าเชื้อ (Starter) เรียกว่า โคจิ (Koji) เพื่อการหมักอาหาร (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2563) และยังมีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์ เนื่องจาก *A. oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ใช้ในอุตสาหกรรมได้ (Gomi, 2014) เพื่อไฮโดรไลซ์สตาร์ชให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) นำไปหมักต่อไปให้เกิดแอลกฮอล์ด้วยยีสต์ เพื่อผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น สาเก (sake) เป็นต้น (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2555) นอกจากนั้นปัจจุบันนิยมนำ *A. oryzae* เป็นโฮสต์ในการผลิตโปรตีนลูกผสม เนื่องจาก มีกระบวนการ Post-translational translocation, glycosylation และ การม้วนพับของโปรตีนที่เหมาะสม (Yoon et al., 2010) ใน *A. oryzae* การเคลื่อนที่ของถุงเวสิเคิลนั้นเคลื่อนที่ได้ด้วยไมโครทูบูลไปยังปลายยอด (apical tip) จากนั้นถุงเวสิเคิลจะถูกขนส่งด้วยสายแอคติน (actin cable) ไปยังเมมเบรนและหลั่งโปรตีนออกมา (Kitamoto, 2015) ปัจจุบันมีการพัฒนาการเคลื่อนที่ของถุงเวสิเคิลและกระบวนการหลั่งโปรตีนเพื่อให้ *A. oryzae* สามารถผลิตโปรตีนลูกผสมได้มากขึ้น เช่นการเคลื่อนที่ของเวสิเคิลในออร์แกเนลล์ต่างๆที่เกี่ยวข้องอย่างเช่น ER และระบบ receptor เช่น SNAREs (Higuch, 2021)

2.3 การรวมชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Yeast Assembly

การรวมชิ้นดีเอ็นเอ (DNA assembly) เป็นกระบวนการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาจัดเรียงและเชื่อมต่อเข้าด้วยกันให้เป็นสายดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวขึ้น โดยจะพิจารณาจากความเกี่ยวเนื่องกันระหว่างสายดีเอ็นเอ ที่มีส่วนเหมือนกันจะสามารถเชื่อมเข้าด้วยกันได้ (เบญจพล, 2565) ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการสร้างระบบการแสดงออกของยีนและโครโมโซมทั้งหมด โดยทั่วไปชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กนิยมใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะและ DNA ligase เพื่อให้ดีเอ็นเอที่สนใจเชื่อมกับพลาสมิดได้ แต่ถ้าในบางงานที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 100 kb ขึ้นไป อาจจะเกิดการแตกหักได้ง่ายจึงใช้เทคนิค Yeast assembly เป็นการอาศัยลำดับดีเอ็นเอที่ทับซ้อนกันและประกอบเข้าด้วยกันโดยอาศัยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องจากมีคุณสมบัติในกระบวนการ homologous recombinant ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นกลไกในการซ่อมดีเอ็นเอที่เสียหาย งานวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวไว้ว่ายีสต์ *S.cerevisiae* สามารถรวมและประกอบชิ้นชิ้นดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่โดยมีลำดับเบสที่ทับซ้อนกัน โดยใช้ส่วนที่ทับซ้อนกัน 20 bp และชิ้นดีเอ็นเอสามารถมีความยาวได้ถึง 200 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สามารถรวมชิ้นดีเอ็นเอได้หลายชิ้นในครั้งเดียว (Gibson, 2009) ซึ่งสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบชิ้นดีเอ็นเอได้ถึง 12 ชิ้น และเกิดเป็นพลาสมิดลูกผสมที่มีความหลาหหลายมากขึ้น (Kristy et al., 2020) นอกจากนี้ก็ยังมีเทคนิคการรวมชิ้นดีเอ็นเออื่นๆ เช่น Gibson Assembly, Golden Gate และ Ligase cycling reaction (LCR) เป็นต้น

2.4 โปรตีน SNARE

SNARE หรือ Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor proteins คือ มอเตอร์โมเลกุล (Molecular motor) ที่ทำหน้าที่ช่วยในการฟิวชันระหว่าง 2 เมมเบรน คือ ระหว่าง vesicle membrane และ target membrane (Rognlien, 2003) โปรตีน SNARE จะเร่งการขนส่งโปรตีนระหว่างออร์แกเนลล์ โปรตีน SNARE นั้นมีหลายชนิด ซึ่งจะจำเพาะในออร์แกเนลล์ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งโปรตีน เช่น Sly1p และ Sec1p จะควบคุมการเคลื่อนที่ของเวสิเคิลจาก ER ไปยัง Golgi Apparatus และจาก Golgi Apparatus ไปยัง plasma membrane ตามลำดับ (Hou et al., 2011) และจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าโปรตีน SNARE นั้นสามารถเพิ่มการหลั่ง heterologous protein ได้ เช่น cellulase และ cellobiohydrolase (Van Zyl et al., 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม

3.1.1 การสร้างส่วนประกอบของพลาสมิดลูกผสม

3.1.1.1 พลาสมิดฐาน (Backbone plasmid) ประกอบด้วยยีนคัดเลือกใน แบคทีเรีย ยีสต์ และราเส้นใย ได้แก่ ยีนต้านยาแอมพิซิลินและยีนสร้างสารอาหารที่จำเป็น พร้อมทั้งมีเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ซึ่งเปิดวงด้วย เอนไซม์ *sfaAI* โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ซึ่งมีปริมาณทั้งหมด เท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 60 นาที

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเปิดวงพลาสมิดฐาน

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
H_2O	36
10xbuffer	5
SfaAI	2
Plasmid1 (5 ไมโครกรัม)	7
Total volume	**50**

3.1.1.2 ชิ้นยีน SNAREs, Promotor 1 และ Terminator 1 ทำโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้แสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR และตรวจผลของ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด DNA clean & concentrator^{TM}-4 และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น BioPhometer 30D (Eppendorf)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
H_2O	20
2X Phire Green Hot Start II PCR Master Mix	25
forward primer	2
reverse primer	2
DNA template (50 นาโนกรัม)	1
Total volume	**50**

3.1.2 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิค Yeast assembly

นำยีสต์ INVsc1 จำนวน 1 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำยีสต์มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) และทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.6 นำเชื้อที่ทำการเจือจางแล้วไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 จากนั้นถ่ายโอนชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้วิธีของ Invitrogen (Catalog no. V8251-20) โดยทำการล้างเซลล์ด้วย 1x TE และ 1X LiAc/0.5X TE บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นทำการผสมชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยมีส่วนประกอบดังนี้ พลาสมิดฐาน , ชิ้นส่วนยีน SNAREs, Promotor, terminator และ เซลล์ยีสต์ ซึ่งทำการส่งถ่ายดีเอ็นเอโดยใช้ Dimethy sulfoxide (DMSO) และวิธีการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำยีสต์ที่ได้รับดีเอ็นเอไปเลี้ยงบนอาหาร Synthetic Defined (SD) Medium ที่เติมกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ Histidine, Tryptophan และ Leucine นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 วัน ทำการคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดเป้าหมาย ด้วยเทคนิค Yeast colony PCR ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.3 จากนั้นจึงนำโคโลนีที่มีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายไปเลี้ยงในอาหารเหลว YPD 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดด้วยชุด QIAprep Spin Miniprep Kit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา Yeast colony PCR

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
H_2O	4.5
2X Phire Green Hot Start II PCR Master Mix	5
forward primer	0.25
reverse primer	0.25
Total volume	**10**

3.2 การเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E.coli*

การเพิ่มปริมาณพลาสมิดทำได้โดยนำพลาสมิดจากข้อ 3.1 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ (Competent cells) ในการศึกษานี้ใช้ *E.coli* ชนิด DH5α ด้วยวิธีการ heat shock ตามวิธีการของ Invitrogen (Cat No. 18265-017) จากนั้นนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Luria Bertani (LB) agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสุ่มเลือกโคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำมาสกัดพลาสมิดด้วยชุด QIAprep Spin Miniprep Kit แล้วจึงนำมาตรวจสอบพลาสมิดโดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา ดังตารางที่ 3.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พร้อมทั้งทำการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิเคราะห์ DNA sequencing ด้วยโปรแกรม SnapGene และ Clustal Omega ในลำดับถัดไป

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการตรวจสอบพลาสมิด

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
H_2O	12.3
10xbuffer	1.5
NotI	0.25
SfaAI	0.25
DNA (300 นาโนกรัม)	x
Total volume	**15**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสู่ราโดยวิธี PEG-mediated protoplast transformation (PMT)

เตรียมพลาสมิดโดยทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ เอนไซม์ *SgsI* สามารถเตรียมปฏิกิริยาได้ ดังตารางที่ 3.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและทำสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด DNA cleaning & ConcentrationTM -5 เพื่อทำ PMT

การถ่ายโอนดีเอ็นสู่ราโดยวิธี PMT ตามวิธีการของ Chutakul C. et.al. (2007) ใช้เชื้อรา *A. oryzae* ทำให้เป็นเซลล์โปรโตพลาสต์ (protoplast) โดยใช้เอนไซม์ glucolonidase, Drisilase และ Lysing enzyme และใช้ Polyethylene glycol (PEG) ในถ่ายโอนดีเอเข้าสู่เซลล์โปรโตพลาสต์ และทำการคัดเลือกบนอาหารแข็ง czapek Dox (CD) ที่มี 1.2 M Sorbitol ที่เติมและไม่เติมสารอาหารชนิดยูราซิลและยูริดีน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปคัดเลือโคลนที่มีการแสดงออกของยีน GFP ด้วยกล้อง Fluorescent (Invented Microscope Model IX71)

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการเตรียมพลาสมิดสำหรับถ่ายสู่รา

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
H_2O	25
10xbuffer (FD)	5
SfaAI	2
DNA (300 นาโนกรัม)	15
Total volume	**50**

3.4 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์รา

เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GFP แล้ว นำราที่มีพลาสมิดลูกผสม จำนวน 6 ชนิดชนิดละ 4-6 โคลน มาเพิ่มปริมาณสปอร์ โดยทำการเลี้ยงในฟลาสก์ที่ประกอบด้วยอัตราส่วนข้าวต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบ 5 แล้วจึงทำการเก็บสปอร์โดยใช้ 0.05% Tween ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ในการชะล้างสปอร์และกรองด้วย Miracloth และทำการเจือจางสปอร์ 20 เท่า ด้วย 0.05% tween เพื่อทำการนับสปอร์ด้วย Hemacytometer และคำนวณหาความเข้มข้น เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) ในการเลี้ยงในอาหาร 4% SM เพื่อประเมินการหลั่งโปรตีนในลำดับถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การประเมินการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์

นำสปอร์จากข้อ 3.5 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 4% SM ที่พีเอช 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยให้สปอร์มีความเข้มข้นเริ่มต้น เท่ากับ 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน และทำการเก็บเชื้อ 1-2 มิลลิลิตร โดยทำการกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ตั้งไว้รอให้เซลล์ตกตะกอนหรือนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อให้ได้ส่วนใส (Supernatant) แล้วจึงเติมส่วนใสปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงใน 96 well plate และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader รุ่น BioTek snergy H1 โดยตั้งค่าความยาวคลื่น Excitation และ Emission เท่ากับ 485 และ 535 นาโนเมตร

3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 11.5 สำหรับ Window เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของของค่าเฉลี่ยการหลั่งโปรตีนรายงานผลของยีน SNAREs แต่ละชนิดด้วย One - way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Duncan test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p-value < 0.05)

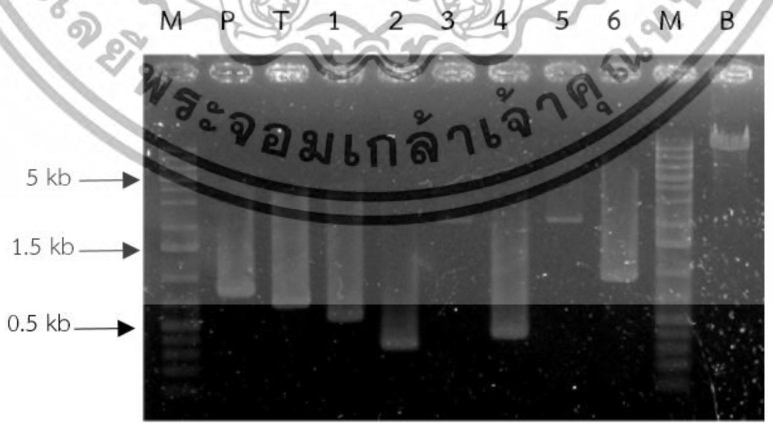
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

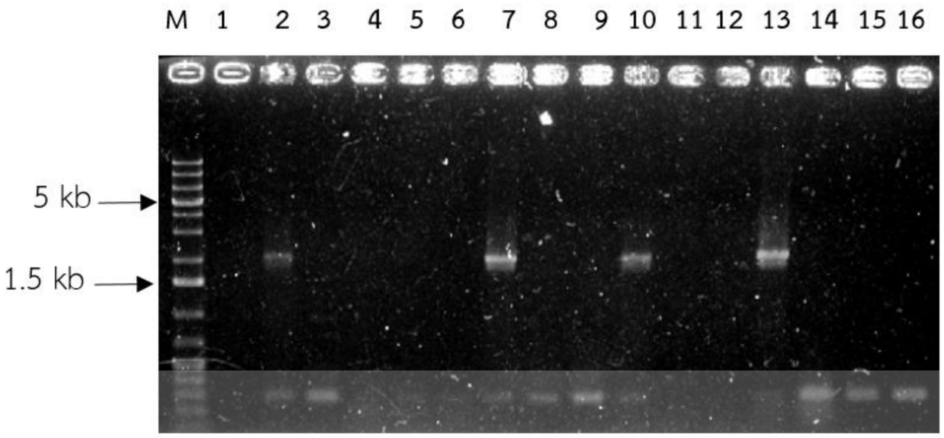
4.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม

การเตรียมส่วนประกอบของพลาสมิดลูกผสม พลาสมิดลูกผสมที่สร้างขึ้น ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอ 4 ส่วน คือ Promoter, Terminator, ยีน SNAREs และ พลาสมิดฐาน เมื่อทำการเพิ่มจำนวนแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานโดย Promoter, Terminator และ ยีน SNAREs มีขนาด 0.7, 0.6 และ 0.2-2.1 kb ในขณะที่พลาสมิดฐานมีขนาดเท่ากับ 17 kb (รูปที่ 4.1) ซึ่งถูกต้องตามเป้าหมาย และเมื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ พบว่าดีเอ็นเอมีปริมาณ 300 - 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอไปโคลนด้วยเทคนิค Yeast Assembly โดยส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ยีสต์ INVsc1 เพื่อทำการรวมชิ้นส่วนต่างๆ และทำการคัดเลือกเซลล์ยีสต์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิค Yeast colony PCR และนำไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ตัวอย่างเช่น ยีน SNARE 5 พบว่าดีเอ็นเอ มีขนาด 2 kb (รูปที่ 4.2) ซึ่งมีขนาดเท่ากับดีเอ็นเป้าหมาย จากนั้นจึงนำพลาสมิดลูกผสมไปเพิ่มปริมาณใน *E.coli* ต่อไป และทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับขนาดของพลาสมิดฐาน โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *SfaAI* พบว่า พลาสมิดลูกผสม มีขนาด 2.8 – 3.0 kb และ 14 kb และในขณะที่พลาสมิดฐาน จะมีขนาด 1.0 และ 14 kb ซึ่งแบนของพลาสมิดลูกผสมนั้นไม่ตรงกับแบนของพลาสมิดฐาน (รูปที่ 4.3) แสดงว่าโคลนนั้นมีพลาสมิดที่มีดีเอ็นตามเป้าหมาย และจะถูกถ่ายโอนเข้าไปในราเป็นลำดับถัดไป



รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้: เลน M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน, เลน P = Promotor, เลน T = Terminator, เลน1-6 = ยีน SNAREs ชนิด SNARE 1, SNARE 2, SNARE 3, SNARE 4, SNARE 5, และ SNARE 6 ตามลำดับ, เลน B = พลาสมิดฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ตัวอย่างการวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อคัดเลือก Yeast colony PCR ของยีน SNARE 5 โดย เลนที่ 2, 7, 10 และ 13 ได้ขนาดตามเป้าหมาย

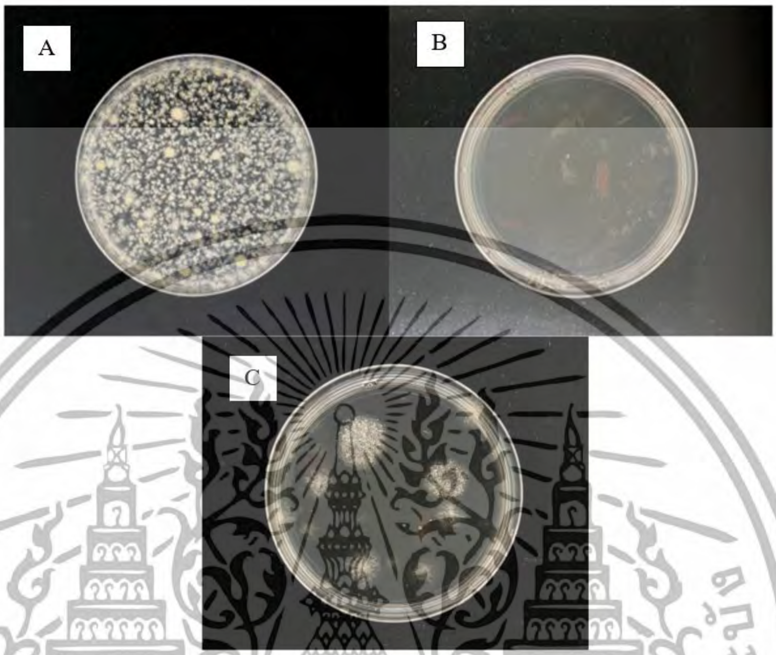
รูปที่ 4.3 ตัวอย่างการวิเคราะห์พลาสมิดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *SfaAI* ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส: เลน1-3 = SNARE 1, เลน 4-6 = SNARE 2 , เลน 7-9 = SNARE 6 และ เลน - = พลาสมิดฐาน

4.2 การคัดเลือกราลูกผสม

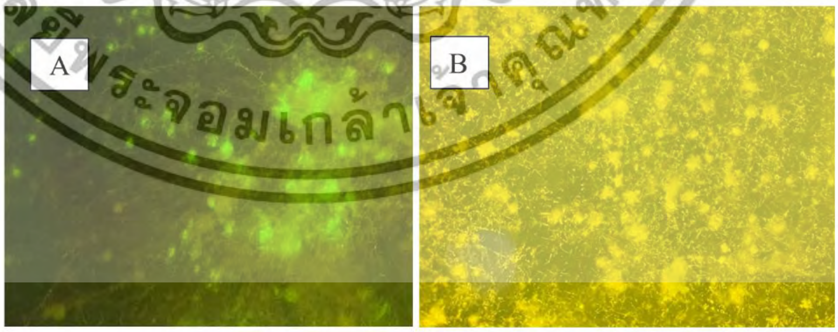
เมื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดแล้วจึงทำการถ่ายโอนพลาสมิดนั้นเข้าสู่ *A. oryzae* และคัดเลือกด้วยอาหารแข็ง CD ที่มี 1.2 M sorbital ซึ่งขาดสารอาหารยูริดีนและยูราซิล โดย *A. oryzae* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจะสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ขาดสารอาหารยูริดีนและยูราซิล ในทางกลับกันถ้า *A. oryzae* ไม่ได้รับพลาสมิดลูกผสมเชื้อราจะไม่มีการเจริญเติบโต เนื่องจาก โฮลต์หรือราเจ้าบ้านผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรมทำให้ไม่มียีนที่สามารถสร้างยูราซิลได้ (รูปที่ 4.4) จากนั้นนำเพลทที่มีการเจริญเติบโต ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน GFP ด้วยกล้อง Fluorescent โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจะมีการแสดงออกของยีน GFP ทำให้มีการเรืองแสงสีเขียวออกมา (รูปที่ 4.5 A) ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อรานั้นได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีนเป้าหมาย ในขณะที่โคโลนีที่ไม่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจะเห็นเป็นโคโลนีสีเหลือง (รูปที่ 4.5 B)



รูปที่ 4.4 การเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อราบนอาหารคัดเลือก : A = ชุดควบคุม ที่เจริญเติบโตบนอาหารที่มียูริดีนและยูราซิล , B = ชุดควบคุม ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่ไม่มียูริดีนและยูราซิล และ C = ตัวอย่างโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม

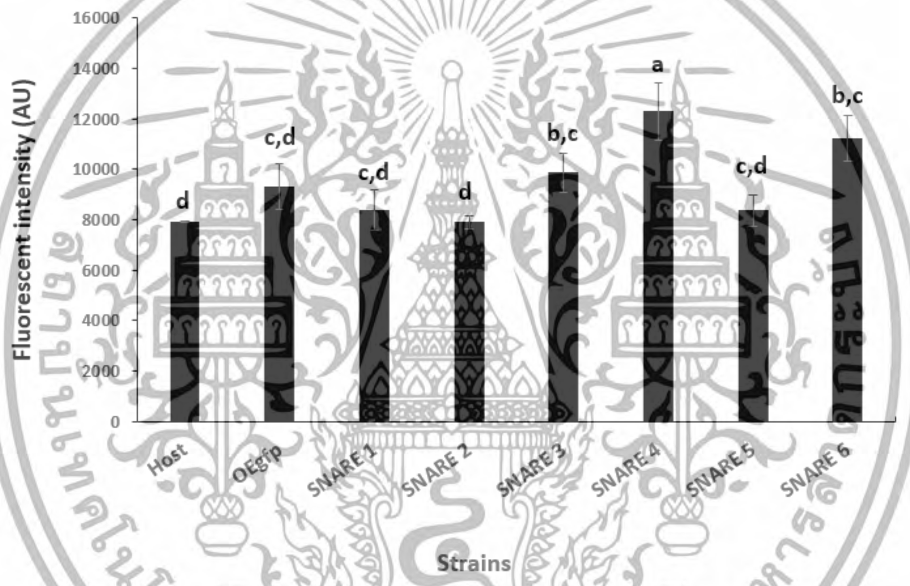


รูปที่ 4.5 ตัวอย่างการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GFP ภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนท์: A = โคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม และ B = โคโลนีที่ไม่ได้รับพลาสมิดลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การหลั่งโปรตีนเรืองแสงออกนอกเซลล์ราลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การวิเคราะห์โปรตีนในอาหารเหลว 4% SM ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา เป็นเวลา 5 วัน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงซึ่งแสดงให้เห็นถึงการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ของราลูกผสม โดยชุดควบคุม คือ ราเจ้าบ้านหรือ โฮสต์ และราสายพันธุ์ที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน GFP (OEgfp) เพียงอย่างเดียว มีค่า Fluorescent intensity (FI, AU) เฉลี่ย เท่ากับ 7000 และ 9000 AU ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน SNARE 4 มีค่า FI สูงกว่าราที่ไม่มียีน SNARE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีการหลั่งโปรตีนสูงขึ้น 32% และรองลงมาคือพันธุ์ที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน SNARE 3 และ SNARE 6 ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีการเพิ่มการแสดงของยีน SNARE 1 , SNARE 2 และ SNARE 5 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับราเจ้าบ้าน (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาตรการหลั่งโปรตีน GFP ออกนอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังจากบ่มเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4-6 โคโลนีของยีน SNAREs ทั้ง 6 ชนิด และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มยีน SNAREs, ราเจ้าบ้าน และรา OEgfp ด้วย Duncan test ที่ (p-value < 0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การสร้างราลูกผสมที่การเพิ่มการแสดงออกของยีน SNARE ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ราทีมียีน SNARE 1, SNARE 2 และ SNARE 3 ที่จำเพาะต่อ GA และ SNARE 4, SNARE 5, และ SNARE 6 ที่จำเพาะต่อ PM พบว่าราที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน SNARE ชนิด SNARE 4 สามารถเพิ่มปริมาณการหลั่งโปรตีน GFP ออกนอกเซลล์ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ราที่ไม่มียีน SNARE) โดยเพิ่มการหลั่งสูงขึ้น 30% และลำดับรองลงมา คือ ราที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน SNARE ชนิด SNARE 6 โดยการหลั่งของโปรตีนเพิ่มขึ้น 20% จึงสรุปได้ว่า ยีน SNARE นั้นสามารถส่งเสริมการหลั่งของโปรตีนออกนอกเซลล์ได้ ซึ่งยีน SNARE 4 เป็นยีนที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาการผลิตโปรตีนลูกผสมอื่นๆ ในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาการแสดงออกของยีน SNAREs ที่ส่งเสริมการหลั่งโปรตีนในรา *A.oryzae* โดยการวัดค่า FI ในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4% SM มี auto fluorescent ทำให้ค่า FI ที่วัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อมีค่า auto fluoreasent ของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ดังนั้นจึงควรนำค่า FI ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4% SM มาหักลบกับค่า FI ในน้ำเลี้ยงเชื้อราลูกผสมทั้งสองชุดการทดลอง เพื่อให้ได้ค่า FI ที่วัดได้เป็นค่าของโปรตีน GFP เพียงอย่างเดียว และนอกจากนั้นอาจจะทำการวิเคราะห์การสะสมโปรตีนภายในเซลล์ เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องและยืนยันความถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

การโคลนยีน. ม.ป.ป.. หน้า 1. มหาวิทยาลัยนเรศวร. เข้าถึงได้จาก http://conf.agi.nu.ac.th/webnewasp/ereading/gene/gene.pdf

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2563. เอกสารข้อมูลความปลอดภัยของจุลินทรีย์และ/หรือจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้ในภาคอุตสาหกรรม. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://reg3.diw.go.th/safety/microorganism/

ชาติชาย แจ้งสน. 2546. การตรวจกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยวิธี GFP MICROPLATEASSAY. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต. (จุลชีววิทยา). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. เข้าถึงได้จาก http://www.thaithesis.org/detail.php?id=1202546000078

นิรันดร์ รุ่งสว่าง. 2566. ระบบการผลิตโปรตีนลูกผสมจากยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ไทย ประสิทธิภาพสูง ต้นทุนต่ำ และมีอิสระในการดำเนินการ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก https://www.biotec.or.th/home/recombinant-protein/

เบญจพล เบญจภัทรวรกุล. 2565. วิธีจัดเรียงสายดีเอ็นเอ โดยใช้สายอ้างอิงจากสิ่งมีชีวิตอื่นที่ใกล้เคียง. วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมคอมพิวเตอร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2555. *Aspergillus oryzae*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1484/aspergillus-oryzae

Bernasconi, R., and Molinari, M. 2011. ERAD and ERAD tuning disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER. Curr. Opin. Cell Biol. 23, 176–183. doi: 10.1016/j.ceb.2010.10.002

Conesa, A., Punt, P. J., van Luijk, N., and van den Hondel, C. A. 2001. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. Fungal Genet. Biol. 33, 155–171. doi: 10.1006/fgbi.2001.1276

Gibson, D. 2009. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. Nucleic Acids Research, 37(20), P. 6984–6990. https://doi.org/10.1093/nar/gkp687

Gomi, K. 2014. *Aspergillus oryzae*. Encyclopedia of Food Microbiology, Second Edition. 2:92-96

Halic, M., Blau, M., Becker, T., Mielke, T., Pool, M. R., Wild, K., et al. 2006. Following the signal sequence from ribosomal tunnel exit to signal recognition. particle. Nature 444, 507–511. doi: 10.1038/nature05326

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Haßdenteufel, S., Johnson, N., Paton, A. W., Paton, J. C., High, S., and Zimmermann, R. 2018. Chaperone-mediated Sec61 channel gating. during ER import of small precursor proteins overcomes Sec61 inhibitor reinforced energy barrier. Cell Rep. 23, 1373–1386. doi: 10.1016/j.celrep.2018. 03.122

Higuch, Y. 2021. Membrane Traffic in *Aspergillus oryzae* and Related Filamentous Fungi. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 7(7), 534. https://doi.org/10.3390/jof7070534

Hou, J, Tyoa, K, Liua, Z, Petranovica, D. and Nielsen, J. 2012. Engineering of vesicle trafficking improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae.* Metabolic Engineering. 14(2), P.120-127. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.01.002

Iwashita, K. 2002. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. Journal of Bioscience and Bioengineering. 94(6):530-5. doi: 10.1016/s1389-1723(02)80191-8.

Kitamoto, K. 2015. Cell biology of the Koji mold *Aspergillus oryzae*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79(6), P. 863–869. https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1023249

Kristy, Ip., Yadin R., George, K.W. 2020. High-Throughput DNA Assembly Using Yeast Homologous Recombination. DNA Cloning and Assembly, Volume 2205. doi: 10.1007/978-1-0716-0908-8_5

Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N. C., and Surolia, A. 2006. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. Trends Biochem. Sci. 31, 156–163. doi: 10.1016/j.tibs.2006.01.003

Rognlien, K and Woodbury, D. 2003. Reconstituting SNARE proteins into BLMs. Membrane Science and Technology. 7:479-488. https://doi.org/10.1016/S0927-5193(03)80040-2

Saloheimo, M., and Pakula, T. M. 2012. The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina). Microbiology 158(Pt 1), 46–57. doi: 10.1099/mic.0.053132-0

Spang, A. 2008. Membrane traffic in the secretory pathway. Cell. Mol. Life Sci. 65,2781–2789. doi: 10.1007/s00018-008-8349-y

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Van Zyl, J. H. D, Haan, R. D. and Van Zyl, W. H. 2016. Over-expression of native *Saccharomyces cerevisiae* exocytic SNARE genes increased heterologous cellulase secretion. Applied Microbiology and Biotechnology. 98(12):5567-78. doi:10.1007/s00253-015-7022-2

Virag, A., and Harris, S. D. 2006. The Spitzenkörper: a molecular perspective. Mycol. Res. 110, 4–13. doi: 10.1016/j.mycres.2005.09.005

Wang, G., Zhang, D., and Chen, S. 2014. Effect of earlier unfolded protein response and efficient protein disposal system on cellulase production in Rut C30. World J. Microbiol. Biotechnol. 30, 2587–2595. doi: 10.1007/s11274-014 1682-4

Wang Q, Zhong C and Xiao H. 2020. Genetic Engineering of Filamentous Fungi for Efficient Protein Expression and Secretion. Front. Bioeng. Biotechnol. 8:293. doi: 10.3389/fbioe.2020.00293

Yoon, J, Aishan, T. Maruyama, J, and Kitamoto, K. 2010. Enhanced Production and Secretion of Heterologous Proteins by the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* via Disruption of Vacuolar Protein Sorting Receptor Gene Aovps10. Applied and environmental microbiology. 5718–5727. doi:10.1128/AEM.03087-09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารและสารเคมี

1. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ ในเทคนิค Yeast assembly**

1.1 yeast peptone dextrose (YPD broth)

YPD broth	50	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

1.2 Synthetic Defined (SD) Medium

SD agar	50	มิลลิลิตร
Amino acid	**ปริมาตร/50 มิลลิลิตร**	
Histidine	200	ไมโครลิตร
Tryptophan	200	ไมโครลิตร
Leucine	1	มิลลิลิตร

ละลาย SD agar จนละลาย รออาหารเย็นลงแล้วจึงเติมกรดอะมิโน จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปเทในเพลท

2. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *E.coli* ในการเพิ่มปริมาณพลาสมิด**

2.1 Luria-Bertani (LB) Agar

LB	50	มิลลิลิตร
Ampicillin (100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	50	ไมโครลิตร

3. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อราและสารเคมี ในวิธี PMT**

3.1 Protoplast Lyzing enzyme

	มิลลิกรัม/3 มิลลิลิตร	
β-glucolonidase	6	มิลลิกรัม
Drisilase	21	มิลลิกรัม
Lysing enzyme	60	มิลลิกรัม

ลายลายใน 0.7 M Nacl 3 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติม β-mercapto ethanol 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วย 0.2 μm filtration

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 STC

	ปริมาตร/30 มิลลิลิตร
1.2 Sorbitol	28.2 มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 8	300 ไมโครลิตร
1 M $CaCl_2$	1.5 มิลลิลิตร

3.3 Czapek Dox (CD) Agar

CD	14	กรัม
Distilled water	400	มิลลิลิตร
Sorbitol	87.6	กรัม
Agar	1.6	กรัม

4. การเตรียมอาหารสำหรับการประเมินหลั่งโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ

4.1 4% SM medium

	กรัม/ลิตร
Glucose	40
Yeast extract	5
KH_2PO_4	2.4
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
Element Sol^n	1 มิลลิลิตร
Distilled water	500 มิลลิลิตร

ทำการปรับ pH ให้ได้ pH 5.5 ด้วย 2 M KOH และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร และแบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้