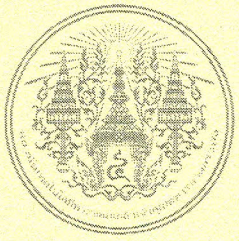


รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์เชื่อมสายดีเอนเอของสาหร่าย ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechosystis* sp. PCC 6803 สู่ระบบการแสดงออก

Cloning of DNA ligase gene of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to expression vector

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์เชื่อมสายดีเอนเอของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechosystis* sp. PCC 6803 สู่ระบบการแสดงออก

Cloning of DNA ligase gene of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to expression vector

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

b.12681222

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์เชื่อมสายดีเอนเอของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechosystis* sp. PCC 6803 สู่ระบบการแสดงออก

แหล่งเงิน ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 30 กันยายน 2557

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

นาย เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ สังกัด สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) ถือได้ว่าเป็นเทคนิคที่สำคัญอย่างมากในการศึกษาเพื่อเข้าใจและอธิบายปรากฏการณ์การต่างๆของสิ่งมีชีวิตในระดับของพันธุกรรม วิธีหนึ่งที่จะใช้ลดระยะเวลาในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนคือการผ่าเหล่า (Mutation) อย่างไรก็ดีระดับของการผ่าเหล่าของสิ่งมีชีวิตอยู่ในระดับที่ต่ำมาก เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมที่เรียนกว่าการโคลน (Cloning) จะเป็นเทคนิคที่สำคัญในการลดระยะเวลาในการศึกษา กระบวนการศึกษาการโคลนนั้นจะต้องใช้เอนไซม์ที่ตัดเส้นดีเอนเอและเอนไซม์ที่เชื่อมต่อดีเอนเอเข้าด้วยกัน การศึกษาครั้งนี้ได้มีการโคลนยีนสำหรับผลิตเอนไซม์เชื่อมต่อเส้นดีเอนเอ (DNA ligase) จากสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ซึ่งมีรหัสจากฐานข้อมูลไซยาโนเบส (http://genome.microbedb.jp/cyanobase/) คือ sll1209 ชิ้นยีนขนาด 2,010 นิวคลีโอไทด์ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) จากนั้นโคลนเข้าสู่ระบบแสดงออก pET-22b(+) ที่ตำแหน่ง *NdeI* และ *XhoI* ภายใต้กรอบของการแสดงออก จากนั้นลำดับของยีนที่โคลนเข้าระบบแสดงออกนี้ได้ยืนยันความถูกต้องด้วยการหาลำดับเบส พบว่ามีความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตามต้นแบบทุกตำแหน่ง

คำสำคัญ : เอนไซม์เชื่อมต่อดีเอนเอ, การโคลน, ไซยาโนแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Cloning of DNA ligase gene of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to expression vector

Researcher: Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj

Faculty: Science **Department:** Chemistry

ABSTRACT

The genetic engineering technique is one of most important technique for understanding and explaining the natural phenomenon of organism in the genetic level. One of the techniques to reduce time-consuming process is mutation. However, the mutation rate in typical organisms is very low; the technique of cloning is one of the good choices for the use in study. The process needs more restriction enzymes to cut DNA fragments and DNA ligase enzyme to ligate them together. In this study, DNA ligase sequence obtained from cyanobase (http://genome.microbedb.jp/cyanobase/) was coded as sll1209. The gene with the size of 2,010 nucleotides was successfully amplified by PCR (Polymerase chain reaction). This gene was then cloned in frame to pET-22b(+) expression vector at *NdeI* and *XhoI* position. The sequence was confirmed by sequencing, and show that the identical to DNA template.

Keywords : DNA ligase, cloning, cyanobacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... จ

สารบัญภาพ ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 1

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 5

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 5

3.2 สารเคมี 5

3.3 วิธีการทดลอง 6

บทที่ 4 ผลการวิจัย 9

4.1 การสืบค้นข้อมูลดีเอนเอจากฐานข้อมูลดีเอนเอ 9

4.2 การออกแบบไพรเมอร์จับจำเพาะ 10

4.3 การเพิ่มชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR 11

4.4 การเตรียมดีเอนเอของระบบแสดงออก 14

4.5 การเชื่อมต่อดีเอนเอสองชิ้นดังกล่าวเข้าเป็นเส้นวงปิดเดียวกัน 16

4.6 การหาลำดับเบสของดีเอนเอลูกผสม 18

4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 24
5.1 สรุปผลการวิจัย 24
5.2 ข้อเสนอแนะ 24
บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง 25
ภาคผนวก 27
โปสเตอร์เผยแพร่ผลงานวิจัย 27
สรุปการใช้จ่ายเงิน 28
ประวัตินักวิจัย 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่ **หน้า**

4.1 ผลผลิต PCR ใน 1% Agarose gel electrophoresis 13

4.2 แสดง pET22b(+) expression vector 14

4.3 ผลการแยกการตัด pET22b(+) ใน 1% Agarose gel electrophoresis 15

4.4 ผลการทำ colony PCR จากทั้งหมด 44 colonies 17

4.5 แผนที่ยีนของ p22Lig6803 เพื่อแสดงตำแหน่งและทิศทางของชิ้นยีนที่วางตัวอยู่ในดีเอนเอของระบบแสดงออก 18

4.6 แผนภาพยืนยันการหาลำดับเบสของ p22Lig6803 เป็นไปอย่างถูกต้อง 20

4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ p22Lig6803 และ sll1209 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในยุคปัจจุบัน เทคโนโลยีพันธุวิศกรรมได้เข้ามามีบทบาทอย่างสูงในกระบวนการวิจัยเชิงชีวภาพ เพื่อให้เข้าใจถึงลักษณะของความเป็นธรรมชาติและการอธิบายปรากฏณ์การณ์ต่างๆ โดยเทคนิคต่างๆที่ได้พัฒนาขึ้นต่างก็เป็นไปเพื่อเพิ่มความรวดเร็วของงานวิจัยในด้านต่างๆไม่ว่าจะเป็นทั้งในด้านการศึกษาค้นคว้าองค์ความรู้พื้นฐานหรือจะเป็นด้านการพัฒนาจนเป็นชิ้นงานก็ดี

ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตนั้น มีลักษณะที่สำคัญคือจะมีตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ หรือที่รู้จักกันในนามของเอนไซม์ (enzyme) ปฏิกิริยาแต่ละปฏิกิริยาต่างก็ต้องการเอนไซม์แตกต่างชนิดกันขึ้นกับสารตั้งต้นและทิศทางของปฏิกิริยานั้นๆ หนึ่งในปฏิกิริยาที่สำคัญของกระบวนการเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมคือ ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อสายดีเอนเอตั้งแต่สองเส้นขึ้นไปเข้าหากัน (DNA ligation) โดยในปฏิกิริยานี้จะมีตัวเร่งทางชีวภาพคือเอนไซม์ DNA ligase ดังนั้นหากมีการศึกษาพัฒนาการผลิตเอนไซม์ DNA ligase ได้ก็จะเป็นบรรไดขั้นหนึ่งของกระบวนการศึกษาอันจะส่งผลต่อความรวดเร็วและการประหยัดค่าใช้จ่ายในระบบงานวิจัยเชิงชีวภาพโดยผ่านทางเทคนิคพันธุวิศวกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. แยกดีเอนเอที่ใช้ควบคุมการแปลรหัสโปรตีนให้เป็นเอนไซม์ DNA ligase ออกจากจีโนมของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803
2. เชื่อมต่อดีเอนเอดังกล่าวเข้ากับระบบดีเอนเอที่จะใช้แปรรหัสให้เป็นโปรตีน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

เนื่องด้วยสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 นั้นได้มีการหาลำดับเบสได้ของทั้งจีโนม (genome sequencing) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว (Kaneko และคณะ, 1996) ผู้วิจัยโครงการนี้ต้องการดึงประโยชน์จากสิ่งมีชีวิตสีเขียวออกมาใช้งาน ดังนั้นในส่วนของเนื้องานนั้นจึงต้องการคัดแยกดีเอนเอที่ควมคุมการแปลรหัสโปรตีนให้เป็นเอนไซม์ DNA ligase จากจีโนมของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ผ่านทางกระบวนการพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอนเอของยีนดังกล่าวในปริมาณมาก จากนั้นจะทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอนเอที่ได้เข้ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TA cloning vector เพื่อเพิ่มปริมาณแบบยั่งยืนในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ในการนี้จะมีการเติมตำแหน่งจดจำการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เอาไว้ที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอนเอที่เกิดในกระบวนการพีซีอาร์เพื่ออำนวยความสะดวกในการตัดเส้นดีเอนเอที่ต้องการออกจาก TA cloning vector อีกทั้งยังช่วยให้การเชื่อมต่อชิ้นดีเอนเอที่ต้องการนี้เข้าสู่ expression vector ได้สะดวกขึ้น ดีเอนเอลูกผสมที่ได้ในขั้นสุดท้ายนี้จะเป็นจุดเริ่มต้นที่รวดเร็วของกระบวนการผลิตเอนไซม์ DNA ligase ต่อไป

1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนสำหรับใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase Chain Reaction, PCR) โดยจะมีการเติมตำแหน่งจดจำการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะไว้ที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์แต่ละข้าง เพื่อความสะดวกในการโคลนยีน

2. เพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

3. ตัดชิ้นดีเอนเอดังกล่าว ด้วยเอนไซมตัดจำเพาะ และในขณะเดียวกันก็ตัดระบบเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับแสดงออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน

4. เชื่อมต่อดีเอนเอสองเส้นนี้เข้าด้วยกัน ตรวจสอบความถูกต้องด้วยการส่งดีเอนเอที่เชื่อมต่อแล้วด้วยการหาลำดับเบส

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้เป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการผลิตเอนไซม์ DNA ligase ได้อย่างยั่งยืน อีกทั้งยังสามารถใช้พัฒนาองค์ความรู้พื้นฐานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้อีกทางหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ได้มีการพยายามจะผลิตเอนไซม์ DNA ligase จากสิ่งมีชีวิตหลากหลายกลุ่มด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็น จากเซลล์เนื้อเยื่อของมนุษย์ อาเคียแบคทีเรีย แบคทีเรียทนร้อน หรือแม้แต่แบคทีเรียจากร่างกายของมนุษย์เอง Johnson A.P. และ Fairman M.P. (1997) ได้พยามยามแยกเอาเอนไซม์นี้จากเซลล์ไลน์ของมนุษย์โดยใช้วิธีทางชีวเคมีพื้นฐาน คือเลี้ยงเซลล์ในปริมาณมากจากนั้นทำการแตกเซลล์แล้วแยกเอาเอนไซม์ที่ต้องการออกมาโดยใช้ เทคนิค conventional chromatography วิธีนี้ค่อนข้างจะใช้ทรัพยากรณ์มาก กระบวนการทำบริสุทธิ์ก็ประกอบไปด้วยหลายขั้นตอนอันจะนำมาซึ่งโอกาสที่จะสูญเสียเอนไซม์เนื่องจากลักษณะของเทคนิคเอง อีกทั้งยังรวมไปถึงการได้ผลผลิตในปริมาณที่ต่ำเมื่อผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์หลายขั้นตอน แต่เมื่อต้นทุนการผลิตนั้นสูงเพราะต้องใช้จ่ายในการเลี้ยงเซลล์ในปริมาณมาก นักวิทยาศาสตร์ยุคต่อมาจึงได้พยายามพัฒนาเทคนิคทางเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมเพื่อเป็นการทั้งลดต้นทุนในการผลิตและยังให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย ได้มีกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มได้นำเอาประโยชน์ของเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมต่างๆมาใช้เพื่อผลิตเอนไซม์ DNA ligase ในปริมาณมากโดยผ่านระบบการแสดงออกต่างๆ (expression system) ในปี 2004 กลุ่มวิจัยของ Rolland J. ได้ทำการโคลนยีน DNA ligase จากแบคทีเรียทนร้อน *Thermococcus fumicolans* เข้าสู่ระบบการแสดงออก pET-26b(+) ในปีต่อมา Wilson A. และคณะ ได้โคลนยีนประเภทเดียวกันนี้จาก *Escherichia coli* เข้าสู่ pET-16b และทำการปรับปรุงให้การแสดงออกดีขึ้นบนระบบ pTrc99A อย่างไรก็ดีระบบการแสดงออกของ pET นี้ยังถูกใช้สำหรับยีนที่แยกมาจาก *Staphylothermus marinus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มอาเคียแบคทีเรีย (Archaeabacteria) ที่อาศัยในทะเล (Seo M.S. และคณะ, 2007) นอกจากนี้แล้ว ระบบการแสดงออกอื่นที่นอกเหนือจากระบบ pET ก็ยังถูกนำมาใช้งาน เช่น ระบบ pCOLD ซึ่งถูกใช้ในการแสดงออกของยีนที่แยกได้จาก *Entamoeba histolytica* (Cardona-Felix C.S. และคณะ, 2010) ข้อดีของระบบ pCOLD นี้คือสามารถใช้งานได้ดีเมื่อใช้อุณหภูมิต่ำสำหรับการแสดงออก อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน ระบบของ pET ก็ยังถือเป็นระบบที่ได้รับความนิยม ยังคงมีการนำยีนจาก *Methanocaldocossus janaschii* ซึ่งเป็นอาเคียแบคทีเรียที่แยกมาจากทะเลลึก เข้ามาแสดงออกบน pET28a (Wang Y. และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากระบบที่ได้ยกมาเป็นตัวอย่างนี้ ต่างก็ถือว่าได้ใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมเพื่อผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก อีกทั้งระบบที่ได้มีการถูกใช้อย่างหลากหลายตั้งแต่อดีตจนถึงยุคปัจจุบันนั้น ซึ่งสามารถใช้ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ จะเห็นได้ว่าการศึกษาครั้งนี้ถือว่ามีศักยภาพอย่างสูงที่จะผลิตเป็นเอนไซม์เพื่อการใช้งานอีกทั้งยังใช้ศึกษาเชิงลึกได้อีกด้วย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Microcentrifuge tube
2. Centrifuge
3. Autoclave
4. Spectrophotometer
5. Agarose gel electrophoresis chamber
6. Sequencer
7. Gel doc
8. Incubator shaker

3.2 สารเคมี

1. DNA primer
2. Pfu polymerase
3. Agarose
4. Tris
5. Acetic acid
6. EDTA
7. Ethidium bromide
8. NdeI restriction enzyme
9. XhoI restriction enzyme
10. pET22b(+) vector
11. T4 DNA ligase
12. Agar
13. Peptone
14. Yeast extract
15. Sodium chloride
16. Ampicillin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนสำหรับใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase Chain Reaction, PCR) โดยจะมีการเติมตำแหน่งจดจำการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะไว้ที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์แต่ละข้างเพื่อความสะดวกในการโคลนยีน

>slr1209

ATGACCACCC CCGATCGCCT ATTGCAACTG CGCCAACAAC TCCAAAAAGC CAGCTACGCC
TACTATGTAC TGGATGCGCC GGTCATGGAG GACAGCGTTT ACGACCAGCT TTACCGGGAA
CTGCAAAGGC TAGAGGCAGA AAATCCGGAG TTAATTACCC CCGACAGTCC GACCCAACGA
GTGGGGGAGC AACCGGCCAG TCAGTTCCGC TCTGTTGCCC ATAATATTCC CCTCTACAGC
CTAGAAAATG CCTTTAATGT GCAGGAATTA CAACAGTGGC AAGAACGCTG GCAACGCATT
GCCCCAACCA TCGAAAAGGC TGAATACGTC TGTGAGCTAA AAATTGACGG CTCGGCGATC
GCCCTGACCT ATGAGAATGG TTTGTTGGTG CGGGGGGTAA CTAGGGGAGA CGGCACCACC
GGGGAAGAAA TTAGCCAAAA TATTAAAACC ATTCGATCCA TTCCCGTGAA GCTTAATTTA
GATAATCCTC CCCCAACGGT GGAAGTGAGG GGGGAAGCCT TTTTGCCCCT AGAAGAATTT
AATCGTATTA ATCACGAGCG GGAAGCCCAG GGAGAAAGCT TATTTGCCAA TCCCCGTAAT
GCCGCCGCCG GTACTCTCCG TCAGTTGGAC CCCAAAATAG TCCACCAAAG ACGCTTACAA
TTTTTTGCCT ATACGCTCCA TTTACCAGGG CAAGAAGACA AAATCCAAAG TCAATGGCAA
GCTTTGGAAT ATCTCAAAAA AGCTGGCTTT ATGGTTAATC CCCATTGTCA GCTCTGTAAA
GGTTTAGATG AAGTAGTGGC ATATTTTGAA GACTGGGAAG GCGCCCGGCA ACGCTTACCC
TATATGACCG ACGGGGTGGT GGTGAAAATT AATCAGTATC CCCTGCAAAG AGAGTTAGGC
TTCACCCAAA AATTTCCCCG CTGGGCGATC GCCTTAAAAT ATCCTGCCGA AGAAACCCCC
ACCGTAGTCA AAGCCATTGA AGTTAATGTG GGCCGCACCG GCGCAGTCAC CCCCCTAGCC
GTGATGGAGC CAGTACAGTT AGCCGGCACC ACGGTACAAA GAGCCACTCT GCATAACCAA
GACCGCATCC AAGAATTAGA TATCCGGGTG GGGGACACGG TAATTATTCG CAAAGCAGGG
GAAATTATCC CCGAAGTGGT CCGGGTAATG ACAGAATTGC GCCCGGAAAA CACCACCCCC
TACATTTTTC CTTCCCATTG CCCGGCCTGT GGTTCCCCCT TGGTCCGACC CCTGGAAGAA
GCTGTCATCC GTTGTGTCAA TAGTTCCTGC TCCGCTATTT TGCAAGGCAG TTTAATTCAC
TGGGCTAGCC GCAACGCTTT GGATATCCAG GGTTTGGGGG AAAAAGTTGT GATTACGCTC
TTGGAAAATC GGTTAGTCAA CTCCGTTGCT GATTTATATG GTTTACAGGT GGAGCAGTTG
TTAGGATTAG AACGTTTTGC CCAAAAATCC GCCGAAAAAT TAATTGCCGC CATTGAAGTT
AGCAAAAGCC AACCCTGGAG CCGCATTTTA TTTGGCTTAG GTATCCGCCA TGTGGGCCAG
GTAAATGCCA AATTACTCAG CCAACAGTTT CCCACCGTGG AAAAACTAAG CCAAGCCAGC
ATTCCCGACC TGGAAGGAGT CTATGGCATT GGCCCAGAAA TTGCCGAAGC CGTGGTTAAT
TGGTTCAGGA ACCCCGGTAA TCAACAATTA ATTCAAGATT TAGAGGAGTT GGGTTTAGTA
TTGGCAAACC AAGGGATTGA CCAGACCAAA ACTGACAGCG GCAAGTTAAA GGGCAAAACC
TTTGTGTTAA CCGGGACTTT GCCCAACCTT AGTCGCCTAG AAGCTCAGGA ATTAATTGAA
CAGAGCGGCG GTAAAGTAAC CAGCAGTGTA AGTACCAAAA CTGATTATGT TCTCTTGGGA
GATAAACCAG GAAGTAAGGC CGCCAAGGCG GAAAGTTTGG GCATCAAGTT ACTATCTGAG
GCGGAGTTTT TACAATTGTT GGAGCCGTAG

โดยที่บริเวณสีเทาคือบริเวณที่มีการออกแบบให้ไพรเมอร์เข้าจับกับยีนได้โดยที่ในส่วนเริ่มต้นของยีนนั้น ไพร์เมอร์จะมีการเพิ่มตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และในไพร์เมอร์ที่จับกับส่วนปลายของยีนจะมีการเติมตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 เพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จะถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยา PCR โดยที่ในปฏิกิริยาจะประกอบด้วยองค์ประกอบดังนี้

10X Pfu buffer	5	ul
10 mM mixed dNTP	1	ul
10 uM Forward primer	3	ul
10 uM Reverse primer	3	ul
gDNA	5	ng
Pfu polymerase	2	unit
Water	up to 50 ul	

รอบของ PCR ที่ใช้ เป็นดังต่อไปนี้

1. 94 °C	3	min
2. 94 °C	30	sec
3. 50-65 °C	30	sec
4. 72 °C	4	min

5. วนกลับไปที่ขั้นที่ 2. อีกทั้งหมด 29 รอบ

6. 72 °C	10	min

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิต PCR ที่ได้ จะถูกนำมาแยกในวุ้น Agarose จากนั้นทำการตัดเนื้อวุ้นเพื่อแยกเอาชิ้นดีเอนเอที่มีขนาดตามที่ต้องการออกมาใช้งาน

3. ตัดชิ้นดีเอนเอดังกล่าว ด้วยเอนไซมตัดจำเพาะ และในขณะเดียวกันก็ตัดระบบเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับแสดงออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน นั่นคือ ทั้งชิ้นผลผลิต PCR และ pET22b(+) จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* จากนั้นทำการแยกดีเอนเอทั้งสองชิ้นนี้ในวุ้น Agarose อีกครั้งเพื่อกำจัดชิ้นดีเอนเอขนาดเล็กที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4. เชื่อมต่อดีเอนเอสองเส้นนี้เข้าด้วยกัน จากนั้นส่งดีเอนเอลูกผสมเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอนเอที่ต้องการ ทำการสกัดแล้วส่งตรวจสอบความถูกต้องด้วยการส่งทำการหาลำดับเบส (DNA Sequencing)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การสืบค้นข้อมูลดีเอนเอจากฐานข้อมูลดีเอนเอ

ได้มีการค้นคว้าหาลำดับเบสของยีนสำหรับสร้างเอนไซม์เชื่อมต่อดีเอนเอ (DNA ligase) ของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803 จากเวบไซต์ฐานข้อมูลยีนของไซยาโนแบคทีเรีย (http://genome.microbedb.jp/cyanobase/) จากฐานข้อมูลดังกล่าว พบว่ายีนนี้ถูกตั้งชื่อว่า sll1209 อันมีขนาด 2,010 นิวคลีโอไทด์ วางตัวอยู่บนโครโมโซมในตำแหน่งที่ 10,622 ถึง 12,631 ยีนนี้หากถูกแปลรหัสให้เป็นโปรตีน จะได้โปรตีนที่มีขนาด 699 กรดอะมิโน จากการทำนายน้ำหนักโมเลกุลด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์พบว่าโปรตีนนี้มีขนาด 74,602.0156 ดาลตัน พร้อมทั้งได้ทำนายค่า Isoelectric point (pI) คือ 5.59 (http://protcalc.sourceforge.net/cgi-bin/protcalc) ค่าการทำนายต่างๆเหล่านี้จะสามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลที่เอื้ออำนวยต่อการต่อยอดงานวิจัยชิ้นนี้ต่อไป

>slr1209

ATGACCACCC CCGATCGCCT ATTGCAACTG CGCCAACAAC TCCAAAAAGC CAGCTACGCC
TACTATGTAC TGGATGCGCC GGTCATGGAG GACAGCGTTT ACGACCAGCT TTACCGGGAA
CTGCAAAGGC TAGAGGCAGA AAATCCGGAG TTAATTACCC CCGACAGTCC GACCCAACGA
GTGGGGGAGC AACCGGCCAG TCAGTTCCGC TCTGTTGCCC ATAATATTCC CCTCTACAGC
CTAGAAAATG CCTTTAATGT GCAGGAATTA CAACAGTGGC AAGAACGCTG GCAACGCATT
GCCCCAACCA TCGAAAAGGC TGAATACGTC TGTGAGCTAA AAATTGACGG CTCGGCGATC
GCCCTGACCT ATGAGAATGG TTTGTTGGTG CGGGGGGTAA CTAGGGGAGA CGGCACCACC
GGGGAAGAAA TTAGCCAAAA TATTAAAACC ATTCGATCCA TTCCCGTGAA GCTTAATTTA
GATAATCCTC CCCCAACGGT GGAAGTGAGG GGGGAAGCCT TTTTGCCCCT AGAAGAATTT
AATCGTATTA ATCACGAGCG GGAAGCCCAG GGAGAAAGCT TATTTGCCAA TCCCCGTAAT
GCCGCCGCCG GTACTCTCCG TCAGTTGGAC CCCAAAATAG TCCACCAAAG ACGCTTACAA
TTTTTTGCCT ATACGCTCCA TTTACCAGGG CAAGAAGACA AAATCCAAAG TCAATGGCAA
GCTTTGGAAT ATCTCAAAAA AGCTGGCTTT ATGGTTAATC CCCATTGTCA GCTCTGTAAA
GGTTTAGATG AAGTAGTGGC ATATTTTGAA GACTGGGAAG GCGCCCGGCA ACGCTTACCC
TATATGACCG ACGGGGTGGT GGTGAAAATT AATCAGTATC CCCTGCAAAG AGAGTTAGGC
TTCACCCAAA AATTTCCCCG CTGGGCGATC GCCTTAAAAT ATCCTGCCGA AGAAACCCCC
ACCGTAGTCA AAGCCATTGA AGTTAATGTG GGCCGCACCG GCGCAGTCAC CCCCCTAGCC
GTGATGGAGC CAGTACAGTT AGCCGGCACC ACGGTACAAA GAGCCACTCT GCATAACCAA
GACCGCATCC AAGAATTAGA TATCCGGGTG GGGGACACGG TAATTATTCG CAAAGCAGGG
GAAATTATCC CCGAAGTGGT CCGGGTAATG ACAGAATTGC GCCCGGAAAA CACCACCCCC
TACATTTTTC CTTCCCATTG CCCGGCCTGT GGTTCCCCCT TGGTCCGACC CCTGGAAGAA
GCTGTCATCC GTTGTGTCAA TAGTTCCTGC TCCGCTATTT TGCAAGGCAG TTTAATTCAC
TGGGCTAGCC GCAACGCTTT GGATATCCAG GGTTTGGGGG AAAAAGTTGT GATTACGCTC
TTGGAAAATC GGTTAGTCAA CTCCGTTGCT GATTTATATG GTTTACAGGT GGAGCAGTTG
TTAGGATTAG AACGTTTTGC CCAAAAATCC GCCGAAAAAT TAATTGCCGC CATTGAAGTT
AGCAAAAGCC AACCCTGGAG CCGCATTTTA TTTGGCTTAG GTATCCGCCA TGTGGGCCAG
GTAAATGCCA AATTACTCAG CCAACAGTTT CCCACCGTGG AAAAACTAAG CCAAGCCAGC
ATTCCCGACC TGGAAGGAGT CTATGGCATT GGCCCAGAAA TTGCCGAAGC CGTGGTTAAT
TGGTTCAGGA ACCCCGGTAA TCAACAATTA ATTCAAGATT TAGAGGAGTT GGGTTTAGTA
TTGGCAAACC AAGGGATTGA CCAGACCAAA ACTGACAGCG GCAAGTTAAA GGGCAAAACC
TTTGTGTTAA CCGGGACTTT GCCCAACCTT AGTCGCCTAG AAGCTCAGGA ATTAATTGAA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CAGAGCGGCG GTAAAGTAAC CAGCAGTGTA AGTACCAAAA CTGATTATGT TCTCTTGGGA
GATAAACCAG GAAGTAAGGC CGCCAAGGCG GAAAGTTTGG GCATCAAGTT ACTATCTGAG
GCGGAGTTTT TACAATTGTT GGAGCCGTAG

4.2 การออกแบบไพร์เมอร์จับจำเพาะ

เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่จะโคลนเข้ากับระบบแสดงออก จึงต้องอาศัยการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอนเอที่ต้องการผ่านวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) อย่างไรก็ดี ชิ้นยีนที่เพิ่มปริมาณผ่านการ PCR นั้น จะต้องถูกเชื่อมต่อเข้ากับดีเอนเอของระบบแสดงออก pET22b(+) ดังนั้นจึงต้องมีการเติมลำดับดีเอนเอที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่ออำนวยความสะดวกแก่การเชื่อมต่อดีเอนเอทั้งสองชิ้นนี้เข้าด้วยกัน

Forward primer นั้นจะมีการเติมตำแหน่ง NdeI พร้อมทั้งเพิ่มลำดับอีก 3 นิวคลีโอไทด์เพื่อให้ NdeI เข้าเกาะได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในส่วนของ Reverse primer นั้นจะมีการเติมตำแหน่งตัด XhoI พร้อมทั้งตำแหน่งเกาะของเอนไซม์นี้อีก 4 นิวคลีโอไทด์

>slr1209

ATGACCACCC CCGATCGCCT ATTGCAACTG CGCCAACAAC TCCAAAAAGC CAGCTACGCC
TACTATGTAC TGGATGCGCC GGTCATGGAG GACAGCGTTT ACGACCAGCT TTACCGGGAA
CTGCAAAGGC TAGAGGCAGA AAATCCGGAG TTAATTACCC CCGACAGTCC GACCCAACGA
GTGGGGGAGC AACCGGCCAG TCAGTTCCGC TCTGTTGCCC ATAATATTCC CCTCTACAGC
CTAGAAAATG CCTTTAATGT GCAGGAATTA CAACAGTGGC AAGAACGCTG GCAACGCATT
GCCCCAACCA TCGAAAAGGC TGAATACGTC TGTGAGCTAA AAATTGACGG CTCGGCGATC
GCCCTGACCT ATGAGAATGG TTTGTTGGTG CGGGGGGTAA CTAGGGGAGA CGGCACCACC
GGGGAAGAAA TTAGCCAAAA TATTAAAACC ATTCGATCCA TTCCCGTGAA GCTTAATTTA
GATAATCCTC CCCCAACGGT GGAAGTGAGG GGGGAAGCCT TTTTGCCCCT AGAAGAATTT
AATCGTATTA ATCACGAGCG GGAAGCCCAG GGAGAAAGCT TATTTGCCAA TCCCCGTAAT
GCCGCCGCCG GTACTCTCCG TCAGTTGGAC CCCAAAATAG TCCACCAAAG ACGCTTACAA
TTTTTTGCCT ATACGCTCCA TTTACCAGGG CAAGAAGACA AAATCCAAAG TCAATGGCAA
GCTTTGGAAT ATCTCAAAAA AGCTGGCTTT ATGGTTAATC CCCATTGTCA GCTCTGTAAA
GGTTTAGATG AAGTAGTGGC ATATTTTGAA GACTGGGAAG GCGCCCGGCA ACGCTTACCC
TATATGACCG ACGGGGTGGT GGTGAAAATT AATCAGTATC CCCTGCAAAG AGAGTTAGGC
TTCACCCAAA AATTTCCCCG CTGGGCGATC GCCTTAAAAT ATCCTGCCGA AGAAACCCCC
ACCGTAGTCA AAGCCATTGA AGTTAATGTG GGCCGCACCG GCGCAGTCAC CCCCCTAGCC
GTGATGGAGC CAGTACAGTT AGCCGGCACC ACGGTACAAA GAGCCACTCT GCATAACCAA
GACCGCATCC AAGAATTAGA TATCCGGGTG GGGGACACGG TAATTATTCG CAAAGCAGGG
GAAATTATCC CCGAAGTGGT CCGGGTAATG ACAGAATTGC GCCCGGAAAA CACCACCCCC
TACATTTTTC CTTCCCATTG CCCGGCCTGT GGTTCCCCCT TGGTCCGACC CCTGGAAGAA
GCTGTCATCC GTTGTGTCAA TAGTTCCTGC TCCGCTATTT TGCAAGGCAG TTTAATTCAC
TGGGCTAGCC GCAACGCTTT GGATATCCAG GGTTTGGGGG AAAAAGTTGT GATTACGCTC
TTGGAAAATC GGTTAGTCAA CTCCGTTGCT GATTTATATG GTTTACAGGT GGAGCAGTTG
TTAGGATTAG AACGTTTTGC CCAAAAATCC GCCGAAAAAT TAATTGCCGC CATTGAAGTT
AGCAAAAGCC AACCCTGGAG CCGCATTTTA TTTGGCTTAG GTATCCGCCA TGTGGGCCAG
GTAAATGCCA AATTACTCAG CCAACAGTTT CCCACCGTGG AAAAACTAAG CCAAGCCAGC
ATTCCCGACC TGGAAGGAGT CTATGGCATT GGCCCAGAAA TTGCCGAAGC CGTGGTTAAT
TGGTTCAGGA ACCCCGGTAA TCAACAATTA ATTCAAGATT TAGAGGAGTT GGGTTTAGTA
TTGGCAAACC AAGGGATTGA CCAGACCAAA ACTGACAGCG GCAAGTTAAA GGGCAAAACC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
TTTGTGTTAA CCGGGACTTT GCCCAACCTT AGTCGCCTAG AAGCTCAGGA ATTAATTGAA
CAGAGCGGCG GTAAAGTAAC CAGCAGTGTA AGTACCAAAA CTGATTATGT TCTCTTGGGA
GATAAACCAG GAAGTAAGGC CGCCAAGGCG GAAAGTTTGG GCATCAAGTT ACTATCTGAG
GCGGAGTTTT TACAATTGTT GGAGCCGTAG
```

บริเวณสีเทานั้นคือบริเวณที่ Forward primer และ Reverse primer เข้าจับที่บริเวณเริ่มต้นและบริเวณปลายของยีน ตามลำดับ โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้งสองคือ

Forward: 5' GTACATATGATGACCACCCCCGAT 3'

Reverse: 5' GCTCCTCGAGCGGCTCCAACAATTGTAAA 3'

บริเวณที่ขีดเส้นใต้ของไพรเมอร์ทั้งสองคือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และลำดับทางด้านปลาย 5' ก่อนบริเวณจดจำนี้ จะเป็นบริเวณให้เอนไซม์ตัดจำเพาะเข้าจับเพื่อทำการตัดสายในบริเวณที่ขีดเส้นใต้

4.3 การเพิ่มชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่สะดวกแก่การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่สนใจศึกษาได้ในเวลาอันสั้น ในปฏิกิริยาของการทำ PCR นี้จะมีองค์ประกอบและรอบของการทำปฏิกิริยาต่อไปนี้

10X Pfu buffer	5	ul
10 mM mixed dNTP	1	ul
10 uM Forward primer	3	ul
10 uM Reverse primer	3	ul
gDNA	5	ng
Pfu polymerase	2	unit
Water	up to 50 ul	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบของ PCR ที่ใช้ เป็นดังต่อไปนี้

1. 94 °C	3	min
2. 94 °C	30	sec
3. 50-65 °C	30	sec
4. 72 °C	4	min

5. วนกลับไปที่ขั้นที่ 2. อีกทั้งหมด 29 รอบ

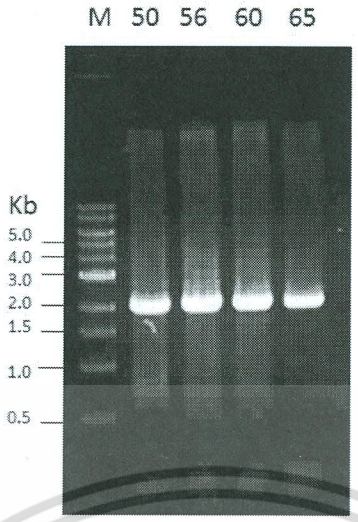
6. 72 °C	10	min

ผลผลิต PCR ที่ได้ จะถูกนำมาแยกในวุ้น Agarose ภายใต้สนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์/15 เซนติเมตร ในอ่างบัฟเฟอร์ TAE (Tris-Acetate-EDTA buffer)

ผลการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ในวุ้น Agarose ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.1 ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่า ยีนดังกล่าวสามารถถูกเพิ่มปริมาณได้ตลอดในช่วงอุณหภูมิของการเข้าจับที่ 50 -65 องศาเซลเซียส ขนาดของชิ้นคาดหวังคือ 2,010 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจากในรูปที่ 3.1 จะเห็นได้ว่าดีเอนเอขนาดประมาณ 2,000 นิวคลีโอไทด์ถูกผลิตขึ้นมาได้จากการทำ PCR ชิ้น วุ้นตรงบริเวณที่เป็นผลผลิต PCR จากทั้ง 4 ช่อง นี้จะถูกตัดออกจากแผ่นใหญ่ เพื่อทำการสกัดเอาดีเอนเอที่อยู่ในเนื้อวุ้นมาทำงานต่อ

ชิ้นดีเอนเอที่ถูกสกัดออกมาจากเนื้อวุ้นนี้จะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดคือ *NdeI* และ *XhoI* เพื่อปรับให้ปลายทั้งด้าน 5' และ 3' ของชิ้นดีเอนเอนี้เหมาะสมแก่การเชื่อมต่อเข้ากับระบบแสดงออก pET22b(+)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ผลผลิต PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis

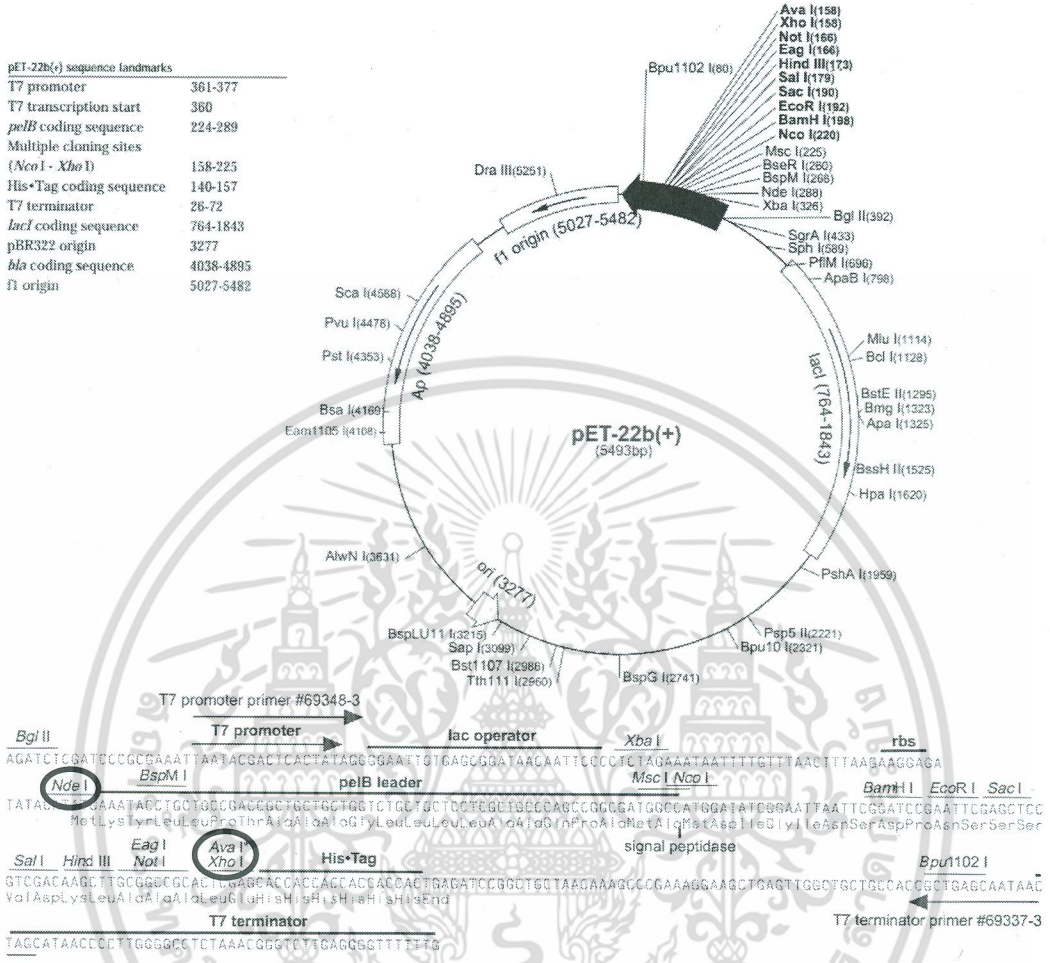
M: DNA marker (1 kb ladder, NEB)

50 – 65: annealing temperature ของ PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การเตรียมดีเอนเอของระบบแสดงออก

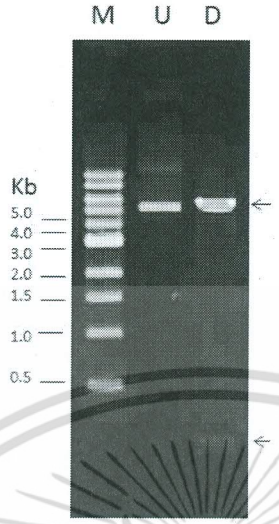
ดีเอนเอเวคเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ pET22b(+) อันมีแผนที่ยีนดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดง pET22b(+) expression vector วงรีแสดงถึงตำแหน่งที่ *NdeI* และ *XhoI* เข้าตัด

ดีเอนเอวงปิดของ pET22b(+) นี้ จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* เพื่อให้มีตำแหน่งพร้อมเชื่อมต่อตรงกับชิ้นดีเอนเอที่ต้องการจะต่อเข้า (ชิ้นจากหัวข้อ 4.3) เมื่อตัด pET22b(+) ได้แล้ว จะทำให้ได้ชิ้นดีเอนเอสองชิ้น ขนาด 5,363 และ 130 คู่เบส ผลการทดลองเป็นไปตามรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ผลการแยกการตัด pET22b(+) ใน 1% agarose gel electrophoresis

M: DNA marker (1 kb ladder, NEB)

U: uncut pET22b(+)

D: digested pET22b(+) with *NdeI* และ *XhoI*

จะเห็นได้ว่า เมื่อทำการตัด pET22b(+) ด้วย *NdeI* และ *XhoI* แล้ว จะให้ชิ้นขนาดประมาณ 5 kb และชิ้นเล็กที่มีขนาดต่ำกว่า 0.5 kb (ดังศรชี้) จากนั้นทำการตัดแถบดีเอนเอขนาดประมาณ 5 kb ของเลน D นี้ออกจากเจล และทำการแยกเอาดีเอนเอในเจลออกมาใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การเชื่อมต่อดีเอนเอสองชิ้นดังกล่าวเข้าเป็นเส้นวงปิดเดียวกัน

เมื่อได้ชิ้นดีเอนเอสองเส้น (จากข้อ 4.3 และ 4.4) ที่มีปลายตัดอันเกิดจากเอนไซม์ชนิดเดียวกันแล้ว ก็จะนำดีเอนเอทั้งสองเส้นนี้มาทำการเชื่อมต่อเข้าด้วยกัน ผ่านการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase

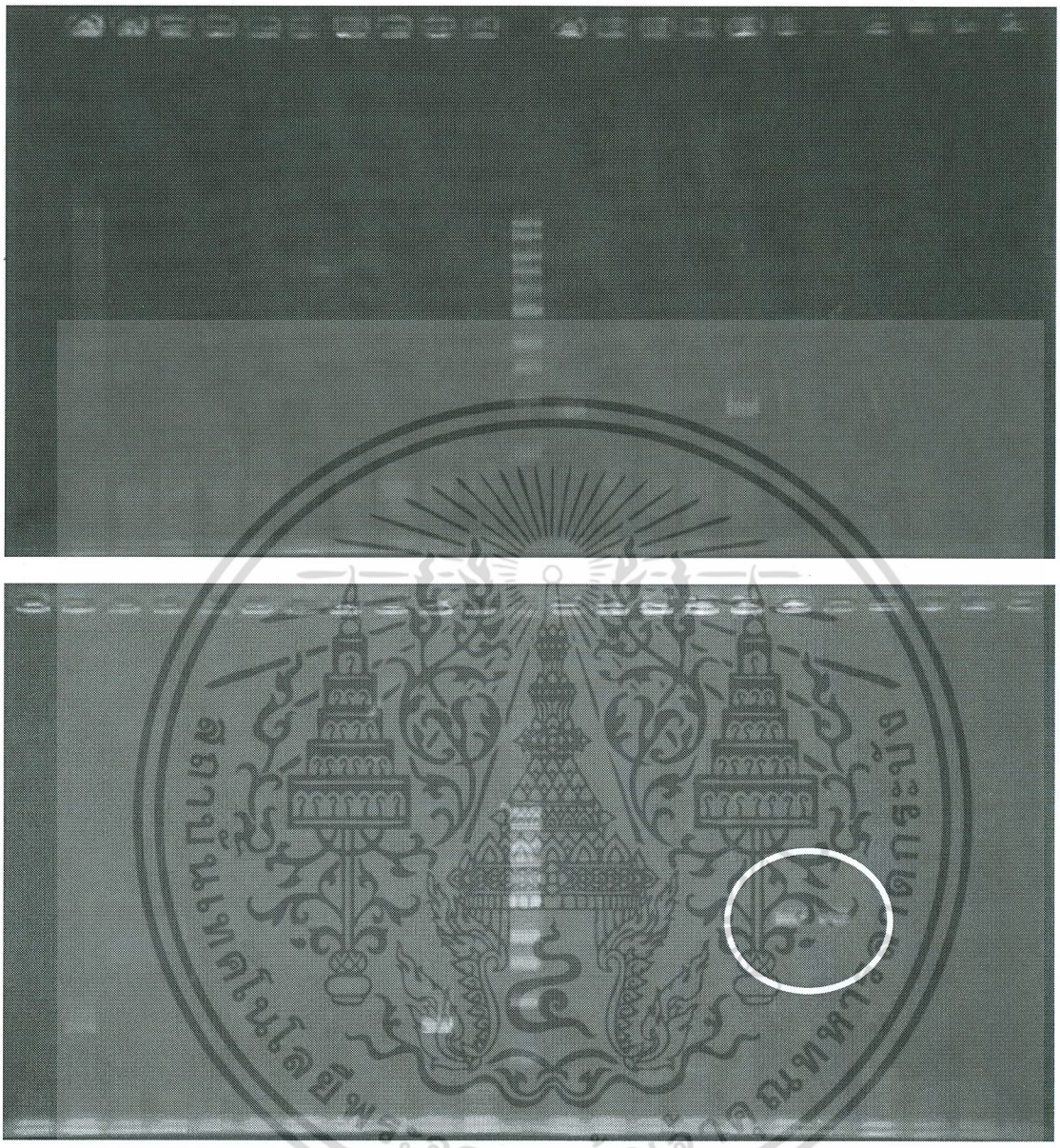
ปฏิกิริยาที่ใช้ในการเชื่อมเส้นดีเอนเอทั้งสองเส้น เป็นดังนี้

10X ligation buffer	2	ul
Digested vector	100	ng
Digested gene	300	ng
T4 DNA ligase	0.2	ul
Water up to	20	ul

จากนั้น transform เข้า *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดด้วยยา Ampicillin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ug/ml โคโลนีที่โตได้นั้น อาจจะมีทั้งพลาสมิดลูกผสมที่ต้องการและไม่ต้องการ ดังนั้นเพื่อเป็นการตรวจสอบ จึงได้มีการทำ colony pcr เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นที่เข้าไปอยู่ใน expression vector ในการทำ colony PCR นี้จะใช้ T7 promotor primer และ T7 terminator primer เป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ เนื่องด้วยไพรเมอร์สองตัวนี้จะจับในช่วงที่มีชิ้นดีเอนเอแทรกกลางอยู่ระหว่างตำแหน่งของ *NdeI* และ *XhoI* ดังนั้นขนาดที่ต้องการก็จะมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 2.2 kb

การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการทำ colony PCR ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



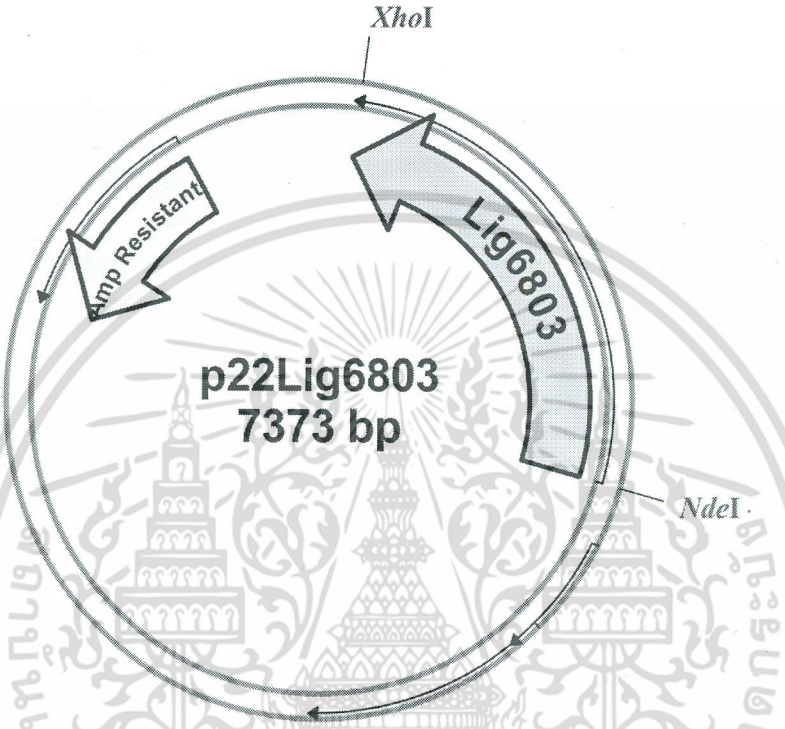
รูปที่ 4.4 ผลการทำ colony PCR จากทั้งหมด 44 colonies

ผลการทำ colony PCR ดังรูปที่ 4.4 พบว่า ใน 44 โคโลนีที่ตรวจสอบ มีเพียง 2 โคโลนีเท่านั้น (ดังในวงกลมของรูปที่ 4.4) ที่มีขนาดของชิ้นแทรกกลางระหว่าง *NdeI* และ *XhoI* เป็นไปตามที่คาดหวัง อย่างไรก็ดี สองโคโลนีนี้จะต้องถูกตรวจสอบความถูกต้องของลำดับดีเอนเอที่แทรกตัวอยู่ โดยการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การหาลำดับเบสของดีเอนเอลูกผสม

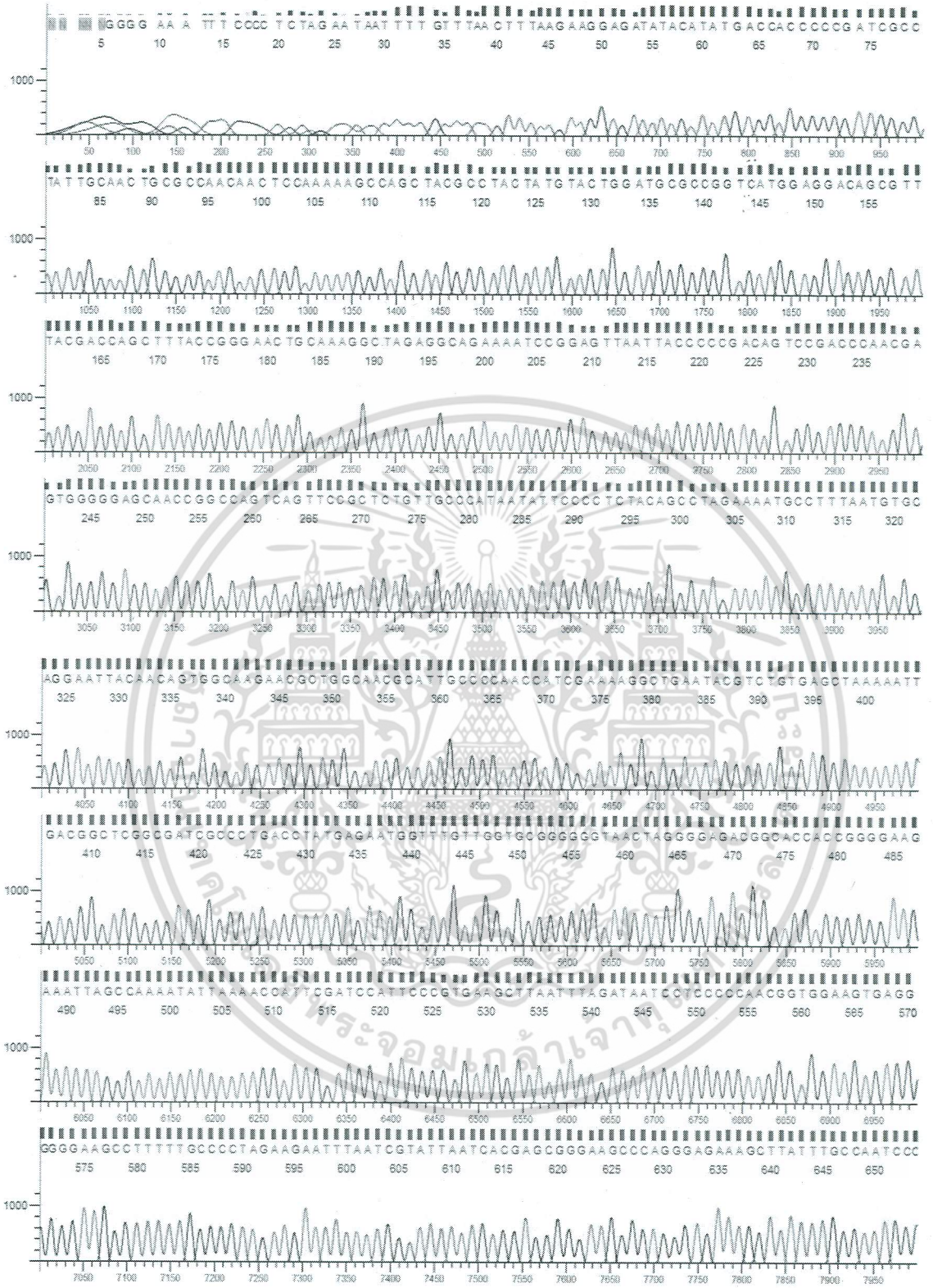
ดีเอนเอที่เป็นลูกผสมอันเกิดจากชิ้นยีนที่ศึกษา (sll1209) และดีเอนเอของระบบแสดงออก (pet22b(+)) นี้ได้ถูกตั้งชื่อใหม่ว่า p22lig6803 (ดังแสดงตามรูปที่ 4.5)



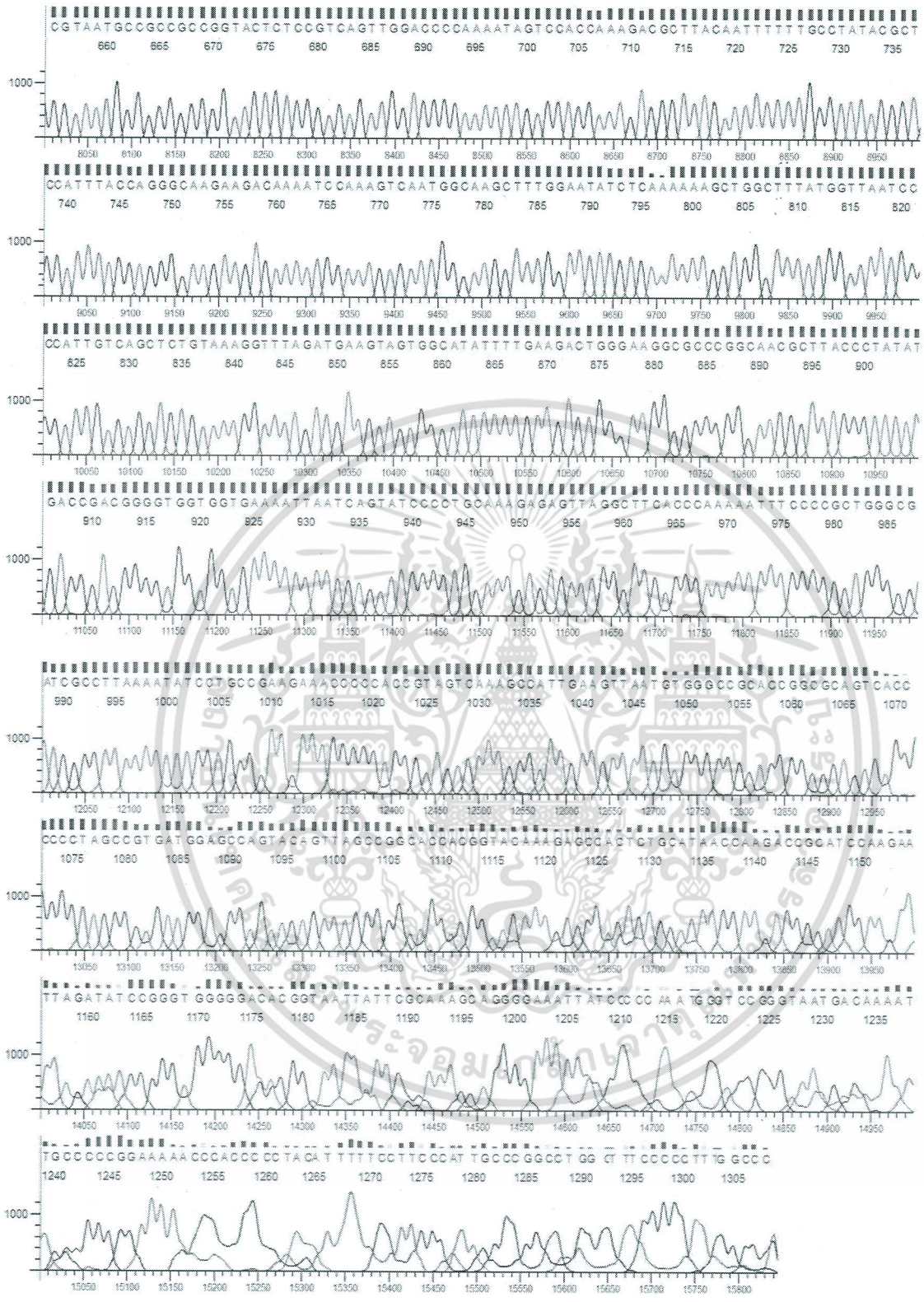
รูปที่ 4.5 แผนที่ยีนของ p22Lig6803 เพื่อแสดงตำแหน่งและทิศทางของชิ้นยีนที่วางตัวอยู่ในดีเอนเอของระบบแสดงออก

ความถูกต้องของลำดับเบสทั้งหมดของชิ้น sll1209 ถูกส่งไปทำการตรวจสอบด้วยวิธี DNA sequencing รูปที่ 4.6 แสดงผลของการหาลำดับเบสของ p22Lig6803 บริเวณที่มีชิ้น sll1209 แทรกตัวอยู่ ผลการตรวจสอบพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมีความถูกต้องและตรงกับฐานข้อมูลที่ได้แสดงลำดับของนิวคลีโอไทด์เอาไว้ 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองนี้ได้ยืนยันว่าการส่งชิ้นยีน sll1209 เข้าสู่ระบบแสดงออก pET22b(+) นั้นมีความถูกต้องและสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4.6 แผนภาพยืนยันการหาลำดับเบสของ p22Lig6803 เป็นไปอย่างถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากการหาลำดับของ p22Lig6803 นั้น ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน sll1209 ในฐานข้อมูลดีเอนเอไซยาโนแบคทีเรีย ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองเส้นนี้ได้ถูกเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม clustal W ซึ่งผลการเปรียบเทียบได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.7 พบว่าลำดับมีความเหมือนกันอย่างสมบูรณ์ อีกทั้งยังเห็นด้วยว่าบริเวณปลายของ p22Lig6803 นั้น ได้มีตำแหน่งที่จะแปลรหัสให้เป็นกรดอะมิโน cyctein เพื่ออำนวยความสะดวกสำหรับการทำบริสุทธิ์โปรตีนต่อไป

```
                 10         20         30         40         50         60         70         80
p22Lig6803   ATGACCACCC CCGATCGCCT ATTGCAACTG CGCCAACAAC TCCAAAAAGC CAGCTACGCC TACTATGTAC TGGATGCGCC
sll1209      ATGACCACCC CCGATCGCCT ATTGCAACTG CGCCAACAAC TCCAAAAAGC CAGCTACGCC TACTATGTAC TGGATGCGCC

                 90        100        110        120        130        140        150        160
p22Lig6803   GGTCATGGAG GACAGCGTTT ACGACCAGCT TTACCGGGAA CTGCAAAGGC TAGAGGCAGA AAATCCGGAG TTAATTACCC
sll1209      GGTCATGGAG GACAGCGTTT ACGACCAGCT TTACCGGGAA CTGCAAAGGC TAGAGGCAGA AAATCCGGAG TTAATTACCC

                170        180        190        200        210        220        230        240
p22Lig6803   CCGACAGTCC GACCCAACGA GTGGGGGAGC AACCGGCCAG TCAGTTCCGC TCTGTTGCCC ATAATATTCC CCTCTACAGC
sll1209      CCGACAGTCC GACCCAACGA GTGGGGGAGC AACCGGCCAG TCAGTTCCGC TCTGTTGCCC ATAATATTCC CCTCTACAGC

                250        260        270        280        290        300        310        320
p22Lig6803   CTAGAAAATG CCTTTAATGT GCAGGAATTA CAACAGTGGC AAGAACGCTG GCAACGCATT GCCCCAACCA TCGAAAAGGC
sll1209      CTAGAAAATG CCTTTAATGT GCAGGAATTA CAACAGTGGC AAGAACGCTG GCAACGCATT GCCCCAACCA TCGAAAAGGC

                330        340        350        360        370        380        390        400
p22Lig6803   TGAATACGTC TGTGAGCTAA AAATTGACGG CTCGGCGATC GCCCTGACCT ATGAGAATGG TTTGTTGGTG CGGGGGGTAA
sll1209      TGAATACGTC TGTGAGCTAA AAATTGACGG CTCGGCGATC GCCCTGACCT ATGAGAATGG TTTGTTGGTG CGGGGGGTAA

                410        420        430        440        450        460        470        480
p22Lig6803   CTAGGGGAGA CGGCACCACC GGGGAAGAAA TTAGCCAAAA TATTAAAACC ATTCGATCCA TTCCCGTGAA GCTTAATTTA
sll1209      CTAGGGGAGA CGGCACCACC GGGGAAGAAA TTAGCCAAAA TATTAAAACC ATTCGATCCA TTCCCGTGAA GCTTAATTTA

                490        500        510        520        530        540        550        560
p22Lig6803   GATAATCCTC CCCCAACGGT GGAAGTGAGG GGGGAAGCCT TTTTGCCCCT AGAAGAATTT AATCGTATTA ATCACGAGCG
sll1209      GATAATCCTC CCCCAACGGT GGAAGTGAGG GGGGAAGCCT TTTTGCCCCT AGAAGAATTT AATCGTATTA ATCACGAGCG

                570        580        590        600        610        620        630        640
p22Lig6803   GGAAGCCCAG GGAGAAAGCT TATTTGCCAA TCCCCGTAAT GCCGCCGCCG GTACTCTCCG TCAGTTGGAC CCCAAAATAG
sll1209      GGAAGCCCAG GGAGAAAGCT TATTTGCCAA TCCCCGTAAT GCCGCCGCCG GTACTCTCCG TCAGTTGGAC CCCAAAATAG

                650        660        670        680        690        700        710        720
p22Lig6803   TCCACCAAAG ACGCTTACAA TTTTTTGCCT ATACGCTCCA TTTACCAGGG CAAGAAGACA AAATCCAAAG TCAATGGCAA
sll1209      TCCACCAAAG ACGCTTACAA TTTTTTGCCT ATACGCTCCA TTTACCAGGG CAAGAAGACA AAATCCAAAG TCAATGGCAA

                730        740        750        760        770        780        790        800
p22Lig6803   GCTTTGGAAT ATCTCAAAAA AGCTGGCTTT ATGGTTAATC CCCATTGTCA GCTCTGTAAA GGTTTAGATG AAGTAGTGGC
sll1209      GCTTTGGAAT ATCTCAAAAA AGCTGGCTTT ATGGTTAATC CCCATTGTCA GCTCTGTAAA GGTTTAGATG AAGTAGTGGC
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      810        820        830        840        850        860        870        880
p22Lig6803      ATATTTTGAA GACTGGGAAG GCGCCCGGCA ACGCTTACCC TATATGACCG ACGGGGTGGT GGTGAAAATT AATCAGTATC
sll1209         ATATTTTGAA GACTGGGAAG GCGCCCGGCA ACGCTTACCC TATATGACCG ACGGGGTGGT GGTGAAAATT AATCAGTATC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      890        900        910        920        930        940        950        960
p22Lig6803      CCCTGCAAAG AGAGTTAGGC TTCACCCAAA AATTTCCCCG CTGGGCGATC GCCTTAAAAT ATCCTGCCGA AGAAACCCCC
sll1209         CCCTGCAAAG AGAGTTAGGC TTCACCCAAA AATTTCCCCG CTGGGCGATC GCCTTAAAAT ATCCTGCCGA AGAAACCCCC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      970        980        990       1000       1010       1020       1030       1040
p22Lig6803      ACCGTAGTCA AAGCCATTGA AGTTAATGTG GGCCGCACCG GCGCAGTCAC CCCCCTAGCC GTGATGGAGC CAGTACAGTT
sll1209         ACCGTAGTCA AAGCCATTGA AGTTAATGTG GGCCGCACCG GCGCAGTCAC CCCCCTAGCC GTGATGGAGC CAGTACAGTT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1050       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
p22Lig6803      AGCCGGCACC ACGGTACAAA GAGCCACTCT GCATAACCAA GACCGCATCC AAGAATTAGA TATCCGGGTG GGGGACACGG
sll1209         AGCCGGCACC ACGGTACAAA GAGCCACTCT GCATAACCAA GACCGCATCC AAGAATTAGA TATCCGGGTG GGGGACACGG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190       1200
p22Lig6803      TAATTATTCG CAAAGCAGGG GAAATTATCC CCGAAGTGGT CCGGGTAATG ACAGAATTGC GCCCGGAAAA CACCACCCCC
sll1209         TAATTATTCG CAAAGCAGGG GAAATTATCC CCGAAGTGGT CCGGGTAATG ACAGAATTGC GCCCGGAAAA CACCACCCCC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1210       1220       1230       1240       1250       1260       1270       1280
p22Lig6803      TACATTTTTC CTTCCCATTG CCCGGCCTGT GGTTCCCCCT TGGTCCGACC CCTGGAAGAA GCTGTCATCC GTTGTGTCAA
sll1209         TACATTTTTC CTTCCCATTG CCCGGCCTGT GGTTCCCCCT TGGTCCGACC CCTGGAAGAA GCTGTCATCC GTTGTGTCAA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1290       1300       1310       1320       1330       1340       1350       1360
p22Lig6803      TAGTTCCTGC TCCGCTATTT TGCAAGGCAG TTTAATTCAC TGGGCTAGCC GCAACGCTTT GGATATCCAG GGTTTGGGGG
sll1209         TAGTTCCTGC TCCGCTATTT TGCAAGGCAG TTTAATTCAC TGGGCTAGCC GCAACGCTTT GGATATCCAG GGTTTGGGGG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1370       1380       1390       1400       1410       1420       1430       1440
p22Lig6803      AAAAAGTTGT GATTACGGTC TTGGAAAATC GGTTAGTCAA CTCCGTTGCT GATTTATATG GTTTACAGGT GGAGCAGTTG
sll1209         AAAAAGTTGT GATTACGCTC TTGGAAAATC GGTTAGTCAA CTCCGTTGCT GATTTATATG GTTTACAGGT GGAGCAGTTG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1450       1460       1470       1480       1490       1500       1510       1520
p22Lig6803      TTAGGATTAG AACGTTTTGC CCAAAAATCC GCCGAAAAAT TAATTGCCGC CATTGAAGTT AGCAAAAGCC AACCCTGGAG
sll1209         TTAGGATTAG AACGTTTTGC CCAAAAATCC GCCGAAAAAT TAATTGCCGC CATTGAAGTT AGCAAAAGCC AACCCTGGAG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1530       1540       1550       1560       1570       1580       1590       1600
p22Lig6803      CCGCATTTTA TTTGGCTTAG GTATCCGCCA TGTGGGCCAG GTAAATGCCA AATTACTCAG CCAACAGTTT CCCACCGTGG
sll1209         CCGCATTTTA TTTGGCTTAG GTATCCGCCA TGTGGGCCAG GTAAATGCCA AATTACTCAG CCAACAGTTT CCCACCGTGG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1610       1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
p22Lig6803      AAAAACTAAG CCAAGCCAGC ATTCCCGACC TGGAAGGAGT CTATGGCATT GGCCCAGAAA TTGCCGAAGC CGTGGTTAAT
sll1209         AAAAACTAAG CCAAGCCAGC ATTCCCGACC TGGAAGGAGT CTATGGCATT GGCCCAGAAA TTGCCGAAGC CGTGGTTAAT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750       1760
p22Lig6803      TGGTTCAGGA ACCCCGGTAA TCAACAATTA ATTCAAGATT TAGAGGAGTT GGGTTTAGTA TTGGCAAACC AAGGGATTGA
sll1209         TGGTTCAGGA ACCCCGGTAA TCAACAATTA ATTCAAGATT TAGAGGAGTT GGGTTTAGTA TTGGCAAACC AAGGGATTGA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1770       1780       1790       1800       1810       1820       1830       1840
p22Lig6803      CCAGACCAAA ACTGACAGCG GCAAGTTAAA GGGCAAAACC TTTGTGTTAA CCGGGACTTT GCCCAACCTT AGTCGCCTAG
sll1209         CCAGACCAAA ACTGACAGCG GCAAGTTAAA GGGCAAAACC TTTGTGTTAA CCGGGACTTT GCCCAACCTT AGTCGCCTAG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1850       1860       1870       1880       1890       1900       1910       1920
p22Lig6803      AAGCTCAGGA ATTAATTGAA CAGAGCGGCG GTAAAGTAAC CAGCAGTGTA AGTACCAAAA CTGATTATGT TCTCTTGGGA
sll1209         AAGCTCAGGA ATTAATTGAA CAGAGCGGCG GTAAAGTAAC CAGCAGTGTA AGTACCAAAA CTGATTATGT TCTCTTGGGA
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1930       1940       1950       1960       1970       1980       1990       2000
p22Lig6803      GATAAACCAG GAAGTAAGGC CGCCAAGGCG GAAAGTTTGG GCATCAAGTT ACTATCTGAG GCGGAGTTTT TACAATTGTT
sll1209         GATAAACCAG GAAGTAAGGC CGCCAAGGCG GAAAGTTTGG GCATCAAGTT ACTATCTGAG GCGGAGTTTT TACAATTGTT

                ....|....| ....|....| ..
                      2010       2020
p22Lig6803      GGAGCCGCTC GAGCACCACC AC
sll1209         GGAGCCGTAG ---------- --
```

รูปที่ 4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ p22Lig6803 และ sll1209

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าชิ้นดีเอนเอ sll1209 ได้ถูกเพิ่มปริมาณผ่านวิธีการ PCR ได้อย่างสำเร็จ พร้อมทั้งชิ้นยีนนี้ยังได้ถูกเตรียมให้มีความพร้อมอย่างเหมาะสมแก่การโคลนเข้าสู่ดีเอนเอของระบบแสดงออก

ดีเอนเอของระบบแสดงออก pET22b(+) ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางสำหรับงานแสดงออก รวมถึงงานวิจัยในครั้งนี้ด้วย การเตรียมความพร้อมของดีเอนเอในส่วนนี้ มีความเหมาะสมที่จะรับเอาชิ้นยีน sll1209 เข้ามาแทรกตัวอยู่

การผลิตดีเอนเอลูกผสม p22Lig6803 ทำได้ด้วยความสำเร็จ อีกทั้งได้ทำการตรวจสอบด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นที่เรียบร้อย

ได้มีการเติมตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของ p22Lig6803 เพื่อแปลรหัสให้เป็นกรดอะมิโน cyctein อันจะเหมาะสมแก่การทำบริสุทธิ์โปรตีนต่อไปผ่านการใช้คอลัมน์ Ni-NTA

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเชื่อมต่อเส้นดีเอนเอทั้งสองเส้นเข้าด้วยกัน ดีเอนเอลูกผสมนี้สามารถที่จะนำไปใช้งานต่อในการแสดงออกเอนไซม์ DNA ligase ได้ ซึ่งหากสามารถทำการผลิตโปรตีนดังกล่าวได้ ก็จะเป็นประโยชน์แก่ห้องปฏิบัติการ เนื่องด้วยเอนไซม์ชนิดนี้มีราคาค่อนข้างสูง หากสามารถต่อยอดงานวิจัยชิ้นนี้ได้ ก็จะสามารถเป็นช่องทางหนึ่งในการลดค่าใช้จ่ายในห้องปฏิบัติการทางอนุชีววิทยาและชีววิทยาโมเลกุลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Cardona-Felix, C.S., Pastor-Palacios, G., Cardenas, H., Azuara-Liceaga, E., Brieba, L.G.Biochemical characterization of the DNA ligase I from *Entamoeba histolytica* (2010) Molecular and Biochemical Parasitology, 174 (1), pp. 26-35.

Johnson, A.P., Fairman, M.P.The identification and purification of a novel mammalian DNA ligase (1997) Mutation Research - DNA Repair, 383 (3), pp. 205-212.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (1996) DNA Research, 3 (3), pp. 109-136.

Rolland, J.-L., Gueguen, Y., Persillon, C., Masson, J.-M., Dietrich, J.Characterization of a thermophilic DNA ligase from the archaeon *Thermococcus fumicolans* (2004) FEMS Microbiology Letters, 236 (2), pp. 267-273.

Seo, M.S., Kim, Y.J., Choi, J.J., Lee, M.S., Kim, J.H., Lee, J.-H., Kwon, S.-T.Cloning and expression of a DNA ligase from the hyperthermophilic archaeon *Staphylothermus marinus* and properties of the enzyme (2007) Journal of Biotechnology, 128 (3), pp. 519-530.

Wang, Y., Xie, J.-J., Han, Z., Liu, J.-H., Liu, X.-P.Expression, purification and biochemical characterization of *Methanocaldococcus jannaschii* DNA ligase (2013) Protein Expression and Purification, 87 (2), pp. 79-86. Article in Press.

Wilkinson, A., Smith, A., Bullard, D., Lavesa-Curto, M., Sayer, H., Bonner, A., Hemmings, A., Bowater, R.Analysis of ligation and DNA binding by *Escherichia coli* DNA ligase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(LigA) (2005) Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1749 (1), pp. 113-122.

ฐานข้อมูลพันธุกรรมไซนาโนแบคทีเรีย http://genome.microbedb.jp/cyanobase/

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

งานวิจัยนี้ได้มีการนำไปเสนอในงานนิทรรศการวันวิทยาศาสตร์ประจำปี 2557 ระหว่างวันที่ 25-26 สิงหาคม 2557 ณ หอประชุมจุฬาภรณ์ฯ ในรูปแบบโปสเตอร์ดังรูปด้านล่าง

การโคลนยีนที่พลิตเอนไซม์เชื่อมสายดีเอนเอของสาหร่าย ไซยาโนแบคทีเรีย Synechocystis sp. PCC 6803 สู่ระบบการแสดงออก

เชิดศักดิ์ มหนีรัตนรุ่งโรจน์*
*สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ
ได้มีการโคลนยีนสำหรับพลิตเอนไซม์เชื่อมต่อเส้นดีเอนเอ (DNA ligase) จากสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย Synechocystis sp. PCC 6803 ซึ่งมีรหัสจากฐานข้อมูลไซยาโนเบส คือ sll1209 ชิ้นยีนขนาด 2,010 นิวคลีโอไทด์ ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) จากนั้นโคลนเข้าสู่ระบบแสดงออก pET-22b(+) ที่ตำแหน่ง NdeI และ XhoI ภายใต้กรอบของการแสดงออก จากนั้นลำดับของยีนที่โคลนเข้าระบบแสดงออกนี้ ได้ยืนยันความถูกต้องด้วยการหาลำดับเบส พบว่ามีความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ตามต้นแบบทุกตำแหน่ง ตั้งชื่อพลาสมิดดังกล่าวว่า p22Lig6803

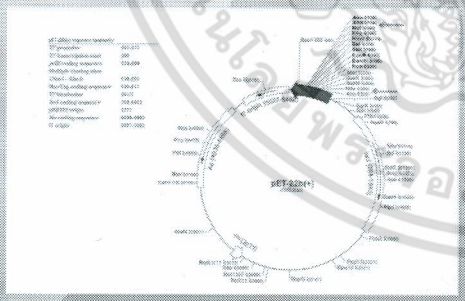
ที่มาและความสำคัญ

เทคนิคหนึ่งในการวิจัยทางพันธุวิศวกรรมคือการเชื่อมต่อเส้นดีเอนเอสองเส้นเข้าด้วยกัน โดยอาศัยเอนไซม์เชื่อมต่อสาย (DNA ligase) อย่างไรก็ดีเอนไซม์ดังกล่าวสามารถหาซื้อได้ทั่วไปในราคาที่สูงหากเราสามารถพลิตเอนไซม์ใช้เองในห้องปฏิบัติการได้ก็จะสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายลงได้

ไซยาโนแบคทีเรีย Synechocystis sp. PCC 6803 เป็นหนึ่งในสิ่งมีชีวิตที่มีการถอดรหัสพันธุกรรมเป็นที่เรียบร้อยสามารถเข้าถึงข้อมูลลำดับยีนได้ที่ฐานข้อมูลไซยาโนเบส (http://genome.microbedb.jp/cyanobase) จึงเป็นฐานข้อมูลที่เอื้ออำนวยให้งานวิจัยเป็นไปด้วยความรวดเร็วยิ่งขึ้น

วิธีทำการทดลอง

ชิ้นยีนที่ต้องการจากในจีโนมจะถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์(Polymerase Chain Reaction) DNA Primer มีลำดับดังต่อไปนี้ Forward: 5'GTACATATGAGA CCACCCCCGAT 3' และ Reverse: 5' GCTCCTCGAGCGGCTCCAACAA TTGTAAA 3' โดยที่บริเวณที่ยีดเส้นใส่ จะเป็นบริเวณให้เอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ XhoI เข้าตัดได้ตามลำดับก่อนจะถูกโคลนเข้าระบบแสดงออกของ pET-22b(+) ที่ตำแหน่งตัดเดียวกันข้อมูล ที่เอื้ออำนวยให้งานวิจัยเป็นไปด้วยความรวดเร็วยิ่งขึ้น

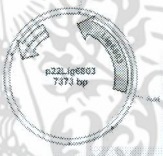


รูปที่ 1 แผนที่ยีนของพลาสมิดแสดงออก pET-22b(+) แผนภาพโคลนยีนตำแหน่งตัด NdeI และ XhoI (สีฟ้า)

พลการทดลอง

สามารถเพิ่มปริมาณยีนยีนได้สำเร็จด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ดังรูปที่ 2

รูปที่2: ผลผลิต PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis M: DNA marker (1 kb ladder, NEB) 50-65: annealing temperature ของ PCR



รูปที่ 3 แผนที่ยีนแสดงผลสำเร็จของการเชื่อมดีเอนเอที่ต้องการ (Lig6803) เข้าสู่ระบบแสดงออก และตั้งชื่อพลาสมิดใหม่นี้คือ p22Lig6803

ชิ้นยีนดังกล่าวได้ถูกโคลนเข้าอย่างถูกตำแหน่งบนระบบแสดงออกดังรูปที่3 และได้ทำการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ดังยืนยันการหาลำดับบางส่วนในรูปที่4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ได้ทำการโคลนยีนเข้าสู่ระบบการแสดงออกได้อย่างถูกต้องและสมบูรณ์ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระบบแสดงออกที่มียีนยีนดังกล่าวนี้พร้อมสำหรับงานในขั้นต่อไปคือการพลิตเป็นเอนไซม์เพื่อใช้งานจริงในระดับของห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายของห้องปฏิบัติการในทางหนึ่งอีกทั้งยังสามารถเป็นจุดเริ่มต้นของการต่อยอดงานวิจัยในลักษณะของการแสดงลักษณะ (Characterization) ของเอนไซม์ที่ได้โคลนเข้าไปสู่ระบบการแสดงออกนี้

กิตติกรรมประกาศ

ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

1. ฐานข้อมูลพันธุกรรมของไซยาโนแบคทีเรีย http://genome.microbedb.jp/cyanobase
2. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปการใช้จ่ายเงิน

	วันที่	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ
ไตรมาสที่ 1 (ต.ค. 56 - ธ.ค. 56)	-	-	-
ไตรมาสที่ 2 (ม.ค. 57 - มี.ค. 57)	25-มี.ค.-57	-	24,454.12
ไตรมาสที่ 3 (เม.ย. 57 - มิ.ย. 57)	-	-	-
ไตรมาสที่ 4 (ก.ค. 57 - ก.ย. 57)	2-ก.ค.-57	-	16,946.66
	5-ส.ค.-57	-	6,009.44
	7-ส.ค.-57	1,468.04	-
	10-ก.ย.-57	-	1,121.74
	รวม	1,468.04	48,531.96

รวมรายจ่าย 50,000.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ไทย) อาจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

   (อังกฤษ) Cherdsak Maneeruttanarungroj, Ph.D.

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 3606 00476 64 4

3. การทำงาน

   ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

   สถานที่ทำงาน สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

   สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง

   จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรณีย์ 10520

   โทรศัพท์ 02-329-8400-11 ต่อ 6243 โทรสาร 02-329-8412

   โทรศัพท์มือถือ 084-662-6149 email: kmcherds@kmitl.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

   ปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ปริญญาเอก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ประสบการณ์งานวิจัย

   1. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยเครื่องหมายพันธุกรรมเชิงโมเลกุล
   2. ศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน
   3. ศึกษากระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในจุลชีพสีเขียว

ผลงานวิจัย

1. **Maneeruttanarungroj, C.**, Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2012) Sulfate permease (SulP) and hydrogenase (HydA) in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551: Dependence of gene expression on sulfur status in the medium. Int J Hydrogen Energ 37:15105-15116. (Impact factor 2010 = 4.053)
2. **Maneeruttanarungroj, C.**, Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2010) A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. Int J Hydrogen Energ 35:13193-13199. (Impact factor 2010 = 4.053)
3. Nzila, A., Rottmann, M., Chitnumsub, P., Kiara, S. M., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Taweechai, S., Yeung, B. K., Goh, A., Lakshminarayana, S. B.,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zou, B., Wong, J., Ma, N. L., Weaver, M., Keller, T. H., Dartois, V., Wittlin, S., Brun, R., Yuthavong, Y. and Diagana, T. T. (2010) Preclinical evaluation of the antifolate QN254, 5-chloro- N060-(2,5-dimethoxy-benzyl)-quinazoline-2,4,6-triamine, as an antimalarial drug candidate. Antimicrob Agents Chemother 54, 2603–2610. (Impact factor 2010 = 4.672)

4. Dasgupta, T., Chitnumsub, P., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Nichols, SE., Lyons, TM., Tirado-Rives, J., Jorgensen, WL., Yuthavong, Y. and Anderson, K.S. (2009) Exploiting structural analysis, *in silico* screening, and serendipity to identify novel inhibitors of drug-resistant *Falciparum* malaria. ACS Chem Biol 4:29–40. (Impact factor 2010 = 5.698)
5. Supungul, P., Tang, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon A. (2008) Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 32, 61–70. (Impact factor 2010 = 3.293)
6. **Maneeruttanarungroj, C.**, Pongsomboon, S., Wuthisuthimethavee, S., Klinbunga, S., Wilson, K.J., Swan, J., Li, Y., Whan, V., Chu, K.H., Li, C.P., Tong, J., Glenn, K., Rothschild, M., Jerry, D. and Tassanakajon, A. (2006) Development of polymorphic expressed sequence tag-derived microsatellites for the extension of the genetic linkage map of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Anim Genet 37, 363–368. (Impact factor 2010 = 2.203)

<u>รางวัลที่เคยได้รับ</u>

1. 25 November 2012
   Best oral presentation award from Young Scientist Program (13th FAOMBM congress). Sirindhorn Science Home, NSTDA, Thailand
2. 20 April 2012
   Best oral presentation award from The Science Forum 2012 (Applies Science and Technology session). Mahamakut Building, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand: April 19 – 20, 2012.
3. 03 April 2011
   Outstanding presentation award from RGJ-Ph.D. Congress XII, Jomtein Palm Beach Resort Pattaya, Chonburi, Thailand.
4. 17 June 2010
   Recognized as best graduate student, Chulalongkorn University, Thailand
5. 21 August 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The excellent graduate student award, the Prof. Dr. Tab Nilanidhi Foundation (the award was presented to the student who received the highest GPA above 3.70 in each department).

6. 13 July 2005
   Outstanding Thesis Award, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้