

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการทดลอง

3.1. วัสดุ

3.1.1. แบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน(host cell)

Escherichia coli DH5 α [$F^- \phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK^- mK^+) phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$]

E. coli K12 JM 109 [($F/ traD36 lacq \Delta (lacZ) M15 proA+B+ /rpsL(Strr) thr leu thi lacY galK gal T ara fhuA dam dcm supE44\Delta (lac-proAB)$)]

3.1.2. ยีสต์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีน

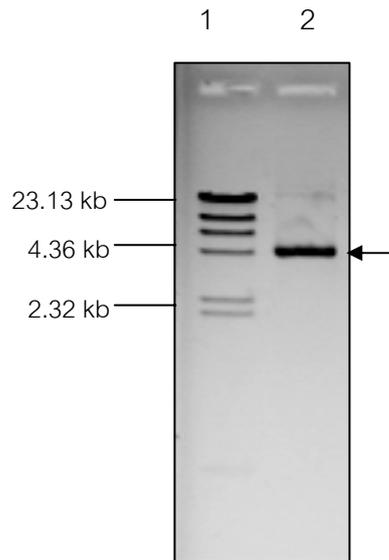
Pichia pastoris KM 71 (*arg4 his4 aox1: : ARG4*)

3.1.3. พลาสมิด

พลาสมิดที่ใช้เป็นต้นแบบในการสร้างยีน phyA170 กลาย คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ สายผสม pPICZ α A-rPhyA170 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเอนไซม์และเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ภาพที่ 3.1 (Promdonkoy et al. 2008)

ภาพที่ 3.1

ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ
สายผสม pPICZ α -rPhyA170 ที่สกัดได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α



Lane ที่ 1: Lamda DNA/HindIII marker (Fermentas) (100 ng)

Lane ที่ 2: พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -rPhyA170

3.2. วิธีการทดลอง

3.2.1. การเลือกตำแหน่งกรดอะมิโนที่ต้องการศึกษา

การเลือกตำแหน่งกรดอะมิโนที่ต้องการศึกษา โดยทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases ระหว่างเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ และการสร้างโครงสร้างสามมิติจำลองของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 จากรายงานการวิจัยของ Tomschy และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษาเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* โดยใช้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 เป็นโครงสร้างต้นแบบในการวิเคราะห์หาตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ phytase จากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด เพื่อที่จะจำแนกหากรดอะมิโนที่อาจจะมีส่วนช่วยในการเพิ่ม catalytic activity ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* โดย Tomschy และคณะได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 (Q27) มีความสำคัญกิจกรรมของเอนไซม์ ความจำเพาะต่อค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และความหลากหลายต่อสับสเตรตของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus*

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงจะทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพื่อศึกษาความสำคัญต่อความจำเพาะของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 จึงได้เลือกเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50(Q50) เพื่อศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนตำแหน่งนี้ว่ามีความสำคัญต่อความจำเพาะของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 อย่างไร โดยนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases ที่ต้องการศึกษา ได้แก่ *A. niger* TR170 มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases จากเชื้อรา 3 สายพันธุ์ คือ *A. fumigatus*, *A. japonicus* TR86 และ *A. niger* NRRL 3135 (เป็นสายพันธุ์ที่ทราบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase แล้ว) โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL 2.0.8 จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> จากนั้นจึงนำผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases จากเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์เพื่อดูค่า identity และตรวจสอบชนิดของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 ว่าเป็นกรดอะมิโน Glutamine เช่นเดียวกับในเชื้อรา *A. fumigatus* หรือไม่ จากนั้นทำการสร้างโครงสร้างสามมิติจำลองของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 โดย

ใช้โปรแกรม Swiss-Model จากเว็บไซต์ <http://www.expasy.org/spdbv/> โดยใช้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 เป็นต้นแบบในการจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 เพื่อตรวจสอบดูว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 อยู่ในบริเวณใดของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 จากนั้นจะทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งนี้ให้เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น 9 ชนิด ได้แก่ Asparagine Threonine Leucine Isoleucine Valine Alanine Glycine Serine และ Proline ด้วยเทคนิค site directed mutagenesis ด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

3.2.2. การเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งจำเพาะในยีน phyA170 ด้วยเทคนิค site directed mutagenesis ด้วยวิธีพีซีอาร์

3.2.2.1. การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ยีน phyA170 กลาย ของเอนไซม์ phytases โดยจะทำการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งเพื่อให้ได้ยีน phyA170 กลาย ซึ่งสามารถถอดรหัสออกมาเป็นกรดอะมิโนที่ต้องการ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์จะอ้างอิงจาก codon usage ของเซลล์เจ้าบ้านที่เราจะใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งในที่นี้จะใช้ยีสต์ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยอ้างอิง codon usage จากเว็บไซต์ <http://www.kazusa.or.jp/codon/> ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่เหลือจะอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 โดยไพรเมอร์แต่ละสายมีจำนวนนิวคลีโอไทด์สายละ 30 เบส และทำการตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์ให้เหมาะสมกับสภาวะในการทำ site directed mutagenesis ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ดีคือ ไม่เกิดการจับกันเองระหว่างไพรเมอร์ (primers dimmer) และ มีค่า melting temperature (Tm) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ในเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียส ถึง 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้มีการสังเคราะห์เรียบร้อยแล้วมาใช้ในการสร้างยีน phyA170 กลายของเอนไซม์ phytases ด้วยเทคนิค site directed mutagenesis ด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีน phyA170 กลายในตำแหน่งจำเพาะ แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างยีน *phyA170* กลาย

ด้วยเทคนิค site directed mutagenesis

Primers	Forward	Reverse	Restriction Enzyme
Q50A	5'G CAT CTT TGG GGT <u>GCT</u> TAC GTG CCG TTC TT 3'	5'GAA CGG CAC GTA <u>AGC</u> ACC CCA AAG ATG CGA 3'	-
Q50G	5'G CAT CTT TGG GGT <u>GGT</u> TAC GTG CCG TTC TT 3'	5'GAA CGG CAC GTA <u>ACC</u> ACC CCA AAG ATG CGA 3'	-
Q50I	5'G CAT CTT TGG GGT <u>ATT</u> _TAC GTG CCG TTC TT 3'	5'GAA CGG CAC GTA <u>AAI</u> ACC CCA AAG ATG CGA 3'	-
Q50L	5'T CG CAT CTT TGG GGT <u>TTG</u> <i>TAC</i> GTG CCG TTC 3'	5'AA GAA CGG CAC GTA <u>CAA</u> ACC CCA AAG ATG C 3'	<i>RsaI</i> * GT AC
Q50N	5' G CAT CTT TGG GGT <u>AAC</u> TAC GTG CCG TTC TT3'	5'GAA CGG CAC GTA <u>GII</u> ACC CCA AAG ATG CGA 3'	-
Q50P	5'G CAT CTT TGG GGT <u>CCA</u> TAC GTG CCG TTC TT 3'	5'GAA CGG CAC GTA <u>TGG</u> ACC CCA AAG ATG C GA 3'	-
Q50S	5'G CAT CTT TGG GGT <u>TCT</u> TAC GTG CCG TTC TT 3'	5'GAA CGG CAC GTA <u>AGA</u> ACC CCA AAG ATG CGA 3'	-
Q50T	5'G CAT CTT TGG GGT <u>ACT</u> TAC GTG CCG TTC TT 3'	5'GAA CGG CAC GTA <u>AGI</u> ACC CCA AAG ATG CGA 3'	<i>RsaI</i> * GT AC
Q50V	5'CG CAT CTT TGG GGT <u>GTT</u> TAC GTG CCG TTC T 3'	5'AAA GAA CGG CAC GTA <u>AAC</u> ACC CCA AAG ATG 3'	-

หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดอะมิโนที่ทำการกลายแสดงด้วยตัวอักษรตัวหนา นิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงจากพลาสมิดดั้งเดิมแสดงด้วยตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ และบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงด้วยตัวอักษรตัวเอียง

3.2.2.2. การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ยีน phyA170 กลาย

นำพลาสมิดดีเอ็นเอต้นแบบ pPICZ-rPhy170 ซึ่งได้รับจากห้องปฏิบัติการ เอนไซม์และเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ(BIOTEC) โดยพลาสมิดดีเอ็นเอต้นแบบนี้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-rPhy170 ที่มียีน phyA170 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 แทรกอยู่ โดยจะต้องทำการเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-rPhy170 ในแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α นี้โดยทำการถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α โดยวิธีทรานส์ฟอร์เมชันตามวิธีของ Sambrook (2001) โดยจะนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-rPhy170 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีคอมพิเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 α แล้วบ่มในน้ำแข็งนาน 45 นาทีและนำไปแช่ในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นย้ายหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ใส่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีและบ่มเป็นเวลา 2 นาที ใส่อาหารเหลว LB broth 800 ไมโครลิตรในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่สารละลายเซลล์บนน้ำแข็ง 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาทีแล้วเปิดอาหารส่วนใสทิ้ง 900 ไมโครลิตร คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแตนต์บนอาหารแข็ง (LB agar) ที่มี zeocin เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.2.2.3. การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-rPhy170 จากแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ด้วย QIAprep spin miniprep kit

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-rPhy170 ที่อยู่ใน *E. coli* DH5 α ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep spin miniprep kit โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-rPhy170 ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว Luria-Betani (LB broth) 5 มิลลิลิตร ที่มี zeocin เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลบหลอดขึ้นลงทันที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ถ่ายส่วนใสใส่ QIA prep spin column แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนที่ผ่าน column ที่ จากนั้นล้าง column ด้วย บัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนที่ผ่าน column ที่ และล้าง column ด้วย บัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนที่ผ่าน column ที่ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลที่เหลือ และย้าย column ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติบบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อชะพลาสמידีเอ็นเอออกจาก column เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2.4. การทำปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งจำเพาะในยีน phyA170

ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งที่สนใจที่ละจุด (single point mutation) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction PCR) ตามวิธีของ Stratagene's QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis kit และใช้ไพรเมอร์ที่แสดงในตารางที่ 3.1 โดยมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ-rPhy170 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และมีส่วนผสมต่างๆ ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบดังนี้ 1X *Pfu* Buffer 200 ไมโครโมลาร์ dNTPs 2.5 U *Pfu* DNA polymerase 1 ไมโครโมลาร์ Forward primer 1 ไมโครโมลาร์ Reverse primer และ DNA template ทำการควบคุมอุณหภูมิในปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PCR ที่สภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขั้นที่ 1 Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยขั้นตอนที่ 2-4 ทำทั้งหมด 18 รอบ ขั้นตอนที่ 5 Prolonged extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำ PCR products ที่ได้มาบ่มกับเอนไซม์ *DpnI* จำนวน 1 U ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัดดีเอ็นเอต้นแบบแล้ววิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

3.2.3. การถ่ายยีน phyA 170 กลายเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* JM109

3.2.3.1. การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* JM109

ทำการเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยเชื้อ *E. coli* JM109 ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเซลล์ในระยะ exponential phase โดยเปิดเซลล์แบคทีเรียลงใน flask ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเหลว LB broth 400 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5-0.6 แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที นำมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้งและกระจายตะกอนเซลล์ด้วย 100 ไมโครโมลาร์ CaCl₂ ที่แช่เย็นปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยการแบ่งใส่ครั้งแรก ¼ ของปริมาตร เขย่าเซลล์เพื่อให้กระจาย แล้วเติมส่วนที่เหลือจนครบ 20 มิลลิลิตร แล้วบ่มในน้ำแข็งนาน 15 นาที นำมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้งและกระจายตะกอนเซลล์ด้วย 10 ไมโครโมลาร์ CaCl₂ ที่แช่เย็นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และ 40 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 0.5 มิลลิลิตร เขย่าเซลล์เพื่อให้กระจาย แบ่งคอมพีเทนต์เซลล์ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.3.2. การถ่ายยีน phyA 170 กลายเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* JM109

ด้วย วิธีทรานส์ฟอร์เมชัน (Transformation)

การถ่ายดีเอ็นเอโดยวิธีทรานส์ฟอร์เมชันตามวิธีของ Sambrook (2001) โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ site directed mutagenesis และกำจัดพลาสมิด pPICZ-rPhy170 ต้นแบบด้วยเอนไซม์ DpnI แล้ว 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 แล้วบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาทีและนำไปแช่ในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นย้ายหลอดคอมพีเทนต์เซลล์ใส่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีและบ่มเป็นเวลา 2 นาที ใส่อาหารเหลว LB broth 800 ไมโครลิตรในหลอดคอมพีเทนต์เซลล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่สารละลายเซลล์บนน้ำแข็ง 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาทีแล้วเปิดอาหารส่วนใส่ทิ้ง 900 ไมโครลิตร คัดเลือกทรานส์-

ฟอรัมบนอาหารแข็ง (LB agar) ที่มี zeocin เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.2.4. การตรวจหาโคโลนี *E. coli* JM109 ที่ได้รับ พลาสมิดสายผสมที่มียีน phyA 170 กลาย

การวิเคราะห์ยีน phyA 170 กลายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำการสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* JM109 ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม phyA170 กลาย Q50L และ phyA 170 กลาย Q50T ซึ่งขึ้นได้บนอาหารแข็ง LB (LB agar) ที่มี zeocin เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ด้วย QIAprep spin miniprep kit แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* ที่มีบริเวณจดจำอยู่ในตำแหน่งกลายในยีน phyA170 โดยยีนกลายจะมีจุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังแสดงในตาราง 3.1 โดยมีส่วนประกอบและสภาวะในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ดังนี้

Distilled deionized water	7.70	ไมโครลิตร
10X buffer	1	ไมโครลิตร
พลาสมิดดีเอ็นเอ	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>RsaI</i> (10U/ul)	0.30	ไมโครลิตร

ส่วนการตรวจหาโคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* JM109 ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม phyA170 กลาย ชนิดอื่นซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก็จะทำให้การทำการสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* JM109 ซึ่งเจริญได้บนอาหารแข็ง LB (LB agar) ที่มี zeocin เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ด้วย QIAprep spin miniprep kit แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.2.4.1. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phyA 170 กลาย

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม ทั้งที่ผ่านการคัดเลือกด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (pPICZ α -mPhyA170 กลายQ50L และ pPICZ α -mPhyA170 กลาย Q50T) และพลาสมิดสายผสมที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีน phyA170 เนื่องจากยีน phyA170 แทรกอยู่ในพลาสมิด pPICZ α จึงใช้ 'ไพรเมอร์ α -Factor1085 (5' GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT 3') ซึ่งสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phyA170 ได้ โดยดูรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ในภาคผนวก ค

3.2.5. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 โดยยีสต์ *P. pastoris*

3.2.5.1. การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายสำหรับการทรานสเฟอร์เมชั่นเข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris*

ทำการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายสำหรับการนำเข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* ซึ่งต้องใช้พลาสมิดดีเอ็นเอความเข้มข้นประมาณ 5-20 ไมโครกรัม จะเตรียมโดยทำการเชื่อมต่อแบบที่เรียกว่าผสม *E. coli* JM109 ที่บรรจุพลาสมิดที่มียีน rPhyA 170 กลายและยีน rPhyA 170 ดั้งเดิม ลงในพลาสม์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว Luria-Betani (LB broth) 25 มิลลิลิตร ที่มี zeocin เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep spin miniprep kit ปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดขึ้นลงทันที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ถ่ายส่วนใสใส่ QIA prep spin column แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนที่ผ่าน column ทิ้ง จากนั้นล้าง column ด้วยบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนที่ผ่าน column ทิ้ง และล้าง column ด้วย บัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติสสารละลายส่วนที่ผ่าน column ที่ 1 แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลที่เหลือ และย้าย column ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อชะพลาสติกดีเอ็นเอออกจาก column จากนั้นนำพลาสติกดีเอ็นเอมาทำการ linearized เพื่อให้พลาสติกดีเอ็นเอเป็นเส้นตรงและสามารถแทรกตัวเข้าสู่โครโมโซมของยีสต์เจ้าบ้านได้ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PmeI* ที่มีบริเวณจดจำอยู่ในพลาสติกดีเอ็นเอ pPICZ-rPhy170 โดยมีส่วนประกอบและสภาวะในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ดังนี้

Distilled deionized water	22.50	ไมโครลิตร
100X BSA	0.5	ไมโครลิตร
10X buffer4	5	ไมโครลิตร
พลาสติกดีเอ็นเอ	20	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>PmeI</i> (10U/ul)	2	ไมโครลิตร

เมื่อผสมสารตามส่วนประกอบข้างต้นแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น 24 ชั่วโมงจากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยจะเปรียบเทียบกับพลาสติกดีเอ็นเอที่ไม่ได้ทำการ linearized เพื่อตรวจสอบว่าสามารถทำการ linearized ได้สำเร็จหรือไม่

3.2.5.2. การทำพลาสติกดีเอ็นเอที่ทำการ linearized ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Wizard DNA Clean-Up System (Promega)

นำพลาสติกดีเอ็นเอที่ได้ทำการ linearized 20 ไมโครลิตร ผสมกับ distilled deionized water 30 ไมโครลิตร และเรซิน 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดขึ้นลง จากนั้นถ่ายสารละลายพลาสติกดีเอ็นเอผสมลงในกระบอกดูดขนาด 10 มิลลิลิตรที่บริเวณส่วนปลายประกอบอยู่กับ column ซึ่งมีเมมเบรนเป็นส่วนประกอบเพื่อใช้ในการจับพลาสติกดีเอ็นเอ แยกออกจากสารละลายที่มีสารอื่นๆ ปะปนอยู่ จากนั้นนำส่วนของ plunger ใส่เข้าไปส่วนบนของปากกระบอกดูดและเพิ่มแรงดันเพื่อให้สารละลายไหลผ่านเมมเบรนของ column ออกมา โดยพลาสติกดีเอ็นเอจะจับอยู่กับเมมเบรนของ column จากนั้นทำ

การล้าง column ด้วย 80เปอร์เซ็นต์ ไอโซโพรพานอล 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นย้าย column ลงหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และชะพลาสมิดดีเอ็นเอออกมา ด้วย distilled deionized water ที่มีอุณหภูมิประมาณ 65-70 องศาเซลเซียส 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแบ่งพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วออกมา 4 ไมโครลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์อีกครั้งด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis และพลาสมิดดีเอ็นเอที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.5.3. การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ของยีสต์ *P. pastoris*

เชื้อยีสต์ *P. pastoris* ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YPD(Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) 5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ยีสต์ 50 ไมโครลิตร ลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว YPD 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงต่อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือจนกว่าเซลล์จะมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 1.3-1.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นถ่ายสารละลายเซลล์ลงหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง และกระจายตะกอนเซลล์ด้วย 50 มิลลิลิตรของน้ำ Nanopure water filter sterilized ที่แช่เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง และกระจายตะกอนเซลล์ด้วย 30 มิลลิลิตร ของน้ำ Nanopure water filter sterile ที่แช่เย็นอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง และกระจายตะกอนเซลล์ด้วย 2 มิลลิลิตร ของสารละลาย 1 โมลาร์ ของ sorbitol ที่แช่เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง และกระจายตะกอนเซลล์ด้วย 500 ไมโครลิตร ของสารละลาย 1 โมลาร์ ของ sorbitol ที่แช่เย็น ซึ่งจะนำไปใช้ในการทรานสฟอร์มเมชันโดยทันที

3.2.5.4. การถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายพันธุ์เข้าสู่ยีสต์เจ้าบ้าน *P. pastoris* ด้วยการทำให้ electroporation

การถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *P. pastoris* การทดลองทุกขั้นตอนจะทำในอ่างน้ำแข็ง โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทำการ linearized แล้ว 10 ไมโครลิตร ผสมกับคอมพีเทนต์เซลล์ของยีสต์ *P. pastoris* 100 ไมโครลิตร ใน electroporation cuvette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ที่แช่เย็น ป่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปผ่านกระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง electroporation โดยตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ 1.5 กิโลโวลต์ 25 ไมโครพาร์ส และ 200 โอห์ม และเติม 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย 1 โมลาร์ sorbitol ที่แช่เย็น ลงในสารละลายผสมของพลาสมิดดีเอ็นเอและคอมพีเทนต์เซลล์ที่อยู่ใน electroporation cuvette ทันที จากนั้นเทสารละลายลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร และนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเซลล์ยีสต์ 200 ไมโครลิตรมาคัดเลือกบนอาหารแข็ง YPD ที่มี zeocin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จนกระทั่งปรากฏโคโลนี จึงทำการสุ่มคัดเลือกโคโลนี ประมาณ 10 โคโลนี เพื่อทำ master plates เก็บไว้ และนำไปตรวจสอบผลการแทรกตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายพันธุ์เข้าสู่โครโมโซมของยีสต์ *P. pastoris* ต่อไป

3.2.5.5. การตรวจสอบการแทรกตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายพันธุ์เข้าสู่โครโมโซมของยีสต์ *P. pastoris* ด้วยวิธีพีซีอาร์

3.2.5.5.1. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ *P. pastoris*

เชื้อยีสต์ *P. pastoris* ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YPD 5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ยีสต์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง กระจายตะกอนเซลล์ด้วย sterilized distilled water 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมสารละลายผสมระหว่าง Enzhane lysis buffer กับ 1M DTT (อัตราส่วน 100:1) ด้วยอัตราส่วน 3 เท่าของน้ำหนักเซลล์ยีสต์ (100 มิลลิกรัม ~ 100 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา

1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายส่วนบนลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 1 เท่าของสารละลายผสมระหว่าง chloroform กับ isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใสลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ซึ่งต้องระวังไม่ให้ตะกอนสีขาวติดมาด้วย จากนั้นเติม 1 เท่าของสารละลายผสมระหว่าง chloroform กับ isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) อีกครั้ง ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใสลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ซึ่งต้องระวังไม่ให้ตะกอนสีขาวติดมาด้วย เติม 0.5 เท่า ของสารละลาย 7.5 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตท และ 2 เท่า ของสารละลายแอบโซลูทเอทานอล นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70เปอร์เซ็นต์ เอทานอลที่แช่เย็น 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อีกครั้ง เพื่อกำจัดสารละลายเอทานอลที่เหลืออยู่ จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้สารละลายเอทานอลระเหยออกไปจนหมด และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Nanopure water filter sterile 20 ไมโครลิตร และแบ่งสารละลายดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.5.5.2. การตรวจสอบการแทรกตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม กลายเข้าสู่โครโมโซมของยีสต์เจ้าบ้าน *P. pastoris* ด้วยวิธีพีซีอาร์

ในการตรวจสอบการแทรกตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายเข้าสู่โครโมโซมของยีสต์ *P. pastoris* ด้วยวิธีพีซีอาร์ จะใช้ไพรเมอร์ 5'AOX1 (5' GACTGGTTCCAATTGACA AGC3') และ 3'AOX1 (5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3') โดยมีโครโมโซมดีเอ็นเอของยีสต์ *P. pastoris* เป็นต้นแบบ โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนผสมต่างๆ ของปฏิกิริยา ดังนี้ จีโนมดีเอ็นเอของยีสต์ *P. pastoris* ความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัม 10X Taq DNA polymerase buffer (Fermentas) 0.2 ไมโครโมลาร์ 5'AOX1 0.2 ไมโครโมลาร์ 3'AOX1 primer 25 ไมโครโมลาร์ MgCl₂ 2 ไมโครโมลาร์ dNTPs และ Taq DNA polymerase

(Fermentus) 2.5 U ทำการควบคุมอุณหภูมิในปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PCR ที่สภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขั้นที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที โดยในขั้นตอนที่ 2-4 ทำทั้งหมด 30 รอบ ขั้นที่ 5 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา นำ PCR products ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentus) เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของ PCR products ที่เกิดขึ้นว่ามีขนาดเท่ากับขนาดของยีน phyA170 หรือไม่ (1.8 kb) จากนั้นนำ PCR products ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลาย โดยการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีน phyA170 โดยใช้ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ α -Factor1085 (5' GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT 3') ซึ่งสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phyA170 ได้ โดยดูรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ในภาคผนวก ค

3.2.5.6. การตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ของยีสต์ *P. pastoris* ในระดับ small-scale

ตรวจสอบประสิทธิภาพของการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ในระดับ small-scale ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* ทั้งที่บรรจุพลาสมิดสายผสมกลาย (pPICZ α - mPhyA170) และ พลาสมิดสายผสมดั้งเดิม (pPICZ α -rPhyA170) ซึ่งจะใช้เป็นตัว positive control และ ใช้ยีสต์ *P. pastoris* ที่ไม่ได้บรรจุพลาสมิด pPICZ α เป็นตัว negative control โดยทำการแยกเชื้อจากโคโลนีเดียวของยีสต์ *P. pastoris* ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ยีสต์ 250 ไมโครลิตร (0.1%) ใส่ลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BMGY 25 มิลลิลิตร (Buffered Glycerol-complex medium Invitrogen USA) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ จนเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 2-6 เทซารละลายเซลล์ยีสต์ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 \times g

นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง กระจายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว BMMY (Buffered Methanol-complex medium Invitrogen USA) 5 มิลลิลิตร จากเทสารละลายเซลล์ลงในฟลาस्क ขนาด 50 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน โดยจะมีการเติมแอสไซลูทเมทานอล 150 ไมโครลิตร ทุก 24 ชั่วโมง เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของเมทานอล (3% เมทานอล) ให้คงที่ โดยเมทานอลเป็นตัวเหนี่ยวนำ ให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน phyA170 และทุกวันจะมีการเก็บตัวอย่างสารละลายเซลล์ยีสต์ ปริมาณ 150 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เก็บส่วนใสที่แยกจากตะกอน (supernatant) มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน phyA170 ด้วย 10% SDS-PAGE

3.2.5.7. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำโปรตีนผสมกับ 5x sample buffer (250 ไมโครโมลาร์ Tris-HCl pH 6.8 0.5 โมลาร์ DTT 10%(w/v) SDS 0.02% bromophenol blue และ 50%(v/v) glycerol) แล้วต้มสารละลายโปรตีนในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึง load สารละลายโปรตีนใน 10เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ โดยจ่ายกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นจึงย้อม polyacrylamide gel ด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 โดยเปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของแถบโปรตีนกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (PAGE Ruler™ Prestain Ladder Fermentas)

ตารางที่ 3.2

ส่วนประกอบในการเตรียม 10% polyacrylamide gel สำหรับการวิเคราะห์

โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ส่วนประกอบ	10เปอร์เซ็นต์ Separating gel	5เปอร์เซ็นต์ Stacking gel
Distilled water	3.2 มิลลิลิตร	2.3 มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl pH 8.8 + 0.4% SDS	2.0 มิลลิลิตร	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	1.0 มิลลิลิตร
30% Acrylamide (Acrylamide: Bis-acrylamide = 29:1)	2.67 มิลลิลิตร	0.66 มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	100 ไมโครลิตร	50 ไมโครลิตร
TEMED	5 ไมโครลิตร	3 ไมโครลิตร

3.2.5.8. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ด้วยยีสต์ *P. pastoris*

ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ของยีสต์ *P. pastoris* ที่บรรจุพลาสมิดสายผสมกลาย (pPICZ α -mPhyA170) และ พลาสมิดสายผสมดั้งเดิม (pPICZ α -rPhyA170) เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ phytase โดยทำการเชื้อเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *P. pastoris* ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YPD 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ยีสต์ 625 ไมโครลิตร (0.5%) ใส่ลงในฟลาस्कขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BMGY 125 มิลลิลิตร (Buffered Glycerol-complex medium Invitrogen USA) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนเริ่มมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 4-5 เทสสารละลายเซลล์ยีสต์ลงในขวดพลาสต์ิกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 \times g นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งและกระจายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว BMMY (Buffered Methanol-complex medium Invitrogen USA) 25 มิลลิลิตร จากเทสสารละลายเซลล์ลงในฟ

ลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน โดยจะมีการเติมแอสโซลูทเมทานอล 750 ไมโครลิตร ทุก 24 ชั่วโมง เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของเมทานอล (3% เมทานอล) ให้คงที่ โดยเมทานอล เป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 และทุกวันจะมีการเก็บตัวอย่าง สารละลายเซลล์ยีสต์ปริมาณ 750 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เก็บส่วน supernatant มาวิเคราะห์ปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ด้วย 10% SDS-PAGE และนำไปทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase ต่อไป

3.2.6. การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ phytase

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ phytase โดยอ้างอิงจากวิธีของ Engelen 1994 โดย ปฏิริยามีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร ส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิริยาได้แก่ สารละลาย ตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ซึ่งคาดว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phytase ซึ่ง ละลายอยู่ใน 0.1 M acetate buffer pH 5.5 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ สับสเตรต 0.5% phytic acid ใน 0.1 M acetate buffer pH 5.5 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ทำปฏิริยาในหลอด ทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น หยุดปฏิริยาด้วยการเติม 500 ไมโครลิตร ของ stop/color reagent [25% (v/v) ammonium heptamolybdate stock solution 25% (v/v) ammonium vanadate stock solution และ 16.5% (v/v) 65% nitric acid] โดยถ้าสารละลายปรากฏเป็นสีเหลือง แสดงว่าสารละลายรีคอมบิแนนท์ โปรตีนมีกิจกรรมของเอนไซม์ phytase และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโน เมตร เพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเอนไซม์ต่อไป โดย 1 ยูนิตของ เอนไซม์หมายถึง จำนวนของเอนไซม์ phytase ในการปลดปล่อยสาร inorganic phosphate ออกมา 1 ไมโครโมลต่ออนาที

3.2.6.1. การทดสอบหาค่า pH และ ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์ phytases

ในการทดสอบหาสภาวะ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ phytases จะ ทำการทดลองหาค่ากิจกรรมของสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ที่คาดว่าจะมีกิจกรรม ของเอนไซม์ phytases จะทดสอบการทำปฏิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กับสารละลายสับสเตรต phytic ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ที่สภาวะ pH ดังต่อไปนี้ glycine-HCl (pH 2.0 3.0 และ 4.0) sodium acetate (pH 4 4.5 5.0 5.5 และ 6.0) 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) (pH 6.5 7.0 และ 7.5) Tris-HCl (pH 7.0 8.0 และ 9.0) และ glycine-NaOH (pH10) ในส่วนการทดสอบหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ phytases จะทดสอบโดยหาค่ากิจกรรมของสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน phyA170 ที่คาดว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phytases จากการทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรต phytic acid ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในช่วงที่สภาวะ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของโปรตีนกลายแต่ละชนิดเป็นเวลา 15 นาที ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 40 50 60 70 80 และ 90 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5

3.2.6.2. การทดสอบความทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด-เบส และความ ร้อนของเอนไซม์ phytases

ในการทดสอบการทนทานต่อสภาวะความเป็นกรดเบสของเอนไซม์ phytases จะทดสอบโดยการนำสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน phyA170 ที่คาดว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phytase เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 2-10 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน phyA170 50 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์ phytic acid 450 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา ด้วยการเติม 500 ไมโครลิตร ของ stop/color reagent [25% (v/v) ammonium heptamolybdate stock solution 25% (v/v) ammonium vanadate stock solution และ 16.5% (v/v) 65% nitric acid]

ในการทดสอบความทนทานต่อความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ จะทดสอบโดยการนำสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ที่คาดว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phytase โดยจะเลือกทดสอบเฉพาะโปรตีนกลาย Q50P Q50I และ Q50L เปรียบเทียบกับโปรตีนดั้งเดิมซึ่งเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ไมโครโมลาร์ sodium acetate pH 5.5 มาบ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 10 15 30 และ 60 นาที จากนั้นนำ 100 ไมโครลิตร ของสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ที่คาดว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phytase มาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรต 0.5 เปอร์เซ็นต์ phytic acid 400 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา

ด้วยการเติม 500 ไมโครลิตร ของ stop/color reagent [25% (v/v) ammonium heptamolybdate stock solution 25% (v/v) ammonium vanadate stock solution และ 16.5% (v/v) 65% nitric acid] จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์หมายถึง จำนวนของเอนไซม์ phytase ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาให้ inorganic phosphate ออกมา 1 ไมโครโมลต่อนาที และหาค่า relative activity โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase ที่มีค่ากิจกรรมสูงสุด มีค่า relative activity คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะ pH ระดับต่างๆ หรือที่อุณหภูมิระดับต่างๆ และคำนวณออกมาเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ relative activity เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์และสรุปผลต่อไป

3.2.6.3. การศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ phytases

ในการศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ phytases จะทำโดยทำการทดสอบกิจกรรมของสารละลายตัวอย่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ sodium acetate pH 5.5 ที่คาดว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phytase โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กับสารละลายซับสเตรต phytic acid ที่ความเข้มข้น 10 ระดับ ได้แก่ 0.0001 0.001 0.01 0.1 0.25 0.5 1 2.5 5 10 และ 12.5 มิลลิโมลาร์ โดยคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ phytases โดยใช้หลักการของสมการ Michaelis-Menten ซึ่งจะใช้โปรแกรม KALEIDA-GRAPH version 3.51 (Synergy) ในการวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ชนิดต่างๆ