

รายงานการวิจัย

การสร้างตัวพาที่ยื่นต่อการแสดงออกของโปรตีนสำหรับใช้ในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจ

Construction of expression vectors for livestock

พัฒนพงษ์ ทัดทา และคณะ

สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาสัตวศาสตร์และวิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ และ รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย ที่ปรึกษาโครงการ

บทคัดย่อ

การสร้างตัวพาหีนที่เอื้อต่อการแสดงออกของโปรตีนสำหรับใช้ในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจ

พัฒนพงษ์ ทัดทา¹, สมจิตร ถนอมวงศ์วัฒนะ¹, ไฉน น้อยแสง², สุริยะ สะวานนท์³

¹ สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

² วิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

³ ภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือพัฒนาตัวพาหีนที่เอื้อต่อการแสดงออกของโปรตีนสำหรับใช้ในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจโดยใช้โปรโมเตอร์ของยีนอัลฟาเอสวันเคซินควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โครงสร้างของตัวพาหีนสำหรับโคประกอบด้วย 5' arm จำนวน 6,386 คู่เบส, neo cassette จำนวน 1,657 คู่เบส, 3' arm จำนวน 5,663 คู่เบส, และ tk cassette จำนวน 2,800 คู่เบส ตัวพาหีนสำหรับใช้ในสุกรประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์เบสจำนวน 21,276 คู่เบสโดยมี 5' arm จากโปรโมเตอร์ของยีนอัลฟาเอสวันเคซินจากสุกรจำนวน 6.3 kb และ 3' arm จำนวน 6.6 kb ใช้ดีเอ็นเอที่เป็นรหัสควบคุมการสร้างโปรตีนของยีน *EPO* และ *GCSF* เป็นยีนเป้าหมาย ตัวพาหีนที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการถ่ายยีนในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อผลิตโปรตีนมูลค่าสูง

คำสำคัญ : ตัวพาหีนที่เอื้อต่อการแสดงออกของโปรตีน, เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, การถ่ายยีน

Abstract

Construction of expression vectors for livestock

Pattanapong Thadtha¹, Somjit Thanomwongwattana¹, Chanai Noysang², and Suriya Sawanon³

¹Animal Science Division, Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi

²Thai Traditional Medicine College, Rajamangala University of Technology Thanyaburi

³Animal Science Department, Kasetsart University Kamphaengsaen Campus

The aim of this study was to construct the gene targeting vector for using in farm animals. The gene construct for cattle contains 6,386 bp of α S1 casein promoter, 1,657 bp of neo cassette, 5,663 bp of 3' arm, and 2,800 bp of tk cassette. The DNA construct of swine contains 21,276 bp which has 6.3 kb of 5' arm and 6.6 kb of 3' arm derived from porcine α S1 casein. The coding region of *EPO* and *GCSF* genes was used as target genes. The expression of these genes is regulated by α S1 casein promoter. These gene constructs may be useful in gene transfer into mammalian cells using electroporation and transfection techniques.

Keywords : expression vectors, mammalian cells, gene transfer

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ.....	ii
บทคัดย่อ.....	iii
Abstract.....	iv
สารบัญเรื่อง.....	v
สารบัญตาราง.....	vi
สารบัญภาพ.....	vii
บทนำ.....	1
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	5
วัสดุและสารเคมี.....	5
การพัฒนาเวกเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจ.....	6
การเก็บตัวอย่าง.....	6
การสกัดดีเอ็นเอ.....	7
พีซีเอ.....	9
การเตรียมโคลนนิ่งเวกเตอร์.....	10
การไลगेชัน.....	12
ทรานสฟอร์มเมชัน.....	12
การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	13
ผลการวิจัย.....	14
การออกแบบตัวพายินที่เอื้อต่อการแสดงออกของยีนในสัตว์เศรษฐกิจ.....	14
การพัฒนาเวกเตอร์สำหรับใช้ในโค.....	16
การออกแบบตัวพายินสำหรับใช้ในเซลล์สุกร.....	21
ความเป็นไปได้ในการนำยีนเข้าสู่เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของสุกร.....	23
วิจารณ์ผลการวิจัย.....	24
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย.....	25
บรรณานุกรม.....	26
ภาคผนวก.....	28

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1. เอนไซม์ตัดจำเพาะในตำแหน่งการโคลนยีนของเวกเตอร์ pBluescript.....	15
ตารางที่ 2. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง.....	17
ตารางที่ 3. องค์ประกอบของตัวพายีนสำหรับใช้ในโค.....	20
ตารางที่ 4. องค์ประกอบของตัวพายีนสำหรับใช้ในสุกร.....	22

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1. เวกเตอร์โครงร่าง pBluescript.....	14
ภาพที่ 2. โครงสร้างของยีนอัลฟาเอสวันเคซินในโคพันธุ์ Hereford.....	16
ภาพที่ 3. ตำแหน่งการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ 5' arm ของตัวพายิน.....	17
ภาพที่ 4. ตำแหน่งการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย.....	18
ภาพที่ 5. ตำแหน่งการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ neo cassette.....	18
ภาพที่ 6. ตำแหน่งการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ 3' homology arm.....	19
ภาพที่ 7. ตำแหน่งการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ negative selection marker.....	19
ภาพที่ 8. โครงสร้างของตัวพายินที่เอื้อต่อการแสดงออกโปรตีนสำหรับใช้ในโค.....	20
ภาพที่ 9. ตำแหน่งการเข้าไปของยีนเป้าหมายในโครโมโซมของโค.....	21
ภาพที่ 10. ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern blot	21
ภาพที่ 11. โครงสร้างของตัวพายินสำหรับใช้ในสุกร.....	22
ภาพที่ 12. ชิ้นดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการสร้างตัวพายินสำหรับสุกร	23

บทนำ

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่คือความสามารถในการเคลื่อนย้ายยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) ไปมาระหว่างเซลล์โดยอาศัยตัวพาที่ยีนที่เรียกว่าเวกเตอร์ (vector) ในการทำรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) นั้นจำเป็นจะต้องมีส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือยีนที่เราต้องการโคลน (gene or DNA fragment), เวกเตอร์หรือตัวพา, เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease), เอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) และเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ขั้นตอนในการทำยีนโคลนนิ่ง (gene cloning) มีดังต่อไปนี้ 1) การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือยีนที่เราสนใจ 2) การเตรียมเวกเตอร์หรือตัวพา 3) การเชื่อมดีเอ็นเอเข้ากับตัวพา 4) การนำเวกเตอร์เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน และ 5) การตรวจหาเซลล์เจ้าบ้านที่มีเวกเตอร์ที่เราโคลนเข้าไป เทคนิคดังกล่าวเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและมีการนำไปใช้ในการพัฒนาทางด้านการเกษตร ทางด้านการแพทย์ทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทย

ในทางด้านการผลิตสัตว์มีการนำเทคนิคพันธุวิศวกรรมไปใช้ในการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเศรษฐกิจในสัตว์ (ช่อทิพ และคณะ, 2547; Ibeagha-Awemu *et al.*, 2007) การศึกษาผลของความหลากหลายในระดับดีเอ็นเอต่อลักษณะการให้ผลผลิตสัตว์ (Bovenhuis *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 2002; Prinzenberg *et al.*, 2003; Chessa *et al.*, 2007) การตรวจสอบผลผลิตจากสัตว์และการตรวจวินิจฉัยโรคในสัตว์ นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคการถ่ายยีน (Dyck *et al.*, 2003; Paterson *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2008)

การถ่ายยีน (gene transfer) เป็นเทคนิคในการนำดีเอ็นเอจากภายนอกร่างกายหรือดีเอ็นเอจากแหล่งอื่น (foreign genes) เข้าไปในเซลล์เป้าหมายโดยมีจุดประสงค์ที่จะให้มีการแสดงออกของยีน (gene expression) เฉพาะในเซลล์หรือในอวัยวะเป้าหมายนั้น (ปราณีต 2003; Houdebine, 2002) เทคนิคทางการถ่ายยีนนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทางการแพทย์ เช่น การทำยีนบำบัด (gene therapy) การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรียหรือในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (recombinant human proteins) การผลิตโปรตีนเพื่อการรักษา (human therapeutic proteins) (Kues and Niemann, 2004; Thomson and McWhir, 2004) และในทางการเกษตร ได้แก่ การผลิตพืชจีเอ็มโอ การสร้างเวกเตอร์สำหรับผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic farm animals) การผลิตโปรตีนที่สำคัญทางการแพทย์ของคนในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (bioreactors) (Bulfield, 2000; Wheeler, 2003; Kues and Niemann, 2004) เป็นต้น โดยความสำเร็จในการถ่ายยีนนั้นขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น เวกเตอร์ที่ใช้ในการนำยีนเข้าสู่เซลล์ (vectors) ยีนที่ใช้และระดับของการแสดงออก (gene and its

expression level) เซลล์เป้าหมาย (target cells) วิธีการในการถ่ายยีน (gene transfer methods) และ วัตถุประสงค์ในการนำไปประยุกต์ใช้ (Jo and Tabata, 2008)

วิธีการในการนำส่งยีนเข้าไปในเซลล์เป้าหมายนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น วิธีทางกายภาพ (physical methods) กับวิธีทางเคมี (chemical methods) ตัวอย่างของวิธีการทางกายภาพได้แก่ ไมโครอินเจกชัน (microinjection) และ อิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) (Jo and Tabata, 2008) ในขณะที่ DEAE-Dextran, calcium phosphate และ cationic liposome-mediated transfection เป็นวิธีทางเคมี (ปราณีต 2003) นอกจากนี้ยังมีวิธีการนำยีนเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยไวรัสเวกเตอร์ที่ถูกดัดแปลงให้หมดความสามารถในการก่อโรคในคนหรือสัตว์แล้ว การใช้ไวรัสเวกเตอร์มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนสูงกว่าวิธีการอื่น ๆ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องตำแหน่งของยีนที่เข้าไปแบบสุ่มและความกังวลในเรื่องของความปลอดภัย (ปราณีต 2003) อย่างไรก็ตามการเลือกใช้วิธีการในการถ่ายยีนนั้นมีปัจจัยที่ควรพิจารณาดังนี้ ยีนเป้าหมาย ระดับของการแสดงออก และวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ (Jo and Tabata, 2008)

เวกเตอร์หรือตัวพาที่ยีนนิยมใช้ในเทคนิคทางด้านรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอได้นำมาจากพลาสมิด (plasmid), โครโมโซม (artificial chromosome) และ ไวรัส (virus) เป็นต้น เพื่อให้สามารถนำส่งยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพเวกเตอร์มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ จุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบ (origin of replication, *ori*) ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการโคลนนิ่งดีเอ็นเอ (multiple cloning site, MCS) และ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะสำหรับการคัดเลือก โดยเวกเตอร์แต่ละชนิดมีวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้แตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น ใช้ในการทำการตัดต่อยีน ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน ใช้ในการทำยีนบำบัด ทั้งนี้เทคนิคการสร้างเวกเตอร์ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เริ่มต้นจากการสร้างเวกเตอร์เพื่อใช้ในการโคลนนิ่งและเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีน เรื่อนี้ ๆ มีรายงานการสร้างเวกเตอร์ที่สามารถแสดงออกโปรตีนได้หลาย ๆ ตัว (multicistronic expression vector) และมีการนำไปประยุกต์ใช้ในหลาย ๆ ด้าน ยกตัวอย่างเช่น การทรานสเฟกต์ต้นกำเนิดของคน (Hasegawa *et al.*, 2007), การทำยีนบำบัด, และการรีโปรแกรมมิงเซลล์ร่างกาย (Abujarour and Ding, 2009, Carey *et al.*, 2009)

สำหรับเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกของโปรตีนนั้นมีทั้งสำหรับการแสดงออกในเซลล์ของยูคาริโอตและโปรคาริโอตและมีทั้งที่สร้างมาจากพลาสมิดและไวรัส เวกเตอร์ที่เอื้อต่อการแสดงออกของโปรตีนในสัตว์แบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามรูปแบบการเข้าไปในโครโมโซมคือเวกเตอร์แบบ ทรานสยีน กับเวกเตอร์ที่นำส่งยีนแบบกำหนดเป้าหมาย เวกเตอร์แบบ transgene ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ รหัสพันธุกรรมสำหรับสร้างโปรตีน และดีเอ็นเอสำหรับหยุดกระบวนการถอดรหัส โครงสร้างของเวกเตอร์แบบ gene targeting vector คล้ายกับเวกเตอร์แบบทรานสยีน และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เป็นเป้าหมายเพิ่มขึ้นมาเพื่อให้นำส่งเข้าไปในโครโมโซมแบบกำหนดตำแหน่งได้ (Cheah and Behringer,

2001; Hall *et al.*, 2009) ดังนั้นการสร้างเวกเตอร์เพื่อใช้กับเซลล์ของสัตว์จะแตกต่างจากเวกเตอร์ทางการค้าสำหรับแสดงออกของโปรตีนที่ใช้กันทั่วไปในการวิจัยทางด้านชีววิทยาโมเลกุลซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่สร้างขึ้นมาเพื่อศึกษาการทำหน้าที่ของยีน (gene function study) ที่สามารถแสดงออกได้ดีในเซลล์ของแบคทีเรียและยีสต์ ซึ่งมีระบบการถอดรหัสและแปลรหัสที่ไม่ซับซ้อน ทำให้ตัวพาหีนเหล่านี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้กับเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจ เช่น สุกร และ โค ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีความซับซ้อนของระบบร่างกาย มีการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่เฉพาะ เช่น เซลล์เต้านม เซลล์ตับ เซลล์หัวใจ เป็นต้น โดยมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะเจาะจงและแตกต่างกันไปในแต่ละอวัยวะ (differentially expressed genes) การสร้างเวกเตอร์สำหรับใช้ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงจำเป็นต้องมีการสร้างและปรับระบบการถอดรหัสและแปลรหัส (transcriptional regulation) โดยเฉพาะ โปรโมเตอร์ (transcription promoter) และทดสอบเวกเตอร์ว่าใช้ได้ผลในเซลล์หรืออวัยวะเป้าหมายหรือไม่

เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปของความเป็นไปได้ในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนในต่อมน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Bulfield, 2000; Houdebine, 2002; Niemann and Kues, 2003; Wheeler, 2003; Kues and Niemann, 2004; Thomson and McWhir, 2004) เนื่องจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถผลิตน้ำนมได้เป็นปริมาณมาก นอกจากนี้โปรตีนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีกระบวนการหลังการแปลรหัส (post-translational modification) ที่คล้ายกับโปรตีนของมนุษย์ (Niemann and Kues, 2003) น้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิดคือ โปรตีนหางนม (whey proteins) กับเคซีนโปรตีน (casein proteins) โดยพบเคซีนโปรตีนประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม (Farrell *et al.*, 2004) ทำให้การแสดงออกของยีนเป้าหมายภายใต้การควบคุมของยีนตระกูลเคซีนเป็นที่น่าสนใจ ดังนั้นงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการสร้างเวกเตอร์ที่เอื้อต่อการแสดงออกของโปรตีนสำหรับสัตว์เลี้ยงเศรษฐกิจ โดยจะเลือกใช้ pBluescript เวกเตอร์ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันในการสร้างเวกเตอร์สำหรับทำยีนแท็กเก็ตติ้ง (gene targeting vector) ในสัตว์มาเป็นโครงร่างของเวกเตอร์ (backbone vector) และจะใช้โปรโมเตอร์ของยีนเคซีนเป็นตัวขับเคลื่อนการแสดงออกของยีนเป้าหมาย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ทำการจัดหาเวกเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจ
 2. สร้างตัวพาหีนที่เอื้อต่อการแสดงออกของยีนในสัตว์เศรษฐกิจ
 3. ความเป็นไปได้ในการนำยีนเข้าสู่เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของสุกร
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ
1. ได้เวกเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจ

2. ได้สร้างตัวพาหีนที่เอื้อต่อการแสดงออกของยีนในสัตว์เศรษฐกิจ
3. ทราบถึงความเป็นไปได้ในการนำยีนเข้าสู่เซลล์ร่างกาย (somatic cells) ของสุกร

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและสารเคมี

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองมีดังรายการต่อไปนี้

1. เวกเตอร์โครงร่าง pBluescript II Phagemid Vector (pBluescript II KS+ phagemid kit, Agilent Technologies)
2. พลาสมิด pBigT (Addgene, 21270)
3. หลอดเก็บตัวอย่างเลือด
4. ชุดกักตุนเซลล์ในมิกซ์ดีเอ็นเอ Gentra Puregene Blood Kit (Catalog # 158445, Qiagen)
5. ชุดกักตุนเซลล์ในมิกซ์ดีเอ็นเอ PureLink Genomic DNA Mini Kit (Catalog # K1820-01, Invitrogen)
6. PCI (Catalog # P2069-100ML, Sigma)
7. Ethanol
8. Isopropanol
9. TE buffer
10. SDS 20% solution
11. RNase A
12. Proteinase K
13. EDTA
14. Tris base
15. กรดบอริก
16. กรดอะซิติก
17. NaOH
18. Ethidium bromide
19. Agarose gel
20. DNA polymerase
21. Oligo nucleotides
22. T4 DNA Ligase
23. Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
24. RBC TA Cloning Vector Kit (Catalog # RC001, RBC Bioscience)
25. HIT-DH5α super 10 (Catalog # RH619, RBC Bioscience)
26. HIT-JM109 high 10 (Catalog # RH718, RBC Bioscience)
27. SOC media
28. HCl
29. NaCl
30. Ampicillin
31. LB

32. X-gal-IPTG Ready Solution
33. BD Bacto-Tryptone (Catalog # 211705, BD)
34. Bacto-Yeast Extract (Catalog # 211705, BD)
35. Bacto-Agar (Catalog # 214010, BD)
36. Glycerol

การพัฒนาเวกเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจ

เวกเตอร์โครงร่างที่ใช้ในการทดลองนี้คือ pBluescript II Phagemid Vector (pBluescript II KS+ phagemid kit, Agilent Technologies) pBluescript เป็นเวกเตอร์ลูกผสมที่เกิดจากการรวมกันระหว่างนิวคลีโอไทด์เบสของพลาสมิดกับแบคทีเรียฟาจ (ภาพที่ 1 และ ภาคผนวกที่ 1)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัลฟาเอสวันเคซีน (*CSN1S1*) ของโคพิพันธุ์ Hereford (*Bos taurus*) เข้าถึงได้จากฐานข้อมูล UCSC Genome Browser (Baylor Btau_4.6.1/bosTau7. <http://genome.ucsc.edu>) ยีนอัลฟาเอสวันเคซีนอยู่บนโครโมโซมหมายเลข 6 ที่ตำแหน่ง 88242527 – 88256780) ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในภาคผนวกที่ 3 และ 7

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัลฟาเอสวันเคซีน (*CSN1S1*) ของสุกรได้จากนิวคลีโอไทด์เลขทะเบียน EU213063 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ยีนอัลฟาเอสวันเคซีนของสุกรอยู่บนโครโมโซมหมายเลข 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในภาคผนวกที่ 2 และ 6

นิวคลีโอไทด์เบสของ neo cassette ได้มาจากพลาสมิด pBigT (Addgene, 21270) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HSV-tk cassette ได้มาจาก PGKneobpA ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ positive selection cassette และ negative selection cassette แสดงในภาคผนวกที่ 5 และ 8 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานของลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้โปรแกรม Sequence Manipulation Suite (<http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/index.html>) การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใช้โปรแกรม Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ออกแบบไพรเมอร์และตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม In-Silico PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/>) และ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดโคนมจากฟาร์มโคนมลูกผสมพันธุ์ขาวดำในพื้นที่จังหวัดสระบุรี เก็บตัวอย่างเลือดในหลอดทดลองที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA ทำการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

เลือดที่ใหม่ ในกรณีที่ไม่สามารถทำได้ทันเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดด้วยวิธีมาตรฐาน Phenol-chloroform DNA extraction หรือใช้ชุด
กิตทางการค้าของบริษัท ขั้นตอนการทำมีดังต่อไปนี้

การสกัดจีโนมิกส์ด้วยชุดกิต PureLink Genomic DNA Mini Kit

ดำเนินการตามคู่มือของบริษัทดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างเลือดปริมาณ 200 μ l ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml
2. เติม Proteinase K จำนวน 20 μ l
3. เติม RNase A จำนวน 20 μ l ผสมโดยการวอร์เท็ก บ่มที่อุณหภูมิห้อง (15–25 องศาเซลเซียส)
นาน 2 นาที
4. เติม Genomic Lysis/Binding Buffer จำนวน 200 μ l ผสมโดยการวอร์เท็ก บ่มที่อุณหภูมิ 55
องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
5. เติมเอทานอล จำนวน 200 μ l ผสมโดยการวอร์เท็กนาน 5 วินาที
6. ย้ายของเหลวจากข้อ 5 จำนวน 640 μ l ลงใน PureLink Spin Column
7. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทของเหลวทิ้ง ย้าย Spin Column
ไปใส่ลงใน PureLink Collection Tube
8. เติม Wash Buffer 1 จำนวน 500 μ l
9. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 10,000 g นาน 1 นาที
10. ทิ้ง Collection Tube ย้าย Spin Column ใส่ลงใน Collection Tube อันใหม่
11. เติม Wash Buffer 2 จำนวน 500 μ l
12. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 16,000 g นาน 3 นาที
13. ย้าย Spin Column ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml
14. เติม Genomic Elution Buffer จำนวน 25 - 200 μ l
15. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 16,000 g นาน 1 นาที
16. จะได้สารละลายดีเอ็นเอ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ที่ -20 องศาเซลเซียสสำหรับการ
เก็บระยะยาว
17. วัดความเข้มข้น DNA อัตราส่วนของ $A_{260}/A_{280} > 1.8$

การสกัดจีโนมิกส์ด้วยชุดคิท Gentra Puregene Blood Kit

ดำเนินการตามคู่มือของบริษัทดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างเลือดปริมาณ 300 μ l ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml
2. เติม RBC Lysis Solution จำนวน 900 μ l ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 – 3 นาที
- 3.ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 g (~ ๑๒๐๐๐ rpm) นาน 20 วินาที จะได้ของเหลวและตะกอนแยกจากกัน คูดของเหลวทิ้งไป ระวังอย่าให้โคนตะกอน
4. ทำการวอร์เท็กนาน 10 วินาที เพื่อให้ตะกอนละลาย
5. เติม Cell Lysis Solution จำนวน 300 μ l ผสมโดยการดูดสารละลายด้วยปิเปต
6. วอร์เท็กนาน 10 วินาที ผสมจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายสีใส
7. เติม RNase A Solution จำนวน 1.5 μ l กลับหลอดไปมา 25 ครั้ง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
8. บ่มหลอดตัวอย่างในน้ำแข็งนาน 1 นาที เพื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 20 – 22 °C
9. เติม Protein Precipitation Solution จำนวน 100 μ l วอร์เท็กที่ความเร็วสูงสุด นาน 20 วินาที
10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 g นาน 1 นาที
11. เติม isopropanol จำนวน 300 μ l ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml
12. ถ่ายของเหลวจากข้อ 10 ลงในหลอดทดลองที่มี isopropanol ระวังอย่าดูดเอาตะกอนมาด้วย ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 50 ครั้ง จะมองเห็นดีเอ็นเอเป็นเส้นสีขาว
13. เซนตริฟิวที่ความเร็ว 16,000 g นาน 1 นาที ได้เพลเลตดีเอ็นเอสีขาวที่ก้นหลอด
14. ถ่ายของเหลวทิ้งไป ให้เหลือ pellet ดีเอ็นเอไว้ คว่ำหลอดบนกระดาษดูดความชื้น
15. เติม 70% ethanol จำนวน 300 μ l กลับหลอดไปมาเพื่อล้าง DNA pellet จำนวน 50 ครั้ง
16. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 g นาน 1 นาที ได้ตะกอนดีเอ็นเอสีขาวที่ก้นหลอด ใช้ปิเปตถ่ายของเหลวทิ้ง
17. ตากตะกอนดีเอ็นเอโดยคว่ำหลอดทดลองบนกระดาษดูดความชื้น นาน 5 นาที
18. เติม DNA Hydration Solution จำนวน 100 μ l (ในช่วง 25 - 100 μ l ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้) วอร์เท็กนาน 5 วินาที
19. บ่มสารละลายดีเอ็นเอที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (หรืออาจจะนาน 1 – 2 ชั่วโมง ในกรณีดีเอ็นเอละลายยาก)
20. บ่มสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน บนเครื่องเขย่า

21. เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ที่ -80 องศาเซลเซียสสำหรับการเก็บระยะยาว
22. วัดความเข้มข้น DNA อัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} จะอยู่ในช่วง 1.7 ถึง 1.9

พีซีเอ

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีเอ สภาพของปฏิกิริยาแตกต่างกันไปตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ขั้นตอนการดำเนินการมีดังต่อไปนี้

1. จีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำพีซีเอ
2. ไพรเมอร์ที่ใช้ดังตารางที่ 2
3. องค์ประกอบของ PCR

องค์ประกอบ	ปริมาณ (μl)	ความเข้มข้น
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	30	
Buffer	10	1X
dNTPs	1	200 μM
DNA polymerase	2	0.1u / μl
MgCl ₂	3	1500 μM
Forward primer	1	1 μM
Reverse primer	1	1 μM
ดีเอ็นเอ	2	50 ng / μl

4. ปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	
1	95 C	5 นาที	Initial denature
2	94 C	15 วินาที	40 cycles
3	53 C	1 นาที	
4	72 C	10 นาที	
5	GO TO 2: 39X		
6	72 C	10 นาที	Final elongation
7	END		

5. ตรวจสอบผลผลิตของพีซีเอด้วยเทคนิคการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า
6. เตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยการแยกสกัดจากเจลหรือใช้ชุดคิท เพื่อใช้ในการโคลนลงในเวกเตอร์ ดังนี้

6.1. ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ต้องการดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณ (μl)
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	22.5
Buffer (10X)	5
BSA	2
DNA	20
เอนไซม์ตัดจำเพาะ	0.5

- 6.2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 C นาน 2 – 24 ชั่วโมง
- 6.3. ตรวจสอบการตัดด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 6.4. ตัดชิ้นเจลให้มีขนาดเล็ก เติม Gel Extraction Buffer จำนวน 150 μl
- 6.5. บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- 6.6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 1 นาที
- 6.7. เติม Wash Buffer จำนวน 750 μl
- 6.8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 1 นาที
- 6.9. ย้าย Spin Column ใส่ในหลอดทดลองใหม่ ขนาด 1.5 ml
- 6.10. เซนตริฟิวที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 3 นาที
- 6.11. ย้าย Spin Column ใส่ในหลอดทดลองใหม่ ขนาด 1.5 ml
- 6.12. เติม Elution Buffer จำนวน 20 – 30 μl
- 6.13. บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 4 นาที
- 6.14. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 4 นาที

การเตรียมโคลนนิ่งเวกเตอร์

ใช้เวกเตอร์ pBluescript II Phagemid Vector ในการพัฒนาอินทาร์เกตติ้งสำหรับใช้ในสัตว์เศรษฐกิจ ก่อนการเชื่อมดีเอ็นเอทำการเตรียมเวกเตอร์เพื่อให้พร้อมรับชิ้นดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. สั่งซื้อเวกเตอร์จากบริษัทในรูปแบบฟาจมิดและแบคทีเรียเจ้าบ้าน เก็บ phagemid ที่อุณหภูมิ -20

องศาเซลเซียส ในขณะที่ bacterial strain เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

2. ทำการเพิ่มปริมาณเวกเตอร์เพื่อเก็บไว้โดยการทรานสฟอร์มเมชันเข้าไปในแบคทีเรียเจ้าบ้าน

2.1. ใช้ฟาจมิคเคเตอร์ปริมาณ 1 μl (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) เติมลงในแบคทีเรียเจ้าบ้านปริมาณ 50 μl

2.2. บ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที

2.3. จุ่มหลอดลงในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 C นาน 90 วินาที

2.4. บ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที

2.5. เติม SOC medium จำนวน 250 μl

2.6. บ่มในตู้เลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 C นาน 1 ชั่วโมง พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 180 rpm

2.7. เลี้ยงเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้ามคืน ในตู้เลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 C

2.8. เชี่ยเอาโคโลนีจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จำนวน 3 ml ผสมโดยการวอร์เทก

2.9. เลี้ยงในตู้เลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 C

2.10. ย้ายจุลินทรีย์จำนวน 300 μl ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 30% glycerol จำนวน 300 μl ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว

2.11. เก็บจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมเวกเตอร์เพื่อเชื่อมกับชิ้นดีเอ็นเอ (Ligation)

3.1. ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ต้องการดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณ (μl)
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	22.5
Buffer (10X)	5
BSA	2
DNA	20
เอนไซม์ตัดจำเพาะ	0.5

3.2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 C นาน 6 ชั่วโมง (6 – 24 ชั่วโมง)

3.3. ตรวจสอบการตัดด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.4. เติมเอนไซม์ calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) จำนวน 1 μl

3.5. บ่มที่อุณหภูมิ 37 C นาน 30 นาที

3.6. ทำเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์ด้วยการเติม Gel Extraction Buffer จำนวน 150 μl ลงในสารละลายเวกเตอร์จากข้อ 3.5 จำนวน 50 μl

- 3.7. ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 1 นาที
- 3.8. เติม Wash Buffer จำนวน 750 µl
- 3.9. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 1 นาที
- 3.10. ย้าย Spin Column ใส่ในหลอดทดลองใหม่ ขนาด 1.5 ml
- 3.11. เซนตริฟิวที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 3 นาที
- 3.12. ย้าย Spin Column ใส่ในหลอดทดลองใหม่ ขนาด 1.5 ml
- 3.13. เติม Elution Buffer จำนวน 20 – 30 µl
- 3.14. บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 4 นาที
- 3.15. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 4 นาที

การไลเกชัน

เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. องค์ประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์

องค์ประกอบ	ปริมาณ (µl)
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	10
10X T4 DNA ligase	1
ชิ้นดีเอ็นเอ	6
เวกเตอร์	2
เอนไซม์ DNA ligase	1

2. บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ทรานสฟอร์เมชัน

นำ recombinant DNA ที่ได้จากการไลเกชันเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (*E. coli*) ดังต่อไปนี้

1. ใช้สารละลายที่ได้จากการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ จำนวน 1 µl เติมนลงในแบคทีเรียเจ้าบ้าน ปริมาณ 50 µl
2. บ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที
3. จุ่มหลอดลงในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 C นาน 90 วินาที

4. บ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที
5. เติม SOC medium จำนวน 250 μ l
6. บ่มในตู้เลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 C นาน 1 ชั่วโมง พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 180 rpm
7. เลี้ยงเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani ข้ามคืน ในตู้เลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 C

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

ใช้โคโลนีที่เกิดจากการทรานสฟอร์มเมชันในการสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมิด มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

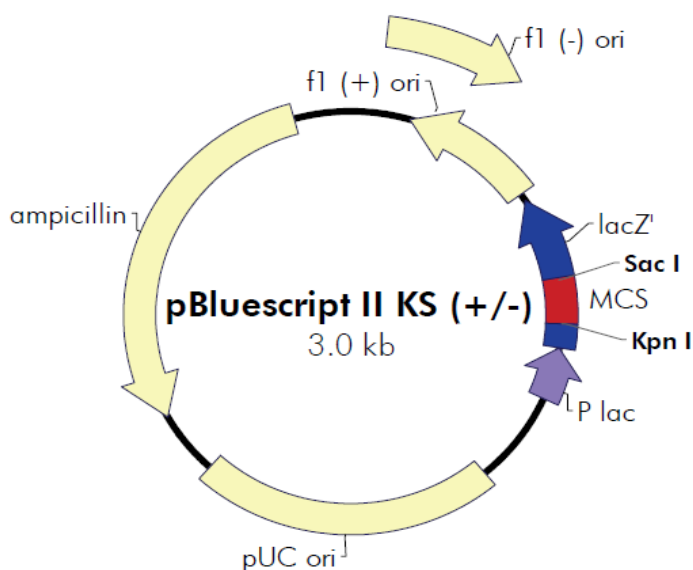
1. เชี่ยเอาโคโลนีจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จำนวน 3 ml
2. เลี้ยงในตู้เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 C เขย่าที่ความเร็ว 180 rpm
3. ย้ายสารละลายจากข้อ 2 จำนวน 750 μ l ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml
4. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 10 นาที ดูดของเหลวทิ้งเก็บตะกอนของเซลล์แบคทีเรีย
5. เติมบัฟเฟอร์ จำนวน 250 μ l ทำให้ตะกอนละลายโดยใช้ปิเปต
6. เติม Lysis Buffer จำนวน 250 μ l กลับหลอดไปมา 6 ครั้ง
7. เติม Neutralization Buffer จำนวน 350 μ l ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 6 ครั้ง
8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 C นาน 10 นาที
9. ย้ายของเหลวลงใน Spin Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง
10. เติม Wash Buffer จำนวน 750 μ l
11. เซนตริฟิวที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 1 นาที
12. ย้าย Spin Column ไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เซนตริฟิวที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 3 นาที
13. ย้าย Spin Column ไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 ml
14. เติม Elution Buffer จำนวน 20 – 30 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 นาที
15. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 24 C นาน 4 นาที

ผลการวิจัย

ทำการออกแบบเวกเตอร์สำหรับใช้ในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจ โดยใช้โปรโมเตอร์ของยีนอัลฟาเอสวัน เคซีนจากสุกรและโคในการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ในการทดลองนี้เลือกใช้เวกเตอร์ฟิบลูสคริป เป็นเวกเตอร์โครงร่าง ผลการพัฒนาเวกเตอร์สำหรับใช้ในสัตว์เศรษฐกิจมีดังต่อไปนี้

การออกแบบตัวพายีนที่เอื้อต่อการแสดงออกของยีนในสัตว์เศรษฐกิจ

เวกเตอร์โครงร่างที่ใช้ในการทดลองนี้คือ pBluescript II Phagemid Vector (pBluescript II KS+ phagemid kit, Agilent Technologies) pBluescript เป็นเวกเตอร์ลูกผสมที่เกิดจากการรวมกันระหว่างนิวคลีโอไทด์เบสของพลาสมิดกับแบคทีเรียฟาจ ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์เบสจำนวน 2961 คู่เบส (Accession # X52327) มีโครงสร้างของจุดกำเนิดของการสังเคราะห์เบสของแบคทีเรีย (ตำแหน่งของลำดับเบส 1158 – 1825) ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการโคลนยีน (ตำแหน่งของลำดับเบส 653 – 760) และตำแหน่งของยีนต้านยาปฏิชีวนะสำหรับการคัดเลือก (ตำแหน่งของลำดับเบส 1976 – 2833) แผนภาพแสดงโครงร่างของฟิบลูสคริปเวกเตอร์ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1. เวกเตอร์โครงร่าง pBluescript

ที่มา : pBluescript II Phagemid Vectors, Agilent Technologies

ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการโคลนยีนของเวกเตอร์ pBluescript (Multiple cloning site, MCS) มีตำแหน่งอยู่ที่ลำดับเบส 653 – 760 เอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้ช่วยในการโคลนชิ้นดีเอ็นเอต่าง ๆ ลงในเวกเตอร์ pBluescript ได้ง่ายขึ้น ตำแหน่งที่นิยมใช้ในการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ pBluescript คือ *KpnI*, *XhoI*, *SalI*, *HindIII*, *EcoRV*, *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *XbaI*, *NotI*, *SacI* (ตารางที่ 1)

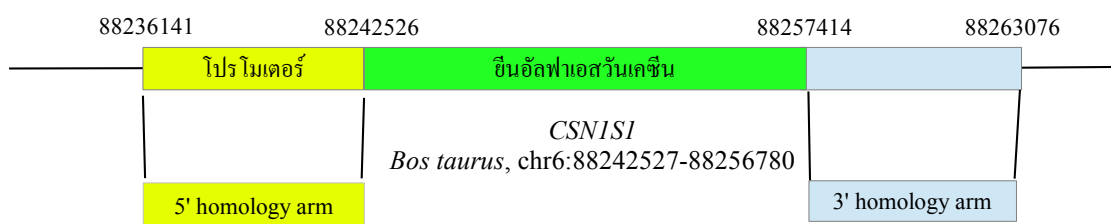
ตารางที่ 1. เอนไซม์ตัดจำเพาะในตำแหน่งการโคลนยีนของเวกเตอร์ pBluescript

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่ง	ตำแหน่งการตัด
<i>KpnI</i>	759	GGTAC↓C
<i>ApaI</i>	753	GGGCC↓C
<i>DraII</i>	749	RG↓GNCCY
<i>Eco0109I</i>	749	RG↓GNCCY
<i>XhoI</i>	740	C↓TCGAG
<i>SalI</i>	734	G↓TCGAC
<i>AccI</i>	735	GT↓MKAC
<i>HincII</i>	736	GTY↓RAC
<i>ClaI</i>	726	AT↓CGAT
<i>Bsp106I</i>	726	AT↓CGAT
<i>HindIII</i>	719	A↓AGCTT
<i>EcoRV</i>	715	GAT↓ATC
<i>EcoRI</i>	707	G↓AATTC
<i>PstI</i>	705	CTGCA↓G
<i>SmaI</i>	697	CCC↓GGG
<i>BamHI</i>	689	G↓GATCC
<i>SpeI</i>	683	A↓CTAGT
<i>XbaI</i>	677	T↓CTAGA
<i>NotI</i>	670	GC↓GGCCGC
<i>EagI</i>	670	C↓GGCCG
<i>SacII</i>	664	CCGC↓GG
<i>BstXI</i>	665	CCANNNN↓NTGG
<i>SacI</i>	657	GAGCT↓C

หมายเหตุ T แทน Thymine, Y แทน C หรือ T, R แทน A หรือ G, N แทนเบสทุกตัวที่เป็นไปได้, M แทน A หรือ C, และ K แทน G หรือ T

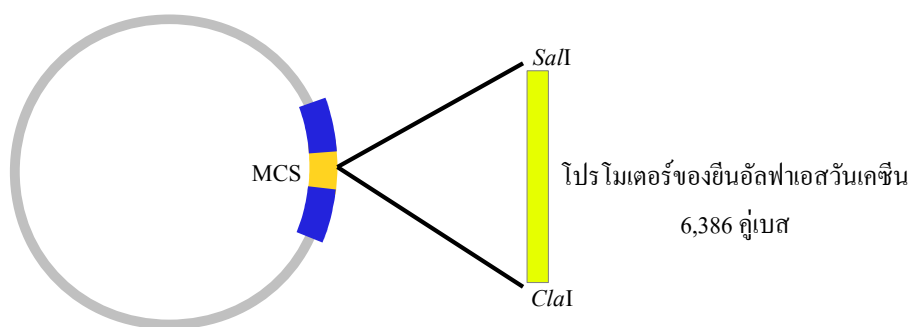
การพัฒนาเวกเตอร์สำหรับใช้ในโค

ยีนตระกูลเคซีน (casein gene family: *CSN*) ในโคอยู่บนโครโมโซมหมายเลข 6 ประกอบด้วยยีนเบต้าเคซีน (β -casein, *CSN2*) อัลฟาเคซีน (α S1-casein, *CSN1S1* และ α S2-casein, *CSN1S2*) และคัลป้าเคซีน (κ -casein, *CSN3*) เป็นรหัสพันธุกรรมสำหรับการสร้างโปรตีนเคซีนในน้ำนมของโค ในโคนมพบว่ามีการแสดงออกของยีนอัลฟาเคซีนมากที่สุดประมาณ 13 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรน้ำนม (Koczan *et al.*, 1991) ดังนั้นการใช้โปรโมเตอร์ของยีนอัลฟาเคซีนควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายจึงเป็นที่น่าสนใจ พบว่ายีนอัลฟาเคซีนมีขนาด 14,254 คู่เบส ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์เบสคือ 88242527 – 88256780 ในการออกแบบเวกเตอร์เพื่อนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์สัตว์ในครั้งนี้ใช้โปรโมเตอร์ของยีนอัลฟาเคซีนเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โครงสร้างของยีนอัลฟาเคซีนในโคแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2. โครงสร้างของยีนอัลฟาเคซีนในโคพันธุ์ Hereford

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็น 5' homology arm ได้มาจากยีนอัลฟาเคซีนของโคพันธุ์ Hereford (*Bos taurus*) ในฐานข้อมูล UCSC Genome Browser (Baylor Btau_4.6.1/bosTau7. <http://genome.ucsc.edu>) ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เท่ากับ 6,386 คู่เบส (chr6: 88236141 – 88242526) ประกอบด้วยอะดีนีนเบสจำนวน 2,280 เบส ไทมีนจำนวน 2,024 เบส ไซโตซีนจำนวน 980 เบส และกวานีนจำนวน 1,102 เบส มีเปอร์เซ็นต์เบส GC เท่ากับ 32.6% (ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในภาคผนวกที่ 3) ทำการโคลนลงในเวกเตอร์โครงร่างที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SalI* และ *ClaI* ดังภาพที่ 3 และตารางที่ 3



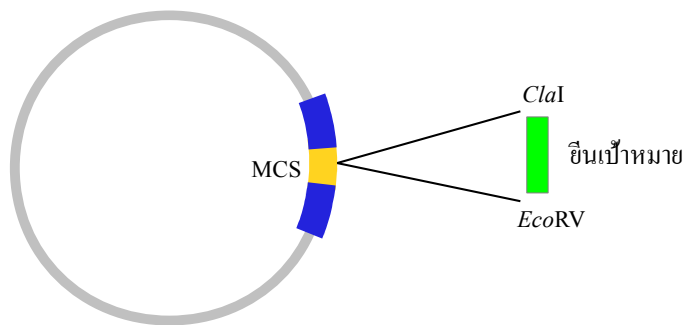
ภาพที่ 3. ตำแหน่งการโคลนจีนดีเอ็นเอ 5' arm ของตัวพายิน

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับการสร้างเวกเตอร์แสดงดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

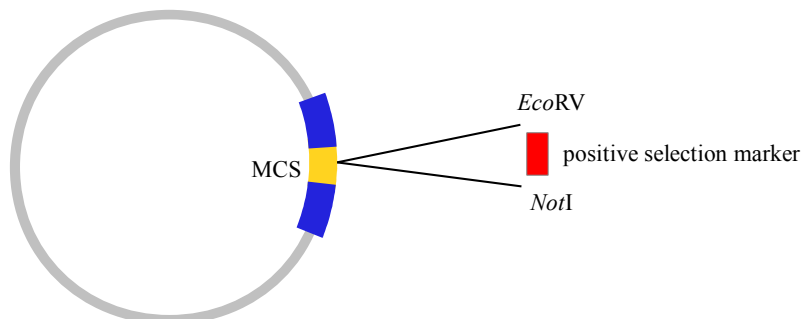
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Tm	ตำแหน่ง
bcsn1s1-5-F	CTCTCAACCACATAGGAAGTG	61	chr6:88236141-88236161
bcsn1s1-5-R	GGTTGTCAAGATCTATGTAAG	56	chr6:88242526-88242506
bcsn1s1-3-F	GTTGGAAACTGCTTGTCTAAT	59	chr6:88257414-88257434
bcsn1s1-3-R	CTGCTATCAGAGCGAGTAATG	61	chr6:88263076-88263056
pcsn1s1-5-F	TAGAGAGAAACAAAGATGTC	55	EU213063
pcsn1s1-5-R	GGTTGTCAACACCTATATAAG	56	EU213063
pcsn1s1-3-F	GGCCGCCATCTACCATGTAG	64	EU213063
pcsn1s1-3-R	CGCGGAATTGACTGCGACTGG	69	EU213063

ยีนเป้าหมายที่นำมาใช้ในการทดลองในครั้งนี้เป็นยีนของมนุษย์ที่ผลิตโปรตีนมูลค่าสูง เช่น ยีน granulocyte colony-stimulating factor (*G-CSF*) และ ยีน erythropoietin (*EPO*) โดยยีน *G-CSF* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่หลั่งออกมานอกเซลล์ มีหน้าที่ในการควบคุมการสร้างเม็ดเลือดในกระดูกไขสันหลัง กระตุ้นให้มีการเจริญและพัฒนาของเซลล์ ยีน *G-CSF* ได้มาจากธนาคารยีนเลขทะเบียน NT_010755 (ตำแหน่ง 1896024-1897508) ขนาด 1,485 คู่เบส (ภาคผนวกที่ 4) ยีน *EPO* ได้มาจาก NC_000007 (100720800-100723700) มีขนาด 2,153 คู่เบส (ภาคผนวกที่ 4) ทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้างเม็ดเลือดแดง จะโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายเหล่านี้ลงในเวกเตอร์โครงร่างที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ClaI* และ *EcoRV* ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4. ตำแหน่งการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย

ใช้ neo cassette เป็น positive selection marker สำหรับการคัดเลือกการเข้าไปของยีนที่เรากำลังศึกษาในโครโมโซม นี้โอคาสเซตประกอบด้วยโปรโมเตอร์จากยีน phosphoglycerate kinase (*PGK*) รหัสพันธุกรรมสำหรับสร้างโปรตีนของยีน neomycin phosphotransferase (*Neo*) และดีเอ็นเอควบคุมการหยุดการถอดรหัสจากยีน growth hormone (bovine growth hormone polyadenylation signal)

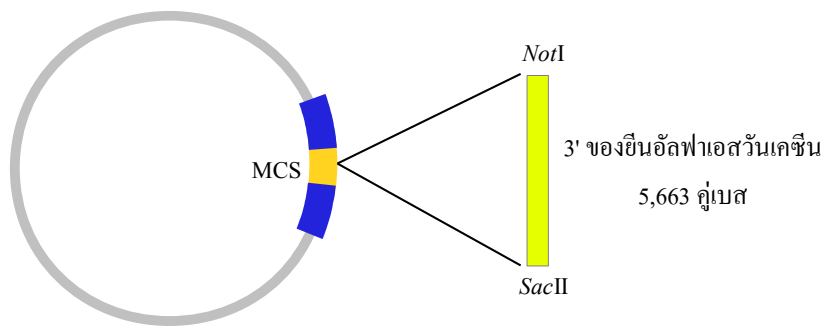


ภาพที่ 5. ตำแหน่งการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ neo cassette

โคลน positive selection marker ลงในเวกเตอร์โครงร่างที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* และ *Not*I (ภาพที่ 5) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ neo cassette แสดงดังในภาคผนวกที่ 5

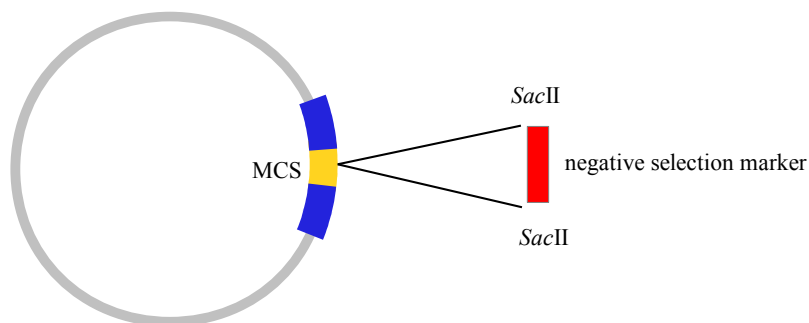
ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็น 3' homology arm ได้มาจากยีนอัลฟาเอสวันเคซีนของโคพิพันธุ์ Hereford (*Bos taurus*) ในฐานข้อมูล UCSC Genome Browser (Baylor Btau_4.6.1/bosTau7. <http://genome.ucsc.edu>) ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เท่ากับ 5,663 คู่เบส (chr6: 88257414-

88263076) ประกอบด้วยอะดีนีนเบสจำนวน 2086 เบส ไทมีนจำนวน 1609 เบส ไซโตซีนจำนวน 982 เบส และกวานีน จำนวน 986 เบส มีเปอร์เซ็นต์เบส GC เท่ากับ 34.8% (ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในภาคผนวกที่ 7) ทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอนี้ลงในเวกเตอร์โครงร่างที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *SacII* ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6. ตำแหน่งการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ 3' homology arm

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็น negative selection marker ได้มาจาก HSV-tk cassette ซึ่งประกอบด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *PGK* จากหนูทดลอง รหัสพันธุกรรมจากยีน thymidine kinase (*tk*) และ polyA signal จากยีน growth hormone ในโค ทำการโคลน tk cassette ลงในเวกเตอร์โครงร่างที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacII* ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7. ตำแหน่งการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ negative selection marker

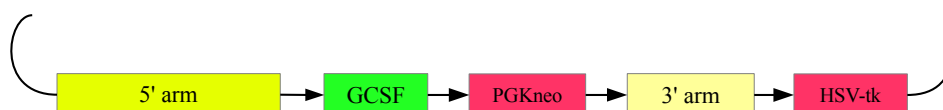
ตารางที่ 3 สรุปชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด และตำแหน่งการโคลนใน pBluescript เพื่อสร้างตัวพาหีนสำหรับ

ใช้ในโค

ตารางที่ 3. องค์ประกอบของตัวพายินสำหรับใช้ในโค

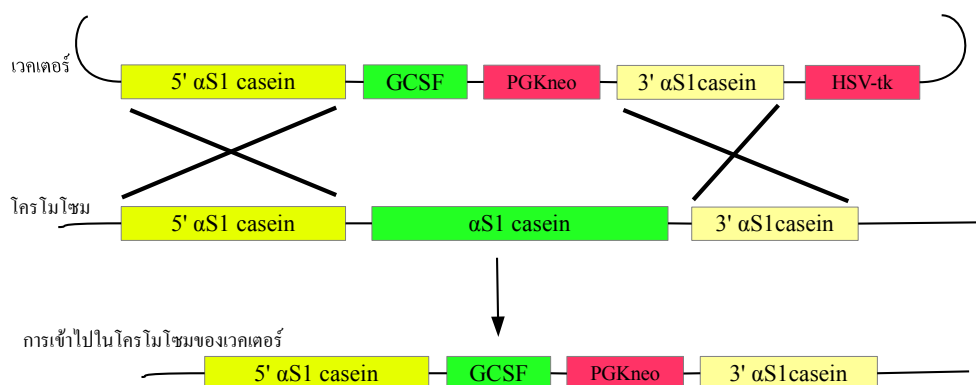
องค์ประกอบ	ขนาด (bp)	ตำแหน่งการโคลน
5' arm	6386	<i>SalI-ClaI</i>
<i>GCSF</i>	1485	<i>ClaI-EcoRV</i>
<i>EPO</i>	2153	<i>ClaI-EcoRV</i>
Neo cassette	1657	<i>EcoRV-NotI</i>
3' arm	5663	<i>NotI-SacII</i>
tk cassette	2800	<i>SacII-SacII</i>

โครงสร้างของยีนที่เรากำลังศึกษาที่สมบูรณ์แสดงดังภาพที่ 8 ตัวพายินที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะนำยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมของสัตว์ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีนอัลฟาเอสวันเคซินในโค ดีเอ็นเอพหุหน่วยประกอบด้วย 5' arm จากโปรโมเตอร์ของยีนอัลฟาเอสวันเคซินในโค, ยีนเป้าหมาย (ยีน *EPO* หรือ *GCSF*), positive selection marker, 3' arm จากยีนอัลฟาเอสวันเคซินในโค และ negative selection marker (ตารางที่ 3)



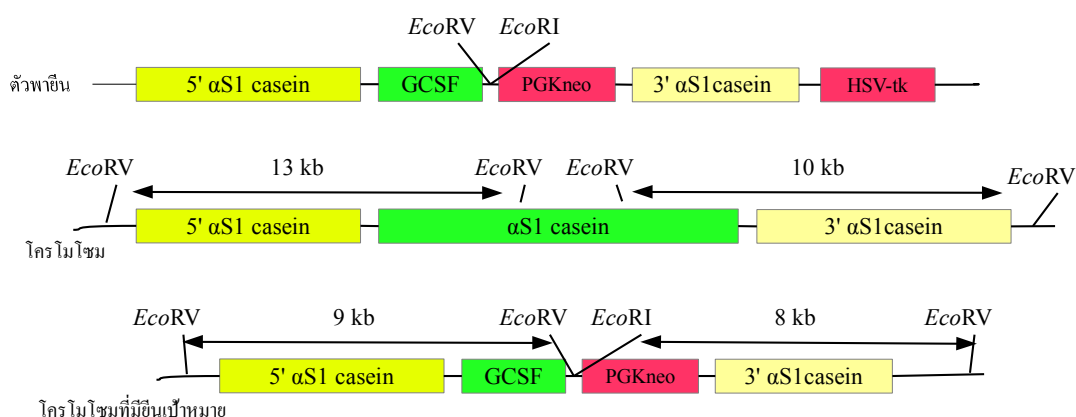
ภาพที่ 8. โครงสร้างของตัวพายินที่เอื้อต่อการแสดงออกโปรตีนสำหรับใช้ในโค

ภาพที่ 9 แสดงรูปแบบและตำแหน่งการเข้าไปของยีนเป้าหมายในโครโมโซมของโค หากเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ การแสดงออกของยีนเป้าหมาย (*EPO* และ *GCSF*) จะอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของอัลฟาเอสวันเคซินในโคบนโครโมโซมหมายเลข 6



ภาพที่ 9. ตำแหน่งการเข้าไปของยีนเป้าหมายในโครโมโซมของโค

ภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับตรวจสอบการเข้าไปในจีโนมของตัวพายินด้วยเทคนิคเข้าเทิร์นบลอต (Southern blot analysis) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่กำหนด ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนเป้าหมายจะมีขนาดเล็กกว่าชิ้นดีเอ็นเอของอัลฟาเอสวันเคซินปกติ



ภาพที่ 10. ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern blot

การออกแบบตัวพายินสำหรับใช้ในเซลล์สุกร

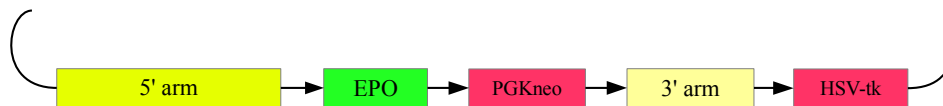
โครงสร้างของตัวพายินสำหรับใช้ในสุกรเหมือนกับในโค แตกต่างกันเพียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาใช้เป็น 5' arm และ 3' arm ได้มาจากยีนอัลฟาเอสวันเคซินในสุกร (EU213063) ในสุกรยีนอัลฟาเอสวันเคซินอยู่บนโครโมโซมหมายเลข 8 ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด และตำแหน่งการโคลนในการสร้างตัวพายิน

สำหรับใช้ในสุกรแสดงดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4. องค์ประกอบของตัวพาइनสำหรับใช้ในสุกร

องค์ประกอบ	ขนาด (kb)	ตำแหน่งการโคลน
5' arm	6.3	<i>SalI-ClaI</i>
<i>GCSF</i>	1.5	<i>ClaI-EcoRV</i>
<i>EPO</i>	2.2	<i>ClaI-EcoRV</i>
Neo cassette	1.7	<i>EcoRV-NotI</i>
3' arm	6.6	<i>NotI-SacII</i>
tk cassette	2.8	<i>SacII-SacII</i>

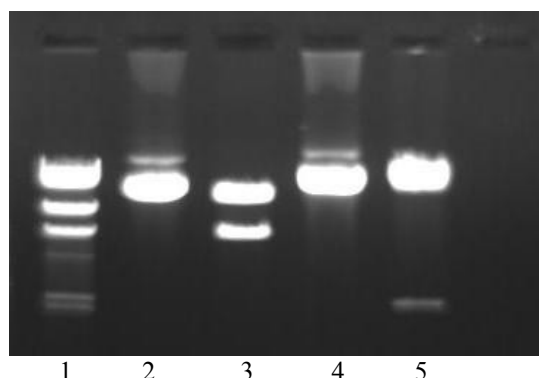
ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างของตัวพาइनที่สมบูรณ์สำหรับใช้ในเซลล์ของสุกร



ภาพที่ 11. โครงสร้างของตัวพาइनสำหรับใช้ในสุกร

รูปแบบการเข้าไปในโครโมโซมของตัวพาइनสำหรับสุกรจะเหมือนของโค วิธีการในการตรวจสอบการเข้าไปในโครโมโซมจะใช้ทั้งเทคนิคพีซีอาและเข้าเทิร์นบลอต

ภาพที่ 12 แสดงชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนที่นำมาใช้ในการสร้างตัวพาอินสำหรับเซลล์ของสุกร



ภาพที่ 12. ชิ้นดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการสร้างตัวพาอินสำหรับสุกร

1: lambda/HindIII size marker

2: ชิ้นดีเอ็นเอ α SI5'-GCSF- α SI3' จำนวน 1 μ l

3: ชิ้นดีเอ็นเอ α SI5'-GCSF (บน) และ α SI3' (ล่าง) จำนวน 3 μ l

4: ชิ้นดีเอ็นเอ α SI5'-GCSF- α SI3'-TK จำนวน 1 μ l

5: ชิ้นดีเอ็นเอ α SI5'-GCSF- α SI3' (บน) และ tk (ล่าง) จำนวน 3 μ l

0.8% agarose gel electrophoresis

ความเป็นไปได้ในการนำยีนเข้าสู่เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของสุกร

การนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ต้นกำเนิดของหนูทดลองเพื่อผลิตหนูทดลองดัดแปลงพันธุกรรมสำหรับใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนและเป็นแบบสำหรับศึกษาโรคในมนุษย์มีความก้าวหน้าและทำกันอย่างแพร่หลาย (Cheah and Behringer, 2001; Hall *et al.*, 2009) มีความพยายามนำเทคนิคการถ่ายยีนไปใช้ในสัตว์เศรษฐกิจ (Rogers *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามมีประสิทธิภาพต่ำเนื่องจากในสัตว์เศรษฐกิจยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในหลอดทดลองได้ (Thomson and McWhir, 2004) ดังนั้นการถ่ายยีนในเซลล์ร่างกายจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง (Bulfield, 2000; Houdebine, 2002; Niemann and Kues, 2003; Paterson *et al.*, 2003; Wheeler, 2003; Kues and Niemann, 2004) เวกเตอร์ที่ได้จากการทดลองนี้หากเสร็จสมบูรณ์จะนำไปใช้ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของสุกรด้วยเทคนิค electroporation ซึ่งผู้วิจัยจะจัดทำเป็นข้อเสนอโครงการในขั้นต่อไป

วิจารณ์ผลการวิจัย

การวิจัยนี้ได้จัดหาเวกเตอร์โครงร่างสำหรับใช้เป็นตัวพาอินที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจโดยเลือกใช้ pBluescript (ภาพที่ 1) และออกแบบตัวพาอินสำหรับใช้ในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจได้ ตัวพาอินนี้สามารถใช้ได้กับโคหรือสุกร (ตารางที่ 3 และ 4 และ ภาพที่ 8 และ 11) การวางแผนในการตรวจสอบการเข้าไปในจีโนมของตัวพาอินด้วยเทคนิคพีซีอาและเข้าเทิร์นบลอตซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้กันทั่วไปในการตรวจสอบการเข้าไปในโครโมโซมของเวกเตอร์ (Cheah and Behringer, 2001; Hall *et al.*, 2009) โครงร่างของเวกเตอร์ที่ใช้ดัดแปลงมาจาก gene targeting vector ที่นิยมใช้ในการสร้างหนูทดลองดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนและเป็นแบบสำหรับศึกษาโรคในมนุษย์ ผู้วิจัยเชื่อว่าเวกเตอร์นี้สามารถนำไปใช้ในเซลล์เพาะเลี้ยงของสุกรและโคได้ อย่างไรก็ตามจะต้องมีการดำเนินการทดลองนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เพื่อพิสูจน์ว่าตัวพาอินที่สร้างขึ้นสามารถใช้ได้จริง ผู้วิจัยจะจัดทำข้อเสนอโครงการในอนาคตต่อไป

สำหรับการสร้างตัวพาอินในครั้งนี้ต้องใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลหลาย ๆ ด้านร่วมกันเพื่อประกอบชิ้นดีเอ็นเอให้เป็นตัวพาอินที่ต้องการ เทคนิคเหล่านี้ได้แก่ การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอและเวกเตอร์สำหรับการไลगेชัน การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอ การนำส่งรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน การคัดเลือก การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และการซีควเอนซิง ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ต้องอาศัยทักษะของผู้ปฏิบัติ วัสดุและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง รวมทั้งการมีห้องปฏิบัติการที่สมบูรณ์ ทำให้ในบางขั้นตอนไม่สามารถดำเนินการให้เสร็จสมบูรณ์ได้ อันเนื่องมาจากเงื่อนไขระยะเวลาและเทคนิคดังกล่าวมีความยากในตัวมันเองอยู่แล้ว ในบางกรณีอาจจะไม่ประสบความสำเร็จตามแผนที่วางไว้ได้ ยกตัวอย่างเช่นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองที่จะต้องมีการออกแบบไพรเมอร์และปรับองค์ประกอบและปรับสภาพของปฏิกิริยาเพื่อให้เหมาะสมกับชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้น

เนื่องจากการประยุกต์ใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมยังไม่แพร่หลายในวงการปศุสัตว์ของบ้านเรา และจากความรู้ของผู้วิจัยที่มีอยู่เชื่อว่าการทดลองนี้เป็นความพยายามครั้งแรกในการพัฒนาตัวพาอินสำหรับใช้ในเซลล์เพาะเลี้ยงของปศุสัตว์ในประเทศไทย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเป็นการเปิดโอกาสและการพัฒนานักวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในสาขาสัตวศาสตร์เพื่อนำความก้าวหน้าทางด้านชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการผลิตสัตว์ และผลการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้โดยทำการจัดหาและออกแบบเวกเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจ

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้จัดหาเวกเตอร์โครงร่างสำหรับใช้เป็นตัวพาหีนที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกในเซลล์ของสัตว์เศรษฐกิจโดยเลือกใช้ pBluescript (ภาพที่ 1) และออกแบบตัวพาหีนสำหรับใช้ในเซลล์ของโคและสุกร (ตารางที่ 3 และ 4 ภาพที่ 8 และ 11) แม้ว่าในขั้นตอนการนำองค์ประกอบต่าง ๆ ของเวกเตอร์มาประกอบกันให้เป็นตัวพาหีนที่สมบูรณ์จะไม่เป็นไปตามเป้าหมายที่ตั้งไว้ใน การทดลองนี้คาดหวังว่าจะนำตัวพาหีนที่ได้ไปใช้ในการส่งเข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์ ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปควรจะดำเนินการทดสอบการนำส่งตัวพาหีนที่ได้เข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ทั้งที่ได้จากตัวอ่อนหรือจากสัตว์ที่โตเต็มที่แล้วด้วยเทคนิคอิเล็กโตรพอเรชันและเทคนิคทรานสเฟกชัน (transfection) ด้วยสารเคมีที่มีจำหน่ายโดยบริษัท เพื่อนำไปใช้ในการผลิตผลิตโปรตีนมูลค่าสูงในสัตว์เศรษฐกิจ

บรรณานุกรม

- ช่อทิพ อรุณเดชาชัย จันทร์จรัส เรียวเดชะ ดวงสมร สุวัทนา และมนต์ชัย ดวงจินดา. 2547. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนเบต้าเคซีนและแคปปาเคซีนในโคนมลูกผสม. *เวชสารสัตวแพทย์*. 34: 57-63.
- ปราณีต โอปะณะโสภิต. 2003. การพัฒนาวิธีนำส่งยีน. *Thai J. Pharm. Sci.* 27: 1-15.
- Abujarour, R. and S. Ding. 2009. Induced pluripotent stem cells free of exogenous reprogramming factors. *Genome Biol* 10: 220.
- Bovenhuis H, Van Arendonk JA, Korver S. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J Dairy Sci.* 75: 2549-2559.
- Bulfield, G. 2000. Farm animal biotechnology. *Trends in Biotechnology* 18: 10-13.
- Carey, B.W., S. Markoulaki, J. Hanna, K. Saha, Q. Gao, M. Mitalipova, and R. Jaenisch. 2009. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 157-62.
- Cheah, S. S. and Behringer R. R. 2001. Contemporary gene targeting strategies for the novice. *Mol Biotechnol.* 19(3):297-304.
- Chessa S, Chiatti F, Ceriotti G, Caroli A, Consolandi C, Pagnacco G, Castiglioni B. 2007. Development of a single nucleotide polymorphism genotyping microarray platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms. *J Dairy Sci.* 90: 451-464.
- Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA. 2003. Making recombinant proteins in animals--different systems, different applications. *Trends Biotechnol.* 21: 394-399. Review.
- Farrell HM Jr, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci* 87: 1641-1674.
- Hall, B., A. Limaye, and A. B. Kulkarni. 2009. Overview: generation of gene knockout mice. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino et al.* Chapter 19: Unit 19 12 19 12 11-17.
- Hasegawa, K., A.B. Cowan, N. Nakatsuji, and H. Suemori. 2007. Efficient Multicistronic Expression of a Transgene in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 25: 1707-1712.
- Houdebine, L. 2002. Transgenesis to improve animal production. *Livestock Production Science* 74: 255-268.
- Ibeagha-Awemu EM, Prinzenberg EM, Jann OC, Lühken G, Ibeagha AE, Zhao X, Erhardt G. 2007. Molecular characterization of bovine CSN1S2*B and extensive distribution of zebu-specific milk protein alleles in European cattle. *J Dairy Sci.* 90: 3522-3529.
- Jo, J. and Y. Tabata. 2008. Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. *Eur J Pharm Biopharm* 68: 90-104.
- Koczan, D., G. Hobom, and H. M. Seyfert. 1991. Genomic organisation of the bovine alpha-S1 casein gene. *Nucleic Acids Research* 19: 5591-5596.
- Kues, W. A., and H. Niemann. 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends in Biotechnology* 22: 286-294.

- Martin P, Szymanowska M, Zwierzchowski L, Leroux C. 2002. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reprod Nutr Dev.* 42: 433-459. Review.
- Niemann, H. and W.A. Kues. 2003. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim Reprod Sci* 79: 291-317.
- Paterson L, DeSousa P, Ritchie W, King T, Wilmut I. 2003. Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. *Applications of reproductive cloning. Anim Reprod Sci.* 79: 137-143. Review.
- Prinzenberg EM, Weimann C, Brandt H, Bennewitz J, Kalm E, Schwerin M, Erhardt G. 2003. Polymorphism of the bovine CSN1S1 promoter: linkage mapping, intragenic haplotypes, and effects on milk production traits. *J Dairy Sci.* 86: 2696-2705.
- Rogers, C.S., Y. Hao, T. Rokhlina, M. Samuel, D.A. Stoltz, Y. Li, E. Petroff, D.W. Vermeer, A.C. Kabel, Z. Yan, L. Spate, D. Wax, C.N. Murphy, A. Rieke, K. Whitworth, M.L. Linville, S.W. Korte, J.F. Engelhardt, M.J. Welsh, and R.S. Prather. 2008. Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J Clin Invest* 118: 1571-7.
- Thomson, A. J., and J. McWhir. 2004. Biomedical and agricultural applications of animal transgenesis. *Molecular Biotechnology* 27: 231-244.
- Wheeler, M. 2003. Production of transgenic livestock: Promise fulfilled. *Journal of Animal Science* 81: 32-37.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของเวกเตอร์โครงร่าง

```
>gi|58061|emb|X52327.1| pBluescript II KS(+) vector DNA, phagemid  
excised from lambda ZAPII  
CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAAC  
CAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTC  
CAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA  
GGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTA  
AATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG  
AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCAC  
CACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGG  
GAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT  
TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATA  
CGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGATCCCCCGGG  
CTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGT  
TCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTT  
ATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT  
GAGCTAATCACAATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTG  
CATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCA  
CTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT  
ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGT  
AAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT  
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGT  
GCGCTCTCTGTTCGACACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG  
CTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC  
ACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAG  
ACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCT  
ACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC  
TGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG  
TGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT  
TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA  
GGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC  
TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCC  
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTG  
CAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGC  
CGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA  
GTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCT  
CGTCGTTTGGTATGGCTTCAATTCAGTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTT  
GTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCA  
CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG  
GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAAT  
ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGA  
AACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTT  
CAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGG  
AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAG  
GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCA  
CATTTCCCCGAAAAGTGCCAC
```

ภาคผนวกที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของ 5' arm (สุกร)

>EU213063_43086-36808_6279

TAGAGAGAAACAAAGATGTCTTTCATATTCTCAGTAAATTTCTTCTGGAAGTTTCACTG
TTAAAAGACATTTTCTAGAAAGACTCACCAGTCATAAACCCAAATATTCCTGGGAGAATG
CTGACAAACTAGCTTTGAAATTCATGTTCTGAATTATTGACTGTCTCATAACAGATGAGT
TCTCCAATGAGGTTTAAATGTGGACCAGAATATGTAGCAACAGTACACAAAACCTTGCAGA
GTAAAGTTTACCTCCTGACTCACAGTTCCTTCCCTCCAAACTCGAAGTCTATTGCTAAT
GTTTCCTCTCCTTTTTGTGCTAGTTTTCTAAGAAGTATGAATCTAGGAAAGAATGTTTC
CAATATTGAAACTTGAAACACAAGAAAGCTTTCAGCTTGGTTGTCCCTTATCTGACCTAT
TTCCACTTTCAGTACTTAGGGATTCTGTTGGATTTTCAAACCGTCGTGATAGTACTAG
AGTAGCTTTGCCTTTGTGTGCCAAAGATAGTTTTGGTTTATGGCTGTCTGTTTGTATGA
TTATTACAAAGACTCTCCCATACTCATAAGTGTTCATGTTGAATGATCAGTTATATGTT
CATCCTACATATGACTATTACATCAGAAAATCGCTATTTCAGGTAATAATTCATTCTTTC
TTTACTCACAGGACAAAGGCCTGTTTAACTACAAATCATCTAAATATGTGTCTCAAATGT
GAACGTGTGATTTTTCTTTTTTAGTGGTTTGAACGAACAATTTTTTTTTTAATTTATTTT
TTCCCACTGTAAAGCAAGGGGATCAAGTTATCCTTACATGTATACATTTTTTATTCCCCAC
CCTTTGTTCTGTTGCAATATGAGTATCTAGACATAGTTCTCAATGCTACTCAGTAGGATC
TCCTTGTAATCTACTCTAAGTTGTGTCTGATCAGCCCAAGCTCCCAATCCCTCCCACTC
CCTCCCTCTCCCATCAGGCAGCCACAAGTCTATTTTCCAAGTCCATGATTTTCTTTTCTG
TGGAAGGGCTCATTTGTGCCTTATATAAGATTCCAGGTATCAGTGATATATCATTTGGTA
TTTGTCTTTCTCTTTCTGACTTACTTCACTCAGTATGAGAGTCTCTAGTTCCATCCATGT
TGCTGCAATGGCATTATGCCATTCTTTTTATGGCTGAGTAGTATTCCATTGTGTGTATA
TACTACATCTTCCGGATCCAATCATCTGTTGATGGACATTTGGGTTGTTTCCATGTCCTG
GCTATTGTGAATAGAGCTGCAATGAACATGTGGGTGCATGTGTCTCTTTCAAGGTAAGTT
TTGTCTGGATATATGCCAAGAGTGGGATTGCAGGGTCACATGGTAGTTCTATGTGTAGA
TTTCTAAGGTATCTCCAAACTGTTCTCTATAGTGGCTGTACCAGCTTACATTACACACAA
CAGTGCAGGAGGGTTCCCTTTTCTCCACCCCCCCCCCAGCATTTGTTATTTGTGGACTTA
TCAATGATGGCCATTCTGACTGGTGTGAGGTGGTATCTCATGGTAGTTTTGTTTGCATTT
CTCTAATAATCAGGGATGTTGAGCATTTTTTTCATGTGCTTGTGGCCATCTGTACATCTT
CCTTTGAGAAATGTCTATTTCAGGTCTTTTGCCCATTTTTCCATTGGGTTGGTTGGCTTTT
TTGCTGTTGAGTTGTATAAGTTGCTTGTATATTCTAGAGATTAAGCCCTTGTCCATTGCA
TCATTGGAAGCTATTTTTCTCCATTCTGTAAGTTGTCTTTTTGTTTTCTTTTGGGTTTCC
TTTGCTGTGCAAAAGCTTGTGAGTTTGTGAGGTCCCATTTGGGTTTATTTTTGCTCTTATT
TCTGTTGCTTTGGGAGATTGACCTGAGAAAATATTCATGATGTTGATGTGAGAGAGATT
TTGCCAATGTTCTCTTCCAGGAGTTTGATGGTGTCTTGTCTTATATTTAAGTCTTTTACGC
CATTTTGAAGTTTATTTTTGTGCATGGTGTGAGAGTGTGTACCAGTTTCGTTAATTTTCAT
GCAGCTGTCCAGGTTTCCAGCAATGCTTGTGTAATAGACTTTCTTTTTCCCATTTTATG
TTCTTGCCTCCTTTGTCAAAGATTAATTGACCATAGTTGTCAAAGTTTATTTCTGGGTTC
TCTATTCTGTTCCATTGGTCTGTCTGTTTTGATAGCAGTGGCATGTTGTTTTGATGACTG
TGGCTTTGTAATATTTTTTGAAGTCTGGGAAAGTTATGCCTCCTGCTTGATTTTTGTTTC
TCAGGATTGCTTTGGCAATTCTGAGTCTTTTGTGGTTCCATATAAAATTTTGGATTGTTT
GTTCTAGTTCTGTGAAAAACGTCATCGGTAATTTGATAGGGATTGCATTGAATCTGTATA
TTACTTTGGGTAGTATGGCCATTTTTACATTATTGATTTTTTCCAATCCATGAACACGGAA
TATCTTTCCATTTCTTTACATCTTCTTTGATTTCTTTGATTATAGTTTTATATGAAGTGA
ACAACTTTAAAGTGATAAAAGCAAAAGGAAAAATACGAATATAAAGCAAAATTGACATAAGC
TAAAATTTTGCAGGATTTGACGTTGTATAAATCTACAATGAATATGTTTGTCTGAATTAC
AGTGAACAGTCATATTTTACAAGTATAAGAATGATTTATTTCAAATACAACTTAATTA
ACTATATTCTATATCTAATAAGCAAAGTGAAGATTGATCCTTATCCATAGGTACTAGAAA
AATCTGTGTTTTGAGTTTATGAGAATTCCTATGGTGGATACATGTGTTCACTAAGAGTTG
GCTTGTCTTTAAAAGTTCTGATTGTTCTTCTTTGATGGCAAGCCTTATTATTATCAAATC
TAAGACTCCAGTCTCAGTTTTTTGAGTCTCTATTTTTGGACTATCAGGAATATTAAAAAT
ATCAGCTTTTTGTATGTGAATTACCCACTATAGTATGAGACTACAGATTTTGTCTTACCC
AACTTTTTATTTCCCTGTGTCTTGTCTCATTTCTTCACCTCTGTAAATAAATAATGTAAG
AATGAGTAAACAAATGAGGATACAGTAGCTTTACACAACCTACAGTATGATCCTGAATTG
GAAATAAAATAAGTCAGTTATCCTGGATGCATTCTCAGGAAAAGACAAGAGCCGGGTATT
GTAAGGCAGTGGAGAATACTTGTCTCAGCCCCCTTGGATAAATCAGAGTAAATAGAAAAAT

ACTAGTGCTTTTTTACATTGATGTAATGCAGTCAGCAAGGACGATACTATCCAAAGAGA
AGTTTAAACATGGAAAACATAGCCTTGTCTATCCCCAGTATGGAAAGCCTGAGCCACTGC
GAAATTTCTTTTAAACCCCAAATAATGTTCTACCATATGACTGTAAATTGGCTGTGAATA
TCACTATGGATTTATTATTTTATTTTAAATTTTTTGGTCTTTTTTCTTTTAGGGCTG
CACCCATGGCATATGGAGGTTCCCAGGCTAGGGGTGCAATTGGAGTTGTAGCTGCCAGCC
TACACCACAGCCACAGCAATGCCAGATCTGAGCTGTGTCTGCAACTTACACCACAGCTCA
TGGCAACACCAGATCATTGACCCCTTGAGTGAGGCCAGGGATCGAACCTGCAACCTCATG
GTTCCCTAGTCAGATTCATTTCCCCTGCGCCACAATGAGAATTCCAGAATTTTTTTAAATA
TATAGTGTGATACCTTTCTGTAAACAAGCAGTCACAATCAACAATTTTTTAAATCCAGCT
CTATGTATAGATATTTTATTCAGCATGCAATTTTTTCTTAAATTAACAATGCCAGTTA
ATTCTAGGATTATATTTTCCAGGACTGGAAAGAAAGTTTTTTTTTCTTTTATTTACTTACT
TTAAAAGGTGGAAAATTGGAGTTATGGTTGATTTTTTGGGGGGGGGAGTATTTAAAAAT
TGTATTTCTTAAATAAAAAATTATTCTTGAATAATTATTTTTAATTAAGAAATCTAACAATT
AAATTAATGAATACTATCACAAACACATATACCCAAAATAAGCAAGCAGAAAATTATTTG
GTGTAGTTAAAATACTACCAAAGTTTATAAGGCAATTGTATTTCTTTTGGTTAAAAAA
AAGATCAGATCACATATAAGGTAACCTTACTCCACAAGGTAACCTTACTTAGAATACTTAGA
ATAAATACTTAGAAGACTTAGAATAAATAATAGGGAATAAATAGAGTTTTTAAAGGTGAA
ATAGATGATGAAATCTTCTCATGGTCTAGTACAATTATAAAAAATTAAAAATTTTGTATGA
TTTTATTTTGTCTCAAGAATTTCCCTTACAGGTATTGACTTTTTTCAAAAGCTGTAAAGGA
AATTTTATTGCTATATTAATCTTTCCAATTATCCATTTAACTTAAAAAGCATGTTCTTAT
AATAACCATAAATATGGAATTTTTATGTATCTTAATTTTGAATAATGTCATTCCATTTCC
TGTATAATTTGGTATCATAGCATGAATCACTCCTTTGTTGAAAACCTCTCCTCAGAATTTT
TTGGGAGAAAAATTGGACAGAAAATTAATTTCTCTTTGAGAGAATTCTTAGAATTTAAA
TGACACTATTGGTTGAACTGAAACCACAAAATTAGCATTTTACTAATCACTAGGTTTAAA
TATTTGTGAAACAAAGAGATCTGCCACCATCTTGATCATCAGCTCAGCTTGCTTCTTCTT
TCCGGTCTTGGGTTCAAGGTATTTTCAATTTACATATAGCAAAATGTGATATATTATGATTT
CAATCTGTCTAATTTTTTCACTCCTCACTAAAAAATATGCACTGGTAACCTTTTCTGTGTGA
TTCCAAATATTGATACCTTTTAAATGATATACTGGTGGCTTAAAAATGCATTTGCAAAATGT
CGATGCCATCTATCTCAGAGCTTTAGTTGAAAAATAATAGTTTTTATAAAGACCAAATTTT
TTTTGCCAAATTTTATGAAAACCTTATTATGTGAAATAATTTATAATCTTTTTTAAAGATCA
TAGTGAGGATCATTCTGGTAGAATATTTCAAGACCATTTTTATTCCATGTCATTAGGTT
AATAAAATTAATTTCTATAAAGGATATGTCAATGATATACACAGATATAAATGACTACTTT
TTAAAAGATGGTTAGATTTGGATATTTGGAAAAATGCAATGAATAAAACCAGTAAACTC
ATTTTGGATTTATAAATATGTCTTCTTACAAATGCAGTTAGATTCTACAATATGTAGAC
TGAAACAGTATGTATAAATAAGCTGATTAGTTTGGTGGCTAATGTATAAACAATGCA
TGTATATTATGACTTTTCCTTTCTAATTTCTCTGGAACACAGTTTCCCAGGACATAAGTT
CTAAGTATCTCTGGGTTCTTGTAATTTGATGGAACCTCTAGAAGTCACACATGATAAGACA
TCAGAATCTTATGATTCTGCTCAATGAAGTCGTCTTTATGCAGTCATGTCATGGATATAG
CAACGTAGAAAAACATAACATAATAGCTAGACTTTAAAAAAAATTTGATGGAGGTAAAT
GTTTCTACATAATATGCACCAACAGTGTTTTTCCCAAAGACGCTGAAAAAGCAGGATTCT
CTAACATAGACCTAGAAAAACACCTTCAAAAAATTGCAGATAGGGAGTTCCCGTTGTGGC
TCAGTGGTTAAACAAATCCGACTAGGAACCATGAGGTTGCAGGTTCAATCCCTGGCCTTGC
TCAGTGGGTTAAAGGATCTGGCATTGATGTGAGCTGTGGTGTAGGTCGAAGACGTGGCTT
GGATCCCACGTTGCTGTGGCTCTGGTGTAGGCTGGTGGCTACAGCTCTGATTCAACCCCT
AGCCTGGGAACCTCCACATGCCGTGGGAGCGGCCCAAAAAAGGCAAAAAGACCAAAAA
AAATTTTTTTTTTTCAGATAAAATTAATGCCAGTTCCCTGTGCCTTTTATGTTTATTATCAA
TTTTTAGCAATCTGATGGTCTAAGAGGAAATATTTAAATAATTAATTGTAGTATTCTT
AAATTTAGTAGTATTTAAATATTAATGTTTATGTATTCTCTGACAAAACCTATTACCA
CTTCAAGGATCAAATGTTTTGTTTTAGAGGTGATACTGGTGTTCCTTATCTCATATAAG
CACTAAGCAAGATAATTTGAATGATAAATTTTCTGTGAGTAAATTTTCTGTGACACCT
AAATTTTTATTTTGTTCCTTATATAGGTGTTGACAACC

ภาคผนวกที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของ 5' homology arm (โค)

```
>bosTau7_chr6:88236141-88242526
CTCTCAACACATAGGAAGTGGATATTACTAAACAGATGGGAACATTGAG
ACAAAATGAGGTTGCAAAATTACACTGTTGGTCATTGAAAGCCAGAAATT
AAACTTACAATTTGACCTTGAAGCATTGTCTTGCAACCACTACATTCTAT
CTCTTTACTTAAACAATGCTCACTTAAGATTTCCAAAGACCAATTGACAG
AGTATCAAGTTAAAAAGGACACTGTTTTAAATCCAAATATAAAATCTATC
ATAGGTTCCACATTTCCAGTACTATCATATATTCAGAATATAAAACTTCC
TGAAAAGAGCTCTGTTTTAGTTCTGGATACTAAAATTCTATTTATACAAT
ATCTAAGAGTAATCATTAATGATCTTATTGTGTATCTTTTCTTAGATTCC
AAATGGCATATGGATTTCTAGAGAAAAACAGAAATATCTTTCACATTTCT
CAGTAACTTTCCTTCTGGAAGGTTGACTGTTTGTTATATAATTAAGCAAC
ACTTTCCTAGAAGACTAATCAGTCAAATGTTCTGGGAGAACTTTGACAA
ACCAAGTTGAACTTCAAATTTCTGAATTTTCACTGTCTCAAACAAAGTC
AGTCCTCCAAAGAGGTTTGAATCTGGACTAGAATATTTAGCAACAATGTA
CATAATCTTGCAGGGGATAGTGTGTCTCTTAACTCATAGTTTTTTTTTTC
AAAAATCTATGTTTTATTACTAATAATGTTTTTTGTATGTGTGCTAATTTT
TCTAATAAGTTTAATTTTTTTTTTTCATTATTGAAATTTGAAAGTCAAGAAA
GCTTAGTTCTCCCTTACCCAGTCTATTTCTGGTTTCATTTCTTTAGGGAT
TTTGTGGATTTTCAAACAGGTTGTGATATCACTAGAGTATCTATGCC
TTGAGCTCTTAAATTAGTCCAATCTATATCTATTGTTTTGTTATAATTAT
TAAGAGTAGACCTTTTACTATGATAAATGATCAATGTTAGATGACCAAC
TTTATGGTCACCCCATGTATGACTGTTACATCAGAAAATTAATATTTT
TTTATTTACAAGGCAAAGGCCCATTTGACTACAAATAGTCTAAATATGTG
TCTCAAATTTAAGCCTTGTTTAGTAGTTGGAAGTGAAGAATTTTAAGTGA
TAAAGCAAATTGAAAATATCAATATAAATCAAATAAATGTAGGCTAACAT
TTTGCATGATTTGGCATTATATAAATCTACAATCCTTTTTCACGGATCACA
AACTTGTGTGGTGAAGGGCCTTGAGTAACTCAATGAAGCTATGAGTCAT
GTCATACAAAGCTCCCCAAAATGGTCAAGTCATACTGAAGAGTTCTGACA
AAATGTGGTCCACTGGAGGAGGGAATGGCAAACCACTGCAATATTCTTAC
CATGAGAATCCCATGAATAGTATGAAAAGGCAAAAAGATACGACACCAGA
AGATGAGCTCCCCAAGTCAGAAGATGTCCAATATGCTACTAGGGAAGAGC
AGAGGGCAGTTACTAATAGCTCCAGAAAGGATGGAGCAGGTGGGCCAAAG
CAGAAATGACTGGTTGTGTCTGGTGATAAAAGTAAAGTCCAATGCTGTAA
AGAACAGTATTGATTAGGAACCTTAGAATGTTAGGTTTCATGAATTAAGGCA
AGTTGGATATGGTCAAGCAGGAAAGAAATCAGTGAACATAAATTTGGACAG
GAATGGGCAATTTAATTCAGATTACCATTATATCTATTACTGTGGGCAAG
AATCCCTTAGAAGAAATAGAGTAGTCCTCATAGTCAAGAAAAGAATCTGA
AATGCAGTGCTTGATGCAATCTCAAAAACAATAGAATGATCTCCATTTG
TTTCCAAGGCAAACCATTCACATCACAGTAATCCAAGTCTGTGCCCCAA
CCACTAACGCTGATGATGCTGAAGATGACCTGGTCTACAAAGACCTACAA
GACCTTCTAGAAGTACACCGAATAAATAAATCAATATCCTTTTTCATCAT
AGGGGATTGGAATGCAAAAGTAGAAAGTCAAGAAATACTTGGAGTAACAG
GAAATTTTGCTTTGGAGTTAAAAATGAAGCAAGTCAAAGGCTAACAGTTG
TGTCAAGAGAACACATTGGTTCATAGTGAATACCCTCTTCCACCAACACGA
GATGACTCTGTACATGGACATCAGCAGATGATCAACACTGAAATTTGGATA
GATTATATTCTTTGCAGCCAAAGATGGAGAGACTGTATATAGTCAGTAAA
AAATAAGACCTGGAGCTGACTGTGGCTAAGATCTTGAGCTCCTTATTGCA
AAATTCAGGCTTAAAAAGAAAATGAAGAAAACCATTTGAATGGACATTGAA
AATTGAATGGACAATTCAACTATGACCTAAATCAAATCCCTTATGATTAC
ACAGTAGAGGTGATGAATAGATTCAAAGGATTAGATCTGGCTATTACATT
GTACAGGAGGCAGTGACCAACACTATTCCAAAGTGGGGGTGGGCGGAAAT
CCAGAAGTTAAAGTGGTTATCTGAGAAGGCTTTACAAATAGTTGAGAAAA
GAAGAAAGAAAATAGAAAAAGAAAAGAAAAGAGAAGCAAAAGACAA
AGACAAAGGAGAAAGGGGAAGCTATACCCAAGTGAATGCAGAGTTCCAGA
AAATAGCAAGAGAGAATGAGAAGGCCTTCTTAAATGAACAATGCAAAGAA
```

GTAGAGGAAAAACAATAGAATGAGAAAGACTAGAGATCTCTTCAAGAAAAAC
TACAGCTGTCTGGGAATATTTTACAAAGGGAATATTTCCCACTTCCCAAG
ACCTTTTACCAGGGATCTTCCCAACCCAGATGGGCATGAAAAAGGAGAGA
AATAAAAAAGGACTTAACAGAAGCAGAAGAAATTAAGAAGAGGTGGCAAGA
ATAGTATTACAGAAGAACTGTATTTAAAAGATCTTAATGACCCAGATAGC
CACAGTTGTGTAGTCTCTCATCTACAGCTTAAAACTCAATGTTCAAAAAA
CTAAGTTCATAGCATACTGCCCCATCACTTCATGGAAAATAGTGGGGGAG
GGGGAGAAGGTGGAAGTAGTGTCTAGATTTTTATTTTCTTGGACTCAAAATC
ACTGCAGACAGTGATTATAGCCATGAAATTAAATGACGCTTACTCCTTGA
AAAGAAAGTTCTGAAAAACCTAGACAACATATTA AAAAGCAGTGACATCA
CTTTACTGATAAGTGTCTTTATAGTCAAAGCTATGGTTTTTCCAGTAGCC
ATGTACAGATGTGAGAATTGGACTATGAAGAAGGATGAGTGTCAAAGGAC
TGATGTTTTCAAATTGTGGTGGATACACTCCTTTGCATGCGTGCTAAGTC
ATTTCAAGTCATGTCCAACCTCTTTGCAACCCAGTGGACTGTCTGTCTGCCAG
GTTCCCTCTGTCCATGGGATTCTCCAGGCAAGAGCAACGGAGTGGGTGTCT
ATTTCTTCCACCAAGGGGATCTTCCCAATCCAGATATTGAACCTGCATCTC
TAATGTTTTCTGTCTTGGCAGGCAGGTTCTTTTACCAGTGTGCCACCTGG
AAAGTCCGGATACACTCCTGGGAAAGACAAAAGTAGAGTATTACAATGCA
GCAAGGATTTTTGTTCTCAGCTCCTTGAATAAATTATAGTGAATAGAAAA
CATTAGTATCTTGTGAAATTGATGTGAAACAGATAGTAAGGAAGATAAT
ATCTAAAGAAAACCTTCAATATGGGAAATTATAGTCTTTTCTATCTTCAA
GTGGACAGCCTGAACAGTTTTTGAATTTCTTTTAATACAAAATAATGTTC
CTGTCATACAACTGTGAATACACTGAAAATATCACTATAGATTTTTTAA
GTATATAATATGATTCTTTCTTATAAACAATGAGTTGCAATCAACAAGT
TTTTTAAAGCTCTCACTTGTATAGATTTATTTTTTAGCACATAATATTTTC
TACAATGTACAATGCCAGTTAATTCTAGGAGTACAATTAAGAATTGGAGA
GATAGGAATTTTTTTCTTTTACTTGTCTTACTTTAAAGATGGAAAATCAG
AGTTATGGTTTTATTTTTCGCAATATTTAAAAATTATAATTCTTGAATAAC
TATTAATTTTAATTAAATAATCTGTAATGAGAATCCTCCTACCAATGTAG
GAGACGTGAGTTTGACTCCCGGTAGGGAAGATACCCTGCAGAAGGAAAT
GGCAACCCACTCCAATATTATTACTTGGGAAATCCCATGGACAGAGGAGA
CTGGCAGGCTGCAGTCCATGGGGTCAAAAGAACTGGACACGACTTAGA
AACTAAACAACAACAATTTATACCAGAATGAATGAACTAGTTACCACAAC
TAGTACACCCAAAATGAACAAAAATAGCTTGGTGGTATAATTAAATGC
CACCAAAATTTATACAATAATTATATTTTCTTTTTTGCAGGAAAAAGATTA
GACCACATATAATGTAACCTATTTTACAAAGGTAAATAATTATAATAAATA
ATATGGATTAACTGAGTTTTTAAAGGTGAAATAAATAATGAATTCTTCTC
ATGGTCTTGTATGTTAATAAAAAATTGAAAAATTTTGAAGACCCATTTTG
TCCCAAGAATTTTCAATTTACAGGTATTGAATTTTTTCAAAGGTTACAAAGGA
AATTTTATTGATATAATAAATGCATGTTCTCATAATAACCATAAATCTAG
GGTTTTGTTGGGGTTTTTTTTGTTTGTAAATTTAGAACAATGCCATTCCA
TTTCCTGTATAATGAGTCACTTCTTTGTTGTAACTCTCCTTAGAATTTT
TTGGGAGAGGAAGTGAACAGAACATTGATTTCTATGTGAGAGAATTCTT
AGAATTTAAATAAACCTGTTGGTTAACTGAAACCACAAAATTAGCATTT
TACTAATCAGTAGGTTTAAATAGCTTGGAAGCAAAAGTCTGCCATCACCT
TGATCATCAACCCAGCTTGCTGCTTCTTCCAGTCTTGGGTTCAAGGTAT
TATGTATACATATAACAAAATTTCTATGATTTTCTCTGTCTCATCTTTC
ATTCTTCACTAATACGCAGTTGTAACTTTTCTATGTGATTGCAAGTATTG
GTACTTTCCTATGATATACTGTTAGCTTAAAAATATATTTGCAAATGTTG
ATACTATCTATCTCAGAGCTATAGGTGAAAAATTAAATACTTTTATAAAG
ACCAAATTGATCATTTTTTAAACGAAATTCTTATATACTGAAAATGTAGAT
ACATAAATCTCAGTATAGATTTTATGGTAAAATAATTTGAATCATTTTTGTC
AAATCTGTAAAAAGTTGTATACAGAATAATTTATAATATTTTTGTTTT
CATAGAAATAACATTTCTGGTGAATATTTCAAGGCCATTTTTATTTTTGT
GTAATTAGGTTAATAAAATTAATTTTATAAAGGAAATGTCAATGATAGAC
AATTAGATATAAATGACTACTTTTATAAAGATGATTAAATTTGGATATTT
GTAAGGATACAAATATATGAAAACAGTAGACTCATTTGGGGCCTATAAAT

ATGTCCTTTTTTAACAAATGCAGGTAGATTCTACAGTTTGTAAACTGAAGC
 AGCCTATATAAAATAATCTGTCATTAGTTTGCTGACTAAGGTATAAACAA
 ATTTTCATGTATAATCTAATTTTTCTTATGTATCTGAAACGCATTTTTCCA
 GCACATATAAATGTATGTATTTTTGGGTCTTGCAATTTAATGGAACCTCTA
 GGAGTCAAACGTGATATGTTTGACTTATGATTCTGTTTAATCATCTTCAT
 TCAGTCATGTTCATGGATATATCAACCCAGCAAAATTAAGTAATAGCTAGA
 TCCTTTTTAAAAATTTAATGAAGGTTAATAGTTTCTACATAATGCACAATG
 TTTTTCATGAAGACTCTGAAAGAGCAGGCTAAAGGATAAAGACATTTTAA
 AAAATTACAGATATTAATGTAATTTACCAGTGCGTTTGTAGTTTATCAAT
 TTTAACAAATCCAATGATCTAAGAGGAAATTTCTTTTTAATTTTTTTTGT
 AGTATTTTAAAAATTTGTAATATTTAAATATTGATGCTTCTCTATTCTCT
 GACAAAACCCCTACTATTACTTTTCAGGATCAAATGCTTTACTTTAAAGTGT
 AGTAAGATATTGGTATTTCTTATCTTATATAAGCACTAAGCAAAATAATT
 TGAATGGTAAATATTTATATTGAAGAGCAAAATTAAGCAAAATAATGAATA
 AAAATATTACTTTCAAGTGCACAACCTTTTATCATAATATACTCCTTTGT
 TGGAAAAATTAAGAATTTTTTTTTTCATGAATCAAATTTTATTATAAGACC
 TAACATTTTTATTTTCTTACATAGATCTTGACAACC

ภาคผนวกที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของยีนเป้าหมาย

>hEPO2153bp_NC_000007:100720800-100723700

ATGGGGGTGCACGGTGAGTACTCGCGGGCTGGGCGCTCCCGCCCCGGGTCCCTGTTT
 GAGCGGGGATTTAGCGCCCCGGCTATTGGCCAGGAGGTGGCTGGGTTCAGGACCGGCGA
 CTTGTCAAGGACCCCGGAAGGGGGAGGGGGGTGGGGCAGCCTCCACGTGCCAGCGGGGAC
 TTGGGGGAGTCTTTGGGGATGGCAAAAACCTGACCTGTGAAGGGGACACAGTTTGGGGGT
 TGAGGGGAAGAAGTTTGGGGGTCTGCTGTGCCAGTGGAGAGGAAGCTGATAAGCTGAT
 AACCTGGGCGCTGGAGCCACCCTTATCTGCCAGAGGGGAAGCCTCTGTGCACACCAGGAT
 TGAAGTTTGGCCGGAGAAGTGGATGCTGGTAGCTGGGGGTGGGGTGTGCACACGGCAGCA
 GGATTGAATGAAGGCCAGGGAGGCAGCACCTGAGTGCTTGCATGGTTGGGGACAGGAAGG
 ACGAGCTGGGGCAGAGACGTGGGGATGAAGGAAGCTGTCCTTCCACAGCCACCCTTCTCC
 CTCCCCGCTGACTCTCAGCCTGGCTATCTGTTCTAGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTT
 CTCTGTCCCTGCTGTGCTGCCCTCTGGGCCTCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTC
 ATCTGTGACAGCCGAGTCTTGAGAGGTACCTCTTGAGAGCCAAGGAGGCCGAGAATATC
 ACGGTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTCAGGGCTTCAGGGAAC
 CCTCCCAGATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTTGGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGC
 CCCCCACATAAGAATAAGTCTGGTGGCCCCAAACCATACTTGGAAACTAGGCAAGGAGC
 AAAGCCAGCAGATCCTACGGCCTGTGGGCCAGGGCCAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTC
 CCGGGGCTGTGTGCATTTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATC
 ACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGAGTTCTTTT
 TTTTTTTTTTTTCTTTCTTTTGGAGAATCTCATTTGCGAGCCTGATTTTGGATGAAAGG
 GAGAATGATCGAGGGAAAGGTAAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGGCGCAGAG
 GCTCACGTCTATAATCCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCTGGA
 GTTTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCATCTCTACAAACATTTAAAAAAA
 TTAGTCAGGTGAGGTGGTGCATGGTGGTAGTCCAGATATTTGGAAGGCTGAGGCGGGAG
 GATCGCTTGAGCCAGGAATTTGAGGCTGCAGTGAGCTGTGATCACACCACTGCACCTCA
 GCCTCAGTGACAGAGTGAGGCCCTGTCTCAAAAAAGAAAAAGAAAAAATAATGAG
 GGCTGTATGGAATACATTCAATTATTCATTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCATTCATTCAT
 TCATTCAATCAACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGCTCAGCTTGGTGCTTGGGGCT
 GCTGAGGGGCGAGGAGGAGAGGGTGACATGGGTGAGCTGACTCCCAGAGTCCACTCCCTG
 TAGGTGCGGCGAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCTGTC
 CTGCGGGGCGAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTGCAT
 GTGGATAAAGCCGTGAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCC
 CAGGTGAGTAGGAGCGGACACTTCTGCTTGCCTTTCTGTGAAGAAGGGGAGAAGGGTCTT
 GCTAAGGAGTACAGGAACGTCCGTATTCCTTCCCTTTCTGTGGCACTGCAGCGACCTCC
 TGTTTTCTCCTTGGCAGAAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCAC
 TCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCCGCAAACTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCTCC

GGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGA

>hGCSF1485bp_NT_010755_Hs17_10912:1896024-1897508

ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGGTGAGTGTCTTGGCCCAGGATGGGAGAGCC
GCCTGCCCTGGCATGGGAGGGAGGCTGGTGTGACAGAGGGGCTGGGGATCCCCGTTCTGGGAATGGGGAT
TAAAGGCACCCAGTGTCCCCGAGAGGGCCTCAGGTGGTAGGGAACAGCATGTCTCCTGAGCCCCGCTCTGT
CCCCAGCCCTGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACCTCTGGACAGTGCAGGAAGCCACCCCCCTGGGCCC
TGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCTGCTCAAGTGTCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGC
GCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGGTGAAGTGAAGTGGGTGAGAGGGCTGTGGAGGGAAGCCCGGTGGGGAGAG
CTAAGGGGGATGGAAGTGCAGGGCCAACATCCTCTGGAAGGGACGTGGGAGAATATTAGGAGCAGTGGAG
CTGGGGAAGGCTGGGAAGGGACTTGGGGAGGAGGACCTTGGTGGGGACAGTGTCTCGGGAGGGCTGGCTGG
GATGGGAGTGGAGGCATTACATTAGGAGAAAGGGCAAGGGCCCCCTGTGAGATCAGAGAGTGGGGGTGCA
GGGCAGAGAGGAAGTGAACAGCCTGGCAGGACATGGAGGGAGGGGAAAGACCAGAGAGTCTGGGGAGGACC
CGGGAAGGAGCGGCGACCCGGCCATGGCGAGTCTCACTCAGCATCCTTCCATCCCCAGTGTGCCACCTAC
AAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCCTGGGCTCCCCCTGAGCA
GCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGTGAAGTGTGAGGAAAGGATAAGGCTAATGAGGAGGGGGGAAGGAG
AGGAGGAACACCCATGGGCTCCCCATGTCTCCAGGTTCCAAGCTGGGGGCCTGACGTATCTCAGGCAGC
ACCCCTAAGTCTTCCGCTCTGTCTCACAGGCAGGCTGCTTGAGCCAAGTCCATAGCGGCCCTTTTCTCTCT
ACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCT
GGACGTGCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGGTGAGCCTTGTGGGCGAGGGTGGCCAAGGTCTGT
GCTGGCATTTCTGGGCACCACAGCCAGGCCTGTGTATGGGCCCCTGTCCATGCTGTACCCCCAGCATTTCC
TCATTTGTAATAACGCCCCTCAGAAGGGCCCAACCACTGATCACAGCTTTCCCCACAGATGGAAGAAC
TGGGAATGGCCCCCTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGGCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCG
GGCAGGAGGGGTCTGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTCTGGAGGTGTCTGACCGCTTCTACGCCAC
CTTGCCCAGCCCTGA

ภาคผนวกที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของ neo cassette

>LoxP site

ATAACTTCGT ATAGCATACA TTATACGAAG TTAT

>mPGK, Addgene13442:PGKneobpA, 2251-2767, 517bp

ATTCTACCGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGC
CCCGCTGGGCACCTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCAC
CGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCC
CCTAGTCAGGAAGTTCCCCCGCCCCGAGCTCGCGTCTGTGACGACGTGACAAATGGA
AGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGT
AGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCT
GGGAAGGGGTGGGTCCGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCGGGCGCCCCG
AAGGTCTCCGGAGGCCCCGCATTCTGCACGCTTCAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTT
CTCCTCTTCTCATCTCCGGGCCTTTTCGACCTGCAGC

>NeoR/KanR, Addgene13442:PGKneobpA, 2772-3572, 801bp

ATGGGATCGGCCATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAG
AGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTT
CGGCTGTGACGCGAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTTG
AATGAAGTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGC
GCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTG
CCGGGGCAGGATCTCCTGTCTATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCT
GATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGACCCACCAAGCG
AAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGAT
CTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGC
ATGCCCCAGGCGATGATCTCGTCTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATG
GTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGC
TATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCT
GACCGCTTCTCTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTAT
CGCCTTCTTGACGAGTTCTTC

>bGHPA, Addgene13442:PGKneobpA, 3610-3837, 228bp
CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATT
GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGG
ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG

ภาคผนวกที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของ 3' homology arm (สุกร)

>EU213063_6620
GGCCGCCATCTACCATGTAGAACCATTTTATCTGAAGACTTTGACTGTTCTTTTAGAACA
GGGAAATCGCAAATCGAAGTCAATCTTCCTTCTTGAATTCTTTACTCTATATTAGATAGC
ATATAATCCTTTTCTTTGGCAAAGTTGTCTAACAGTTTAGTGTCTAAATTTTCAGTTGT
ATCATGCCAGTAGGAAGACCACTGAATCAGAGGGAATTAAAAGTCTTTACTAAATTTCAA
TATGGAAATTTTGTTTAAAAAGCCTTTGAATTGCTTCTCCTGTAAAGTGCCATCATTTCAA
ATAATTGTGTGCAGTGACTGAGATTTTTCTTCCTTCTTTTCAATAAAATTACATTTTAAGG
CACAACTCCTATTTTTTGTCAATTATTCATTTCAGCAGAATTTGCACAATCCTGTTAACAG
TCTTTATGCCTGTAACATTTTATTTTCACTAAGTTTTTATTACACTTTCAACCACAATTC
AATGAACAAAATGGTAAATCTTCATGCCTAGCTGATGCTGACAGGTTATAAGCTGGGTCT
AGGATCTTTTCAATTTGAAGTCACCTGTCTATAGGATATTCTCCATGAGAACATAGGTGTGG
CTGCAGAGAAGAACAGTGGTATGACAGTTGCGGGTGCCTGCGGAATTTGAAAAACATGGC
TAAGCTGTTTATTTATGTCAACAGAACCTGTTTGAAGCCAACTCATTTGATTATTTGATT
ATTATACACTTACTTTTATAATTAGGTAGATTAGATAATAAACATTTAATAGGTTAGACC
ATGGCATAACAGTAACACAATACTCAGTGTCTCCTCCGAACCTCAGTGAAGAGTTATTTCTC
AAAATGACAATAGTCGCTTGCATTAATACCCTCAAACCTGCTGGAATTTACTTTCCAG
AGTTTATTTCCAGGGTCCCCAACAAACCTATCTGCTGTGACTCTTTAAGAACTTCTTTT
CACCAGGTCATAAAATACAGGTGGCAAGGTCTCTTGTACCACAACCTAAACGACCTATTT
AGTTAGCAGTTCTGTCTCTTATCGATTATATATATAATTGATATGCACATATATGCATAA
CACCTAAACACGTATTTTTTGCCTATAACGCTTTTTTACCAGTTGTCACTTGGTTTGGTG
ACACTAGTCTCCTTCCATTTTCCCTGAGGTTGGAAATGCAATTTCAATTACTTTGCACCT
CTCACCAGAGTTCTCAGTCAATTGTTTAGCACAAAAGAATTTTCAAAAAGTTTGCCCTTC
AAGGAAAAGTTTAAAGGAGAATAATTTATCCTTTGTAGACACAGGGAAGTGCAGGGCCAT
TAGAACTAAGCATATCTATTTATGGATGTTTAAATATTTCTCTTTCAATTATGATTGTCA
AACTGCCTTCTAGAGTCTCACAATAACAGAAGCAGAAAAAATACAGTTGTGAAAAAAC
AGTGCTGACAGTGAAGTGAAGAATATGTGCATTCTCATTGGCTGCCCTTCCAATGCAT
TGTTGCTGTGCAGGAATACACAGGTCAAATGTAACCAAATTTGGGGACTTCTAGGTGAAA
CTAGAAATGTGGATTGGTGTGTAAGATCTCCTATTTTTTAAATATTGGTCTAGTGTTTTTT
AAATATAAAATACACAGTCTCCTTCTCTTTATTGGCCAGACCCAACCCCTCTAACACTAG
TCTATGTACTATAGTGTACTTTAAGTCATTAAGTAAAGGACTTTCTACTTCCAGTCCAAT
CAAGGTTGAATCCCAGTTACAGTGAAGTGAAAGTGAGAAGTAGGACATTAGGGTAATAAT
TAGCTACAGTAAACAAAGAAATCATGATTCCATCATGACAAATACACAGTAAGTGTTAGG
GGCTACATGGGGCTCATTGTTAAATGGCTCATCATGCTGACCCATGAGACTGACCATCT
TGTTCAAGCGACATCCTGTTTTTGGCACTGGTGCCTATTTTCCCAAGACTACAAGACCAG
GGGGGACCACACACCTCCAGCCTTCTCAAGATTATGAGTGCACCCTACCGTGAGATACCT
CTGACTTTCTCATGACGATGTGACCACCAGAGTCCACCTGCAGGTGAAAGATAAACTATA
AACTAACCTTCCCCCGCTTCAGGAATCAATTTCCCCTCTGCAGAGTATAAGAAGGCCCTG
CTAGAAGGGCGGGGGGGCTGACTCTTCTCAAAGGTCAGTCAGCCTCTCCTTTTTCTTCT
AATAAATTTTCTTCTCTTTGCCTGAACACCCAATTCCTTCTCTTTTTCTCCATGCTCGCC
TTACAGTAAGACCTTCAGGAGCACTTGGGAGCAGGCGGTTCTGTAAATTTTCCATACCTT
CCCATATATTCCACTTTCAATAGTTGGGTTCTTATTGTCCTAACTTTCAAGAAGCAATC
CATTTTATAGGATTCATGTCATATTAATCACTATAGATTAGATTTTGCATGCCCTCCCGAA
TTCATATGTTGAAGCCCTAACTCCCCCATGTGATGCATTTGGAGGTGGCATCTTTGGAGG
CAAATAGGTCATGTGAGTGGGATATCTATGAGTGGGATTAGTGCCCTCTAAGAAAAGCT
AGGAGAGAGCTTGTCTATCTTTCTGCCTTGTGAGGATACAGCAGAAAGGCAGGCACCTGC
AGGCCAAGAGGGAGCCTTACCGGACACAGGATCTGCTGGCACCTGGATCTTGGTAAATG
TTATTTGTAAGTGTATGTCTGTGAGTTGCTATGGGCAGGATGTACTGGCTGGTAAACATT
GTTTAGTAATAAGTGGATGTGGTTTTACACCAGATTTAGGAGAATCTAGGAGTGGTGAGGT

AAAATGGGGTTTGGCATTCAATTGTTGACTCATTATATAGCTAAAAATATGCCTGCTTGAT
GAGCTTATTGTAAGAGATCTCACAAGTCATTTTGGAGCTTCTAGTATTGAGGTGCTTTGC
ACACCCTCTGTTAGTGGCCTAAGAACTGAAGATAACACATGTCTTGTGCTACCAAGCAGT
AGGAGGATAAATGAAGTTTGTCTTGGAGATCTCAGTACCTCTTTCATCTTTCAATGCATA
CCCTTCTCCTGTTGTTGTACTCTGTCTCTGCCTGTAATAAAGCTGTTCTGTTAGTGTAA
ACTGTATGGGTCTCCTTTAACTATCAAAAATGTTAGGTCTTGTGTGATTACCACCTCGCT
GTAATATACAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGAGAATTCATCTGCAAGTTCTCTCTC
ATCTCCTGCTTCTCATTCTGAAATTTTACCTCAGTGGGGGCTAAACTATGCATATAAC
AGTAGCATTAAACCAACTATTACAGTTTCTGAGGAAACCCGGTCCTGTGCTATAGTACACA
ATCCCATTCAAGTCCAACAGCAAAGAGGTGAGTCTGCATTGATGAGGTCCCAACCACAGG
GAAAAGGAAGAAGACAGGCAATATACTGAATGCACACATCGCAATGAATCACCACAGATA
CTTACTTCCAGGCTAAGGGAAAGAATATCGCTAGTTCCCCAGCACTTTCTCACATTTTCT
GTCAAGTTGTACCTTCCCTCAGATAACCAATAGTCTAGCTTATCACACAAGAATTTAATC
GATCATTAGATTCTAATAAATTCCACTTATTGGATTACATATTCCATTATATTTTGGCCT
GATTACTGTCATTCAATGTTATTTATATAAAATTACCCCTTGTTTTTTTTTGTGGCAGTAA
CTCATTCAATTTCACTGCAGTATGATATCCCATTCCACTTTAGACCATGACTTATTTATA
CAAAATACATTTATACAAAATACAAATTTATACAAAATAACGTAAATGTTAATTCATT
TATGTTGATTTTAGTTTGGGGTATTAGCATTGTTAGGAGTATTGGGTAAATGTTTTTGA
ATACATATGAAAGCATATTATGGTTTCTTTTGGTTGTATACCTAAGAGAAGAAATGTTA
GTTATAATATAAGCAGATGTTTATTTTTGACAAAGACTCATAATACTTTCCGAGTTGCTT
GAACCATTTTATATTTATTTTAACATTACCTAGCATTATTTCAGTTTGCTTATTTTTGTA
AATACTTGGTTTTTACCAATTCTTCTCATTTTCAGCTATTCTGGAGGTTGTGTCATGATATC
TGGTATTTTTTAACTTGCATTTTCCAGAGAAATAATGGTATTGAACATCTTTTCATATATT
TATTGACAATTAATAAACCTCTTTGGTGAAGTGCCCATTCAAAGATATTGCTTGTGCAC
TATTATATTAGTTGCCTTTGTTATTGAAATATGCCCAATTAAATTTTGGACAATTTGGGG
ACTGGATTTCAGACAAAAGTTCTGCTGGCCATGTCAGGTTTGAGATATTAATTAGATACT
CCGATGTGGAGAAGAATGCAGTTGAGCACTTGAATTTGGAGTTCAGGAAAAAATAAGTTT
GAGGACATACATGTGGAAGCTTCAAGCCCACGAATGGACTTAAAGTCATGGAATCAAACA
ACATCAATCATAGTAAGGCTAATCCCTAGGGTATTCCACACATTGCATGTTTGGAAAAGG
AGAAAATGCCAGAAGAGACGATGCAAAGAAATAACTGGTGAGTTAAGAGGGAAATCAAGG
GCTTATCAGGCTTAGGATTTTCAATAAAATTTGCGATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAGGAATGACCAACTGGACCAAATAGCACTGATAGTTTGGGTAAAATAAACATAGATTG
GTAAAATGAATGTTGTTGGTAATCTTGAAAAAGTGGTTACCATAGGGGTAAAGCTCAAT
GGGAACAGGTTGATGAGAGAATACCATGTGAAACAATAGACACGGTAGTTTGGACACTTC
CTTTCTGATGGTTACCATAGAGCAGTCTAAAGTACTGCCAAGGATGGAATTTTTCTTTA
AAGATGGGAGACATTATAGCCTAAGTATGGCTTGCACTTGATCTGAGGTAAAGAAAACAC
TGAGGATGCAGGAAAGATGAAATTACTGCTAGAAACAAGTCCTTGTGTAAACACAAGGGG
AGGGAATCAAGTTTACAAATGTAGGAGTTGTGTAACCAAGCAGGACCCTGTGAAGCCTTC
CCACAGTGGATCCACACTCTTGTCTCTGCCTGCATTTTTTGTCTATAGAAAACTTTAGT
CAAAGAATCAGTTTGATCAGAGAAGTGAGAAAATACAGAGAAAAAGGAATACAGTCAAGC
AAGACAGAGTAATAATAGTTTAGCCACTCAGCAATGTCAAGGACTTATGGTTCTTCTCA
TGGACTATAGATAATATGCTGAGCCATGTCTTGAACGGTTTTTGCAGGTGCTCAAACCC
CTACCAGGCGGAAGAAGTCAACTGCATGCTGCCCACAAACATGTAGACCCCAGACCAGTT
GGAAACAGAAGGTTGATGATGCTGACTCCCAATTACCTCATCACCAAACAGTTAGGAAAA
TATCCAAGGGCTGATCATGCCCGGCTCCTTGAAGAGTAAGAGTAAGAGTCCTCACCCTC
CTCCAAGAGGCACACAGTCCCCGAAGCACTAGCCTGCTGTGTACCCTCTGCCTGGCAATT
AAAGCTACTTTTGGCCGTTTCCACATTTCTATTTGGCGTCAGTGTATAGAGGCAGCCGAT
ACTTCGGTGATAGTTGGTAGACAGATAATTCATTGCAATGAAAAAATTACTCCACAGACA
GAGACAAGGGATATCAGAGCTTACATAAGTCTACTCTCTTGGGCATTAGTGGCTAAAAC
AACATCCTTCAGCTCATTCTCATTGTGACACTGGCACTGGCTGCTCTAGTGTAAGTGAGG
AATGTGGAGCCACACGGACACCCATCCTGCCTGTGTGGGGTGCTATTACATTAAAACT
TCAATAAAAACCTTTCAACTGACTGTGTTATAGATGCAAAAACCTGAATCTTTGAAAGCCT
AACTTATACAGCACCATTAGCCACCATTGTTACAGAGCCGTGATTTCAGATTTTACATTGG
AAGCCTTCTTATCTAGGAGGATCATAAAATTTAACATCCAATGCAGATACTTTTGAGAGT
GAAAGGCACAAGTATAATAGTTTCAGCTGAGATAAGAGGTATAAACCAAGACTTTCTAGAG
TATATTACAGCATTAGATCACCTGCCTTTTCTCCATTTTTTGATATAATTTAGTACTCAA
GTCAAAGCATTCTACTCAATTTCAATTTTTTCCGTGGCTATTTTTAACATTAATAAATACT

TTAAGTTAACTAATAAAGAGGCCAGTTAGGTTTGGAAAATTATAATAAAAAACAGGAAAAC
TAAATATGCCTAAGGATTAATTTATTGAAATGACTGGTTAGGAAATTATAATTCCATAA
ATTATTTTTATACATATTTTTGAAATATTCATGGTATTTCCAACCTAAAATTGAAATTCT
GTGCTATTAGTTGAATTAATAATTTTGGAAATAGAGAATTTCTGAGTCAAATTCAAATTAA
GATGAAGGCCATATAAAGCATAAAATAAATAAGAGAATAAAGTTTCATTTTTTTCATGTA
GACTCATTTAAAAATTATTTGGTAGCATGATGCAAAGATTGAAAAGTTTGACATTTCCAG
TCGCAGTCAATTCCGCGGGG

ภาคผนวกที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของ 3' arm (โค)

>bosTau7_chr6:88257414-88263076
GTTGGAAACTGCTTGTCTAATCATTGATCCTCTTTTCATATGAGAGCTCA
GTACAAAAGTACAACGTGTAGACTATAAAGTTGTTTTGCTGGTCTCTAG
TCTAGCTATATTTAAACACATTACACTTAGATAATATCAATAATTAAATT
GGCTTCAACATTTTTTGTATTATAGTAATATCAAATTTAAGTAGCAATAA
AACTAGCTAATTTTAATTAATATAATTTATTATATTGAAATTTTTATACA
AGTATAGGAGTGTGGGTGTTACTAATTCTGGTGACCCCAACAGTGGAATC
CTATTTCTTTATGATCACTGAAATAGAAATACTTAATACGTCACATAGTTA
AATCAAGTGTGTCTATTAAGAAGAAAACAGATTTAAATGTCCATAGAT
GTGTTTTGAGTACTTCAATTTACTATATAGGAGCTTGTAGTTGTGTGTGT
ATGTGTATGTTCCCTTTCTAGTGGTGGAACTTCCCTTATAACAGATCAA
AAGATGGAAAATAAAAGTCTGACGTACTTGGAAGTTTTTACTTTGAATTA
TTTTGCCATATTTTCTGTACTGCAAAGAAAGTGCAACCTAGTCATAAA
TTGCCTGTAAAACCTTAAAAATCAGGAGCAGTGGGTATGTGTTAGTAACAG
GAGACACATATAACTTTGTGAACCTTCATCTTAAGATGAAGAGAAAATGAC
TATTAAAGTGTATCTTATCATAACAGTACCTTCTCCCTTCAAACATGCA
GCATAACTAACCACATATTTCTTTTTTGGTTTACAGATGGTTCTGAAAAT
TCCATGCTCTACATGTCTTTTCATCTATCATGTCAAACCATTCTATCCAA
AGGCTTCAACTGCTGTTTTAGAAATAGGGCAATCTCAAATTGAAGGCACTC
TTTCTTCTTGAGTTCTCTACTGTATTTTAGATAGTGTAAACATCCTTAAGT
GAAATTGTCCTAACAGCTTGTTACCTAAATTCAGTAGTATCATGCTGGT
ATAAAGGCCACTGAGTCAAAGGGAATTAAAGTCTTCATTAAATTTCTGTA
TGGAAAATGTTTTAAAGCCTTTGAATCACTTCTCCTGTAAGTGCCATCA
TATCAAATAATTGTGTGCATTAACCTGAGATTTTGTCTTTCTTCTTTTCAA
TAAATTACATTTTAAAGGCACTATTCTATTTTTTGTGATTATTCCATTGG
AAGGAATTTACACAACCTTTGTGAGTTTGTGTGTATATAACATTTTGT
CACTAAATTTTTATGACATTTTCAACCACATTTTAATGAAAAAATTCAAA
TGTTCACTTCTAGCTGATCCTGGTAGATTATAAACTGAGTCTAAGATCTT
TCATTTGAAGTCAACTGTTTATAGAATATTTTCCATGTGAACATGGACGT
GGCTGCAGAGAGAACAGCAGTGTAGTAGTTGTGGGTGCACTGGCAATTTG
AACAACCTGGTTATACTGTTTAATTTGGCAGGACTTGTTGGAGCTCAATC
CATTTGATTATACTTGAGTTTATAACTAGGTAGATTACAAAGTAAAGATT
GTAAAGGTAAACACAGGACACACAGTAACAGAGCATTTCATAGTGAGCTGT
TCAGTGTCTCCAAAACCTCTAATGAGTAATTACTTCTCAAATGACAACA
GCTGCTTACTCTGATATCTTTAAAGCCCCAGGTGAAATTTATTTTCCCGG
CTTTATTCTAGGATTCCAACCAACCAATCTGTCATGACTCTTTAAGAA
CCTTGTATGACCCAGGTACAAAACACAGGTAATAAGGTCTCTTGTACAA
CAGTTTAGACCATCTATATCAGTTGTTCTGTTTACTGATTATGTAGATAT
GTATACATAACATTGAAACATGTAATTTTTGCCTTGAAAATTTTTTTTA
AAAATCCACTTAGTATTAGGTCTTCTGCCTCCTCTATGTTAAGTACAAGG
TACAACAACCTGTTATTCAATCTAGAGAAGGTTTGTCAACATACTCAGAA
TACTGGACCTGGCAGAAGTTAACGGAGGGTGCAGATTTCATACATCTTCAT
AAAATGTATTTCCAGCTTCTGTCTATGTCAGTTCCCAAAGAATCAGG
AAAACACAATTTTCATGTGTTGTGAATCCTATAGATAATGCCATCCATTTA
ATGAATGTCTTGTAAACAGTAGCATGGTAAAAGTCACGTTTTCTGTAGAT
TAAACTGTGGTACAAACAGGCCAATATCACTGATGAACATAGATGCAAAA

ATCCTTAACAAAATTCTAGCAATCAGAATCCAACAACACATTAAAAAGAT
CATACACCATGACCAAGTGGGCTTTATCCCAGGGATGCAAGGATTCTTCA
ATATCTGCAAATCAATCAATGTAATACACCACATTAACAAATTGAAAAAT
AAAAACCATATGATTATCTCAATAGATGCAGAGAAAGCCTTTGACAAAAT
TCAACACCCATTTATGATAAAAACTCTCCAGAAAGCAGGAATAGAAGGAA
TATACCTCAACATAATAAAAGCGATATATGACAAACCCACAGCAAACATT
ATCCTCAATGGTGAAAAATTGAAAGCATTTCTCTAAAGTCAGGAACAAG
ACAAGGGTGGCCACTTTTACCATTACTATTCAACATAGTTTTGGAAGTTT
TGGCCACAGCAATCAGAGCAGAAAAAGAAATAAAAGGAATCCAAATTGGA
AAAGAAGAAGTAAACTCTCACTGTTTGCAGATGACATGATCCTCTACAT
AGAAAACCTAAAGACTCCACCAGAAAATTACTAGAATTAATCAATGATT
ATAGTAAAGTTGCAGGATATAAAATCAACACACAGAAATCCCTTGCAATTC
CTATACACTAATAATGAGAAAAGTAAAGAGAAATTAAGGAAACAATTCC
ATTACCATTTGCAACAGAAAGAATAAAATACTTAGGAATATATCTACCTA
AAGAACTAAAGACCTATATATAGAAAAGTATAAAACACTGGTGAAAGAA
ATCAAAGAGACACTAATAGATGGAGAAATATACCATGTTTCATGGATTGG
AAGAATCAATATAGTGAAGTAAATGAGTATACTACCCAAAGCAATTTATAGAT
TCAATGCAATCCCTATCAAGCTACCAACAGTATTCTTCACAGAGCTAGAA
CAAATAATTTTACAAATTTGTATGGAATACAAAAAACCTCGAATAGCCAA
AGCGATCTTGAGAAAGAAGAATGGAAGTGGAGGAATCAACCTACCTGACT
TCAGGCTCTACTACAAAGCCACAGTCATCAAGACAGTATGGTACTGGCAC
AAAGACAGAAATATAGATCAATGGAACAAAATAGAAAGCCCAGAGATAAA
CCCATGCACATATGGACACCTTATCTTTGACAAAGGAGGCAAGAATATAC
AATGGATTAAAGACAATCTCTTTAACAAGTGGTGCTGGGAAATCTGGTCA
ACCACTTGTAAGAAATGAACTAGAGCACTTTCTAACACCATACACAAA
AATAAACTCAAAATGGATTAAAGATCTAAACGTAAGACCAGAAAATATAA
AACTCCTAGGGGAGAACATAGGCAAAACACTCTCTGACATACATCACAGC
AGGATCCTCTATGACCCACCTCCCAGAATATTGGAAATAAAAGCAAAAAT
AAACAAATGGGACCTAATTAACCTTAAAGCTTCTGCACATCAAAGAAAA
CTATTAGCAAGGTGAAAAGACAGCCTTCAGAATGGGAGAAAATAATAGCA
AATGAAGCAACTGACAAACAATAATCTCAAAAATATACAAGCAACTCCT
ACAGCTCAACTCCAGAAAAATAAATGACCCAATCAAAAAATGGGCCAAA
GAACTAAATAGACATTTCTCCAAAGAAGACATACAGATGGCTAACAAACA
CATGAAAAGATGCTCAACATCACTCATTATCAGAGAAATGCAAATCAAAA
CCACTATGAGGTACCATTTACACCAGTCAGAATGGCTGCGATCCAAAAG
TCTACAAATAATAAATGCTGGAGAGGGTGTGGAGAAAAGGGAACCTCTT
ACACTGTTGGTGGGAATGCAAACTAGTACAGCCACTATGGAGAACAGTGT
GGAGATTCTTAAAAAACTGGAATAGAACTGCCTTATGATCCAGCAATC
CCACTGCTGGGCATACACACTGAGGAAACCAGAAGGGAAGAGACACGTG
TACCCCAATGTTTCATCGCAGCACTGTTTATAATAGCCAGGACATGGAAAG
CAACCTAGATGTCCATCAGCAGATGAATGGATAAGAAAGCAGTGGTACAT
ATACACAATGGAGTATTACTCAGCCATTAAAAAGAAAACATTTGAATCAG
TTCTAATGAGGTGGATGAACTGGAGCCTATTATACAGAGTGAAGTAAGT
CAGAAAGAAAAACACCAATACAGTATACTAACGCATATATATGGAATTTA
GAAAGATGGTAACAATAACCTGTGTACAAGACAGCAAAAGAGACACTGA
TGTATAGATCAGTTTTATGGACTCTATGGGAGAGCGAGATGGTGGGAAGA
TTTGGGAGAATGGCATTGAAACATGTAAATATCATGTATGAAACAAGAT
GCCAGTCCAGGTTGATGCACGATACTGAATGCTTAGGGCTGGTGCCTG
GGACGACCCAGAGGGATAGTATGGGGAGGGAGGAGGGAGGGGTTTCAGG
ATGGGGAACACATGTATACCTGTGGTGGATTCAATTTTGATATTTGGCAAA
ACTAATACAATTATGTAAAGTTTAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
CTTGTCCTTTAAAGCTGTCCCATGAGAGAGAAAGTTCTGTTTTTAAGACG
AGAACAACTGATTCCTAGTATTTTTTTCTTTAGCTATGTCAGAATGGAAA
AAAAAAGAAAGAAATTTCTAGCTGTGAAGTAAATACCAGGAATTTGCCTGA
CATGTATCATATTAATAATGCCACCTGTAATAGGTGCCATAACCTCATTA
AGTTTGAAATAATCTATTGTTATCCTCCAAGAAGCTATTTTAAAGGCCAA
ATGAGGAAGTGAATAATGATGTAATTCATCTATCTTTAGTCTTTGCATC

TTTTAGTGTTCAACAGCTGTAATCCCCCAGAAATGCAAATTTTTATGAT
 TTTTATGATAGAAAGAGACAAAAGAATTGCTTCTATTTAGCATTTTTTGA
 CCTCCTTATTCCATAAGTCAGGGGGATAATATGGGGATTAGAGGAGTGTC
 TAAATGTATCCAGTCAAACATTACACTCTGAACTGATGACTTATCATAAA
 TGATTTAGAATATCACTAGGCTTGAAAGGAGGCAAACCTCGGGTAGTAACA
 CAAATTATTACTCAAATCAAAGAAATCTCAACATGAACAAAAGATTATCA
 GGACATTTCTCCATCCAATAATGAATGATAAGACAAAGCATGGATCTCA
 GAGTCTGTAATAAGATCACATAGTTCCTTTTATCCAGGTAAATGCTTCAA
 ATTCATAATCTGAAGGCAAGTACCAGAGTTGGAAATATGATGTTATAGTA
 TGATCTTTCTTATAGAATTTTGATGTTCTTTTCATTCCAGGAATATAGCT
 CCATAAATTGATTCTTATTTGTAAATAGCAGGTGGGGTGAATCATTACTC
 GCTCTGATAGCAG

ภาคผนวกที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของ **negative selection marker**

>HSV-tk

ATGGCTTCGTACCCCGGCCATCAGCACGCGTCTGCGTTTCGACCAGGCTGCGCGTTCTCGC
 GGCCATAGCAACCGACGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAAGTC
 CGCCCGGAGCAGAAAATGCCACGCTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCCCCACGGGATG
 GGGAAAACCAACCAACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTTCGCGCGACGATATCGTCTAC
 GTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGGCTTCCGAGACAATCGCGAACATC
 TACACCACACAACACCGCCTTGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGGACGCGCGGTGGTA
 ATGACAAGCGCCCAGATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGCCGTTCTGGCT
 CCTCATATCGGGGGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCCGCCCCGGCCCTCACCCTCATC
 TTCGACCGCCATCCCATCGCCGCCCTCCTGTGCTACCCGGCCGCGCGATACCTTATGGGC
 AGCATGACCCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTTCGTGGCCCTCATCCCGCCGACCTTGCCCCGC
 ACAAACATCGTGTTGGGGGCCCTTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCTGGCCAAACGC
 CAGCGCCCCGGCGAGCGGCTTGACCTGGCTATGCTGGCCGCGATTTCGCCGCGTTTACGGG
 CTGCTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGGGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGATTGGGGA
 CAGCTTTCGGGGACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAGCCCCAGAGCAACGCGGGCCCA
 CGACCCCATATCGGGGACACGTTATTTACCCTGTTTCGGGCCCCGAGTTGCTGGCCCCC
 AACGGCGACCTGTACAACGTGTTTGCCTGGGCCTTGACGTCTTGCCAAACGCCTCCGT
 CCCATGCACGTCTTTATCCTGGATTACGACCAATCGCCCGCCGGCTGCCGGGACGCCCTG
 CTGCAACTTACCTCCGGGATGATCCAGACCCACGTACCAACCCAGGCTCCATACCGACG
 ATCTGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCCCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGA