ผลการทดลอง

1. สืบหายีน carbonic anhydrase สายยาวของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA 2) และเพิ่มจำนวนยีนโดยใช้วิธี PCR (polymerase chain reaction) **วิธีที่ 1**

1.1 จากการสืบค้นหายีนคาร์โบนิค แอนไฮเดรส (CA) สายยาวของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในฐานข้อมูลมาเลเรีย โดยใช้โปรแกรม BLAST พบ open reading frame อยู่บนโครโมโซมที่ 11 พบจำนวนกรดอะมิโน 418 ตัว และได้ออกแบบ primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

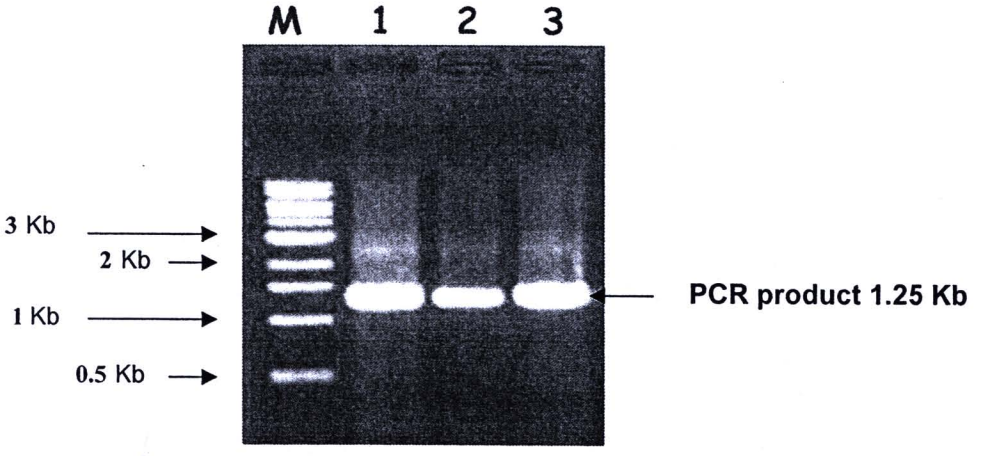
forward primer ได้แก่

5' CGC**GGATCC**ATGCTTGAAATGATAGATAAATAT **3'** จำนวน 33 mers

ส่วน reverse primer ได้แก่

5' CCC**AAGCTT**TTATTTATTACCTGAGCCGACGTG **3'** จำนวน 33 mers

พร้อมกับได้ใส่ตำแหน่งที่สามารถตัดได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* (แสดงด้วยตัวอักษรตัวหนา) และนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน PfCA 2 โดยอาศัย genomic DNA (gDNA) เพื่อให้ได้ยีน PfCA 2 ที่มีความยาวมากที่สุดโดยใช้วิธี PCR ผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนโดย PCR ได้แสดงใน **รูปที่ 1**



รูปที่ 1 ผลการเพิ่มจำนวนยีน PfCA 2 ที่ได้จากการทำ PCR และนำมาแยกโดย 1% agarose electrophoresis

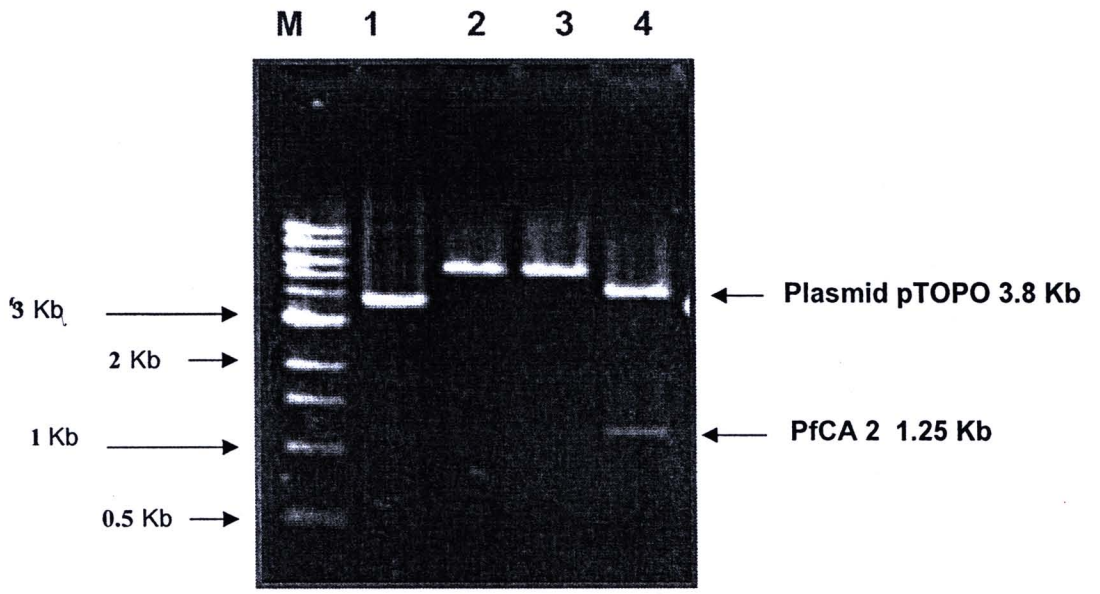
Lane M standard DNA ladder ขนาด 1Kb

Lane 1-3 ยีน PfCA 2 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนทำ PCR

พบว่าตำแหน่งของยีน PfCA 2 จะมีขนาด 1.25 Kb ดังแสดงใน Lane ที่ 1-3 เมื่อเทียบกับค่าดีเอ็นเอมาตรฐาน ใน Lane M

1.2 **Cloning** และ **Plasmid Extraction**

ต่อมาได้นำชิ้น DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยอาศัย PCR ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTOPO และนำพลาสมิดที่ได้หรือพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Top10 strain) และคัดเลือก cloned cells มาทดสอบดูพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* แล้วนำมาแยกด้วย electrophoresis ซึ่งผลที่ได้แสดงใน**รูปที่ 2**



รูปที่ 2 แสดงแถบของ DNA จากพลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III*

Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1 พลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 ที่ยังไม่ได้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III*

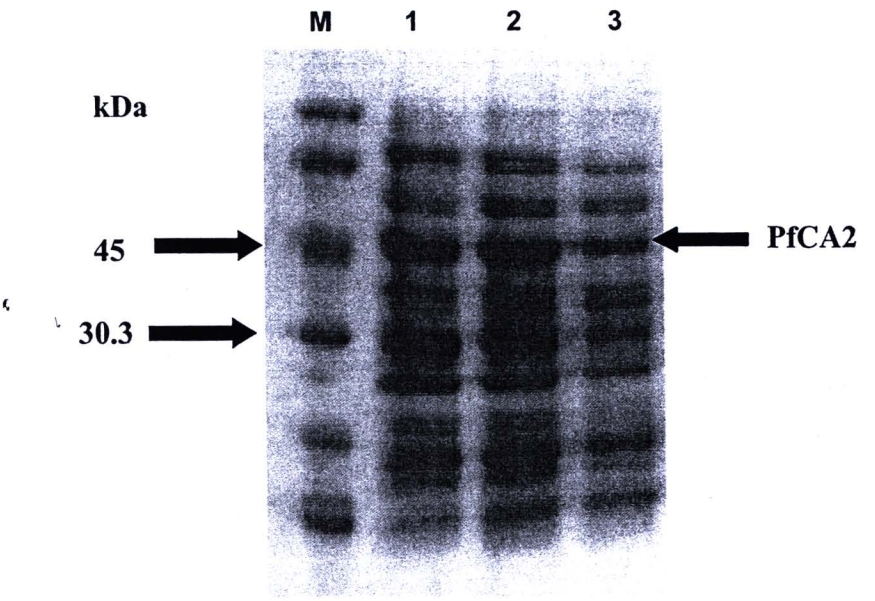
Lane 2 พลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I*

Lane 3 พลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind III*

Lane 4 พลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III*

1.3 Protein Expression และ Identification

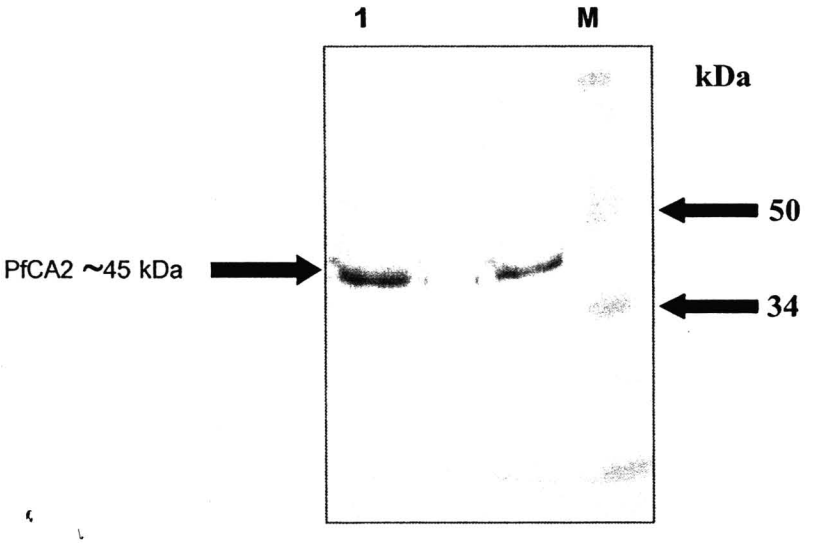
หลังจากนั้นนำเอาพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 มาทำการเหนี่ยวนำใน *E. Coli* โดยอาศัย IPTG ให้ผลิตโปรตีนออกมาและนำเอาโปรตีนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni^{2+}-NTA-agarose affinity gel column และนำโปรตีนไปแยกและทดสอบโดยอาศัย SDS-PAGE แสดงใน**รูปที่ 3**



รูปที่ 3 แสดงแถบโปรตีนที่สกัดจาก *E. Coli* หลังจากผ่านคอลัมน์ Ni^{2+}-coumn imidazole นำมาแยกโดยอาศัย SDS-PAGE

Lane M standard protein molecular size marker
Lane 1 แถบโปรตีนที่อยู่ในสารละลายส่วนใส (supernatant)
Lane 2 แถบโปรตีนที่อยู่ในสารละลายส่วนใสที่ผ่าน Ni^{2+}-NTA-agarose affinity gel column
Lane 3 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 1

ถึงแม้ว่าโปรตีนที่สกัดได้จะมีความบริสุทธิ์น้อยแต่เมื่อนำมาทำการทดสอบหาตำแหน่งโปรตีนที่ต้องการโดยการทำ Western blot จะพบโปรตีนที่ต้องการในตำแหน่งที่คาดประมาณไว้ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 ±1 kDa ดังแสดงใน**รูปที่ 4**



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบโปรตีนโดย Western Blot โดยอาศัย anti-His

Lane M standard protein molecular size marker

Lane 1 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 1

1.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน PfCA 2

นำเอาพลาสมิดที่มีชิ้นยีน PfCA 2 ไปหาลำดับเบสโดยการทำ DNA sequencing พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1257 bp ดัง**รูปที่** 5 และมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GeneBank 100% และพบว่ามีลำดับกรดอะมิโน 418 ตัว ดัง**รูปที่ 6**

ATGCTTGAAATGATAGATAAATATAATACCCATTTTGTACAAACAACCAAACCTTATTACGAATTTAATG
TAACTAATCTAACTAATTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGAAAATCACCTGATCGGTTCAGG
TGAAAATATGCAAAAAAAGGATGAAAAAAATATAAAGGATTTTCATATAAATGATTATGAAATAGATGGG
AAAACAATTCATAATAAAGAGAACAAGGATTCCTTTAAAATGAATAAAAATAAATTAAACGATAACGAAG
AATTATTTTATATGGACAATATATTATCTTATAAACCAAATAAAAAGAAGTTGTTTACTTATTCCTTTTC
CGAAAATGAAGGAAATTCTGAAAAAGAAGAAACCCTTTATAATTTTAAAAATATGAAAAATATAAATAGC
GTACAAAATAATATTAACAAGACCTTTTTATATAACAAATTGAAAAATGTAGATTATTATGAGCATGGTT
ATAATTGGGATATAGGTCAATGTAAAACAGGGAAATATCAATCTCCTGTTGATTTACCTATGAAAGATTT
AAAGGAGAGAGAATTAAAAAATATAAGTGATGTGTATTTAAATTTATTTGACGATGACAATTATGCATGG
AACAATTATAACAAACCATGGATGAAAGGAGATTTTTTTTATTATTATGAATATTTTATAAAAAAAATTG
TTATTAATAGACAAAATAATATATTTCAAATAAAAGCTGCAAGAGATGGAATAATACCATTTGGTGTGTT
ATTTACTACTGAACAACCTGCTATGTTTTATGCAGATCAAATCCATTTTCATGCTCCTAGCGAACATACA
TTTCAAGGTTCAGGTAATAGAAGAGAAATTGAAATGCAAATATTTCATAGTACAAATTATTTTTATGATA
TACAAGATGATAAATCCAAATATAAAAAAAAATACGGGTTACATATATATAATAATTTAAAAAAAAATTC
AAAAGAAACTTCAAAAAAAGATTCAAGTAGATATCATTCTTATCTTATGTCCTTTCTAATGAATAGCTTA
TCAAATGAACAATTACAAAACAAATATAATAAAAAAAAAAGAATAAAAAAGATGAAAAACCAATATGAAG
TAATATCTATTACATTTACTAGTGCAGAAATTAATGCTTCAACTATTAATGCTTTTAAGAAATTACCATC
AGAAAAATTTCTAAGAACTATAATAAATGTATCAAGTGCAGTTCACGTCGGCTCAGGTAATAAATAA

รูปที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน PfCA 2

MLEMIDKYNTHFVQTTKPYYEFNVTNLTNSKKKKKKKKRENHLIGSGENM
QKKDEKNIKDFHINDYEIDGKTIHNKENKDSFKMNKNKLNDNEELFYMDN
ILSYKPNKKKLFTYSFSENEGNSEKEETLYNFKNMKNINSVQNNINKTFL
YNKLKNVDYYEHGYNWDIGQCKTGKYQSPVDLPMKDLKERELKNISDVYL
NLFDDDNYAWNNYNKPWMKGDFFYYYEYFIKKIVINRQNNIFQIKAARDG
IIPFGVLFTTEQPAMFYADQIHFHAPSEHTFQGSGNRREIEMQIFHSTNY
FYDIQDDKSKYKKKYGLHIYNNLKKNSKETSKKDSSRYHSYLMSFLMNSL
SNEQLQNKYNKKKRIKKMKNQYEVISITFTSAEINASTINAFKKLPSEKF
LRTIINVSSAVHVGSGNK

รูปที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนของ ยีน PfCA 2

1.5 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์

ได้มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์และนำเอาตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม acetazolamide มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Krungkrai et al. 2004 พบว่ามีตัวยาบางตัวมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ค่อนข้างดี (ตัวยับยั้งตัวที่ 1,2,5) เมื่อเทียบกับ aetemisinin (Ki=2.4 μM) ดัง**ตารางที่ 1**

ตัวยับยั้ง	Ki (μM)
1	0.76
2	0.52
3	3.54
4	1.4
5	0.47
6	1.13
7	5.38
8	2.52
aetemisinin	2.41

ตารางที่ 1 การศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยยาในกลุ่ม acetazolamide

ความเข้มข้นของสับสเตรท [S]=25 (μM)

ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง [I]=10 (μM)

2. การเพิ่มปริมาณยีน PfCA 2 โดยวิธี PCR (polymerase chain reaction) **วิธีที่ 2**

เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตและสกัดจากวิธีแรกมีความบริสุทธิ์และปริมาณน้อย จึงได้เปลี่ยนระบบการ cloning และ expression ของ PfCA 2 โดยอาศัยวิธี Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology ซึ่งวิธีนี้จะสะดวก รวดเร็ว โปรตีนที่ได้สามารถตรวจสอบได้ง่ายรวดเร็ว และจำเพาะ โดยอาศัยวิธี Lumino™ Green Detection Kit เนื่องจากอาศัยหลักการฟลูออเรสเซนส์ จึงทำให้สามารถตรวจหาโปรตีนได้ในระดับนาโนกรัม พร้อมกับได้ออกแบบ primer คู่ใหม่ โดยเติมเบส CACC เข้าหน้า forward primer เพื่อให้สามารถเชื่อมต่อกับลำดับเบส GTGG ที่อยู่บนพลาสมิดตัวใหม่ได้แก่ pET 160/GW/D-TOPO หรือ pET TOPO@ vector (Invitrogen) ได้ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

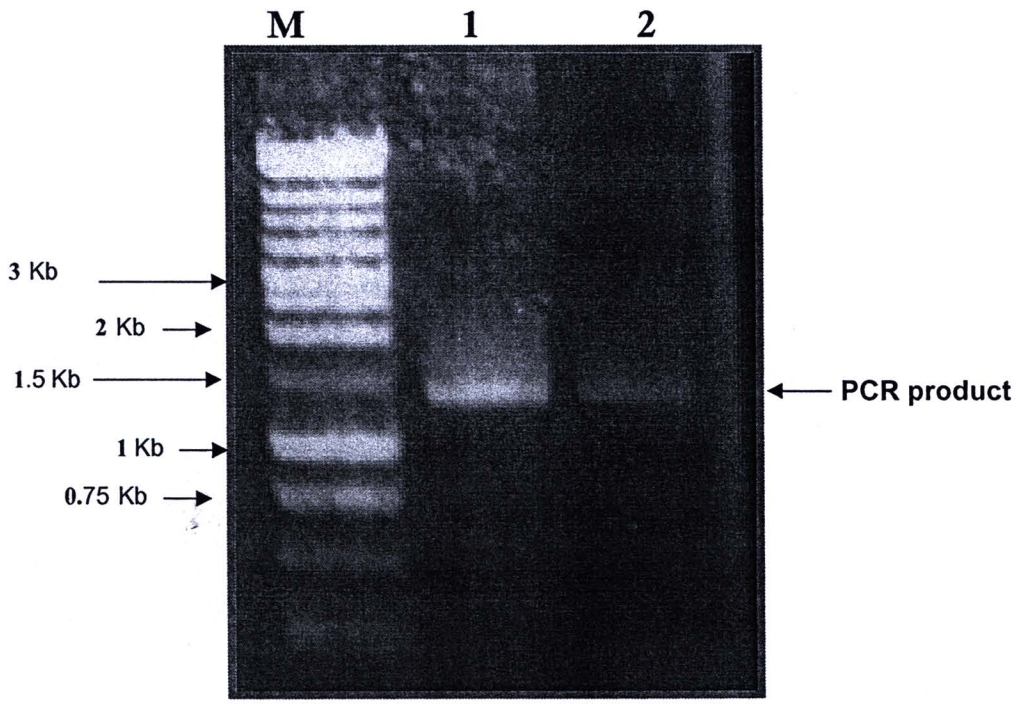
forward primer ได้แก่

5' CGC**GGATCC**ACCATGCTTGAAATGATAGATAAATAT **3'** จำนวน 36 mers

ส่วน reverse primer ได้แก่

5' CCC**AAGCTT**TTATTTATTACCTGAGCCGACGTG **3'** จำนวน 33 mers

พร้อมกับได้ใส่ตำแหน่งที่สามารถตัดได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* ผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน PfCA 2 โดยวิธี PCR แสดงใน**รูปที่ 7**



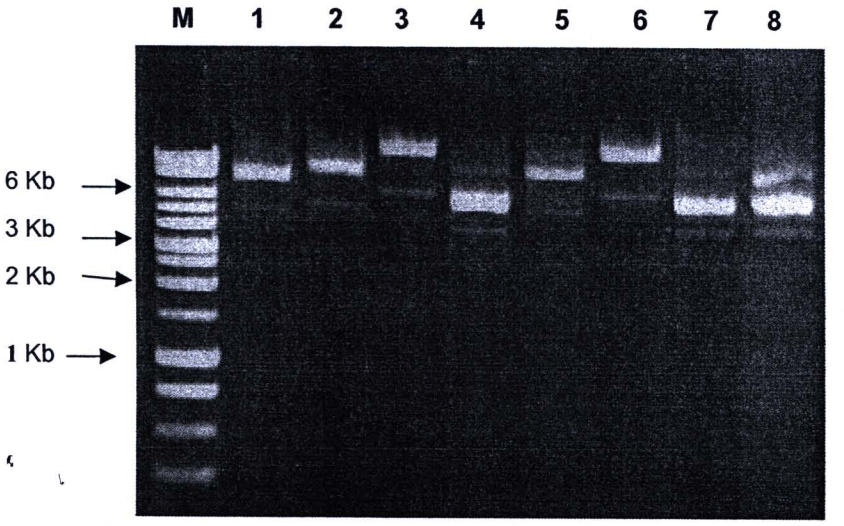
รูปที่ 7 PfCA 2 gene ที่ได้จากการทำ PCR วิธีที่ 2

Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1-2 ยีน PfCA 2 ที่ได้จากการทำ PCR

2.1 **Cloning** และ **Plasmid Extraction**

นำชิ้นส่วนดีเอนเอที่ได้ไปเชื่อมต่อและใส่ลงไปใน pET 160/GW/D-TOPO ที่มีขนาด 5.8 kb และได้ clone cells มากมายดังแสงใน**รูปที่ 8**

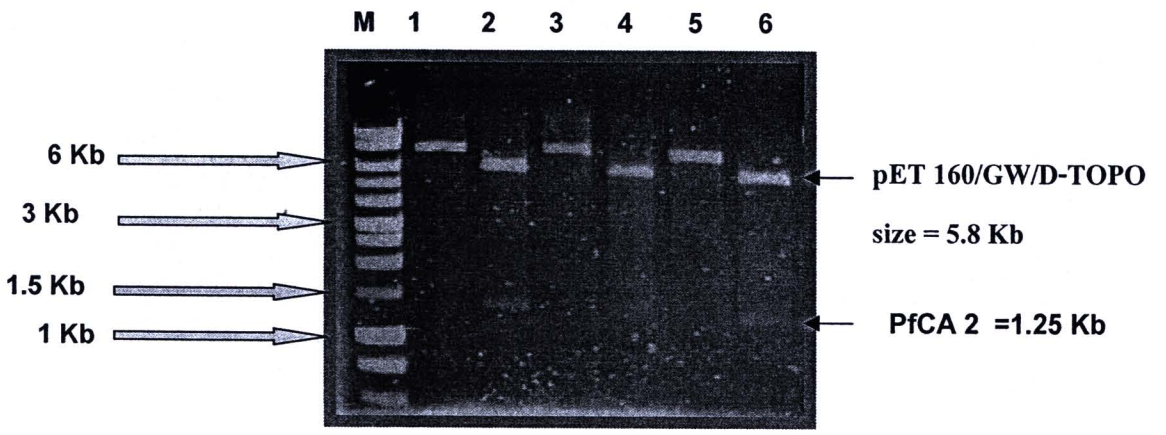


รูปที่ 8 พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน PfCA 2 กับพลาสมิด pET160/GW/D-TOPO

Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1-8 พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน PfCA 2 กับพลาสมิด pET160/GW/D-TOPO

ต่อมาคัดเลือกและทดสอบ clone cells ที่คาดว่าน่ามีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 ไปคัดเลือกต่อด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* ได้ผลดัง**รูปที่ 9**



รูปที่ 9 พลาสมิด pET160/GW/D-TOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ

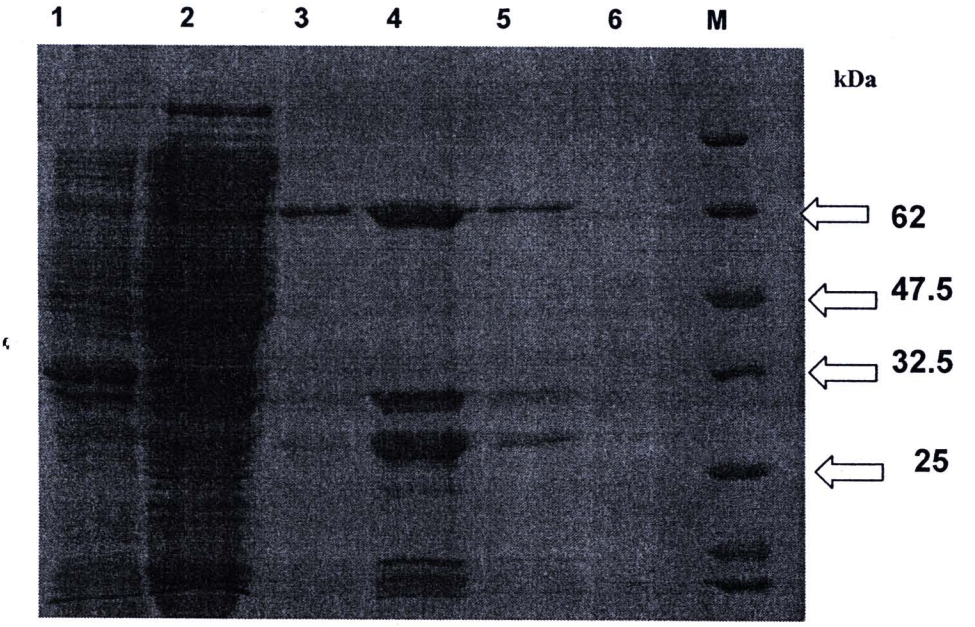
Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1, 3, 5 พลาสมิด pET160/GW/D-TOPOที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA2 และถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamH I*

Lane 2, 4, 6 พลาสมิด pET 60/GW/D-TOPOที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 และถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamH I* และ *Hind III*

2.3 Protein Expression และ Identification

หลังจากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้ *E. Coli* (สายพันธุ์ BL21) ที่มีพลาสมิดลูกผสมที่มียีน PfCA 2 ให้มีการผลิตโปรตีนออกมาโดยอาศัย IPTG ที่อุณหภูมิ 18°C และนำเอาโปรตีนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni^{2+}- nitrilotriacetic acid agarose column และนำโปรตีนไปแยกและทดสอบโดยอาศัย SDS-PAGE แสดงในรูปที่ **10**



รูปที่ 10 แสดงแถบโปรตีนที่สกัดจาก *E. Coli* หลังจากผ่านคอลัมน์ Ni^{2+}-coumn imidazole นำมาแยกโดยอาศัย SDS-PAGE

Lane 1 แถบโปรตีนที่อยู่ในสารละลายส่วนใส (supernatant)

Lane 2 แถบโปรตีนที่อยู่ในสารละลายส่วนใสที่ผ่าน Ni^{2+}-NTA-agarose affinity gel column

Lane 3 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 1

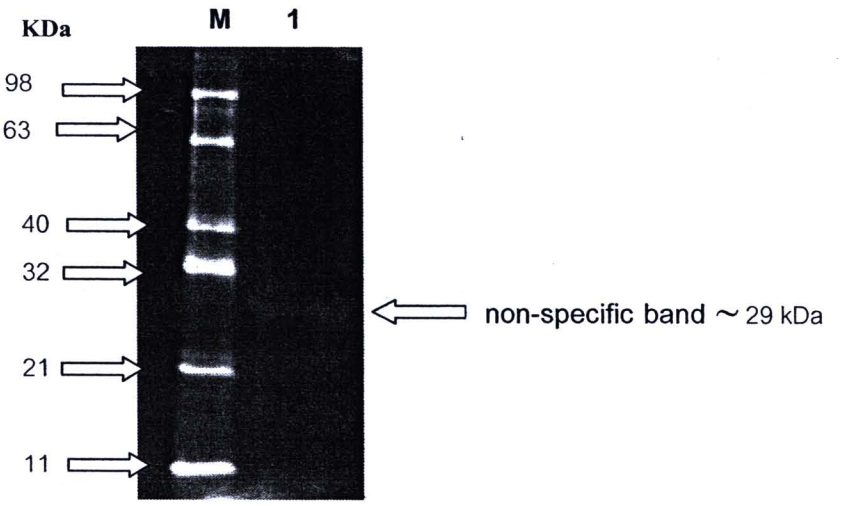
Lane 4 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 2

Lane 5 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 3

Lane 6 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 4

Lane M standard protein molecular size marker

แต่เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาทดสอบหาโปรตีนที่สนใจโดยวิธี Lumino™ Green Detection กลับไม่พบตำแหน่งโปรตีนที่ต้องการ เจอเฉพาะ non-specific band ของ *E. Coli* ตรงตำแหน่งประมาณ 29 kDa ดังแสดงในรูปที่ **11**



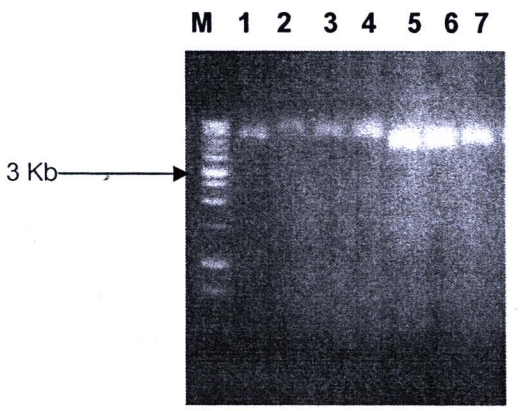
รูปที่ 11 แสดงแถบโปรตีนส่วนที่สกัดจาก *E. Coli* ที่ติดฉลากและตรวจสอบด้วยวิธี Lumino™ Green Detection

Lane M BenchMark™ Fluorescent Protein Standard

Lane 1 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 2

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน PfCA 2 โดยอาศัยพลาสมิดตัวอื่น เช่น $pQA30_a$

เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตและสกัดจากยีน PfCA 2 จากวิธีต่างๆ ที่กล่าวมาได้จำนวนโปรตีนผลผลิตน้อยมากจึงได้มีการพยามเชื่อมต่อยีน PfCA 2 เข้าไปในพลาสมิดตัวอื่นเช่น $pQA30_a$ หลังจากนั้นนำพลาสมิดที่ได้หรือพลาสมิดลูกผสมนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (competent cell) และได้ cloned cells ดังแสดงใน**รูปที่ 12**

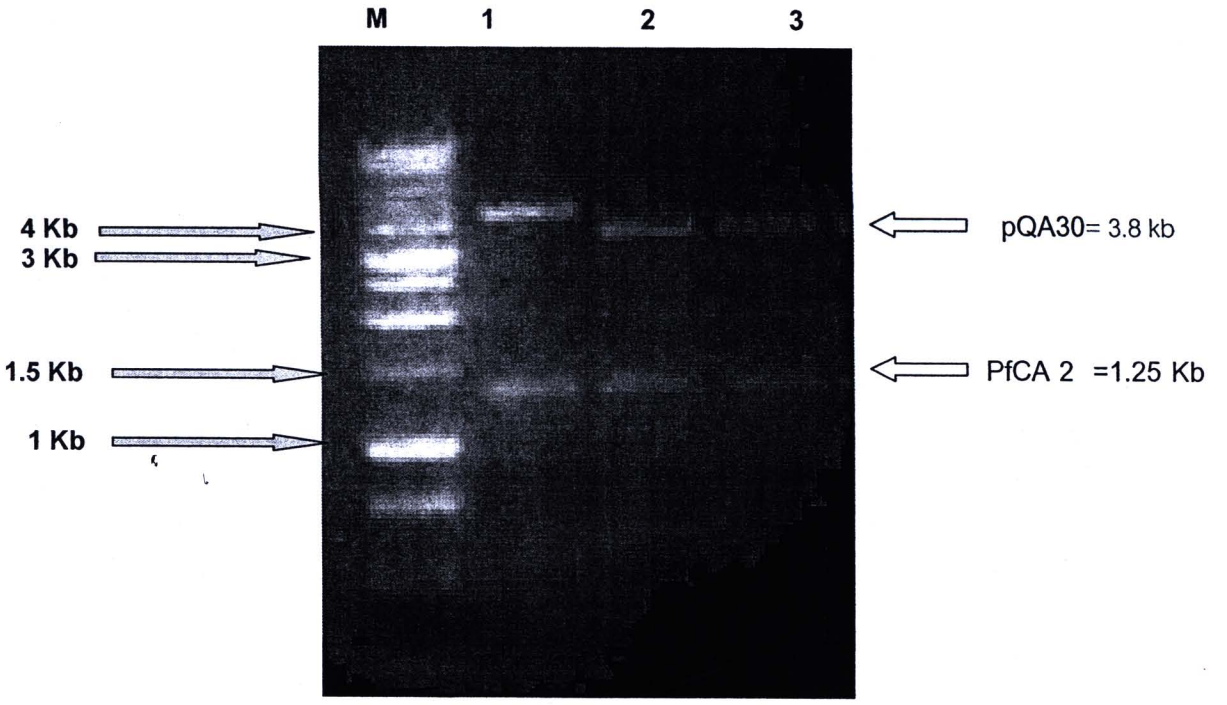


รูปที่ 12 พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน PfCA 2 กับพลาสมิด $pQA30_a$

Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1-7 พลาสมิดลูกผสมที่ได้จาการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน PfCA 2 กับพลาสมิด $pQA30_a$

ต่อจากนั้นนำเลือก cloned cells มาทดสอบดูพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 โดยการทำ electrophoresis หลังจากที่ได้ทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* และผลที่ได้แสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 พลาสมิดลูกผสม pQA30 ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 และถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III*

Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1-3 พลาสมิด pQA30 ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA2 และถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamH I* และ *Hind III*

อย่างไรก็ดีเมื่อนำเอาพลาสมิดลูกผสมที่ได้มาศึกษาการแสดงออกปรากฏว่าไม่พบโปรตีนตรงตำแหน่งที่ต้องการ (ผลไม่ได้แสดง)