

วิธีการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาไปที่ยีนของ carbonic anhydrase (CA) สายยาวของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA 2) โดยการค้นหายีนและศึกษาการแสดงออกใน *E. Coli* เพื่อให้ได้เอ็นไซม์ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อนำไปศึกษาและค้นหาตัวยับยั้งของเอ็นไซม์ในกลุ่ม aromatic sulfanamides เพื่อใช้เป็นยาเป้าหมายในการรักษาโรคมาเลเรียต่อไป และมีขั้นตอนในการดำเนินงานดังต่อไปนี้

1. สืบหายีน carbonic anhydrase สายยาวของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA 2) ในฐานข้อมูลของมาเลเรีย โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul et al. 1990) ออกแบบ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนในจีโนม (genomic DNA) เพื่อให้ได้ยีน PfCA 2 ที่มีความยาวมากที่สุดโดยวิธี PCR (polymerase chain reaction)
2. ยีน PfCA 2 ที่ได้จากการทำ PCR จากข้อ 1 (full-length PfCA2) จะนำไปหาลำดับเบสและถูกนำไปโคลนในพลาสมิดที่มีลำดับของฮิสทีดีนติดอยู่ (His-tagged sequence) เช่น pTOPO เพื่อให้ง่ายต่อการทำให้เอ็นไซม์บริสุทธิ์ เมื่อทราบลำดับเบสของ PfCA 2 รวมทั้งลำดับของกรดอะมิโนแล้วนำไปเปรียบเทียบกับความเหมือน (homology) กับ CA ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ
3. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ในปริมาณ 10-30 มิลลิกรัม เช่น ดูเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำของ IPTG (time for IPTG induction) หาปริมาณที่เหมาะสมของ IPTG ในการเหนี่ยวนำ หรือศึกษาหาอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในระหว่างการเหนี่ยวนำเป็นต้น จากขั้นตอนทั้งหมดที่กล่าวมานี้คาดว่าจะการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จะได้โปรตีนลูกผสมออกมาประมาณ 2-5 มิลลิกรัม
4. นำโปรตีนที่ได้จากข้อ 3 ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีโครมาโตกราฟีโดยใช้ affinity chromatography (Chirica et al. 2001) เรียกเอ็นไซม์ที่สกัดจากวิธีนี้ว่า recombinant PfCA 2 และนำไปศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี (Krungkrai et al. 2001) รวมถึงการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีทั่วไป เช่น ศึกษาทางจลนศาสตร์เพื่อหาค่า K_m K_i เป็นต้น และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับเอ็นไซม์ PfCA 1 และเอ็นไซม์ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงในจานทดลอง (*in vitro*)
5. ศึกษาารูปแบบ (model) และโครงสร้างของเอ็นไซม์ CA ในรูปที่อิสระ (free) และรูปที่จับกันเป็นคอมเพล็กซ์ (complexed) กับตัวยับยั้งในกลุ่ม aromatic sulfonamides ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของ Professor Dr. Supuran, C.T. และ Professor Dr. Scozzafava, A. โดยใช้ structure-activity relationship (SAR)
6. ศึกษาผลของยาในกลุ่ม aromatic sulfonamides ในการยับยั้งเอ็นไซม์ PfCA 2 และ PfCA 1
7. ศึกษาผลของยาในกลุ่ม aromatic sulfonamides ที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Plasmodium falciparum*