วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ Human fetal osteoblast cell line

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Human fetal osteoblast cell line (hFOB1.19 (ATCC® CRL-11372™), Rockville, USA) ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) ที่มี 10% fetal calf serum, 2mM glutamine, 50 U/ml penicillin G และ 50 µg/ml streptomycin โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37^0C ภายใต้ 5% CO_2 และทำการเลี้ยงเซลล์จนได้ 80% confluent จึงนำไปสกัด Total RNA ต่อไป

2. การเตรียม Total RNA และ Complementary DNA (cDNA)

นำเซลล์เพาะเลี้ยง Human fetal osteoblast cell line (hFOB) ที่ทำการเลี้ยงตามวิธีการข้างต้นมาใช้สำหรับการสกัดปริมาณอาร์เอ็นเอรวม (Total RNA) ตาม protocol ของ Nucleospin® RNA II (Machere-Nagel, Germany) แล้วนำไปวัดปริมาณอาร์เอ็นเอโดยใช้เครื่อง spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และคำนวณอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้ ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 90 volts และทำการย้อมแถบอาร์เอ็นเอด้วย ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำไปใช้เป็นแม่แบบเพื่อสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) โดยอาศัย oligo $(dT)_{18}$ เป็นไพรเมอร์ ตามวิธีการมาตรฐานของ RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas life science) จากนั้นนำตัวอย่างไปใช้เป็นแม่แบบในการในการหาเพิ่มปริมาณยีนของ BMP-2 ของมนุษย์โดยเทคนิค Polymerase chain reaction

3. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์

ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ mature hBMP-2 ของมนุษย์ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ cDNA ที่เตรียมได้เป็นแม่แบบ ท่อนดีเอ็นเอถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพร์เมอร์ (primer) ที่ถูกออกแบบให้จำเพาะกับลำดับเบสของยีน mature hBMP-2 โดย Forward primer **คือ** 5′- CAAGCCAAACACAAACAGCG -3′ และ Reverse primer คือ 5′ GCGACACCCACAACCCTC -3′ ขั้นตอนและสภาวะในการเพิ่มปริมาณปฏิกิริยา PCR หลังจากการปรับสภาวะที่เหมาะสมแล้วมีขั้นตอนดังนี้

อุณหภูมิ	94 °C	เป็นระยะเวลา	2	นาที
อุณหภูมิ	94 °C	เป็นระยะเวลา	45	วินาที
อุณหภูมิ	55 °C	เป็นระยะเวลา	1	นาที
อุณหภูมิ	72 °C	เป็นระยะเวลา	1	นาที
อุณหภูมิ	72 °C	เป็นระยะเวลา	5	นาที

โดยทำทั้งหมดจำนวน 35 รอบ องค์ประกอบต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ได้จาก GoTaq® Green Master Mix (Promega) ปริมาตรสุดท้าย 25 µl หลังจากการเพิ่มจำนวนแล้ว นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการวิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis ทำการตัดแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับยีน mature human BMP-2 ตามที่คำนวณไว้ และนำดีเอ็นเอมาแยกบริสุทธิ์ตามขั้นตอนของ Qiaquick® Gel Extraction kit (Qiagen) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มบริเวณลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยที่ปลาย 5′ จะมีลำดับเบสจำเพาะสำหรับ *EcoR* I, *Nco* I ตามด้วยลำดับเบสสำหรับกรดอะมิโน Histidine จำนวน 6 ตัว และลำดับเบสสำหรับโปรตีน Factor Xa ส่วนที่ปลาย 3′จะออกแบบโดยเพิ่มลำดับเบสสำหรับการจดจำเพื่อหยุดการสร้างโปรตีน (stop codon) ปลายสุดเป็นบริเวณลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Hind* III ดังนี้

Forward primer:

5′GAATTCGGCCATGGCTCATCACCATCACCATCACATCGAAGGGCGCCAAGCCAAACACAA 3′

Reverse primer: 5′ CGCAAGCTTGGATCCTTAGCGACACCCACAACC 3′

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอนเอด้วยเทคนิค PCR ขั้นตอนและสภาวะในการเพิ่มปริมาณปฏิกิริยา PCR หลังจากการปรับสภาวะที่เหมาะสมแล้วมีขั้นตอนดังนี้

อุณหภูมิ	95 °C	เป็นระยะเวลา	5	นาที
อุณหภูมิ	95 °C	เป็นระยะเวลา	30	วินาที
อุณหภูมิ	58 °C	เป็นระยะเวลา	30	วินาที
อุณหภูมิ	72 °C	เป็นระยะเวลา	30	วินาที
อุณหภูมิ	72 °C	เป็นระยะเวลา	5	นาที

โดยทำทั้งหมดจำนวน 30 รอบหลังจากนำมาวิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 90 volts ดีเอ็นเอตามตำแหน่งที่ต้องการถูกตัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Qiaquick® Gel Extraction kit (Qiagen) เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้าสู่เวคเตอร์พาหะต่อไป

4. การโคลนยีน BMP-2 ของมนุษย์เข้าสู่เวคเตอร์พาหะ และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

4.1 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์พาหะ และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำชิ้น PCR product ที่จำเพาะต่อ hBMP-2 ข้างต้นมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์พาหะโดยใช้ CloneJET™ PCR Cloning kit (Fermentas) ด้วยอัตราส่วนระหว่าง เวคเตอร์: ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ 1:3 โดยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase ปฏิกิริยาถูกบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้มาเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านชนิดแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* XL1- Blue โดยวิธีการ Transformation แบบ Heat shock method โดยแช่ *E. coli* XL1- Blue competent cells 100 µl ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นผสมกับ ligation product และแช่บนน้ำแข็งต่ออีก 30 นาที การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์กระทำที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาทีและแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็วอีก 2 นาที

จากนั้นใส่ LB media ปริมาตร 900 μl แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 μg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง

4.2 การคัดเลือก Recombinant clones และตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสม

โคลนที่สนใจซึ่งดื้อยาปฏิชีวนะ Ampicillin ถูกเลือกแบบสุ่มและนำมาเลี้ยงใน LB ที่มี 100 μg/ml Ampicillin การคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอลูกผสมของยีน mature hBMP-2 ทดสอบโดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction) เพื่อตรวจสอบยีนที่เราสนใจ นำโคลนที่สนใจมาเพิ่มปริมาณโดยการเลี้ยงใน LB ที่มี 100 μg/ml Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ทำการสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย Plasmid Miniprep kit (Qiagen) แล้วจึงทำการวิเคราะห์โดยใช้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามที่ได้ออกแบบไว้เช่น *Eco*R I, *Nco* I, *Bam*H I, *Hind* III, หรือ *Bgl* II หรือตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 5-10 units/μg ของดีเอนเอที่ต้องการ และนำมาวิเคราะห์บน 1% agarose gel electrophoresis โดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 90 volts และทำการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

5. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป

วิธีการนี้ใช้สำหรับการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์สูง โดยเลี้ยงพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 5-10 มิลลิลิตรภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Amplicillin ที่ความเข้มข้น 100 μg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง และทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) หรือ HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience) ตามวิธีการมาตรฐานของชุดสกัด ความเข้มข้นของพลาสมิดที่สกัดได้ถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และความบริสุทธิ์ของพลาสมิดที่สกัดได้คำนวณจากค่าอัตราส่วน A260/A280

6. การหาลำดับเบสโดยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (Automated DNA Sequencing)

การเรียงตัวของลำดับเบสสำหรับยีนที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์สามารถทำได้โดยนำโคลนที่สนใจซึ่งบรรจุอยู่พลาสมิดเวคเตอร์ pJET1.2, pEZZ18 หรือ pET vector มาเพิ่มปริมาณใน LB ที่มี 100 μg/ml Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ทำการสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย Plasmid Miniprep kit (Qiagen) แล้วนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และคำนวณอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเทคนิค Automated DNA Sequencing โดยใช้ pJET1.2 forward sequencing primer (5′ CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3′) หรือ reverse sequencing primer (5′ AAGAACATAGATTTTCCATGGCAG 3′) สำหรับ pJET1.2 vector หรือ ใช้

M13 forward sequencing primer (5′ GTAAAACGACGGCCAGT 3′) สำหรับ pEZZ18 vector หรือใช้ T7 terminator sequencing primer (5′ GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3′) สำหรับ pET32a vector ลำดับของเบสที่ได้ถูกแสดงผลด้วยโปรแกรม Chromas Lite 2.01 และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยสืบค้นจากฐานข้อมูลสากล GeneBank database จาก National Center Biotechnology Institute (NCBI) โดยใช้ Blast similarity search และลำดับเบสถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม VectorNTI version 10.0

7. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีเวคเตอร์พาหะบรรจุยีน BMP-2 ของมนุษย์ ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษา ใน LB media ปริมาตร 5 ml ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 μg/ml โดยเขย่า 180 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง overnight culture 0.7 ml ถูกเติมลงใน LB broth 70 ml ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 μg/ml โดยเขย่า 180 rpm ที่ 37 °C จนกระทั่ง OD_{600} มีค่า ~ 0.5 - 0.6 จากนั้นจึงเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 mM และเขย่าต่อไปที่อุณหภูมิ 30°C หรือ 37°C จนครบเวลา 0, 2, 4, 6 และ 20 ชั่วโมง ในแต่ละเวลาทำการเก็บ 10 ml เมื่อครบตามเวลาแล้วทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เซลล์ที่เก็บได้ถูกทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (50mM NaH_2PO_4, 300mM NaCl, 10mM Imdidazole, pH 8.0) หรือใช้สารละลาย B-PER II (Pierce) ที่มี 1mg/ml lysozyme และใช้วิธี freeze-thaw method 3 ครั้ง หรือใช้วิธีการแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic sonicator) โดยใช้ push on 2 sec, push off 1 sec, time 30 sec, amplitude 60% ทำซ้ำ 2 ครั้งแล้วจึงนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกส่วนใส (supernatant) และตะกอน (pellet) จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE

8. การวัดปริมาณโปรตีน

การทดลองใช้การวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford protein assay (Bio-Rad laboratories, USA) โดยมีหลักการคือใช้สี Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งสามารถจับกับกรดอะมิโนที่มีลักษณะเป็นเบสเช่น arginine หรือมีโครงสร้างของวงแหวนอะโรมาติกได้สารประกอบสีน้ำเงินที่มีสีเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานคือ Bovine serum albumin ซึ่งเตรียมโดยการทำ two-fold serial dilutions ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 1,000 μg/ml สารละลายโปรตีนที่ต้องการทราบปริมาณถูกเตรียมโดยเจือจางในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 และนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย Bradford reagent เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm

9. Polyacrylamide gel electrophoresis

15% SDS-PAGE ถูกเตรียมโดยใช้ 15% separating gel และ 4%stacking gel ตามวิธีมาตรฐาน หลังจากที่เจล polymerized อย่างสมบูรณ์แล้วจึงหยอดตัวอย่างโปรตีนที่ปริมาณ 10 µg หรือปริมาณตามต้องการลงในแต่ละหลุม โดยโปรตีนนั้นถูกผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นจึงผ่านกระแสไฟฟ้าที่ศักย์คงที่ 150 volts เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากผ่านสนามไฟฟ้าแล้วทำการย้อมเจลด้วย 5% w/v Coomassie Brilliant Blue เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างสีออกด้วย 50% v/v methanol, 10% v/v acetic acid solution จนกระทั่ง background ใส

10. การแสดงออกและการแยกบริสุทธิ์รีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์โดยวิธี Nickle affinity chromatography

แบคทีเรีย *E.coli* XL1-Blue หรือสายพันธุ์ Shuffle Express *E.coli* ที่มี pEZZ18-hBMP-2 ถูกเลี้ยงใน LB media ปริมาตร 5 ml ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยเขย่า 180 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำ overnight culture เติมลงใน LB media ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1 % inoculum size เลี้ยงโดยเขย่า 180 rpm ที่ 37 °C จนกระทั่ง OD_{600} มีค่า ~ 0.5 - 0.6 จากนั้นจึงเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 mM และเขย่าต่อไปจนครบ 16 - 18 ชั่วโมง จึงทำการเก็บและทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) ที่มี protease inhibitor cocktail (Amressco) ทำการแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) หรือ freeze-thaw โดยแช่แข็งที่ -80°C และ thaw ในน้ำแข็ง 15 นาทีจำนวน 3 ครั้งจากนั้นเติม DNase I (Vivantis, USA) ให้ได้ความเข้มข้น 5 µg/ml และทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่ 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกส่วน soluble portion และ pellet จากนั้นจึงนำส่วนที่เป็น soluble portion มาทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA affinity chromatography

โปรตีนที่มีกรดอะมิโน Histidine ที่เรียงซ้ำกันหลาย ๆ ลำดับสามารถจับกับอนุภาคของ Nickle ได้ โปรตีนที่แสดงออกถูกแยกบริสุทธิ์โดยนำส่วนใสที่ได้จากการแตกเซลล์ ผ่าน Ni-NTA Affinity column (Ni-NTA Superflow resin, QIAGEN) ที่ถูกบรรจุใน column โดยใช้การดกตามแรงโน้มถ่วง Column ถูก equilibrate ด้วย Binding buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 10 เท่าของ column จากนั้นเติม clear soluble supernatant ที่ได้ลงไป จากนั้นทำการล้างด้วย binding buffer ต่อปริมาตร 20 เท่าของ column ตามด้วยการล้างโดยเติม Washing buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 20 เท่าของ column และทำการชะล้างโปรตีน hBMP-2 ออกด้วย Elution buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 10 เท่าของ column โดยเก็บ eluted fractions แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

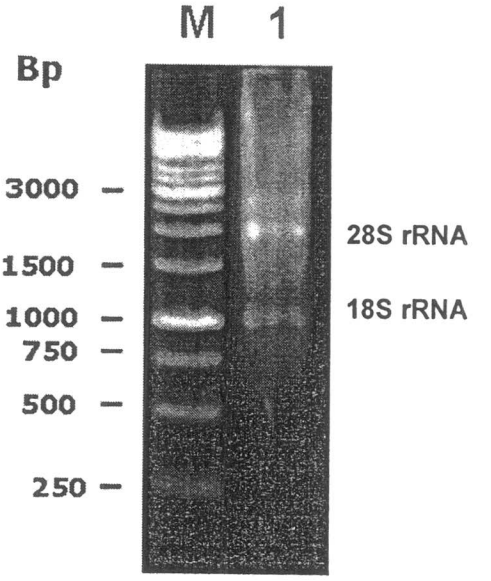
11. การติดตามการผลิตริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ด้วยวิธี Western blot

การตรวจสอบการแสดงออกของริคอมพ์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ ติดตามโดยใช้เทคนิค immunodetection โดยใช้โมโนโคนอลแอนตี้บอดี้ที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์ ตัวอย่างโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้ 15%SDS-PAGE และทำการย้าย (Blotting) ลงบนแผ่น PVDF membrane ที่มีการเรียงลำดับจากขั้วบวกไปขั้วลบโดยเริ่มต้นจากกระดาษกรอง Whatman 3MM filter ตามด้วย PVDF membrane, gel และ Whatman 3MM filter ซึ่งหล่อด้วย blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20%(v/v) methanol, pH 8.3) ที่เย็นภายใต้สนามไฟฟ้าที่ 20 volts เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยใช้ใน Semi-dry blotting apparatus (Atto) หลังจากนั้น Membrane ที่ได้ถูกแช่ใน 5% skim milk ใน TBS-Tween buffer (TBS containing 0.05% Tween 20) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่ม (incubate) กับ Mouse anti-human BMP-2 (Abcam) ที่เจือจางใน 5% skim milk ในอัตราส่วน 1:2,000 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ต่อจากนั้นล้างด้วย 0.05% tween 20-TBS เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างซ้ำสามครั้ง แล้วจึงทำการบ่มกับ Rabbit anti-mouse polyvalent immunoglobulin G ที่ conjugated ด้วย horseradish peroxidase เจือจางใน 5% skim milk ใน TBS-Tween buffer อัตราส่วน 1:2,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย 0.05% tween 20-TBS เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างซ้ำสามครั้ง ขั้นตอนสุดท้ายทำการติดตามการเรืองแสงโดยใช้เทคนิค chemiluminescent โดยเติมสารละลายที่เตรียมได้จาก ECL plus Western blotting detection system (Amersham).ด้วยเครื่อง Bio-rad chemidoc XRS หรือติดตามการเกิดสีด้วย Chromogenic substrate (DAB/H_2O_2 in TBS) เป็นเวลา 5-15 นาที เพื่อดูผลการเกิดสีและล้างด้วยน้ำกลั่นและทำให้แผ่น membrane แห้งโดยวางที่อุณหภูมิห้อง

ผลการทดลอง

1. การสกัดและเพิ่มปริมาณยีนที่จำเพาะต่อ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์

ยีนซึ่งจำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ ได้ทำการแยกมาจากเซลล์ Human Fetal Osteoblast Cell Line (hFOB) โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 37°C ภายใต้ 5% CO_2 และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสัปดาห์ จนกระทั่งเซลล์มีการเจริญเติบโตและปริมาณมากเพียงพอ หลังจากนั้นทำการสกัด Total RNA จากเซลล์ที่ได้ และเตรียมสาย Complementary DNA (cDNA Synthesis) ผลการสกัด Total RNA จากเซลล์ Human Fetal Osteoblast Cell Line (hFOB) และนำมาวิเคราะห์ปริมาณและการตรวจสอบบนวุ้นซึ่งผ่านกระแสไฟฟ้า พบว่า Total RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพเพียงพอและถูกนำมาเป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ complementary DNA โดยใช้ Oligo $(dT)_{18}$ primer ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการวิเคราะห์การสกัด Total RNA ของเซลล์ Human Fetal Osteoblast Cell Line

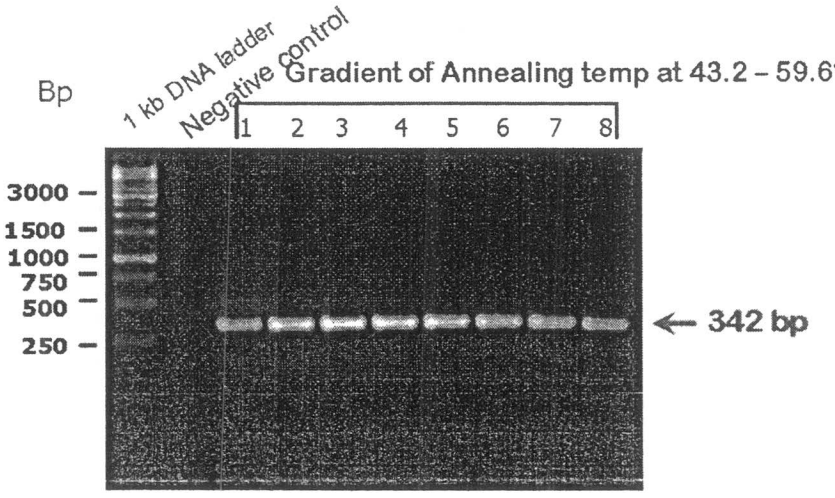
การคัดเลือกยีนที่จำเพาะต่อ mature human Bone Morphogenetic Protein-2 เริ่มต้นโดยการค้นหาลำดับเบสของยีน BMP-2 ของมนุษย์ทั้งหมดจากฐานข้อมูล GeneBank (NCBI) โดยใช้ nucleotide search จากนั้นข้อมูลจาก GeneBank accession number : NM_001200 ซึ่งเป็นลำดับเบสของยีน BMP-2 ของมนุษย์ (Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA) โดยเริ่มจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1632 ถึง 1973 (ตรงกับลำดับกรดอะมิโนที่ 283 ถึง 396) ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบเพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณของยีนที่จำเพาะต่อ mature human BMP-2 ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ cDNA ที่เตรียมได้เป็นแม่แบบท่อนดีเอ็นเอถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่ถูกออกแบบให้จำเพาะกับลำดับเบสของยีน mature BMP-2 ของมนุษย์ และทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน PCR หลังจากการเพิ่มจำนวนแล้ว นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการวิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis และนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาทำแยกบริสุทธิ์ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มบริเวณลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งบริเวณปลาย 5′ และ ปลาย 3′ รวมทั้งการเพิ่มลำดับเบสจำเพาะสำหรับกรดอะมิโน Histidine จำนวน 6 ตัว ตามด้วยลำดับเบสสำหรับโปรทีน Factor Xa ที่ปลาย 5′ โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบอย่างจำเพาะ และทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้บน 1.5% agarose gel electrophoresis

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณของยีนที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยการใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันในขั้นตอนของ Annealing step จาก 40°C – 60°C ดังแสดงในรูปที่ 2 ผลการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณท่อนดีเอ็นเอได้แถบเดียวที่มีขนาด 342 คู่เบส และ Annealing temperature ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 48.4°C – 54.6°C ซึ่งเมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมนี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งพบแถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่มีขนาด 342 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 3 ดีเอ็นเอจาก PCR ขั้นตอนแรกนี้ถูกนำมาใช้แม่แบบของ PCR ครั้งที่ 2 เพื่อเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทำการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนของ Annealing step จาก 48.0°C – 65.0°C (รูปที่ 4) และ Annealing temperature ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 51.4°C – 58.8°C พบแถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่มีขนาด 406 คู่เบส

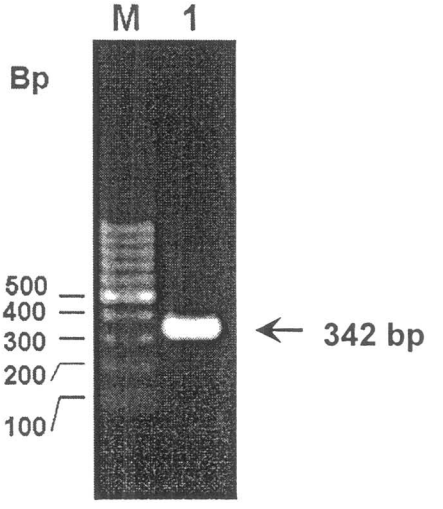
2. การโคลนยีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เข้าสู่เวคเตอร์พาหะ และการตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบส

นำชิ้น PCR product ที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์มาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์พาหะ pJET1.2 vector โดยเทคนิค Blunt end ligation ด้วยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้มาถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านชนิดแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* XL1-Blue โดยวิธีการ Transformation แบบ Heat shock method แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มเพื่อนำมาตรวจสอบยีน BMP-2 โดยใช้เทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Bgl* II (รูปที่ 5) และผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR (รูปที่ 6) พบท่อนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส จากนั้นทำการวิเคราะห์ยีนที่บรรจุใน Recombinant clones โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Eco*R I และ *Bam*H I ซึ่งลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิดนี้จะไม่พบในเวคเตอร์พาหะชนิด pJET1.2 แต่จะพบในบริเวณตำแหน่ง 5′ และ 3′ ของยีน BMP-2 ซึ่งได้มีการเพิ่มเติมเข้าไปเท่านั้น ผลการการทดลองพบว่า โคลนที่ถูกเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส และมีบริเวณลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Eco*R I และ *Bam*H I



รูปที่ 2 แสดงการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอน Annealing ในปฏิกิริยา PCR

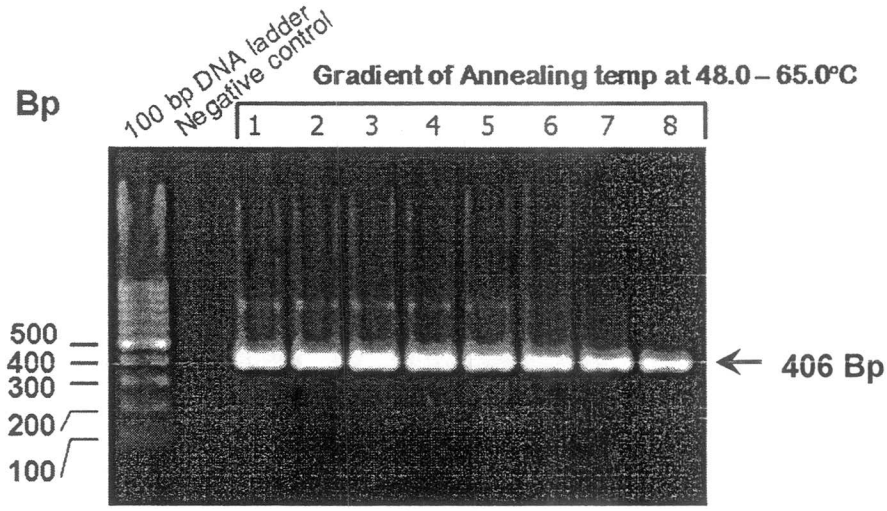
แถวที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 43.2 °C
แถวที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 45.5 °C
แถวที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 48.4 °C
แถวที่ 4 ใช้อุณหภูมิ 51.7 °C
แถวที่ 5 ใช้อุณหภูมิ 54.6 °C
แถวที่ 6 ใช้อุณหภูมิ 56.8 °C
แถวที่ 7 ใช้อุณหภูมิ 58.4 °C
แถวที่ 8 ใช้อุณหภูมิ 59.6 °C



รูปที่ 3 การเพิ่มปริมาณยีนที่จำเพาะต่อ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ โดยเทคนิค Polymerase chain reaction

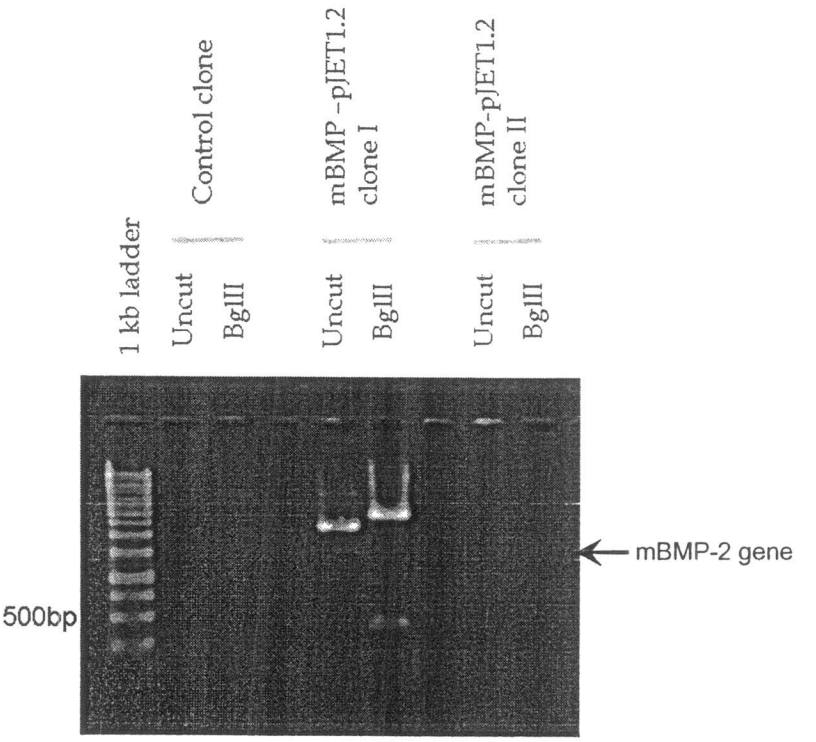
แถวที่ M 100 bp DNA Ladder

แถวที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ในการเพิ่มปริมาณยีนที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์ โดยการใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะ

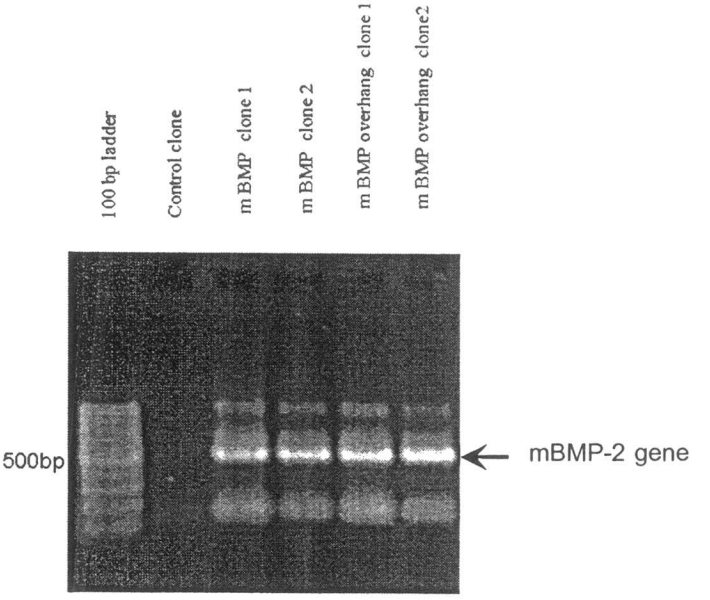


รูปที่ 4 แสดงการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอน Annealing ในปฏิกิริยา PCR เพิ่มบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะและกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว

แถวที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 48.0 °C
แถวที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 49.3 °C
แถวที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 51.4 °C
แถวที่ 4 ใช้อุณหภูมิ 54.5 °C
แถวที่ 5 ใช้อุณหภูมิ 58.8 °C
แถวที่ 6 ใช้อุณหภูมิ 61.8 °C
แถวที่ 7 ใช้อุณหภูมิ 63.9 °C
แถวที่ 8 ใช้อุณหภูมิ 65.0 °C

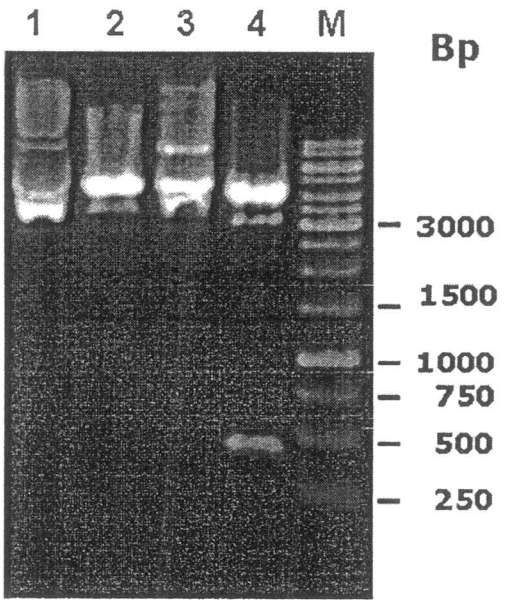


รูปที่ 5 การวิเคราะห์โคลนซึ่งบรรจุยีน mBMP-2 ในเวคเตอร์ pJET1.2 โดยอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* II



รูปที่ 6 การวิเคราะห์โคลนซึ่งบรรจุยีน mBMP-2 และยีน mBMP-2 ที่มีการเพิ่มลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะและสำหรับกรดอะมิโน Histidine โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction

โคลนที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I และ *Bam*H I นี้ถูกนำไปพิสูจน์ลำดับเบสโดยอาศัยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ ผลของการหาลำดับเบสแสดงในรูปที่ 8 ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยการสืบค้นจากฐานข้อมูลสากล GenBank database จาก National Center Biotechnology Institute (NCBI) โดยใช้ Blast similarity search พบว่า ลำดับเบสของดีเอ็นเอจากโคลนที่ถูกเลือกตรงกับยีนของ mature bone morphogenetic protein 2 (mBMP2) ของมนุษย์จากฐานข้อมูลสากล 100% (รูปที่ 9) และทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบสที่ได้โดยใช้โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส Vector NTI (ดังแสดงในรูปที่ 10) ผลการทดลองพบบริเวณของยีน mBMP-2 ของมนุษย์ บริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว ดังแสดงในรูปที่ 10 และ11 จึงสรุปได้ว่าคณะผู้วิจัยสามารถโคลนยีนสำหรับ mature BMP-2 ของมนุษย์ โดยมีลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับฐานข้อมูลสากลทุกประการ



รูปที่ 7 การวิเคราะห์ Recombinant clone ที่บรรจุยีน mature human BMP-2 โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

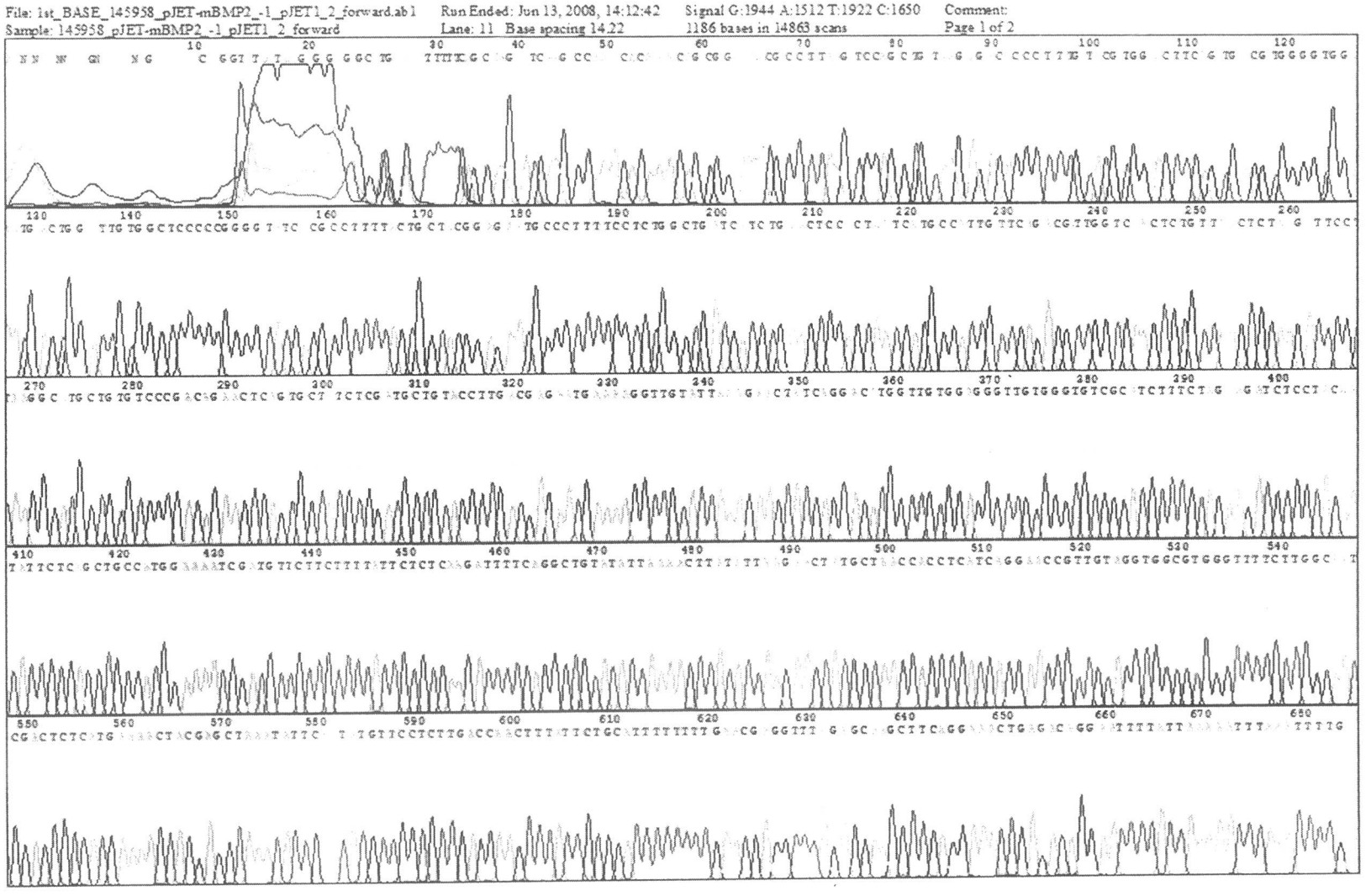
แถวที่ M 1 Kb DNA Ladder

แถวที่ 1 undigested plasmid pJET1.2 – mBMP-2

แถวที่ 2 plasmid pJET1.2 – mBMP-2 digested with *Eco*R I

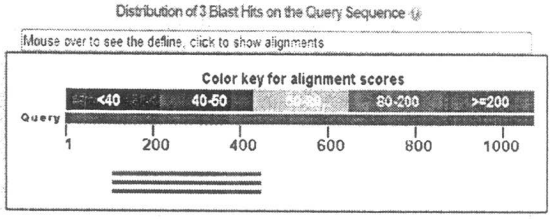
แถวที่ 3 plasmid pJET1.2 – mBMP-2 digested with *Bam*H I

แถวที่ 4 plasmid pJET1.2 – mBMP-2 double-digested with *Eco*R I and *Bam*H I



รูปที่ 8 การวิเคราะห์หาลำดับเบสโดย Automated DNA Sequencing จาก Recombinant clone pJET1.2-hBMP-2 ที่บรรจุยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์

(A) Genetic map ของผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลสากล



escriptions

gend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
Transcripts							
NM_001200.2	Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA	636	636	32%	2e-179	100%	UEGM
Genomic sequences (show first)							
NT_011387.8	Homo sapiens chromosome 20 genomic contig, GRCh37.p5 Primar	636	636	32%	2e-179	100%	
NW_001838652.1	Homo sapiens chromosome 20 genomic contig, alternate assembl	630	630	32%	3e-178	99%	

(B) ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสจากฐานข้อมูลสากล

>ref|NM_001200.2| UEGM Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA
Length=3150

GENE ID: 650 BMP2 | bone morphogenetic protein 2 [Homo sapiens]
(Over 100 PubMed links)

Score = 636 bits (344), Expect = 2e-179
Identities = 344/344 (100%), Gaps = 0/344 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query  60    TAGCGACACCCACAACCCTCCACAACCATGTCCTGATAGTTCTTTAATACAACCTTTTCA  119
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1975  TAGCGACACCCACAACCCTCCACAACCATGTCCTGATAGTTCTTTAATACAACCTTTTCA  1916

Query  120   TTCTCGTCAAGGTACAGCATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTCGGGACACAGCATGCCTTA  179
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1915  TTCTCGTCAAGGTACAGCATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTCGGGACACAGCATGCCTTA  1856

Query  180   GGAATCTTAGAGTTAACAGAGTTGACCAACGTCTGAACAATGGCATGATTAGTGGAGTTC  239
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1855  GGAATCTTAGAGTTAACAGAGTTGACCAACGTCTGAACAATGGCATGATTAGTGGAGTTC  1796

Query  240   AGATGATCAGCCAGAGGAAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCCGGG  299
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1795  AGATGATCAGCCAGAGGAAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCCGGG  1736

Query  300   GGAGCCACAATCCAGTCATTCCACCCCACGTCACTGAAGTCCACGTACAAAGGGTGTCTC  359
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1735  GGAGCCACAATCCAGTCATTCCACCCCACGTCACTGAAGTCCACGTACAAAGGGTGTCTC  1676

Query  360   TTACAGCTGGACTTAAGGCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTG  403
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675  TTACAGCTGGACTTAAGGCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTG  1632
```

รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอที่ได้ กับฐานข้อมูลสากล NCBI database วิเคราะห์โดย Blast similarity search / Nucleotide Blast แหล่งข้อมูล : http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Mature huamn BMP2

342 bp

```
      Q  A  K  H   K  Q  R   K  R  L   K  S  S  C   K  R  H
  1   CAAGCCAAAC ACAAACAGCG GAAACGCCTT AAGTCCAGCT GTAAGAGACA
      GTTCGGTTTG TGTTTGTCGC CTTTGCGGAA TTCAGGTCGA CATTCTCTGT
        P  L  Y   V  D  F  S   D  V  G   W  N  D   W  I  V  A
 51   CCCTTTGTAC GTGGACTTCA GTGACGTGGG GTGGAATGAC TGGATTGTGG
      GGGAAACATG CACCTGAAGT CACTGCACCC CACCTTACTG ACCTAACACC
           SmaI
          ~~~~~~~
           XmaI
          ~~~~~~~
           AvaI
          ~~~~~~~
        P  P  G   Y  H  A   F  Y  C  H   G  E  C   P  F  P
101   CTCCCCCGGG GTATCACGCC TTTTACTGCC ACGGAGAATG CCCTTTTCCT
      GAGGGGGCCC CATAGTGCGG AAAATGACGG TGCCTCTTAC GGGAAAAGGA
       L  A  D  H   L  N  S   T  N  H   A  I  V  Q   T  L  V
151   CTGGCTGATC ATCTGAACTC CACTAATCAT GCCATTGTTC AGACGTTGGT
      GACCGACTAG TAGACTTGAG GTGATTAGTA CGGTAACAAG TCTGCAACCA
        N  S  V   N  S  K  I   P  K  A   C  C  V   P  T  E  L
201   CAACTCTGTT AACTCTAAGA TTCCTAAGGC ATGCTGTGTC CCGACAGAAC
      GTTGAGACAA TTGAGATTCT AAGGATTCCG TACGACACAG GGCTGTCTTG
         S  A  I   S  M  L   Y  L  D  E   N  E  K   V  V  L
251   TCAGTGCTAT CTCGATGCTG TACCTTGACG AGAATGAAAA GGTTGTATTA
      AGTCACGATA GAGCTACGAC ATGGAACTGC TCTTACTTTT CCAACATAAT
       K  N  Y  Q   D  M  V   V  E  G   C  G  C  R
301   AAGAACTATC AGGACATGGT TGTGGAGGGT TGTGGGTGTC GC
      TTCTTGATAG TCCTGTACCA ACACCTCCCA ACACCCACAG CG
```

รูปที่ 10 แสดงลำดับเบส กรดอะมิโนและบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่พบภายในยีน mature BMP-2 ของมนุษย์

ลำดับเบสถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม VectorNTI version 8.0

~ แสดงลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Restriction sites+His6+Fxa

406 bp

```
        EcoRI    NcoI
        ~~~~~~   ~~~~~~~~
          N  S  A   M  A  H  H   H  H  H   H  I  E   G  R  Q  A
    1   GAATTCGGCC ATGGCTCATC ACCATCACCA TCACATCGAA GGGCGCCAAG
        CTTAAGCCGG TACCGAGTAG TGGTAGTGGT AGTGTAGCTT CCCGCGGTTC
           K  H  K   Q  R  K   R  L  K  S   S  C  K   R  H  P
   51   CCAAACACAA ACAGCGGAAA CGCCTTAAGT CCAGCTGTAA GAGACACCCT
        GGTTTGTGTT TGTCGCCTTT GCGGAATTCA GGTCGACATT CTCTGTGGGA
         L  Y  V  D   F  S  D   V  G  W   N  D  W  I   V  A  P
  101   TTGTACGTGG ACTTCAGTGA CGTGGGGTGG AATGACTGGA TTGTGGCTCC
        AACATGCACC TGAAGTCACT GCACCCCACC TTACTGACCT AACACCGAGG
         SmaI
        ~~~~~~
         XmaI
        ~~~~~~
         AvaI
        ~~~~~~
           P  G  Y   H  A  F  Y   C  H  G   E  C  P   F  P  L  A
  151   CCCGGGGTAT CACGCCTTTT ACTGCCACGG AGAATGCCCT TTTCCTCTGG
        GGGCCCCATA GTGCGGAAAA TGACGGTGCC TCTTACGGGA AAAGGAGACC
           D  H  L   N  S  T   N  H  A  I   V  Q  T   L  V  N
  201   CTGATCATCT GAACTCCACT AATCATGCCA TTGTTCAGAC GTTGGTCAAC
        GACTAGTAGA CTTGAGGTGA TTAGTACGGT AACAAGTCTG CAACCAGTTG
         S  V  N  S   K  I  P   K  A  C   C  V  P  T   E  L  S
  251   TCTGTTAACT CTAAGATTCC TAAGGCATGC TGTGTCCCGA CAGAACTCAG
        AGACAATTGA GATTCTAAGG ATTCCGTACG ACACAGGGCT GTCTTGAGTC
           A  I  S   M  L  Y  L   D  E  N   E  K  V   V  L  K  N
  301   TGCTATCTCG ATGCTGTACC TTGACGAGAA TGAAAAGGTT GTATTAAAGA
        ACGATAGAGC TACGACATGG AACTGCTCTT ACTTTTCCAA CATAATTTCT
                                                      HindIII
                                                      ~~~
                                                   BamHI
                                                   ~~~~~~
           Y  Q  D   M  V  V   E  G  C  G   C  R  *   G  S  K
  351   ACTATCAGGA CATGGTTGTG GAGGGTTGTG GGTGTCGCTA AGGATCCAAG
        TGATAGTCCT GTACCAACAC CTCCCAACAC CCACAGCGAT TCCTAGGTTC
        HindIII
        ~~~
         L  A
  401   CTTGCG
        GAACGC
```

รูปที่ 11 แสดงลำดับเบสและบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่พบภายในยีน mature BMP-2 ของมนุษย์ ลำดับเบสถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม VectorNTI version 8.0

~ แสดงลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ATG แสดงลำดับเบสสำหรับกรดอะมิโน Methionine

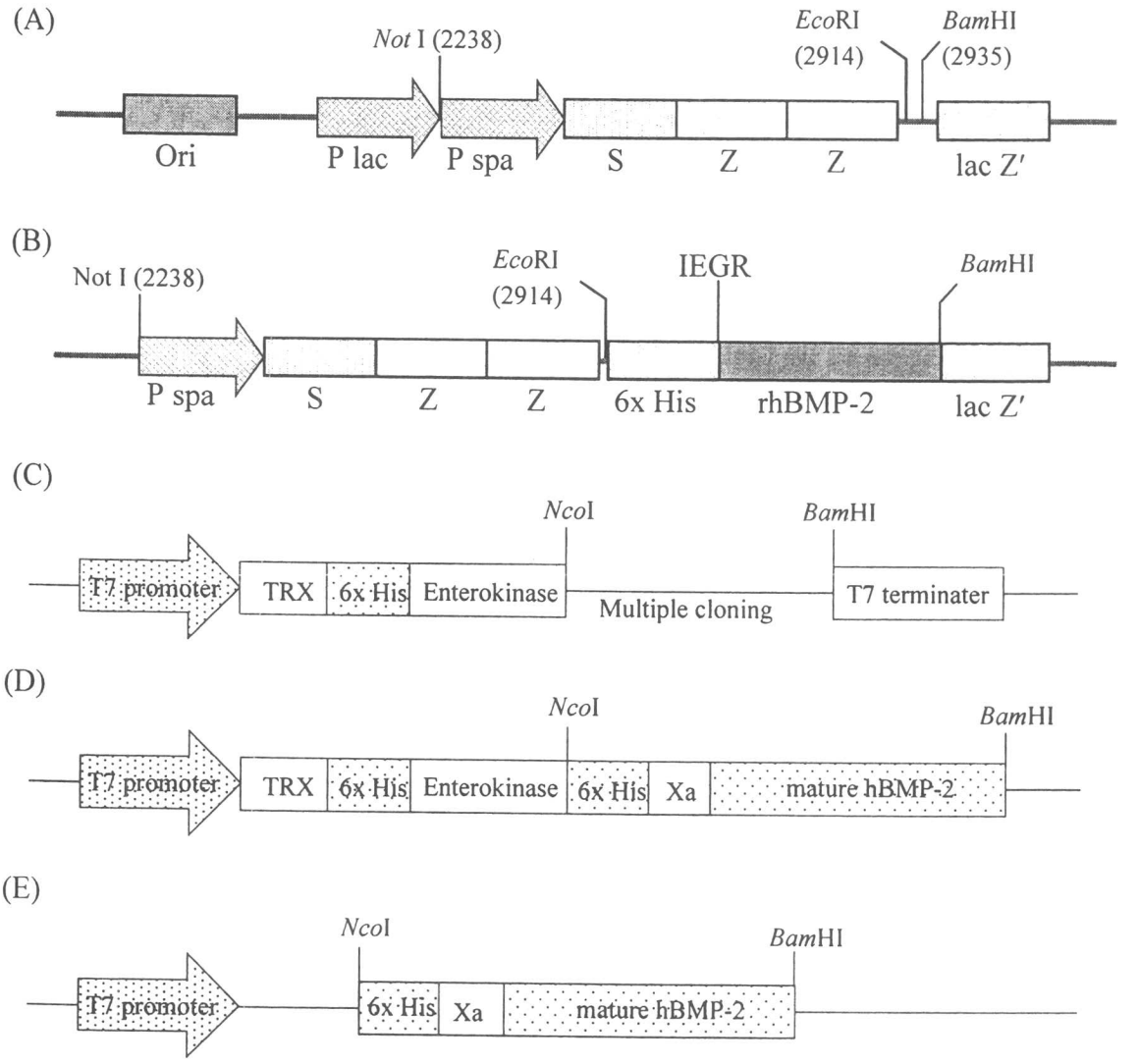
___ แสดงลำดับเบสสำหรับ Factor Xa กรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัว

* Stop codon

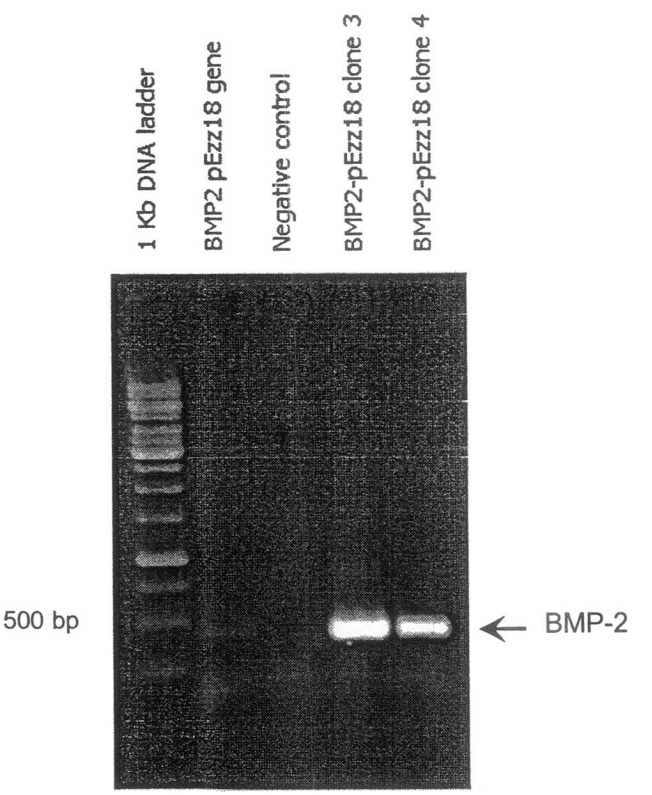
3. การถ่ายโอนยีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เข้าสู่เวคเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 / *E. coli* XL1 Blue

ยีน mature bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) ของมนุษย์ที่บรรจุในเวคเตอร์พาหะ pJET1.2 ถูกย้ายเข้าสู่เวคเตอร์ pEZZ18 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทำการตัดยีน mBMP-2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco*R I และ *Bam*H I จากนั้นนำชิ้นยีนมาผ่านขั้นตอนการทำให้มีความบริสุทธิ์และทำการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pEZZ18 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R I และ *Bam*H I เช่นเดียวกัน ด้วยการทำงานของเอนไซม์ ligase และทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* XL1 Blue แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มเพื่อนำมาตรวจสอบยีนที่สนใจโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) แล้วจึงทำการวิเคราะห์โดยใช้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I และ *Bam*H I ภาพแสดงเปรียบเทียบเวคเตอร์ชนิดต่างๆ ซึ่งบรรจุยีน BMP-2 แสดงในรูปที่ 12

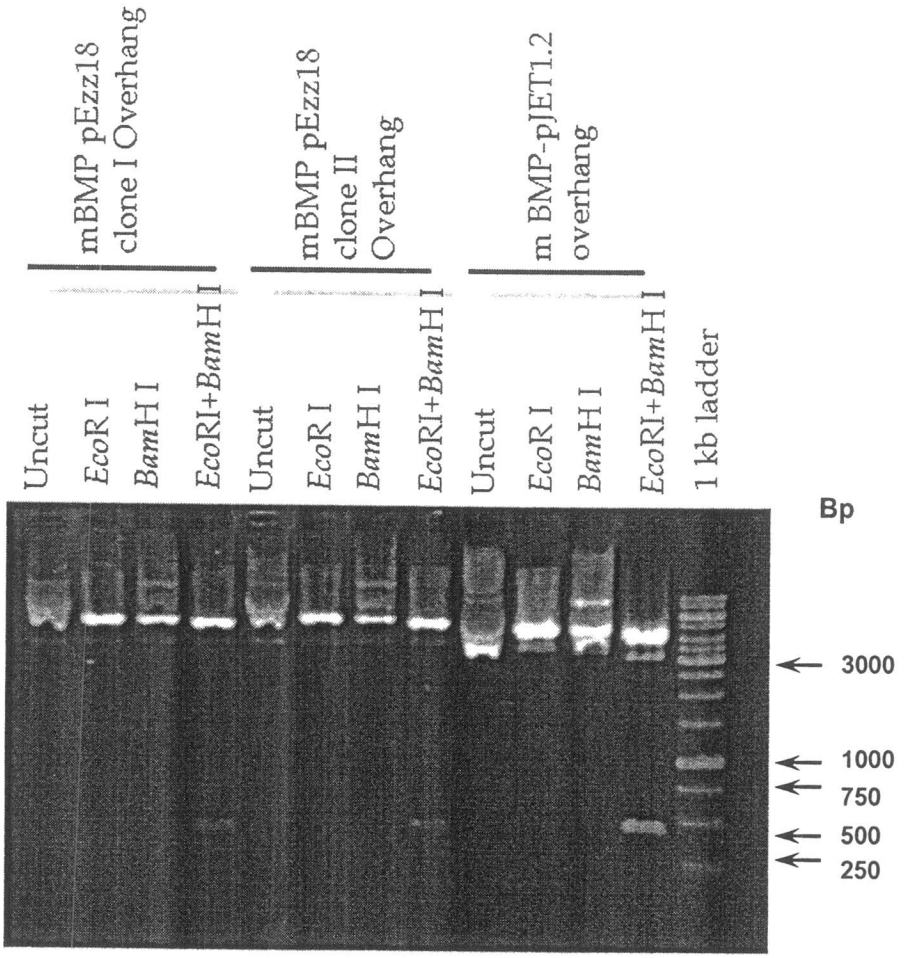
ผลการวิเคราะห์ในการสำรวจแบบสุ่มและตรวจสอบโคลน pEZZ18 ที่บรรจุยีน BMP-2 โดยเทคนิค PCR (รูปที่ 13) พบว่า คณะผู้วิจัยสามารถคัดเลือกโคลนที่บรรจุท่อนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดของยีน mBMP-2 จากนั้นนำโคลนที่สนใจนี้มาทำการวิเคราะห์โดยอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I และ *Bam*H I อีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 14 ผลการการทดลองพบว่าโคลนที่ถูกเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน mBMP-2 ของมนุษย์ และนำโคลนที่ได้ไปพิสูจน์ลำดับของเบสโดยเทคนิคการหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ผลของลำดับเบสแสดงในรูปที่ 16 และพบว่าชิ้นยีนที่บรรจุในเวคเตอร์พาหะ pEZZ18 ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BMP-2 ของมนุษย์ และนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกเพื่อผลิตรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ต่อไป



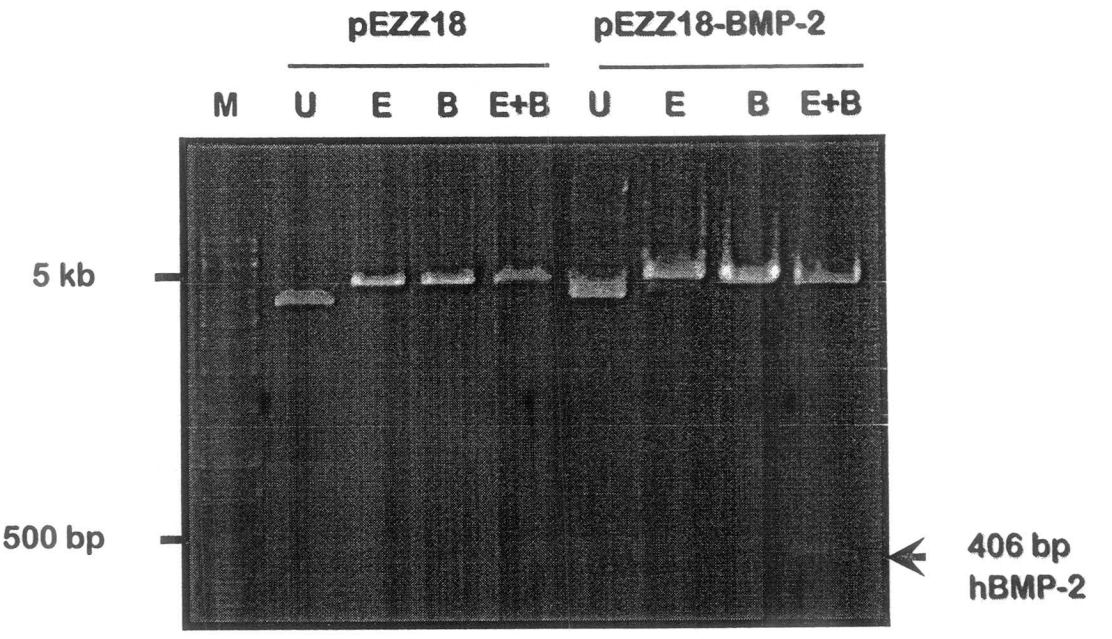
รูปที่ 12 ภาพแสดง Alignment of Restriction sites ของเวคเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก โดยที่ (A) แสดงส่วนของยีนที่กำหนดการสร้าง secretion signal peptide และ ZZ domain ของโปรตีนเอ. (B) pEZZ18-BMP-2 ที่เพิ่มส่วนของ polyhistidine tag และจุดตัดจำเพาะของ factor Xa. (C) แสดงส่วนของ TRX, polyhistidine tag และจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ enterokinase ของ pET32a (D) แสดง alignment ของ pET32a-BMP-2 และ (E) แสดง alignment ของpET15b-BMP-2



รูปที่ 13 การวิเคราะห์โคลนในเวคเตอร์ pEZZ18 ซึ่งบรรจุยีน BMP-2 โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction

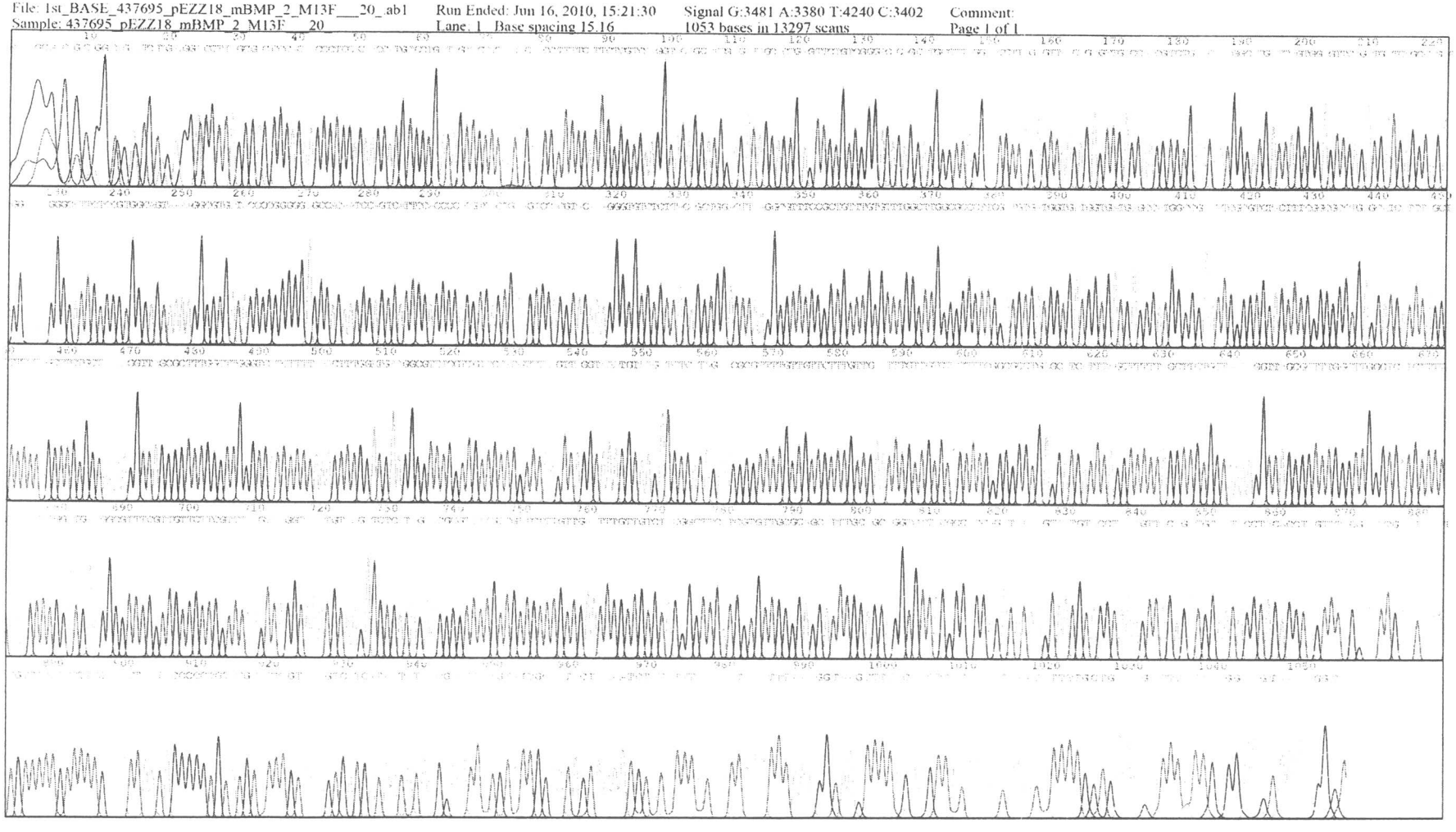


รูปที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ Recombinant clone ในเวคเตอร์ pEZZ18 และเวคเตอร์ pJET1.2 ที่บรรจุยีน mature human BMP-2 โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I, *Bam*H I และ *Eco*R I and *Bam*H I



รูปที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์รีคอมพ์บิแนนท์ pEZZ18-hBMP-2 เปรียบเทียบกับเวคเตอร์พาหะ pEZZ18 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I และ *Bam*H I

M = DNA marker
U = Undigested plasmid DNA
E = *Eco*RI
B = *Bam*H I and *Eco*R I double-digestion



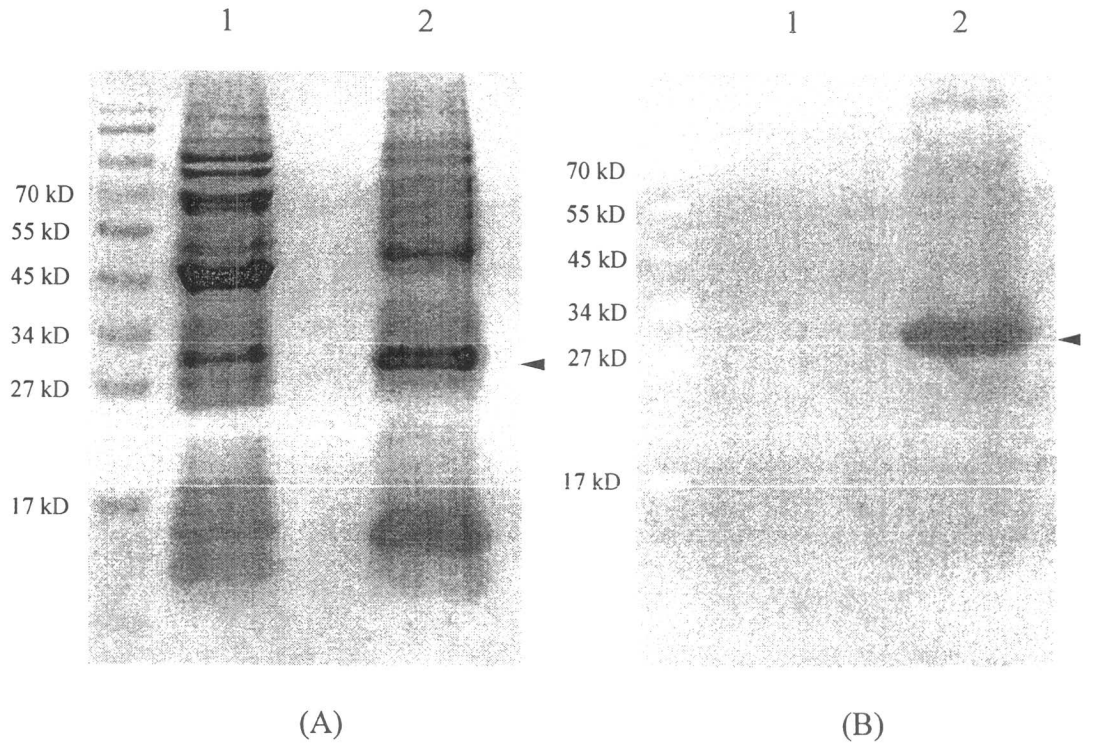
รูปที่ 16 การวิเคราะห์หาลำดับเบสโดย Automated DNA Sequencing จาก Recombinant clone pEZZ18-hBMP-2 ที่บรรจุยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์

4. การศึกษาการแสดงออกและแยกบริสุทธิ์ของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์โดยใช้เวคเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 / *E. coli* XL1 Blue

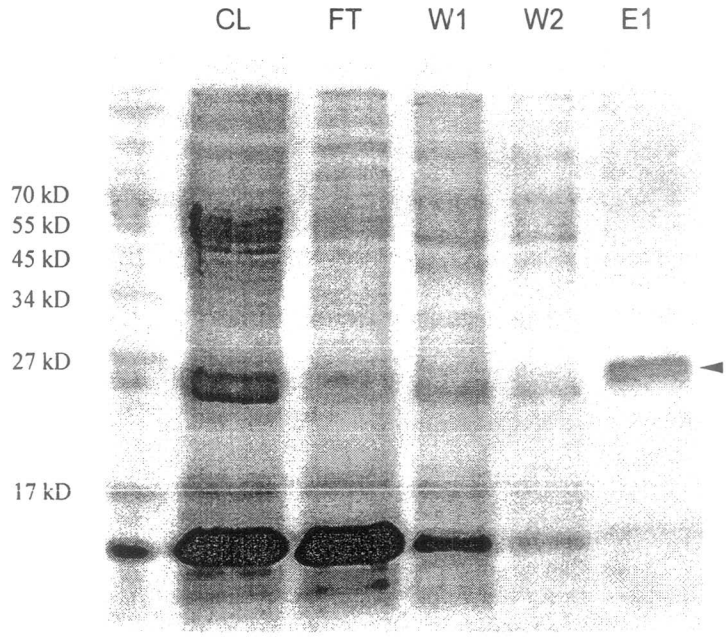
เวคเตอร์ pEZZ18 ที่บรรจุยีน BMP-2 ของมนุษย์ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* XL1 Blue ถูกนำมาศึกษาการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C โดยเขย่าที่ 180 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยนำเซลล์ปริมาณ 1/100 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C และทำการเขย่าจนกระทั่งมีการเจริญเติบโตโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.5 จากนั้นทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM และเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C และทำการเขย่าเป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเก็บส่วนของ media และ cell pellet การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในส่วน cytosol โดยการแตกเซลล์ในส่วนของ cell pellet โดยอาศัยเอนไซม์ Lysozyme, DNAse และวิธีการ freez-thaw หลังจากนั้นทำการปั่นที่ 3,000xg เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บส่วน supernatant

การติดตามการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ทำโดยนำส่วนของ media มาทดสอบการ binding กับ Ni-NTA resin และนำส่วนของ crude cytosol part (supernatant) มาวิเคราะห์โปรตีนโดยเทคนิคการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) และทำการติดตามการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 โดยใช้เทคนิค Western blot analysis ซึ่งทำการย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่แผ่น nitrocellulose membrane โดยอาศัยกระแสไฟฟ้า จากนั้นทำการติดตามรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน mBMP-2 โดยใช้โมโนโคนอลแอนติบอดี้ต่อ BMP-2 ของมนุษย์ (Mouse-anti human mBMP-2) และ Goat-anti mouse IgG polyvalent conjugated HRP เป็น secondary antibody และติดตามสัญญาณโดยการเปล่งแสงด้วยเทคนิค Enhanced chemiluminescence detection (ECL) ผลการติดตามการแสดงออกและการตรวจสอบรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ western blot analysis ดังแสดงในรูปที่ 17 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ พบว่า มีการแสดงออกของยีน BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้เวคเตอร์ pEZZ18 โดยอาศัยแบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ *E. coli* XL1 Blue ภายใต้การควบคุมของ *lac*UV5 และ protein A promoters รีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน mBMP-2 ที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 28 kDa ในส่วนของ cytosol part จึงสามารถนำไปนำไปใช้ในการแยกบริสุทธิ์รีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน mBMP-2 ของมนุษย์ได้

การศึกษาการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ส่วน supernatant หลังการแตกเซลล์มาแยกบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA affinity column (รูปที่ 18) พบว่า รีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน mBMP-2 ของมนุษย์สามารถถูกแยกบริสุทธิ์โดยจับกับ Ni-NTA affinity resin ได้และความบริสุทธิ์สูงโดยสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออกได้จำนวนมาก



รูปที่ 17 (A) แสดงผลการ SDS-PAGE analysis และย้อมด้วยสี coommassie blue ของ hBMP-2 ที่แสดงออกในเซลล์แบคทีเรียชนิด *E. coli.* สายพันธุ์ XL1-blue ในรูปแบบของ fusion protein ที่ละลายอยู่ภายในส่วนของ supernatant โดย lane 1 คือ negative control (pEZZ18 ใน XL1-blue) และ lane 2 คือ pEZZ18-hBMP-2 ใน XL1-blue (B) แสดงผลการทดสอบด้วย western-blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ human BMP-2 ให้ผล positive ที่โปรตีนขนาดประมาณ 28 kD



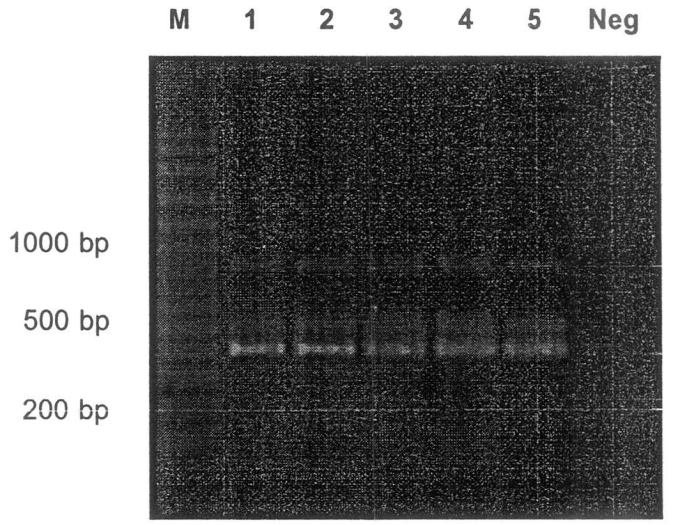
รูปที่ 18 แสดงผลการแยกบริสุทธิ์ BMP-2 ของมนุษย์ด้วย Ni-NTA affinity chromatograpy โดยนำส่วน supernatant หลังการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แตกเซลล์ด้วย Freeze-thaw method โดยที่ CL คือ cell lysate, FT คือ ส่วนที่ไม่จับกับ column, W1 และ W2 คือส่วนที่ได้จากการล้างด้วย binding buffer ที่มี Imidazole ที่ความเข้มข้น 30 mM ปริมาณครั้งละ 10 column volume และ E1 คือ ส่วนที่ได้จากการล้างเอาโปรตีน hBMP-2 ออกด้วย binding buffer ที่มี Imidazole ที่ความเข้มข้น 250 mM โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้มีขนาดประมาณ 28 kDa

5. การถ่ายโอนยีนและการศึกษาการแสดงออกสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์โดยใช้เวคเตอร์พาหะชนิด pET32a ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *E.coli* Origami B

ยีน mature bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ที่บรรจุในเวคเตอร์พาหะ pJET1.2 ถูกย้ายเข้าสู่เวคเตอร์ pET32a เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทำการตัดยีน BMP-2 ของมนุษย์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Nco* I และ *Bam*H I จากนั้นนำชิ้นยีนมาผ่านขั้นตอนการทำให้มีความบริสุทธิ์และทำการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pET32a ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I และ *Bam*H I เช่นเดียวกัน การเชื่อมต่อชิ้นยีนอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ligase และทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ Origami B แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มเพื่อนำมาตรวจสอบยีนที่สนใจโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I และ *Bam*H I

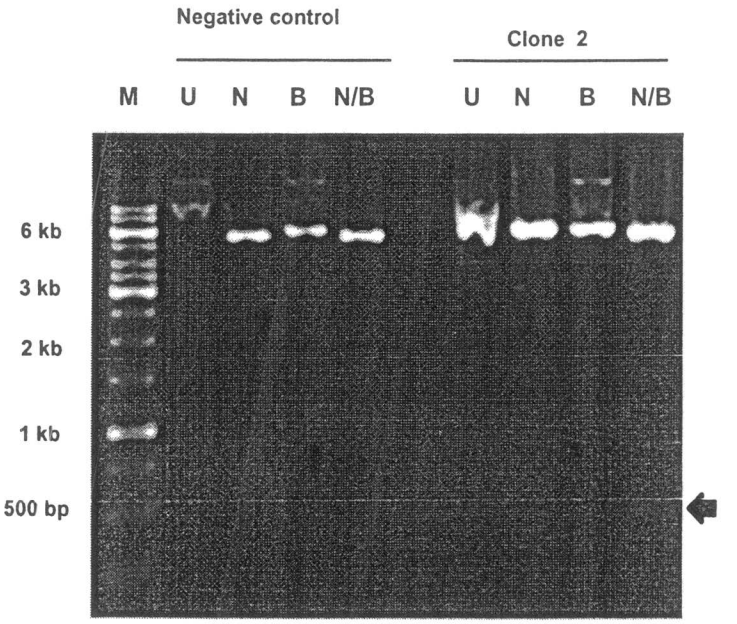
ผลการตรวจสอบโคลน pET32a ที่บรรจุยีน BMP-2 โดยเทคนิค PCR (รูปที่ 19) พบว่าคณะผู้วิจัยสามารถคัดเลือกโคลน pET32a ที่บรรจุท่อนดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดของยีน BMP-2 จากนั้นนำโคลนที่สนใจนี้มาทำการวิเคราะห์โดยอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I และ *Bam*H I ดังแสดงในรูปที่ 20 ผลการการทดลองพบว่า โคลนที่ถูกเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน BMP-2 ของมนุษย์ และนำโคลนที่ได้ไปพิสูจน์ลำดับของเบสโดยเทคนิคการหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ผลของลำดับเบสแสดงในรูปที่ 21 และพบว่าชิ้นยีนที่บรรจุในเวคเตอร์พาหะ pET32a ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BMP-2 ของมนุษย์ และนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกเพื่อผลิตรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ต่อไป

ผลการศึกษาการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ ในเวคเตอร์พาหะชนิด pET32a ในแบคทีเรีย Origami B ที่อุณหภูมิ 37^{o}C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 0.5mM IPTG โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ดังรูปที่ 22 พบว่า มีการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ที่ขนาด 28 kDa ในส่วนโปรตีนรวมหลังการแตกเซลล์ (total crude lysate) ภายใต้การเหนี่ยวนำที่ 37^{o}C ด้วย 0.5mM IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และผลการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 เมื่อเหนี่ยวนำเป็นระยะเวลา 1-4 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 22C จากผลการทดลองพบว่ามีการแสดงออกของ rhBMP-2 ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเหนี่ยวนำที่เพิ่มขึ้น จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการแสดงออกภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิเคราะห์การแสดงออกแยกในส่วน Cytosol และ Pellet เมื่อเหนี่ยวนำที่ 37^{o}C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นของ IPTG ที่ 0.1-0.4 mM (รูปที่ 23) ผลการทดลองพบว่า มีการแสดงออกของ rhBMP-2 ในส่วน cytosol (ในรูป soluble protein) เมื่อเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้นของ IPTG ต่ำๆในช่วงประมาณ 0.1mM ในขณะที่พบการแสดงออกในส่วน pellet (ในรูป inclusion body) ที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเหนี่ยวนำด้วยความเข้มข้นของ IPTG ปริมาณที่สูงขึ้น (0.2-0.4 mM)



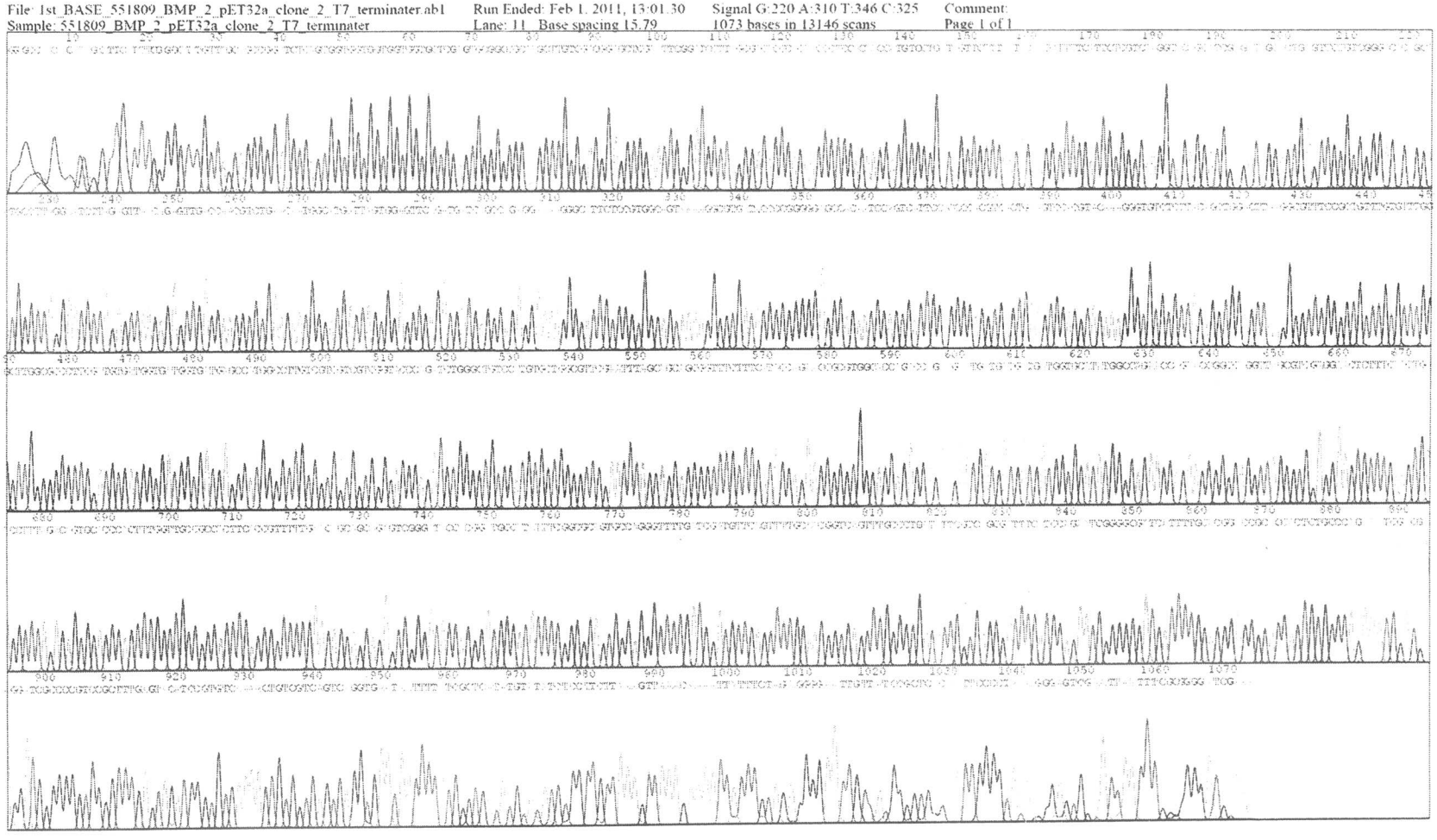
รูปที่ 19 การวิเคราะห์ Recombinant clones ที่สนใจด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก recombinant clones ของ pET32a-BMP-2 ที่ถูกเลือกแบบสุ่ม

Lane	M	=	100 bp DNA Ladder
	1	=	Clone no. 1
	2	=	Clone no. 2
	3	=	Clone no. 3
	4	=	Clone no. 4
	5	=	Clone no. 5
	Neg	=	pET32a transformed clone (as negative control)

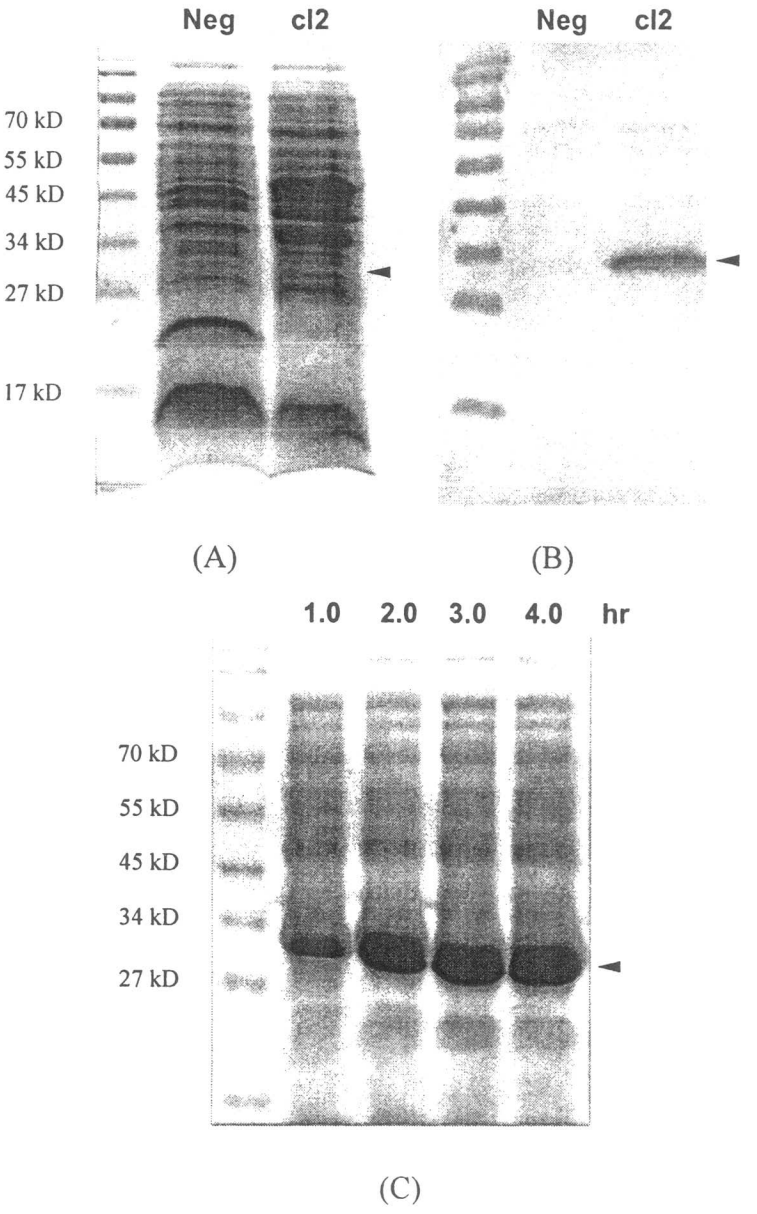


รูปที่ 20 การวิเคราะห์ Recombinant clones ที่สนใจโดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ เวคเตอร์พาหะชนิด pET32a ซึ่งบรรจุยีน BMP-2 ของมนุษย์หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ถูกนำมาวิเคราะห์บน 0.8%Agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide

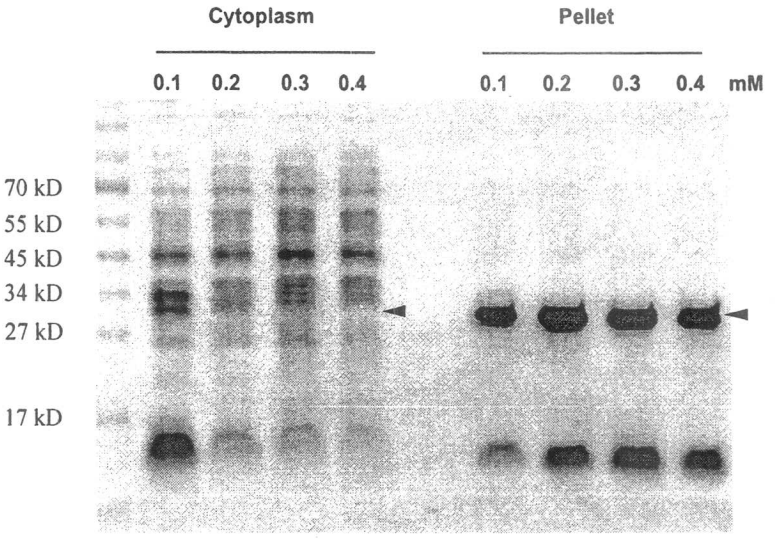
Lane M	=	1 kb DNA Ladder
Negative control	=	pET32a plasmid vector with no insert
U	=	undigested plasmid DNA
N	=	pET32a digested with *Nco* I
B	=	pET32a digested with *Bam*H I
N/B	=	pET32a double-digested with *Nco* I and *Bam*H I



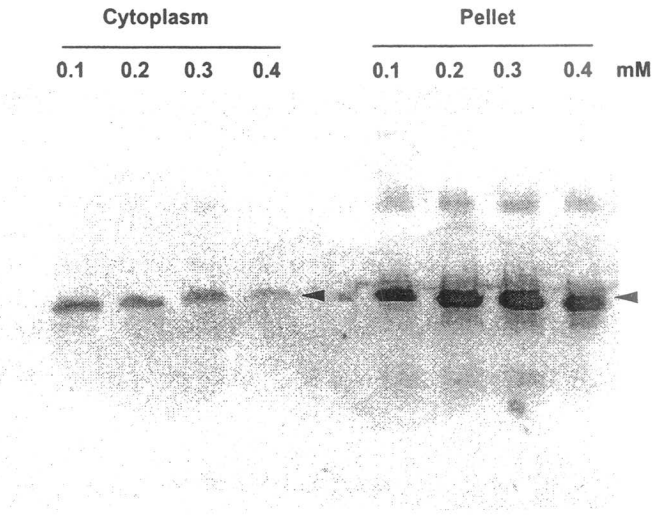
รูปที่ 21 การวิเคราะห์หาลำดับเบสโดย Automated DNA Sequencing จาก Recombinant clone pET32a-BMP-2 ที่บรรจุยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์



รูปที่ 22 แสดงผลการทดสอบการแสดงออกของโคลน pET32a-BMP-2/*E.coli* OrigamiB ที่อุณหภูมิ 37°C หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 mM โดย (A) ผลการวิเคราะห์โปรตีนรวมหลังการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และแตกเซลล์ด้วย freezed-thaw method วิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE, (B) แสดง Western blot analysis ด้วย monoclonal antibody ต่อ BMP-2 ของมนุษย์ และภาพ (C) แสดงระดับการแสดงออกของ rhBMP-2 ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังการแตกเซลล์ด้วย B-PERII method



(A)

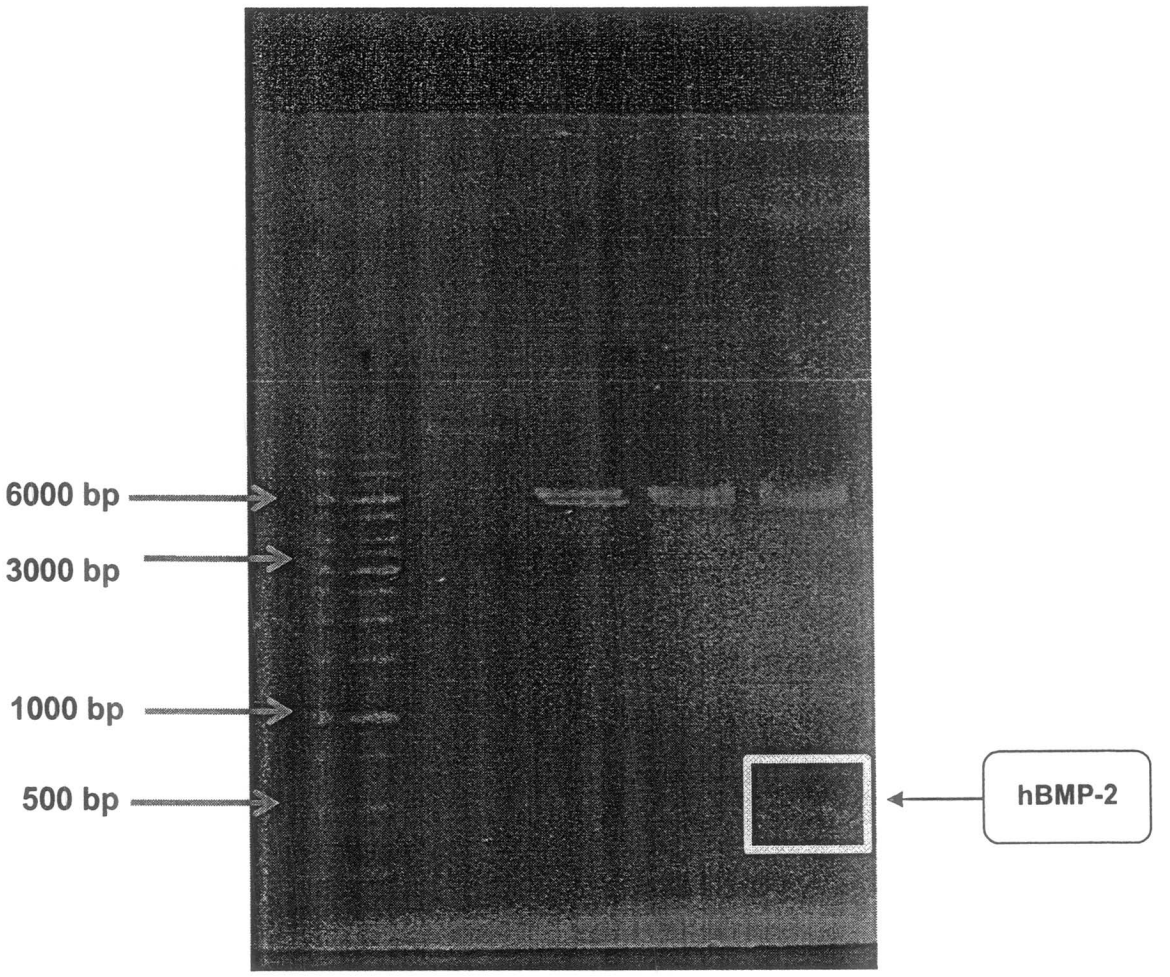


(B)

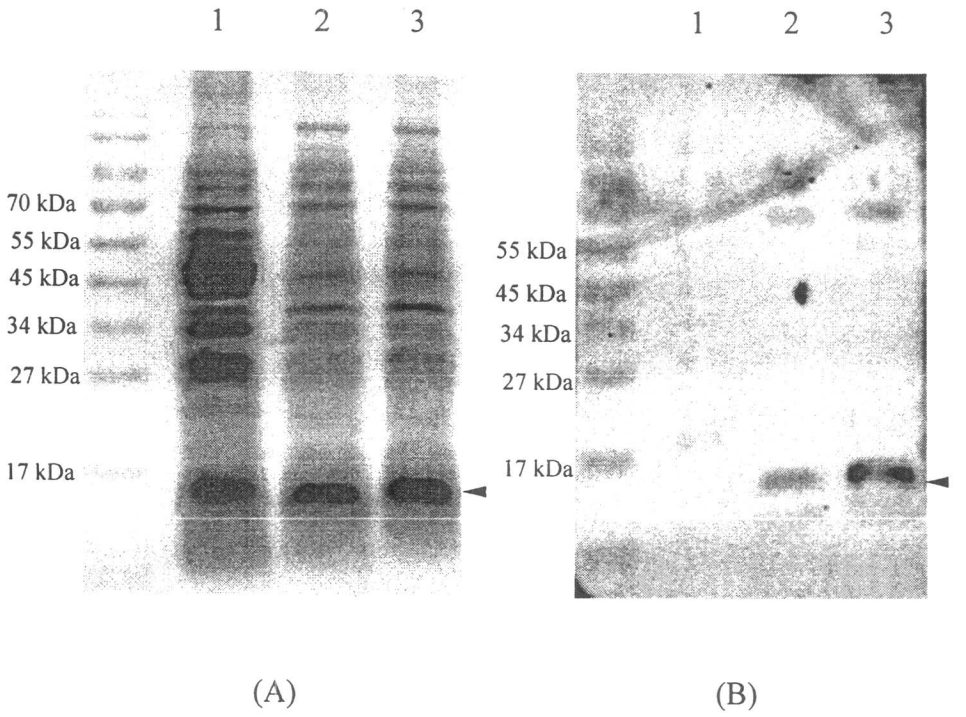
รูปที่ 23 แสดงผลการทดสอบการแสดงออกของโคลน pET32a-BMP-2/*E.coli* OrigamiB ที่ความเข้มข้นของ IPTG ที่แตกต่างกัน เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงที่ 37°C และเขย่า 180 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบการแสดงของโปรตีนในส่วน cytoplasm และ pellet ภาพ (A) แสดง SDS-PAGE analysis และ (B) แสดง Western blot analysis

6. การถ่ายโอนยีนและการศึกษาการแสดงออกสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์โดยใช้เวคเตอร์พาหะชนิด pET15b ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3)

ยีนสำหรับ mature bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ที่บรรจุในเวคเตอร์พาหะ pJET1.2 ถูกถ่ายโอนเข้าสู่เวคเตอร์ pET15b เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน BMP-2 โดยทำการตัดยีน BMP-2 ของมนุษย์จากเวคเตอร์ pJET1.2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Nco* I และ *Bam*H I จากนั้นนำชิ้นยีนมาผ่านขั้นตอนการทำให้มีความบริสุทธิ์และทำการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pET15b ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I และ *Bam*H I เช่นเดียวกัน การเชื่อมต่อชิ้นยีนอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ligase และทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* BL21(DE3) แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มเพื่อนำมาตรวจสอบยีนที่สนใจโดยใช้เทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I และ *Bam*H I (รูปที่ 24) จากผลการทดลองพบว่า โคลน pET15b-BMP-2 ที่ถูกคัดเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน BMP-2 ของมนุษย์ ผลการศึกษาการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้เวคเตอร์พาหะชนิด pET15b ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* BL21(DE3) ที่อุณหภูมิ 37^{o}C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 0.5mM IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ดังรูปที่ 25 พบว่า มีการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ในส่วนโปรตีนรวมหลังการแตกเซลล์ (total crude lysate) ภายใต้การเหนี่ยวนำที่ 37^{o}C ด้วย 0.5mM IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยโปรตีนมีขนาด 14 kDa



รูปที่ 24 แสดงผลการวิเคราะห์ยีน hBMP-2 ใน pET15b expression vector / *E.coli* BL21(DE3) โดยวิธีเอนไซม์ตัดจำเพาะให้ M คือ marker ช่องที่ 1 คือ undigest ช่องที่ 2 คือ digest with *Nco* I ช่องที่ 3 digest with *Bam*H I ช่องที่ 4 คือ double with *Nco* I and *Bam*H I จากผลการตรวจสอบยีนด้วยวิธีเอนไซม์ตัดจำเพาะใน pET15b expression vector พบว่าได้ชิ้นยีนขนาด 406bp ซึ่งคาดว่าจะเป็นยีน BMP-2 ของมนุษย์

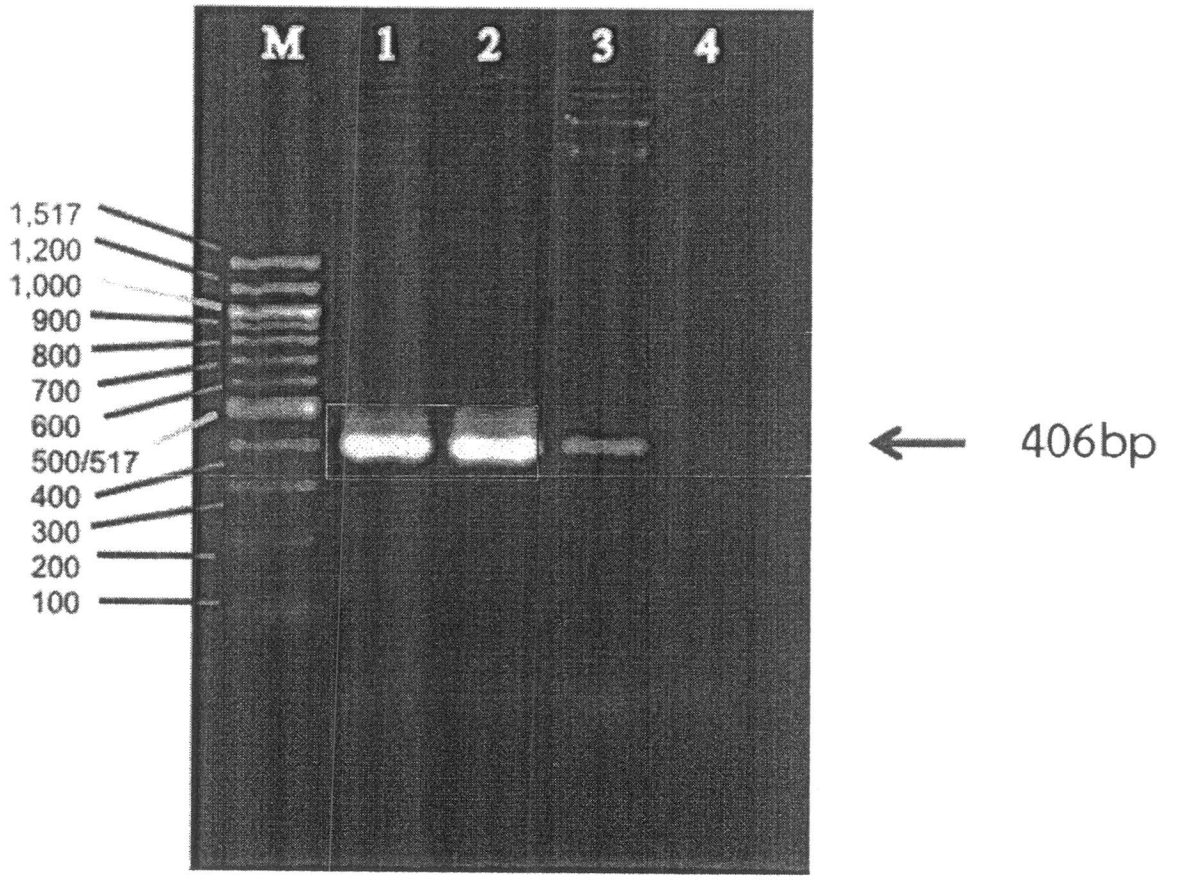


(A) (B)

รูปที่ 25 แสดงผลการแสดงออกของโคลน pET15b-BMP-2 / *E.coli* BL21(DE3) (A) แสดงผลการ SDS-PAGE analysis และย้อมด้วยสี coomassie blue ของ hBMP-2 ที่แสดงออกในเซลล์แบคทีเรียชนิด *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ในรูปแบบของ fusion protein ที่ละลายอยู่ภายในส่วนของ supernatant โดย lane 1 คือ negative control (pET15b ใน *E.coli* XL1-blue) , lane 2 คือ pET15b-BMP-2 ใน *E.coli* BL21(DE3) ที่ผ่านการทำลาย disulfide bond ด้วย β-mercaptoethanol และ lane 3 คือ pET15b-BMP-2 ใน *E.coli* BL21(DE3) (B) แสดงผลการทดสอบด้วย Western blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ human BMP-2 ให้ผล positive ที่โปรตีนขนาดประมาณ 14 kDa

7. การศึกษาการแสดงออกสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ในเวคเตอร์พาหะชนิด pET15b ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® T7 Express *E. coli*

เนื่องจากผู้วิจัยต้องการศึกษาการแสดงออกของ BMP-2 ของมนุษย์ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ส่งเสริมการแสดงออกของยีนในรูปแบบ soluble protein รวมทั้งส่งเสริมการสร้างพันธะ disulfide bond ภายในเซลล์แบคทีเรียภายใต้การควบคุมโดย T7 promoter ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® T7 Express *E. coli* ถูกใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของโปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ที่บรรจุในเวคเตอร์พาหะ pET15b โดยเริ่มจากนำพลาสมิดเวคเตอร์ pET15b-BMP-2 ที่บริสุทธิ์ มาทำการ transformation เข้าสู่ Competent cells ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® T7 Express *E. coli* แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มและนำมาตรวจสอบยีนที่บรรจุอยู่โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ดังแสดงในรูปที่ 26 จากผลการวิเคราะห์พบว่า โคลน pET15b-BMP-2 ที่ถูกคัดเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน BMP-2 ของมนุษย์ การศึกษาการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้เวคเตอร์พาหะชนิด pET15b ในแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® T7 Express *E. coli* ศึกษาโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์โปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังรูปที่ 27 และการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ดังรูปที่ 28 พบว่า มีการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ในส่วน Pellet (ในรูป inclusion body) ภายใต้การเหนี่ยวนำที่ 30°C และ 37°C โดยการเหนี่ยวนำที่ 30°C จะเริ่มพบการแสดงออกของ BMP-2 ขนาด 14 kDa ที่เวลา 2 ชั่วโมงและมีการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง



รูปที่ 26 ผลการวิเคราะห์ pET15b-BMP-2/ Shuffle® T7 Express *E. coli* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

M = 100bp DNA Ladder

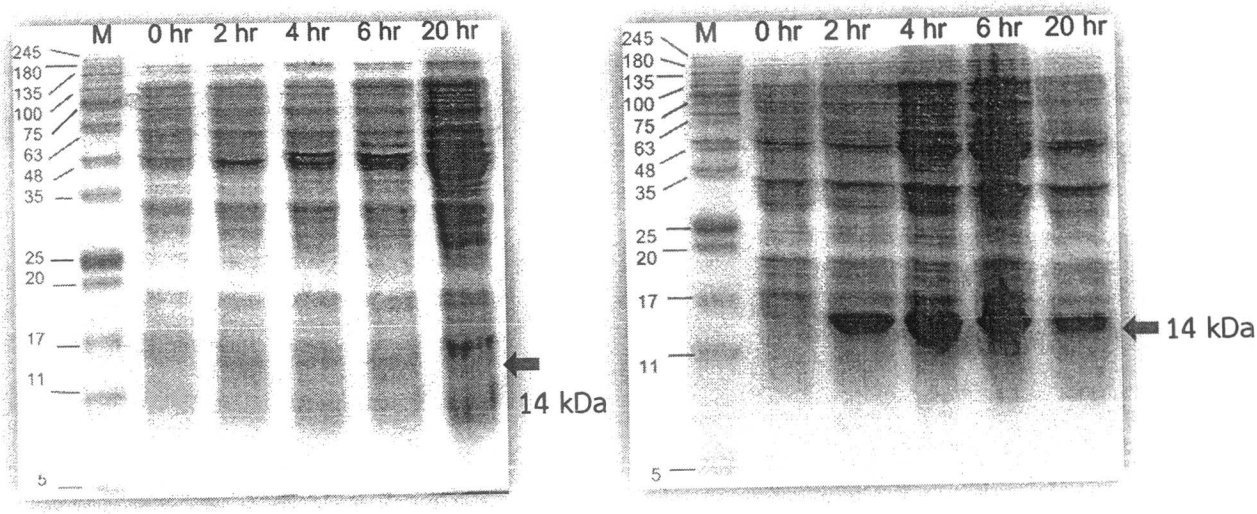
1 = pET15b-BMP-2 / SHuffle®T7 Express *E.coli* clone1

2 = pET15b-BMP-2 / SHuffle®T7 Express *E.coli* clone2

3 =vector pET15b

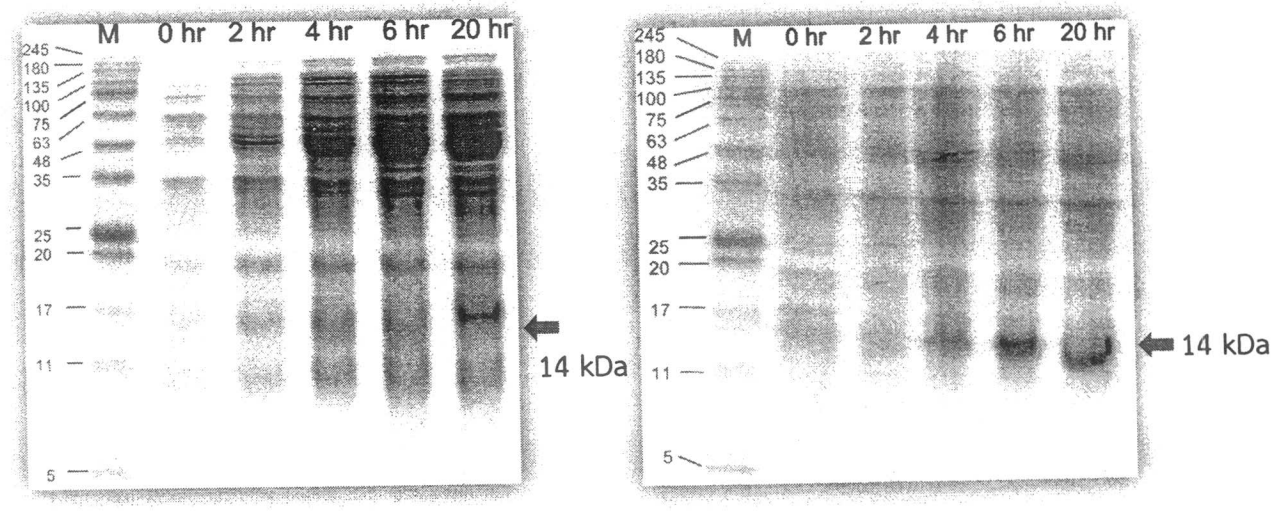
4 =H_2O

(A) การแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 30°C



Supernatant **Pellet**

(B) การแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 37°C

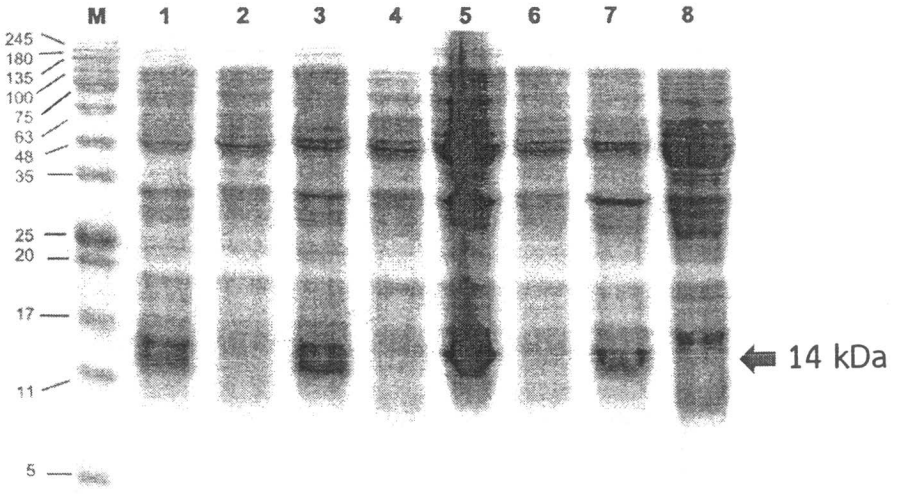


รูปที่ 27 การแสดงออกของโปรตีนโดยเวคเตอร์พาหะ pET15b-BMP-2 ที่ถ่ายโอนเข้าสู่ SHuffle® T7 express *E.coli* ซึ่งวิเคราะห์โปรตีนบน 15%SDS-PAGE

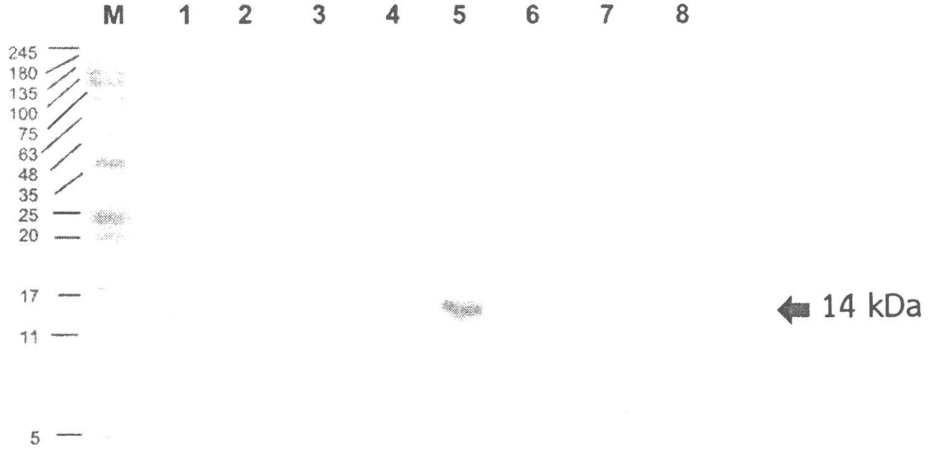
(A) การแสดงออกของโปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ที่อุณหภูมิ 30°C ในระยะเวลาต่างๆ

(B) การแสดงออกของโปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ที่อุณหภูมิ 37°C ในระยะเวลาต่างๆ

(A) SDS-PAGE



(B) Western blot

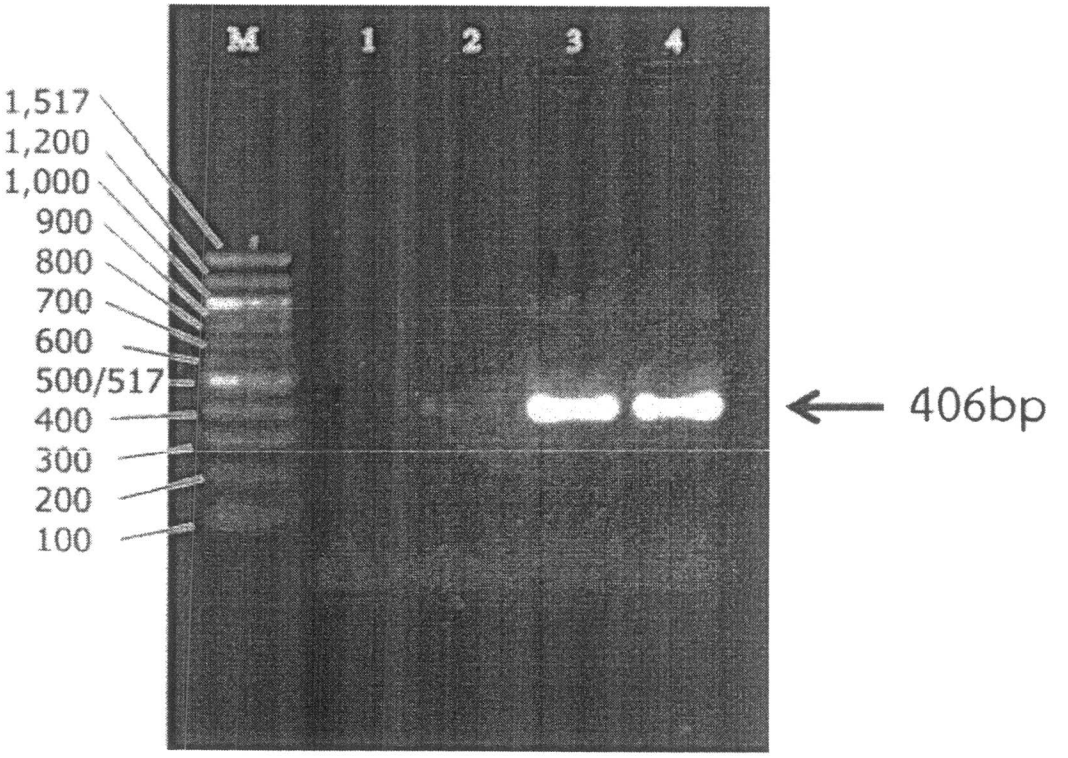


รูปที่ 28 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยเวคเตอร์พาหะ pET15b-BMP-2 ที่ถ่ายโอนเข้าสู่ SHuffle® T7 express *E.coli* ที่อุณหภูมิ 30°C ด้วย 1mM IPTG (A) การวิเคราะห์โปรตีนบน 15%SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (B) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ monoclonal antibody to human BMP-2 (1:2,000) จากนั้นใช้ Goat anti-mouse-HRP (1:2,000) และติดตามปฏิกิริยาโดยการเกิดสีของ DAB = 3′- diaminobenzidine tetra hydrochloride และ hydrogen peroxide

M = Protein marker
1 = pellet 2 ชั่วโมง
2 = supernatant 2 ชั่วโมง
3 = pellet 4 ชั่วโมง
4 = supernatant 4 ชั่วโมง
5 = pellet 6 ชั่วโมง
6 = supernatant 6 ชั่วโมง
7 = pellet 20 ชั่วโมง
8 = supernatant 20 ชั่วโมง

8. การศึกษาการแสดงออกสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ในเวคเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® Express *E. coli*

เนื่องจากผู้วิจัยต้องการศึกษาการแสดงออกของ BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้ lac/UV5 และ protein A promoter ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ส่งเสริมการแสดงออกของยีนในรูปแบบ soluble protein รวมทั้งส่งเสริมการสร้างพันธะ disulfide bond ภายในเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® Express *E. coli* ถูกใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของโปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ที่บรรจุในเวคเตอร์พาหะ pEZZ18 โดยเริ่มจากนำพลาสมิดเวคเตอร์ pEZZ18-BMP-2 ที่บริสุทธิ์ มาทำการ transformation เข้าสู่ Competent cells ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® Express *E. coli* แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มและนำมาตรวจสอบยีนที่บรรจุอยู่โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ดังแสดงในรูปที่ 29 และผลการวิเคราะห์โคลนโดยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Eco*R I และ *Hin*d III (รูปที่ 30) จากผลการวิเคราะห์พบว่า โคลน pEZZ18-BMP-2 / Shuffle® Express *E. coli* ที่ถูกคัดเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน BMP-2 ของมนุษย์ การศึกษาการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้เวคเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 ในแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® Express *E. coli* ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์โปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังรูปที่ 31 และการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ดังรูปที่ 32 พบว่า มีการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ทั้งในส่วนของ Supernatant (ในรูป soluble protein) และในส่วนของ Pellet (ในรูป inclusion body) ภายใต้การเหนี่ยวนำที่ 30°C และ 37°C โดยการเหนี่ยวนำที่ 30°C จะเริ่มพบการแสดงออกของ BMP-2 ขนาด 28 kDa ที่เวลา 2 ชั่วโมงทั้งส่วนของ Supernatant และในส่วนของ Pellet โดยระดับการแสดงออกของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีน พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการแสดงออกจะมีการผลิตรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนออกมาในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น และพบมีการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 20 ชั่วโมง



รูปที่ 29 ผลการวิเคราะห์ pEZZ18-BMP-2 / Shuffle® Express *E. coli* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

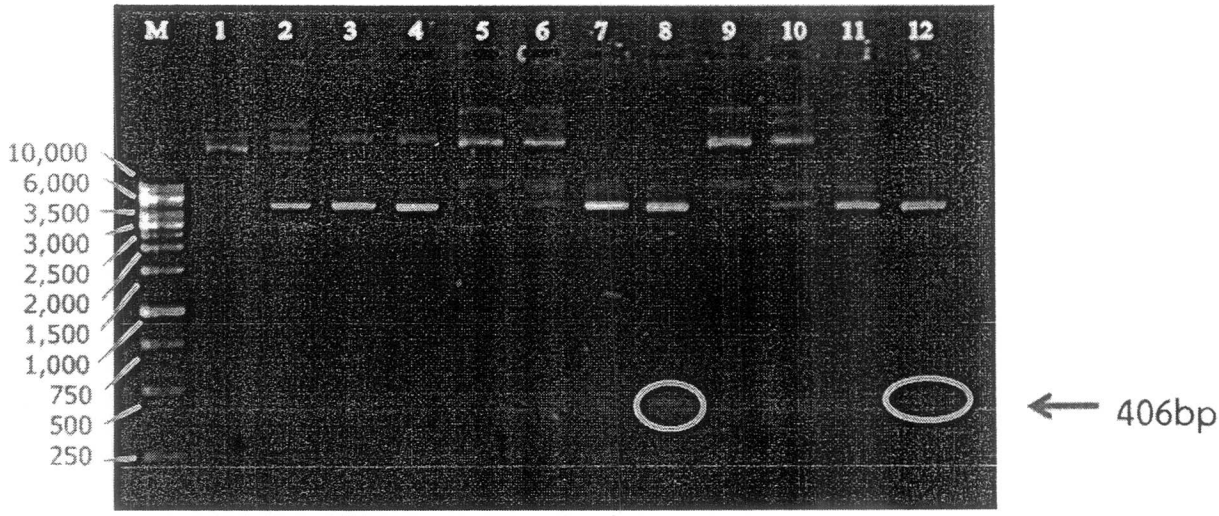
M = Marker 100bp DNA Ladder

1 = ผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ H_2O เป็น Template

2 = ผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ Vector pEZZ18 เป็น Template

3 = ผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ pEZZ18-BMP-2 clone 1 เป็นTemplate

4 = ผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ pEZZ18-BMP-2 clone 2 เป็น Template



รูปที่ 30 แสดงผลจากการวิเคราะห์ pEZZ18-BMP-2 / Shuffle® Express *E. coli* ด้วยเอนไซม์ *Eco*R I และ *Hin*d III

1 = pEZZ18 uncut

2 = pEZZ18+ *Eco*R I

3 = pEZZ18+ *Hin*d III

4 = pEZZ18 + *E +H*

5 = pEZZ18-BMP-2 (clone1) uncut

6 = pEZZ18-BMP-2 (clone1) + *Eco*R I

7 = pEZZ18-BMP-2 (clone1) + *Hin*d III

8 = pEZZ18-BMP-2 (clone1) + *E+H*

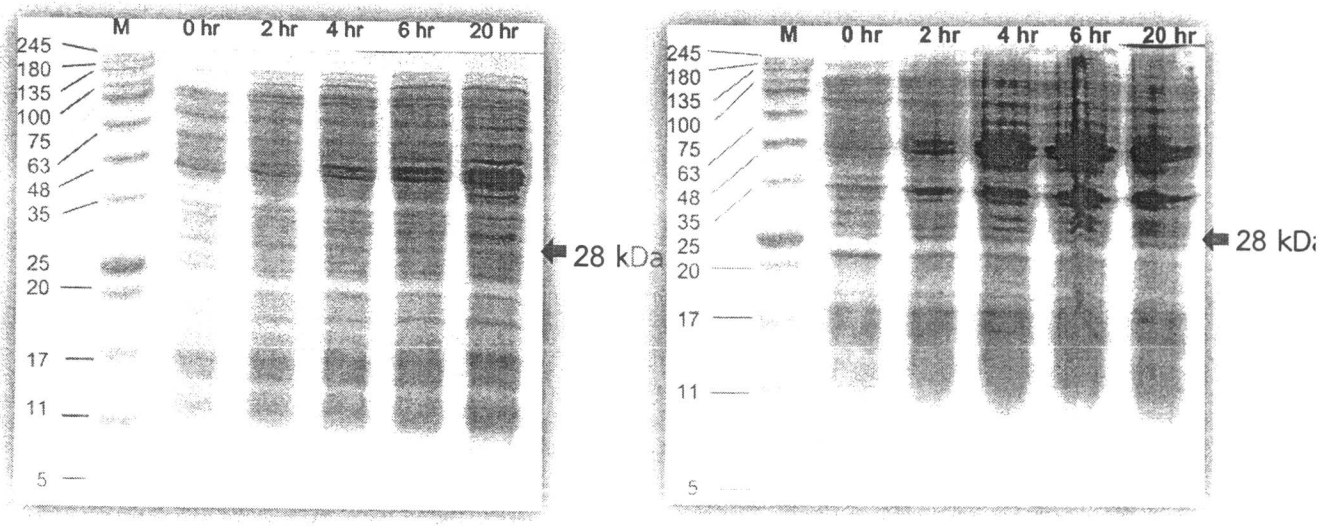
9 = pEZZ18-BMP-2 (clone2) uncut

10 = pEZZ18-BMP-2 (clone2) + *Eco*R I

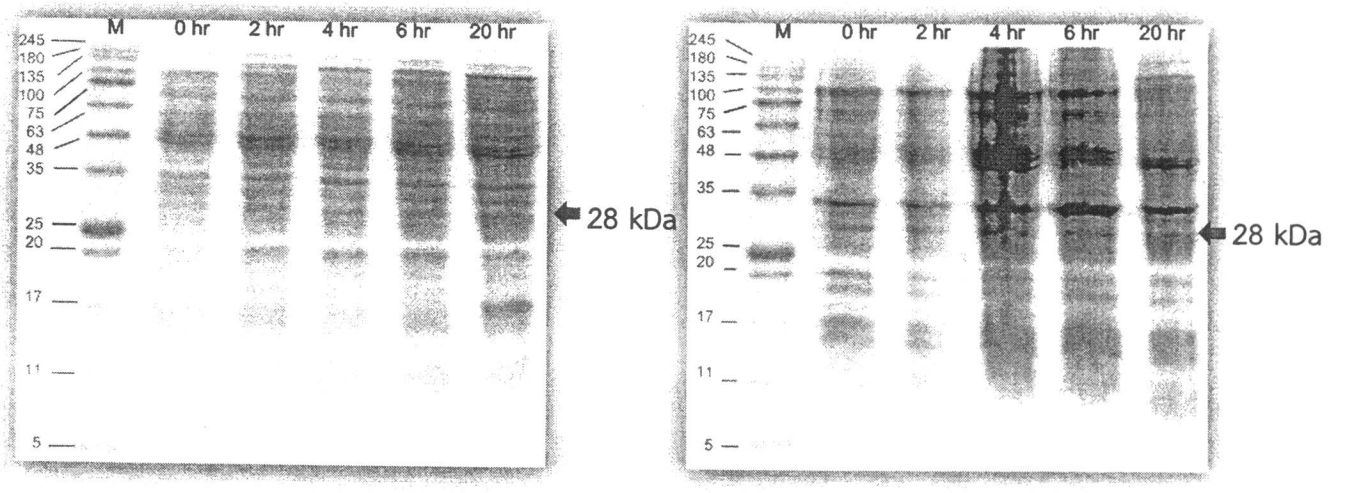
11 = pEZZ18-BMP-2 (clone2) + *Hin*d III

12 = pEZZ18-BMP-2 (clone2) + *E+H*

(A) การแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 30°C



(B) การแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 37°C

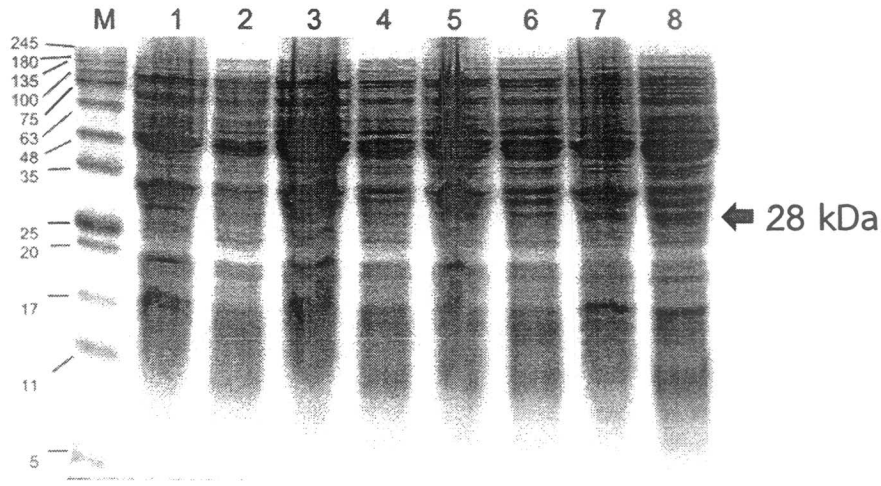


รูปที่ 31 การแสดงออกของโปรตีนโดยเวคเตอร์พาหะ pEZZ18-BMP-2 ที่ถ่ายโอนเข้าสู่ SHuffle® Express *E.coli* ซึ่งวิเคราะห์โปรตีนบน 15%SDS-PAGE

(A) การแสดงออกของโปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ที่อุณหภูมิ 30°C ในระยะเวลาต่างๆ

(B) การแสดงออกของโปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ที่อุณหภูมิ 37°C ในระยะเวลาต่างๆ

(A) SDS-PAGE



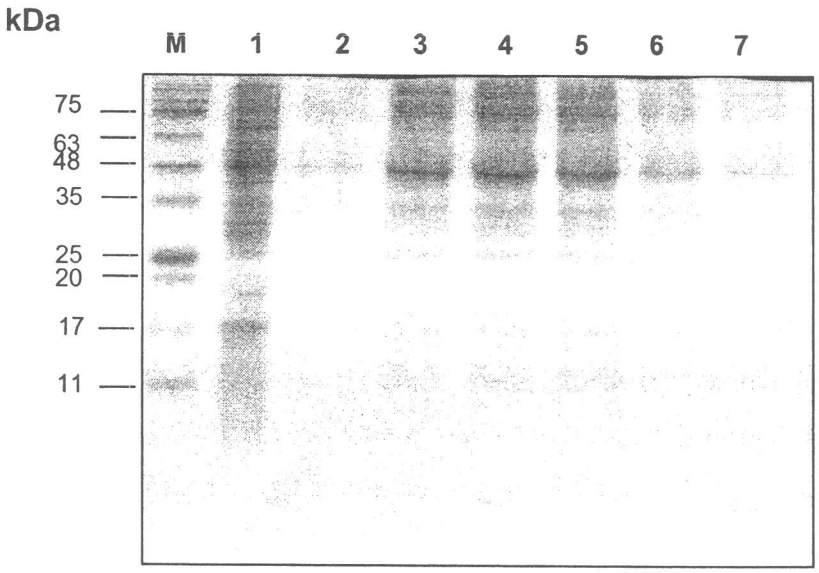
(B) Western blot

รูปที่ 32 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยเวคเตอร์พาหะ pEZZ18-BMP-2 ที่ถ่ายโอนเข้าสู่ SHuffle® express *E.coli* ที่อุณหภูมิ 30°C ด้วย 1mM IPTG (A) การวิเคราะห์โปรตีนบน 15%SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (B) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ monoclonal antibody to human BMP-2 (1:2,000) จากนั้นใช้ Goat anti-mouse-HRP (1:2,000) และติดตามปฏิกิริยาโดยการเกิดสีของ DAB (3′- diaminobenzidine tetrahydrochloride) และ hydrogen peroxide

M = Protein marker
1 = pellet 2 ชั่วโมง
2 = supernatant ชั่วโมง
3 = pellet 4 ชั่วโมง
4 = supernatant 4 ชั่วโมง
5 = pellet 6 ชั่วโมง
6 = supernatant 6 ชั่วโมง
7 = pellet 20 ชั่วโมง
8 = supernatant 20 ชั่วโมง

9. การแยกบริสุทธิ์สำหรับริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ ด้วยเทคนิค Nickle affinity chromatograpy

เวคเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 ซึ่งบรรจุยีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® Express *E. coli* ถูกทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 30°C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG ส่วน crude supernatant จากการแตกเซลล์ถูกทดสอบการจับกับ Ni-NTA resin และทำการชะล้างด้วย imidazole ความเข้มข้นสูง ผลการวิเคราะห์โปรตีนบน SDS-PAGE พบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์(รูปที่ 33) จึงสรุปได้ว่า เทคนิคการแยกริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ออกจากโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ สามารถอาศัยการจับกันระหว่าง histidine residues ที่ติดอยู่กับโปรตีน hBMP-2 กับ Ni-NTA affinity resin ได้



รูปที่ 33 การย้อมสี Comassie blue staining ของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatograpy ภายใต้ 15%non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 150 volts เป็นเวลา 60 นาที

M = Protein standard marker
1 = Crude supernatant
2 = Eluted fraction 1
3 = Eluted fraction 2
4 = Eluted fraction 3
5 = Eluted fraction 4
6 = Eluted fraction 5
7 = Eluted fraction 6

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เป็นโปรตีนที่สำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงการเจริญของเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์กระดูกของมนุษย์ รวมทั้งการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) เป็นเซลล์ต้นตัวอ่อนของกระดูกอ่อนและเซลล์กระดูก ดังนั้นโปรตีนชนิดนี้จึงมีประโยชน์ในด้านการรักษาโรคของกระดูกอ่อนและโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกเป็นอย่างยิ่ง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์เพื่อผลิตรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนชนิด BMP-2 ของมนุษย์ในระบบของเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย โดยได้ทำการคัดแยกยีนที่กำหนดการสร้าง mature human BMP-2 ซึ่งสกัดได้จากเซลล์กระดูกระยะตัวอ่อน (Human fetal osteoblast cell line) เซลล์ถูกเลี้ยงให้ได้ปริมาณที่เพียงพอและนำมาสกัด Total RNA จากนั้นทำการเตรียมเป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และ oligo dT_{18} primer การเพิ่มปริมาณยีนของ mature human BMP-2 ทำโดยอาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ดีเอนเอนี้ถูกทำให้บริสุทธิ์และทำการเพิ่มปริมาณอีกครั้งหนึ่ง เพื่อเพิ่มลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I และ *Nco* I ต่อด้วยลำดับเบสสำหรับ 6xHistidine tag, Factor Xa ทางปลาย 5′ และมีการเพิ่มบริเวณของเบสที่หยุดการสร้างสายโปรตีน (stop codon) และบริเวณสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Hin*d III ทางปลาย 3′ การออกแบบลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเพิ่มบริเวณของกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว เพื่อประโยชน์ในการนำชิ้นยีนเข้าสู่เวคเตอร์พาหะและนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อไป ผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์ pJET-1.2 และทำการตรวจสอบโดยอาศัยเทคนิค PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ โคลนในพลาสมิดเวคเตอร์ถูกทำการถ่ายโอนเข้าสู่ดีเอนเอพาหะสำหรับการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่างๆ ในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน และศึกษาการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนชนิด BMP-2 ของมนุษย์

ยีนที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์ (Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA) ได้ถูกค้นหาจากฐานข้อมูลสากล Genbank sequence database จาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) ผู้วิจัยได้เลือกบริเวณยีนซึ่งมีรายงานว่าเป็นลำดับเบสที่จำเป็นสำหรับการทำหน้าที่ของ Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์หรือเรียกว่า mature human bone morphogenetic protein-2 เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณยีนสำหรับ mature BMP-2 ให้มากขึ้น การวิเคราะห์จากฐานข้อมูลพบว่า ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 283 ถึง 396 (114 amino acids) จำเป็นสำหรับ mature BMP-2 ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1632 ถึง 1973 (342 คู่เบส) และลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ถูกนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนสำหรับ mature BMP-2 หลังจากการเพิ่มปริมาณยีนโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) พบว่ามีการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอนเอได้แถบเดียว โดยมีขนาดใกล้เคียงกับยีนสำหรับ mature BMP-2 (342 คู่เบส) ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นนี้มีความเป็นไปได้สูงว่า ดีเอ็นเอที่แยกได้เป็นยีนสำหรับ mature BMP-2 ของมนุษย์

ต่อมานำท่อนดีเอ็นเอนี้มาเพิ่มลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะและเพิ่มบริเวณของกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว โดยเทคนิค PCR อีกครั้งเพื่อประโยชน์ในการแยกบริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการของ Ni-NTA affinity chromatography และการถ่ายโอน (subcloning) เข้าสู่เวคเตอร์พาหะที่ต้องการ ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอนเอของชิ้นยีนโดยเทคนิค PCR นั้นได้ทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนการ Annealing เพื่อให้มีการจับกันอย่างจำเพาะมากขึ้นระหว่างไพรเมอร์กับดีเอนเอต้นแบบ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สามารถแยกและเพิ่มปริมาณยีน BMP-2 ของมนุษย์อย่างมีความจำเพาะได้ผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นดีเอนเอแถบเดียวที่มีขนาด 342 คู่เบส โดยองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ PCR ใช้ Annealing temperature อยู่ระหว่าง 48.4°C – 54.6°C และเมื่อทำ PCR อีกครั้งเพื่อเพิ่มตำแหน่งของเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ กรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัว และบริเวณกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด Factor Xa ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนของ Annealing step อยู่ระหว่าง 51.4°C – 58.8°C สามารถเพิ่มดีเอนเอได้แถบเดียวที่มีขนาด 406 คู่เบส ดังนั้นผู้วิจัยจึงประสบความสำเร็จในการแยกและเพิ่มปริมาณยีนที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์

หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยเทคนิค PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์พาหะ ในเบื้องต้นการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เวคเตอร์พาหะชนิด pJET1.2 โดยอาศัยหลักการของ Blunt-end ligation ซึ่งนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยตรงมาเข้าสู่ขบวนการทำให้เกิดปลายทู่ (blunt end) ทำการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์พาหะ และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย หลักการนี้มีข้อดีที่ลดขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอผ่านเจล และการที่ดีเอ็นเอจะไม่ได้รับผลกระทบจากแสงอัลตร้าไวโอเลต จึงลดโอกาสการเกิดความผิดปกติบนสายดีเอนเอ และวิธีนี้มีความสะดวกรวดเร็ว รีคอมบีแนนท์โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มและนำมาวิเคราะห์เบื้องต้นโดยการใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ พบว่า โคลนที่ถูกคัดเลือกสามารถเพิ่มจำนวนได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นแถบเดียว และมีขนาดใกล้เคียงกับยีนสำหรับ mature BMP-2 โคลนเหล่านี้ได้ถูกนำมาตรวจสอบเพิ่มเติมโดยอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดได้แก่ *Eco*R I และ *Bam*H I ผลการวิเคราะห์พบรีคอมบีแนนท์โคลนที่แสดงขนาดของท่อนดีเอ็นเอหลังจากการตัดมีขนาดประมาณ 406 คู่เบส ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้นี้มีขนาดใกล้เคียงกับยีนสำหรับ mature BMP-2 ที่ทำการเพิ่มลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ถูกเพิ่มในบริเวณ 5′ และ 3′ ของชิ้นดีเอ็นเอ เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะพบในชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนเข้าสู่เวคเตอร์พาหะเท่านั้น จะไม่พบในเวคเตอร์ซึ่งไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์รีคอมบีแนนท์โคลนโดยอาศัยเทคนิค PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงมีความเป็นได้สูงว่า รีคอมบีแนนท์โคลนที่ถูกคัดเลือกมียีนที่สนใจ คณะผู้วิจัยได้ทำการหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในเวคเตอร์พาหะโดยอาศัยเทคนิคการตรวจหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ เพื่อเป็นการพิสูจน์ลำดับเบสที่ถูกต้อง ลำดับเบสที่ได้ถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลนานาชาติ ผลการวิเคราะห์พบว่า ชิ้นดีเอนเอมีลำดับเบสตรงกับยีน mature BMP-2 ของมนุษย์ 100% จึงสรุปได้ว่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ศึกษาคือ ดีเอ็นเอสำหรับยีน Bone morphogenetic protein-2 ของมนุษย์จริง

ในการศึกษาการผลิต BMP-2 ของมนุษย์ในเซลล์แบคทีเรีย ผู้วิจัยได้ทำการย้ายชิ้นยีนจากพลาสมิดเวคเตอร์ pJET1.2 เข้าสู่เวคเตอร์พาหะสำหรับการแสดงออกของโปรตีนจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ pEZZ18, pET15b และ pET32a ในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

การศึกษาการแสดงออกของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียทำได้โดยนำยีน BMP-2 ของมนุษย์ซึ่งบรรจุอยู่ในพลาสมิดเวคเตอร์ pJET1.2 ย้ายเข้าสู่เวคเตอร์พาหะสำหรับการแสดงออกของโปรตีนทั้งสามชนิดดังกล่าว ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดย lacUV5 promoter และ T7 promoter ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อหาชนิดของ expression vector และสายพันธุ์แบคทีเรียที่เหมาะสมกับการสร้างริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ได้ดี ยีน BMP-2 ของมนุษย์ซึ่งบรรจุอยู่ในพลาสมิดเวคเตอร์ pJET1.2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Bam*HI แล้วจึงทำการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์พาหะ pET15b และ pET32a ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Bam*HI เช่นเดียวกันด้วยหลักการ Sticky end ligation จากนั้นทำการ Transformation ด้วยวิธีการเปลี่ยนแปลงความร้อน (Heat shock method) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านชนิดที่เหมาะสม เวคเตอร์พาหะชนิด pET15b ซึ่งบรรจุยีน ยีน BMP-2 ของมนุษย์ถูกนำเข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ *E.coli* BL21(DE3) และ Shuffle® T7 express *E.coli* ตามลำดับ สำหรับเวคเตอร์พาหะชนิด pET32a ซึ่งบรรจุยีน BMP-2 ของมนุษย์ถูกนำเข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ Origami B รีคอมพ์บิแนนท์โคลนที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้ยาปฏิชีวนะถูกตรวจสอบว่ามียีน BMP-2 ของมนุษย์ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวด้วยวิธี PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Nco*I และ *Bam*HI ผลการวิเคราะห์พบชิ้นยีนที่เพิ่มจำนวนได้และชิ้นยีนที่ถูกตัดออกมามีขนาดคงเดิม (406 คู่เบส) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลสำเร็จในการย้ายชิ้นยีน BMP-2 ของมนุษย์เข้าสู่เวคเตอร์ pET15b ในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* BL21(DE3) และ Shuffle® T7 express *E.coli* รวมทั้งประสบความสำเร็จในการสำหรับย้ายชิ้นยีน BMP-2 ของมนุษย์เข้าสู่เวคเตอร์ pET32a ในเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ Origami B

การศึกษาแสดงออกของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ โดยอาศัยเวคเตอร์พาหะชนิด pET15b และ pET32a อาศัยหลักการของการเหนี่ยวนำ T7 promoter และใช้ lysogen ของ bacteriophage DE3 และ T7 RNA polymerase เมื่อมีการกระตุ้นด้วย isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ภายใต้อุณหภูมิที่ 30°C และ 37°C จากผลการทดลองสรุปได้ว่า มีการแสดงออกของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ขนาด 14 กิโลดาลตัน โดยใช้เวคเตอร์พาหะชนิด pET15b ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *E.coli* BL21(DE3) และ Shuffle® T7 express *E.coli* ในรูปแบบ inclusion bodies ในส่วน pellet เท่านั้น ไม่พบการแสดงออกในส่วน supernatant เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ในขณะที่ผลการแสดงออกของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ โดยอาศัยเวคเตอร์พาหะชนิด pET32a พบว่า มีการแสดงงออกของ hBMP-2 ขนาด 28 กิโลดาลตัน ในรูปแบบทั้ง soluble protein ในส่วน crude supernatant และพบ inclusion bodies ในส่วน pellet โดยจะพบการแสดงออกในรูปแบบ soluble protein ได้มากเมื่อถูกชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่ำประมาณ 0.1mM ดังแสดงในการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ human mBMP-2 จากผลการแสดงออกของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ภายใต้การควบคุมด้วย

T7 promoter โดยมี fusion protein ชนิด Thioredoxin (Trx) ร่วมด้วยพบว่า การมี Trx fusion protein ร่วมอยู่ด้วยสามารถช่วยการแสดงออกของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ให้สามารถผลิตในรูปแบบ soluble protein ได้ หากไม่มี fusion protein ชนิดนี้อยู่จะมีการแสดงออกในรูปแบบ inclusion bodies เท่านั้น

การศึกษาแสดงออกของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ โดยอาศัยเวคเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 อาศัยหลักการของการเหนี่ยวนำภายใต้ lacUV5 promoter และ protein A promoter ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *E.coli* XL1-Blue และ Shuffle® Express *E.coli* โดยการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ human mBMP-2 พบว่ามีการแสดงออกของ hBMP-2 ขนาด 28 กิโลดาลตัน ทั้งในส่วน soluble protein และส่วน pellet เมื่อทำการแสดงออกที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ภายใต้การชักนำด้วย 1mM IPTG ซึ่งการแสดงออกที่อุณหภูมิ 30°C จะสามารถผลิต hBMP-2 ในรูปแบบ soluble protein ได้ปริมาณมากกว่า จึงสรุปได้ว่าคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการผลิตริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ภายใต้การควบคุมของ lacUV5 promoter และ protein A promoter ในรูปแบบ soluble protein เมื่อมีการแสดงออกที่อุณหภูมิ 30°C เมื่อชักนำด้วย 1mM IPTG ซึ่งสรุปได้ว่าการมี fusion protein ชนิด ZZ สามารถช่วยให้โครงสร้างและการแสดงออกของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ สามารถผลิตในรูปแบบ soluble protein ได้

การศึกษาการแยกบริสุทธิ์ของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ ทำโดยนำส่วนของ cytosol part (soluble protein) มาแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคของ Ni-NTA affinity chromography โดยมีหลักการคือ การเกิดการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างกรดอะมิโนฮีสติดีนจำนวน 6 ตัว (6xHistidine tag) ซึ่งจะเกิดการสร้างพันธะกับ Ni-NTA resin อย่างจำเพาะและทำการชะล้างออกจากคอลัมภ์ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ imidazole จากผลการทดลองสรุปได้ว่า คณะผู้วิจัยสามารถใช้เทคนิค Ni-NTA affinity chromography สำหรับการแยกบริสุทธิ์ริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ โดยสามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนชนิดอื่นออกไปได้จำนวนมาก ซึ่งสามารถนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการกระตุ้นเซลล์กระดูกหรือกระดูกอ่อนต่อไป

ปัญหาและอุปสรรค

เซลล์ที่มีการแสดงออกของ Bone morphogenetic proteins ซึ่งจะนำมาสกัดยีนนั้นมีราคาสูงจึงต้องอาศัยความร่วมมือจากผู้ร่วมวิจัยภายนอกโดยผ่านทางนักวิจัยที่ปรึกษา เซลล์นี้ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษต้องใช้ระยะเวลาสั่ง และมีราคาสูง รวมทั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มีปริมาณเพียงพอค่อนข้างช้าต้องอาศัยระยะเวลานาน นอกจากนี้เนื่องจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เกี่ยวข้องกับงานด้าน Molecular biology techniques และเป็นการเริ่มต้นการวิจัยของผู้วิจัย จึงต้องหาเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ให้มีความเหมาะสมกับการทดลอง รวมทั้งใช้ระยะเวลาในการสั่งสารเคมีหรือชุดสกัดต่างๆระยะหนึ่ง และส่วนใหญ่มีราคาค่อนข้างสูง จึงทำให้มีอุปสรรคบ้างในช่วงเริ่มต้นของการวิจัย นอกจากนี้ช่วงเวลาในการทำวิจัยนี้ส่วนหนึ่งข้าพเจ้า ดร.วราภรณ์ เกษกาญจน์ หัวหน้าโครงการได้อยู่ในช่วงการได้รับเชิญไปทำวิจัยในฐานะ Visiting Researcher ณ มหาวิทยาลัยนาโกย่า เมืองนาโกย่า ประเทศญี่ปุ่น (ตั้งแต่วันที่ 20 ตุลาคม 2551 จนถึง 31 มีนาคม 2553 ตามที่ได้แจ้งกับทางผู้อำนวยการฝ่ายวิชาการ สกว.ได้รับทราบไปแล้วนั้น) นอกจากนี้ข้าพเจ้าได้ย้ายสังกัดจากเดิมภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ เปลี่ยนสังกัดใหม่เป็นภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก จึงทำให้การติดตามผลการวิจัย การแก้ไขปัญหาและอุปสรรคมีความล่าช้าไปบ้าง แต่อย่างไรก็ดีคณะผู้วิจัยก็มีความตั้งใจอุตสาหะในการดำเนินการวิจัยในโครงการนี้ให้บรรลุเป้าหมายตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้