

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยเป็นอุตสาหกรรมที่มีการเจริญเติบโตสูงและสร้างได้ให้กับประเทศมหาศาล แต่กระนั้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้ประสบปัญหาโรคระบาดจากไวรัส ซึ่งได้สร้างความเสียหายอย่างรุนแรง โดยมีการระบาดของไวรัสหลายสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง (สิริทุกขวินาศ และชุติมา ขมวิทย์, 2545) ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงได้ทำการวิจัยและคิดหาวิธีป้องกันปัญหานี้ โดยการศึกษาและทำความเข้าใจกลไกต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างกุ้งและไวรัส กลไกหนึ่งที่กำลังเป็นที่น่าสนใจอยู่ในขณะนี้ คือกลไกการตอบสนองการติดเชื้อไวรัสด้วยกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกที่เซลล์ใช้ในการต่อสู้กับไวรัส การศึกษากลไกนี้มีโอกาสนำไปสู่การค้นพบวิธีการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อไวรัสได้ (et al., 1997)

กระบวนการ apoptosis เป็นกระบวนการที่สิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ใช้กำจัดเซลล์ที่ไม่จำเป็นหรือเซลล์ที่ผิดปกติทั้ง ทั้งยังเป็นส่วนประกอบของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสอีกด้วย (Thompson, 1995) ในปัจจุบันมีการศึกษากระบวนการ apoptosis ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แมลง และหนอนตัวกลม พบว่ากระบวนการ apoptosis ลักษณะการอนุรักษ์อยู่ในสายวิวัฒนาการ (Yuan et al., 1993; Abrams et al., 1999; Earnshaw et al., 1999; Shi, 2001) เนื่องจากว่ากุ้งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการวิวัฒนาการใกล้เคียงกับแมลง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าลักษณะกระบวนการ apoptosis ที่มีอยู่ในเซลล์กุ้งก็น่าจะคล้ายกับกระบวนการ apoptosis ของแมลง

ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นที่ทราบกันโดยชัดแล้วว่า กลไกของการ apoptosis เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่ชื่อว่า caspase (Shi ,2004) โดยที่เซลล์จะมีการส่งเสริมหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase เพื่อควบคุมกระบวนการ apoptosis โปรตีนตัวหนึ่งที่รู้จักกันดีในฐานะเป็นโปรตีนที่ใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase คือโปรตีน Inhibitor of apoptosis proteins (IAP) โปรตีนชนิดนี้สามารถยับยั้งกระบวนการ apoptosis โดยการเข้าจับโดยตรงกับเอนไซม์ caspase และทำให้เอนไซม์ caspase ไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งในเซลล์สภาวะปกติจะมีโปรตีนนี้อยู่เพื่อป้องกันกระบวนการ apoptosis (Deveraux et al., 1997) แต่เมื่อยามที่เซลล์จำเป็นต้องเกิดกระบวนการ apoptosis เช่น มีการติดเชื้อไวรัสเกิดขึ้น ภายในเซลล์จะเกิดการส่งสัญญาณทำให้มีการปลดปล่อยโปรตีนที่ส่งเสริมการทำงานของ caspase ออกมาจากไมโทคอนเดรีย ส่วนหนึ่งของโปรตีนกลุ่มนั้นคือโปรตีน Smac และ HtrA2 (Wu et al., 2000; Hegde et al., 2002) โปรตีน Smac และ HtrA2 จะมีหน้าที่ในการเข้าจับโดยตรงกับโปรตีน IAP ตรงตำแหน่ง BIR domain เพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน IAP กระบวนการนี้จะปลดปล่อยเอนไซม์ caspase ให้เป็นอิสระเพื่อที่จะทำให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ได้ (Chai et al., 2001) ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะกลไกการควบคุม

ในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมา มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการ apoptosis ในเซลล์กิ้งมากขึ้น โดยเมื่อปี 2006 Phongdara และคณะ ได้ศึกษากระบวนการ apoptosis และยืนยันการมีอยู่ของเอนไซม์ caspase ในกิ้ง (Phongdara et al., 2006) ต่อมาในปี 2008 คณะวิจัยของ Leu ได้ค้นพบโปรตีน IAP ในเซลล์กิ้งกุลาดำ (Leu et al., 2008) และเมื่อไม่นานมานี้ ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ ได้ค้นพบยีนของกิ้งที่มีลักษณะคล้ายยีน *HtrA2* ซึ่งทำให้เกิดสมมติฐานว่า กิ้งก็อาจมีกลไกการทำงานของกระบวนการ apoptosis ในลักษณะเดียวกับในสัตว์อื่น

ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้ จึงได้ทำการแสดงออกและผลิตโปรตีน HtrA2 และ โปรตีน IAP ของกิ้งกุลาดำในระบบแบคทีเรีย รวมถึงการแยกผลิตเฉพาะส่วน BIR domains ของโปรตีน IAP ด้วย จากนั้นโปรตีน HtrA2 ที่ผลิตได้จะถูกนำมาทดสอบปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน IAP และ BIR domains ซึ่งจะเป็นการยืนยันหน้าที่ของโปรตีน HtrA2 ในกระบวนการ apoptosis ถ้าหากว่างานวิจัยชิ้นนี้ประสบความสำเร็จ ก็จะเป็นการเพิ่มความเข้าใจในกระบวนการ apoptosis ในกิ้ง และยังสามารถใช้โปรตีน HtrA2 เป็นโปรตีนเป้าหมายของยา ในการส่งเสริมกระบวนการ apoptosis ในกิ้งเพื่อการต้านทานเชื้อไวรัสได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาวิธีการและผลิตโปรตีน HtrA2 ของกิ้งกุลาดำในระบบแบคทีเรีย
2. เพื่อทำการผลิตโปรตีน IAP และ BIR domains ของกิ้งกุลาดำในระบบแบคทีเรีย
3. เพื่อทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน HtrA2 กับ IAP และ BIR domains ของกิ้งกุลาดำ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การยืนยันการอนุรักษ์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน HtrA2 และ IAP ในเซลล์กิ้งจะเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการ apoptosis ในเซลล์กิ้ง เพื่อให้สามารถใช้โปรตีนดังกล่าวเป็นส่วนร่วมในการออกแบบยาต้านเชื้อไวรัสในกิ้ง โดยเน้นการส่งเสริมกระบวนการ apoptosis ในเซลล์กิ้งที่ติดเชื้อไวรัส

1.4 ขอบเขตของโครงการ

1. ทำการทดสอบการแสดงออกและผลิตโปรตีน *PmHtrA2* ในเซลล์แบคทีเรีย
2. ทำการทดสอบการแสดงออกและผลิตโปรตีน *PmIAP* และ BIR domains ในเซลล์แบคทีเรีย
3. ทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmIAP* และ BIR domains กับโปรตีน *PmHtrA2* ในระบบ *in vitro* ด้วยเทคนิค pull down assay

บทที่2 ตรวจเอกสาร

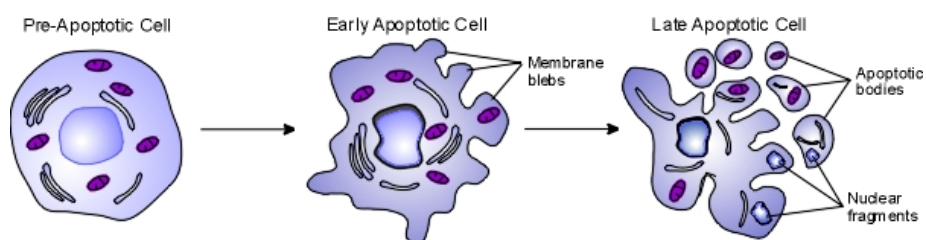
2.1 การตายของเซลล์

การตายของเซลล์หมายถึง ภาวะล้มเหลวของเซลล์ที่ไม่อาจดำเนินการให้เซลล์นั้นๆยังคงทำงานหรือมีชีวิตต่อไปได้ (Mosby's Medical Dictionary, 2009) ซึ่งการตายของเซลล์นั้นเกิดโดยกระบวนการที่ต่างกันสองกรณีคือ 1. การตายอย่างมีแบบแผน (Program cell death) ซึ่งเป็นรูปแบบการตายของเซลล์ที่เกิดจากการดำเนินการภายในเซลล์นั้นๆ อันต้องอาศัยพลังงานในการดำเนินการ 2. การตายอย่างอุบัติเหตุ (necrosis) เป็นรูปแบบการตายของเซลล์ที่ถูกกระทำโดยปัจจัยจากภายนอก เช่น ถูกสารพิษ มีการบาดเจ็บ หรือได้รับความรุนแรงทางกายภาพ เช่น ความร้อน ซึ่งการตายรูปแบบนี้ ไม่จำเป็นต้องอาศัยพลังงานขับเคลื่อนให้เซลล์เกิดการตาย (Ashe and berry, 2003)

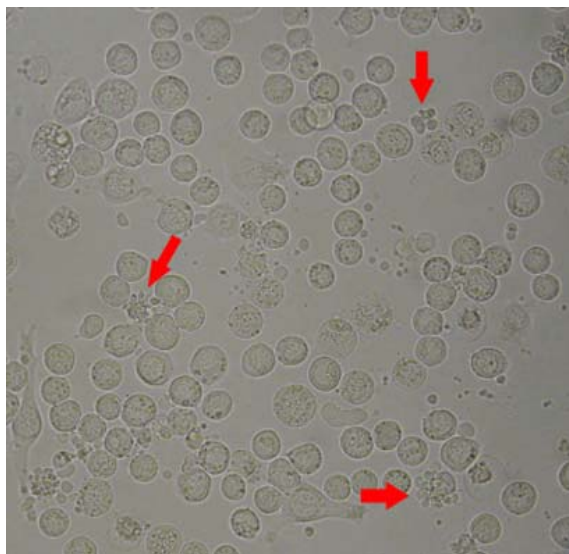
2.1.1 ลักษณะการตายของเซลล์

หากดูจากลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์ที่เกิดการตายนั้น จะสามารถทำให้แบ่งลักษณะการตายของเซลล์ได้ออกเป็น 3 รูปแบบ ดังนี้

Apoptosis คือการตายอย่างมีแบบแผนที่อาจเกิดขึ้นกับเซลล์ในหลายสถานะเช่น เกิดการติดเชื้อไวรัส การถูกควบคุมในกระบวนการเจริญเติบโต การได้รับรังสี การได้รับสารเคมี DNA เกิดความเสียหาย สถานะที่มีสารอาหารไม่เพียงพอ เป็นต้น กระบวนการ apoptosis มีขั้นตอนประกอบด้วย 1. เซลล์ได้รับสัญญาณกระตุ้นจากภายนอกหรือจากภายในเซลล์ 2. เกิดกระบวนการทำงานร่วมกันของโปรตีนกลุ่มหนึ่งในเซลล์เพื่อกระตุ้นให้เซลล์เกิดการ apoptosis 3. เกิดการ apoptosis ขึ้นภายในเซลล์ เมื่อเซลล์เกิดการ apoptosis จะทำให้เซลล์เกิดลักษณะต่างๆแสดงออกมา ซึ่งสามารถสังเกตได้จากรูปร่างผิดปกติของเซลล์ที่มีลักษณะบางส่วนโป่งพองบางส่วนยุบตัว (blebbing) เกิดการหดตัวของโครมาติน (chromatin condensation) นิวเคลียสเกิดการแตกออกเป็นชิ้นๆ (nuclear fragmentation) ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งสุดท้ายเซลล์จะแตกออกเป็น membrane vesicle เล็กๆหลายชิ้น ภายในจะบรรจุไซโทพลาสตที่มีชิ้นส่วนออร์แกเนล หรือชิ้นส่วน DNA ที่แตกหัก ซึ่งเรียกว่า apoptotic body (Alberts et al., 2008) ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 2.2

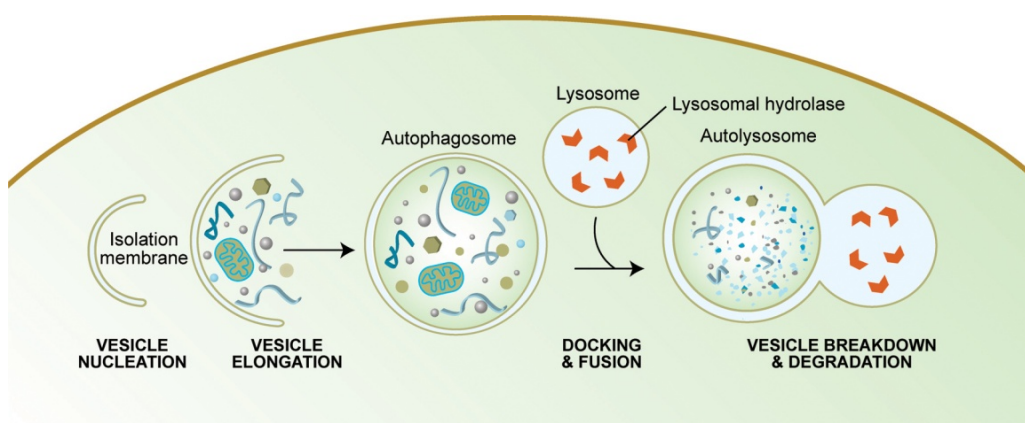


รูปที่ 2.1 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อเกิด apoptosis (Danton, 2009)



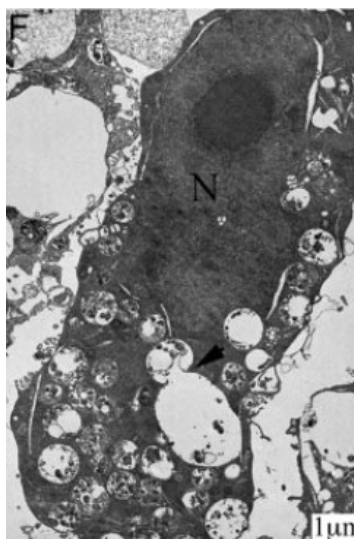
รูปที่ 2.2 ลักษณะ Apoptotic bodies ของเซลล์แมลง sf9 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

autophagocytosis หรือการกินตัวเอง เป็นการทำลายส่วนประกอบในเซลล์โดยการใช้ lysosomal vesicle มีขั้นตอนประกอบด้วย 1. มีการสร้าง autophagic vacuole ในเซลล์ 2. บรรจุอแกเนลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์ที่จะทำลายลงไปในนั้น (encapsulation) กลายเป็น autophagosome 3. autophagosome จะไปรวมตัวกับ lysosomal vesicle เพื่อทำลายสิ่งที่อยู่ใน autophagosome (Alicia and Beth, 2009) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเกิด autophagocytosis (Alicia, 2009)

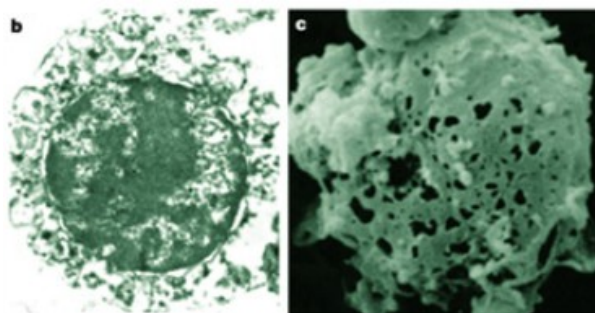
การเกิด autophagocytosis จะเกิดในหลายสภาวะของเซลล์ เช่น การขาดอาหาร การมีอแกเนลล์ที่ได้รับความเสียหาย หรือการมีโปรตีนที่ไม่ได้ใช้ในการทำงานจำนวนมากภายในเซลล์ (Daniel and Scott, 2000) จึงจำเป็นที่จะกำจัดส่วนประกอบของเซลล์เหล่านั้นออกไป นอกจากนั้นสามารถเกิดจากการที่ไม่โตคอนเดรียได้รับความเสียหาย และเกิดการปลดปล่อย intermembrane



รูปที่ 2.4 เซลล์ที่เกิด autophagocytosis แสดงให้เห็นถึงการรวมตัวกันของ Autophagosome กับ lysosomal vesicle (Chao et al., 2004)

การเกิด Autophagocytosis ของเซลล์เป็นทั้งการนำไปสู่การตายของเซลล์ และการรอดชีวิตของเซลล์ (promote cell survival) ซึ่งสมดุลของกระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับสถานะของเซลล์ในขณะนั้น

และสุดท้ายการตายแบบ Necrosis สามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุเช่น ถูกสารพิษ ได้รับความรุนแรงทางกายภาพ ติดเชื้อ หรือได้รับบาดเจ็บ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เกิดขึ้นแบบอุบัติเหตุ ไม่มีกระบวนการภายในเซลล์ที่ขับเคลื่อนการตาย แต่เป็นเพราะเซลล์ได้รับความเสียหายจนไม่อาจทำงานตามปกติได้ ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ Necrosis สามารถสังเกตได้จาก cell membrane เกิดการแตกหรือรั่วไหล เกิดการบวมของไมโทคอนเดรียและออร์แกเนลล์ต่างๆ ดังรูปที่ 2.5 การตายของเซลล์ในลักษณะนี้จะทำให้ในบริเวณนั้นเกิดการอักเสบตามมา



รูปที่ 2.5 ลักษณะของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ necrosis (Syntichaki and Tavernarakis, 2003)

2.1.2 การตายของเซลล์กับระบบภูมิคุ้มกัน

การตายของเซลล์นั้นไม่อาจกล่าวได้ว่าเป็นความเสียหายของเซลล์ร่างกายไปเสียทั้งหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การตายของเซลล์แบบ apoptosis ซึ่งเป็นการตายของเซลล์อย่างมีจุดหมาย เพื่อการควบคุมการพัฒนาการของร่างกาย การรักษาสมดุลของเซลล์ และยังทำหน้าที่เป็นอาวุธอย่างหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย ซึ่งถ้าหากมีความผิดปกติเกิดขึ้นกับยีนที่ควบคุมการทำงานของกระบวนการ apoptosis ก็มักจะทำให้เกิดโรคมะเร็งภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคมะเร็งภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง และโรคเมะเร็งขึ้นได้ (Thompson, 1995)

ในกรณีของการติดเชื้อไวรัส กระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ก็ยังทำหน้าที่ยับยั้งการแพร่กระจายของไวรัส (Everett and McFadden, 2001) โดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเกิดการตายไป ก่อนที่ไวรัสจะได้ทำการเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายสู่เซลล์อื่น ในการศึกษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส จึงมักจะมีการศึกษาการเกิดกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยเสมอ

2.2 กระบวนการ apoptosis

ดังที่ได้กล่าวไปในข้างต้น กระบวนการ apoptosis เป็นเสมือนการตั้งโปรแกรมในการกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการ โดยเฉพาะเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์ที่ติดเชื้ออื่นเอเกิดความเสียหาย กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมคุณภาพและรักษาสมดุลเซลล์ภายในสิ่งมีชีวิต ในระบบภูมิคุ้มกันกระบวนการ apoptosis ถูกใช้ในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ภายใต้การใช้ประโยชน์อย่างหลากหลายนี้ กระบวนการ apoptosis จึงต้องถูกควบคุมด้วยโปรตีนหลายกลุ่ม ซึ่งสามารถแยกตามประเภทหน้าที่การทำงานได้ดังนี้

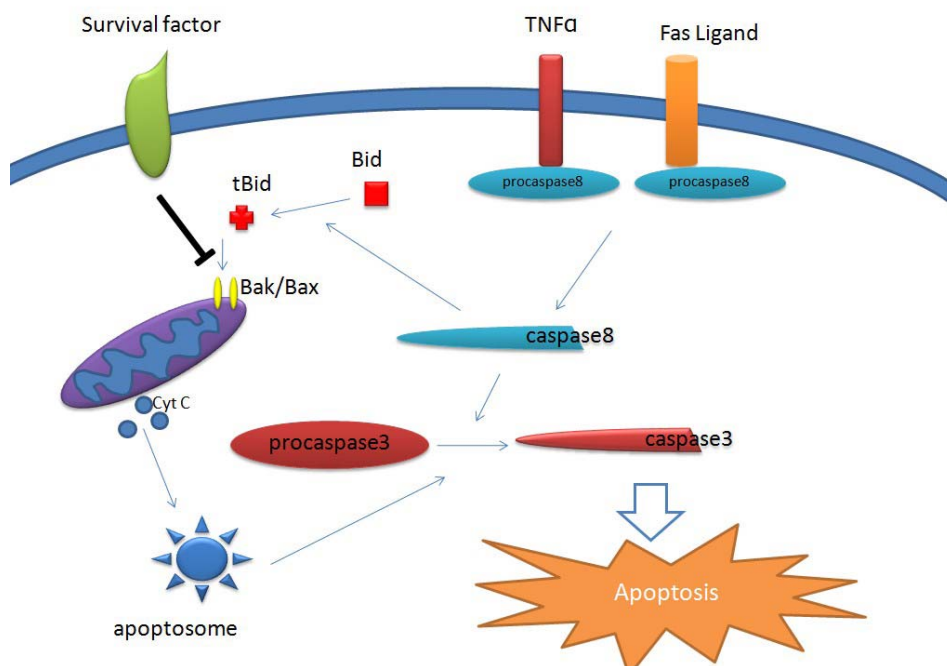
- (1) โปรตีนกลุ่มที่ช่วยในการส่งสัญญาณและกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis เช่น Death receptors ต่างๆ () รวมถึง โปรตีน p53 เป็นต้น (et al., 2003)
- (2) โปรตีนกลุ่มที่ใช้ดำเนินกระบวนการ apoptosis คือกลุ่มโปรตีน caspase (Cohen, 1997)
- (3) โปรตีนกลุ่มที่ใช้ในการยับยั้งกระบวนการ apoptosis คือกลุ่มโปรตีน IAP (Liston et al., 2003) และ Bcl-2 (and) บางชนิด

- (4) โปรตีนกลุ่มที่ช่วยส่งเสริมกระบวนการ apoptosis เช่น กลุ่มโปรตีน Bcl-2 บางชนิด (Youle and ;) โปรตีน Smac (and , 2002) และโปรตีน HtrA2 (Suzuki et al., 2004)

2.2.1 การกระตุ้นกระบวนการ apoptosis

การเกิดกระบวนการ apoptosis นั้น เริ่มต้นจากการที่เซลล์ได้รับสัญญาณกระตุ้น ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นสองแบบ คือ 1. สัญญาณจากภายนอกเซลล์ (extrinsic) 2. สัญญาณภายในเซลล์ (intrinsic) (Ghavami et al., 2009) มีรายละเอียดดังนี้

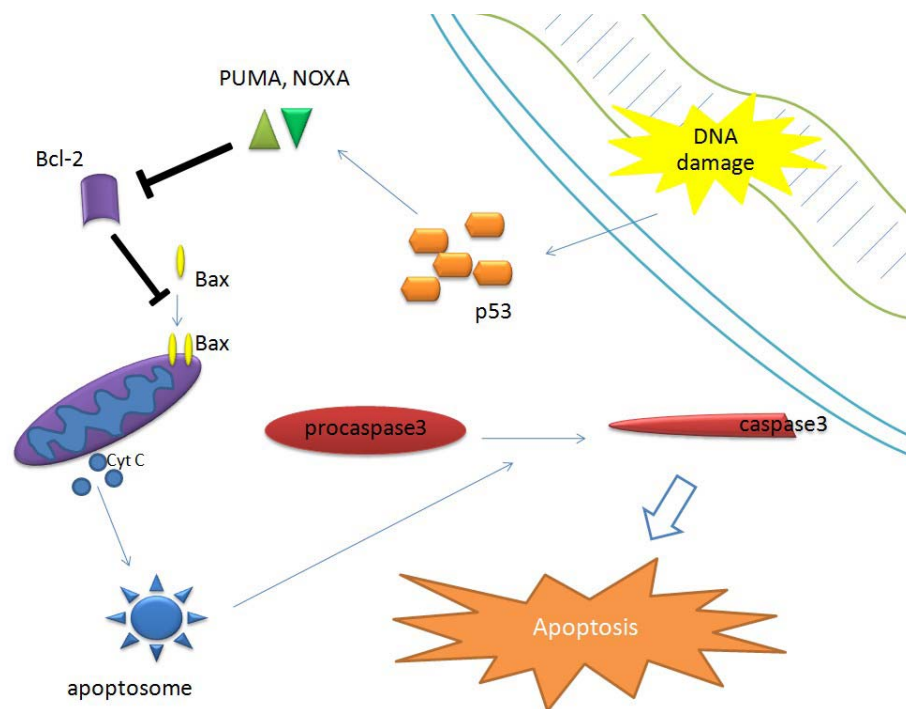
การรับสัญญาณจากภายนอกเซลล์ (Death receptor induce extrinsic pathway) เกิดจากการรับสัญญาณจากภายนอกเซลล์ด้วย receptor กลุ่มหนึ่ง ซึ่งเป็น receptor ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (promote cell death) receptor กลุ่มนี้ถูกเรียกว่า death receptor เช่น TNF receptor, FAS receptor, TRAIL receptor และ IL-1 receptor เป็นต้น เมื่อสารสื่อสัญญาณ (Death factors) ที่ถูกส่งมาจากภายนอกเซลล์มาจับกับ Death receptor ก็จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ death receptor ทำให้ adaptor protein ในส่วนปลาย C-terminal ของ death receptor ที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึมไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis เช่น เมื่อ FAS receptor จับกับสารสื่อสัญญาณ FAS associated death domain protein (FADD) จะทำการจับกับ procaspase-8 และกระตุ้น procaspase-8 ให้กลายเป็น caspase-8 ที่สามารถทำงานได้ caspase-8 สามารถไปกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ได้สองทางคือ 1. ไปกระตุ้น caspase cascade โดยตรงทำให้ปริมาณของ caspase3 ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น 2. ไปกระตุ้น Bid ให้กลายเป็น Truncated Bid (tBid) จากนั้น tBid จะไปจับกับ Bax และ Bak ทำให้โมเลกุลทั้งสองนี้ไปเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรียและทำให้เกิดรูรั่วเพื่อปลดปล่อย intermembrane space proteins ของไมโทคอนเดรียเช่น Cytochrome C ทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ต่อไป (, 2002) ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แผนภูมิกลไกการส่งสัญญาณ apoptosis จากภายนอกเซลล์

การเกิดสัญญาณจากภายในเซลล์ (Mitochondria mediated apoptosis intrinsic pathway) สัญญาณการเกิดกระบวนการ apoptosis จากภายในเซลล์นั้น มีกระบวนการหลักคือการใช้ไมโทคอนเดรียเป็นสื่อกลางในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis เมื่อเซลล์ได้รับความผิดปกติต่างๆ เช่น ได้รับ Oxidative stress สูง DNA เกิดความเสียหาย หรือเกิดการติดเชื้อไวรัสทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติไป ก็จะมีการส่งสัญญาณไปสู่ไมโทคอนเดรียให้กระตุ้นกระบวนการ apoptosis

โปรตีน p53 เป็นโปรตีนสำคัญใน intrinsic pathway โปรตีนนี้เป็นเหมือนตัวตรวจวัดความผิดปกติของเซลล์ เมื่อ DNA เกิดความเสียหาย จะทำให้โปรตีน p53 เกิดการเพิ่มจำนวนมากขึ้นภายในเซลล์ โปรตีน p53 จะไปกระตุ้นโปรตีน PUMA และ NOXA ให้พร้อมทำงาน หากเป็นยามปกติที่เซลล์ยังไม่ต้องการเกิดกระบวนการ apoptosis นั้น จะมีโปรตีน Bcl-2 ช่วยป้องกันไม่ให้โปรตีน Bax ไปจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรีย อันจะทำให้เกิดการปลดปล่อย intermembrane space proteins ออกมา แต่เมื่อโปรตีน PUMA และ NOXA ถูก p53 กระตุ้นแล้ว โปรตีนทั้งสองจะสามารถไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bcl-2 ทำให้โปรตีน Bax ไม่ถูกยับยั้งอีกต่อไป และสามารถทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรียเกิดรูและเกิดการปลดปล่อย intermembrane space proteins ออกมา ซึ่งประกอบด้วย cytochrome C เพื่อกระตุ้น caspase 3 และทำให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ในที่สุด (Haupt et al., 2003) ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แผนภูมิกลไกการส่งสัญญาณ apoptosis จากภายในเซลล์

2.2.2 การทำงานและการควบคุมกระบวนการ apoptosis

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์สำคัญที่ทำให้เกิดการกระตุ้นกันเป็นทอดๆของกลุ่มโปรตีน caspase (caspase cascade) เริ่มจากการที่ไมโทคอนเดรียจะปลดปล่อย cytochrome C ออกมา โปรตีนนี้จะรวมตัวกับ pro-caspase 9 และ Apaf-1 ก่อเกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า apoptosome และไปกระตุ้นการทำงานของ caspase cascade (Adams and Cory, 2002) เมื่อ caspase cascade ถูกกระตุ้นให้เกิดการทำงานแล้ว เซลล์ก็จะเกิดกระบวนการ apoptosis (Shi, 2004) ดังรูปที่ 6 และ 7 นอกจากนี้โปรตีนกลุ่มที่กล่าวไปข้างต้นแล้ว ก็ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดร่วมกันควบคุมการทำงานของกระบวนการ apoptosis เช่น โปรตีนกลุ่ม Bcl-2 โปรตีนกลุ่ม IAP โปรตีน Smac และโปรตีน HtrA2

1. caspase cascade เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ apoptosis และทำหน้าที่หลักในการขับเคลื่อนกระบวนการ apoptosis เอนไซม์ caspase สามารถแบ่งได้ออกเป็นสองชนิดคือ

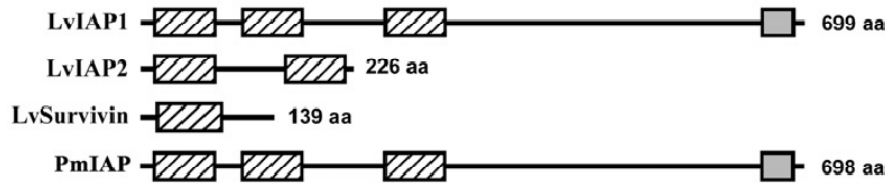
initiator caspase เช่น caspase-8, caspase-9 เป็นเอนไซม์ caspase ที่มี caspase recruitment domain (CARD) สำหรับจับกับโปรตีนอื่นที่จะมากระตุ้น caspase เหล่านี้ เช่น FADD และ Apoptosome เมื่อเกิดการจับแล้ว procaspase จะถูกกระตุ้นให้เป็น caspase ที่สามารถทำงานได้ initiator caspase เหล่านี้จะไปกระตุ้นการทำงานของ effector caspase อีกทอดหนึ่ง

effector caspase เช่น caspase-3, caspase-7 เอนไซม์ caspase เหล่านี้จะถูกกระตุ้นโดย initiator caspase ให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ caspase เหล่านี้เป็นตัวทำงานหลักโดยการไปทำปฏิกิริยัมพันธ์กับโปรตีนอื่นหลายชนิด เช่น ทำลายโปรตีนที่ใช้ซ่อมแซม DNA กระตุ้นเอนไซม์ DNase

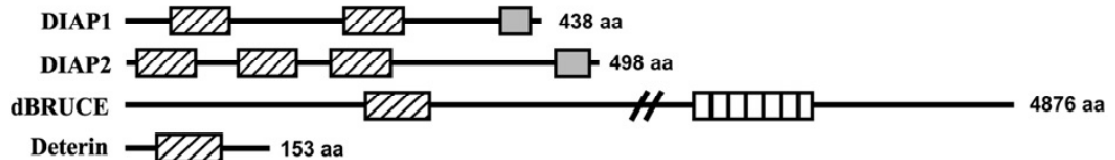
2. Bcl-2 family proteins คือโปรตีนกลุ่มที่มีโดเมน Bcl-2 homology (BH) 1-4 อยู่ (Rebecca et al., 2008) โปรตีนกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการควบคุมการปลดปล่อย intermembrane space proteins ของไมโทคอนเดรีย (Martinou and Green, 2001) โดยโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 มีทั้งส่วนชนิดที่ใช้กระตุ้นและยับยั้งการปลดปล่อย intermembrane space proteins ของไมโทคอนเดรีย ชนิดที่กระตุ้นจะทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย ส่วนชนิดที่ใช้ยับยั้งจะเกาะอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียทำให้เยื่อหุ้มเกิดความคงตัว

3. Inhibitor of apoptosis proteins (IAP) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการควบคุมสมดุล apoptosis ภายในเซลล์ โปรตีน IAP ถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยถูกจำแนกด้วยลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันคือ Baculoviral IAP Repeat (BIR) กล่าวคือโปรตีนทุกชนิดที่มี BIR domain อยู่จะถูกเรียกเป็นโปรตีน IAP ทั้งหมด โดยไม่คำนึงถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการ apoptosis นอกจาก BIR domain แล้ว โปรตีน IAP ยังมี domain อื่นๆอีกดังเช่น caspase recruitment domain (CARD) ซึ่งช่วยในการเข้าจับกับ caspase ต่อมา ubiquitin-conjugating (UBC) domain เป็นโดเมนที่ทำให้โปรตีน Ubiquitin เกาะอยู่เพื่อเตรียมใช้ และ really interesting new gene (RING) domain ช่วยเติม Ubiquitin ให้กับโปรตีนที่มาจับกับ IAP (et al., 2003) ดังรูปที่ 2.8

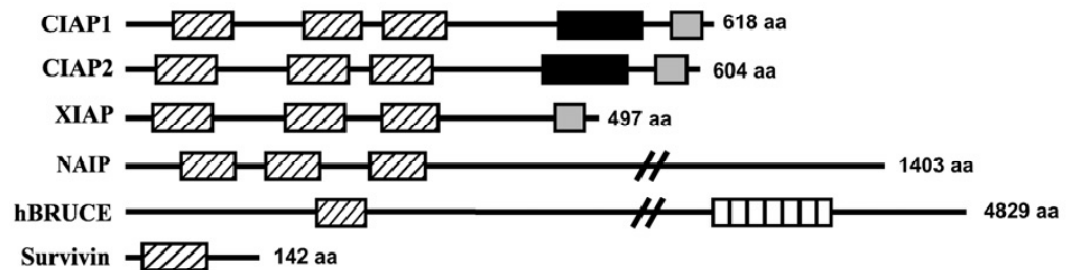
Penaeid shrimp



Drosophila



Mammalian



▨ : BIR ▤ : RING ■ : CARD ▤▤▤ : UBC

รูปที่ 2.8 โครงสร้างโปรตีน IAP ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ (Leu et al., 2012)

ในสภาวะปกติ โปรตีน IAP จะคอยระงับกระบวนการ apoptosis โดยการจับกับเอนไซม์ caspase (Deveraux et al., 1997) BIR domain ของโปรตีน IAP เป็นตำแหน่งที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ caspase และ RING domain ทำหน้าที่ในการทำลายโปรตีนทั้งสองด้วยระบบ ubiquitin แต่หากเมื่อใดที่เซลล์จำเป็นต้องเข้าสู่กระบวนการ apoptosis ก็จะมีการสร้างโปรตีนออกมายับยั้งการทำงานของโปรตีน IAP อีกทีหนึ่ง (

4. Apoptosis inducer proteins เมื่อเซลล์ถูกขับเคลื่อนไปสู่กระบวนการ apoptosis จำเป็นที่จะต้องปลดปล่อยโปรตีน caspase จากการยับยั้งของโปรตีน IAP (Shi, 2004) ดังนั้นจึงเป็นหน้าที่ของโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่มี motif ที่ใช้ในการจับกับโปรตีน IAP ซึ่งเรียกว่า IAP binding motif (IBM) ส่วนของ IBM นี้มีลักษณะเป็นกรดอะมิโน 4 ตัวตรงตำแหน่งปลายด้าน N-terminal ดังรูปที่ 2.9 โปรตีนที่มี IBM ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้แก่ Smac และ HtrA2 (Wu et al., 2000; Hegde et al., 2002) ส่วนในแมลงหวี่ได้แก่ Reaper, Hid และ Grim (et al., 2000) โปรตีน IBM ในยามปกติจะถูกเก็บอยู่ที่ intermembrane space ของไมโทคอนเดรีย และเมื่อเซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis โปรตีนเหล่านี้ก็จะถูกปลดปล่อยออกมาพร้อมกับ Cytochrome c (Verhagen et al., 2007)

Mammalian	↓								
Smac/DIABLO	A	V	P	I	A	Q	K	S	
hCasp-9	A	T	P	F	Q	E	G	L	
mCasp-9	A	V	P	Y	Q	E	G	P	
xCasp-9	A	T	P	V	F	S	G	E	
hHtrA2/Omi	A	V	P	S	P	P	P	A	
mHtrA2/Omi	A	V	P	A	P	P	P	T	
<i>Drosophila</i>									
Reaper	A	V	A	F	Y	I	P	D	
Grim	A	I	A	Y	F	L	P	D	
Hid	A	V	P	F	Y	L	P	E	
Sickle	A	I	P	F	F	E	E	E	

รูปที่ 2.9 เปรียบเทียบ IBM จากโปรตีนของสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมและแมลงหวี่ ลูกศรชี้ลักษณะการอนุรักษ์กรดอะมิโนตัวแรก (Alanine) (Shi, 2004)

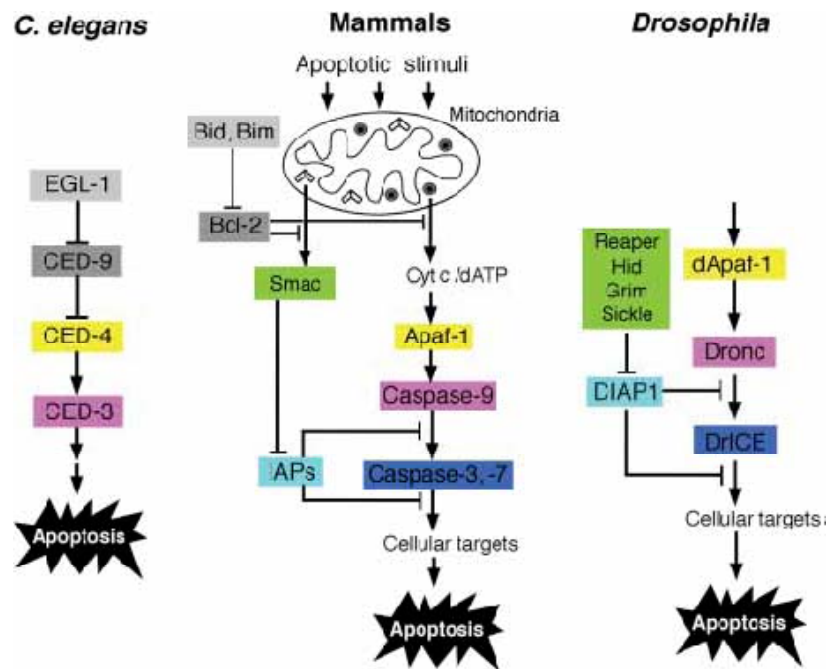
โปรตีนกลุ่มนี้จะใช้ IBM จับกับ BIR domain ของโปรตีน IAP แบบแข่งขัน (competitive) จากการศึกษาเชิงโครงสร้างทำให้พบว่า เมื่อ IAP ถูกจับโดย Smac ลำดับอะมิโนของ IAP ในส่วนที่ใช้ยับยั้งโปรตีน caspase จะถูก Smac ล็อกเอาไว้ไม่ให้ทำงานได้ (Chai et al., 2001)

2.2.3 การอนุรักษ์กระบวนการ apoptosis ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ

ในรายงานทบทวนเอกสารงานวิจัยของ Shi ได้เขียนถึงกระบวนการ apoptosis ในสัตว์ชนิดต่างๆ เริ่มจากในหนอนตัวกลม (*Caenorhabditis elegans*) ได้มีการศึกษาพบว่า กระบวนการ apoptosis ถูกควบคุมด้วยการทำงานอย่างเป็นลำดับของโปรตีน 4 ชนิด โดยมีโปรตีน CED-3 เป็นเหมือนโปรตีน caspase แต่ก่อนที่โปรตีน CED-3 จะทำงานได้นั้นจำเป็นต้องถูกกระตุ้นโดยโปรตีน CED-4 ก่อนถึงจะทำงานได้ ในยามที่ยังไม่เกิด apoptosis โปรตีน CED-4 จะถูกยับยั้งโดยโปรตีน CED-9 เมื่อเซลล์ถูกขับเคลื่อนให้เกิดกระบวนการ apoptosis จะมีการสร้างโปรตีน EGL-1 ออกมายับยั้งการทำงานของโปรตีน CED-9 เพื่อเปิดทางให้ CED-4 ไปกระตุ้นการทำงานของ CED-3 (Horvitz, 2003)

โปรตีน CED-9 นั้นมีลักษณะและการทำงานคล้ายกับโปรตีน Bcl-2 ของสัตว์เลื้อยลูกด้วยนม โปรตีน CED-4 ก็มีหน้าที่คล้ายกับโปรตีน Apaf-1 (คือการกระตุ้นการทำงานของ initiator caspase) ดังรูปที่ 10 ซึ่งแสดงเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของหน้าที่ของโปรตีนด้วยสี (Cory and Adams, 2002)

ส่วนในแมลงหวี่นั้น มีโปรตีน dApaf-1 ทำหน้าที่คล้าย Apaf-1 ของสัตว์เลื้อยลูกด้วยนม มีโปรตีน Dronc และ DriCE ทำหน้าที่เหมือนโปรตีน caspase แต่กระบวนการยับยั้งการ apoptosis นั้นต่างไปจากของหนอนตัวกลม คือไม่ได้มีการยับยั้งการทำงานของตัวกระตุ้น initiator caspase แต่ได้มีการใช้โปรตีน DIAP1 ซึ่งเป็นโปรตีน IAP ชนิดหนึ่งในการยับยั้งการทำงานของ initiator และ



รูปที่ 2.10 เปรียบเทียบกระบวนการ apoptosis ในสิ่งมีชีวิต 3 ชนิดได้แก่ หนอนตัวกลม สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และแมลงหวี่ (Shi, 2004)

2.2.4 การศึกษากระบวนการ apoptosis ในกึ่งกลาดำ

กึ่งกลาดำ ถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจสำคัญของภูมิภาคเอเชียที่ประสบกับปัญหาการติดเชื้อไวรัสมาโดยตลอด ปัญหานี้ส่งผลเสียต่อมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันจึงได้มีการวิจัยหาทางในการป้องกันเชื้อไวรัสของกึ่งอย่างกว้างขวาง การศึกษากระบวนการ apoptosis ในกึ่งก็เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยหาทางป้องกันไวรัส และทำให้เกิดความรู้ใหม่ๆเกี่ยวกับกระบวนการ apoptosis ในกึ่ง

ในปี 2006 Phongdara และคณะได้ทำการค้นพบยีน caspase-3 ในกึ่งเป็นครั้งแรกโดยการใช้ conserve sequence ของโปรตีน caspase ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในการค้นหายีน caspase จาก cDNA ของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) (Phongdara et al., 2006)

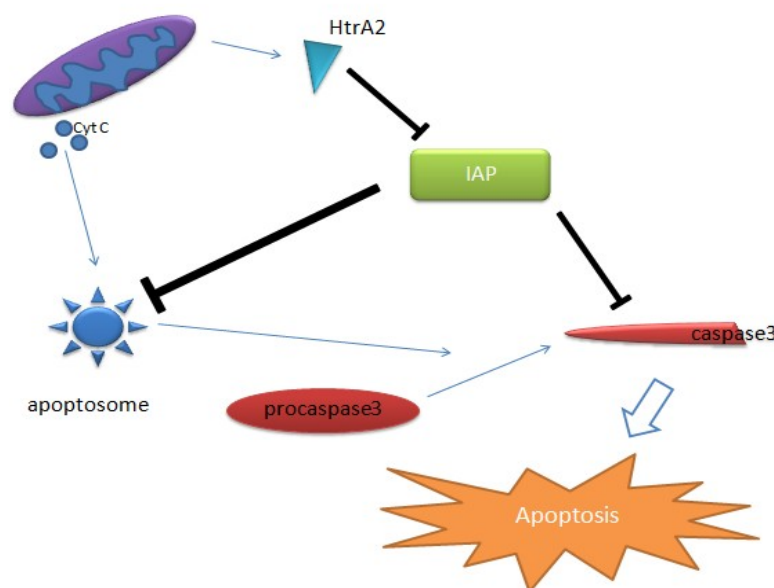
ในปี 2007 Leu และคณะได้ค้นพบยีน IAP ในกึ่งกลาดำ (*PmIAP*) เป็นครั้งแรก ด้วยวิธี 5' race นอกจากนั้นยังทำการโคลนและตรวจสอบยีนดังกล่าว ด้วยการทดสอบปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Reaper ของแมลงหวี่ ซึ่งพบว่าโปรตีน IAP สามารถจับและยับยั้งการตายของเซลล์ที่เกิดจากโปรตีน Reaper ได้ (Leu et al., 2007)

จากการค้นพบดังกล่าว ทำให้เกิดแนวคิดที่ว่า กุ้งน่าจะมีลักษณะกระบวนการ apoptosis ที่คล้ายคลึงกับแมลงหวี่และมนุษย์ อย่างไรก็ตามสมมติฐานนี้จะครบถ้วน ก็ต่อเมื่อมีการค้นพบโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ IAP ในเซลล์ของกุ้งเองเสียก่อน ดังเช่นที่มีโปรตีน Smac และ HtrA2 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือที่มีโปรตีน Reaper, Hid, Grim และ Sickie ในแมลงหวี่

ทั้งนี้ ดร. ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ ได้ค้นพบโปรตีนที่ยังไม่เคยถูกระบุในกุ้งมาก่อนจากห้องสมุด cDNA ของกุ้งกุลาดำ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนดังกล่าว ก็พบว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน HtrA2 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งโปรตีน HtrA2 นี้เป็นโปรตีนที่ถูกเก็บอยู่ที่ intermembrane space ของไมโทคอนเดรีย สามารถถูกปลดปล่อยออกมาพร้อมกับ Cytochrome C และมีลำดับกรดอะมิโน IBM เช่นเดียวกับ Smac ในการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่การทำงานของโปรตีน HtrA2 ก็พบว่าเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน IAP และนำไปสู่กระบวนการ apoptosis เช่นเดียวกับ Smac (et al., 2002) ดังนั้นจึงเกิดสมมติฐานว่า โปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับ HtrA2 นี้ อาจเป็นโปรตีนที่กุ้งใช้ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน IAP เพื่อทำให้เกิดกระบวนการ apoptosis

2.3 โครงสร้างและบทบาทของโปรตีน HtrA2 และ IAP ในกระบวนการ apoptosis

HtrA2 เป็นโปรตีนกลุ่ม Serine protease ที่ถูกปลดปล่อยสู่ไซโทพลาสซึมในช่วงที่เซลล์มีกระบวนการ apoptosis เพื่อส่งเสริมการทำงานของ caspase โดยการจับและทำลายโปรตีน IAP อันมีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ caspase ดังแสดงในรูปที่ 2.11



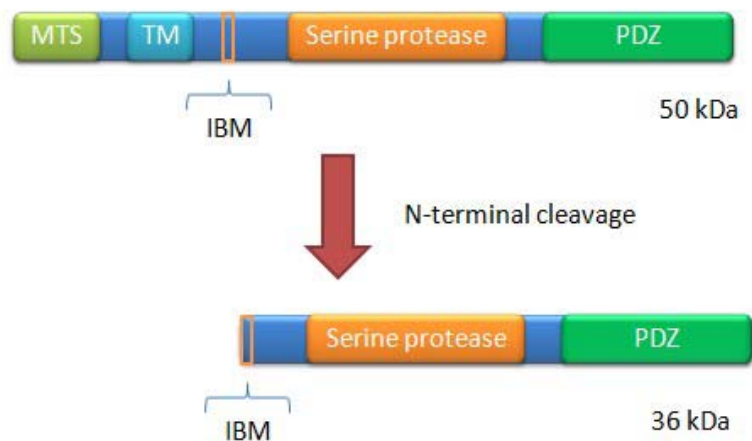
รูปที่ 2.11 บทบาทของโปรตีน HtrA2 ในเซลล์ที่เกิดกระบวนการ apoptosis

2.3.1 โครงสร้างและการทำงานของโปรตีน HtrA2

ในช่วงที่เซลล์ยังไม่เกิดกระบวนการ apoptosis โปรตีน HtrA2 ที่ถูกเก็บไว้ที่ไมโทคอนเดรีย ประกอบด้วย 5 domains (Harris et al., 2001) ได้แก่

1. Mitochondrial Localization Signal (MLS) domain ทำหน้าที่ส่งสัญญาณให้โปรตีน HtrA2 ถูกพาไปเก็บไว้ยัง mitochondrial intermembrane space
2. Transmembrane (TM) segment เป็นส่วนที่ยึดโปรตีน HtrA2 ให้อยู่บนเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย
3. IAP-binding motif (IBM) เป็นส่วนที่ใช้จับกับโปรตีน IAP
4. Serine protease domain เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาตรงตำแหน่งกรดอะมิโน serine ใช้สำหรับการย่อยสลายโปรตีนตัวอื่น
5. PDZ domain มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของ serine protease domain และยังสามารถจับกับส่วน C-terminal ของ receptor บางตัวบนเยื่อหุ้มเซลล์

เมื่อโปรตีน HtrA2 ถูกกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยจาก intermembrane space ของไมโทคอนเดรีย จะเกิดกระบวนการตัดกรดอะมิโนด้าน N-terminal ของ IBM ทิ้งไป การตัดแปลงโปรตีนในลักษณะนี้ จะทำให้โปรตีน HtrA2 เหลืออยู่เพียง 3 domain และมี IBM อยู่ตรงปลาย N-terminal ดังรูปที่ 2.12 โครงสร้างนี้จะสามารถจับกับ BIR domain ของโปรตีน IAP ได้ (Shenuarin and Kohji, 2008)



รูปที่ 2.12 โครงสร้างและการตัดแปลงโปรตีน HtrA2 ไปสู่รูปแบบที่พร้อมใช้งาน (Mature HtrA2)

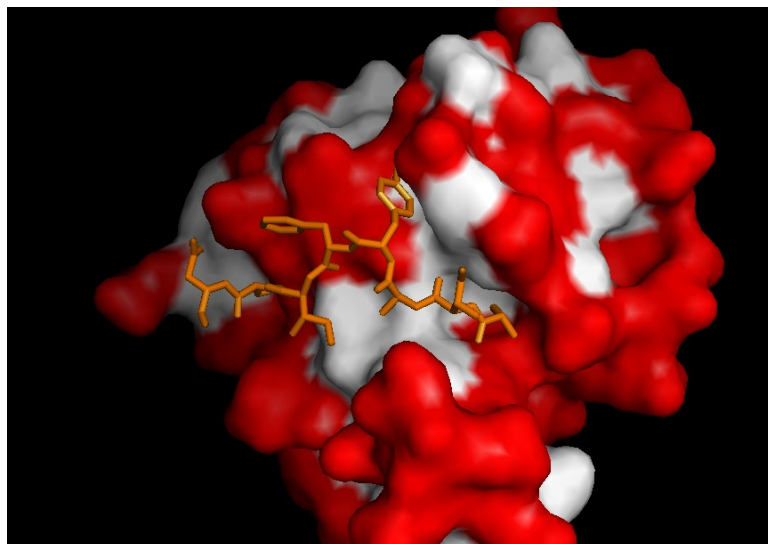
จากการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน HtrA2 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า เมื่อเกิดการปลดปล่อยโปรตีน HtrA2 ที่พร้อมทำงานออกมาสู่ไซโตพลาสม โปรตีน HtrA2 จำนวน 3 โมเลกุลจะมารวมกันเกิดเป็น trimeric form มีรูปร่างคล้ายปิรามิด ดังรูปที่ 13 ปลายส่วน N-terminal ที่เป็น IBM จะอยู่บนยอดปิรามิด ส่วน PDZ domain จะเป็นฐานปิรามิด ซึ่งบดบัง serine protease domain ที่อยู่ภายใน การก่อตัวเป็นรูปร่างลักษณะนี้ ทำให้โปรตีน HtrA2 สามารถควบคุมการทำงานของ serine

โปรตีน HtrA2 สามารถใช้ส่วน IBM ในการเข้าจับกับ BIR domain ของโปรตีน IAP และสามารถจับได้ทั้ง BIR2 และ BIR3 อย่างไรก็ตาม HtrA2 มีความเป็นไปได้ที่จะจับกับ BIR2 ได้ดีกว่า BIR3 ซึ่งอาจทำให้เกิดผลในการส่งเสริมการทำงานของ caspase-3 และ -7 ได้มากกว่า caspase-9 (Verhagen et al., 2002) เนื่องจาก BIR2 เป็นส่วนที่โปรตีน IAP ใช้ทำปฏิสัมพันธ์กับ caspase-3 และ -7 ในขณะที่ใช้ BIR3 ทำปฏิสัมพันธ์กับ caspase-9

2.3.2 โครงสร้างของโปรตีน IAP

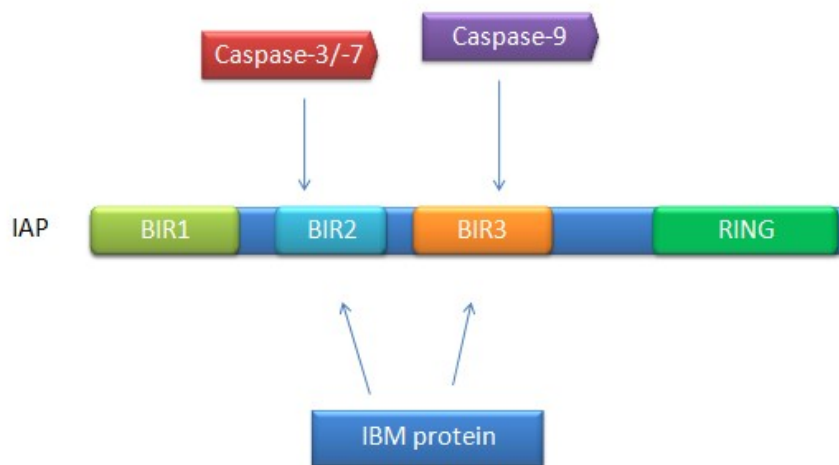
โปรตีน IAP เป็นโปรตีน domain ที่มีลักษณะเฉพาะที่เรียกว่า BIR domain ซึ่งสามารถใช้จับกับโปรตีน caspase ได้ ในขณะเดียวกัน BIR domain ก็ยังเป็นบริเวณเป้าหมายที่โปรตีน HtrA2 ใช้ในการเข้าจับเพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน IAP

โปรตีน IAP นั้นจะมี BIR domain อยู่ประมาณ 1-3 ตำแหน่ง ซึ่งจะเรียกเรียงตามตำแหน่งว่า BIR1-3 เมื่อมีการก่อรูปเป็นโครงสร้างสามมิติ จะมีการยึดแต่ละ BIR domain ไว้ด้วย zinc ion ที่กึ่งกลางโมเลกุลของ IAP ทำให้โครงสร้างของ BIR domain มีลักษณะเว้าเข้าเป็นร่อง (BIR groove) ซึ่งมีลักษณะเป็น hydrophobic สามารถใช้ในการจับกับ IBM (Eckelman et al., 2008) ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 โครงสร้าง BIR2 groove ของโปรตีน DIAP พื้นผิวสีขาวแสดงถึงความเป็น hydrophobic ผิวสีแดงแสดงถึงความเป็น hydrophilic สีส้มคือ IBM ของ Grim

โปรตีน IAP ใช้ตำแหน่งของ BIR ที่ต่างกันในการจับกับ caspase ที่ต่างชนิด กล่าวคือ โปรตีน IAP ใช้ BIR2 ในการจับกับ caspase-3 และ-7 และใช้ BIR3 ในการจับกับ caspase-9 ซึ่ง BIR ทั้งสอง domain นี้ สามารถถูกโปรตีน IBM จับได้ทั้งสองตำแหน่ง ดังรูปที่ 2.14 แต่อาจมีการจับตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งได้ดีกว่าอีกตำแหน่ง (et al., 2003) BIR domain จึงเป็น Domain ที่สำคัญใช้ในการจับกับทั้ง caspase และ IBM proteins ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้ จึงสนใจที่จะศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน HtrA2 กับ BIR domain ทั้งสอง



รูปที่ 2.14 หน้าที่ทำปฏิสัมพันธ์ของ domain ต่างๆของโปรตีน IAP

2.3.3 การทำปฏิสัมพันธ์ระหว่าง IBM และ BIR domain

มีโปรตีนมากมายชนิดที่สามารถทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน IAP ได้ แม้ว่าโปรตีนต่างๆ เหล่านั้นจะมีโครงสร้าง หน้าที และกลไกในการทำงานต่างกันแทบจะสิ้นเชิง อย่างไรก็ตาม โปรตีน เหล่านั้นทุกโปรตีนจะมีลำดับกรดอะมิโนที่มีลักษณะเฉพาะเรียกว่า IBM จำนวน 4 กรดอะมิโนกันในส่วน N-terminal ของโปรตีน และต่างก็ใช้ 4 กรดอะมิโนนี้ในการจับกับโปรตีน IAP ที่ตำแหน่ง BIR domain

โปรตีน *PmHtrA2* ในงานวิจัยชิ้นนี้ก็เป็นหนึ่งในโปรตีนที่มี IBM จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง IBM ของโปรตีน *PmHtrA2* และโปรตีน IBM อื่นๆ รวมถึงโปรตีน HtrA2 จากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ดังรูปที่ 2.15 ทำให้พบรูปแบบการอนุรักษ์ดังนี้

1. กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 คืออลานีน
2. ตำแหน่งที่ 1 และ 2 เป็นกรดอะมิโนที่มี side chain เป็น hydrophobic และส่วนใหญ่มักจะ มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 4 เป็น hydrophobic ด้วยเช่นกัน

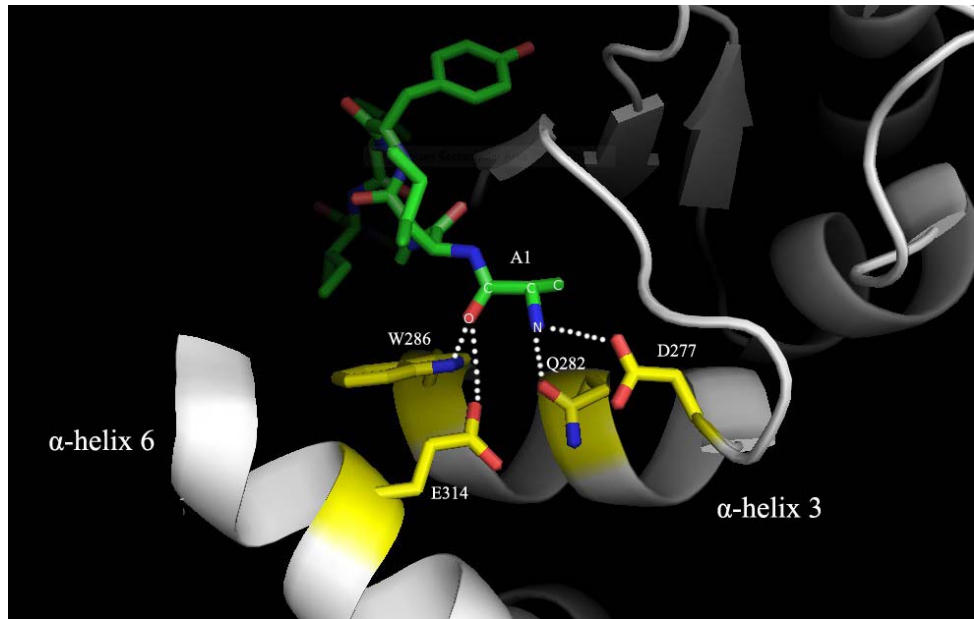
3. มีวาลีนเป็นกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 2

Hid	AVPF	
Grim	AIAY	
Reaper	AVAF	
smac	AVPI	
caspase-3	SGVD	
caspase-9	ATPF	IBM
<i>Penaeus monodon</i>	AVQA	HtrA2
<i>Aedes aegypti</i>	TVTA	
<i>Canis familiaris</i>	SVLG	
<i>Mus musculus</i>	AVPA	
<i>Homo sapiens</i>	AVPS	

รูปที่ 2.15 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน IBM ของโปรตีนหลายชนิด

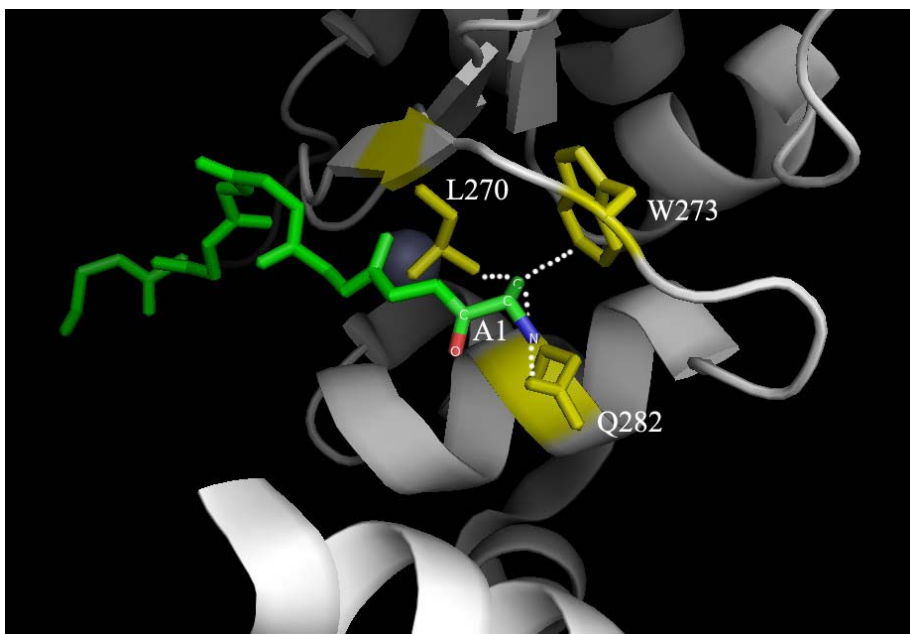
อย่างไรก็ตามอาจจะพบได้ว่า IBM ของโปรตีน caspase อาจไม่เกินไปตามการอนุรักษ์ดังกล่าวมากนัก สามารถพบกรดอะมิโนที่ไม่ใช่ hydrophobic ปนเข้ามามากกว่า IBM จากโปรตีนอื่น ทำให้เป็นข้อสังเกตว่าลักษณะเช่นนี้อาจทำให้ IBM ของ caspase สร้างพันธะได้อ่อนกว่า IBM จากโปรตีนชนิดอื่น ข้อสังเกตนี้สามารถอธิบายต่อไปว่า เมื่อโปรตีนจำพวก death effectors ถูกปลดปล่อยเพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ภายในเซลล์ และมีการเข้าทำปฏิสัมพันธ์กับ IAP อย่างแน่นแฟ้นกับโปรตีน caspase เนื่องจาก IBM ของโปรตีน caspase อาจสร้างพันธะได้อ่อนกว่า ดังที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นจึงอาจทำให้โปรตีน death effectors เป็นฝ่ายชนะในการแข่งขันเสมอ และทำให้โปรตีนดังกล่าวสามารถทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis ได้อย่างลุล่วงในที่สุด

มีการศึกษาเชิงโครงสร้างของปฏิสัมพันธ์ของ IBM และ BIR ในแมลงหวี่ (Wu et al., 2001) โดยได้ทำการดักจับโปรตีน BIR2 ของ IAP จากแมลงหวี่ (DIAP) ที่กำลังจับกับ IBM ของโปรตีน Grim ของแมลงหวี่ ทำให้ค้นพบว่า IBM ของ Grim นั้นจะใช้กลานินซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวแรก สอดแทรกเข้าไปใน hydrophobic groove ของ BIR จากนั้นกลานิน (A1) จะใช้หมู่อะมิโนสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ side chain ของกรดอะมิโนแอสปาดิกแอซิด 277 (D277) และกลูตามีน 282 (Q282) จาก α -helix 3 ของ BIR2 ในขณะที่วงแหวนหมู่คาร์บอกซิลจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนทริปโตฟาน 286 (W286) จาก α -helix 3 และ กลูตามิกแอซิด 314 (E314) จาก α -helix 6 ดังแสดงในรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 การสร้างพันธะไฮโดรเจนของอลานีนของ IBM ของ Grim กับ side chain ของกรดอะมิโนต่างๆใน BIR2 ของ DIAP

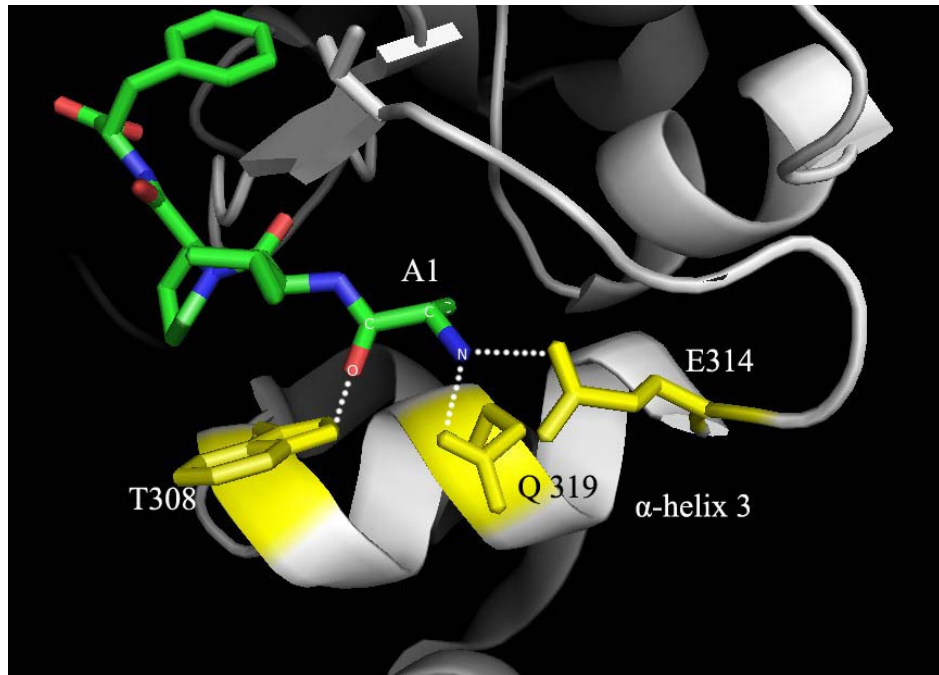
นอกจากจะมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนแล้ว ออลานีน (A1) ก็ยังสร้างพันธะแวนเดอวาลกับ side chain ของกรดอะมิโนที่อยู่บนพื้นผิวของ BIR groove ด้วย โดยหมู่เมทิลของ ออลานีน (A1) ซึ่งอยู่ชิดกับ hydrophobic groove มากที่สุดจะสร้างพันธะกับ side chain ของกรดอะมิโนลิวซีน 270 (L270), ทริปโตฟาน 273 (W273), และกลูตามีน 282 (Q282) ดังรูปที่ 17 จากนั้นกรดอะมิโนตัวต่อๆมาของ IBM ก็จะสร้างพันธะไฮโดรเจนและแวนเดอวาลตามพื้นผิว hydrophobic ของ BIR groove ทำให้เกิดการจับกันของทั้งสองโปรตีน



รูปที่ 2.17 การสร้างพันธะแวนเดอวาลของอลานีนของ IBM ของ Grim กับ side chain ของกรดอะมิโนต่างๆใน BIR2 ของ DIAP

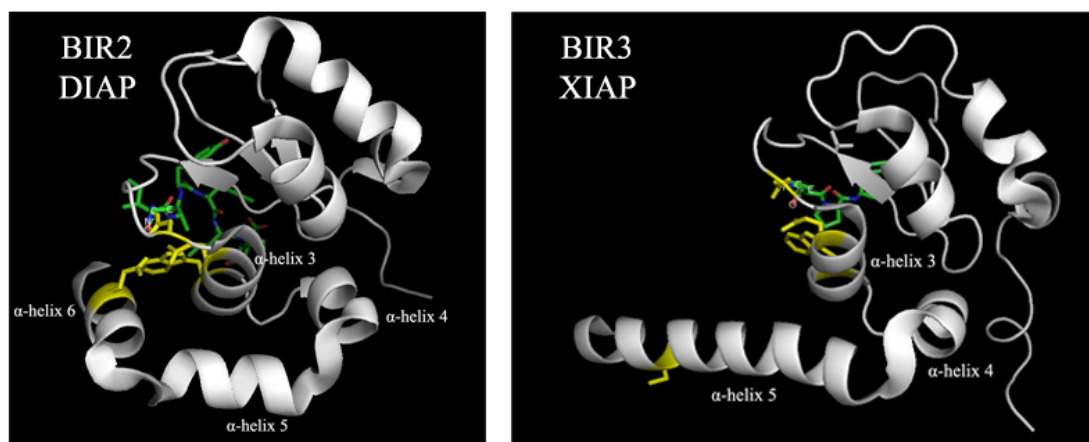
2.3.4 ลักษณะของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง IBM และ BIR domain ที่ถูกอนุรักษ์ไว้

การสร้างพันธะไฮโดรเจนของอลานีนกับกรดอะมิโนใน BIR groove ดังที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ไม่ได้พบเพียงในแมลงหวี่เท่านั้น แต่เป็นรูปแบบการทำให้ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นกับการทำให้ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง IBM และ BIR ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วย เช่นในการทำให้ปฏิสัมพันธ์ของ BIR3 ของ XIAP กับ IBM ของ smac ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ก็ใช้ลักษณะดังกล่าวในการทำให้ปฏิสัมพันธ์ โดยจะใช้หมู่อะมิโนสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ side chain ของ กลูตามิกแอซิด 314 (E314) และ กลูตามีน 319 (Q319) ซึ่งอยู่บน α -helix 3 และใช้หมู่คาร์บอกซิลสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ side chain ของ ทรีโอนีน 308 (T308) บน α -helix 3 เช่นเดียวกับปฏิสัมพันธ์ในแมลงหวี่ ดังแสดงในรูปที่ 2.18



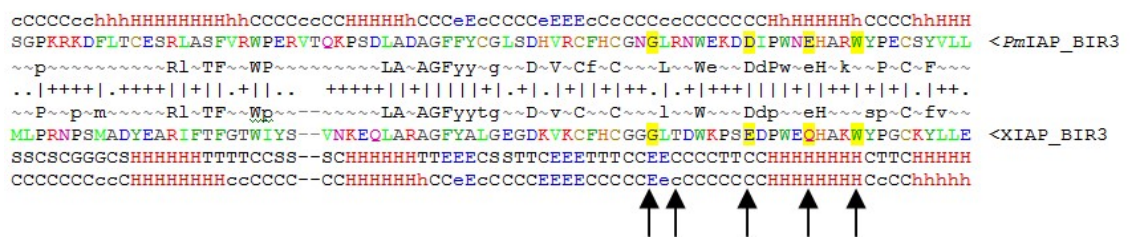
รูปที่ 2.18 การสร้างพันธะไฮโดรเจนของอลานีนของ IBM ของ Smac กับ side chain ของกรดอะมิโนต่างๆใน BIR3 ของ XIAP

สิ่งที่แตกต่างกันคือในแมลงหวี่นั้นการเรียงตัวของ α -helix 4, 5, และ 6 จะทำมุมฉากต่อกันละกัน ทำให้ กลูตามิกแอซิด 314 (E314) จาก α -helix 6 ของ BIR2 ของ DIAP สามารถสร้างพันธะกับหมู่คาร์บอกซิลของอลานีน 1 (A1) ได้อีก 1 พันธะ ส่วนการเรียงตัวของ α -helix 5 และ 6 ของ BIR3 ของ XIAP นั้นมีลักษณะต่อกันเป็น helix เดียว ทำให้ไม่มีการวนมาสร้างพันธะไฮโดรเจนเพิ่มอีก 1 พันธะกับอลานีน 1 (A1) ของ Smac ดังแสดงในรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.19 ลักษณะการพับตัวที่ต่างกับของ BIR2 ของ DIAP และ BIR3 ของ XIAP

เมื่อใช้โปรแกรม HHpred (Söding, 2005; Söding et al., 2005) วิเคราะห์โครงสร้างระดับสองและลำดับกรดอะมิโนของ BIR3 จาก *PmIAP* โดยเปรียบเทียบกับ BIR3 จาก XIAP แล้วก็พบว่าโปรตีนทั้งสองมีลักษณะโครงสร้างระดับสองคล้ายคลึงกัน และมีการอนุรักษ์กรดอะมิโนที่ใช้ในการสร้างพันธะไฮโดรเจน ณ ตำแหน่งเดียวกันบนโครงสร้างระดับสอง ดังแสดงในรูปที่ 2.21 จะพบการอนุรักษ์ลักษณะของกรดอะมิโนแทบทุกตำแหน่ง ในตำแหน่งลูกศรที่ 3 แม้จะไม่ใช่กรดอะมิโนชนิดเดียวกัน แต่ side chain ของกรดอะมิโนทั้งสองก็มีลักษณะคล้ายคลึงกัน นอกจากกรดอะมิโนตรงตำแหน่งนี้ใน BIR3 อื่นๆ เช่น BIR2 ของ DIAP ก็จะมีปรากฏเป็น แอสปาดิกแอซิด (D) เช่นเดียวกับ *PmIAP*



รูปที่ 2.21 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างระดับสองของ BIR3

จาก *PmIAP* และ BIR3 จาก XIAP

การเปรียบเทียบลักษณะการอนุรักษ์ของการทำปฏิสัมพันธ์ของ IBM และ BIR ตลอดจนการอนุรักษ์ลักษณะของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่มีความสำคัญด้านการสร้างพันธะไฮโดรเจนของ BIR ต่างๆ ตลอดจน BIR ของ *PmIAP* เป็นสิ่งที่ชี้ว่าโปรตีน *PmIAP* นี้ น่าที่จะมีปฏิสัมพันธ์และมีหน้าที่เหมือนกันกับโปรตีน *PmIAP* ในสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งเป็นสิ่งที่สนับสนุนสมมติฐานของงานวิจัยชิ้นนี้

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือ

Autoclave (TOMY; SX-700)

Centrifuge (Centra-M2)

Fume hood (Super flow fume cupboard)

Lamina flow (36211 – 04; Labconco)

Micropipette 0.5 – 10 μ l (AV - 100; Accumax)

Micropipette 100 – 1,000 μ l (AV - 600; Accumax)

Micropipette 20 – 200 μ l (AV - 800; Accumax)

Microtube 1.5 μ l

Microwave (R – 3S68; Sharp)

Orbital shaker (4581; Thermo forma)

pH meter (713 pH meter; Metrohm)

Pipette controller (Fastpette V-2; Labnet)

Pipette tip of Micropipette 0.5 – 10 μ l (Croning)

Pipette tip of Micropipette 20 – 200 μ l (Croning)

Pipette tip of Micropipette 100 – 1,000 μ l (Gerinerlabotecnik)

Power supply (powrepac 200; Bio-Rad)

Refrigerator (SJ-D48H-BE; Sharp)

Refrigerator&Freezer (FC-19; Sharp)

Sonicator (SONIC & MATERIAL; VEX 600)

Spectrophotometer (SC; Labomed)

Top Loader balance (GF-3000; Diethelm)

Vortex mixer (vortex-2-genie G560E; Scientific industries)

Water bath (WB-14; MemMert)

PD10 desalting column

Protein purification column

3.1.2 สารเคมี

Trypnone, Yeast extract, Calcium chloride, Isophapyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), Sodium chloride, Imidazole, Triton X-100, Nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA; QIAGEN), Bromophenol blue, β -mercaptoethanol, Tris-base, Glycine, water, Sodium dodecyl sulfate, Acrylamide, Ammonium persulfate, N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), Acetic acid, methanol, Sodium hydroxide, Hydrochloric, Ethanol, Chloramphenicol, Kanamycin, Ampicillin, Potassium acetate, Rubidium chloride, Manganese chloride, 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS)

3.2 เชื้อแบคทีเรีย พลาสมิดและยีน

Bacteria *Escherichai coli* strain BL21 DE3 (invitrogen)

Bacteria *Escherichai coli* strain BL21 RIL (invitrogen)

Recombinant plasmid pET15bThio/BIR2

Recombinant plasmid pET15bThio/BIR3

Recombinant plasmid pET15bThio/*PmIAP*

Recombinant plasmid pET15bThio/*PmHtrA2*

Recombinant plasmid pET28b/ *PmHtrA2*

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน *PmHtrA2*

3.3.1.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pET28b ที่มียีน *PmHtrA2* และพลาสมิดลูกผสม pET15bThio ที่มียีน *PmHtrA2*, *PmIAP*, *BIR2*, และ *BIR3*

ยีน *PmHtrA2*, *PmIAP*, *BIR2*, และ *BIR3* ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR และโคลนเข้าสู่พลาสมิดลูกผสม pET15bThio หรือ pET28b โดยผู้ช่วยนักวิจัยของห้องปฏิบัติการ ใช้พลาสมิด pDhsp/V5/*PmIAP* เป็น template ในการทำ PCR ยีน *BIR2*, *BIR3*, และ *PmIAP* และใช้ pDhsp/V5/*PmHtrA2* เป็น template ในการทำ PCR ยีน *PmHtrA2*

3.3.1.2 การ Transformation พลาสมิดลูกผสม pET28b และ pET15bThio ที่มีอินเป้าหมายสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* BL21 DE3 และ BL21 RIL

ปิเปตพลาสมิดลูกผสมที่มีอินเป้าหมายปริมาตร 3 μ l ลงใน microtube ที่มี competent cell (ภาคผนวก ค) ของเชื้อ *E.coli* BL21 DE3 หรือ BL21 RIL ปริมาตร 200 μ l นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock โดยนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 60 วินาที ต่อจากนั้นเติม LB broth (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 800 μ l ลงใน microtube บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไป centrifuge ด้วยความเร็วที่ทำให้ได้ค่าแรงโน้มถ่วง 4500 xg เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลาย (supernatant) 900 μ l ทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ (pellet) เบบๆ จากนั้นนำเชื้อ 100 μ l ไป spread ลงบน LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 μ g/ml) สำหรับพลาสมิด pET15bThio หรือยาปฏิชีวนะ Kanamycin (ความเข้มข้นสุดท้าย 50 μ g/ml) สำหรับพลาสมิด pET28b แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.3.1.3 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน

ทำการเตรียมกล้าเชื้อ โดยใช้โคโลนีของเชื้อที่ได้จากการทดลอง 3.3.1.2 ใส่ลงใน LB broth ปริมาตร 3 ml ที่มียาปฏิชีวนะที่จำเพาะกับพลาสมิด จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเลี้ยงในตู้ incubator shaker ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำกล้าเชื้อ มาทำการถ่ายลงอาหาร LB broth โดยทำการดูดเชื้อปริมาตร 100 μ l ถ่ายลงในอาหารปริมาตร 3 ml ที่มียาปฏิชีวนะที่จำเพาะกับพลาสมิด แล้วทำการเลี้ยงในตู้ incubator shaker ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ค่า OD₆₆₀ ประมาณ 0.6-0.8

จากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างโปรตีนด้วยการเติม 1 M IPTG (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 μ l ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM) แล้วทำการเลี้ยงใน incubator shaker ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 15 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์แบบที่เรียโดยดูดตัวอย่างปริมาตร 3 ml นำไป centrifuge ด้วยความเร็วที่ทำให้ได้ค่าแรงโน้มถ่วง 4,500 xg เป็นเวลา 10 นาที

ละลายเซลล์ตะกอนตัวอย่างด้วย Buffer 1 (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตหรือ vortex จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator (ภาคผนวก ค) แล้วนำไป centrifuge ด้วยความเร็วที่ทำให้ได้ค่าแรงโน้มถ่วง 20,000 xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลาย supernatant ออก แล้วเติม Ni-NTA bead 50 μ l ลงใน supernatant นำไปเข้าเครื่อง shaker ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ด้วยความเร็วที่ทำให้ได้ค่าแรงโน้มถ่วง 4,500 xg เป็นเวลา 1 นาที ปิเปต

3.3.2 การผลิตและการทำบริสุทธิ์โปรตีน

3.3.2.1 การเลี้ยงเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

ทำการเตรียมกล้าเชื้อ โดยใช้เชื้อที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.1.3 ที่เก็บไว้ตู้แช่แข็ง -80°C ปริมาตร $100\mu\text{l}$ ใส่ลงใน LB broth ปริมาตร 10 ml ที่มียาปฏิชีวนะที่จำเพาะกับพลาสมิด จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียไปทำการเลี้ยงในตู้ incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำกล้าเชื้อมาถ่ายลงอาหาร LB broth โดยเปิดกล้าเชื้อปริมาตร 10 ml ลงในอาหารปริมาตร 1 ลิตร ที่มียาปฏิชีวนะที่จำเพาะกับพลาสมิด แล้วทำการเลี้ยงในตู้ incubator shaker ภายใต้อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ค่า OD_{660} ประมาณ 0.6-0.8 จากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างโปรตีนด้วยการเติม 1M IPTG ปริมาตร 1 ml ลงในอาหาร LB broth (IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM) แล้วทำการเลี้ยงใน incubator shaker ภายใต้อุณหภูมิ 15°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรีย ด้วยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อไป centrifuge ด้วยความเร็วที่ทำให้ได้ค่าแรงโน้มถ่วง $4,500 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที รวบรวมตะกอนเซลล์ทั้งหมดเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เพื่อทำการทำบริสุทธิ์โปรตีนต่อไป

3.3.2.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีน

การทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง Sonicator

หลังจากเก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์แล้วทำการเติม Buffer 1 ปริมาตร 30 ml ลงในหลอด falcon tube ขนาด 50 ml ที่มีตะกอนเซลล์อยู่ ละลายตะกอนเซลล์ด้วยการเปิดหรือ vortex จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator ติดตั้ง probe ที่ขนาดเหมาะสมกับปริมาตรสารละลายเซลล์ ใช้ amplitude 40% และทำการ sonicate โดยใช้เวลา pulse in 5 วินาที pulse off 5 วินาที จำนวน 5 cycles และระวังไม่ให้สารละลายเซลล์เกิดความร้อนระหว่างการ sonicate

การทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย Ni-NTA affinity chromatography

หลังจากทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง Sonicator แล้ว นำสารละลายของตะกอนเซลล์มาทำการ Centrifuge ด้วยความเร็วที่ทำให้ได้ค่าแรงโน้มถ่วง $20,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที แยก supernatant

หลังจากทำการบ่มโปรตีนกับ Ni-NTA bead แล้ว ค่อยๆปล่อยสารละลายในคอลัมน์ออกจนหมด จากนั้นล้าง Ni-NTA bead ที่กำลังจับกับโปรตีนอยู่ด้วย Buffer 1 ปริมาตร 1 column volume จำนวน 5 ครั้ง ตามด้วยการล้างด้วย Buffer 2 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 column volume จำนวน 5 ครั้ง เช่นกัน จากนั้นปล่อย Buffer ที่อยู่ในคอลัมน์ออกจนหมด แล้วเติม Buffer 3 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 ml ลงในคอลัมน์ ปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที โปรตีนจะถูกชะออกมาใน Buffer 3 จากนั้นค่อยๆปล่อย Buffer 3 ออก เพื่อเก็บสารละลายโปรตีน ทำการ Elution ทั้งหมด 5 ครั้ง จากนั้นแบ่งโปรตีนจาก Elution fraction ทั้งหมดตัวอย่างละ 10 μ l ไปตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

การเปลี่ยน Buffer ของโปรตีนด้วย PD10 desalting column

นำ Eluted fraction จากการทดลองที่ 3.3.2.2 มาทำการเปลี่ยน Buffer โดยการปิเปตสารละลายโปรตีนทั้งหมด (ปริมาตร 2.5 ml) ลงใน PD10 column ปล่อยสารละลายที่ไหลออกมาในตอนแรกทิ้งไปทั้งหมด จากนั้นเติมสารละลาย TEV cleavage buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.5 ml ลงในคอลัมน์ และเก็บสารละลายที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ในขั้นตอนนี้ไว้ (ปริมาตร 3.5 ml) จากนั้นแบ่งสารละลายโปรตีนที่ได้ตัวอย่างละ 10 μ l ไปตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

การตัดโปรตีน thioredoxin ออกจากโปรตีนเป้าหมาย

ผสมสารละลายโปรตีนที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.2.3 กับ TEV protease ในอัตราส่วน 1:5 จากนั้นผสมกับ DDT ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1mM บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นเตรียมคอลัมน์ทำบริสุทธิ์โปรตีนเหมือนในการทดลองที่ 3.3.2.2 โดยใช้ Ni-NTA bead 0.5 ml จากนั้นนำสารละลายผสมของโปรตีนและ TEV protease ที่ผ่านการบ่มแล้วใส่ลงในคอลัมน์ ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้โปรตีน Thioredoxin ที่ถูกตัดออกมาและโปรตีน TEV protease จับกับ Ni-NTA bead จากนั้นปล่อยสารละลายออกจากคอลัมน์ เก็บสารละลายดังกล่าวเอาไว้เป็นสารละลายโปรตีนเป้าหมายที่ผ่านการตัดด้วย TEV protease นำไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จะพบว่าโปรตีนมีขนาดเล็กลง

3.3.3 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmHtrA2* และ *PmIAP* ด้วยวิธี pull down assay

3.3.3.1 การตรวจสอบคุณภาพของโปรตีน

นำสารละลายโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบคุณภาพ มาผสมกับ SDS-PAGE loading dye ที่ปราศจาก mercaptoethanol จากนั้นนำไปทดสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

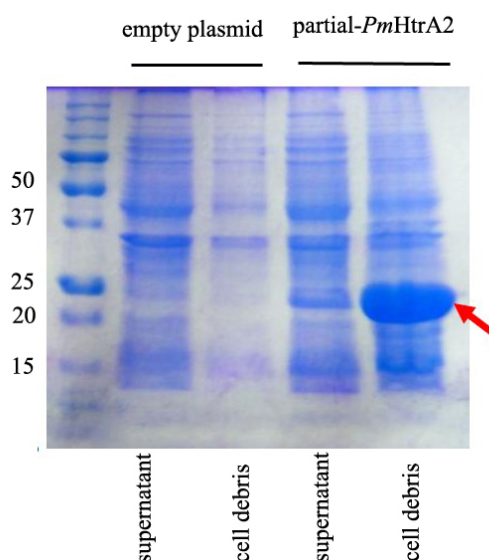
3.3.3.2 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน

ผสมโปรตีน *PmIAP* เวอร์ชันต่างๆ ปริมาตร 500 μ l กับ Ni-NTA bead 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้โปรตีนจับกับ Ni-NTA bead หลังจากนั้นเปิดสารละลายออกให้เหลือแต่ Ni-NTA bead และเติมโปรตีน *PmHtrA2* ที่ผ่านการตัดเอาโปรตีน thioredoxin ออกมาแล้ว ปริมาตร 500 μ l และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนเอาเฉพาะส่วนที่เป็น Ni-NTA bead และล้าง Ni-NTA bead ด้วย washing buffer (20 mM tris, 0.3mM NaCl, 15mM imidazole, 1X protease inhibitor, pH8) 10 นาที 3 ครั้ง จากนั้นใส่ loading buffer ลงใน Ni-NTA bead แล้วทำการตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน *PmHtrA2*

ก่อนหน้าการดำเนินงานชิ้นนี้ จากการศึกษาเบื้องต้นของ ดร. ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ ได้ทำการแสดงออกโปรตีน *PmHtrA2* ที่ไม่ครบส่วน (partial-*PmHtrA2*) อันประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ 177 – 351 ซึ่งครอบคลุม PDZ domain และส่วนหนึ่งของ serine protease เท่านั้น ผลปรากฏว่าเมื่อทำการทดสอบการแสดงออกโปรตีน partial-*PmHtrA2* บนพลาสมิด pET28b ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 DE3 พบว่าโปรตีน partial-*PmHtrA2* มีการแสดงออกมาในรูปที่ละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย โปรตีนส่วนใหญ่แสดงออกมาเป็น inclusion body ซึ่งตกตะกอนและรวมตัวอยู่ในส่วนของเศษเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ลักษณะดังกล่าวเป็นอุปสรรคต่อการผลิตโปรตีนที่มีคุณสมบัติที่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาขั้นสูงต่อไป เช่น การศึกษาโครงสร้างสามมิติ และการศึกษาปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่น ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้จึงพยายามทำการศึกษาวิธีที่จะสามารถผลิตโปรตีน *PmHtrA2* ในรูปแบบที่สามารถละลายน้ำได้

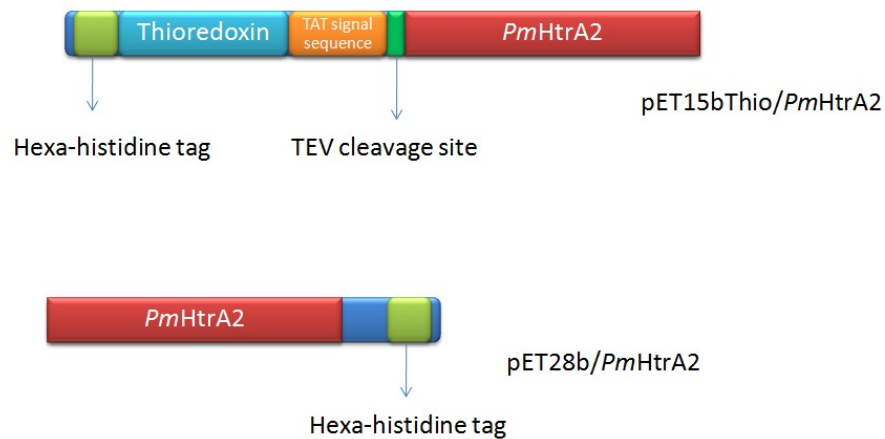


รูปที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน partial-*PmHtrA2* บนพลาสมิด pET28b

ในเซลล์ BL21 DE3 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ต่อมาการศึกษาเพิ่มจนทราบลำดับเบสทั้งหมดของยีน *PmHtrA2* เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างจึงทำให้รู้ว่าโปรตีนดังกล่าวประกอบด้วย 4 domains หลักคือ mitochondria localizing signal (MLS), transmembrane (TM), serine protease, และ PDZ domain นอกจากนี้ก็ยังค้นพบ IBM อยู่ระหว่าง transmembrane domain กับ serine protease ซึ่งตามทฤษฎีแล้ว ตรงส่วนนี้จะเป็นตำแหน่งที่เกิดการตัดสอง mitochondria localizing signal (MLS) และ transmembrane (TM) ที่ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนก่อนหน้า IBM 1 ตำแหน่งพอดี ทำให้โปรตีนที่ถูกตัดอยู่ในรูปแบบพร้อมทำงาน (mature HtrA2) จากการที่ค้นพบลำดับเบสของยีน *PmHtrA2* ที่สมบูรณ์นี้ จึงเกิดการวางแผนทำการผลิตโปรตีน *PmHtrA2* ในรูปแบบ mature *PmHtrA2* เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นสูงต่อไป

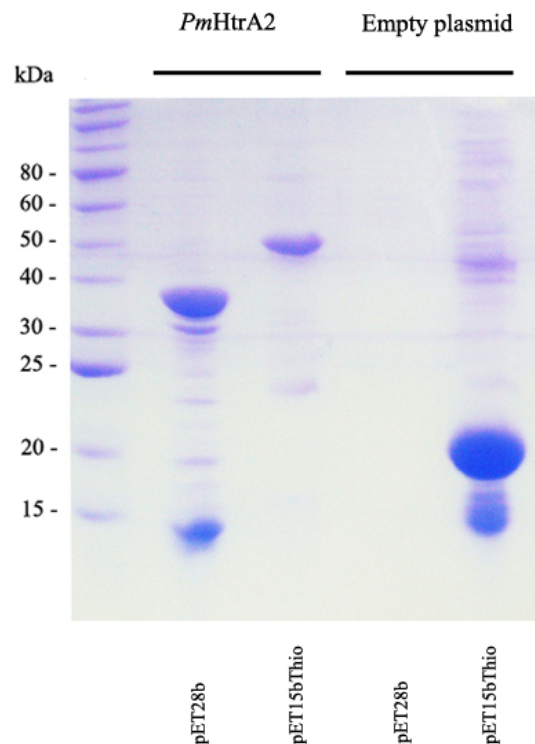
ยีน mature *PmHtrA2* จึงถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR และโคลนเข้าสู่พลาสมิดลูกผสม pET28b และ pET15bThio โดยผู้ช่วยนักวิจัยของห้องปฏิบัติการ พลาสมิด pET28b เป็นพลาสมิดพื้นฐานสำหรับแสดงออกยีน ซึ่งเคยถูกใช้มาแล้วเมื่อทำการแสดงออกยีน partial-*PmHtrA2* ส่วนพลาสมิด pET15bThio นั้นเป็นพลาสมิดที่ได้รับการดัดแปลงมาจากพลาสมิด pET15b ซึ่งมีการใส่ hexa-histidine tag, *E. coli* thioredoxin, TAT signal sequence, TEV substrate sequence, และ multiple cloning site เพิ่มเข้าไปในพลาสมิด pET15b เมื่อยีนในพลาสมิด pET15bThio ถูกถอดรหัสออกมา จะทำให้มีส่วนของโปรตีนลูกผสม hexa-histidine Tag, Thioredoxin, TAT signal sequence, และ TEV substrate sequence เชื่อมติดอยู่ในส่วน N-terminal ของโปรตีนเป้าหมาย การมีโปรตีนต่างๆเชื่อมติดเช่นนี้จะทำให้โปรตีนเป้าหมายมีลักษณะพิเศษดังนี้ 1. ด้วยคุณสมบัติของ Histidine tag จะทำให้โปรตีนลูกผสมมีความง่ายต่อการ Purification ด้วยการใช้ Ni NTA bead และยังสามารถตรวจสอบยืนยันโปรตีนได้ด้วยวิธีการ western blot ด้วยแอนติบอดีที่จดจำต่อ histidine tag 2. โปรตีน Thioredoxin จะช่วยทำให้โปรตีนมีการพับตัวที่ดี เสถียรขึ้น ละลายน้ำมากขึ้น และอาจช่วยให้มีการแสดงออกได้มากขึ้น (Edward et al., 1993) 3. TAT signal sequence จะทำให้เกิดการส่งโปรตีนที่ถูกผลิตไปเก็บไว้ใน periplasm ซึ่งเหมาะแก่การเก็บรักษาโปรตีน และ 4. TEV substrate sequence จะช่วยให้สามารถใช้เอนไซม์ TEV protease ตัดส่วนโปรตีนลูกผสมข้างต้นออกจากโปรตีนที่ผลิตได้ แผนภาพพลาสมิดดังกล่าวแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แผนภาพลักษณะส่วนประกอบทางโครงสร้างของโปรตีน *PmHtrA2* บนพลาสมิด pET15bThio/*PmHtrA2* และ pET28b/*PmHtrA2*

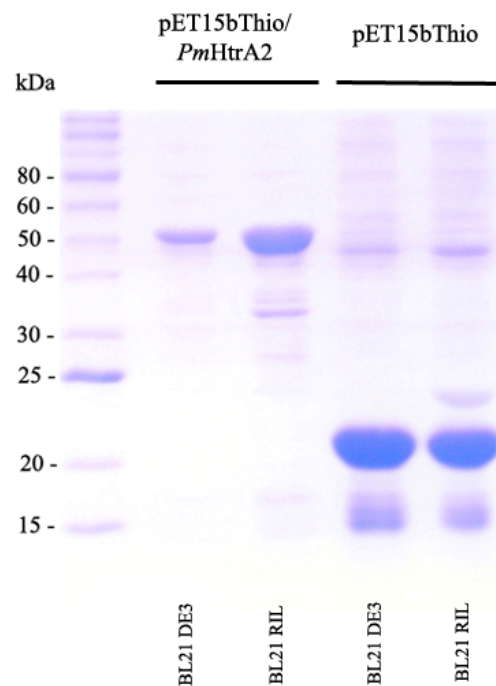
พลาสมิดลูกผสมทั้งหมดต่างถูก transform เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3) และ BL21 RIL จากนั้นทำการเลี้ยงและกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมดังที่กล่าวไปในส่วนของวิธีการทดลองที่ 3.3.1.3 หลังจากทำการตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ดังแสดงในรูปที่ 4.3 จากผลการทดลอง พบว่าโปรตีน *PmHtrA2* จากทั้งสองพลาสมิดสามารถแสดงออกในรูปแบบละลายน้ำได้ โปรตีนที่แสดงออกมีขนาดประมาณ 38 kDa สำหรับ pET28b และ 50 kDa สำหรับ pET15bThio ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ถูกคำนวณโดยโปรแกรม compute pI/Mw จากโปรแกรม expasy (

คือมีขนาด 39.4 kDa มีค่า pI เท่ากับ 7.35 สำหรับพลาสมิด pET28b และมีขนาด 53.5 kDa มีค่าเท่ากับ pI 6.4 สำหรับพลาสมิด pET15bThio อย่างไรก็ตามพบว่า โปรตีน *PmHtrA2* ที่ถูกผลิตด้วยเซลล์ BL21 DE3 มีลักษณะเหมือนถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ (degradation) ดังที่เห็นในรูปที่ 24 ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าโปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นด้วยพลาสมิด pET28b มีความไม่เสถียร ทำให้เกิดการสลายตัวเอง (self degradation) ต่างจากโปรตีน *PmHtrA2* ที่ถูกแสดงออกด้วยพลาสมิด pET15bThio ไม่พบการแตกหักของโปรตีนแต่อย่างใด หากแต่มีการแสดงออกของโปรตีนน้อยกว่าใน pET28b ทั้งนี้การแสดงออกของพลาสมิด pET15bThio ที่ไม่มียีน *PmHtrA2* จะพบการแสดงออกของ thioredoxin ที่มีขนาดประมาณ 20 kDa



รูปที่ 4.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน *PmHtrA2* ด้วยพลาสมิด pET28b และ pET15bThio ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

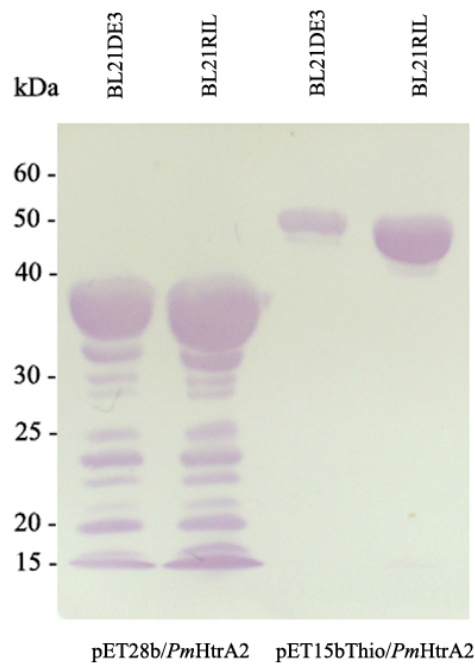
เมื่อทำการวิเคราะห์ codon bias จากลำดับเบสของยีน *PmHtrA2* พบว่าทั้งสองยีนมี codon ที่พบได้น้อยในเซลล์ *E.coli* อยู่หลายตำแหน่ง ดังนั้นจึงได้มีการเลือกใช้ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 RIL มาใช้ในการแสดงออกโปรตีน ซึ่งเซลล์ BL21 RIL นั้นมีการตัดต่อยีน tRNA สำหรับ rare codon 3 ชนิดคือ Arginine (AGA และ AGG), Leucine (AUA), และ Isoleucine (CUA) เพิ่มเข้าไปในโครโมโซม ทำให้โปรตีน *PmHtrA2* ที่ถูกถอดรหัสด้วยเซลล์ BL21 RIL มีโอกาสประสบความสำเร็จในการ translation สูงกว่าโปรตีน *PmHtrA2* ที่ถูกแสดงออกด้วยเซลล์ BL21 DE3 ธรรมดา ดังนั้นเมื่อพลาสมิดลูกผสม pET15bThio/*PmHtrA2* แสดงออกในเซลล์ BL21 RIL ก็พบว่ามีความการแสดงออกของโปรตีน *PmHtrA2* เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้เซลล์ BL21 DE3 จริง ดังในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน *PmHtrA2* ด้วยพลาสมิด pET15bThio

ในเซลล์เจ้าบ้าน BL21 DE3 และ BL21 RIL ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

จากข้อสังเกตเรื่องการเสื่อมสภาพของโปรตีน จึงมีการตรวจสอบโปรตีน *PmHtrA2* ที่แสดงออกในเซลล์และพลาสมิดชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Western blot ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ histidine tag เพื่อยืนยันการแตกสลายและเสื่อมสภาพของโปรตีน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.5 พบแถบโปรตีนขนาดเล็กกว่าแถบโปรตีน *PmHtrA2* อยู่หลายแถบ เนื่องจากการทดสอบนี้ใช้แอนติบอดีที่จดจำต่อ histidine tag เป็นตัวตรวจจับโปรตีน ดังนั้นจึงสามารถชี้ให้เห็นได้ว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏคือโปรตีน *PmHtrA2* ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ โดยจะพบการเสื่อมสลายของโปรตีน *PmHtrA2* เฉพาะที่ถูกผลิตจากพลาสมิด pET28b เท่านั้น

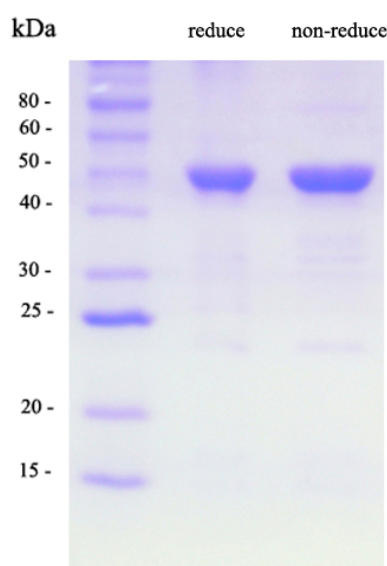


รูปที่ 4.5 การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีน *PmHtrA2* ด้วยวิธี Western blot

โดยทั่วไปแล้ว โปรตีนจากยูคาริโอตนั้นมักจะมีปัญหาในการแสดงออกได้ยากในระบบแบคทีเรีย เนื่องจากในเซลล์ยูคาริโอตจะมีสภาพแวดล้อมและกระบวนการที่ต่างไปจากในเซลล์แบคทีเรีย เช่น มีการใช้ codon ที่พบได้น้อยในแบคทีเรีย และมีกระบวนการ post translation ดังนั้นระบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม thioredoxin (thioredoxin fusion partner expression system) จึงสามารถช่วยทำให้โปรตีนจากยูคาริโอตสามารถรักษาความเสถียรได้มากขึ้น โปรตีน thioredoxin นั้นสามารถทำหน้าที่เป็น self chaperon ได้ เนื่องจากคุณสมบัติของ thioredoxin เป็นโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ดี ทนความร้อน มีความเสถียรสูง สามารถเหนี่ยวนำให้โปรตีนที่ถูกเชื่อมต่อกับมีคุณสมบัติดังกล่าวตามไปด้วย และการใช้เซลล์เจ้าบ้านที่มีการเพิ่ม codon เป็นพิเศษก็สามารถช่วยให้ช่วยให้ยีนมีโอกาสประสบความสำเร็จในการ translation เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นมามีปริมาณมากขึ้น

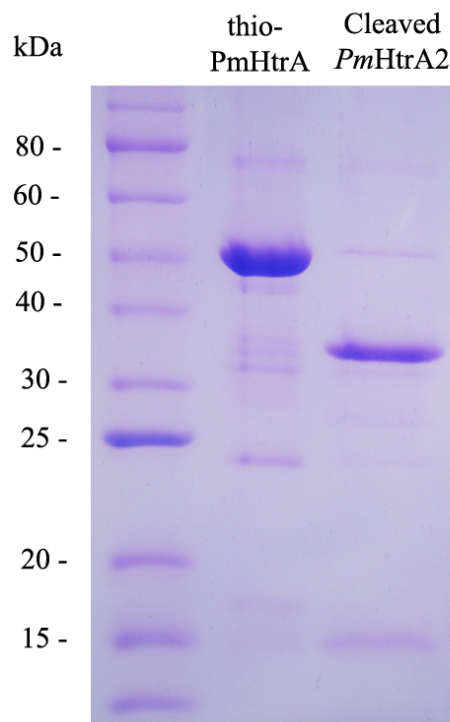
4.2 การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน *PmHtrA2*

จากผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน *PmHtrA2* บ่งชี้ว่าระบบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม thioredoxin ด้วยพลาสมิด pET15bThio และเซลล์เจ้าบ้าน BL21-RIL มีความเหมาะสมในการผลิตโปรตีน *PmHtrA2* ในการทดลองต่อมาจึงมีการผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนทั้งสองในปริมาณที่มากขึ้นตามวิธีการทดลองที่ 3.3.2 ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 4.6 โปรตีน *PmHtrA2* นั้น



รูปที่ 4.6 การวิเคราะห์คุณภาพโปรตีน *PmHtrA2* ที่ผ่านการถูกทำบริสุทธิ์ผ่าน Ni NTA column ในสภาวะ reducing และ non-reducing โดยวิธี SDS-PAGE

อย่างไรก็ตามโปรตีน *PmHtrA2* ที่ทำบริสุทธิ์ได้นั้นมีส่วนของโปรตีนลูกผสม thioredoxin และ hexahistidine tag เชื่อมติดอยู่ในส่วน N-terminal ซึ่งทำให้โปรตีนที่ผลิตได้อาจมีโปรตีนลูกผสมมาขัดขวางการทําปฏิสัมพันธ์ของ IBM กับ BIR ในขั้นตอนการทํา pull down assay ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องตัดส่วนโปรตีนลูกผสมออกไปจากโปรตีน *PmHtrA2* ทั้งนี้ด้วยการออกแบบให้มีส่วน TEV cleavage site อยู่ระหว่างโปรตีนลูกผสมและโปรตีน *PmHtrA2* จึงทำให้สามารถใช้ TEV protease ตัดโปรตีนลูกผสมออกไปได้ ในการทดลองขั้นต่อไปจึงได้ทำการตัดส่วนโปรตีนลูกผสมออกด้วยเอนไซม์ TEV protease ซึ่งจำเพาะกับลำดับกรดอะมิโน ENLYFQGGs ที่อยู่ระหว่าง IBM ของ *PmHtrA2* กับโปรตีนลูกผสม เมื่อทำการบ่มโปรตีน *PmHtrA2* ร่วมกับเอนไซม์ TEV protease แล้วทำการกำจัดโปรตีนลูกผสมด้วยการนำสารละลายโปรตีนผ่าน Ni NTA bead โปรตีน TEV และโปรตีนลูกผสม thioredoxin ที่ถูกตัดออกมาจะถูกจับด้วย Ni NTA bead ส่วนโปรตีน *PmHtrA2* ไม่ถูก Ni NTA bead จับ จึงสามารถเก็บโปรตีน *PmHtrA2* ได้จาก flow through หลังจากตรวจสอบโปรตีน



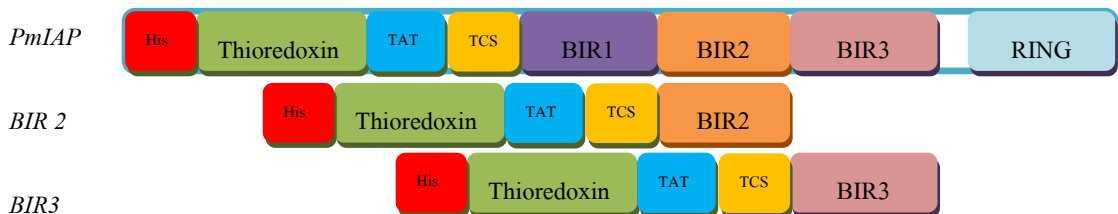
รูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์โปรตีน โปรตีน *PmHtrA2* ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ TEV protease ด้วยวิธี SDS-PAGE

4.3 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์โปรตีน

PmIAP

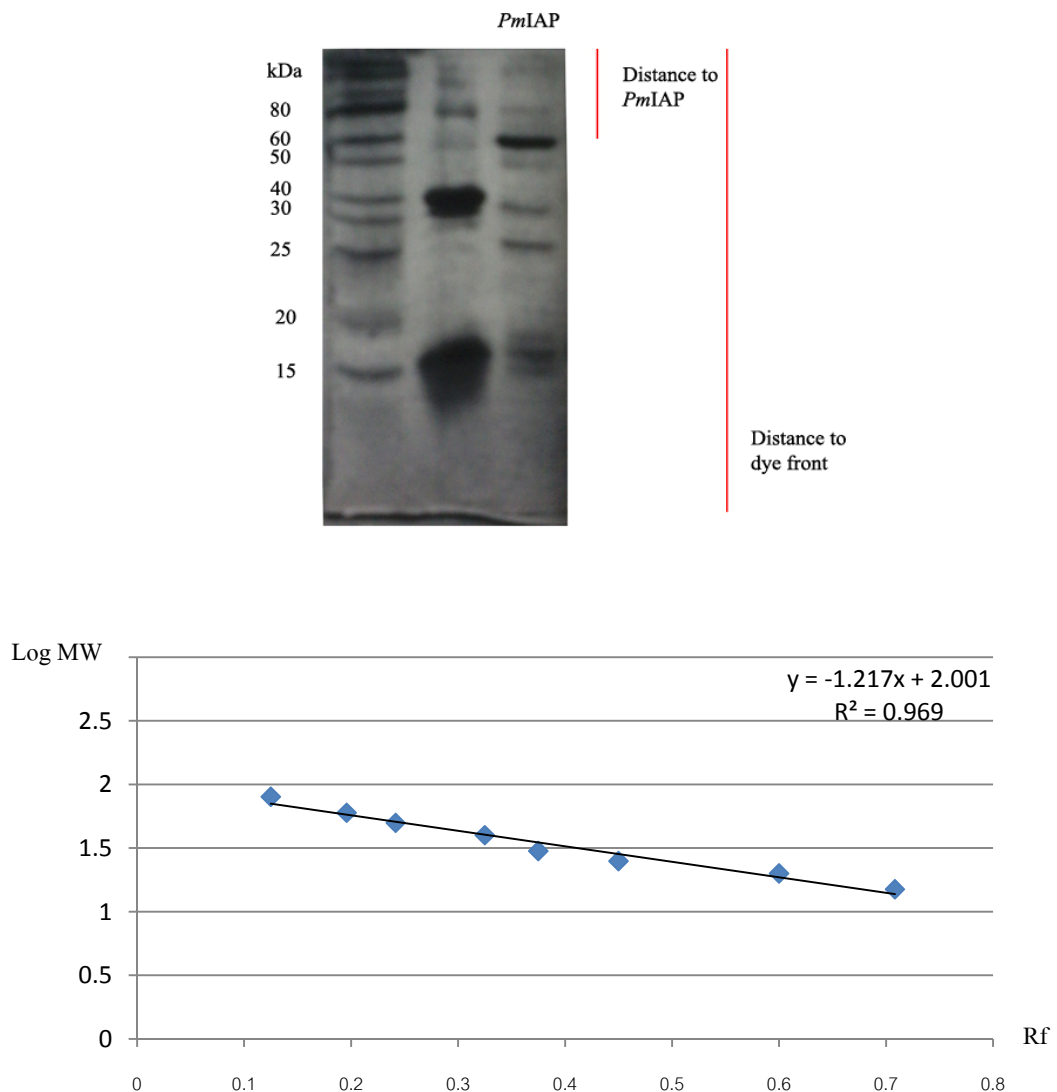
โดยทั่วไปปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmIAP* กับ IBM protein จะเกิดตรงตำแหน่ง BIR2 และ BIR3 domain (ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องผลิตโปรตีน *PmIAP* ขนาดสมบูรณ์ เนื่องจากการผลิตโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะเป็นงานที่มีความยากลำบากสูง อย่างไรก็ตามในงานวิจัยชิ้นนี้ นอกจากจะพยายามผลิตส่วน BIR2 และ BIR3 แล้ว ก็ยังได้ลองทำการผลิตโปรตีน *PmIAP* ขนาดสมบูรณ์ด้วย

ยีน *PmIAP*, *BIR2*, และ *BIR3* จึงถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ไพรมเมอร์ถูกออกแบบให้จำเพาะกับลำดับเบสที่ครอบคลุมแต่ละชิ้นส่วนของโปรตีน *PmIAP* ดังรูปที่ 4.8 ยีน *PmIAP* และ *BIR* ทั้ง 2 เวอร์ชันถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิด pET15b/Thio โดยผู้ช่วยนักวิจัยของห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 4.8 ลักษณะโครงสร้างของโปรตีน *PmIAP* และ *BIR* ที่ถูกแสดงออกโดยพลาสมิด pET15bThio

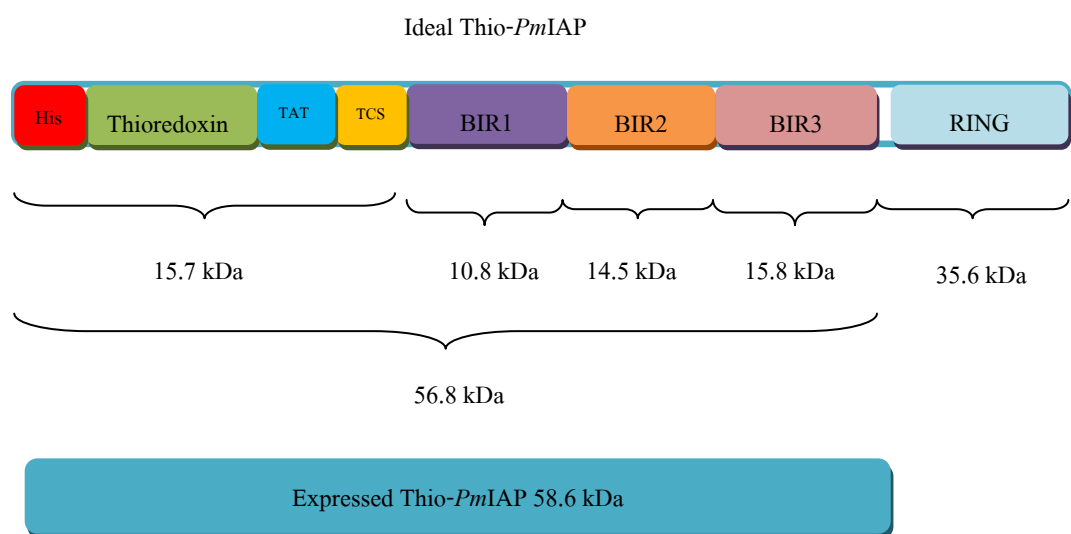
หลังจากที่ได้ทำการโคลนแล้วจึงทำการ transformation พลาสมิดทั้งหมดเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* BL21 RIL จากนั้นทำการเลี้ยงและกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว ซึ่งผลปรากฏว่าโปรตีน *BIR2* และ *BIR3* สามารถแสดงออกได้ดี โดยโปรตีนที่แสดงออกมีขนาดประมาณ 30 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีน *BIR2* และ *BIR3* ที่ถูกคำนวณค่าทางทฤษฎี คือ 31.7 kDa และ 30.3 kDa และมีค่า pI 6.38 และ 6.79 ตามลำดับ ในส่วนของโปรตีน *PmIAP* นั้นสามารถแสดงออกได้ปริมาณน้อย และมีขนาดประมาณ 60 kDa ซึ่งไม่ตรงกับค่าที่คำนวณได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ คือ 92.5 kDa จึงได้ทำการคำนวณขนาดที่แน่ชัดของโปรตีนโดยใช้วิธีวัดค่า R_f (Ian, 2005) ดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 รูปเจลที่ใช้ในการคำนวณและกราฟที่พล็อตระหว่างค่า log MW และค่า Rf ของ maker

เมื่อแทนค่า Rf ของโปรตีน *PmIAP* ในสมการที่ได้จากกราฟจะได้เป็นสมการ $y = -1.217(0.1916) + 2.001$ ซึ่งสามารถคำนวณค่า log MW ของโปรตีน *PmIAP* ได้ 1.7678228 เมื่อคำนวณกลับจึงสามารถทราบค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนลูกผสม Thioredoxin-*PmIAP* คือ 58.58991 kDa ซึ่งต่างจากค่าที่คำนวณได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Expasy) ซึ่งมีขนาด 92.5 kDa ดังนั้นจึงแปลว่าโปรตีน *PmIAP* ที่สามารถแสดงออกมาได้นี้เป็นชิ้นส่วนโปรตีนที่ไม่สมบูรณ์ คือมีกรดอะมิโนไม่ครอบคลุมทุกโมเลกุลของ *PmIAP*

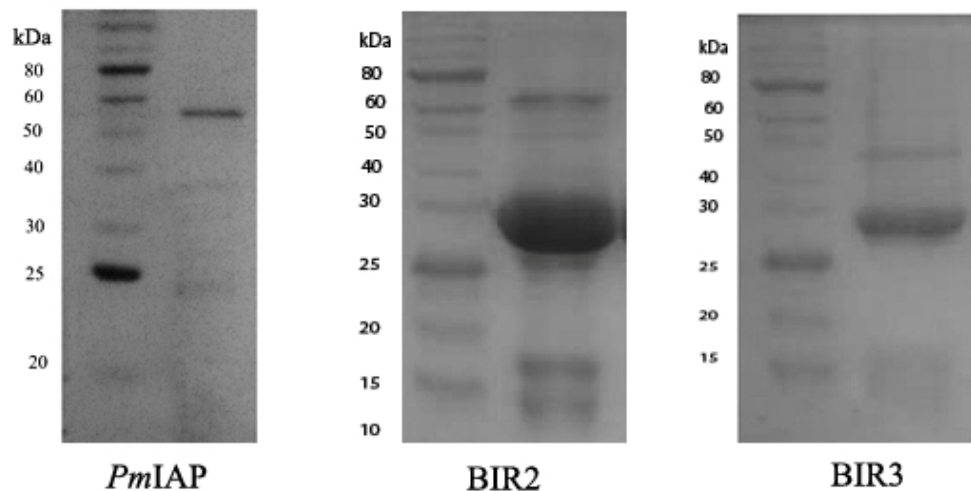
จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนลูกผสม thioredoxin- *PmIAP* พบว่า โปรตีน Thioredoxin มีขนาด 15.7 kDa ส่วนที่เป็น BIR domain ทั้ง 3 domain มีขนาดรวมกัน 41.1 kDa เมื่อรวมกับส่วนของ thioredoxin แล้วจะได้เป็นขนาด 56.8 kDa และจากข้อสังเกตว่า โปรตีนที่สามารถถูก



รูปที่ 4.10 แผนภาพโครงสร้างและขนาดของ domain ต่างๆของโปรตีน *PmIAP* ในพลาสมิด pET15bThio และขนาดของโปรตีน Thio-*PmIAP* ที่ถูกแสดงออก

แม้ว่าโปรตีน *PmIAP* จะมีการแสดงออกอย่างไม่สมบูรณ์ก็ตาม แต่โปรตีน *PmIAP* ขนาด 58.6 kDa นี้ยังคงมีส่วนของ BIR ทั้งสาม domain อยู่ครบ ซึ่ง BIR domain ทั้งสามเป็นส่วนที่ใช้ในการทำปฏิสัมพันธ์กับ IBM ดังนั้นจึงเชื่อว่าโปรตีนชิ้นส่วนนี้น่าจะยังคงมีคุณสมบัติที่จะสามารถทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน *PmHtrA2* ได้

ต่อจากนั้น จึงได้ทำการผลิตโปรตีน *PmIAP*, BIR2, และ BIR3 โดยการเลี้ยงในสถานะเดิม ข้างต้น ในปริมาณมากขึ้น เมื่อโปรตีนถูกทำบริสุทธิ์ด้วย Ni NTA bead affinity chromatography และผ่านการเปลี่ยน Buffer ด้วย PD10 column สุดท้ายโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ถูกนำมาทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE ดังแสดงในรูปที่ 4.11

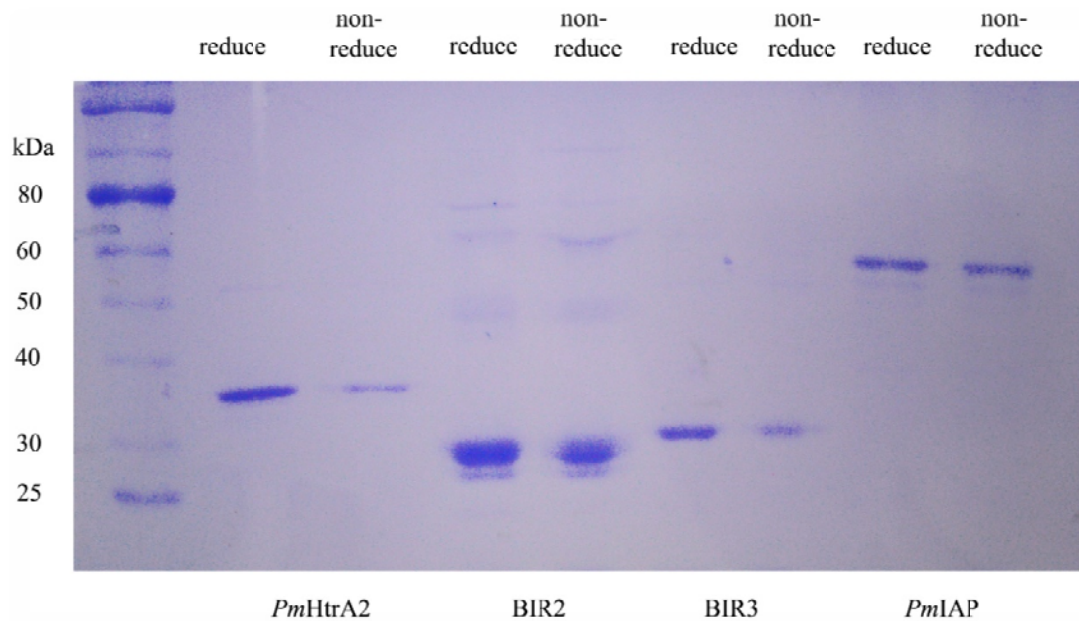


รูปที่ 4.11 การวิเคราะห์โปรตีน *PmIAP*, BIR2, และ BIR3 ภายหลังจากทำบริสุทธิ์โดย Ni NTA column ด้วยวิธี SDS-PAGE

การทดลองนี้ความประสบความสำเร็จในการผลิตโปรตีน N-terminal *PmIAP*, BIR2, และ BIR3 โปรตีนที่ได้มีขนาดตรงกับที่เคยทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน หลังจากนั้นโปรตีนจะถูกเก็บเพื่อรอทำการทดลองขั้นต่อไป

4.4 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmHtrA2* และ *PmIAP* ด้วยเทคนิค pull down assay

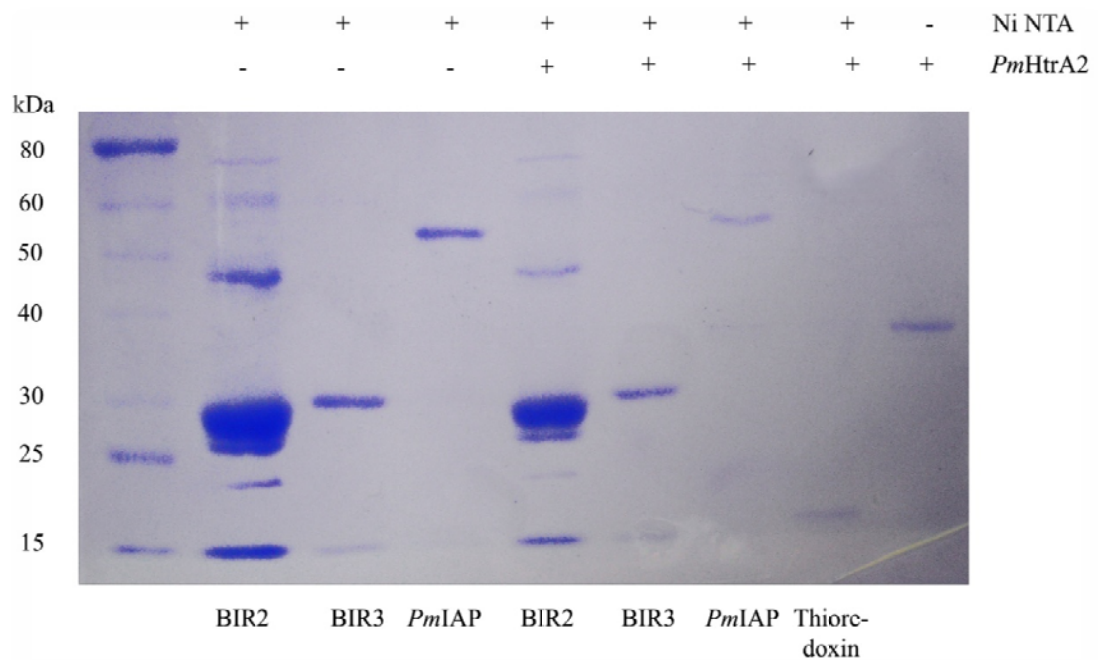
โปรตีน *PmHtrA2*, *PmIAP*, BIR2, และ BIR3 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และพร้อมทำการทดลอง ถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพของโปรตีน โดยการทดสอบ SDS-PAGE ในสภาวะ reducing และ non-reducing เพื่อตรวจสอบคุณภาพของโปรตีน จากผลการทดลองพบว่าแถบโปรตีนในสภาวะ non-reducing ของโปรตีนทั้งหมดมีลักษณะเป็นแถบแถบเดียว ไม่มีลักษณะการกระจายตัว ดังแสดงในรูปที่ 4.12 ซึ่งบ่งชี้ว่าโปรตีนทั้งหมดมีการพับตัวในรูปแบบเดียวกันสม่ำเสมอ อันน่าจะเป็นรูปแบบตามธรรมชาติ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าโปรตีนดังกล่าวพร้อมที่จะถูกนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.12 การตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะ reducing และ non-reducing

ในการทำการทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน ด้วยวิธี pull down assay นั้น โปรตีน *PmIAP*, *BIR2*, และ *BIR3* ถูกจับให้ตกตะกอนด้วย Ni NTA bead จากนั้นโปรตีน *PmHtrA2* จะถูกเติมลงไป ในหลอดทดลอง และนำไปบ่มเพื่อให้โปรตีนเกิดการทำให้ปฏิสัมพันธ์กัน หลังจากล้าง Ni NTA bead ด้วย washing buffer แล้วจึงนำ Ni NTA bead มาทำการทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE หากว่าโปรตีน *PmHtrA2* สามารถจับกับโปรตีน *PmIAP* ในเวอร์ชันใดเวอร์ชันหนึ่งได้ ก็จะสามารถปรากฏบนแผ่นเจล จากผลการทดลองข้างต้น ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ไม่พบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmHtrA2* กับโปรตีน *PmIAP* ในทั้งสามเวอร์ชันเลย กล่าวคือในการทดสอบจะพบแต่เพียงแถบโปรตีน *PmIAP* เวอร์ชันต่างๆ เท่านั้น แต่ไม่พบแถบโปรตีน *PmHtrA2* ที่ขนาดประมาณ 37 kDa

เนื่องจากโปรตีน *PmIAP* ในการทดลองนี้เป็นโปรตีนลูกผสมที่มีส่วนของ thioredoxin เชื่อมอยู่ด้วย ในการทดลองนี้จึงได้ทำ control เพื่อป้องกันผลบวกปลอมที่อาจเกิดจากการของ thioredoxin กับโปรตีน *PmHtrA2* โดยจะนำเฉพาะส่วนของโปรตีนลูกผสม thioredoxin ที่มี hexahistidon tag มาจับกับ Ni NTA bead จากนั้นนำมาบ่มกับโปรตีน *PmHtrA2* ซึ่งใช้สภาวะการทดลองเดียวกับโปรตีน *PmIAP* เวอร์ชันต่างๆ ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ว่าโปรตีน *PmHtrA2* จะไม่สามารถจับกับโปรตีน thioredoxin ได้



รูปที่ 4.13 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยวิธี pull down assay

ซึ่งกรณีการไม่พบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนดังกล่าวในการทดสอบแบบ *in vitro* ด้วยเทคนิค pull down assay นั้นอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ โดยสันนิษฐานว่า สาเหตุหลักเกิดจากหลังการตัดส่วนโปรตีนลูกผสม thioredoxin ออกไปจาก N-terminal ของโปรตีน *PmHtrA2* นั้นทำให้โปรตีน *PmHtrA2* มีกรดอะมิโนเกินมา 3 โมเลกุลทางด้านปลาย N-terminal ซึ่งจะทำให้ปลาย N-terminal ของโปรตีน *PmHtrA2* ที่สังเคราะห์ได้มีลำดับ GGS AVQA ต่างจากลำดับในธรรมชาติคือมีเพียง AVQA เท่านั้น ซึ่งถึงแม้ว่ากรดอะมิโนสองตัวที่เกินมาจะเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดไม่ใหญ่มาก แต่กรดอะมิโนดังกล่าวมี side chain เป็นพวก hydrophilic ซึ่งในธรรมชาตินั้นกรดอะมิโนสองตัวแรกของโปรตีน mature *PmHtrA2* คืออลานีนและวาเลอีน มี side chain เป็นพวก hydrophobic การมีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติที่กลับตาลปัตรจากสภาวะธรรมชาติเช่นนี้จึงอาจมีผลต่อการทำปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสอง เนื่องจากตามทฤษฎีแล้ว การวิธีที่ IBM สร้างพันธะกับ BIR นั้นจะเป็นการยื่นส่วนปลายของ IBM เข้าไปในร่องของ BIR ที่มีพื้นผิวเป็น hydrophobic ออลานีนจะสร้างพันธะไฮโดรเจน 4 พันธะกับกรดอะมิโนโดยรอบ ส่วนกรดอะมิโนอีกสามตัวถัดมาจะทาบบนพื้นผิว hydrophobic และสร้างพันธะแวนเดอวาล์กับกรดอะมิโนที่พื้นผิวนั้น (Wu et al., 2001) การที่มีกรดอะมิโนที่เป็น hydrophilic สองตัวเพิ่มเข้ามาต่อจากอลานีนทางด้าน N-terminal อาจรบกวนการยื่นปลายอลานีนเข้าไปด้านใน ซึ่งมีโอกาสส่งผลกระทบต่อปฏิสัมพันธ์ดังกล่าว

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

ในปัจจุบันความรู้ความเข้าใจในกระบวนการ apoptosis ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ นั้นมีอยู่มาก แต่ก็มีข้อจำกัดคือแม้มีการศึกษา วิจัย และสังเคราะห์ความรู้ด้าน apoptosis ออกมาและสามารถทำความเข้าใจในกระบวนการ apoptosis ได้ในเชิงลึก แต่ก็ยังจำกัดอยู่แต่เพียงในสัตว์ไม่กี่ชนิดที่เป็นโมเดลศึกษาทางชีววิทยาเท่านั้น ดังนั้นเมื่อนักวิจัยต้องการความรู้ความเข้าใจในกระบวนการ apoptosis ในสัตว์บางชนิดที่มีลักษณะแตกต่างกับสิ่งมีชีวิตที่เป็นโมเดลศึกษาเหล่านั้น ก็ไม่อาจใช้ข้อมูลจากกระบวนการ apoptosis ในสิ่งมีชีวิตโมเดลได้ หากแต่จำเป็นต้องสร้างองค์ความรู้ขึ้นจากการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่ตนเองกำลังสนใจขึ้นมาเท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กุ้ง เป็นสัตว์ที่ค่อนข้างแตกต่างในเชิงวิวัฒนาการกับสิ่งมีชีวิตโมเดลในไฟลัม Arthropod อย่างแมลงหวี่ ในปัจจุบันความรู้ทางด้านการกระบวนการ apoptosis ในกุ้งยังมีอยู่น้อย แต่กระนั้นก็เป็นที่น่าสนใจศึกษาสำหรับนักวิชาการในหลายประเทศ งานวิจัยชิ้นนี้ก็เป็นอีกหนึ่งความพยายามที่ต้องการจะเพิ่มเติมความรู้เกี่ยวกับกระบวนการ apoptosis ในกุ้ง

เนื่องจากว่าในกระบวนการ apoptosis ในสิ่งมีชีวิตต่างๆจะมีกลไกการทำงานของโปรตีนคล้ายกันคือ โปรตีน caspase ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis โปรตีน IAP ทำหน้าที่คอยยับยั้งการทำงานของ caspase และ โปรตีน IAP antagonist ที่ทำหน้าที่คอยยับยั้งการทำงานของ IAP ในกระบวนการ apoptosis จะมีลักษณะอนุรักษณ์และพบการปรากฏตัวของโปรตีนดังกล่าวเสมอ ซึ่งในปัจจุบันก็ได้มีการค้นพบโปรตีน *PmCaspase* (Wongprasert et al., 2007) และโปรตีน *PmIAP* (Leu et al., 2008) รวมถึงปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสอง (Leu et al., 2008) นอกจากนี้ในกุ้งกุลาดำแล้วก็ยังค้นพบโปรตีน *LvIAP1* ในกุ้งขาวซึ่งมีลักษณะทางโครงสร้างคล้ายคลึงกับโปรตีน *PmIAP* มีรายงานการทดลองพบว่าโปรตีนนี้มีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์ เมื่อขัดขวางการทำงานของโปรตีนดังกล่าวก็จะทำให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis (Leu et al., 2012) การค้นพบโปรตีน *PmHtrA2* ซึ่งเป็นโปรตีน IAP antagonist จึงน่าสนใจ และเกิดสมมติฐานว่าโปรตีน *PmHtrA2* น่าจะทำปฏิสัมพันธ์และยับยั้งการทำงานของโปรตีน *PmIAP* ได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนดังกล่าว และเนื่องจากการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสองเป็นกลไกการกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ดังนั้นจึงอาจใช้เป็น drug target ในการต่อสู้กับโรคติดเชื้อไวรัสได้ นอกจากนี้ก็เป็นที่น่าสนใจว่านอกจากโปรตีน *PmIAP* แล้ว ในกุ้งกุลาดำยังอาจมีโปรตีนตัว

การแสดงออกของโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย

ในขั้นแรกผู้ทำการวิจัยมุ่งหมายที่จะค้นหาวิธีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวด้วยระบบเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากเป็นระบบที่สามารถจัดการได้ง่าย สามารถผลิตโปรตีนออกมาในปริมาณมาก ในระยะเวลาอันสั้น อย่างไรก็ตามการแสดงออกของโปรตีนในระบบแบคทีเรีนี้อาจมีความเสี่ยงอยู่ ซึ่งจุดนี้เป็นข้อเสียและพบได้บ่อยเมื่อมีการพยายามแสดงออกโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตในเซลล์แบคทีเรีย นั่นคือโปรตีนจากยูคาริโอตนั้นอาจต้องการกระบวนการ post translation modification ซึ่งกระบวนการดังกล่าวไม่มีในเซลล์แบคทีเรีย และโปรตีนอาจความไม่เสถียร โปรตีนอาจเกิดการ translation ได้ยาก หรือโปรตีนอาจเกิดการตกตะกอนรวมตัวกันเป็น inclusion body ภายในเซลล์แบคทีเรีย ด้วยเหตุผลดังกล่าว ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน จึงได้เกิดการพัฒนาเทคนิคหลากหลายเทคนิค เพื่อช่วยให้การแสดงออกของยูคาริโอตประสบความสำเร็จได้ในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งในงานวิจัยชิ้นนี้ก็ได้้นำเทคนิคการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับการดัดต่อยีนเสริมมาใช้ โดยมีการดัดต่อยีน *thioredoxin*, TAT signal sequence, และ TEV substrate sequence ไว้ที่ส่วน N-terminal ของยีนที่ต้องการแสดงออก โดยโปรตีน *thioredoxin* นั้นเป็นโปรตีนที่แสดงออกได้ง่ายในเซลล์ *E. coli* มีคุณสมบัติละลายน้ำสูง ทนต่อความร้อน (LaVallie et al., 1993) และสามารถทำหน้าที่เป็น self chaperon ได้ (Kern et al., 2003) การที่มีโปรตีน *thioredoxin* เชื่อมติดอยู่กับโปรตีนเป้าหมายในลักษณะนี้ จะส่งผลให้โปรตีน *thioredoxin* ช่วยเหนี่ยวนำให้โปรตีนเป้าหมายมีการแสดงออกดีขึ้น ช่วยให้ละลายน้ำได้ดี และมีเสถียรภาพมากขึ้น TAT signal sequence ทำให้เกิดการส่งโปรตีนเป้าหมายไปเก็บไว้ที่ periplasm หลังจากการ translation ซึ่งมีแนวคิดที่ว่าสภาวะแวดล้อมที่เป็น reducing ค่าและมี proteolytic activity ค่าของ periplasm นั้นเหมาะกับการเก็บรักษาโปรตีน (, 1982) ทั้งนี้หากในอนาคตต้องการที่จะทำบริสุทธิ์ให้ได้เฉพาะโปรตีนเป้าหมายที่ไม่ใช่โปรตีนลูกผสม ก็จะต้องทำการใส่ลำดับกรดอะมิโนที่เป็น substrate ของโปรตีน protease เช่น TEV protease ที่ตำแหน่งระหว่างโปรตีน *thioredoxin* และโปรตีนเป้าหมาย เพื่อที่จะสามารถใช้ TEV protease ตัดให้โปรตีนเป้าหมายเป็นอิสระได้นอกจากนั้นใน vector ที่ใช้ในงาน

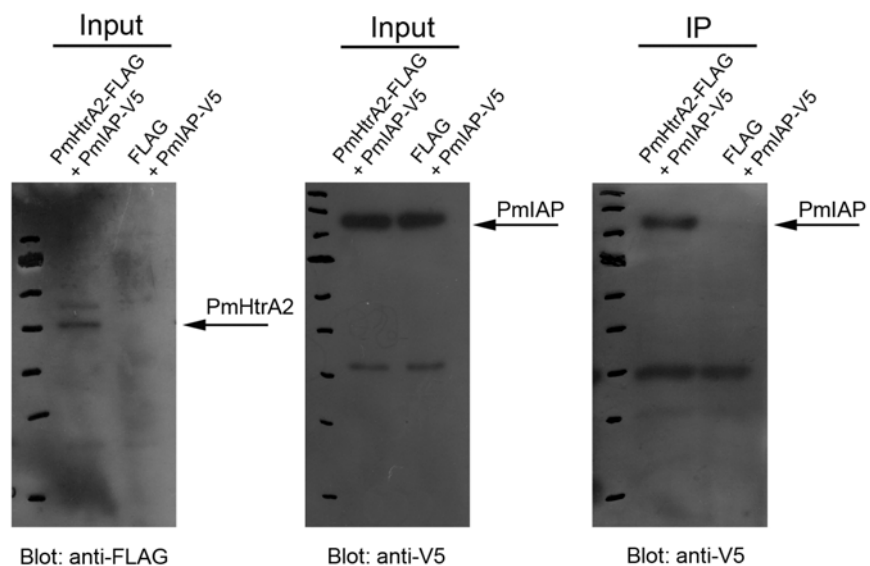
การเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้านก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถประสบความสำเร็จในการแสดงออกของโปรตีนได้ ในความเป็นจริงนั้นโปรตีน *PmHtrA2* สามารถแสดงออกได้ในทั้งเซลล์เจ้าบ้าน BL21DE3 และ BL21RIL แต่ปริมาณการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ BL21RIL จะมีมากกว่าในเซลล์ BL21DE3 อาจเนื่องมาจากว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนจากยูคาริโอต ทำให้บาง codon ในยีนมีปริมาณ copy number ของ tRNA สำหรับ codon นั้นๆ ในเซลล์ *E. coli* อยู่่น้อย ซึ่งอาจส่งผลให้โปรตีนเกิดการแสดงออกได้ไม่ดี การใช้เซลล์เจ้าบ้าน BL21RIL ที่มีการตัดต่อเพิ่มยีนของ tRNA ของ rare codon ในเซลล์ ทำให้มีโอกาสแสดงออกโปรตีนดังกล่าวสูงขึ้น

ก่อนหน้างานวิจัยชิ้นนี้ ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ได้เคยทำการแสดงออกโปรตีน partial-*PmHtrA2* ด้วยพลาสมิด pET25b ในเซลล์ BL21 DE3 เอาไว้และมีแนวโน้มว่าอาจเกิดเป็น inclusion body ได้ เมื่อนำโปรตีน *PmHtrA2* มาแสดงออกในพลาสมิดและเซลล์เจ้าบ้านดังกล่าว แม้ไม่พบปัญหาการเกิด inclusion body แต่ก็พบว่าโปรตีนมีการสลายตัว เมื่อแสดงออกในพลาสมิด pET15bThio ที่เป็นระบบการแสดงออกของโปรตีนถูกผสม thioredoxin ผลปรากฏว่าสามารถแก้ปัญหาความไม่เสถียรของโปรตีนได้ แต่มีการแสดงออกของโปรตีนน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ระบบการแสดงออกของโปรตีนถูกผสม thioredoxin ร่วมกับเซลล์เจ้าบ้าน BL21 RIL ก็ปรากฏว่าสามารถแสดงออกโปรตีนได้ปริมาณมากขึ้น ผลสำเร็จนี้ทำให้สามารถผลิตโปรตีน *PmHtrA2* ในปริมาณมากได้

ในส่วนของโปรตีน *PmIAP* นั้น นอกจากจะพยายามแสดงออกเฉพาะ domain ที่เกี่ยวข้องกับ การทำปฏิสัมพันธ์อย่าง BIR2 และ BIR3 ก็ยังได้ลองพยายามแสดงออกโปรตีน *PmIAP* ที่สมบูรณ์ด้วย เนื่องจากในปัจจุบันแม้ว่าได้มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ BIR อย่างกว้างขวางแล้ว แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาโครงสร้างของ *PmIAP* ขนาดสมบูรณ์เลย ลักษณะของการเรียงตัวของ BIR ทั้งสามจึงยังคงไม่ถูกสร้างเป็นแผนภาพสามมิติอยู่จนทุกวันนี้ อย่างไรก็ตามโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มักจะแสดงออกได้ยากในเซลล์แบคทีเรีย แม้การใช้การแสดงออกของโปรตีนถูกผสม thioredoxin และ เซลล์เจ้าบ้าน BL21 RIL สามารถช่วยให้แสดงออกโปรตีน *PmIAP* ได้ แต่ก็เกิดการแสดงออกอย่างไม่สมบูรณ์ กล่าวคือแสดงออกมาได้เพียง 58.6 kDa เท่านั้นจากขนาดเต็ม 92.5 kDa อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน *PmIAP* แล้ว ก็คาดว่าโปรตีน *PmIAP* ที่ผลิตออกมาได้นี้ยังคงมี domain ที่

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmHtrA2* และ *PmIAP* ด้วยวิธี pull down assay

การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmHtrA2* และ *PmIAP* แบบ *in vitro* ด้วยเทคนิค pull down assay นั้น แม้ว่าจะไม่พบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmHtrA2* และโปรตีน *PmIAP* ในการทดลองนี้ก็ตาม แต่ผู้ทำการทดลองก็ยังคงสมมติฐานเดิมไว้ว่าโปรตีนดังกล่าวน่าจะสามารถทำปฏิสัมพันธ์กันได้ เนื่องจากมีหลักฐานการทดสอบเบื้องต้นโดย ดร.ภคกุล สังข์สุริยะจากหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกึ่งซึ่งได้ทำงานวิจัยร่วมกัน พบว่าโปรตีนทั้งสองสามารถทำปฏิสัมพันธ์กันได้ ในการทดสอบแบบ *in vivo* ด้วยเทคนิค co-immunoprecipitation ในเซลล์แมลง sf9 ดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 ผลการทำ Western blot เพื่อทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmHtrA2* และโปรตีน *PmIAP* ในเซลล์ sf9 ด้วยเทคนิค co-immunoprecipitation โดย ดร.ภคกุล สังข์สุริยะ

ดังนั้นจึงความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดปัญหาจากกรดอะมิโนที่เกินมาในปลายด้าน N-terminal ของโปรตีน *PmHtrA2* ซึ่งเป็นข้อที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ในระบบการแสดงออกของโปรตีนคู่ผสม thioredoxin ที่ใช้โปรตีน TEV protease ในการตัด

เนื่องจากการทำปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmHtrA2* และโปรตีน *PmIAP* นั้นจะเริ่มจากการสอด IBM ที่อยู่ในส่วนปลาย N-terminal ของโปรตีน *PmHtrA2* เข้าไปใน BIR groove อันมีพื้นผิวเป็น

ในการทดลอง co-immunoprecipitation ในเซลล์แมลงข้างต้น โปรตีน *PmHtrA2* ที่ใช้ในการทดลองนี้ถูกสร้างจากพลาสมิด *pDhsp/FLAG/PmHtrA2* ซึ่งเมื่อแสดงออกในเซลล์แมลงแล้ว จะมีเพียงกรดอะมิโนเมทิโอนีนเพิ่มมาที่ปลาย N-terminal เท่านั้น (MAVQA) ซึ่งกรดอะมิโนเมทิโอนีนนั้นมี side chain เป็นพวก hydrophobic เช่นเดียวกับอลานีนและวาเลอีน จึงอาจกลมกลืนและไม่มีผลต่อปฏิสัมพันธ์มากนัก

อย่างไรก็ตามหากต้องการศึกษาโครงสร้างของปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmHtrA2* และ *PmIAP* ในอนาคต ก็จำเป็นต้องผลิตโปรตีน *PmHtrA2* ที่สมบูรณ์และสามารถใช้งานได้ในระบบแบคทีเรีย หากต้องการจะตอบสนองจุดประสงค์นี้ ก็จำเป็นต้องปรับปรุงระบบการทำรีซูทรีโปรตีน โดยอาจใช้ Factor Xa protease เป็นตัวตัดโปรตีนแทน ซึ่งจะต้องทำการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบน vector *pET15bThio* ตรงตำแหน่งของ TEV substrate sequence ให้กลายเป็นลำดับเบสที่จะแสดงออกเป็นลำดับกรดอะมิโน R อันเป็น substrate ของ Factor Xa protease ด้วยวิธีการทำ side direct mutation หรือการโคลนโดยเพิ่มลำดับเบสดังกล่าวในไพรเมอร์ การตัดด้วย Factor Xa protease นี้ จะเป็นการตัดที่หลังตำแหน่ง R ของ substrate sequence ซึ่งจะทำให้โปรตีนเป้าหมายที่ผ่านการตัด ไม่มีกรดอะมิโนอื่นเกินมาในส่วน N-terminal

งานที่สามารถต่อยอดได้ในอนาคต

แม้การทดลองนี้การยืนยันปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสองในระบบ *in vitro* ด้วยโปรตีนที่ผลิตได้จากแบคทีเรียยังไม่สามารถยืนยันการเกิดปฏิสัมพันธ์ได้ แต่กระนั้นการทดลองนี้ก็ค้นพบความเป็นไปได้ในการผลิตโปรตีนดังกล่าวในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งความรู้ในส่วนนี้จะเปิดโอกาสให้สามารถทำการผลิตโปรตีนดังกล่าวในปริมาณที่มากได้ โปรตีนปริมาณมากนี้สามารถนำไปผลิตแอนติบอดีทดสอบเชิงชีวเคมี หรือทดสอบเชิงโครงสร้างในอนาคตต่อไป ซึ่งการศึกษาที่จะตามมานี้อาจทำให้สามารถตอบคำถามน่าสงสัยในแวดวงกระบวนการ apoptosis ได้ เช่น ในปัจจุบันยังไม่มีใครสามารถทำการดกลีโปรตีน BIR ทั้ง 3 domain ได้เลย ในฐานะข้อมูลจะมีแต่เพียง BIR เดี่ยวๆ เท่านั้น ซึ่งไม่มีใครรู้ว่าในธรรมชาตินั้น BIR ทั้ง 3 domain มีการเรียงตัวกันอย่างไร ในงานวิจัยชิ้นนี้แม้ผลิตโปรตีน PmIAP รูปแบบที่ไม่สมบูรณ์ออกมา แต่ก็มี BIR ทั้ง 3 domain อยู่ครบ ซึ่งอาจจะนำโปรตีนที่ผลิตได้นี้ทำการดกลีโปรตีนต่อไป รวมกับผลึกของโปรตีนนี้ในขณะที่กำลังทำปฏิสัมพันธ์กับ PmHtrA2 นอกจากนั้นสมมติฐานการรวมตัวเป็น trimeric pyramid นั้นยังไม่มีใครทดลองเพื่อพิสูจน์ลักษณะปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวในระดับโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน

เอกสารอ้างอิง

ศิริ ทุกขัวินาศ และชุติมา ขมวิสัย, 2545, “แนวทางการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งของ ประเทศไทย”, วารสารการประมง, ปีที่ 55, ฉบับที่ 3, หน้า 55.

Abrams, J.M., 1999, “An Emerging Blueprint for Apoptosis in Drosophila”, **Trends in Cell Biology**, Vol. 9, pp. 435–440.

Adams, J.M. and Cory, S., 2002, “Apoptosomes: Engines for Caspase Activation”, **Current Opinion in Cell Biology**, Vol. 14, pp. 715–720.

Ashe, P.C. and Berry, M.D., 2003, “Apoptotic Signaling Cascades”, **Biology Psychiatry**, Vol. 27, No. 2, pp. 199-214.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2008, “Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells”, **Molecular Biology of the Cell**, 5th ed., Garland Science, pp. 1115.

Alicia, M. and Beth, L., 2009, **Autophagy in C. elegans** [Online], Availablev: http://www.wormbook.org/chapters/www_autophagy/autophagy.html [2013, May 24].

Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, Ch., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.-Ch., Frutiger, S. and Hochstrasser, D.F., 1993, “The Focusing Positions of Polypeptides in Immobilized pH Gradients can be Predicted from their Amino Acid Sequences”, **Electrophoresis**, Vol. 14, pp. 1023-1031.

Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E.S. and Shi, Y., 2001, “Structural Basis of Caspase-7 Inhibition by XIAP”, **Cell**, Vol. 104, pp. 769–780.

Chai, J., Yan, N., Huh, J.R., Wu, J.W., Li, W., Hay, B.A. and Shi, Y., 2003, “Molecular Mechanism of Reaper/Grim/Hid-Mediated Suppression of DIAP1-Dependent Dronc Ubiquitination”, **Nature Structural Biology**, Vol. 10, pp. 892–898.

Chen, G. and Goeddel, D.V., 2002, “TNF-R1 Signaling: a Beautiful Pathway”, **Science**, Vol. 296, pp. 1634–1635.

Cohen, G.M., 1997, “Caspases: the Executioners of Apoptosis”, **Biochemical Journal**, Vol. 326, pp. 1–6.

Cory, S. and Adams, J.M., 2002, “The Bcl2 Family: Regulators of the Cellular Life-or-Death Switch”, **Nature Review Cancer**, Vol. 2, pp. 647–656.

Daniel, N.N., 2007, “BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death”, **Clinical Cancer Research**, Vol. 13, No. 24, pp. 7254-7263.

Daniel, J.K. and Scott, D., 2000, “Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation”, **Science**, Vol. 290, pp. 1717-1721.

Danton, H., 2009, **Life & Death in the Ovary** [Online], Available: <http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio380/lecture3.htm> [2012, May 12].

Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. and Reed, J.C., 1997, “X-Linked IAP is a Direct Inhibitor of Cell-Death Proteases”, **Nature**, Vol. 388, pp. 300–304.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H., 1999, "Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis", **Annual Review of Biochemistry**, Vol. 68, pp. 383–424.

Eckelman, B.P., Drag, M., Snipas, S.J. and Salvesen, G.S., 2008, "The Mechanism of Peptide-Binding Specificity of IAP BIR Domains", **Cell Death and Differentiation**, Vol. 15, pp. 920–928.

Edward, R.L., Elizabeth, A.D., Sharlotte, K., Kathleen, L.G., Paul, F.S. and John, M.M., 1993, "A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the *E. coli* Cytoplasm", **Nature Biotechnology**, Vol. 11, pp. 187–193.

Everett, H. and McFadden, G., 2001, "Viruses and Apoptosis: Meddling With Mitochondria", **Virology**, Vol. 288, No. 1, pp. 1–7.

Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J. and Los, M., 2009, "Apoptosis and Cancer: Mutations within Caspase Genes", **Journal of Medical Genetic**, Vol. 46, pp. 497–510.

Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E. and Steller, H., 2000, "Induction of Apoptosis by *Drosophila* Reaper, Hid and Grim through Inhibition of IAP Function", **European Molecular Biology Organization Journal**, Vol. 19, No. 4, pp. 589-597.

Harris, B.Z. and Lim, W.A., 2001, "Mechanism and Role of PDZ Domains in Signaling Complex Assembly", **Journal of Cell Science**, Vol. 114, pp. 3219-3231.

Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y., 2003, "Apoptosis - the p53 Network", **Journal of Cell Science**, Vol. 116, pp. 4077-4085.

Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S., 2002, "Identification of Omi/HtrA2 as a Mitochondrial Apoptotic Serine Protease that Disrupts Inhibitor of Apoptosis Protein-Caspase Interaction", **The Journal of Biological**, Vol. 277, No. 1, pp. 432-438.

Horvitz, H.R., 2003, "Worms, life and death", **ChemBioChem**, Vol. 4, pp. 697–711.

Ian, M., 2005, **Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques**, 2nd ed., Springer, pp. 103-105.

Kern, R., Malki, A., Holmgren, A. and Richarme, G., 2003, "Chaperone Properties of *Escherichia coli* Thioredoxin and Thioredoxin Reductase", **Biochemistry Journal**, Vol. 371, pp. 965-972.

LaVallie, E.R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E.A., Collins-Racie, L.A. and McCoy, J.M., 2000, "Thioredoxin as a Fusion Partner for Production of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia coli*", **Methods in Enzymology**, Vol. 326, pp. 322-340.

Leu, J.H., Wang, H.C., Kou, G.H. and Lo, C.F., 2008, "*Penaeus monodon* Caspase is Targeted by a White Spot Syndrome Virus Anti-apoptosis Protein", **Devopmental and Comparative Immunology**, Vol. 32, pp. 476-486.

Leu, J.H., Kuo, Y.C., Kou, G.H. and Lo, C.F., 2008, "Molecular Cloning and Characterization of an Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) from the Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*", **Developmental and Comparative Immunology**, Vol. 32, pp. 121–133.

Leu, J.H., Chen, Y.C., Chen, L.L., Chen, K.Y., Huang, H.T., Ho, J.M. and Lo, C.F., 2012,

“*Litopenaeus vannamei* Inhibitor of Apoptosis Grotein 1 (LvIAP1)

is Essential for Shrimp Survival”, **Developmental and Comparative Immunology**, Vol. 38, pp.

78-87.

Li, W., Srinivasula, S.M., Chai, J., Li, P., Wu, J.W., Zhang, Z., Alnemri, E.S. and Shi, Y., 2002,

“Structural Insights into the Pro-apoptotic Function of Mitochondrial Serine Protease HtrA2/Omi”,

Nature Structural Biology, Vol. 9, pp. 436–441.

Liston, P., Fong, W.G. and Korneluk, R.G., 2003, “The Inhibitors of Apoptosis: There is more to

Life than Bcl2”, **Oncogene**, Vol. 22, pp. 8568–8580.

Lopez, J. and Meier, P., 2012, “Inhibitor of Apoptosis Proteins at the Crossroad of Innate Immunity

and Death”, **Current Opinion of Cell Biology**, Vol. 22, No. 6, pp. 872-81.

Martinou, J.C. and Green, D.R., 2001, “Breaking the Mitochondrial Barrier”, **Nature Reviews**

Molecular Cell Biology, Vol. 2, pp. 63-67.

Mosby, 2009, **Mosby's Dictionary of Medicine, Nursing & Health Professions**, 8th ed., Elsevier.

Phongdara, A., Wanna, W. and Chotigeat, W., 2006, “Molecular Cloning and Expression of

Caspase from White Shrimp *Penaeus merguensis*”, **Aquaculture**, Vol. 252, pp. 114–120.

Rebecca, C. T., Sean, P. C. and Seamus, J.M., 2008, “Apoptosis: Controlled Demolition at the

Cellular Level”, **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Vol. 9, pp. 231-241.

Shao, Y., Gao, Z., Marks, P.A. and Jiang, X., 2004, “Apoptotic and Autophagic Cell Death Induced by Histone Deacetylase Inhibitors”, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Vol. 101, No. 52, pp. 18030–18035.

Shenuarin, B. and Kohji, F., 2008, “Activation of HtrA2, a Mitochondrial Serine Protease Mediates Apoptosis: Current Knowledge on HtrA2 Mediated Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury”, **Cardiovascular Therapeutics**, Vol. 26, pp. 224–232.

Shi, Y., 2001, “A Structural View of Mitochondria-mediated Apoptosis”, **Nature Structural Biology**, Vol. 8, pp. 394–401.

Shi, Y., 2004, “Caspase Activation, Inhibition, and Reactivation: a Mechanistic View”, **Protein Science**, Vol. 13, pp. 1979–1987.

Söding, J., 2005, “Protein Homology Detection by HMM-HMM Comparison”, **Bioinformatics**, Vol. 21, pp. 951–960.

Söding, J., Biegert, A. and Lupas, A.N., 2005, “The HHpred Interactive Server for Protein Homology Detection and Structure Prediction”, **Nucleic Acids Research**, Vol. 33, pp. 244–248.

Suzuki, Y., Takahashi-Niki, K., Akagi, T., Hashikawa, T. and Takahashi, R., 2004, “Mitochondrial Protease Omi/HtrA2 Enhances Caspase Activation through Multiple Pathways”, **Cell Death and Differentiation**, Vol. 11, pp. 208–216.

Syntichaki, P. and Tavernarakis, N., 2003, “The Biochemistry of Neuronal Necrosis: Rogue Biology?”, **Nature Reviews Neuroscience**, Vol. 4, pp. 673-684.

Tain, L.S., Chowdhury, R.B., Tao, R.N., Plun-Favreau, H., Moiso, N., Martins, L.M., Downward, J., Whitworth, A.J. and Tapon, N., 2009, “Drosophila HtrA2 is Dispensable for Apoptosis but Acts Downstream of PINK1 Independently from Parkin”, **Cell Death and Differentiation**, Vol. 16, pp. 1118-1125.

Talmadge, K. and Gilbert, W., 1982, “Cellular Location Affects Protein Stability in *Escherichia coli*”, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Vol. 79, No. 6, pp. 1830-1833.

Thompson, C.B., 1995, “Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease”, **Science**, Vol. 267, pp. 1456–1462.

Verhagen, A.M. and Vaux, D.L., 2002, “Cell Death Regulation by the Mammalian IAP Antagonist Diablo/Smac”, **Apoptosis**. Vol. 7, No. 2, pp. 163-166.

Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakushi, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R. and Wrobel, C., 2002, “HtrA2 Promotes Cell Death through Its Serine Protease Activity and Its Ability to Antagonize Inhibitor of Apoptosis Proteins”, **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 277, pp. 445–454.

Verhagen, A.M., Kratina, T.K., Hawkins, C.J., Silke, J., Ekert, P.G. and Vaux, D.L., 2007, “Identification of Mammalian Mitochondrial Proteins that Interact with IAPs via N-terminal IAP Binding Motifs”, **Cell Death and Differentiation**, Vol. 14, pp. 348–357.

Wajant, H., 2002, “The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm”, **Science**, Vol. 296, No. 5573, pp. 1635–1636.

Wongprasert, K., Sangsuriya, P., Phongdara, A. and Senapin, S., 2007, “Cloning and Characterization of a Caspase Gene from Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Infected with White Spot Syndrome Virus (WSSV)”, **Journal of Biotechnology**, Vol. 131, pp. 9-19.

Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J.W., Du, C., Wang, X. and Shi, Y., 2000, “Structural Basis of IAP Recognition by Smac/DIABLO”, **Nature**, Vol. 408, pp. 1008-1012.

Wu, J.W., Cocina, A.E., Chai, J., Hay, B.A. and Shi, Y., 2001, “Structural Analysis of a Functional DIAP1 Fragment Bound to Grim and Hid Peptides”, **Molecular Cell**, Vol. 8, No. 1, pp. 95-104.

Yan, N., Wu, J.W., Huh, J.R., Chai, J., Li, W., Hay, B.A. and Shi, Y., 2004, “Molecular Mechanisms of DrICE Inhibition by DIAP1 and Removal of Inhibition by Reaper, Hid, and Grim”, **Nature Structural Molecular Biology**. Vol. 11, pp. 420–428.

Youle, R.J. and Strasser, A., 2008, “The BCL-2 Protein Family: Opposing Activities that Mediate Cell Death”, **Nature Review Molecular Cell Biology**, Vol. 9, No.1, pp. 47-59.

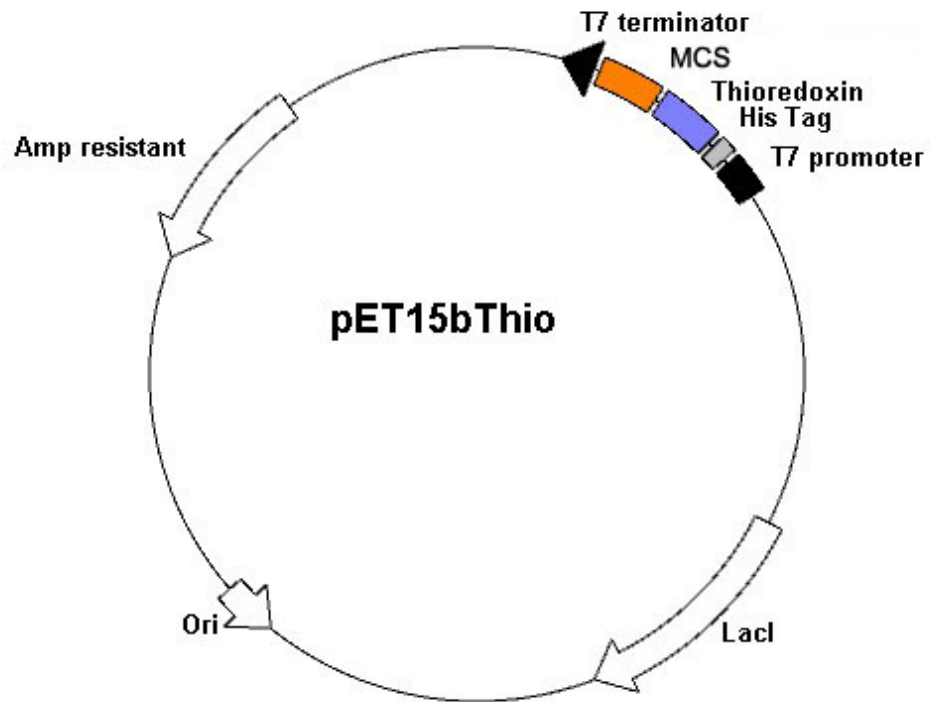
Young, L.S., Dawson, C.W. and Eliopoulos, A.G., 1997, “Viruses and Apoptosis”, **British Medical Bulletin**, Vol. 53, No. 3, pp. 509-521.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R., 1993, “The *C. elegans* Cell Death Gene *Ced-3* Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 Converting Enzyme”, **Cell**, Vol. 75, pp. 641–652.

ภาคผนวก ก

แผนที่พลาสมิด ลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโน

แผนที่พลาสมิด pET15bThio



ลำดับเบสของยีน *PmIAP*

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      5          15         25         35         45         55
PmIAP  ATGGGTGATA TGTCCACGA TCAGCGAAGC CTTGCAAGGG AGGAGTATCG GTTGAATACC

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      65         75         85         95        105        115
PmIAP  TTTGGAAGCA GTGACTTCGT TGTTGACAAG AAGAAAGTTG CCGAGGCGGG GTTTTATTAC

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      125        135        145        155        165        175
PmIAP  ACAAAGAAAG GAGATGACGT GAAGTGCTTT GACTGCAAGT GGGAAAGTGA TGCCAAGACC

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      185        195        205        215        225        235
PmIAP  ATCAGTCCGG CAGATGACAT TGCAAGAATT CACAAAGAGA GAAGACCTGA CTGCCCTTT

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      245        255        265        275        285        295
PmIAP  GCACAGGGTT TAAAGACCAT TCCAGGCCCC ACTAGAAATA AAACCTTTAT ATCTTATGAT

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      305        315        325        335        345        355
PmIAP  AGTCTGAGAT ACGAGAAAGA GCGATTGGAG ACTTTCATTG ACTGGCCTGT GAAGTGGCTG

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      365        375        385        395        405        415
PmIAP  GATCCATCAG AGTTAGCCAG TGATGGATTG TACTACTTGC GCACAGCCCA CCACTGCGCT

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      425        435        445        455        465        475
PmIAP  TGTGTGTTTT GCCGAGGCAT AGTGGGCGCT TGGGAGGTGG GAGACACACC AAGAGGAGAG

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      485        495        505        515        525        535
PmIAP  CATCAGCGCC ACTTTCACCA CTGCCCATTT ATCAGGGGTC AACCAGTTGG TAATGTGCCT

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      545        555        565        575        585        595
PmIAP  ATTCATCATA GCAACATCCT AGCCTGTCTA CCAAGCATAG ATTCCACAGC CCAGAGCAAT

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      605        615        625        635        645        655
PmIAP  AGTACCAGCA CTCAGAAGCG AGGCACAGAT GAATGCGGAA CGTCAAGGCA CATGGCTGGT

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      665        675        685        695        705        715
PmIAP  TCCTATCCAG AATGTCGTGG ACCCCCCAAC AAGCCTGACG TGCCTGGGA GGAGATTGGC

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      725        735        745        755        765        775
PmIAP  CTGCCGCACT ACTCTGGGCC AAAACGCAAG GACTTCCTGA CGTGTGAGAG TCGACTTGCA

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      785        795        805        815        825        835
PmIAP  AGTTTCGTGA GGTGGCCTGA ACGTGTCAAC CAGAAGCCAA GTGATTTAGC AGATGCTGGA

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      845        855        865        875        885        895
PmIAP  TTCTTTTATT GTGGCTTGAG TGACCATGTC CGTTGCTTCC ACTGTGGGAA TGGTCTTCGT

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      905        915        925        935        945        955
PmIAP  AACTGGGAGA AAGATGACAT ACCTTGGAAT GAGCATGCTC GCTGGTACCC TGAGTGTAGC

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      965        975        985        995       1005       1015
PmIAP  TATGTTCTCT TGAAGAAAGG ACAGGACTTT ATTGACAAAG TTCGACGTGA GAAACCACCA

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      1025       1035       1045       1055       1065       1075
PmIAP  TACATCCGCA AAGCCCCCGC AGCAAAGCCA AGTACTAGCA CAGTATCGGC AAGTGCCACA

```

PmIAP						
	1085	1095	1105	1115	1125	1135
	CCAGGAGGTC	GCACAGTCTC	TGACAAAGAT	TTAGATCCTT	TGATGGATT	AGATATCATA
PmIAP						
	1145	1155	1165	1175	1185	1195
	CGAGGAGTAT	TGGGCATGGG	ATTCCCAACA	CACATAGTAA	GGGCTGCTCT	AAAAGACCAG
PmIAP						
	1205	1215	1225	1235	1245	1255
	GTTCAAAAGG	CTGGTATGCC	ATTTTTCAGC	ATGGAGCCCT	GTATTGAGGC	TGTCCTTCAG
PmIAP						
	1265	1275	1285	1295	1305	1315
	AAAATGGAAG	AAGAAACAAG	ACAGACACTA	CAGGCTGACC	CTATTGAGAG	TGAAGCAACA
PmIAP						
	1325	1335	1345	1355	1365	1375
	GAAAGCCAGG	TTGCCAAGAT	TCAGTCAATC	CATTCTAGGA	GTGAGACTGC	ACAAAAATAGT
PmIAP						
	1385	1395	1405	1415	1425	1435
	GAAGTAGCTG	GTTCCAGTTC	TCCATCCACT	TCTGGTGCAC	AAGCATCAGC	TGCCTCAGAG
PmIAP						
	1445	1455	1465	1475	1485	1495
	CCATCCACTT	CTTCAGCCTC	TGAGGATATC	ACTGGAATT	TACCCACTCT	TCCAACCCCA
PmIAP						
	1505	1515	1525	1535	1545	1555
	TCCACATCTA	CCAACACAGA	ACATTTACCC	ACACTACCAA	GTCCACCTAG	AAGTACAGAT
PmIAP						
	1565	1575	1585	1595	1605	1615
	ACCACAACAC	CTGTATCAGG	ACAACAAGAA	AGTTCACAAG	AAAGTTCAGC	AACAGCACAG
PmIAP						
	1625	1635	1645	1655	1665	1675
	AACACAAGCT	CCACTTCACC	CCAGCAAAGC	CAAGGAGATG	ACGAGGCAAT	GGAAGTCGAT
PmIAP						
	1685	1695	1705	1715	1725	1735
	GAAAGAGGTG	CAGATGTCCA	TCCCATGGAA	CGAGTGATCA	TGCAGGCTGA	TGAGATAATG
PmIAP						
	1745	1755	1765	1775	1785	1795
	AGTATGGCAG	AGGAAGCCTT	AAAACCAACA	AGTTCAGGTC	CTCCTTCTCT	GGGCCAGTCA
PmIAP						
	1805	1815	1825	1835	1845	1855
	GACCTTAAAG	TTGTCGGTGA	AGGCGAGGGT	TCTGCAGTGT	TGGAGCAAGC	GTCAACGTCT
PmIAP						
	1865	1875	1885	1895	1905	1915
	GGTGTGAAAC	ATCAATCTGG	AGCAGTTACT	TCACCACAGT	CTACTAAGGA	ACTGGCAGAT
PmIAP						
	1925	1935	1945	1955	1965	1975
	GAGCTTGAAA	GAATCCGTGA	CATTGCGATG	TGCAAAGTCT	GCATGGATGC	TGAGATGGAC
PmIAP						
	1985	1995	2005	2015	2025	2035
	GTCGTGTTCC	TACCCTGTGC	ACATATGGTT	ACTTGTGCTT	CTTGTGCACT	CGCTCTTACT
PmIAP						
	2045	2055	2065	2075	2085	2095
	CAGTGTCCCA	TCTGTAGGAA	AGACATCAAA	TTCACCATCA	AACCTATTGT	ATCCTGA

ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *PmIAP*

PmIAP	
	5 15 25 35 45 55
	MGDMSHDQRS LAREEYRLNT FGSSDFVVDK KKFAEAGFY TKGDDVKCF DCKWEVDAKT
PmIAP	
	65 75 85 95 105 115
	ISPADDIARI HKERRPDCPF AQLKKTIPRP TRNKTIFISYD SLRYEKERLE TFIDWPVKWL
PmIAP	
	125 135 145 155 165 175
	DPSELASDGF YYLRTADHCA CVFCRGIVGA WEVGDTPRGE HQRHFPHPCF IRGQPVGNVP
PmIAP	
	185 195 205 215 225 235
	IHHSNILACL PSIDSTAQSN STSTQKRGTD ECGTSRH MAG SYPECRGPPN KPDVSWEIIG
PmIAP	
	245 255 265 275 285 295
	LPQYSGPKRK DFLTCEURLA SFVRWPERVT QKPSDLADAG FFYCGLSHDV RCFHCNGRLR
PmIAP	
	305 315 325 335 345 355
	NWEKDDIPWN EHARWYPCS YVLLKKGQDF IDKVRREKPP YIRKAPAAKP STSTVSASAT
PmIAP	
	365 375 385 395 405 415
	PGGRTVSDKD LDPLMDLDII RGVLGMGFPT HIVRAALKDQ VQKAGMPFFS MEPCIEAVLQ
PmIAP	
	425 435 445 455 465 475
	KMEEETRQTL QADPIESEAT ESQVAKIQSI HSRSETAQNS EVAGSSSPST SGAQASAASE
PmIAP	
	485 495 505 515 525 535
	PSTSSASEDI TGTLPPLPTP STSTNTEHLP TLPSPPRSTD TTPVSGQQE SSQESSATAQ
PmIAP	
	545 555 565 575 585 595
	NTSSTSPQQS QGDDEAMEVD ERGADVHPME RVIMQADEIM SMAEEALKPP SSGPPSLGQS
PmIAP	
	605 615 625 635 645 655
	DLKVVGEGEG SAVLEQASTS GVKHQSGAVT SPQSTKELAD ELERIRDIRM CKVCMDAEMD
PmIAP	
	665 675 685 695
	VVFLPCAAMV TCASCAVALT QCPICRKDIK FTIKPIVS

ลำดับเบสของยีน *PmHtrA2*

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5         15        25        35        45        55
HtrA2  GCAGTGCAGG CATCTAGCCC TCTACCCCCT GAGGATGTGT CCGTGGCAGG AAATGGAGAA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      65        75        85        95       105       115
HtrA2  GCTTCAGCCT TTTTCAAGAA GAGGGATATG TATAATTTTG TTGCAGATGC CGTTCAGAAA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      125       135       145       155       165       175
HtrA2  GCTTCAGGTG GTGTTGTCTT TATCTCCATA AATGATACAA GGAGGCACAT TATTCGGCAA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      185       195       205       215       225       235
HtrA2  TATCAACATC TGTCAAATGG ATCAGGTTTC ATTGTCAGTG AAGACGGACT AATTCTCACC

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      245       255       265       275       285       295
HtrA2  AATGCTCATG TTGTCAAGAA TTTTCCCAAG TCTGTTGAAA TTAAGGTCGG TCTAATAGAT

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      305       315       325       335       345       355
HtrA2  GGCAGAGAGT ATTCTGCAGT TGTTGAAGAA ATTGACACAG TATCAGATCT AGCTTTGTTA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      365       375       385       395       405       415
HtrA2  AGAATCAATT GTACAGGACT TGTTCTCTCT AAACCTTGGAG ACTCAAGTGG AGTAAGACCA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      425       435       445       455       465       475
HtrA2  GGAGAGTTTG TAGCTGCCTT AGGCTGTCCT CTGTCTCTGT CAAACTCTGT CACTTTGGGT

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      485       495       505       515       525       535
HtrA2  GTTGTTTCAT CTGCTGATCG AGGGAGTGTC GAACCTTGGTT TACGAGGGAA AGACATGCAG

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      545       555       565       575       585       595
HtrA2  TACATCCAAA CAGACGCAGC CATTACTTTT GGCAACTCAG GAGGCCCTCT GATCAACTTG

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      605       615       625       635       645       655
HtrA2  GACGGAGAAG TCATTGGAAT AAATTCAATG ACAGTAACTT CAGGAATCTC ATTTGCCATC

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      665       675       685       695       705       715
HtrA2  CCTGTAGATC ATGCTAAGGA ATTTATGAAG AAAGCTGAAA AGAAAAGAGT TGACCTGGCC

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      725       735       745       755       765       775
HtrA2  AAATATCCAA AACCAAGCTC TACTCAGCGG CGTACTTAG GTGTTACAAT GCTGACCTTG

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      785       795       805       815       825       835
HtrA2  ACAAAATCCA TTCTACAAGA GCTGCAGTCT AGAGGTGGTC CCATGTCAAG TATTCCATCA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      845       855       865       875       885       895
HtrA2  GATATCACAC AAGGGGTCTT CATATGGAAA GTCGTTGTGG GTTCTCCAGC ATATCAATCA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      905       915       925       935       945       955
HtrA2  GGGCTGATAC CAGGGGACAT CATTACCCAT ATCAACAATG AACCAGTGGC ATCATCAAGA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      965       975       985       995      1005      1015
HtrA2  GATGTCTACA GAAGCCTTGA ACACAAAGGA GATTTGGTAA TGGTAGTGGT ACGCAATGGC

      .....|.....| .....|.....| .....|.
      1025      1035      1045      1055
HtrA2  CAACGCTATA AAGTTATTGT TTCTCCAGAG GAGTAA

```

ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *PmHtrA2*

						
	5	15	25	35	45	55
HtrA2	AVQASSPLPP	EDVSVAGNGE	ASAFFKKRDM	YNFVADAVQK	ASGGVVFISI	NDTRRHIIHQ
						
	65	75	85	95	105	115
HtrA2	YQHLSNGSGF	IVSEDGLILT	NAHVVSNNPK	SVEIKVRLID	GREYSAVVEE	IDTVSDLALL
						
	125	135	145	155	165	175
HtrA2	RINCTGLVPL	KLGDSSGVRP	GEFVAALGCP	LSLSNSVTLG	VVSSADRGSV	ELGLRGKDMQ
						
	185	195	205	215	225	235
HtrA2	YIQTDAAITF	GNSGGPLINL	DGEVIGINSM	TVTSGISFAI	PVDHAKEFMK	KAEEKRVDLA
						
	245	255	265	275	285	295
HtrA2	KYPKPSSTQR	RYLGVTMLTL	TKSILQELQS	RGGPMSSIPS	DITQGVFIWK	VVVGSPAYQS
						
	305	315	325	335	345	.
HtrA2	GLIPGDIITH	INNEPVASSR	DVYRSLEHKG	DLVMVVVRNG	QRYKVIVSPE	E

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

ข.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. LB medium (Luria-Bertani medium)

Tryptone	10.00 g
Yeast extracts	5.00 g
NaCl	10.00 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 ml

ถ้าเป็น LB agar เติม agar 15 g/l และฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ถ้าต้องการเติมยาปฏิชีวนะให้เติมหลังจากฆ่าเชื้อแล้วและเติมขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 45 °C โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ kanamycin เท่ากับ 50 µg/ml

ข.2 สารละลายที่ใช้ในการเตรียม competent cell

1. สารละลาย RF1

Potassium acetate (30 mM)	1.47 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (10 mM)	0.75 g
RbCl (100 mM)	6.05 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O (50 mM)	4.59 g
Glycerol (15 % w/v)	75.00 ml
น้ำกลั่น (Sterile)	450.00 ml

ปรับ pH ที่ 5.8 ด้วย 0.2 M acetic acid ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 ml จากนั้นกรองสารละลายผ่าน millipore filter ขนาด 0.45 µm แล้วเก็บไว้ที่ 4 °C

2. สารละลาย RF2

RbCl (100 mM)	0.65 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (75 mM)	5.50 g
MOPS (10 mM)	1.05 g
Glycerol (15 % w/v)	75.00 ml

ปรับ pH ที่ 6.8 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 ml จากนั้นกรองสารละลายผ่าน millipore filter ขนาด 0.45 µm แล้วเก็บไว้ที่ 4 °C

ข.3 สารละลายที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis

1. TBE buffer

Tris-base 10.80 g

Boric acid 5.50 g

0.5 M EDTA (pH 8.0) 4.00 ml

ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 ml

2. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA 18.60 g

ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml

ข.4 สารละลาย TEV cleavage buffer

NaCl 8.7 g

Tris 3.025 g

ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ที่ pH 8 ด้วย 1 M NaOH แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 ml

ข.5 สารละลายที่ใช้ในการผลิตและทำ Purification โปรตีน

pH ของทุก Buffer จะต้องไม่เท่ากับค่า pI ของโปรตีน และห่างกันอย่างน้อย ± 1

1. Buffer 1

Trisbase 3.023 g

NaCl 8.7 g

Imidazole 1.02 g

triton x 100 5 ml

H₂O 995 ml

2. Buffer2

Trisbase 3.023 g

NaCl 29 g

Imidazole 1.02 g

H₂O 1000 ml

3. Buffer3

Trisbase 0.3 g

NaCl 0.87 g

Imidazole	1.36 g
H ₂ O	100 ml

ข.6 ยาปฏิชีวนะ ความเข้มข้น 100 mg/ml

Kanamycin	1.00 g
Ampicillin	1.00 g

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml ฆ่าเชื้อโดยกรองผ่าน syring filter ที่มีขนาด 0.45 μ m และแบ่งใส่ microtube หลอดละ 1 ml เก็บไว้ที่ -20 °C

ข.7 สารละลายที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE

1. 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

Tris base	6.05 g
-----------	--------

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น 50 ml แล้วค่อยๆ เติมกรด HCl เข้มข้นลงไป (พร้อมกวน) จนได้ pH 6.8 (ใช้ HCl ประมาณ 8 ml) เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave เป็นเวลา 15-20 นาที

2. 1 M Tris-HCl (pH 8.8)

Tris base	12.10 g
-----------	---------

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น 50 ml แล้วค่อยๆ เติมกรด HCl เข้มข้นลงไป (พร้อมกวน) จนได้ pH 8.8 (ใช้ HCl ประมาณ 8 ml) เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave เป็นเวลา 15-20 นาที

3. 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

Tris base	18.15 g
-----------	---------

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น 50 ml แล้วค่อยๆ เติมกรด HCl เข้มข้นลงไป (พร้อมกวน) จนได้ pH 8.8 (ใช้ HCl ประมาณ 4 ml) เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave เป็นเวลา 15-20 นาที

4. 20 % (w/v) SDS

SDS	20.00 g
-----	---------

ละลาย SDS ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml บรรจุลงในขวดใส ถ้าพบว่าละลายช้าให้ทำละลายในอ่างน้ำอุ่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave เป็นเวลา 15-20 นาที

5. 10 % (w/v) Ammonium persulfate (APS)

Ammonium persulfate	0.05 g
---------------------	--------

ละลาย ammonium persulfate ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 μ l

6. 1 % Bromophenol blue

Bromophenol blue 100.00 mg

ละลายในน้ำกลั่น 10 ml กรองผ่านกระดาษกรอง บรรจุลงในขวดสีชา

7. Electrophoresis buffer (Running buffer)

Tris base 1.51 g

Glycine 7.20 g

SDS 0.50 g

ละลาย Tris base 1.51 g ในน้ำกลั่น 400 ml เติม glycine 7.2 g และ SDS 0.5 g ละลายทั้งหมดให้เข้ากัน pH จะมีค่าประมาณ 8.3 ถ้าค่า pH สูงกว่า 8.3 มากเกินไป ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.3 ด้วยกรด HCl เข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 ml บรรจุลงในขวดสีชา

8. Staining solution

Coomassie blue 0.50 g

Methanol 250.00 ml

Glacial acetic acid 50.00 ml

ละลายสี Coomassie Blue 0.5 g ใน methanol ปริมาตร 250 ml กวนให้ละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer นานประมาณ 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ml และกรด glacial acetic acid ปริมาตร 50 ml กวนต่อไปอีก 30 นาที เก็บไว้ในขวดสีชา

9. Destaining solution

Methanol 50.00 ml

Glacial acetic acid 90.00 ml

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 860 ml กวนให้เข้ากันบรรจุลงในขวดสีชา

10. 5x Loading buffer (Sample buffer)

1 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.60 ml

1 % Bromophenol blue 1.00 ml

Merceptoethanol 0.50 ml

ผสม 1 M Tris-HCl (pH 6.8) ปริมาตร 0.6 ml , merceptoethanol ปริมาตร 0.5 ml และ 1 % bromophenol blue ปริมาตร 1 ml กับน้ำกลั่นปริมาตร 0.9 ml บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C หรือที่ -20 °C

11. 30 % (w/v) Acrylamide - 0.8 % (w/v) Methylene bis acrylamide

Acrylamide 30.00 g

Methylene bis acrylamide 0.80 g

ละลาย acrylamide 30 g และ methylene bis acrylamide 0.8 g ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml

ข.8 สารละลาย 1M IPTG

IPTG 0.238 g

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml มาเชื้อโดยกรองผ่าน syring filter ที่มีขนาด 0.45 μm ใส่ microtube เก็บไว้ที่ -20°C

ข.9 สารละลายที่ใช้ในการทำ Western blot

1. Towbin buffer

Tris	3.02 g
NaCl	14.4 g
Methanol	200 ml
H ₂ O	800 ml

2. 0.5%PBST

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.27 g
Tween-20	5 ml
H ₂ O	995 ml

3. แอนติบอดี

Blocking buffer	5 ml
Anti His conjugated HRP anti body	2.5 μl

ข.10 สารละลายที่ใช้ในการทำ pull down assay

1. Washing buffer

Trisbase	3.023 g
NaCl	8.7 g
Imidazole	1.02 g
H ₂ O	1000 ml

ภาคผนวก ค

วิธีการเฉพาะ

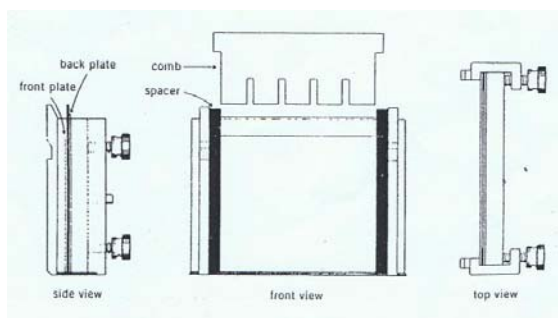
ค.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *Escherichia coli*

เป็นการเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการกระบวนการทำ transformation ของเวกเตอร์ที่มีอินเป้าหมายเข้าสู่แบคทีเรีย เริ่มจากนำเชื้อที่ต้องการเตรียม competent cell (*Escherichia coli*) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จาก stock frozen glycerol stock culture หรือ single colony จากจานเพาะเชื้อเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 3 ml ที่บรรจุใน test tube ขนาด 15 ml จากนั้นนำไปปั่นเชื้อภายในเครื่อง orbital shaker ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง (over night) จากนั้นนำเชื้อที่ปั่น over night แล้ว ปริมาตร 2 ml ลงใน LB broth ปริมาตร 200 ml (เจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:100) เลี้ยงเชื้อภายในเครื่อง orbital shaker ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ควบคุมการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD660) ให้ค่าอยู่ในช่วง 0.5-0.8 แล้วนำเชื้อไปแช่ในกล่องน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วจึงนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C (โดยแบ่งใส่หลอดขนาด 50 ml จำนวน 4 หลอด) ทิ้งส่วนใสแล้วละลายตะกอนเชื้อ (pellet) ด้วยสารละลาย RF1 ที่เย็น ในปริมาตร 10 ml ด้วยการเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นนำไปแช่ในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลานาน 30 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งส่วนใสแล้วละลาย pellet ด้วยสารละลาย RF2 ที่เย็น ในปริมาตร 2.5 ml โดยการเปิดขึ้นลงเบาๆ จากนั้นนำไปแช่ในกล่องน้ำแข็ง เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วทำการ aliquot competent cell โดยแบ่งเชื้อปริมาตร 100 μ l ลงใน sterile microtube ที่เย็นขนาด 1.5 ml ให้ทำภายใน 15 นาที ที่เย็นตลอดเวลา แล้วเก็บไว้ที่ -80 °C

ค.2 การทำ SDS-PAGE

1. การประกอบชุด SDS-PAGE (BIO-RAD, Mini-protein II cell)

ทำความสะอาดแผ่นกระจก (Glass plate), spacers, comb, gel casting unit ด้วยน้ำสบู่เหลว และล้างน้ำเปล่าให้สะอาด เช็ดแผ่นกระจกด้านที่จะสัมผัสกับ acrylamide gel ด้วย ethanol ทิ้งให้แห้งสนิท แล้วประกอบชิ้นส่วนของ gel casting unit ดังรูป ค.1



รูปที่ ค.1 การประกอบชุด SDS-PAGE

2. การเตรียมเจล

เตรียมสารสำหรับ set gel ดังต่อไปนี้

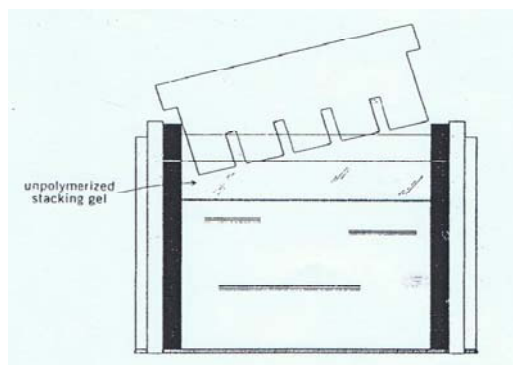
12 % Separating gel solution

H ₂ O	3.40 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.50 ml
30 % (w/v) Acrylamide - 0.8 % (w/v) Bis-acrylamide	4.00 ml
20 % (w/v) SDS	50.00 µl
10 % (w/v) Ammonium persulfate (APS)	150.00 µl
TEMED	6.00 µl
Total	10.10 ml

4 % Stacking gel solution

H ₂ O	3.075 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
30 % (w/v) Acrylamide - 0.8 % (w/v) Bis-acrylamide	670.00 µl
20 % (w/v) SDS	25.00 µl
10 % (w/v) Ammonium persulfate (APS)	75.00 µl
TEMED	5.00 µl
Total	5.05 ml

เท separating gel solution ลงใน gel casting unit ด้วย pasteur pipette ให้ถึงระดับประมาณ 1.5 cm จากขอบของ glass plate แผ่นสั้น ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ หลังจากนั้นใช้ pasteur pipette อันใหม่ดูดน้ำกลั่น ค่อยๆ เททับลงบนผิวหน้า gel เพื่อให้ผิวหน้าเรียบ ปลอ่ยให้ gel แข็งตัวประมาณ 20-30 นาที เหน้าทิ้งให้หมด แล้วใช้กระดาษกรองซับเอาน้ำบนผิว gel ออกให้หมด แล้วจึงเท stacking gel ที่เตรียมเสร็จแล้วลงไปให้เต็มช่องว่างกระจก แล้วจึงนำ comb ไปเสียบ เพื่อให้เกิดช่องสำหรับ load ตัวอย่าง ดังรูป ค.2

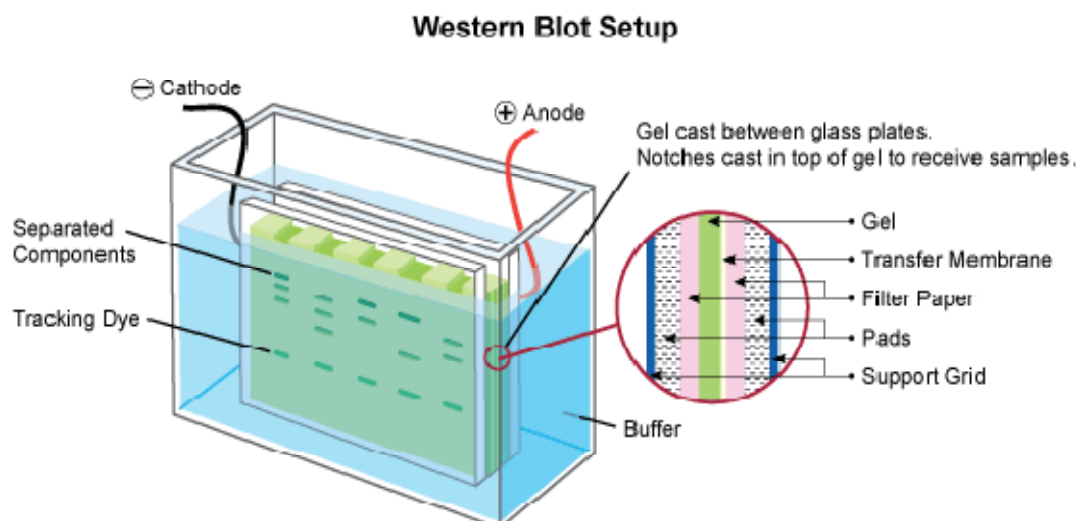


รูปที่ ค.2 การสอด comb เพื่อสร้าง sample well ใน stacking gel

หลังจาก gel แข็งตัวแล้ว นำตัวอย่างที่ผสม 5x loading buffer ในอัตราส่วน 1:5 และผ่านความร้อน 100 °C นาน 10 นาทีแล้ว มาหยอดลงใน sample well โดยใช้ micropipette แล้วทำ electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 120 volts เป็นเวลาประมาณ 80 นาที หรือจนกว่าแถบสีของ loading buffer เคลื่อนที่ลงไปถึงปลายด้านล่างของ gel จากนั้นแกะแผ่น gel ออกจากแผ่นกระจกมาทำการย้อมสีโดยแช่ลงใน staining solution (ภาคผนวก ข.4) เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที แล้วทำการล้างสีออกด้วย destaining solution (ภาคผนวก ข.4) จนเห็นพื้นหลังของ gel สีใส หรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างเปรียบเทียบกับ protein molecular weight marker

ค.3 การทำ Western blot analysis

ทำการแยกขนาดของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้วิธี SDS-PAGE ก่อนโดยใช้ prestained protein marker เป็น marker จากนั้นตัดกระดาษในโตรเซลล์โลสหรือเมมเบรนมาให้พอดีกับขนาดของเจล เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ SDS-PAGE แล้วจึงแกะเจลออกมาจากกระจกโดยล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัด SDS ออกแล้วตัดส่วน stacking gel ออก แล้ววางลงไปบนเมมเบรนที่ผ่านการแช่ใน towbin buffer แล้วซึ่งวางอยู่บนกระดาษกรองสองชั้นและวางอยู่บนฟองน้ำ และปิดทับเจลด้วยกระดาษกรองสองชั้นและฟองน้ำเช่นกัน ทำการไล่อากาศออกแล้วประกบชุดเข้าด้วยกัน นำไปลงใน buffer tank โดยจัดให้เมมเบรนอยู่ทางด้านแอนโอดหรือขั้วบวกและเจลอยู่ทางด้านแคโทดหรือขั้วลบ นำเจลให้ความเย็นใส่ลงใน buffer tank เพื่อรักษาอุณหภูมิไม่ให้เกิดความร้อน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 V เป็นเวลา 1 ชม.



รูปที่ ค.3 ชุดของ Western blot

หลังจากนั้นทำการแกะชุดประกอบนำเมมเบรนวางลงในภาชนะกล่องพลาสติกที่สะอาด แล้วทำการล้างด้วย 0.5% PBS-T สามครั้งๆละ 10 นาที โดยเขย่าที่ความเร็วรอบต่ำๆ แล้วบล็อกด้วย Blocking reagent เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากการบล็อกแล้วทำการล้างด้วย 0.5% PBST สามครั้งเช่นกัน แล้วป้อนด้วย HRP conjugated antibody เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5% PBS-T เช่นเดิม แล้วทำการตรวจหาแถบโปรตีนที่สนใจด้วยการหยด TMB substrate ลงไป

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล

นายรักจิต สุวรรณบูรณ์

วัน เดือน ปีเกิด

1 มกราคม 2532

ประวัติการศึกษา

ระดับมัธยมศึกษา

ประโยคมัธยมศึกษาตอนปลาย

โรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัยสุพรรณบุรี พ.ศ. 2549

ระดับปริญญาตรี

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี พ.ศ. 2553

ทุนการศึกษา หรือทุนวิจัย

ทุนคณะวิทยาศาสตร์ ปิงบประมาณ 2553

ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์

Suwannaboon, R., Phiwsaiya, K., Senapin, S., Khunrae,