บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ไมโครปิเปต : P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P20 (5-20 µl), P100 (20-100 µl), P1000 (0.1-1 ml) (Gilson, France)
2. ทิป : 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1,000 µl (Elkay, USA)
3. ทิปแบบมีไส้กรอง : 10 µl, 200 µl, 1,000 µl (Elkay, USA)
4. หลอดชนิด Microcentrifuge : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (Bio-RAD, Elkay, USA)
5. หลอดชนิด Polypropylene conical : 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)
6. บีกเกอร์ : 50 ml, 100 ml, 200ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
7. ขวดรูปชมพู่ : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
8. ขวดดูแรน : 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Duran, Germany)
9. กระบอกตวง : 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1,000 ml (Witeg, Germany)
10. แท่นวางหลอด (rack) (Autopack, USA)
11. เทอร์โมมิเตอร์ (Precision, Germany)
12. พาราฟิล์ม (American National Can, USA)
13. พลาสติกสำหรับห่อ (Diamond, USA)
14. กระดาษฟลอยด์ (Diamond, USA)
15. ปิเปต บอย (Tecnomara, Switzerland)
16. เครื่องวอร์เท็กซ์ (Scientific Industry, USA)
17. เครื่องวัดค่า pH (Eutech Instrument, USA)
18. Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
19. แท่งแม่เหล็ก (Agimatic-e, China)
20. เครื่องเซนทริฟิวจ์สำหรับหลอดชนิด Polypropylene conical (J.P.Selecta, Spain)
21. เครื่องเซนทริฟิวจ์สำหรับหลอดชนิด Microcentrifuge (Eppendorf, Germany)
22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Mastercycler personal) (Eppendorf, Germany)
23. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler) (Hybraid, USA)
24. ถาดสำหรับเตรียมเจล พร้อมหวี (Gibco BRL, Scothland)
25. เครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส (Bio-RAD, USA)

26. เครื่องให้ความร้อน (Heat block) (Bockel, UK)
27. เครื่องบ่มเพาะเชื้อ (Incubator) (Memmert, Germany)
28. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometers) รุ่น CE9500 (Super aquarius, UK)
29. คิวเวต (Starna, UK)
30. เครื่องความถี่สูง (Ultrasonic processors) รุ่น UP100H (Dr.Hielscher GmbH, Germany)
31. Gel doc XR (Bio-RAD, USA)
32. ตู้เย็น 4 ^{0}C (Misubishi, Japan)
33. ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C, -80 ^{0}C (Revco, Japan)
34. เครื่องทำให้น้ำบริสุทธิ์ (Water purification equipment) (Labconco, USA)
35. วอเตอร์ บาธ (J.P.Selecta, Spain)
36. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6-well plates) (Corning, New York)
37. ขวดเลี้ยงเซลล์ : T-25, T-75 (Corning, New York)
38. ปิเปตแบบฆ่าเชื้อ (Costar$_{®}$ Stirpipette) : 0.2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Corning, New York)
39. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer) (Wertheim, Germany)
40. หลอดสำหรับเก็บเซลล์เพื่อแช่แข็ง (Cryotube vial) 2.0 ml (Corning, New York)
41. กล่องลดอุณหภูมิ 1^{o}C (Cryo 1^{o}C Freezing container) (Nalgene® Labware, USA)
42. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Macro Confocal รุ่น EZ-C1 (Nikon, Thailand)
43. ตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator) (Shel lab, USA)
44. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ สำหรับส่องเซลล์ (Motic, China)
45. ตู้เขี่ยเชื้อ (Safety cabinet) (Nuaire, USA)
46. ฟิล์มเอ็กซเรย์ (Kodak, Japan)
47. ชุดเตรียมเจลแบบตั้งและชุด 2-D อิเล็กโทรโฟริซิส (Mini-Protean 3 Cell) (Bio-RAD, USA)
48. ชุดทรานส์เฟอร์เจล (Mini Trans-Blot Electophoretic Transfer Cell) (Bio-RAD, USA).
49. เครื่องหมุนหลอด 360 องศา (Biosan, Latvia)

50. เครื่องนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclaved) (Hirayama, Japan)
51. เครื่องไมโครเวฟ (Sumsung, Kaorea)
52. เครื่องชั่งดิจิทอล (Bio active, Thailand)
53. ช้อนตักสาร
54. ตู้ดูดควัน (Fume hood) (Captair, China)
55. สไลด์ (Manufacturer, China)
56. กระจกปิดสไลด์ ขนาด 24x24 mm (Wiegand, Germany)
57. เครื่อง spectrophotometer (nano drop) (Thermo scientific, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป
   - 1.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)
   - 1.2 Agarose, molecular glade (Promega, USA)
   - 1.3 Glycerol (Merck, Germany)
   - 1.4 Sodium deoxycholate (Sigma, USA)
   - 1.5 Bromphenol blue (USB, USA)
   - 1.6 Sodium phosphate dibasic (Fluka, USA)
   - 1.7 Ethidium bromide (Gibco BRL, Scothland)
   - 1.8 Potassiume chloride (BDH, UK)
   - 1.9 Hydrochloric acid (Merck, Germany)
   - 1.10 Potassium phosphate monobasic (Sigma, USA)
   - 1.11 Potassium phosphate dibasic (Sigma, USA)
   - 1.12 Glycine (USB, USA)
   - 1.13 Tween-20 (Bio-Rad, USA)
   - 1.14 Sodium chloride (Merck, Germany)
   - 1.15 Sodium hydroxide (Merck, Germany)
   - 1.16 Sucrose (BDH, UK)
   - 1.17 Tris base (USB, USA)
   - 1.18 100 base pair DNA ladder (Biolab, Thailand)
   - 1.19 1 K base pair DNA ladder (Biolab, Thailand)

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

2.1 10X PCR buffer

2.2 25 mM Magnesium chloride (Promega, USA)

2.3 10 mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega, USA)

2.4 Oligonucleotide primer (Biodesign, Thailand)

2.5 5 U/µl *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)

3. สารเคมี/เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอ

3.1 *Bam*HI (NEB, USA)

3.2 *Eco*RI (NEB, USA)

3.3 10x buffer 3 (NEB, USA)

3.4 100x BSA (NEB, USA)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

4.1 Yeast extract powder (Bio Basic Inc., Canada)

4.2 Agar bacterial powder (Conda, Spain)

4.3 Tryptone powder (Bio Basic Inc., Canada)

4.4 Sodium chloride (BDH, UK)

5. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์

5.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone, Thermo, USA)

5.2 Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, Invitrogen, USA)

5.3 100x Pen-Strep (GIBCO, Invitrogen, USA)

5.4 Trypsin-EDTA (GIBCO, Invitrogen, USA)

5.5 Phosphate Buffered Saline (PBS)

5.6 Tryphan blue(GIBCO, Invitrogen, USA)

6. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Transfection

6.1 Lipofectamine™2000 (Invitrogen, USA)

6.2 Opti-MEM Reduced Serum Medium (GIBCO, USA)

7. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

7.1 QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA)

7.2 Improm-II Reverse Transcriptase Kit (Promega, USA)

7.3 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)

7.4 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan)

7.5 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)

7.6 Mini BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, USA)

7.7 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo, USA)

8. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT

8.1 RIPA buffer

8.2 6x Loading buffer

8.3 10x Tris-Glycine

8.4 Runnig buffer

8.5 Trasfer buffer

8.6 Stripping buffer

8.7 40% Acrylamide/Bis solution (Bio-RAD, USA)

8.8 Non-fat dry milk (Carnation, USA)

8.9 Tris Buffer Saline – Tween (TBS-T)

8.10 mouse anti-V5 monoclonal antibody (Invitrogen, USA)

8.11 goat anti-mouse IgG2a (Abcam, UK)

8.12 rabbit anti- GAPDH (Abcam, UK)

8.13 goat anti-rabbit (Invitrogen, USA)

8.14 Ammoniumpersulphate (APS) (Bio-Rad, USA)

8.15 Temed (Bio-Rad, USA)

8.16 Sodium dodecyl sulphate (SDS) (Sigma, USA)

9. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

9.1 L-alanine (Sigma, USA)

9.2 Sodium glyoxylate (Sigma, USA)

9.3 Pyridoxal phosphate (Sigma, USA)

9.4 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.0

9.5 NADH (Sigma, USA)

9.6 1 M Potassium phosphate buffer, pH 8.0

9.7 Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma, USA)

9.8 Lactate dehydrogenase (Sigma, USA)

9.9 Lysis buffer

10. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์

10.1 Methanol (BDH, UK)

10.2 Phosphate Buffered Saline (PBS)

10.3 Triton-X (Phamacia, Sweden)

10.4 BSA (Sigma, USA)

10.5 Vectashield with DAPI (Thermo, USA)

10.6 Mouse anti-V5 monoclonal (Invitrogen, USA)

10.7 Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG2a (Invitrogen, USA)

10.8 Rabbit anti-catalase polyclonal (Abcam, UK)

10.9 Alexa Flour 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้ แบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

1. การสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพื่อผลิตเอนไซม์ AGT
2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

1. การสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพื่อผลิตเอนไซม์ AGT

1.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 3 ชนิด เพื่อใช้เป็นแหล่งสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ นอกจากนี้ยังใช้เซลล์ COS 7 เป็นแหล่งสำหรับการถ่ายพลาสมิด (expression vector) เข้าไปภายในเซลล์ เพื่อให้ยีน *AGXT* มีการแสดงออกโดยผลิตเอนไซม์ AGT

1.1.1 EBV-transformed lymphoblastoid cell lines (EBV cells) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับการส่งถ่าย Epstein-Barr Virus (EBV) เข้าไปภายในเซลล์

1.1.2 Human hepatocellular liver carcinoma cell lines (Hep-G2 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ตับของมนุษย์

1.1.3 African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells (COS 7 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ไตของลิงชนิดหนึ่งที่พบในทวีปแอฟริกา

1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

1.2.1 การเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง (Thaw cell)

โดยปกติเซลล์เมื่อไม่มีการเพาะเลี้ยงจะถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาในระยะยาว ดังนั้นการเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์จึงต้องทำให้เซลล์ที่ถูกแช่แข็งละลายก่อน โดยนำมาอุ่นในวอเตอร์บาธที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะละลาย จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง (การเทหรือเติมสารต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ต้องทำในตู้เขี่ยเชื้อ (Safety cabinet) เพื่อให้เซลล์ปราศจากการปนเปื้อน โดยก่อนเริ่มและหลังการใช้งานต้องเปิดแสง UV เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที แล้วเช็ดทำความสะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์ทุกครั้ง ทั้งนี้หากต้องมีการนำอุปกรณ์หรือสารเคมีเข้าไปภายในตู้เขี่ยเชื้อระหว่างการใช้งาน ต้องเช็ดด้วย 70% แอลกอฮอล์ก่อนเสมอ) เติม 1X PBS 1 มิลลิลิตร แล้วดูดขึ้นลงเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ตะกอนละลายและกระจายทั่ว จากนั้นเทของเหลวทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย DMEM 10%, 1X FBS และ 1X PenStrep แล้วทำให้ตะกอนแตกกระจายออกจากกันเบา ๆ เสร็จแล้วย้ายลงในหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรอยู่ก้นหลุม รวมปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นวนและเอียงจานเลี้ยงเซลล์สลับไปมาเบา ๆ ประมาณ 5 ครั้ง เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วหลุม นำจานเลี้ยงไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.2.2 การเลี้ยงเซลล์

หลังจากเซลล์เพิ่มปริมาณเต็มหลุม ต้องมีการย้ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อในขวดเลี้ยงเซลล์ (T-Flask) ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมทิ้ง แล้วเติม 1X PBS 1 มิลลิลิตร เอียงไปมาเบา ๆ ให้ทั่วหลุม เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วดูดทิ้ง จากนั้นเติม Trypsin-EDTA 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดออกจากก้นหลุม เมื่อครบเวลาจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 1.5 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ Trypsin ผสมให้เข้ากันโดยดูดขึ้นลง จนกระทั่งเซลล์แยกกระจายออกจากกัน หลังจากนั้นย้ายไปใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 8 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและกระจายเซลล์ให้ทั่วพื้นที่ โดยวางขวดเลี้ยงเซลล์ในแนวนอนแล้วเขย่าเบา ๆ ในทิศทาง ขึ้น-ลง, ซ้าย-ขวา สลับไปมา ประมาณ 10 ครั้ง นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปเก็บไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นทุก ๆ

2-3 วัน ควรตรวจดูสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ว่าเปลี่ยนแปลงหรือไม่ ถ้าสียังไม่เปลี่ยนและเซลล์ยังไม่เพิ่มจำนวนเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ในขวดเลี้ยงเซลล์เดิม เพื่อเพิ่มอาหารให้กับเซลล์และเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ถ้าหากเซลล์มีปริมาณมาก จนกระทั่งเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ซึ่งโดยปกติสีของอาหารเลี้ยงเซลล์จะเปลี่ยนไป สามารถทำต่อได้หลายแบบดังนี้ เก็บเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาในระยะยาว หรือเก็บเซลล์ในรูปตะกอนแห้งสำหรับนำไปวิเคราะห์ต่อ หรือลดปริมาณเซลล์ให้น้อยลงเหลือประมาณ 10-20% สำหรับการเลี้ยงเซลล์ในรอบต่อไป โดยเซลล์ที่เหลืออาจแบ่งเพิ่มเป็นหลาย ๆ ขวดเลี้ยงเซลล์ หรือทิ้งไปถ้าต้องการเพียงคงสภาพการเพาะเลี้ยงเซลล์ไปเรื่อย ๆ โดยไม่ต้องการจำนวนเซลล์เพิ่ม

1.2.3 **การแช่แข็งเซลล์** (Freeze cell)

เป็นการนำเซลล์ไปเก็บรักษาในระยะยาว เพื่อให้คงสภาพเดิมในสภาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยก่อนเริ่มเก็บเซลล์ต้องอุ่นสารต่าง ๆ ที่ต้องใช้และกล่องลดอุณหภูมิทีละ 1 องศาเซลเซียส ในวอเตอร์บาธ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อทุกอย่างอุ่นแล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมที่อยู่ในขวดเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติม 1X PBS 5 มิลลิลิตร เอียงไปมาให้ทั่วแล้วดูดทิ้ง เติม Trypsin-EDTA 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 มิลลิลิตร แล้วกระจายเซลล์ออกจากกัน จากนั้นย้ายไปใส่ในหลอด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วเทของเหลวทิ้ง ใช้มือเคาะข้างหลอดเพื่อให้เซลล์กระจายออก เติม 1X PBS 5 มิลลิลิตร แล้วดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายดียิ่งขึ้น นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เสร็จแล้วเทของเหลวทิ้ง เติม Freezing Media 6 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10% DMSO ใน 1X FBS ผสมและกระจายเซลล์ให้แยกออกจากกัน จากนั้นแบ่งใส่หลอดสำหรับเก็บเซลล์ (Cryotube vial) หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด นำหลอดทั้งหมดไปใส่ในกล่องลดอุณหภูมิทีละ 1 องศาเซลเซียส แล้วนำกล่องไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ

หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด คือ เซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2 และเซลล์ COS 7 จนได้ปริมาณเซลล์พอเหมาะ (ประมาณ 10 ล้านเซลล์) สำหรับเป็นแหล่งในการสกัดอาร์เอ็นเอจึงทำการเก็บเซลล์ในรูปตะกอนแห้ง โดยทำตามขั้นตอนเดียวกันกับการแช่แข็งเซลล์ แต่ไม่ต้องเติม Freezing media จากนั้นจึงนำตะกอนเซลล์แต่ละชนิดที่ได้มาสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วย QIA amp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้ เติมบัฟเฟอร์ RLT 600 ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์แตก ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จนกระทั่งเซลล์กระจายออก ไม่เป็นกลุ่มก้อน จากนั้นย้ายของเหลวทั้งหมดมาใส่ QIA shredder spin column ซึ่งซ้อนทับอยู่บน collection tube แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บของเหลวที่ได้ซึ่งอยู่ใน collection tube มาเติม 70% เอทานอล 600 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง เมื่อเข้ากันแล้วให้ย้ายของเหลวทั้งหมดรวมทั้งตะกอนซึ่งอาจเกิดขึ้นเล็กน้อยลงใน QIAamp spin column หลอดใหม่ซึ่งซ้อนทับอยู่บน collection tube หลอดเดิม แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที เสร็จแล้วย้าย QIAamp spin column ไปซ้อนทับบน collection tube หลอดใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RW1 700 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ย้าย QIAamp spin column ไปซ้อนทับบน collection tube หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อล้างตะกอนอีกรอบ จากนั้นย้าย QIAamp spin column ไปซ้อนทับบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม RNase-Free water 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ QIAamp spin column เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอให้อยู่ในรูปสารละลาย แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เสร็จแล้วจะได้อาร์เอ็นเอที่ละลายอยู่ในน้ำซึ่งอยู่ในหลอด Microcentrifuge ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

1.4 การสังเคราะห์ยีน *AGXT* ปกติ

1.4.1 RT – PCR

นำอาร์เอ็นเอของเซลล์แต่ละชนิดที่ได้มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *AGXT* ปกติต่อไป โดยใช้ Improm-II Reverse Tronscriptase Kit (Promega, USA) ซึ่งมีขั้นตอนแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการนำไพรเมอร์ (Oligo (dT)) มารวมกับอาร์เอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบ โดยเตรียมอาร์เอ็นเอจากเซลล์แต่ละชนิดที่ใช้เป็นต้นแบบแยกแต่ละหลอด ปริมาตร 10.1 ไมโครลิตร ผสมกับไพรเมอร์ชนิด Oligo (dT) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำแต่ละหลอดไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วรีบย้ายไปให้ความเย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ในระหว่างรอให้เตรียม 5X Improm II™ Reaction Buffer 4 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 2.4 ไมโครลิตร 10 mM dNTP Mixture 1 ไมโครลิตร Ribonuclease Inhibitor (RNasin) 0.5 ไมโครลิตร และ ImProm II™ Reverse Transeriptase 1 ไมโครลิตร เมื่อครบ 5 นาทีแล้วจะเข้าสู่ส่วนที่ 2 ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจากอาร์เอ็นเอต้นแบบ โดยนำสารผสมในส่วนแรกไปรวมกับสารผสมที่ได้เตรียมไว้ซึ่งมีปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร นำแต่ละหลอดไปใส่เครื่อง PCR แล้วตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาในขั้นต่าง ๆ ดังนี้ ขั้นแรก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับอาร์เอ็นเอต้นแบบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นคู่สม และขั้นสุดท้าย 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Reverse Transcriptase หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอคู่สมของเซลล์แต่ละชนิดที่ได้มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

1.4.2 การเพิ่มปริมาณยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region)

นำดีเอ็นเอคู่สมของเซลล์แต่ละชนิดมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) ด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่ออกแบบไว้ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับตัดต่อเข้ากับ Expression vector ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน *AGXT* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (CDS) จากฐานข้อมูลใน Pubmed ของ NCBI หลังจากออกแบบไพรเมอร์เสร็จ นำไพรเมอร์ที่ได้ทั้ง 2 ชนิดมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *AGXT* ด้วยโปรแกรม BLAST แล้วส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

ไพรเมอร์ไปสังเคราะห์ที่บริษัท Biodesign สำหรับส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR และสภาวะต่าง ๆ ในการทำ Gradient PCR แสดงไว้ในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ PCR

ชื่อ	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' to 3')
*AGXT-Bam*HI-F	CCA**GGATCC**CGAGCGGCAGGTT
*AGXT-Eco*RI-R	CT**GAATTC**CAGTGGGCAGGTCTCAGCTT

หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตัวหนาคือบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางที่ 2 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR buffer	2.0	1X
2. 25 mM $MgCl_2$	1.2	1.5 mM
3. 10 mM dNTPs	0.4	0.2 mM
4. 10 µM Forward primer (*AGXT-Bam*HI-F)	0.3	0.15 µM
5. 10 µM Reverse primer (*AGXT-Eco*RI-R)	0.3	0.15 µM
6. 5 U/µl Taq Polymerase	0.1	0.5 U
7. Distilled water	13.7	
8. cDNA (แยกชนิดละหลอด)	2.0	
ปริมาตรรวมทั้งหมด	20.0	

ตารางที่ 3 สภาวะในการทำ Gradient PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1. Initial denaturation	94	5 นาที
2. PCR cycle (40 รอบ)		
- Denature	94	45 วินาที
- Annealing	55, 58 และ 60	45 วินาที
- Extension	72	1 นาที 20 วินาที
3. Final extension	72	15 นาที
4. Holding	15	

1.4.3 อิเล็กโทรโฟริซิส

นำ PCR product ของเซลล์แต่ละชนิดมาทำอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อตรวจหายีน *AGXT* ที่ได้จากการทำ PCR บนแผ่น agarose gel 1.5% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel-docXR

1.4.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเจล

เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจึงตัดเจลบริเวณนั้นซึ่งมีขนาดเท่ากับยีน *AGXT* มาสกัดโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำเจลที่ตัดได้ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปชั่งน้ำหนักจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ลงในหลอดปริมาตร 300 ไมโครลิตร ต่อเจลหนัก 100 มิลลิกรัม นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จนกระทั่งเจลละลายหมดซึ่งทำให้สารละลายกลายเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลายในหลอด แล้วผสมให้เข้ากัน เตรียม QIAquick spin column ซึ่งซ้อนทับอยู่บน collection tube ย้ายสารละลายทั้งหมดจากหลอด microcentrifuge มายัง QIAquick spin column เพื่อดักจับดีเอ็นเอไว้ แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่ตกลงใน collection tube ทั้งหมด นำ QIAquick spin column มาซ้อนทับบน collection tube อันเดิม เติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร เพื่อล้างให้

สะอาดแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวทั้งหมดใน collection tube แล้วนำไปปั่นตกตะกอนซ้ำอีกรอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAquick spin column มาซ้อนทับบนหลอด microcentrifuge อันใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางของ QIAquick membrane เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอจะได้ดีเอ็นเอซึ่งก็คือยีน *AGXT* ละลายอยู่ในหลอด microcentrifuge

1.5 การสร้างและเพิ่มปริมาณพลาสมิด (pGEM-T vector) สำหรับ mutagenesis

ขั้นตอนนี้เป็นการนำยีน *AGXT* ปกติที่สังเคราะห์ได้มาตัดต่อเข้ากับ pGEM-T vector เกิดเป็นพลาสมิดลูกผสม แล้วถ่ายพลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ให้มีปริมาณมากพอสำหรับทำ mutagenesis ในขั้นตอนต่อไป เพื่อสังเคราะห์ยีน *AGXT* กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

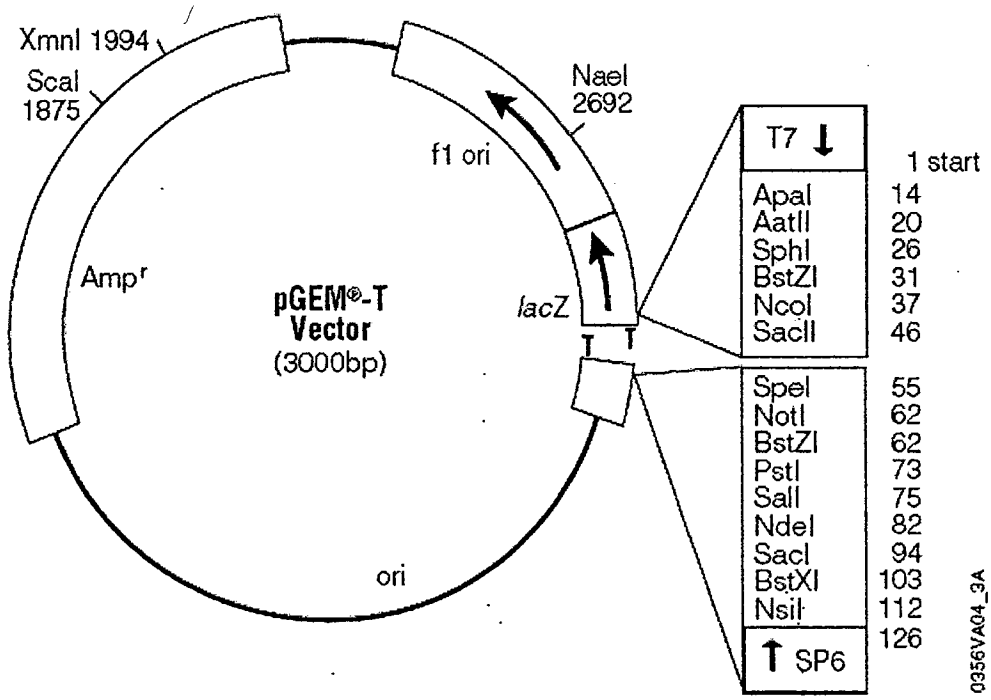
1.5.1 โครงสร้างของ pGEM-T vector

pGEM-T vector (Promega, USA) เป็นพลาสมิดที่มีคุณสมบัติพิเศษคือ มี Thymidine (T) ยื่นออกมาทางปลาย 3' ทั้งสองด้านในบริเวณตำแหน่งที่จะมีการแทรกยีนเข้าไปในพลาสมิด (insertion site,บริเวณ *lacZ*) ดังภาพที่ 11 ทำให้การเชื่อมต่อระหว่างยีนที่ต้องการแทรกกับพลาสมิดเกิดได้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น อีกทั้งยังสามารถป้องกันการกลับมาเชื่อมต่อกันเองของ พลาสมิดเปล่าโดยปราศจากยีนที่ต้องการแทรก นอกจากนี้ยังมียีนต้านยาปฏิชีวนะชนิด ampicillin ทำให้สะดวกต่อการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดเข้าไปภายใน

1.5.2 การเตรียม competent cells

นำเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5-α มาเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ จากนั้นเขี่ยโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ หลังจากนั้นทำการเจือจางโดยนำไปเทใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ ย้ายแบ่งมาใส่ในแต่ละหลอดที่เย็นในหลอด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บเซลล์ในรูปของตะกอน เทของเหลวทิ้งให้หมดจากนั้นเติม 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วใช้ปิเปต บอยดูดขึ้น-ลง เพื่อให้

เซลล์แยกกระจายออกจากกัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้งให้หมด จากนั้นเติม 0.1 M $CaCl_2$ ที่ผสม 10% v/v glycerolปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาปั่นตกตะกอนในตอนแรก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 11 โครงสร้างของ pGEM-T vector

(www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cloning)

1.5.3 การเชื่อมต่อยีน *AGXT* กับ pGEM-T vector (Ligation)

เตรียมสารผสมต่าง ๆ ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 4 เสร็จแล้วนำไปบ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Ligation ระหว่างยีน *AGXT* กับ pGEM-T vector

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 2X Rapid Ligation buffer	5.0
2. 50 ng/µl pGEM-T vector	1.0
3. 33.6 ng/µl PCR product	3.0
4. 3 U/µl T4 DNA Ligase	1.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

1.5.4 การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ competent cells (Transformation)

โดยปกติ competent cells จะถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเริ่มต้นจึงต้องทำให้เซลล์ที่ถูกแช่แข็งละลายก่อน โดยนำมาแช่ในน้ำแข็งจนกว่าจะละลาย จากนั้นนำ competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการทำ Ligation ปริมาตร 8 ไมโครลิตร โดยห้ามเขย่าแรง ๆ แล้วนำไปบ่มไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เสร็จแล้วนำไปวางในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปผสมกับ SOC media 980 ไมโครลิตร 2 M $MgCl_2$ 10 ไมโครลิตร และ 2 M glucose 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาทีในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วดูดของเหลวทิ้งเหลือไว้ประมาณ 100 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้น-ลงเพื่อให้ตะกอนกระจายออกจากกันและละลายในของเหลวอีกครั้ง แบ่งไปเลี้ยงปริมาตร 25 ไมโครลิตรในจานเพาะเชื้อแต่ละใบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งผสมกับ ampicillin ในอัตราส่วน 1:1,000 ซึ่งใช้เป็น marker ในการคัดเลือก ทำให้เซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดเข้าไปเท่านั้นจึงจะสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้ เนื่องจากภายในโครงสร้างของพลาสมิดมียีนต้านยา ampicillin อยู่ โดยนำไปเลี้ยงในเครื่องบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นในจานเพาะเชื้อมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยแยกโคโลนีละหลอด ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร ผสมกับ ampicillin 5 ไมโครลิตร ในหลอด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องบ่ม

เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.5.5 การสกัดพลาสมิด

สกัดพลาสมิดด้วย High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้ นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ได้จากการทำ Transformation แบ่งใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวให้หมด ในขั้นตอนนี้สามารถปั่นตกตะกอนซ้ำเพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียเพิ่มเติมในหลอดเดิมได้อีก เติม PD1 buffer ที่ผสม RNase A แล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้น-ลง เพื่อให้ตะกอนแตกกระจายออกจากกันและผสมเป็นเนื้อเดียวกับของเหลวที่เติม จากนั้นเติม PD2 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันเบา ๆ โดยพลิกหลอดไปมาประมาณ 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งสารละลายใส แล้วเติม PD3 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที โดยพลิกหลอดไปมาประมาณ 10 ครั้ง ห้ามเขย่าแรง ๆ นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างรอให้นำ PD Column ใส่ใน Collection Tube ขนาด 2 มิลลิลิตร เมื่อปั่นตกตะกอนเสร็จให้ดูดเฉพาะของเหลวที่อยู่ด้านบนใส่ลงใน PD Column แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube แล้วนำไปรองใส่กับ PD column ตามเดิม จากนั้นเติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube แล้วนำไปรองใส่กับ PD column ตามเดิม จากนั้นเติม Wash buffer ที่ผสมกับเอทานอลเรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube แล้วนำไปรองใส่กับ PD column ตามเดิม เสร็จแล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาทีอีกครั้ง เพื่อทำให้ PD Column แห้ง จากนั้นย้าย PD Column มาใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นหลอดใหม่และสะอาด แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง PD Column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เสร็จแล้วจะได้พลาสมิดที่อยู่ใน Elution buffer ในหลอด Microcentrifuge

1.5.6 การตรวจสอบพลาสมิด

เป็นการนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับที่ออกแบบไว้ในไพรเมอร์ตั้งแต่ตอนแรก 2 ชนิด คือ *Bam*HI กับ *Eco*RI เพื่อตรวจสอบขนาดโดยประมาณของยีน *AGXT* ที่แทรกเข้าไปและพลาสมิด โดยเตรียมสารผสมต่าง ๆ ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 5 เสร็จแล้วนำไปบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟริซิส บนแผ่น agarose gel 1.5% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel-docXR เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏว่าตรงกับขนาดของยีน *AGXT* และพลาสมิดเปล่าหรือไม่ ถ้าแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 แถบตรงกับขนาดของยีน *AGXT* และพลาสมิดจริง จึงทำการส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AGXT* ที่แทรกอยู่ใน pGEM-T vector ต่อไปที่บริษัท Macro Gen เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนถูกต้องหรือไม่ โดยใช้ universal primer ในการตรวจสอบ คือ pUC/M13 Forward และ pUC/M13 Reverse

ตารางที่ 5 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 20 U/µl *Bam*HI	0.5
2. 20 U/µl *Eco*RI	0.5
3. 10 X Buffer of *Eco*RI	1.0
4. Distilled water	3.0
5. พลาสมิดที่ได้จากการสกัด	5.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

1.6 การสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

ขั้นตอนนี้เป็นการนำพลาสมิดลูกผสม (ยีน *AGXT* ซึ่งมีลำดับเบสถูกต้องเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector) มาทำ mutagenesis โดยใช้ QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) เพื่อสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ซึ่งมีขั้นตอนในการทำดังนี้ ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน *AGXT* ในตำแหน่งที่ต้องการให้มีการกลายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งงานวิจัยนี้ต้องการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 จาก C เป็น G

เพื่อทำให้ได้เอนไซม์ที่ผิดปกติ โดยมีกรดอะมิโนในลำดับที่ 11 เปลี่ยนไปจาก Proline เป็น Arginine โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (CDS) จากฐานข้อมูลใน Pubmed ของ NCBI หลังจากออกแบบไพรเมอร์เสร็จ นำไพรเมอร์ที่ได้ทั้ง 2 ชนิดมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *AGXT* ด้วยโปรแกรม BLAST แล้วส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์ที่บริษัท Biodesign หลังจากได้ไพรเมอร์แล้วทำ Mutant Strand Synthesis Reaction (Thermal Cycling) โดยการเตรียมส่วนผสมต่าง ๆ ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 7 เสร็จแล้วนำไปทำ PCR โดยใช้สภาวะต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ สำหรับทำ mutagenesis

ชื่อ	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' to 3')
AGXT-P11R-F	GCTGCTGGTGACCCCCCGCAAGGCCCTGCTCAAGC
AGXT-P11R-R	GCTTGAGCAGGGCCTTGCGGGGGGTCACCAGCAGC

ตารางที่ 7 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Mutant Strand Synthesis Reaction

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 10X Reaction buffer	5.0
2. 5 ng/µl พลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้	2.0
3. dNTPs mix	1.0
4. 100 ng/µl Forward primer (*AGXT*-P11R-F)	1.25
5. 100 ng/µl Reverse primer (*AGXT*-P11R-R)	1.25
6. Distilled water	39.1
ปริมาตรรวมทั้งหมด	50.0
หลังจากนั้นเติม 2.5 U/µl *Pfu Turbo* DNA polymerase	1.0

ตารางที่ 8 สภาวะในการทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1. Initial denaturation	95	30 วินาที
2. PCR cycle (14 รอบ)		
- Denature	95	30 วินาที
- Annealing	55	30 วินาที
- Extension	68	7 นาที
3. Holding	15	

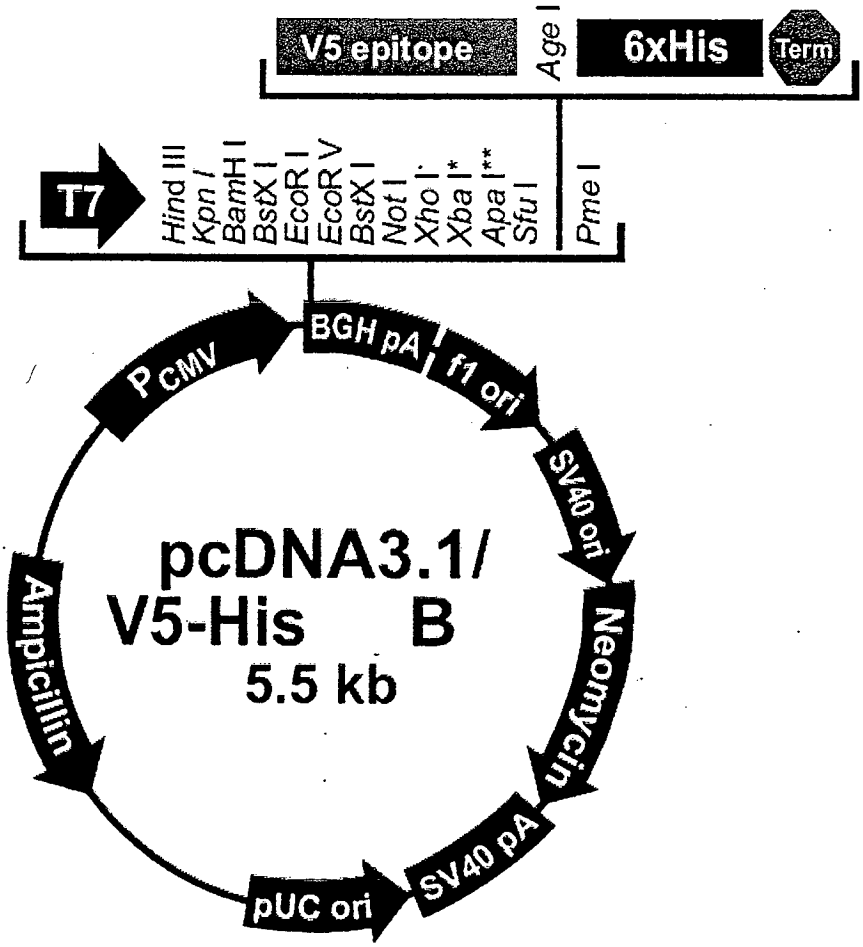
เมื่อทำ PCR เสร็จแล้ว ให้นำ Amplification products ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเติม10 U/µl *Dpn* I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด แล้วใช้ไมโครปิเปตผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอน นาน 1 นาที เพื่อให้สารที่ค้างเกาะตามบริเวณต่าง ๆ ของหลอดตกลงมายังก้นหลอด จากนั้นรีบนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเสร็จจากขั้นตอนนี้จะได้พลาสมิดลูกผสมซึ่งมียีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg แทรกอยู่ หลังจากนั้นทำ transformation เพื่อนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีนกลายพันธุ์แทรกอยู่เข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเหมือนกับขั้นตอนในข้อ 1.5.4 เสร็จแล้วจึงทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ ซึ่งเหมือนกับขั้นตอนในข้อ 1.5.5 และ 1.5.6 ตามลำดับ

1.7 การสร้างและเพิ่มปริมาณพลาสมิด (expression vector) สำหรับการทำ transfection

ขั้นตอนนี้เป็นการนำยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบPro11Arg ตัดต่อเข้ากับ expression vector (pcDNA3.1/V5-*His*B) เพื่อนำพลาสมิดที่ได้ทั้ง 2 ชนิด transfect เข้าสู่เซลล์ COS7 เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ AGT

1.7.1 โครงสร้างของ expression vector

pcDNA3.1/V5-*His*B (Invitrogen, USA) เป็นพลาสมิดที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ออกแบบให้เป็นพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนที่แทรกเข้าไปอยู่ในระดับสูงในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสามารถตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากยีนที่แทรกอยู่ในพลาสมิดนี้ได้ เนื่องจากมีโปรตีนเช่น V5 หรือ 6X His ติดอยู่ ดังแสดงในภาพที่ 12 ทำให้ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกหรือติดตามโปรตีนที่เราสนใจในการวิจัยได้ง่าย โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ติดอยู่กับโปรตีนที่เราสนใจในการตรวจสอบ



ภาพที่ 12 โครงสร้างของ pcDNA3.1/V5-*His*B ซึ่งในงานวิจัยใช้เป็น expression vector (http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V81020)

1.7.2 การเชื่อมต่อยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เข้ากับ expression vector

นำ expression vector และพลาสมิดลูกผสมทั้ง 2 ชนิด คือ ยีน *AGXT* ที่ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ pGEM-T vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam*HI กับ *Eco*RI เพื่อตัดให้มีปลายที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ระหว่างยีนที่ต้องการแทรกเข้าไปกับ expression vector โดยเตรียมส่วนผสมต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 9 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนแผ่น agarose gel 1% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel-docXR

ตารางที่ 9 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับเตรียมตัดต่อยีน *AGXT* กับ expression vector

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
	พลาสมิดลูกผสม	expression vector
1. 20 U/µl BamHI	1.0	1.0
2. 20 U/µl *Eco*RI	1.0	1.0
3. 10 X Buffer 3	3.0	3.0
4. 100 X BSA	0.3	0.3
4. Distilled water	4.7	23.7
5. พลาสมิดลูกผสมแต่ละชนิด	20.0	-
6. expression vector	-	1.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	30.0	30.0

เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งมีทั้งหมด 3 แถบคือ แถบดีเอ็นเอของยีน *AGXT* ที่ปกติ, แถบดีเอ็นเอของยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg และแถบดีเอ็นเอของ expression vector จึงตัดเจลแต่ละบริเวณมาสกัดโดยใช้วิธีการเดียวกับในข้อ 1.4.4 แต่ในขั้นตอนสุดท้ายให้เปลี่ยนจากบัฟเฟอร์ EB มาใช้ deionized water แทน เมื่อเสร็จแล้วนำสารละลายทั้ง 3 ชนิดไปทำอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อตรวจสอบผลจากการสกัดเจลและดูความเข้มข้นของสารละลายที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้น ladder เมื่อทราบความเข้มข้นของสารละลายแต่ละชนิดแล้ว จึงนำมาทำ Ligation เพื่อเชื่อมต่อยีน *AGXT* แต่ละชนิดเข้ากับ expression vector โดยเตรียมสารผสมต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 10 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

ตารางที่ 10 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Ligation ระหว่างยีน *AGXT* กับ expression vector

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 10 X Ligation buffer	1.0
2. 30 ng/µl expression vector	3.5
3. 50.0 ng/µl ยีน *AGXT* แต่ละชนิด	1.5
4. 400 U/µl T4 DNA Ligase	1.0
5. deionized water	3.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

หลังจากนั้นทำ transformation เพื่อนำพลาสมิดเปล่าและพลาสมิดลูกผสมแต่ละชนิด ซึ่งมี 2 ชนิดคือยีน *AGXT* ที่ปกติเชื่อมต่อกับ expression vector และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ expression vector เข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรีย โดยมีขั้นตอนเหมือนกับในข้อ 1.5.4 เสร็จแล้วจึงทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ ซึ่งเหมือนกับขั้นตอนในข้อ 1.5.5 และ 1.5.6 ตามลำดับ แต่ใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์คนละชนิดกัน โดยเปลี่ยนเป็น T7 Promoter และ BGH Reverse ซึ่งเป็น universal primer

1.7.3 การเพิ่มปริมาณพลาสมิด

ในงานวิจัยจำเป็นต้องใช้พลาสมิดในปริมาณมาก พลาสมิดที่เตรียมไว้ในตอนแรกอาจไม่เพียงพอสำหรับการวิจัย ดังนั้นจึงต้องทำการเพิ่มปริมาณพลาสมิดทั้ง 3 ชนิด โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 ขวด ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่อง autoclaved จากนั้นรอให้เย็น จึงเติม ampicillin ขวดละ 250 ไมโครลิตร (ใช้อัตราส่วน 1:1,000) เมื่อเตรียมเสร็จให้ทำ starter โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจากขวดรูปชมพู่แต่ละใบปริมาตร 40 มิลลิลิตร มาแบ่งใส่ในหลอด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดละ 20 มิลลิลิตร จะได้ทั้งหมด 6 หลอด จากนั้นนำ glycerol stock ของพลาสมิดทั้ง 3 ชนิดมาแบ่งใส่ชนิดละ 2 หลอด แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ เมื่อครบกำหนดจึงนำ starter มาเป็นหัวเชื้อในการเพิ่มปริมาณต่อ โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 หลอดของแต่ละชนิดลงในขวดรูปชมพู่แต่ละขวดแยกกัน นำมาเลี้ยงต่ออีก 2 ชั่วโมงที่สภาวะเดียวกัน จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปทำเป็น glycerol stock เพื่อเป็นแหล่งสำรองพลาสมิดและเก็บรักษาในระยะยาวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยแบ่งมา 1,800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับ 100% glycerol ปริมาตร 200

ไมโครลิตร จากนั้นแบ่งใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 8 หลอด หลอดละ 250 ไมโครลิตรแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่เหลือทั้งหมดให้นำไปปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรีย ในหลอด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร พลาสมิดละ 4 หลอด ด้วยความเร็ว 5,400 g (rcf) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำไปสกัดพลาสมิดและตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ ซึ่งเหมือนกับขั้นตอนในข้อ 1.5.5 และ 1.5.6 ตามลำดับ ยกเว้นในขั้นตอนสุดท้ายที่ไม่ต้องส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำอีก เนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนทั้ง 2 ชนิดแล้ว

1.8 การถ่ายพลาสมิด (expression vector) เข้าสู่ COS7 cells (Transfection)

ขั้นตอนนี้เป็นการนำพลาสมิดเปล่า (empty expression vector) และพลาสมิดลูกผสมทั้ง 2 ชนิดคือยีน *AGXT* ที่ปกติเชื่อมต่อกับ expression vector และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ expression vector เข้าไปภายในเซลล์ COS7 เพื่อให้มีการแสดงออกของยีน โดยผลิตเอนไซม์ AGT ออกมา ส่วนเซลล์ COS7 ที่ได้รับพลาสมิดเปล่านั้นจะไม่มีการผลิตเอนไซม์ AGT จึงใช้เป็นตัวควบคุมเพื่อเปรียบเทียบผลการวิจัย

1.8.1 การ seed cell

ก่อนที่จะทำ Transfection ต้องทำการ Seed cell เพื่อเตรียมปริมาณเซลล์ให้พอเหมาะและมีคุณภาพดีเหมาะสำหรับการทำ Transfection ซึ่งการทำทุกอย่างต้องทำในตู้เขี่ยเชื้อ (Safety cabinet) เพื่อให้เซลล์ปราศจากการปนเปื้อน โดยมีข้อควรปฏิบัติอย่างเคร่งครัดเหมือนกับในข้อ 1.2.1 และมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ นำขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 ที่เลี้ยงเซลล์อยู่ก่อนหน้าแล้วมาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM + 10% FBS) ทิ้งให้หมด ล้างด้วย 1 X PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วดูดทิ้งให้หมด จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นใส่ Trypsin 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เซลล์ COS7 หลุดลอกออกจากพื้นขวด เมื่อครบเวลาให้ใช้มือช่วยเคาะข้างขวด เพื่อให้เซลล์หลุดลอกดีขึ้น เมื่อมั่นใจว่าเซลล์หลุดลอกหมดแล้วให้เติม อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 3 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ Trypsin จากนั้นใช้ปิเปตช่วยกระจายเซลล์ออกจากกัน แล้วย้ายไปใส่ในหลอด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อ เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วเทของเหลวที่อยู่ด้านบนทิ้งไป ปิดฝาให้สนิทแล้วใช้มือดีดข้างหลอดเพื่อให้ตะกอนเซลล์กระจายตัวจากกัน จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไปแล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นลง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน เมื่อสังเกตว่า

เซลล์กระจายตัวออกจากกันดี ไม่มีกลุ่มก้อน ให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ติดอยู่ปลายทิปไปทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer) ทำให้ทราบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ COS7 กระจายตัวอยู่ ดังนั้นจึงสามารถคำนวณปริมาณหัวเชื้อนี้ให้มีปริมาณเซลล์ที่พอเหมาะสำหรับการ Transfection ได้ โดยปรับความเข้มข้นให้มีจำนวนเซลล์ตามที่ต้องการในปริมาตรของหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร เช่น แต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมต้องการเซลล์จำนวน 600,000 เซลล์ ดังนั้นจึงต้องทำการปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 600,000 เซลล์/มิลลิลิตร โดยก่อนที่จะนำหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลลิตรไปใส่ในแต่ละหลุมให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปก่อน เมื่อเติมหัวเชื้อลงไปจะได้ปริมาตรรวมในแต่ละหลุม 2 มิลลิลิตร จากนั้นขยับจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมไปมา ซ้าย-ขวา บน-ล่าง เพื่อให้เซลล์ COS7 กระจายทั่วหลุมเท่า ๆ กัน เสร็จแล้วนำจานเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.8.2 การทำ Transfection

วัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดทั้ง 3 ชนิดด้วยเครื่อง spectrophotometer (nano drop) หลังจากนั้นจึงทำการคำนวณปริมาตรของพลาสมิดแต่ละชนิดที่จะถ่ายเข้าไปภายในเซลล์ COS7 โดยแต่ละหลุมต้องการ 4 ไมโครกรัม นำพลาสมิดแต่ละชนิดไปผสมกับ opti-mem ให้ได้ปริมาตรรวม 250 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายอีกหลอดหนึ่งโดยนำ lipofectamine 10 ไมโครลิตร ผสมกับ opti-mem 240 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 หลอดมาผสมกันจะได้ปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปใส่ในหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมที่ทำการ seed cell ไว้ก่อนหน้านี้แล้ว ซึ่งก่อนใส่ให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยใช้ DMEM ที่ไม่ผสม FCS และ Pen-Strep จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.9 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมเอนไซม์ AGT สำหรับวิเคราะห์การทำงานต่อไป โดยวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการ Transfection ซึ่งเกิดจากการแสดงออกของยีน *AGXT* แต่ละชนิดภายในเซลล์ COS7 โดยหลังจาก Transfection ครบ 48 ชั่วโมง จึงเก็บเซลล์ใน RIPA buffer + 1x Protease Inhibitor (PI) สำหรับวิเคราะห์โดยวิธี western blot ส่วนการวิเคราะห์เพื่อวัดความสามารถในการทำงานให้ทำการเก็บเซลล์ใน AGT buffer (100 μM Pyridoxal phosphate, 240 mM Sucrose และ 100 mM Potassium phosphate buffer; pH 8.0) จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตก (sonication) โดยแช่ในน้ำแข็ง ด้วยเครื่อง Ultrasonic processors รุ่น UP100H 3 รอบๆละ 10 วินาที โดยพักระหว่างรอบ 1 นาที สุดท้ายวัดปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด ด้วยวิธี BCA Protein โดยใช้ Mini BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, USA) ซึ่งมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 11 เสร็จแล้วเตรียม Working reagent (Reagent A : Reagent B : Reagent C = 25 : 24 : 1) หลังจากนั้นนำ Working reagent ไปผสมกับสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆและสารละลายโปรตีนที่ต้องการวัด ในอัตราส่วน 20:1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer (nano drop) ซึ่งมีโปรแกรมอัตโนมัติในการคำนวณปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีนที่ต้องการวัด โดยเทียบกับค่าที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน BSA

ตารางที่ 11 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หลอด	ความเข้มข้นของ BSA (μg/μl)	ปริมาตรของสารละลายที่ใช้เก็บเซลล์ (ไมโครลิตร)	ปริมาตรและแหล่งของ BSA (ไมโครลิตร)
A	2	0	120 จาก stock
B	1.5	50	150 จาก stock
C	1	130	130 จาก stock
D	0.75	70	70 จากหลอด B
E	0.5	130	130 จากหลอด C
F	0.25	130	130 จากหลอด E
G	0.125	130	130 จากหลอด F
H	0 (blank)	160	0

2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT

โดยวิธี western blot เทียบกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเปล่าเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งใช้ Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell and Mini-PROTEAN3 Cell (Bio-Rad, USA) โดยนำเซลล์ COS7 ที่ภายในมีพลาสมิดแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ พลาสมิดที่มียีน *AGXT* ปกติ, พลาสมิดที่มียีน *AGXT* กลายพันธุ์ แบบ P11R และพลาสมิดเปล่า ซึ่งแต่ละชนิดอยู่ในสารละลายของ RIPA buffer + 1x Protease Inhibitor (PI) ที่ทำให้เซลล์แตกแล้วมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเฉพาะของเหลวที่อยู่ด้านบนไปวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนรวม ตามขั้นตอนในข้อ 1.9 เพื่อนำมาคำนวณปริมาณของเหลวที่จะนำไปโหลดเจล ซึ่งในแต่ละหลุมใส่โปรตีนรวม 2.5 ไมโครกรัม แล้วนำไปผสมกับ 1X loading buffer, 10% β-mercaptoethanol จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเตรียมแผ่นเจลในชุดเตรียมเจลซึ่งเป็นแผ่นกระจก 2 แผ่นประกบกันมีช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกหนา 1.5 มิลลิเมตร โดยเตรียม separating gel 12% ไว้เป็นส่วนล่างสูงประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นปรับระดับผิวหน้าเจลให้เรียบเสมอกันด้วยการเติม butanol หรือ isopropanol 200 ไมโครลิตร แล้วปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วให้เตรียม stacking gel 4% ซ้อนทับด้านบน separating gel โดยเติมลงไปให้ล้นแล้วใส่ comb ลงไปด้านบนเพื่อให้เกิดหลุมในแผ่นเจล ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ในระหว่างรอแผ่นเจลแข็งตัวให้เตรียม running buffer ปริมาตร 1 ลิตร เมื่อทุกอย่างพร้อมแล้วจึงเริ่มทำ SDS-PAGE โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าในการแยกแถบโปรตีน 120 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 15 นาที ในระหว่างรอการทำ SDS-PAGE ให้เตรียม tank น้ำแข็งและ transfer buffer ปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปแช่ไว้ที่ตู้แช่แข็ง เมื่อครบเวลาจึงทำการ transfer โปรตีนจากเจลสู่ nitrocellulose membrane โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยก่อนเริ่ม transfer ให้แช่ membrane, ฟองน้ำและกระดาษกรองใน transfer buffer ประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงนำมาประกบใน blot โดยเรียงตามลำดับดังนี้blot ด้านสีดำ → ฟองน้ำ → กระดาษกรอง → แผ่นเจล → membrane → กระดาษกรอง → ฟองน้ำ → blot ด้านสีขาว แล้วนำ blot ที่ได้ใส่ลงใน tank run โดยหันด้านสีดำไปทางเดียวกัน พร้อมด้วย tank น้ำแข็ง, transfer buffer และแท่งแม่เหล็ก เพื่อให้ความเย็นกระจายอย่างทั่วถึง เมื่อครบเวลาในการ transfer จึงนำ membrane มาล้างด้วย TBS-T เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น block ด้วย 5% non-fat dry milk นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เสร็จแล้วล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำ membrane มาบ่มด้วย primary antibody 2 ชนิด คือ mouse anti-V5 monoclonal antibody (Invitrogen) ในอัตราส่วน 1:5,000

และ rabbit anti- GAPDH antibody (Abcam) ในอัตราส่วน 1:1,000 โดยผสมกับ 5% non-fat dry milk ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร นำหลอดไปวางบนเครื่องหมุนหลอด 360 องศาแล้วบ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เสร็จแล้วบ่มด้วย secondary antibody 2 ชนิด คือ goat anti-mouse IgG2a (Abcam) ในอัตราส่วน 1:5,000 และ goat anti-rabbit (Invitrogen) ในอัตราส่วน 1:2,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เสร็จแล้วใส่ super signal โดยใช้ Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo, USA) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วปล่อยทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นรีบนำไปประกบกับแผ่นฟิล์มด้วยเวลาที่แตกต่างกัน แล้วนำแผ่นฟิล์มที่ได้ไปล้างด้วยเครื่องล้างฟิล์ม นำแผ่นฟิล์มมาประกบกับ membrane เพื่อระบุตำแหน่งแถบโปรตีนขนาดต่าง ๆ ของ marker จากนั้นจึงอ่านผลจากแผ่นฟิล์ม

2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

โดยวิธี semiautomated spectrophotometric (Rumsby *et al.*, 1997) ซึ่งโปรตีนรวมที่นำมาวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ได้มาจากเซลล์ 5 ชนิด คือ เซลล์ HEPG2, เซลล์ COS7 เปล่า, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน *AGXT* ปกติ, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ P11R และเซลล์ COS7 ที่มี expression vector เปล่า สำหรับสารเคมีที่ใช้ในงานส่วนนี้ทั้งหมดซื้อจากบริษัท Sigma Chemical วิธีนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยเติมสารตั้งต้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 12 ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดต้องเตรียม blank แยกจากกันชนิดละหลอดด้วย

เมื่อเตรียมสารละลายในแต่ละหลอดเสร็จ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเอนไซม์ AGT ทำงาน จะได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นไพรูเวท จากนั้นทุกหลอดหยุดการทำงานของเอนไซม์ AGT ด้วยการเติม 3 M TCA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วรีบนำหลอดไปวางในน้ำแข็ง เฉพาะหลอด blank เติม 0.1 M Sodium glyoxylate ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เสร็จแล้วนำทุกหลอดไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะของเหลวชั้นบนแล้วแช่ในน้ำแข็งเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไพรูเวทที่เกิดขึ้นในขั้นตอนต่อไป ส่วนขั้นที่ 2 เป็นการตรวจวัดปริมาณไพรูเวทที่เกิดขึ้น โดยใช้เอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) และNADH เป็น cofactor เปลี่ยนไพรูเวท เป็นแลคเตท และ NADH เป็น NAD^+ ซึ่ง NADH เท่านั้นที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ดังนั้นจึงต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังใส่เอนไซม์ LDH ประมาณ 5 นาที (A2) ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น CE9500 แล้วนำค่าทั้งสองมา

เปรียบเทียบกันและคำนวณหาปริมาณไพรูเวท ซึ่งจะแสดงค่าความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ได้ โดยถ้ามีปริมาณไพรูเวทมาก ค่า A2 จะลดต่ำลงมากเมื่อเทียบกับค่า A1 ในขั้นตอนนี้นำตัวอย่างที่แช่ในน้ำแข็งจากขั้นตอนแรกมาเจือจาง 3 เท่า โดยเติมตัวอย่างปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมกับ ion-exchanged water ปริมาตร 120 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายผสม (ซึ่งประกอบด้วย 0.25 mM NADH และ 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (A1) เสร็จแล้วเติมเอนไซม์ LDH ซึ่งมีความเข้มข้น 4,981.8 IU/380 ไมโครลิตรปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5 IU ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาทีเพื่อรอให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (A2)

ตารางที่ 12 ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนแรกของการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		ความเข้มข้นสุดท้าย
	Blank	Sample	
1. โปรตีนรวมจากการ sonicate	X*	X*	100 ไมโครกรัม
2. 1 M Potassium Phosphate buffer, pH 8.0	30	30	100 mM
3. 0.1 M Sodium glyoxylate	-	30	10 mM
4. 1 M L-alanine	45	45	150 mM
5. 10 mM Pyridoxal phosphate	4.5	4.5	150 µM
6. Ion-exchanged water	300 – X – 79.5	300 – X – 109.5	
ปริมาตรรวมทั้งหมด	300.0	300.0	

หมายเหตุ * X คือ ปริมาตรที่ได้จากการคำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนรวม ซึ่งได้จากการวัดในข้อ 1.9 เพื่อต้องการปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด 100 ไมโครกรัม

2.3 การตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์

โดยวิธี immunofluorescence (Masyuk *et al.*, 2003) เป็นการใช้แอนติบอดี(secondary antibody) 2 ชนิดที่ติดสารเรืองแสงคนละสีกัน ไปจับกับแอนติบอดี (primary antibody) ต่างชนิดกัน โดยชนิดแรกจับกับ V5 ซึ่งเชื่อมติดกับเอนไซม์ AGT ที่ได้จากการโคลน ส่วนอีกชนิดจับกับเอนไซม์ catalase ซึ่งพบเฉพาะในเพอร์อกซิโซมเท่านั้น แล้วตรวจสอบตำแหน่งของเอนไซม์ AGT และเพอร์อกซิโซมภายในเซลล์จากการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Macro Confocal การตรวจสอบนี้ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ยังคงถูกส่งไปยังเพอร์อกซิโซมตามปกติหรือไม่ มากน้อยเพียงใด โดยมีขั้นตอนในการทำ immunofluorescence ดังนี้ เตรียม methanol เย็นจัดโดยนำไปแช่ในตู้แช่แข็งก่อนเริ่มทำประมาณ 20 นาที นำเซลล์ COS7 ที่ผ่านการ transfect และเลี้ยงบนกระจกปิดสไลด์ขนาด 24 x 24 mm ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมทั้ง 3 ชนิด คือ เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน *AGXT* ปกติ, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg และเซลล์ COS7 ที่มี expression vector เปล่า ล้างเซลล์ด้วย PBS หลุมละ 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้น fix เซลล์ด้วย methanol ที่เย็นจัด หลุมละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ไว้ในตู้เย็นนาน 5 นาที ดูดทิ้งแล้วเติมด้วย PBS ที่ผสมกับ 0.1% *Triton-X* ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร ขั้นนี้ถือว่าเป็นการ Permeabilization โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที ดูดทิ้งแล้ว block ด้วย PBS ที่ผสมกับ 5% BSA และ 0.1% Triton-X เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นบ่มด้วย primary antibody สำหรับจับกับเอนไซม์ AGT คือ mouse anti-V5 monoclonal (Invitrogen) ในอัตราส่วน 1:500 โดยผสมกับ 1% BSA ใน PBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ครั้งละ 4 นาที เสร็จแล้วบ่มด้วย secondary antibody คือ Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG2a (Invitrogen) เป็นสารเรืองแสงสีแดงซึ่งจะไปจับกับ primary antibody ตัวก่อนหน้าในอัตราส่วน 1:1,000 โดยผสมกับ 1% BSA ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นเริ่มบ่มด้วย primary antibody อีกชนิดหนึ่งคือ Rabbit anti-catalase polyclonal (Abcam) ในอัตราส่วน 1:250 โดยผสมกับ 1% BSA ใน PBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ครั้งละ 4 นาที เสร็จแล้วบ่มด้วย secondary antibody คือ Alexa Flour 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) เป็นสารเรืองแสงสีเขียวซึ่งจะไปจับกับ primary antibody ที่จับกับเอนไซม์ catalase ในเพอร์อกซิโซมในอัตราส่วน 1:250 โดยผสมกับ 1% BSA ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที สุดท้ายนำกระจกปิดสไลด์ไปปิดลงบนสไลด์ด้วย vectashield with DAPI ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/สไลด์ วางสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืนในที่มืด

สนิท โดยจากนี้ไปต้องให้สไลด์สัมผัสกับแสงน้อยที่สุด นำสไลด์ทั้งหมดไปส่องเพื่อตรวจสอบผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Macro Confocal รุ่น EZ-C1