

บทที่ 4 ผลการศึกษา

1. การสังเคราะห์ยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

1.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (CDS) จากฐานข้อมูลใน NCBI พบว่า ยีนมีขนาด 1,231 base pairs โดยส่วนที่มีการแสดงออกเริ่มตั้งแต่ นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 123 ถึงนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,301 ดังแสดงในภาพที่ 13 ซึ่งแสดงเป็นช่วงของตัวอักษรหนา ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์เพื่อผลิตยีน AGXT ที่ปกติ และเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg สุดท้ายยีนทั้ง 2 แบบจะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออก โดยผลิตเอนไซม์ AGT ตามปกติและมีการผลิตเอนไซม์ AGT ที่ผิดปกติไปจากเดิมตามลำดับ โดยออกแบบสาย forward ให้สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ในช่วงลำดับที่ 90 – 111 (ช่วงที่มีแถบสีในแถว 61) ซึ่งมีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในลำดับที่ 95 จาก T เป็น A (ตำแหน่งลูกศรชี้) เพื่อให้เป็นบริเวณจดจำสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ในการติดต่อเข้ากับ expression vector ในขั้นตอนต่อไปและออกแบบสาย reverse ให้สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ในช่วงลำดับที่ 1,293 – 1,320 (ช่วงที่มีแถบสีในแถว 1,261) ซึ่งมีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในลำดับที่ 1,314 จาก C เป็น A, ลำดับที่ 1,316 จาก C เป็น T และลำดับที่ 1,317 จาก A เป็น T (ตำแหน่งลูกศรชี้) เพื่อให้เป็นบริเวณจดจำสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะเห็นว่าการออกแบบในสาย Reverse มีการซ้อนทับกับนิวคลีโอไทด์ในส่วนท้ายของยีน เพื่อเปลี่ยนรหัสหยุดโดยเปลี่ยนจาก T เป็น A ในนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,299 (ตำแหน่งลูกศรชี้ในแถว 1,261) ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ AGT ยาวขึ้น สามารถสังเคราะห์ต่อไปยังส่วนโปรตีน V5 ใน expression vector ซึ่งใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกหรือติดตามเอนไซม์ AGT ได้ นอกจากนี้ยังสามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ mutagenesis โดยออกแบบทั้งสาย forward และสาย reverse ให้สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ในช่วงลำดับที่ 137 – 171 (ช่วงที่มีแถบสีในแถว 121) เพื่อผลิตยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg โดยเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น G ในลำดับที่ 154 (ตำแหน่งลูกศรชี้ในแถว 121) นับเป็นการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 ภายในยีนโดยเริ่มนับลำดับที่ 123 เป็นนิวคลีโอไทด์ตัวแรก เพื่อทำให้ได้เอนไซม์ที่ผิดปกติ โดยมีกรดอะมิโนในลำดับที่ 11 เปลี่ยนไปจาก Proline เป็น Arginine

LOCUS NM_000030 1500 bp mRNA linear PRI 16-MAR-2008

DEFINITION Homo sapiens alanine-glyoxylate aminotransferase (AGXT), mRNA.

ACCESSION NM_000030 NM_016236 CDS 123..1301

```

1  ccggaagccc  atccaccaat  cctcacctct  cacctctgtg  tccgcctgc  tgggaaatat
61  tccaggcttt  ggccaaggcc  agtgcagccc  caggftcccg  agcggcaggt  tgggtgcgga
121  ccatggcctc  tcacaagctg  ctggtagacc  cccccaaggc  cctgtctaac  cccctctcca
181  tccccaacca  gctcctgtgt  gggcctggtc  ctccaacct  gcctcctegc  atcatggcac
241  cccgggggct  gcagatgatc  ggggccatga  gcaaggatat  gtaccagatc  atggacgaga
301  tcaaggaagg  catccagtac  gtgtccaga  ccaggaacce  actcacactg  gtcatctctg
361  gctcgggaca  ctgtgcctgt  gaggcgccc  tggtcaatgt  gctggagcct  ggggactcct
421  tectggttgg  ggccaatggc  attggggggc  agcgagccgt  ggacatcggg  gagegcatag
481  gagcccagat  gcaccgatg  accaaggacc  ctggaggcca  ctacacactg  caggagggtg
541  aggagggect  ggcccagcac  aagccagtgc  tgctgttctt  aaccacggg  gagtctcca
601  ccggcgtgct  gcagcccctt  gatggcttcg  gggaaactct  ccacaggtac  aagtgcctgc
661  tctggttgg  ttcggtggca  tcctggggcg  ggacccccct  ttacatggac  cggaaggcca
721  tegacatcct  gtactcgggc  tcccagaagg  ccctgaacgc  cctccaggg  acctcctca
781  tetectteag  tgacaaggcc  aaaaagaaga  tgtactcccg  caagacgaag  ccttctcct
841  tetacctgga  catcaagtgg  ctggccaact  tctggggctg  tgacgaccag  cccaggatgt
901  accatcacac  aatcccctgc  atcagcctgt  acagcctgag  agagagcctg  gcctcattg
961  cggaacaggg  cctggagaac  agtggcgccc  agcaccgcga  ggccgcggcg  tatctcatg
1021  ggcgcctgca  ggcaactggg  ctgcagctct  tcgtgaagga  cccggcgtc  cggtctcca
1081  cagtaccac  tgtgctgta  cccgctggct  atgactggag  agacatcgtc  agctactca
1141  tagaccactt  cgacattgag  atcatgggtg  gccttgggce  ctccacgggg  aaggtgtctg
1201  ggatcggcct  gctgggctgc  aatgccacc  gcgagaatgt  ggaccgcgtg  accggagccc
1261  tgagggcggc  cctgcagcac  tgcccaaga  agaagctgtg  acctgccac  tggcacacag
1321  ctggcactgg  cacacacctg  tccatgccc  accctgaggg  atcaggagca  aacagaccct
1381  gcaaggtcct  ccaggcctgg  ggacaggaaa  gccactgacc  cagcccggga  ggcagaacca
1441  ggcagcctcc  ctggccccag  ggcagccctt  tcctccagt  ggcacctcct  ggaacagctc

```

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (NCBI, 2008)

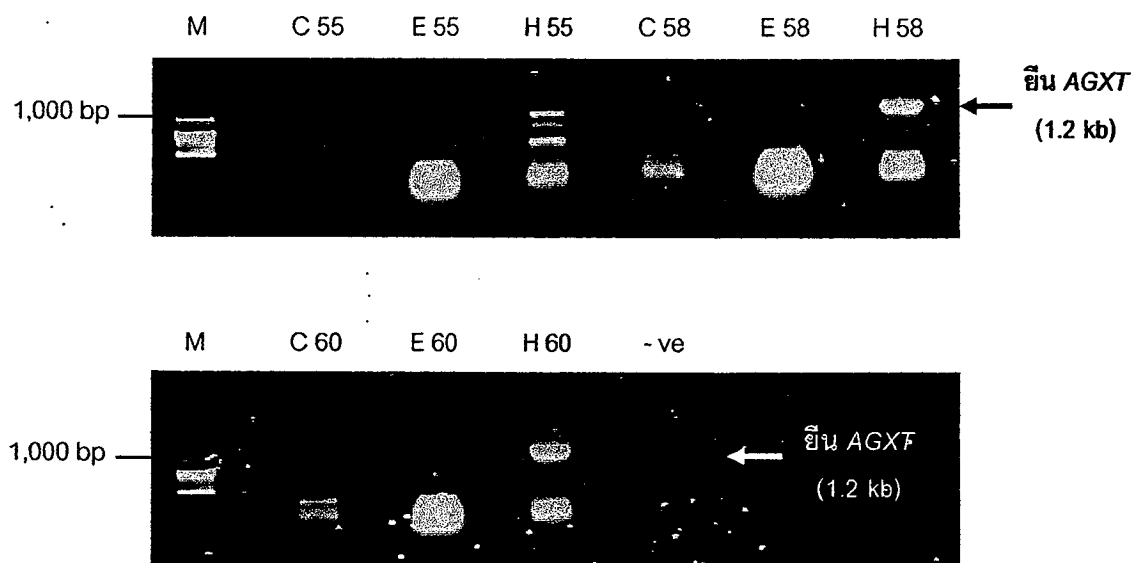
โดย ลูกศร แสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของนิวคลีโอไทด์

ตัวอักษรหนา แสดงตำแหน่งของบริเวณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน

แถบสี แสดงตำแหน่งของบริเวณที่มีการออกแบบไพรเมอร์

1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region)

งานวิจัยนี้ใช้อาร์เอ็นเอเป็นแหล่งในการผลิตยีน AGXT เนื่องจากต้องการยีนเฉพาะในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) เท่านั้น จึงทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2 และเซลล์ COS 7 แล้วนำมาทำ RT-PCR เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอจากเซลล์แต่ละชนิดเป็นดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA) จากนั้นจึงใช้ cDNA ที่ได้เป็นต้นแบบในการทำ Gradient PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน AGXT ในส่วนที่ผลิตโปรตีน ด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ แล้วนำ PCR products ที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลปรากฏว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน AGXT ได้จาก cDNA ของเซลล์ Hep-G2 เท่านั้น โดยเกิดแถบที่ชัดเจนตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) ที่อุณหภูมิ Annealing 2 ระดับ คือ 58 และ 60 องศาเซลเซียส แสดงในภาพที่ 14 เนื่องจากยีน AGXT ทำงานเฉพาะในเซลล์ตับ ยีนจึงมีการแสดงออกโดยถอดรหัสเป็น mRNA ได้ ส่วนยีนในเซลล์ EBV และเซลล์ COS 7 ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ไต ตามลำดับ ทำให้ไม่มีการแสดงออก จึงไม่สามารถสกัดอาร์เอ็นเอออกมาได้ เมื่อทำ PCR จึงไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT เกิดขึ้น

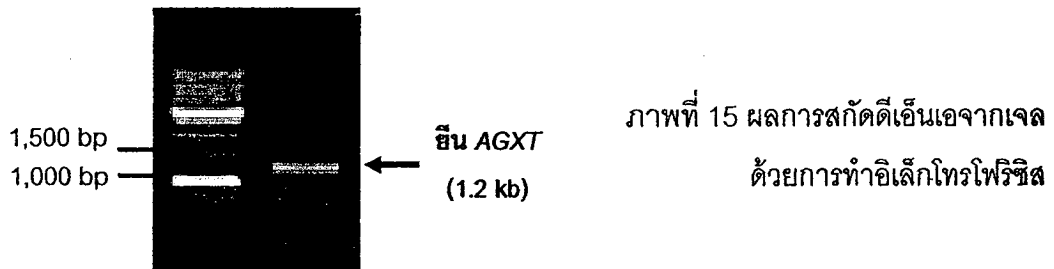


ภาพที่ 14 ผลการสังเคราะห์ยีน AGXT จาก cDNA ของเซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2

และเซลล์ COS 7 ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส จาก PCR products ของ Gradient PCR โดย M คือ Marker, C คือ เซลล์ COS7, E คือ เซลล์ EBV, H คือ เซลล์ Hep-G2 และ -ve คือ negative control ส่วนตัวเลขที่ระบุคู่ตัวอักษร คือ ระดับอุณหภูมิ Annealing

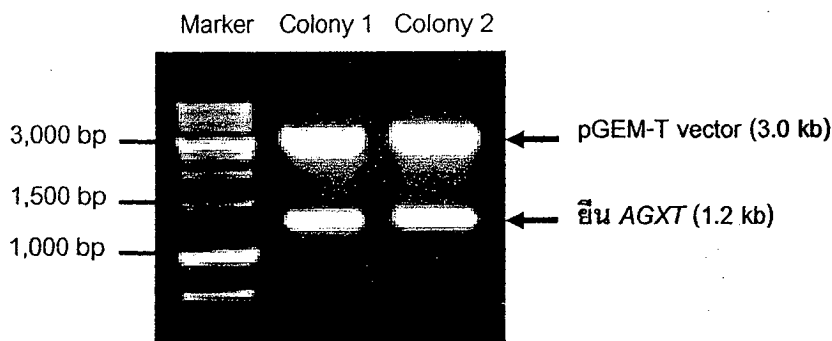
1.3 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเจล

ตัดเจลของภาพที่ 14 เฉพาะบริเวณแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1.2 kb ในช่อง H 58 และ H 60 ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีน AGXT โดยประมาณมารวมกัน แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอจากเจล จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลปรากฏว่า ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีน AGXT แสดงในภาพที่ 15 จึงสรุปว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเจลคือ ยีน AGXT นั้นเอง



1.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector)

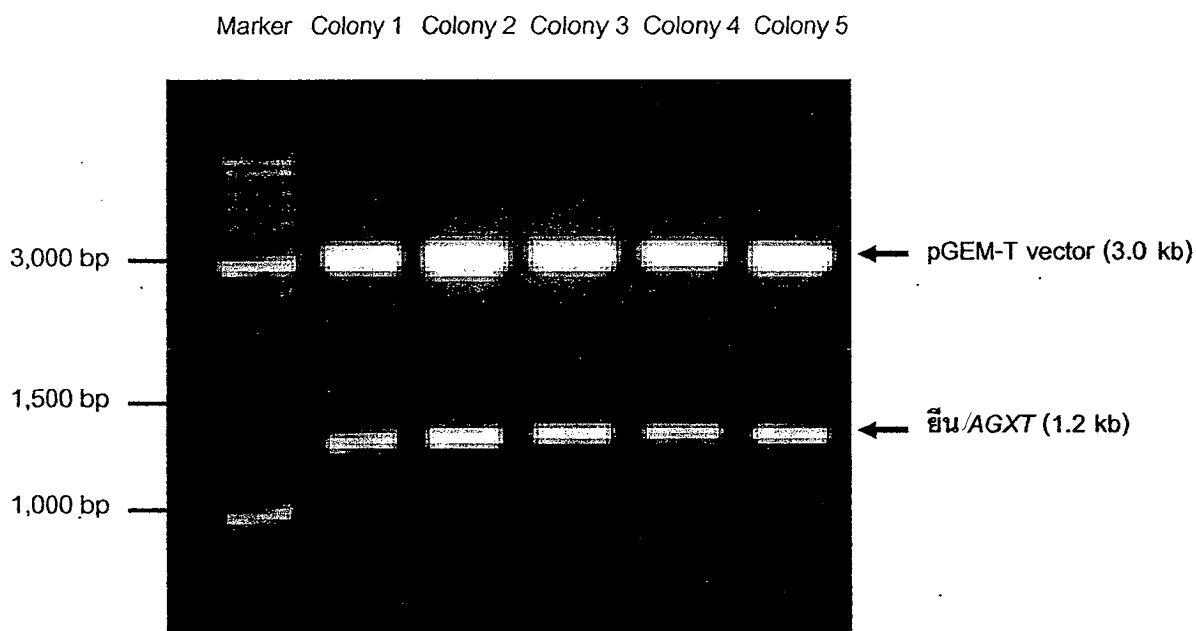
หลังจากที่นำยีน AGXT ปกติที่ได้จากการสกัดเจลมาเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector จนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม แล้วนำไปถ่ายเข้าสู่ competent cells เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด โดยอาศัยการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมี 2 โคลินี่ที่สามารถเจริญบน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ได้ จากนั้นจึงสกัดพลาสมิดออกมา แล้วทำการตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam*HI กับ *Eco*RI แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบขนาดโดยประมาณของยีน AGXT ที่แทรกเข้าไปและขนาดของ pGEM-T vector ผลปรากฏว่า ทั้งสองโคลินี่มีพลาสมิดลูกผสมอยู่ในเซลล์จริง แสดงในภาพที่ 16 โดยแต่ละโคลินี่มี 2 แถบ คือ แถบบนซึ่งมีขนาด 3.0 kb เป็นแถบที่ตรงกับขนาดของ pGEM-T vector ส่วนแถบล่างเป็นแถบที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) แต่การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่สามารถตรวจสอบได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ถูกต้องหรือไม่ จึงต้องส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macro Gen โดยใช้ universal primer ในการตรวจสอบ คือ pUC/M13 Forward และ pUC/M13 Reverse ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T vector ของโคลินี่ที่ 2 ถูกต้องทั้งหมด แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 28 และ 29) จึงใช้พลาสมิดลูกผสมจากโคลินี่ที่ 2 เป็นแหล่งสำหรับทำ mutagenesis ต่อไป



ภาพที่ 16 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีน AGXT ปกติ
โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.5 ผลการสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

หลังจากนำพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector) จากโคโลนีที่ 2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ถูกต้อง มาทำ mutagenesis เพื่อสังเคราะห์ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ แล้วนำพลาสมิดลูกผสม (ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ pGEM-T vector) ที่ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ผลปรากฏว่ามี 5 โคโลนีที่สามารถเจริญบน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ได้ จากนั้นจึงนำโคโลนีทั้งหมดมาสกัดพลาสมิด แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ต่อด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบเบื้องต้น พบว่า ทั้ง 5 โคโลนีมี พลาสมิดลูกผสมอยู่ภายในเซลล์จริง แสดงในภาพที่ 17 โดยแต่ละโคโลนีมี 2 แถบ คือ แถบบนซึ่งมีขนาด 3.0 kb เป็นแถบที่ตรงกับขนาดของ pGEM-T vector ส่วนแถบล่างเป็นแถบที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) หลังจากนั้นส่งทั้ง 5 โคโลนีไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macro Gen โดยใช้ universal primer คือ pUC/M13 Forward และ pUC/M13 Reverse ในการตรวจสอบ ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 3 ถูกต้องทั้งหมด ยกเว้นลำดับที่ 32 เปลี่ยนจาก C เป็น G ซึ่งได้ผลตามที่ต้องการเพื่อให้การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนในลำดับที่ 11 จาก Proline เป็น Arginie แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 30 และ 31) จึงใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีนกลายพันธุ์จากโคโลนีที่ 3 เป็นแหล่งสำหรับนำไปตัดต่อเข้ากับ expression vector ต่อไป

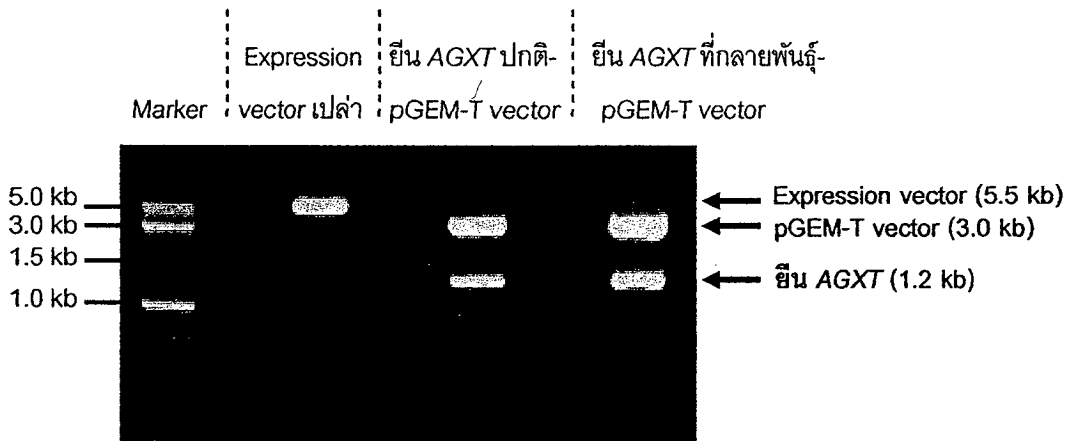


ภาพที่ 17 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีน AGXT กลายพันธุ์
โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

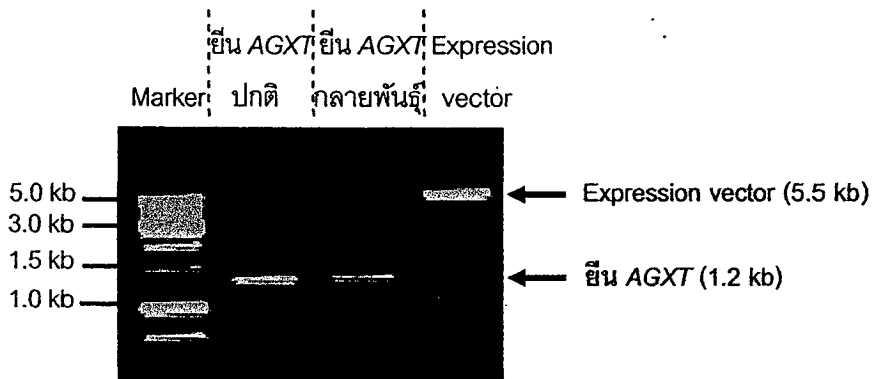
1.6 ผลการสร้างพลาสมิด (expression vector) สำหรับการทำให้ transfection

เป็นการนำยีน AGXT ที่ปกติ และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ตัดต่อเข้ากับ expression vector (pcDNA3.1/V5-HisB) โดยนำ expression vector และพลาสมิดลูกผสมทั้ง 2 ชนิด คือ ยีน AGXT ที่ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เชื่อมต่อกับ pGEM-T vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตัดให้มีปลายที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ระหว่างยีนที่ต้องการแทรกเข้าไปกับ expression vector แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงในภาพที่ 18 จากนั้นตัดเจลในแต่ละแถบ รวมทั้งหมด 3 แถบ คือ แถบ 1.2 kb 2 แถบ และ แถบ 5.5 kb ไปสกัดเจล แล้วตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงในภาพที่ 19 นำยีน AGXT แต่ละชนิดมาเชื่อมต่อกับ expression vector หลังจากนั้นจึงถ่ายพลาสมิดลูกผสมแต่ละชนิดที่ได้เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย แล้วเลือกโคโลนีจาก LB agar มาเพิ่มปริมาณใน LB broth ชนิดละ 2 โคโลนี ทำการสกัดพลาสมิด แล้วตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส ผลปรากฏว่า ทุกโคโลนีมีพลาสมิดลูกผสมอยู่ในเซลล์จริง แสดงในภาพที่ 20 โดยแต่ละโคโลนีมี 2 แถบ คือ แถบบนซึ่งมีขนาด 5.5 kb เป็นแถบที่ตรงกับขนาดของ expression vector ส่วนแถบล่างเป็นแถบที่ตรงกับขนาดของยีน AGXT (1.2 kb) หลังจากนั้นส่ง ทั้ง 4 โคโลนีไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macro Gen โดยใช้ universal primer คือ BGH Reverse และ T7 Promoter ในการตรวจสอบ ผลปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน

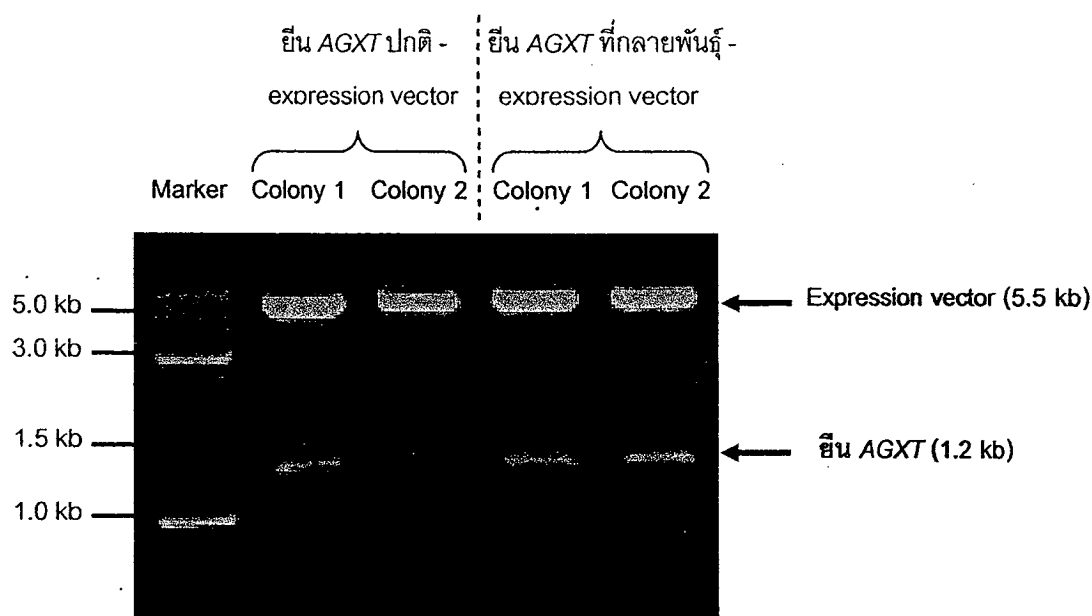
AGXT ปกติที่เชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 2 ถูกต้องทั้งหมด แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 32 และ 33) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 1 ถูกต้องตามที่ต้องการ แสดงในภาคผนวก ค (ภาพที่ 34 และ 35) หลังจากนั้นจึงนำพลาสมิดที่ได้ทั้ง 2 ชนิด transfect เข้าสู่เซลล์ COS7 ต่อไปเพื่อให้มีการผลิต เอนไซม์ AGT



ภาพที่ 18 ผลการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอจากเจลเฉพาะบริเวณ 1.2 kb และ 5.5 kb



ภาพที่ 19 ผลการตรวจสอบการสกัดดีเอ็นเอจากเจล ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพที่ 20 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ทั้ง 2 ชนิด
ชนิดละ 2 โคโลนี โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.7 ผลการทำ Transfection

หลังจาก transfect พลาสมิดทั้ง 3 ชนิด คือ expression vector เปล่า, ยีน AGXT ปกติซึ่งเชื่อมต่อกับ expression vector และยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ซึ่งเชื่อมต่อกับ expression vector เข้าสู่เซลล์ COS7 แล้ว ยีนเหล่านี้จะมีการแสดงออกแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องวัดความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์แต่ละชนิดก่อนที่จะนำไปตรวจสอบการทำงานต่าง ๆ เพื่อให้ปริมาณโปรตีนรวมที่จะนำไปตรวจสอบเท่ากัน จะได้มั่นใจและยืนยันผลได้ว่า ความผิดปกติของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์นั้นเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน ซึ่งมีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์มีความบกพร่องในการทำงานจริง หากค่าที่ได้จากการตรวจสอบมีความแตกต่างกัน โดยใช้การวัดโปรตีนรวมด้วยวิธี BCA Protein ซึ่งเทียบจากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการวัดที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่งเป็นตัวอย่างผลของการวัดปริมาณโปรตีนรวมสำหรับนำไปทำ western blot โดยแต่ละหลุมต้องการโปรตีนรวม 2.5 ไมโครกรัมในปริมาณที่เท่ากัน จะเห็นว่าการเตรียมโปรตีนไปวิเคราะห์นั้นก็ใช้ปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเพื่อสุดท้ายโปรตีนรวมจากแต่ละเซลล์จะได้มีปริมาณเริ่มต้นเท่ากัน

Micro BCA Assay (AGXT ; PH1) 18/11/2552

Standard Curve

OD	0.022	0.039	0.075	0.104	0.136	0.195	0.244
Conc (mg/ml)	0.125	0.250	0.500	0.750	1.000	1.500	2.000

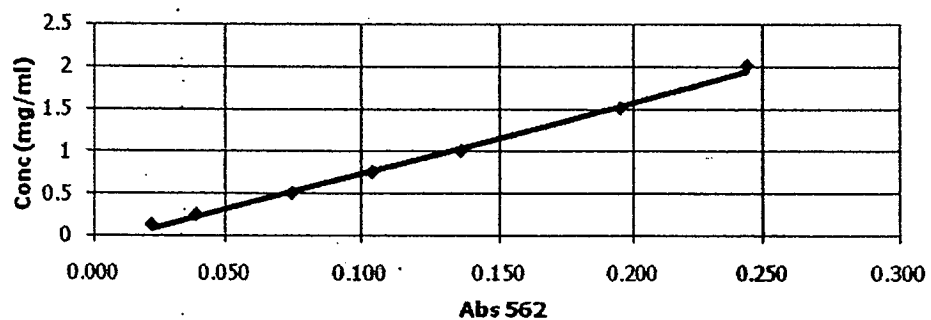
Total Volume 50 ul (3.5x loading buffer 14.3 ul + Protein + RIPA)

ID	OD	Concentration			2.5 ug	
		ug/ul	dilution factor	Total Protein (ug/ul)	Protein	RIPA
Wild type	0.088	0.637	5	3.19	0.8	34.9
Pro11Arg	0.09	0.654	5	3.27	0.8	34.9
Empty vector	0.098	0.721	5	3.60	0.7	35.0

Standard Curve

$$y = 8.365x - 0.098$$

$$R^2 = 0.996$$

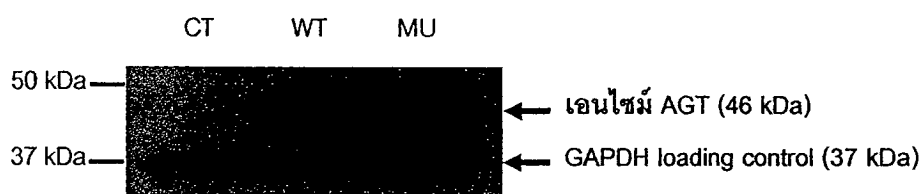


ภาพที่ 21 ตัวอย่างผลของการวัดปริมาณโปรตีนรวม สำหรับนำไปทำ Western blot
ซึ่งแต่ละหลุมต้องการปริมาณโปรตีนรวมเท่ากันคือ 2.5 µg

2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์

เป็นขั้นตอนเพื่อตรวจสอบความสามารถของยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ในการผลิตเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี western blot เทียบกับเซลล์ COS7 ที่ได้รับ expression vector เปล่าเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งผลจากการทำ western blot แสดงให้เห็นว่า ยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ยังคงสามารถผลิตเอนไซม์ AGT ซึ่งมีขนาด 46 kDa ได้ตามปกติ เมื่อเทียบกับยีน AGXT ปกติ ดังภาพที่ 22 ส่วนเซลล์ COS7 ที่ได้รับ expression vector เปล่าไม่มีการผลิตเอนไซม์ AGT แสดงให้เห็นว่า โดยปกติยีน AGXT ไม่มีการแสดงออกในเซลล์ COS7 ซึ่งเป็นเซลล์ไต หรือถ้ามีการแสดงออกคงมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ สอดคล้องกับผลการสกัดอาร์เอ็นเอ (mRNA) ซึ่งต่อมาจะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอคู่ผสม (cDNA) แล้วใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน AGXT ปรากฏว่า การทำ PCR ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ เนื่องจากไม่มีต้นแบบด้วยเหตุนี้เองผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ COS7 เป็นเซลล์สำหรับถ่ายพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าไป หากยีน AGXT มีการแสดงออกโดยผลิตเอนไซม์ AGT แสดงว่าเป็นผลจากการทำงานของยีน AGXT ที่เชื่อมกับ expression vector เท่านั้น ไม่เกี่ยวข้องกับยีน AGXT ที่มีอยู่ก่อนแล้วภายในเซลล์ COS7



ภาพที่ 22 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี western blot

โดย CT คือ โปรตีนที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่มี vector เปล่า

WT คือ โปรตีนที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่มียีน AGXT ปกติเชื่อมต่อกับ expression vector

และ MU คือ โปรตีนที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่มียีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

เชื่อมต่อกับ expression vector

2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

เป็นขั้นตอนเพื่อตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี Semiautomated spectrophotometric โดยนำโปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ 5 ชนิด คือ เซลล์ HEP-G2, เซลล์ COS7 เปล่า, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ปกติ, เซลล์ COS7 ที่มี expression vector เชื่อมต่อกับยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg และเซลล์ COS7 ที่มี expression vector เปล่า มาวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ทั้งก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และหลังใส่เอนไซม์ LDH (A2) ซึ่งทำ 3 ซ้ำแล้วนำค่าเฉลี่ย A1 หักล้างด้วยค่าเฉลี่ย A2 (A1 - A2) เหตุที่ค่า A1 สูงกว่าค่า A2 เนื่องจาก NADH ซึ่งเป็น cofactor ของเอนไซม์ LDH สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เมื่อเอนไซม์ LDH ทำงาน NADH จะถูกเปลี่ยนเป็น NAD^+ ซึ่งไม่สามารถดูดกลืนแสงได้ จึงทำให้ค่า A2 ลดลง สำหรับโปรตีนที่ได้จากแต่ละเซลล์ต้องเตรียม blank แยกจากกันชนิดละหลอดด้วย ซึ่งหลอด blank ต่างจากหลอดตัวอย่างตรงที่ไม่เติม Sodium glyoxylate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ AGT ลงไปตั้งแต่แรก แต่เติมหลังจากที่หยุดปฏิกิริยาด้วย TCA แล้ว ทำให้เอนไซม์ AGT ในหลอด blank ไม่มีการทำงาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่างหักล้างด้วยค่าการดูดกลืนแสงของหลอด blank จะได้ค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ AGT อย่างแท้จริง (ΔA) การวัดนี้ทำทั้งหมด 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย ดังข้อมูลในภาคผนวก ข จากนั้นนำค่าทั้งหมดที่ได้จากการวัดไปคำนวณปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น เพื่อวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT ตามสูตรในภาพที่ 23 ทำให้ได้ข้อมูลเป็นไปตามตารางที่ 13

$$\text{ปริมาณโปรตีน } (\mu\text{mol/h/mg}) = \frac{V \times D}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

โดยที่ V = ปริมาตรรวมทั้งหมดในหลอด = 0.78 ml

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm
 $= 6.3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

d = ความกว้างของคิวเวตที่แสงผ่าน = 1 cm

v = ปริมาตรของตัวอย่างที่นำวัดค่าการดูดกลืนแสง = 0.06 ml

D = จำนวนเท่าของการเจือจาง (dilution factor) = 3

ภาพที่ 23 สูตรการคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น สำหรับวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

ตารางที่ 13 ข้อมูลของผลการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT

ชนิดเซลล์	ครั้งที่	ΔA_s	ΔA_b	ΔA	ปริมาณ โปรเวท ($\mu\text{mol/h/mg}$)	ปริมาณ โปรเวทเฉลี่ย ($\mu\text{mol/h/mg}$)	S.D.
COS7	1	0.009	0.002	0.007	0.13	0.087	0.038
	2	0.004	0.001	0.003	0.06		
	3	0.008	0.004	0.004	0.07		
Hep-G2	1	0.029	0.002	0.019	0.35	0.317	0.029
	2	0.019	0.003	0.016	0.30		
	3	0.017	0.001	0.016	0.30		
Empty vector	1	0.008	0.004	0.004	0.07	0.073	0.015
	2	0.005	0.002	0.003	0.06		
	3	0.007	0.002	0.005	0.09		
Wild type	1	0.194	0.005	0.189	3.51	3.213	0.259
	2	0.166	0.003	0.163	3.03		
	3	0.170	0.003	0.167	3.10		
Pro11Arg	1	0.064	0.001	0.063	1.17	1.007	0.249
	2	0.043	0.004	0.039	0.72		
	3	0.062	0.001	0.061	1.13		

หมายเหตุ COS7 คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 เปล่า

Hep-G2 คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ Hep-G2 เปล่า

Empty vector คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่ได้รับ expression vector เปล่า

Wild type คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่ได้รับยีน AGXT ปกติซึ่งเชื่อมต่อกับ
expression vector

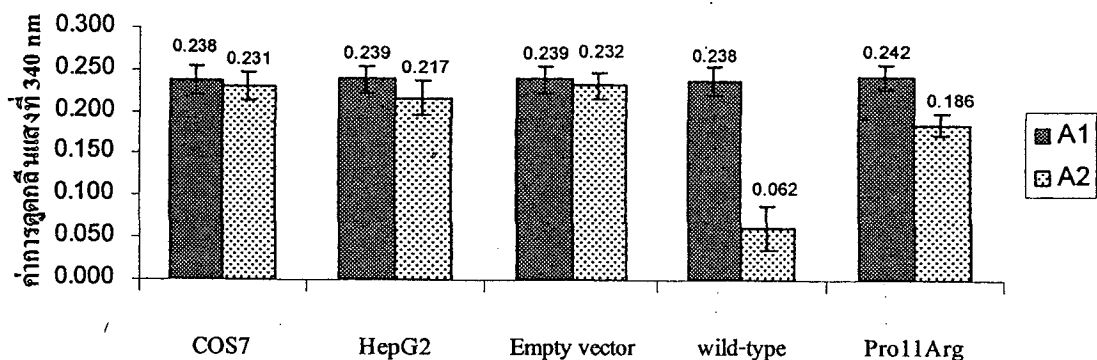
Pro11Arg คือ โปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์ COS7 ที่ได้รับยีน AGXT ที่กลายพันธุ์ซึ่ง
เชื่อมต่อกับ expression vector

$\Delta A_s = A_1 - A_2$ ของหลอดตัวอย่าง (sample)

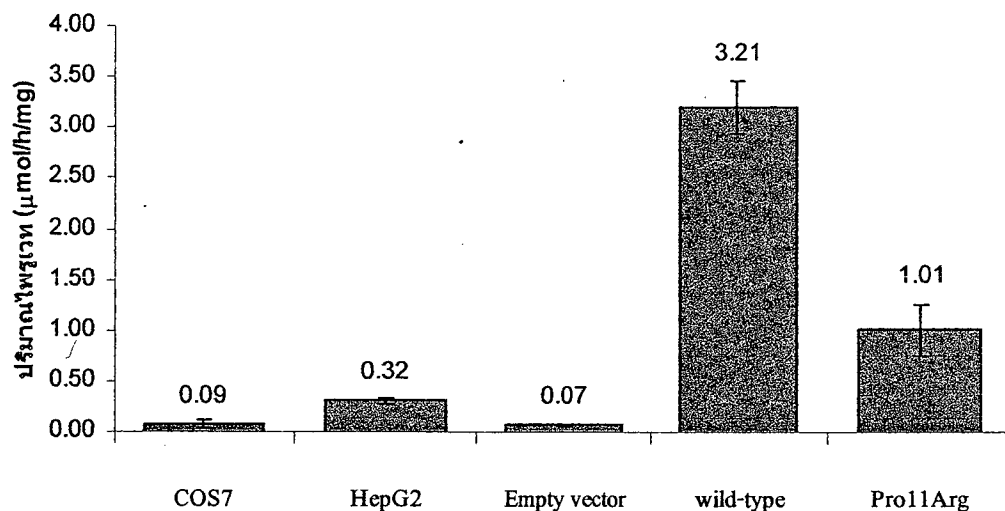
$\Delta A_b = A_1 - A_2$ ของหลอด blank

$\Delta A = \Delta A_s - \Delta A_b$

ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงเป็นกราฟดังภาพที่ 24 จะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่ เอนไซม์ LDH (A1) ของทุกชนิดตัวอย่างมีความใกล้เคียงกัน แต่หลังจากใส่เอนไซม์ LDH พบว่า ค่าการดูดกลืนแสง (A2) ลดลงแตกต่างกัน โดยเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ ปกติมีความแตกต่างระหว่างค่า A1 กับค่า A2 มากที่สุด รองลงมาคือ เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg ตามด้วยเซลล์ Hep-G2 เปล่า แม้ว่าจะเป็นเซลล์ตับ แต่ระดับ การแสดงออกของยีน (การผลิตเอนไซม์ AGT) ยังน้อยกว่าเซลล์ 2 ชนิดแรกซึ่งเป็น over expression ส่วนเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยพลาสมิดเปล่า (empty vector) และเซลล์ COS7 เปล่า มีความแตกต่างระหว่างค่า A1 กับค่า A2 น้อยมาก ซึ่งแทบจะไม่แตกต่างกัน ที่เป็น เช่นนี้ เพราะโดยปกติเอนไซม์ AGT จะแสดงออกเฉพาะในเซลล์ตับ แต่เซลล์ COS7 เป็นเซลล์ไต ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ western blot ที่ไม่พบเอนไซม์ AGT ในเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วย พลาสมิดเปล่า (empty vector) สำหรับภาพที่ 25 แสดงให้เห็นถึงปริมาณโปรตีน ที่ตรวจพบในแต่ละชนิดตัวอย่าง โดยถ้ามีปริมาณโปรตีนมาก แสดงว่าเอนไซม์ AGT มีความสามารถในการทำงานได้ดีมากด้วย ซึ่งพบว่า เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบปกติ มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย $3.21 \pm 0.26 \mu\text{mol/h/mg}$ ในขณะที่เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg (Pro11Arg AGXT) มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย $1.01 \pm 0.25 \mu\text{mol/h/mg}$ ซึ่งน้อยกว่าประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีน AGXT ปกติ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีน AGXT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีความสามารถในการทำงานเพียง 31% ซึ่งลดลง 69% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีน AGXT ปกติ



ภาพที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และหลังใส่เอนไซม์ LDH (A2)



ภาพที่ 25 กราฟแสดงปริมาณโพรูเวทที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ เพื่อดูความสัมพันธ์ในภาพรวมของปริมาณโพรูเวทเฉลี่ยที่ได้จากเซลล์ทั้ง 5 ชนิด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS 17 ผลที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 14 สามารถสรุปได้ว่า ชนิดของตัวอย่างอย่างน้อย 1 ชนิดมีค่าเฉลี่ยปริมาณโพรูเวทแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 14 ค่าทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA

Oneway ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig. (P-value)
Between Groups	21.121	4	5.280	200.363	.000
Within Groups	.264	10	.026		
Total	21.384	14			

โดยที่สมมติฐาน คือ H_0 : ปริมาณเฉลี่ยของโพรูเวทในแต่ละชนิดตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างกัน

H_a : ปริมาณเฉลี่ยของโพรูเวทอย่างน้อย 1 ชนิดตัวอย่างมีค่าแตกต่างกัน

จากตาราง ANOVA ได้ค่า P-value = 0 → ยอมรับ H_a

เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ด้วยวิธี One-way ANOVA แล้วพบว่า มีปริมาณเฉลี่ยของไฟรูเวทอย่างน้อย 1 ชนิดตัวอย่างมีค่าแตกต่างกัน แต่ไม่สามารถระบุได้ว่า ปริมาณเฉลี่ยของไฟรูเวทจากเซลล์คู่ใดที่แตกต่างกันบ้าง จึงต้องทำการเปรียบเทียบโดยการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ด้วยวิธี Post Hoc Tests ซึ่งเป็น Multiple Comparisons ทำให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลทีละคู่ได้ โดยเลือกการวิเคราะห์แบบ Tukey HSD ด้วยโปรแกรม SPSS 17 ข้อมูลที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 15 ซึ่งสรุปผลได้ว่า สามารถแบ่งชนิดตัวอย่าง เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก (COS7 HepG2 และ Empty vector) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณไฟรูเวทไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างทั้งกับ wild type และ Pro11Arg AGXT กลุ่มที่สอง (wild type AGXT) และกลุ่มที่สาม (Pro11Arg AGXT) โดยที่ wild type และ Pro11Arg AGXT มีค่าเฉลี่ยของปริมาณไฟรูเวทแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0) นอกจากนี้ยังมีข้อมูล que แสดงถึงความแตกต่างระหว่างคู่ที่เปรียบเทียบกัน ดังตารางที่ 16 ซึ่งสามารถเปรียบเทียบชนิดตัวอย่างทีละคู่ได้จากค่า P-value (Sig) โดยถ้าคู่ใดมีค่า P-value ≤ 0.01 แสดงว่า คู่นั้นมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 15 สรุปผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD
Tukey HSD^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
Empty vector	3	.0733		
COS7	3	.0867		
HepG2	3	.3167		
Pro11Arg AGXT	3		1.0067	
wild type AGXT	3			3.2133
Sig.		.406	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD

โดยการเปรียบเทียบทีละคู่

Post Hoc Tests (Multiple Comparisons)

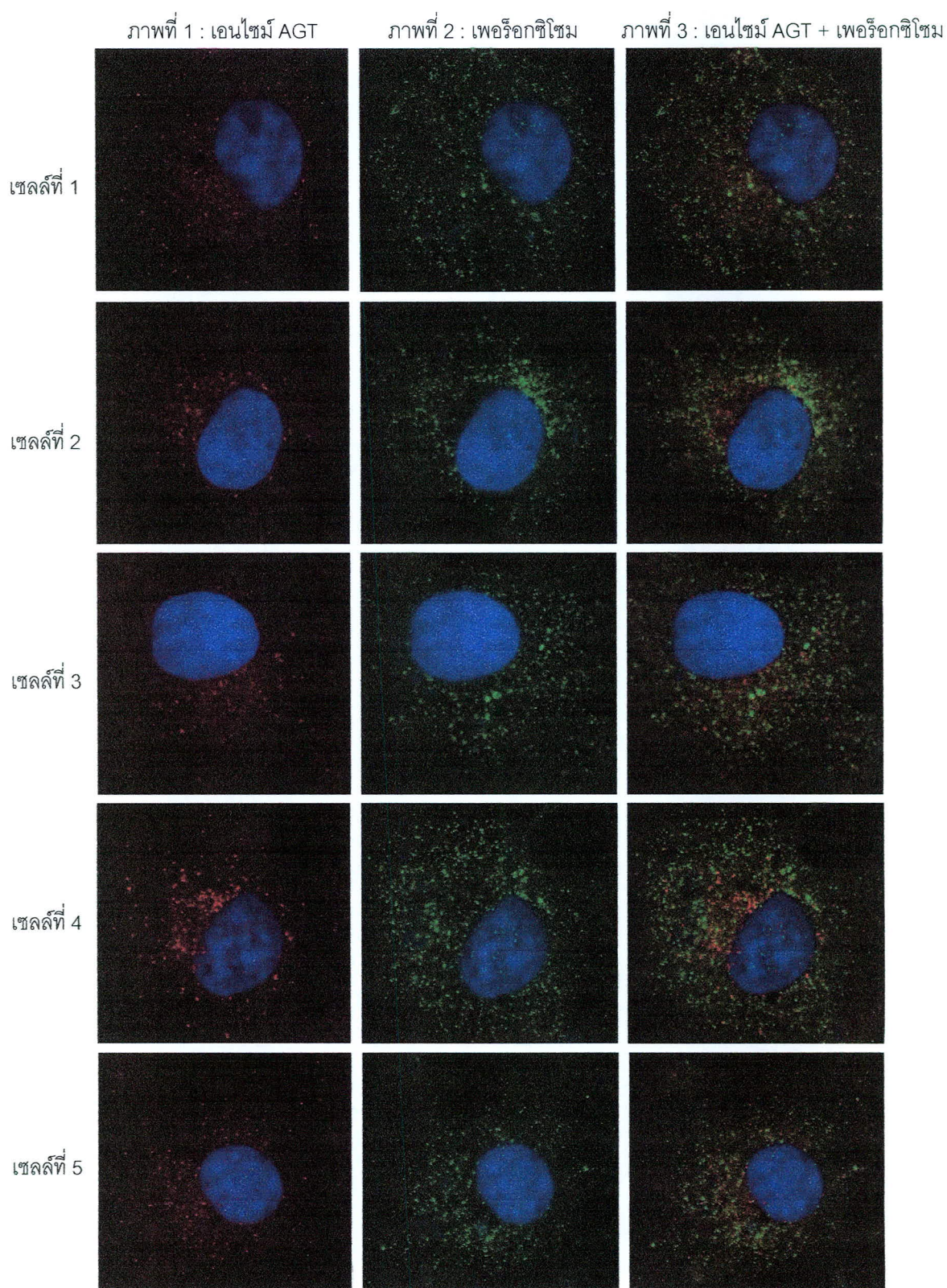
Data (Tukey HSD)

(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. (P-value)	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
COS7	HepG2	-.23000	.13255	.457	-.8051	.3451
	Empty vector	.01333	.13255	1.000	-.5618	.5884
	wild type AGXT	-3.12667*	.13255	.000	-3.7018	-2.5516
	P11R AGXT	-.92000*	.13255	.000	-1.4951	-.3449
HepG2	COS7	.23000	.13255	.457	-.3451	.8051
	Empty vector	.24333	.13255	.406	-.3318	.8184
	wild type AGXT	-2.89667*	.13255	.000	-3.4718	-2.3216
	P11R AGXT	-.69000*	.13255	.003	-1.2651	-.1149
Empty vector	COS7	-.01333	.13255	1.000	-.5884	.5618
	HepG2	-.24333	.13255	.406	-.8184	.3318
	wild type AGXT	-3.14000*	.13255	.000	-3.7151	-2.5649
	P11R AGXT	-.93333*	.13255	.000	-1.5084	-.3582
wild type AGXT	COS7	3.12667*	.13255	.000	2.5516	3.7018
	HepG2	2.89667*	.13255	.000	2.3216	3.4718
	Empty vector	3.14000*	.13255	.000	2.5649	3.7151
	P11R AGXT	2.20667*	.13255	.000	1.6316	2.7818
P11R AGXT	COS7	.92000*	.13255	.000	.3449	1.4951
	HepG2	.69000*	.13255	.003	.1149	1.2651
	Empty vector	.93333*	.13255	.000	.3582	1.5084
	wild type AGXT	-2.20667*	.13255	.000	-2.7818	-1.6316

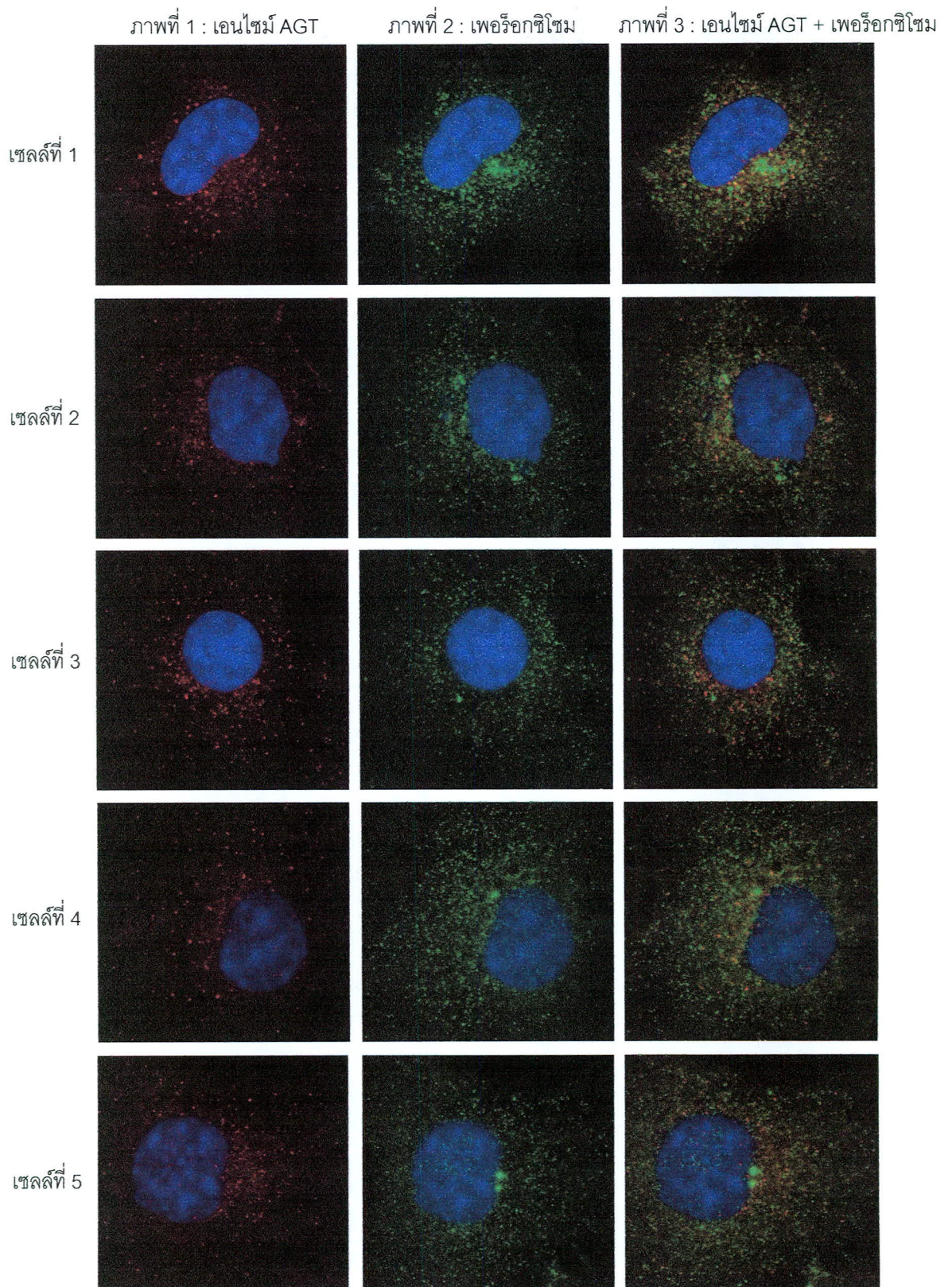
*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

2.3 การตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์

จากการตรวจสอบด้วยวิธี immunofluorescence พบว่า ในเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ ดังภาพที่ 26 มีรูปแบบการย้อมติดสีของเอนไซม์ AGT (สีแดง) โดยถูกทำให้เห็นด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน V5 ที่ผลิตจากยีนใน expression vector ซึ่งใช้เป็น marker ของเอนไซม์ AGT ไม่เหมือนกับรูปแบบของเพอร์ออกซิโซม (สีเขียว) โดยถูกทำให้เห็นด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน catalase ซึ่งใช้เป็น marker ของเพอร์ออกซิโซม เมื่อเทียบกับผลที่ได้จากเอนไซม์ AGT ปกติ ดังภาพที่ 27 พบว่ารูปแบบจะคล้ายคลึงกัน ทาบทับกันสนิท ทำให้เมื่อซ้อนทับสีกันในภาพที่ 3 ของแต่ละเซลล์ สีที่ได้จึงเปลี่ยนเป็นสีส้ม แต่ในบางบริเวณอาจเห็นเป็นสีแดงอยู่ เนื่องจากการติดสีของสีแดงเข้มมาก ส่วนสีเขียวติดแบบจาง ๆ ทำให้เมื่อซ้อนทับสีกันจึงปรากฏเป็นสีแดงแทนที่จะเป็นสีส้ม แต่ขณะที่ในเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์มีบางบริเวณที่สีแดงไม่ทับซ้อนกับสีเขียวประมาณ 20% แสดงว่า เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ประมาณ 20% นั้นถูกส่งไปยังออร์แกเนลล์อื่นที่ผิดตำแหน่งหรืออาจติดอยู่ที่เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม ไม่ได้ถูกส่งไปยังเพอร์ออกซิโซมตามปกติ โดยผลการวิเคราะห์นั้นได้มาจากการเลือกจุดสีแดงในภาพที่ 1 ของแต่ละเซลล์ทั้งเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์และปกติ แล้วเปรียบเทียบกับตำแหน่งเดียวกันในภาพที่ 2 ของเซลล์เดียวกัน ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 เพื่อตรวจสอบว่าสีแดงในภาพที่ 1 ซ้อนทับกับสีเขียวในภาพที่ 2 หรือไม่ ภาพละ 20 จุด พบว่าในกลุ่มเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีค่าเฉลี่ยประมาณ 4 จุดที่สีแดงไม่ซ้อนทับกับสีเขียว



ภาพที่ 26 การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่สังเคราะห์จากเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบ p.Pro11Arg ด้วยวิธี immunofluorescence (60X) โดย สีแดง คือ เอนไซม์ AGT, สีเขียว คือ เพอร์ออกซิโซม, และ สีนํ้าเงิน คือ นิวเคลียส



ภาพที่ 27 การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่สังเคราะห์จาก
 เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน AGXT แบบปกติ ด้วยวิธี immunofluorescence (60X)
 โดย สีแดง คือ เอนไซม์ AGT สีเขียว คือ เพอร์ออกซิโซม และ สีน้ำเงิน คือ นิวเคลียส