สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญ..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 2

ข้อจำกัดของการวิจัย..... 3

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4

วิธีดำเนินการวิจัย..... 4

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย..... 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 7

สาเหตุการเกิดโรค PH1..... 7

กลไกการทำงานของเอนไซม์ AGT..... 8

โครงสร้างของเอนไซม์ AGT..... 10

กลไกการส่งเอนไซม์ AGT สู่ตำแหน่งเป้าหมาย..... 11

ตัวอย่างการกลายพันธุ์ที่พบในยีน *AGXT*..... 12

อุบัติการณ์เกิดโรค PH1..... 14

อาการของผู้ป่วยโรค PH1..... 14

แนวทางการรักษาผู้ป่วยโรค PH1..... 16

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 18

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย..... 18

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 20

หน้า

วิธีดำเนินการวิจัย..... 23
1. การสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพื่อผลิตเอนไซม์ AGT..... 23
1.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 23
1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์..... 24
1.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ..... 26
1.4 การสังเคราะห์ยีน *AGXT* ปกติ..... 27
1.5 การสร้างและเพิ่มปริมาณพลาสมิด (pGEM-T vector) สำหรับ mutagenesis..... 30
1.6 การสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg..... 34
1.7 การสร้างและเพิ่มปริมาณพลาสมิด (expression vector) สำหรับการทำ transfection..... 36
1.8 การถ่าย expression vector เข้าสู่ COS7 cells (Transfection)..... 40
1.9 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด..... 42
2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT..... 43
2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT..... 43
2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT..... 44
2.3 การตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์..... 46
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 48
1. การสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg 48
1.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน..... 48
1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน..... 50
1.3 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเจล..... 51
1.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (ยีน *AGXT* ปกติเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector)..... 51
1.5 ผลการสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg..... 52
1.6 ผลการสร้างพลาสมิด (expression vector) สำหรับการทำ transfection. 53

หน้า

1.7 ผลการทำ Transfection 55
2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT 57
2.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ 57
2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT 58
2.3 การตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์ 64
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 67
สรุปผลการวิจัย 67
อภิปรายผลการวิจัย 68
ข้อเสนอแนะ 70
รายการอ้างอิง 72
ภาคผนวก 76
ภาคผนวก ก 77
ภาคผนวก ข 83
ภาคผนวก ค 86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 93

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ PCR	28
2	ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR	28
3	สภาวะในการทำ Gradient PCR	29
4	ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Ligation ระหว่างยีน *AGXT* กับ pGEM-T vector	32
5	ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	34
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ สำหรับทำ mutagenesis	35
7	ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Mutant Strand Synthesis Reaction	35
8	สภาวะในการทำ PCR	36
9	ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับเตรียมตัดต่อยีน *AGXT* กับ expression vector	38
10	ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ Ligation ระหว่างยีน *AGXT* กับ expression vector	39
11	ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	42
12	ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนแรกของการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT	45
13	ข้อมูลของผลการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT	59
14	ค่าทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA	61
15	สรุปผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD	62
16	ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Post Hoc Tests แบบ Tukey HSD โดยการเปรียบเทียบทีละคู่	63
17	ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ครั้งที่ 1	83
18	ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ครั้งที่ 2	84
19	ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในการวัดการทำงานของเอนไซม์ AGT ครั้งที่ 3	85

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการวิจัย	6
2	ตำแหน่งของยีน *AGXT* (ลูกศรชี้) บนโครโมโซมหมายเลข 2	8
3	ปฏิกิริยาทางเคมีที่ใช้เอนไซม์ AGT เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	9
4	กลไกการทำงานของเอนไซม์ AGT	9
5	กระบวนการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่ผิดปกติซึ่งส่งผลให้เกิดโรค PH1	9
6	โครงสร้างของเอนไซม์ AGT	11
7	กลไกการส่งเอนไซม์ AGT สู่ตำแหน่งเป้าหมาย	11
8	ตำแหน่งในโครงสร้างของเอนไซม์ AGT ที่มักพบการกลายพันธุ์	13
9	ภาวะการสะสมผลึกแคลเซียมออกซาเลท ในอวัยวะต่าง ๆ ของผู้ป่วยโรค PH1	15
10	ลักษณะผลึกแคลเซียมออกซาเลท	16
11	โครงสร้างของ pGEM-T vector	31
12	โครงสร้างของ pcDNA3.1/V5-*His*B ซึ่งในงานวิจัยใช้เป็น expression vector	37
13	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีน	49
14	ผลการสังเคราะห์ยีน *AGXT* จาก cDNA ของเซลล์ EBV, เซลล์ Hep-G2 และเซลล์ COS 7 ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟริซิส จาก PCR products ของ Gradient PCR	50
15	ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเจลด้วยการทำอิเล็กโทรโฟริซิส	51
16	ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *AGXT* ปกติ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟริซิส	52
17	ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *AGXT* กลายพันธุ์ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำอิเล็กโทรโฟริซิส	53
18	ผลการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วทำอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอจากเจลเฉพาะบริเวณ 1.2 kb และ 5.5 kb	54
19	ผลการตรวจสอบการสกัดดีเอ็นเอจากเจล ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟริซิส	54
20	ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม (expression vector)	55
21	ตัวอย่างผลของการวัดปริมาณโปรตีนรวม สำหรับนำไปทำ Western blot	56
22	การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี Western blot	57

ภาพที่ หน้า

23 สูตรการคำนวณหาปริมาณไพรูเวทที่เกิดขึ้น สำหรับวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT..... 58
24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และหลังใส่เอนไซม์ LDH (A2)..... 60
25 กราฟแสดงปริมาณไพรูเวทที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากความสามารถในการทำงาน ของเอนไซม์ AGT..... 61
26 การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่สังเคราะห์จากเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน *AGXT* แบบ Pro11Arg ด้วยวิธี Immunofluorescence. 65
27 การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่สังเคราะห์จาก เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน *AGXT* แบบปกติด้วยวิธี Immunofluorescence 66
28 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ปกติซึ่งเชื่อมกับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 2 โดยใช้ pUC/M13 Forward เป็นไพรเมอร์..... 86
29 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ปกติซึ่งเชื่อมกับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 2 โดยใช้ pUC/M13 Reverse เป็นไพรเมอร์..... 87
30 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมกับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 3 โดยใช้ pUC/M13 Forward เป็นไพรเมอร์..... 88
31 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมกับ pGEM-T vector ของโคโลนีที่ 3 โดยใช้ pUC/M13 Reverse เป็นไพรเมอร์..... 89
32 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ปกติที่เชื่อมอยู่กับ expression Vector ของโคโลนีที่ 2 โดยใช้ BGH Reverse เป็นไพรเมอร์..... 90
33 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ปกติที่เชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 2 โดยใช้ T7 Promoter เป็นไพรเมอร์..... 91
34 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 1 โดยใช้ T7 Promoter เป็นไพรเมอร์..... 91
35 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ซึ่งเชื่อมอยู่กับ expression vector ของโคโลนีที่ 1 โดยใช้ BGH Reverse เป็นไพรเมอร์..... 92