



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

ปริญญา

ชีวเคมี

ชีวเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การแสดงออกของเลคตินจากใบหม่อนในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง และการศึกษา  
การจับกันระหว่างเลคตินและน้ำตาลในคอมพิวเตอร์

Expression of Mulberry Leaf Lectin in Bacterial and Insect Cells and Docking Studies  
between Lectin and Sugars in Computer

นามผู้วิจัย นางสาวสุภาภรณ์ สีทะหา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิวิ ชวงศ์โกมล, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( รองศาสตราจารย์สุนันทา รัตนาโก, ปร.ด. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิวิ ชวงศ์โกมล, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกของเลคตินจากใบหม่อนในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง และการศึกษาการจับกัน  
ระหว่างเลคตินและน้ำตาลในคอมพิวเตอร์

Expression of Mulberry Leaf Lectin in Bacterial and Insect Cells and Docking Studies between  
Lectin and Sugars in Computer

โดย

นางสาวสุภาภรณ์ สีทะหา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุภาภรณ์ สีทะหา 2553: การแสดงออกของเลคตินจากใบหม่อนในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง และการศึกษาการจับกันระหว่างเลคตินและน้ำตาลในคอมพิวเตอร์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) สาขาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D. 215 หน้า

Mulberry leaf lectin1 (MLL1) เป็นเลคตินที่พบในใบหม่อน (*Morus rotundiloba* Koidz.) ที่สามารถจับกับกรดเซียลิกได้ โดยทั่วไปจะพบกรดเซียลิกเป็นน้ำตาลที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรควางชนิดและเซลล์มะเร็ง งานวิจัยนี้สนใจที่จะผลิตโปรตีน MLL1 ในปริมาณมาก และทำให้ เลคตินนี้มีความจำเพาะต่อกรดเซียลิกเพิ่มมากขึ้น จึงทำการโคลนยีนของ MLL1 เพื่อให้โปรตีนสามารถแสดงออกปริมาณมากในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง ซึ่งการโคลนเข้า pET21a เพื่อให้แสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย แบ่งลำดับเบสของเลคตินออกเป็น 3 ส่วน คือ fMLL, nsMLL และ LMLL จากผลการทดลองพบว่า pET-fMLL ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน ในขณะที่ pET-nsMLL ได้โปรตีนหลักขนาด 13 kDa และโปรตีนที่มีขนาด 9 kDa ส่วน pET-LMLL ได้โปรตีนหลักที่มีขนาด 16 kDa และโปรตีนที่มีขนาด 13 kDa เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนเลคตินจากแบคทีเรีย ด้วยการทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายจับกลุ่มตกตะกอน พบว่าโปรตีนไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มตกตะกอน จากนั้นจึงนำยีน MLL1 โคลนเข้า pFastBac HT-A เพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แมลง จึงแบ่งลำดับเบสเป็น 2 ส่วน คือ fMLL และ nsMLL พบว่าทั้ง pFast-fMLL และ pFast-nsMLL ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แมลง จากนั้นทำการศึกษการจับกับกรดเซียลิก (Neu5Gc) ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้ IJOT จากฐานข้อมูลเป็นแม่แบบในการเตรียม homology modeling ของ LMLL แล้วนำโครงสร้างสามมิติที่ได้มาศึกษาการจับกับ GalNAc, Gal $\beta$ 1,3GalNAc และ Neu5Gc ด้วยโปรแกรม AutoDock 3.0.5 และดูผลด้วย Discovery Studio 2.1 พบว่า LMLL สามารถจับกับ Neu5Gc ได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้นศึกษาด้วย molecular dynamics simulation แล้วทำให้เข้าใจแรงที่จับกับน้ำตาล เพื่อที่จะหา LMLL ที่กลายพันธุ์แล้วจับกับ Neu5Gc ได้แรงขึ้น โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะซึ่งทำในคอมพิวเตอร์ เมื่อได้ LMLL ที่กลายพันธุ์ทั้งหมดจึงทำการ docking กับ Neu5Gc และ GalNAc พบว่าเมื่อเปลี่ยนฟีนิลอะลานีนตำแหน่งที่ 47 เปลี่ยนเป็นแอสพาราจิน (F47N) แล้วทำให้ค่าพลังงานที่ใช้ในการจับระหว่าง LMLL กับ Neu5Gc แตกต่างจากการจับระหว่าง LMLL กับ GalNAc มากที่สุด ซึ่งสามารถนำความรู้ที่ได้ปรับปรุงเลคตินเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

Supaporn Seetaha 2010: Expression of Mulberry Leaf Lectin in Bacterial and Insect Cells and Docking Studies between Lectin and Sugars in Computer. Master of Science (Biochemistry), Major Field: Biochemistry, Department of Biochemistry. Thesis Advisor: Assistant Professor Amornrat Promboon, Ph.D. 215 pages.

Mulberry leaf lectin1 (MLL1) is a lectin that is found in Mullberry leaf (*Morus rotumbiloba Koidz.*) that bind specifically to a sialic acid. The sialic acid is a sugar that is found on the surface of pathogenic bacteria and cancer cells. In our research we tried to express MLL1 protein in large scale and increase specificity of lectin to the sialic acid. We cloned and expressed the lectin protein in bacteria and insect cell, we expressed the protein from bacteria cells system by cloning the MLL1 gene into pET21a in 3 forms. That is fMLL, nsMLL and LMLL. However our result showed no expression of pET-fMLL. Furthermore, the pET-nsMLL showed the expression of major protein at 13 kDa and minor one at 9 kDa. Only pET-LMLL showed the expression major protein at 16 kDa and minor one at 13 kDa. However, when all bacterial expressed proteins were checked for aggregation of rabbit red blood cells, none of them has an activity at all. Next, we further expressed the protein from Insect cells system by cloning the MLL1 gene into pFastBac HT-A. in 2 forms. That is fMLL and nsMLL, our result showed no expression of both pFast-fMLL and pFast-nsMLL in the insect cells was observed. After that, we turned to use the computational method to understand molecular interaction with sialic acid. The homology modeling of LMLL was created by using PDB access code 1JOT as a template. The 3D model LMLL was docked with GalNAc, Gal $\beta$ 1,3GalNAc and Neu5Gc and with AutoDock 3.0.5 and visualized by Discovery Studio 2.1. We found that LMLL can bind to Neu5Gc with highest interaction energy as shown in the previous experiment. The interaction was further investigated by molecular dynamics simulation to understand the forces for the sugar binding. To find the mutant that bind to Neu5Gc stronger, we further did *in silico* site direct mutagenesis one by one amino acid in the binding site. All of mutants model were docked with Neu5Gc and GalNAc. We found that if we changed Phenylalanine at position 47 to Asparagine (F47N), the different between the binding energy of Neu5Gc and GalNAc was most increased. Therefore, our knowledge can be use for further modify the lectin to get the protein in the medical application in the future.

---

Student's signature

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร.อมรรัตน์ พรหมบุญ ที่คอยเคียงเคียง ฝึกความอดทน ฝึกความแข็งแกร่ง ไม่ให้ยอมแพ้ในอุปสรรคต่างๆ ขอรอบขอบพระคุณ ผศ.ดร.เกียรติทิวิ ชวงส์โกมล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ให้ กำลังใจ ให้โอกาสได้เรียนรู้ และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ขอรอบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุนันทา รัตนาโก ที่คอยให้กำลังใจ และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่างๆ มากมาย ทั้ง คำแนะนำในการใช้ชีวิต คำแนะนำในการเรียน และขอรอบขอบพระคุณอาจารย์ ภาควิชาชีวเคมี ทุกๆ ท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากสถาบันวิจัยและพัฒนา แห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) (Kasetsart University and Development Institute-KURDI)

ขอขอบคุณ น.ส.อนุสรณ์ วิเศษสิงห์ และนายกัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์ คอยให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย ตอบคำถามต่างๆ คำถามที่ข้าพเจ้าอยากรู้ และสอนในหลายๆ วิชาที่ข้าพเจ้าหลับในห้องเรียน ขอขอบคุณ นายณภัทร สองทวี และน.ส.อรไท สวัสดิ์ชัยกุล คอยให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยด้านคอมพิวเตอร์ ขอขอบคุณ น.ส.ปิยฉัตร มีสวัสดิ์ และ น.ส.กรรณิกา ทองขาว ที่คอยรับฝากงานข้าพเจ้าตลอดเวลา ขอขอบคุณเพื่อนที่แสนดี น.ส. ศิริเกษ ฤทธิกิจ ที่คอยรับฟัง ที่คอยปลอบใจเป็นกำลังใจ และที่สำคัญไม่เคยบ่นข้าพเจ้าสักคำเวลาที่ข้าพเจ้าทำตัวน่ารำคาญ ขอขอบคุณเพื่อนๆ และนักวิจัยอีกหลายคน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องข้อมูล คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และเพื่อนๆ ทุกคน ที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนทุกๆ เรื่อง ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณเพื่อนแสนดีและพี่ๆ แสนน่ารักที่ให้ข้าพเจ้ายืมเงินตลอดมาเวลาที่ขาดสน

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุภาภรณ์ สีทะหา

เมษายน 2553

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(11)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	37
อุปกรณ์	37
วิธีการ	42
ผลและวิจารณ์ผล	70
ผล	70
วิจารณ์ผล	141
สรุปและข้อเสนอแนะ	149
สรุป	149
ข้อเสนอแนะ	150
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	152
ภาคผนวก	176
ภาคผนวก ก สารเคมีในเทคนิคการวิเคราะห์ผล	177
ภาคผนวก ข ข้อมูลในการศึกษาและการวิเคราะห์ผล	182
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	215

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของเลคตินจากสัตว์แบ่งตามความจำเพาะกับบริเวณ carbohydrate-recognition domains (CRDs)	8
2	โปรตีนเลคตินที่จำเพาะกับกรดเซียลิกในพืชชนิดต่างๆ	22
3	การยับยั้งการจับกลุ่มตตะคอนของเม็ดเลือดแดงของแกะ โดยเลคตินจากใบหม่อน	30
4	การเปรียบเทียบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินระหว่างเลคตินที่สกัดได้จากพืชและเลคตินที่แสดงออกในแบคทีเรีย	31
5	สภาวะการมีวนพับของโปรตีนใน 96-well plate	56
6	การแสดงระยะห่างของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง 1JOT กับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc	108
7	การเปรียบเทียบกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะระหว่าง 1JOT และ LMLL	109
8	การเปรียบเทียบค่าพลังงานในการจับกับน้ำตาลชนิดต่างๆ ระหว่าง LMLL กับ 1JOT และเปรียบเทียบกับทดลองในห้องปฏิบัติการ	110
9	การแสดงค่าระยะห่างของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง LMLL กับน้ำตาล	113
10	การเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีนกับน้ำตาล	115
11	การแสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของกรดเซียลิกกลุ่ม N-Acetylneuraminic acid และแสดงการศึกษาการจับกันของ LMLL กับอนุพันธ์ของกรดเซียลิก	118
12	การแสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของกรดเซียลิกกลุ่ม N-Glycolylneuraminic acid และแสดงการศึกษาการจับกันของ LMLL กับอนุพันธ์ของกรดเซียลิก	121
13	การแสดงค่าพลังงานจากการศึกษา MD Simulation ของ 1JOT กับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc	124
14	การเปรียบเทียบแรง Electrostatics จากการศึกษา MD Simulation ของ LMLL กับน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด	125
15	การเปรียบเทียบแรง Van der Waals จากการศึกษา MD Simulation ของ LMLL กับน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด	126

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	การเปรียบเทียบค่าพลังงานและกรดอะมิโนจาก Discovery Studio 2.1 ของ LMLL ในการจับกับน้ำตาล	127
17	การเปรียบเทียบกรดอะมิโนจาก Discovery Studio 2.1 ของ LMLL ในการจับกับน้ำตาล	127
18	การเปรียบเทียบค่าพลังงานจาก AutoDock 3.0.5. และ Discovery Studio 2.1 ของ LMLL ในการจับกับน้ำตาล	127
19	การแสดงค่าพลังงาน (kcal/mol) ในการจับของ LMLL ที่ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับ Neu5Gc	129
20	การแสดงค่าพลังงาน (kcal/mol) ในการจับของ LMLL ที่ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับ GalNAc	130
21	การแสดงค่าพลังงาน (kcal/mol) ในการจับของ LMLL ที่ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับ Man	131
22	การเปรียบเทียบค่าพลังงาน (kcal/mol) การจับของ LMLL ที่ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับ Neu5Gc, GalNAc และ Mannose และเปรียบเทียบความสามารถในการจับของน้ำตาลแต่ละชนิดโดยเทียบจาก Neu5Gc	132
23	การเปรียบเทียบการจับของ LMLL กับน้ำตาล Neu5Gc, GalNAc และ Man ระหว่าง mutant LMLL กับ LMLL	133
24	การแสดงค่าระยะห่างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง F47N-LMLL กับ Neu5Gc, GalNAc และ Man	136
25	การเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง LMLL กับ F47N-LMLL	138
26	การเปรียบเทียบแรง Electrostatics จากการศึกษา MD Simulation ของ F47N-LMLL กับน้ำตาล 3 ชนิด	139
27	การเปรียบเทียบแรง Van der Waals จากการศึกษา MD Simulation ของ F47N-LMLL กับน้ำตาล 3 ชนิด	140

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก1 การเตรียม SDS-PAGE	179
ข1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 1 ชั่วโมง	196
ข2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 24 ชั่วโมง	197
ข3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 48 ชั่วโมง	198
ข4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 72 ชั่วโมง	199
ข5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง	200
ข6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง	201
ข7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง	202
ข8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 1 ชั่วโมง	203
ข9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 24 ชั่วโมง	204
ข10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 48 ชั่วโมง	205
ข11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 72 ชั่วโมง	206
ข12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง	207

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข13	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง	208
ข14	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง	209
ข15	Codon Usage ของ <i>E. coli</i>	212
ข16	Codon Usage ของ <i>Spodotera frugiperda</i>	213

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การแสดงโครงสร้างของเลคตินตามโครงสร้างในธรรมชาติ	5
2	โครงสร้างสามมิติของ ConcanavalinA	10
3	โครงสร้างสามมิติของ Chitin-binding lectins	11
4	โครงสร้างสามมิติของ <i>Galanthus nivalis</i> agglutinin (GNA)	11
5	โครงสร้างสามมิติของเลคตินจาก serpent cucumber	13
6	โครงสร้างสามมิติของ Jacalin related lectins	14
7	โครงสร้างสามมิติของ <i>Amaranthus caudatus</i> agglutinin	15
8	โครงสร้างสามมิติของเลคติน Type2 RIPs	15
9	โครงสร้างสามมิติของเลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลกลูโคส/แมนโนส	17
10	โครงสร้างสามมิติของเลคติน <i>Lotus tetragonolobus</i> lectin (LTA)	18
11	โครงสร้างสามมิติของเลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลกาแลกโตส/ เอ็น-อะเซททิลกาแลกโตซามีน	18
12	โครงสร้างสามมิติของเลคตินจาก <i>Ulex europaeus</i>	19
13	โครงสร้างสามมิติของเลคตินจากถั่วลิสง	20
14	โครงสร้างสามมิติของ lentil lectin	20
15	โครงสร้างสามมิติของ ConA-like lectin (ConM)	21
16	โครงสร้างสามมิติของเลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับกรดเซียลิก	23
17	เลคตินจับกับน้ำตาลบนผิวเซลล์ ทำให้เกิดการรวมกลุ่มตักตะกอนของเซลล์	24
18	หมอนสายพันธุ์หมอนน้อย	28
19	การทำให้เลคตินในใบหมอนบริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sephacel column	30
20	โครงสร้างโดยทั่วไปของกรดเซียลิก	33
21	โครงสร้างของกรดเซียลิกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม	33
22	กรดเซียลิกที่ปลายของสายโพลิแซ็กคาไรด์บนไกลโคโปรตีน ไกลโคลิพิด	34
23	การแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MLL1 เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ IJOT	43
24	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MLLc20	44

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	แผนภาพของเวกเตอร์ pET21a	46
26	แผนภาพของพลาสมิด pGEM-MLL	47
27	แผนภาพของพลาสมิด pET-MLL	50
28	การแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ในการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีนเพื่อให้แสดงออกในเซลล์แมลง	61
29	แผนภาพของเวกเตอร์ pFastBac HT-A	63
30	แผนภาพของพลาสมิด pFast-MLL	64
31	เซลล์แมลงชนิด <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) cell line	67
32	ขนาดของการสังเคราะห์ยีน MLL1 แต่ละส่วน ด้วยวิธีพีซีอาร์	71
33	การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pGEM-fMLL	71
34	การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pGEM-nsMLL	72
35	การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pGEM-LMLL	72
36	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM-fMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMLL	73
37	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM-nsMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nsMLL	74
38	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM-LMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LMLL	75
39	การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pET-fMLL	77
40	การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pET-nsMLL	77
41	การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pET-LMLL	78
42	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-fMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMLL	78
43	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-nsMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nsMLL	80

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
44	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-LMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LMLL	81
45	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ pET-LMLL กับลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-LMLL	81
46	การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-fMLL, pET-nsMML และ pET-LMLL	83
47	การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-nsMML และ pET-LMLL ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.2% Lactose	84
48	การหาอุณหภูมิและสารเหนี่ยวนำที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน	84
49	การหาเวลาในการเหนี่ยวนำที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน	85
50	การแสดงออกของโปรตีน pET-LMLL ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส	85
51	การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot	86
52	การตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMML	88
53	การตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-LMLL	88
54	การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMML และ pET-LMLL โดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	90
55	การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-LMLL โดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส	90
56	การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMML และ pET-LMLL จากโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์และทำให้เกิดการม้วนพับของโปรตีน	91
57	การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pFast-fMML	92
58	การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pFast-nsMML	93
59	การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ยีนของ Bac-fMML และ Bac-nsMML ด้วยวิธีพีซีอาร์	94

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
60	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Bac-fMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMML	95
61	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Bac-nsMML กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nsMML	96
62	ลักษณะของเซลล์แมลง Sf9 ที่มีรีคอมบิแนนท์ยีน	97
63	การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ยีนของ Bac-fMML และ Bac-nsMML จากเซลล์แมลง ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13	98
64	การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์แมลงที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด Bac-fMML และ Bac-nsMML	98
65	การตรวจสอบโปรตีนจากเซลล์แมลงด้วย Western blot	99
66	การตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-fMML	100
67	การตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-nsMML	100
68	การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-fMML ด้วยวิธี Hemagglutination assay	101
69	การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-nsMML ด้วยวิธี Hemagglutination assay	102
70	การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ fMML และ 1JOT	104
71	โครงสร้างระดับตติยภูมิของ MPA (PDB : 1JOT)	104
72	การออกแบบโครงสร้างระดับตติยภูมิของ fMML, nsMML และ LMLL	105
73	การเปรียบเทียบโครงสร้างระดับตติยภูมิของ 1JOT และ LMLL	106
74	การเปรียบเทียบโครงสร้างของ Gal $\beta$ 1,3GalNAc ที่ได้จากโครงสร้างคริสตัล (PDBfile) และโครงสร้างที่ได้จากการ redocking	107
75	การแสดงผลพันธะไฮโดรเจนของการจับกันระหว่าง 1JOT กับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc	107
76	การเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของบริเวณจับจำเพาะระหว่าง 1JOT และ LMLL	109
77	การแสดงผลพันธะไฮโดรเจนของการจับกันระหว่าง LMLL กับน้ำตาลชนิดต่างๆ	112

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
78	การเปรียบเทียบโครงสร้างน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด ขณะจับกับโปรตีน LMLL	115
79	โครงสร้างของอนุพันธ์กรดเซียลิกที่ได้จากการศึกษาการจับกับ LMLL	116
80	การเปรียบเทียบโครงสร้างของ Neu4,5Ac กับ Neu5Gc และการจับกับกรดอะมิโน	117
81	การแสดงพันธะไฮโดรเจนของการจับกันระหว่าง LMLL-F47N กับ Neu5Gc, GalNAc และ Man	135
82	การเปรียบเทียบโครงสร้างและลักษณะผิวของ LMLL และ LMLL-F47N	137
83	การเปรียบเทียบโครงสร้างน้ำตาล 3 ชนิด ขณะจับกับโปรตีน	137
84	ลำดับอาร์เอ็นเอของ fMLL	141
85	ไดอะแกรมจำลองการคาดคะเนบริเวณตัดใน pET-nsMLL และ pET-LMLL	142
<b>ภาพผนวกที่</b>		
ข1	การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pGEM-fMLL ด้าน N-terminal	183
ข2	การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pGEM-nsMLL ด้าน C-terminal	185
ข3	การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pGEM-LMLL ด้าน N-terminal	186
ข4	การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pET-fMLL ด้าน N-terminal	187
ข5	การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pET-fMLL ด้าน C-terminal	188
ข6	การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pET-nsMLL ด้าน C-terminal	189
ข7	การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pET-LMLL ด้าน C-terminal	190
ข8	การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ Bac-fMLL ด้าน C-terminal	192
ข9	การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ Bac-nsMLL ด้าน C-terminal	194
ข10	การทำนายหาสัญญาณโปรตีนด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 Server	210
ข11	การวิเคราะห์ความน่าจะเป็นในการแสดงออกของโปรตีน	211
ข12	ลำดับกรดอะมิโนของ pET-nsMLL ที่ประกอบด้วย $\beta$ -chain และ $\alpha$ -chain	214

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATP	=	Adenosine triphosphate
bp	=	Base pair
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	=	Ethylenediamine-tetra acetic acid diasodium salt
g	=	Gram
Gal	=	Galactose
GalNAc	=	<i>N</i> -acetyl- $\beta$ -galactosamine
Gal $\beta$ 1,3GalNAc	=	Galactose- $\beta$ 1,3- <i>N</i> -acetylgalactosamine
Glc	=	Glucose
h	=	Hour
IPTG	=	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
kb	=	Kilobase pair
kDa	=	Kilodalton
l	=	Liter
LB	=	Luria-Bertani
M	=	Molar
Man	=	Mannose
MgCl <sub>2</sub>	=	Magnesium chloride
mg	=	Milligram
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
NaCl	=	Sodium chloride
NADH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
Neu5Ac	=	<i>N</i> -acetylneuraminic acid
Neu5Gc	=	<i>N</i> -glycolylneuraminic acid
OD	=	Optical density
PCR	=	Polymerase chain reaction

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PEG	=	Polyethylene glycol
pH	=	Logarithm of reciprocal of hydrogen ion concentration
PMSF	=	Phenylmethylsulfonyl fluoride
s	=	Second
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Tris	=	Tris hydroxymethyl aminomethane
TEMED	=	Tetramethylethylenediamine
U	=	Unit
µg	=	Microgram
µM	=	Micromolar
X-Gal	=	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside

## การแสดงออกของเลคตินจากใบหม่อนในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง และการศึกษา การจับกันระหว่างเลคตินและน้ำตาลในคอมพิวเตอร์

### Expression of Mulberry Leaf Lectin in Bacterial and Insect Cells and Docking Studies between Lectin and Sugars in Computer

#### คำนำ

เลคติน (lectin) เป็นกลุ่มโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่จับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะ เลคตินยังมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า แอ็กกลูตินิน (agglutinin) เนื่องจากมีความสามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์หลายชนิดจับกลุ่มตกตะกอน ในปัจจุบันพบเลคตินมากมายหลายชนิด ทั้งจาก แบคทีเรีย รา พืช และสัตว์ แต่ส่วนใหญ่เลคตินได้มาจากพืช และพบมากในส่วนของเมล็ด ซึ่งพืชที่พบเลคตินส่วนใหญ่พบในพืชตระกูลถั่ว (*Leguminosae sp.*) จากการศึกษาบทบาทหน้าที่ของเลคตินในพืชพบว่าเลคตินอาจมีบทบาทที่สำคัญในพืช โดยทำหน้าที่เป็นโปรตีนสะสม (storage proteins) ได้แก่ เลคตินที่พบในเมล็ดและส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เลคตินจากหัวของ *Arum maculatum* (Van Damme *et al.*, 1995) Cinnamomin จากเมล็ดของ *Cinnamomum camphora* (Liu *et al.*, 2002) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการขนส่งน้ำตาล การปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ การควบคุมการแบ่งเซลล์ (Etzler, 1986) และอีกมากมาย แต่บทบาทของเลคตินที่น่าสนใจคือการทำหน้าที่เป็นโมเลกุลป้องกัน (defensive molecules) ซึ่งป้องกันพืชจากการรุกรานของจุลินทรีย์และไวรัส เช่น บทบาทในการต้านทานเชื้อโรค ตัวอย่างเช่น เลคตินจากเมล็ดของ *Talisia esculenta* จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *FU.S.A.rium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Freire *et al.*, 2002) เลคตินจากพืชมักจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลกโตส น้ำตาลอะเซทิลกาแลกโตซามีน (N-acetylgalactosamine) น้ำตาลอะเซทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และ น้ำตาลฟรุกโตส แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีความจำเพาะกับ กรดเซียลิก ซึ่งกรดเซียลิกเป็นน้ำตาลที่ไม่พบในพืช แต่จะพบบนเซลล์ที่หลากหลายบนเซลล์สัตว์และแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด กรดเซียลิกเป็นองค์ประกอบของไกลโคโปรตีนในสัตว์ โดยจะพบกรดเซียลิกเป็นน้ำตาลที่อยู่ปลายของไกลโคคอนจูเกต (glycoconjugates) มีบทบาทในการจดจำกลไก (recognition mechanism) ทางชีววิทยามากมาย เป็นความหลากหลาย (remarkable diversity) ของไกลโคคอนจูเกต บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดและเซลล์มะเร็ง

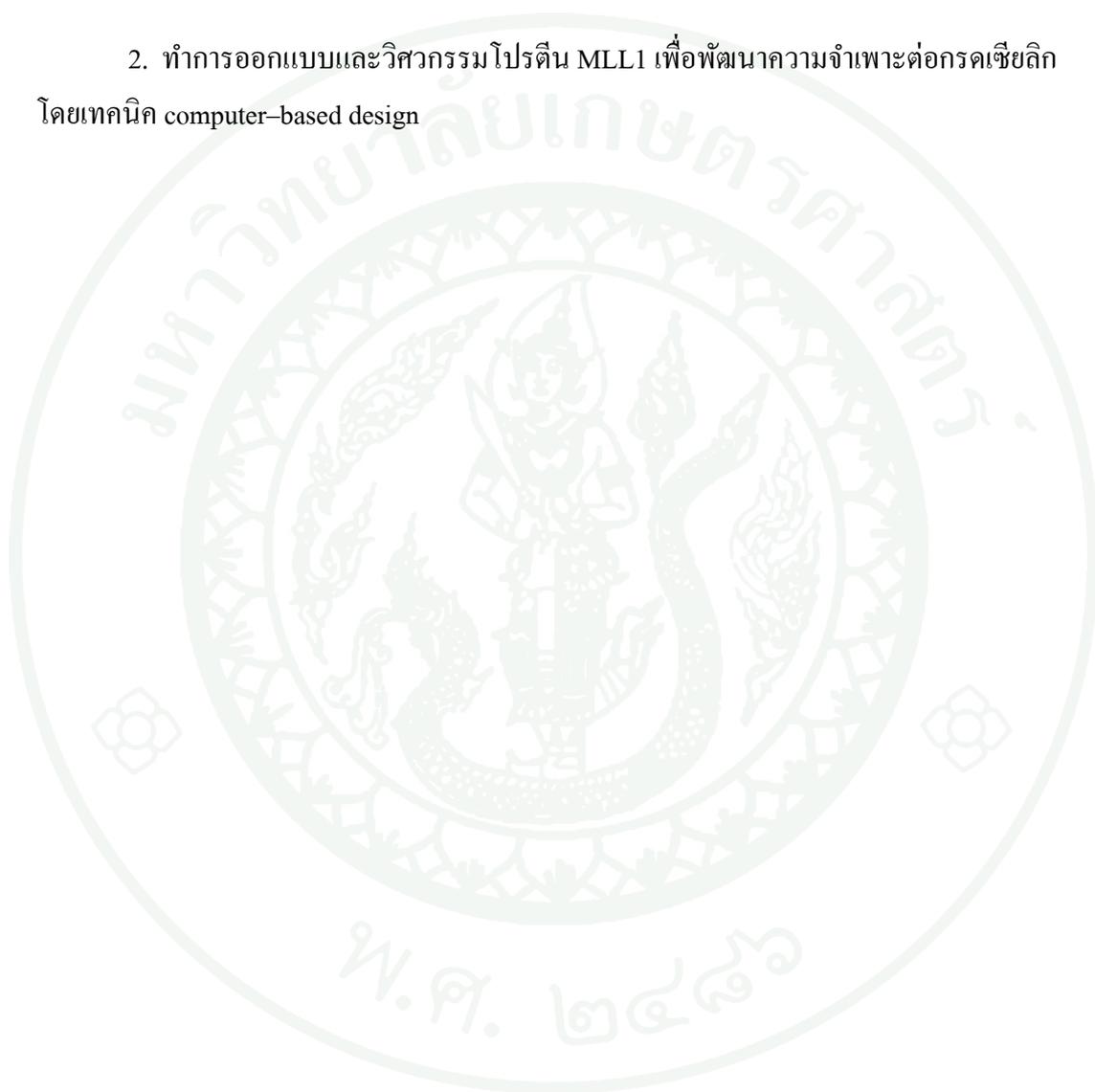
เลคตินที่ค้นพบใหม่ 2 ชนิด ที่พบในใบหม่อน สายพันธุ์หม่อนพันธุ์พื้นเมืองไทยสายพันธุ์หม่อนน้อย (*Morus rotundiloba* Koidz.) มีความจำเพาะต่อกรดเซียลิก คือ Mulberry leaf lectin1 (MLL1) และ Mulberry leaf lectin2 (MLL2) และพบว่า MLL1 มีความสำคัญในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ของต้นหม่อน (Bacterial blight) อันจะทำให้ผลผลิตของใบหม่อนลดลง (Ratanapo *et al.*, 1998) จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดใน cDNA ตลอดสายของ MLL1 (Kankamol, 2003) พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบคล้ายคลึงกับโปรตีนในกลุ่ม jacalin-related lectin (JRL) ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้มักมีลักษณะโครงสร้างการม้วนพับทางสามมิติที่คล้ายคลึงกัน (Houles Astoul *et al.*, 2002) เลคตินในกลุ่ม JRL นี้ สามารถจัดแบ่งได้ออกเป็นสองกลุ่ม ตามความสามารถในการจับกับน้ำตาล คือกลุ่มที่จับกับน้ำตาลแมนโนส และกลุ่มที่จับกับน้ำตาลกาแลกโตส ซึ่งความจำเพาะของน้ำตาลที่แตกต่างกันของเลคตินทั้งสองกลุ่มนี้พบว่าขึ้นอยู่กับสามปัจจัย คือ จำนวน โพลีเปปไทด์ (Yang and Czapl, 1993) ความแตกต่างในลำดับและจำนวนกรดอะมิโน (Houles Astoul *et al.*, 2002) และ ไกลโคซิเลชัน (Glycosylation) (Sahasrabudde *et al.*, 2004) พบว่า MLL1 มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงอย่างมากกับ JRL ซึ่งเป็นเลคตินในกลุ่มที่สามารถจับกับน้ำตาลกาแลกโตสได้ และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 1.93 % โดยน้ำหนัก ซึ่งอาจทำให้มีมากกว่าหนึ่งปัจจัยที่ทำให้ MLL1 มีความจำเพาะกับกรดเซียลิก เช่น ความแตกต่างในลำดับและจำนวนกรดอะมิโน และไกลโคซิเลชัน ซึ่งขณะนี้ยังไม่มียูโดพ JRL ที่มีความจำเพาะกับกรดเซียลิกนอกจาก MLL1

จากการศึกษา MLL1 กับการจับกับน้ำตาลชนิดอื่น เช่น น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลกโตส น้ำตาลอะเซทิลกาแลกโตซามีน (N-acetylgalactosamine) น้ำตาลอะเซทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และ น้ำตาลฟรุกโตส พบว่า MLL1 ยังสามารถจับกับน้ำตาลเหล่านี้ได้ด้วยค่าการจับจำเพาะ ( $K_d$ ) ใกล้เคียงกับการจับกับกรดเซียลิก (Ratanapo *et al.*, 1998) และนำมาศึกษาการแสดงออกของ MLL1 ในแบคทีเรีย พบว่า MLL1 มีการแสดงออกได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 kDa ซึ่งมีขนาดน้อยกว่าการคาดคะเนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ และโปรตีนที่ได้นั้นไม่สามารถทำงานได้ (Getsang, 2007)

ดังนั้นจึงนำไปสู่การวิจัยเพื่อให้โปรตีนเลคตินมีการแสดงออกโดยเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการแสดงออกต่างชนิดกัน และวิศวกรรมโปรตีนเลคตินให้มีความจำเพาะมากขึ้น โดยใช้คอมพิวเตอร์ในการคาดเดาและนำไปสู่การทดสอบจริงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งการเข้าใจคุณสมบัติและความสามารถในการจับกับกรดเซียลิกของเลคตินชนิดใหม่จะสามารถพัฒนาเป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรคเพื่อระบุแบคทีเรียก่อโรคและก๊อนเนอิมะเร็งได้ในอนาคต

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน MLL1 ที่ทำงานได้ในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง
2. ทำการออกแบบและวิศวกรรมโปรตีน MLL1 เพื่อพัฒนาความจำเพาะต่อกรดเซียลิก โดยเทคนิค computer-based design



## การตรวจเอกสาร

### เลคติน

เลคตินค้นพบครั้งแรกจากการศึกษาสารพิษจากเมล็ดคละหุ้ง (*Ricinus communis*) เรียกว่าไรซิน สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์เกาะกลุ่มตกตะกอนได้ และยังพบเลคตินในพืชชนิดอื่นๆ อีกมากมาย เช่น อะบริน (abrin) จากเมล็ดของ *Abrus precatorius* ซินนาโมมิน (Cinnamomin) จากเมล็ดของ *Cinnamomum camphora* จึงเรียกว่า ไฟโตฮีแมกกลูตินิน (photohemagglutinin) หรือ ฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin) ต่อมาได้มีการค้นพบเลคตินจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อีก เช่น เลคตินจากไวรัส แบคทีเรีย และสัตว์ นอกจากนี้ยังพบว่าเลคตินสามารถทำให้เซลล์ชนิดอื่นๆ เกาะกลุ่มกันได้ เช่น ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเส้นใยชนิดต่างๆ เซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น ลิมโฟไซท์ (lymphocyte) และเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Sharon and Lis, 1972) การจับของเลคตินกับน้ำตาลจะจับกันอย่างหลวมๆ สามารถแยกออกจากกันได้ การเกาะกลุ่มของเลคตินกับน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนประกอบของไกลโคโปรตีนถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาลที่มีความจำเพาะกับเลคติน (Barondes, 1981)

โครงสร้างเลคตินในธรรมชาติ แบ่งได้ 4 กลุ่มดังนี้ (Peumans and Van Damme, 1995)

1. Merolectins เป็นเลคตินที่มีขนาดเล็ก มีบริเวณจับกับคาร์โบไฮเดรตหนึ่งตำแหน่ง แต่ไม่สามารถเกิด glycoconjugates หรือ เกิดการตกตะกอนของเซลล์ได้ Merolectins พบเพียงไม่กี่ชนิด เช่น Mannose-binding proteins จากกล้วยไม้ (Pusztai, 1991) เป็นต้น

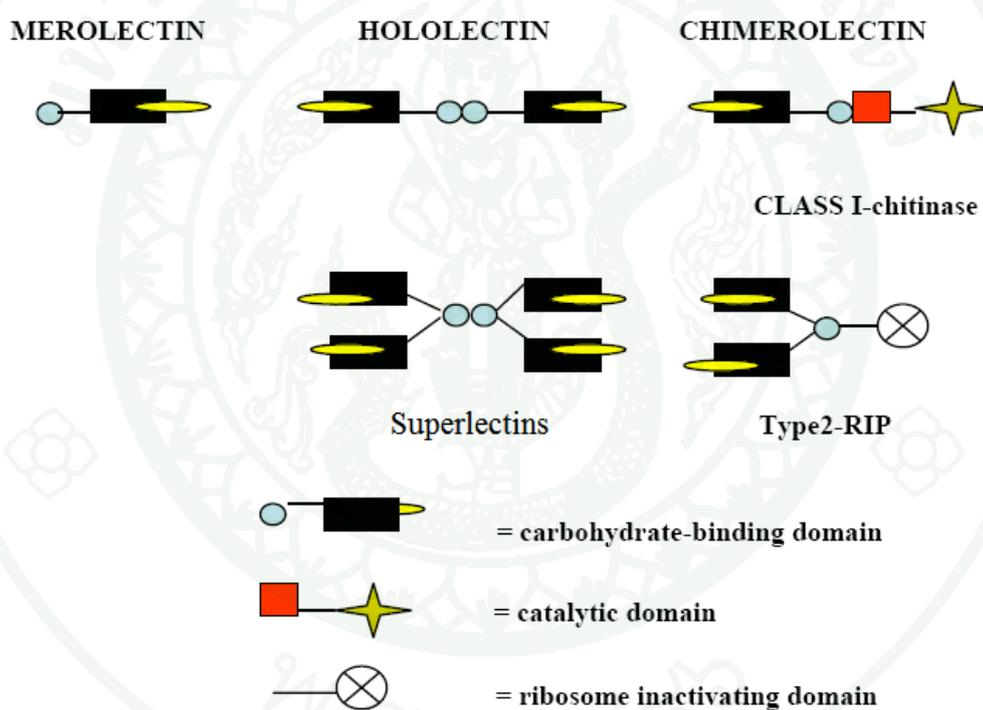
2. Hololectins เป็นเลคตินที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Merolectins แต่มีบริเวณจับกับคาร์โบไฮเดรตสองตำแหน่งหรือมากกว่าสองตำแหน่ง สามารถเกิด glycoconjugates หรือ เกิดการตกตะกอนของเซลล์ได้ ซึ่งเลคตินส่วนใหญ่ในพืชมีลักษณะเป็น Hololectins (Sharon and Lis, 1989; Pusztai, 1991)

3. Chimerolectins เป็นเลคตินที่เป็น fusion proteins มีบริเวณ catalytic activity domain มีบริเวณจับกับคาร์โบไฮเดรตหลายตำแหน่ง สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์ได้ เช่น Type 2 RIP (Barbieri *et al.*, 1993) แต่ในขณะที่ Chimerolectins ที่มีบริเวณจับกับคาร์โบไฮเดรตหนึ่ง

ตำแหน่งคล้ายกับ Merolectins เช่น Class I-chitinases นั้น ไม่สามารถเกิดการตกตะกอนของเซลล์ได้ (Collinge *et al.*, 1993)

4. Superlectins เป็น Chimerolectins ชนิดพิเศษที่มีการสร้าง fusion proteins ต่อจากบริเวณจับกับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate-binding domains) ทำให้โครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลงและจดจำโครงสร้างที่ไม่เกี่ยวกับน้ำตาล เช่น tulip lectin เป็นเลคตินที่พบในหัวของทิวลิป (Cammue *et al.*, 1986)

โครงสร้างเลคตินในธรรมชาติ สามารถสรุปเป็นแผนภาพดังนี้ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การแสดงโครงสร้างของเลคตินตามโครงสร้างในธรรมชาติ

ที่มา: ดัดแปลงจาก Van Damme *et al.* (1998)

## แหล่งที่พบเลคติน

เลคตินพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ การศึกษาเลคตินในพืชมีมากกว่าแหล่งอื่น เลคตินในแต่ละแหล่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป ดังนี้

### 1. สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (Microorganism)

1.1 ไวรัส (Virus) โปรตีนเลคตินในไวรัสที่มีการศึกษา ตัวอย่างเช่น การศึกษา Influenza viruses พบว่าเป็น viral lectin ที่มีโปรตีน hemagglutinin (HA) ภายในหนึ่งหน่วยของโปรตีน ประกอบด้วย 2 สาย โพลีเปปไทด์ คือ HA<sub>1</sub> และ HA<sub>2</sub> มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 36 kDa และ 26 kDa ตามลำดับ และเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Sauter *et al.*, 1992) ต่อมามีการศึกษาใน murine polyoma virus ซึ่งเป็นไวรัสที่ไม่มีเปลือกชั้นนอก (nonenveloped virus) และมีสารพันธุกรรมเป็น DNA เกอียวกู่ Murine polyoma virus มี viral protein (VP1) ที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตได้ อยู่บริเวณ capsid ประกอบด้วย 5 หน่วยย่อย มีโครงสร้างเป็น antiparallel  $\beta$  sheets (Stehle *et al.*, 1994) และการศึกษาใน Rhesus rotavirus พบว่าบริเวณ capsid ด้านนอกประกอบด้วย viral protein 7 (VP7) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน และ viral protein 4 (VP4) เป็น spike protein โดยมีเอ็นไซม์ทริปซิน ตัด VP4 ได้ส่วน N-terminal หรือ VP8 ซึ่งเป็นส่วน viral hemagglutinin ที่มีความสำคัญต่อแอนติบอดี (antibodies) เป้าหมาย (Dormitzer *et al.*, 2002)

1.2 แบคทีเรีย (Bacteria) การศึกษาโปรตีนเลคตินในแบคทีเรียมีมากมาย ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas aeruginosa* สังเคราะห์เลคติน 2 ชนิด คือ PA-IL มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 12.75 kDa และ PA-III มีความจำเพาะต่อน้ำตาลฟิวโคส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 kDa (Gilboa-Garber, 1972) Cholera toxin (cholera toxin) เป็นเลคตินที่พบใน *Vibrio cholera* มีความจำเพาะต่อ galactosyl-N-acetylgalactosamine น้ำหนักโมเลกุล 11 kDa (Richards *et al.*, 1979) และ Botulinum neurotoxin เป็นเลคตินที่พบใน *Clostridium botulinum* ประกอบด้วย 2 สายโพลีเปปไทด์ คือ light chain (LC) เป็นสายที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 kDa และ heavy chain (HC) เป็นสายที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100 kDa (Montecucco and Schiavo, 1995)

1.3 เห็ด รา (Fungi) โปรตีนเลคตินในเห็ดรา ตัวอย่างเช่น Antineoplastic Lectin พบใน *Agaricus bisporus* เป็นเลคตินที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลไคแซคคาไรด์ระหว่าง Gal $\beta$ 1,3GalNAc

บน T antigen ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย น้ำหนักโมเลกุล 64 kDa มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Crenshaw *et al.*, 1995) Aleuria aurantia lectin เป็นเลคตินที่พบใน *Aleuria aurantia* มีความจำเพาะต่อน้ำตาลฟิวโคส (fucose) ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีบริเวณจับกับน้ำตาลฟิวโคส 5 ตำแหน่ง (Olausson *et al.*, 2008)

## 2. สาหร่าย (Algae)

โปรตีนเลคตินในสาหร่าย พบในสาหร่ายไม่กี่ชนิด เช่น Griffithsin (GRFT) เป็นเลคตินที่ต้านไวรัส (antiviral lectin) พบในสาหร่ายสีแดง *Griffithsia sp.* มีรายงานการทำงานของ GRFT ว่าสามารถต้านเชื้อ HIV ได้ GRFT มีความจำเพาะต่อน้ำตาลแมนโนส (Ziołkowska *et al.*, 2006) การศึกษาโครงสร้างคริสตัล (Crystal structures) พบว่า GRFT มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกลูโคส และ N-acetylglucosamine (Ziołkowska *et al.*, 2007)

## 3. สัตว์ (Animal)

โปรตีนเลคตินในสัตว์ส่วนใหญ่พบในไฟลัมอาร์โทรพอด (arthropod) และไฟลัมมอลลัส (mollusk) ตัวอย่างของเลคตินที่พบในไฟลัมอาร์โทรพอด เช่น เลคตินจากซีรึมของกุ้ง *Penaeus indicus* มีน้ำหนักโมเลกุล 181 kDa ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 84 kDa และ 97 kDa (Maheswari *et al.*, 1997) เลคตินในไฟลัมมอลลัส เช่น เลคตินจากหอย *Belamyia bengalensis* มีน้ำหนักโมเลกุล 33 kDa (Banerjee *et al.*, 2004) และยังมีเลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น เลคตินจากปลาทูน่า *Katsuwonus pelamis* มีน้ำหนักโมเลกุล 140 kDa ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีน้ำหนักโมเลกุล 35 kDa มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 14 % ของน้ำหนัก มีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลกโตส (Jung *et al.*, 2003) เป็นต้น นอกจากนี้เลคตินจากสัตว์ยังประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีบริเวณที่สามารถจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตคือ บริเวณ CRD (carbohydrate-recognition domains) ซึ่งสามารถแบ่งเลคตินจากบริเวณ CRD ได้ทั้งหมด 8 กลุ่ม ได้แก่ Calnexin, M-type, L-type, P-type, C-type, Galectin, I-type และ R-type (Taylor and Drickamer, 2003) (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** ชนิดของเลคตินจากสัตว์แบ่งตามความจำเพาะกับบริเวณ carbohydrate-recognition domains (CRDs)

Type	Structure	Typical ligand	Example of function
Calnexin	$\beta$ -sandwich	Glc1Man	Protein sorting in the endoplasmic reticulum
M-type	$\alpha$ -helical barrel	Man <sub>8</sub>	Endoplasmic reticulum associated protein degradation
L-type	$\beta$ -sandwich	Man <sub>5-9</sub>	Protein sorting post-in the endoplasmic reticulum
P-type	Unique $\beta$ -rich structure	Man 6-phosphate	Protein sorting post-golgi
C-type	Unique mixed $\alpha/\beta$ structure	Various	Cell adhesion (selectins) Glycoprotein clearance Innate immunity (collectins)
Galectins	$\beta$ -sandwich	S-galactosides	Glycan cross-linking in the extracellular matrix
I-type	Immunoglobulin superfamily	Sialic acid	Cell adhesion (Siglecs)
R-type	$\beta$ -trefoil	Various	Enzyme targeting Glycoprotein hormone turnover

ที่มา: Taylor and Drickamer (2003)

#### 4. พืช (plant)

เลคตินส่วนใหญ่พบในพืช และพืชที่นำมาศึกษามากที่สุดคือ พืชตระกูลถั่ว โดยจะพบเลคตินมากที่สุดในส่วนของเมล็ด (Sharon and Lis, 1972) และพบมากในส่วนของใบเลี้ยง ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อสำหรับเก็บอาหารไว้ใช้ขณะที่เมล็ดมีการงอก แล้วยังพบเลคตินในส่วนของเอมบริโอและเปลือกหุ้มเมล็ดแต่พบน้อย (Pueppke *et al.*, 1978) จากการศึกษาการกระจายของเลคตินในถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) พบเลคตินมากกว่า 90 % อยู่ที่ใบเลี้ยง และเลคตินส่วนที่เหลือพบในส่วนของลำต้น ใบ และรากอ่อน (Pueppke, 1979) เลคตินในพืชตระกูล Solanaceae ได้แก่ มะเขือเทศ

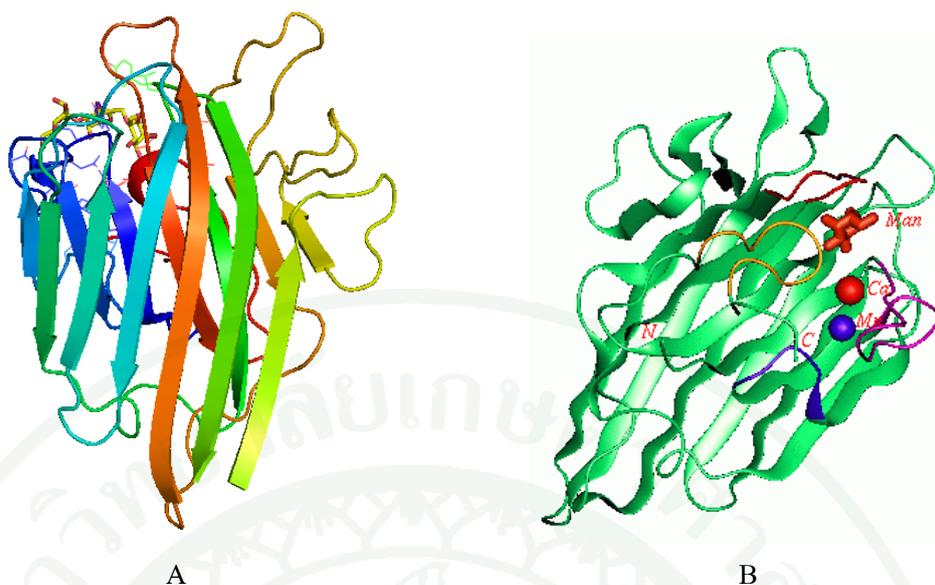
มันฝรั่ง เช่น เลคตินที่พบในมันฝรั่งมีน้ำหนักโมเลกุล 100 kDa ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน (Allen *et al.*, 1978) เลคตินจากมันฝรั่งสามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มได้ เลคตินในกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อน้ำตาล N-acetylglucosamine เลคตินในพืชตระกูล Cucurbitaceae ได้แก่ ฟักทอง แพง แดงกวา เช่น เลคตินจากฟักทอง (*Telfairia occidentalis*) มีน้ำหนักโมเลกุล 180 kDa ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 30 kDa ซึ่งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ T-lymphocyte ได้ (Allen, 1979) นอกจากนี้ยังมีเลคตินในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวส่วนใหญ่พบในกลุ่มธัญพืช ได้แก่ พืชในตระกูล Gramineae เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ ข้าวโอ๊ต ตัวอย่างเลคตินที่พบในพืชกลุ่มนี้คือเลคตินจากข้าวบาร์เลย์ และไรย์สกัดได้จากส่วนเอมบริโอ มีน้ำหนักโมเลกุล 36 kDa ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีน้ำหนักโมเลกุล 18 kDa (Allen and Neuberger, 1972) เป็นต้น

### การแบ่งกลุ่มของเลคตินในพืช

#### 1. การจัดกลุ่มตามโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของเลคติน

การจัดกลุ่มตามโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของเลคติน มีความสัมพันธ์กับจำนวนโปรตีนต่างชนิด (heterogeneous group of proteins) ที่เพิ่มขึ้นในยีน (Van Damme *et al.*, 1998) ได้แก่

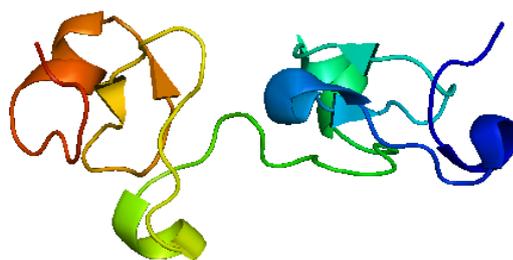
1.1 Legume lectins เป็นเลคตินที่มีโปรตีนชนิดเดียวกัน (homologous proteins) โครงสร้างสามมิติคล้ายกัน แต่มีความจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตต่างกัน (Rouge *et al.*, 1991; Sharon and Lis, 1990) เป็นเลคตินกลุ่มใหญ่และทำการศึกษามาก legume lectins พบมากในพืชตระกูล Leguminosae ส่วนใหญ่สกัดได้จากเมล็ด ลำต้นและเปลือก (Imberty *et al.*, 2000) โครงสร้างของ Legume lectins มีลักษณะที่เรียกว่า jelly-roll motif ประกอบด้วย  $\beta$ -sheet 6 สายด้านหลัง และ  $\beta$ -sheet 7 สายโค้งมาด้านหน้า มีบริเวณจับกับน้ำตาล (carbohydrate-binding sites) คล้ายกัน (Loris *et al.*, 1998) (ภาพที่ 2A) ประกอบด้วย 4 ลูป ได้แก่ ลูป A ลูป B ลูป C และ ลูป D (Sharma and Suroliya, 1997) และมีบริเวณจับกับไอออนโลหะ ( $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Mn}^{2+}$ ) 2 ตำแหน่ง (ภาพที่ 2B) บริเวณจับกับไอออนโลหะนี้มีความอนุรักษ์สูง (conserved) และมีความจำเป็นต่อการจับกับคาร์โบไฮเดรต (Lis and Sharon, 1998)



ภาพที่ 2 โครงสร้างสามมิติของ ConcanavalinA (PDB code: 1ONA) ซึ่งเป็นเลคตินในกลุ่ม Legume lectins

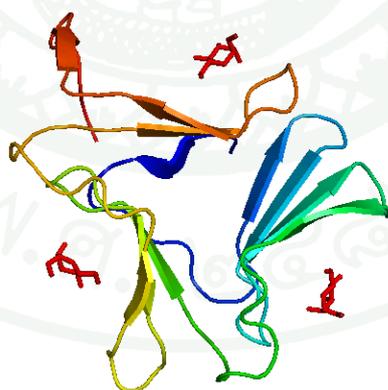
- A) ลักษณะ jelly-roll motif ประกอบด้วย  $\beta$ -sheet 6 สายด้านหลัง และ  $\beta$ -sheet 7 สายโค้งมาด้านหน้า
- B) ConcanavalinA จับกับน้ำตาลแมนโนส และไอออนโลหะ ( $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Mn}^{2+}$ ) ประกอบด้วย ลูป A สีแดง ลูป B สีม่วง ลูป C สีเหลือง และ ลูป D สีน้ำเงิน

1.2 Chitin-binding lectins เป็นโปรตีนเลคตินที่มีขนาดเล็ก ประกอบด้วย hevein domains อย่างน้อยหนึ่งโดเมน (Raikhel *et al.*, 1993) โดย hevein sequence domain ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 40 เรซิดิว และมีกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) และไกลซีน (glycine) อยู่มาก มีความสามารถจับกับไคติน (Peumans *et al.*, 1996) เช่น chitin-binding protein จากยางของต้นยางอินเดีย (rubber tree) มี hevein domains ประกอบด้วยกรดอะมิโน 43 เรซิดิว ตัวอย่างโครงสร้าง chitin-binding lectins เช่น เลคตินจากรากของ Pokeweed (*Phytolacca americana*) (ภาพที่ 3) (Hayashida *et al.*, 2003) chitin-binding lectins พบในพืชกลุ่ม Gramineae, Solanaceae, Phytolaccaceae, Urticaceae, Papavaracaceae และ Viscaceae (Peumans *et al.*, 1996; Raikhel *et al.*, 1993)



**ภาพที่ 3** โครงสร้างสามมิติของ Chitin-binding lectins จากรากของ Pokeweed (PDB code: 1ULM) ประกอบด้วย hevein domains สอง โดเมน

1.3 Monocot mannose-binding lectins เป็นเลคตินที่สามารถจับกับน้ำตาลแมนโนสและพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งแบ่งพืชที่พบเลคตินชนิดนี้ได้เป็น 7 กลุ่มย่อย ได้แก่ Alliaceae, Araceae, Amaryllidaceae, Bromeliaceae, Iridaceae, Liliaceae, และ Orchidaceae (Wright *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 1999). พบได้ในหลายส่วนของพืชแต่ไม่พบในเมล็ด โครงสร้างคริสตัลของ monocot mannose-binding lectins โครงสร้างแรกได้จากเลคตินของ snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) ที่จับอยู่กับน้ำตาลแมนโนส (Hester *et al.*, 1995) มีโครงสร้างเป็น  $\beta$ -barrel ที่ประกอบด้วย 3 โดเมน แต่ละโดเมนมี 4 antiparallel  $\beta$ -sheet (Barre *et al.*, 1996) และแต่ละโดเมนจะมี carbohydrate recognition domain (CRD1, CRD2 และ CRD3) ที่เป็น sequence homology (Van Damme and Peumans, 1991) จึงสามารถจับกับน้ำตาลแมนโนสได้ 3 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4)



**ภาพที่ 4** โครงสร้างสามมิติของ *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA)(PDB code: 1MSA) ซึ่งเป็นเลคตินในกลุ่ม monocot mannose-binding lectins มีโครงสร้างเป็น  $\beta$ -barrel ที่ประกอบด้วย 3 โดเมน แต่ละโดเมนมี 4 antiparallel  $\beta$ -sheet สามารถจับกับน้ำตาลแมนโนสได้ 3 ตำแหน่ง

1.4 Cucurbitaceae phloem lectins เป็นเลคตินที่พบได้เฉพาะในส่วนของท่าน้ำเลี้ยงอาหารของพืชตระกูล Cucurbitaceae มีลักษณะเป็น dimer (Subnis and Hart, 1978) มีความจำเพาะต่อ oligomers ของน้ำตาลอะเซททิลกลูโคซามีน (GlcNAc) (Wang *et al.*, 1994) ลำดับกรดอะมิโนของ Cucurbitaceae phloem lectins คล้ายกันมากกับลำดับกรดอะมิโนของเลคตินจากเมล็ดของ serpent cucumber (*Trichosanthes kirilowii*) (Falasca *et al.*, 1989) ลำดับกรดอะมิโนของเลคตินจากเมล็ดของ snake gourd (*Trichosanthes anguina*) (Komath and Swamy, 1998) และลำดับกรดอะมิโนของเลคตินจากเมล็ดของ *Trichosanthes cucumerina* (Padma *et al.*, 1999) ซึ่ง Cucurbitaceae phloem lectins ยังไม่มีโครงสร้างสามมิติ แต่มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเลคตินจาก snake gourd (Manoj *et al.*, 2001) และเลคตินจาก serpent cucumber (Li *et al.*, 2003) (ภาพที่ 5) โครงสร้างเหมือนกับเลคตินในกลุ่ม type2 RIPs

1.5 Jacalin related lectins เป็นเลคตินที่มีโครงสร้างแบบ  $\beta$ -prism ซึ่งมีความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรต 2 ชนิด คือ น้ำตาลกาแลคโตสและน้ำตาลแมนโนส (galactose-specific lectin และ mannose-specific lectins) ซึ่งกลุ่ม galactose-specific jacalin related-lectins ประกอบด้วย 2 สาย คือ สาย  $\alpha$  เป็นสายหลัก และสาย  $\beta$  เป็นสายรอง ซึ่งเกิดจากกระบวนการ complex co-translation และ post-translational ของ single precursor ส่วน mannose-specific jacalin related-lectins มีเพียงหนึ่งสายโพลีเปปไทด์ (Van Damme *et al.*, 1996) Jacalin related lectins พบในพืชตระกูล Moraceae เช่น เลคตินจาก jacalin, hirsute, artocarpin (Rao *et al.*, 2004) (ภาพที่ 6B) และ MPA (ภาพที่ 6A) (Lee *et al.*, 1998) พืชตระกูล Convolvulaceae เช่น เลคตินจาก conarva และ calsepa (ภาพที่ 6C) (Bourne *et al.*, 2004) พืชตระกูล Asteraceae เช่น เลคตินจาก heltuba (ภาพที่ 6D) พืชตระกูล Gramineae เช่น เลคตินจาก barley และ wheat lectins และพืชตระกูล MU.S.A.ceae เช่น เลคตินจาก banana lectin (Bourne *et al.*, 1999) ส่วนใหญ่พบในเมล็ดมากที่สุด เลคตินที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ jacalin จะเรียกว่า jacalin related lectins

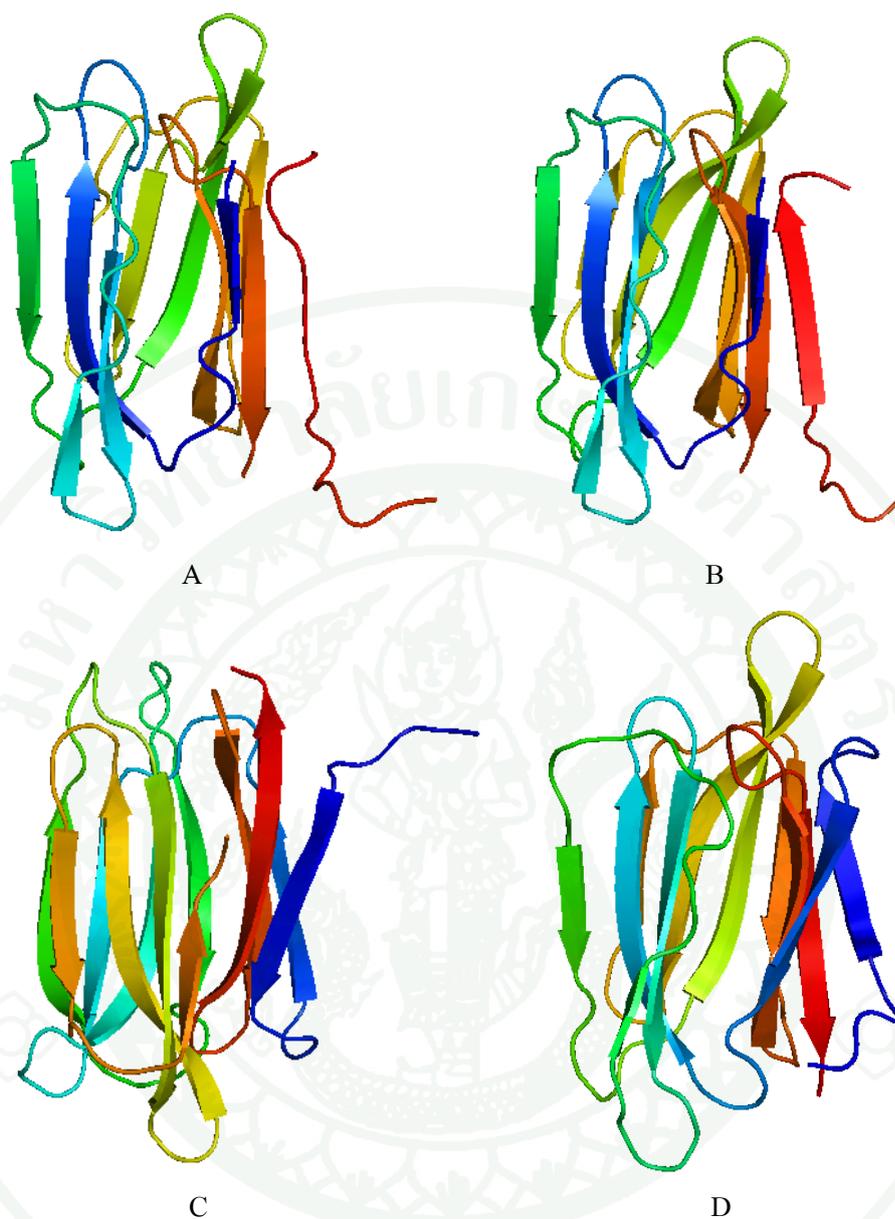
1.6 Amaranthin เป็นเลคตินกลุ่มเล็ก ที่พบในเมล็ดของพืชตระกูล Amaranthus เลคตินในกลุ่ม amaranthin มีลักษณะเป็น  $\beta$ -trefoil มีโครงสร้างเป็น homodimeric proteins ที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30-36 kDa มีความจำเพาะต่อ T-antigen (Gal $\beta$ 1, 3GalNAc) (Rinderle *et al.*, 1989) เช่น *Amaranthus caudatus* agglutinin (Transue *et al.*, 1997) (ภาพที่ 7) amaranthin ที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยนั้น หนึ่งหน่วยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจับกับคาร์โบไฮเดรต และอีกหน่วยทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้าง oligomer ของน้ำตาล (oligomerisation) (Transue *et al.*, 1997)

1.7 Type2 RIPs (Ribosome Inactivating Proteins) เป็น chimeric lectins ที่ประกอบด้วย PAG (Polynucleotide adenosine glycosidase) domain เรียกว่า A-chain (Endo *et al.*, 1987) เชื่อมต่อกับ galactose specific domain เรียกว่า B-chain (Lord *et al.*, 1994) A-chain เป็นส่วนที่แสดงความเป็นพิษ B-chain เป็นส่วนที่จับกับคาร์โบไฮเดรต Type2 RIPs เป็นเลคตินที่สามารถกระตุ้นไรโบโซมของเซลล์ยูคาริโอต (Barbieri *et al.*, 1993) โดยโดเมน A จะทำการตัดพันธะไกลโคซิดิกของอะดีโนซีนของ rRNA หน่วยใหญ่ (Peumans and Van Damme, 1995) ตัวอย่างเลคตินกลุ่มนี้ เช่น เลคติน ricin จาก *Ricinus communis* (Rutenber *et al.*, 1991) (ภาพที่ 8A) และเลคติน abrin จาก *Abrus precatorius* (Tahirov *et al.*, 1995) (ภาพที่ 8B) เลคตินในกลุ่มนี้มีโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโน การเร่งปฏิกิริยา ความเป็นพิษ และความสามารถในการจับกับคาร์โบไฮเดรตคล้ายกัน พบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น ในพืชตระกูล Euphorbiaceae, Fabaceae, Sambucaceae, Viscaceae, Ranunculaceae, Lauraceae, Passifloraceae, Iridaceae และ Liliaceae เป็นต้น พบทั้งในส่วนของเมล็ดและส่วนอื่นๆ ของพืช

1.8 Other lectins เป็นเลคตินที่ยังไม่สามารถจัดกลุ่มได้ เช่น non-RIP lectin จาก *Euphorbia* เป็นต้น (Van Damme, 1998)



ภาพที่ 5 โครงสร้างสามมิติของเลคตินจาก serpent cucumber (PDB code: 1GGP) มีลักษณะเป็นโดเมอร์ โครงสร้างเหมือนกับเลคตินในกลุ่ม type2 RIPs



ภาพที่ 6 โครงสร้างสามมิติของ Jacalin related lectins มีโครงสร้างแบบ  $\beta$ -prism แบ่งได้ 2 กลุ่มคือ galactose-specific lectin ประกอบด้วย 2 สายโพลีเปปไทด์ คือ สาย  $\alpha$  และสาย  $\beta$  ได้แก่

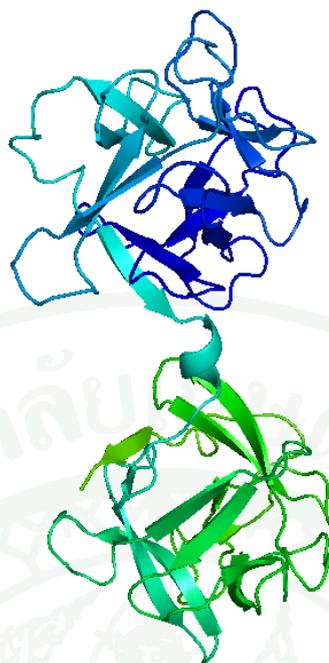
A) เลคตินจาก MPA (PDB code: 1JOT)

B) เลคตินจาก *Artocarpus hirsute* (PDB code: 1TOQ)

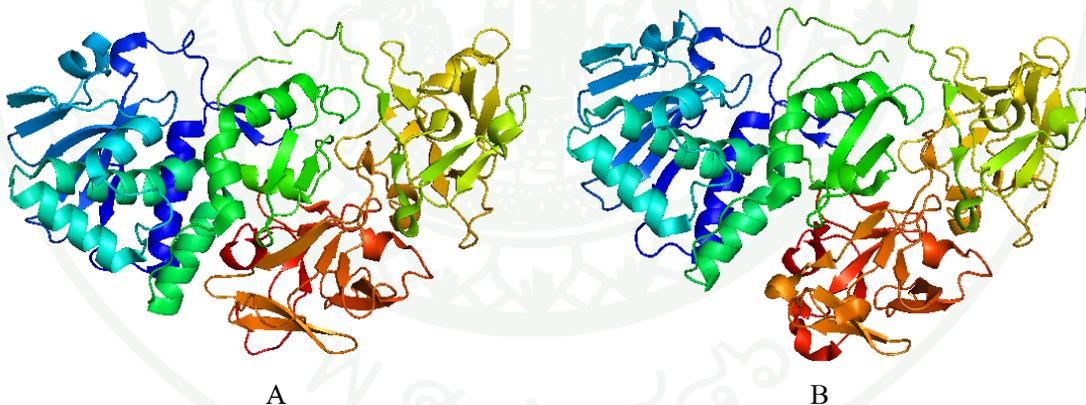
และ mannose-specific lectins มีหนึ่งสายโพลีเปปไทด์ ได้แก่

C) เลคตินจาก *Calystegia sepium* (PDB code: 1OUW)

D) เลคตินจาก *Helianthus tuberosus* (PDB code: 1C3N)



ภาพที่ 7 โครงสร้างสามมิติของ *Amaranthus caudatus* agglutinin (PDB code: 1JLX) มีลักษณะเป็น  $\beta$ -trefoil มีโครงสร้างเป็น homodimeric proteins



ภาพที่ 8 โครงสร้างสามมิติของเลคติน Type2 RIPs เป็น chimeric lectins ที่ประกอบด้วย PAG domain เชื่อมต่อกับ galactose specific domain

A) เลคติน ricin จาก *Ricinus communis* (PDB code: 2AAI)

B) เลคติน abrin จาก *Abrus precatorius* (PDB code: 1ABR)

## 2. การจัดกลุ่มตามความสามารถในการจับกับคาร์โบไฮเดรต

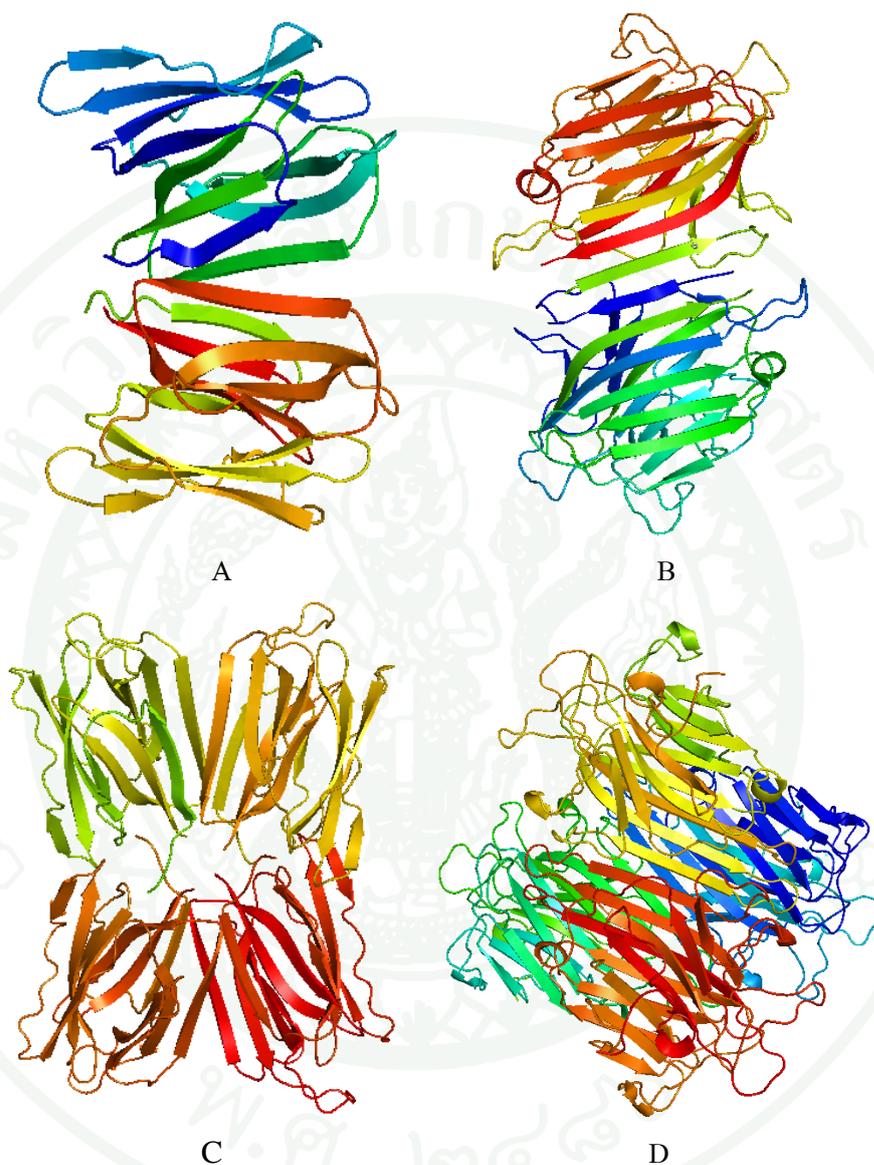
โดยปกติเลคตินจะมีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่ (Van Damme, 1998) ได้แก่

2.1 เลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลกลูโคส/แมนโนส (Glucose/ mannose-specific lectin) เลคตินกลุ่มนี้ต้องการ  $Mn^{2+}$  และ/หรือ  $Ca^{2+}$  ในการจับกับน้ำตาล พบในพืชตระกูล Leguminosea เช่น ขนุน ถั่ว (Goldstein and Poretz, 1986) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เลคตินที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ได้แก่ เลคตินจาก *M.U.S.A. paradisiaca* (banana lectin) แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 14-15 kDa (Singh *et al.*, 2005) (ภาพที่ 9A) เลคตินจาก *Vicia faba* มีขนาดประมาณ 47.5 kDa (Reeke and Becker, 1986) (ภาพที่ 9B) และเลคตินที่ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ได้แก่ เลคติน Artocarpin จากเมล็ดขนุน มีขนาด 65 kDa (Jeyaprakash *et al.*, 2004) (ภาพที่ 9C) เลคตินจาก *Canavalia ensiformis* แต่ละหน่วยย่อยมีขนาดประมาณ 30 kDa (Bouckaert *et al.*, 1999) (ภาพที่ 9D) เป็นต้น

2.2 เลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลฟิวโคส (Fucose-specific lectin) สกัดได้จากพืชสีเขียว เช่น เลคตินจาก *Asparagus pea (Lotus tetragonolobus)* พบ 3 ชนิด คือ เลคติน A, B และ C ซึ่งเลคติน A และ C ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีขนาดเท่ากันคือ 27.8 kDa ส่วนของเลคติน B ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีขนาดเท่ากันคือ 27 kDa (Bloch and Burger, 1974) (ภาพที่ 10) เลคตินจากเปลือกของ *Laburnum anagyroides* (Lutsik and Antoniuk) เลคตินจากรากข้าวโพด (*Zea mays L.*) (Wolfgang and Janet) เลคตินจากราบนเปลือกส้ม (orange peel fungus) มีน้ำหนักโมเลกุล 72 kDa ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีขนาดเท่ากันคือ 36 kDa (Kochibe *et al.*, 1980)

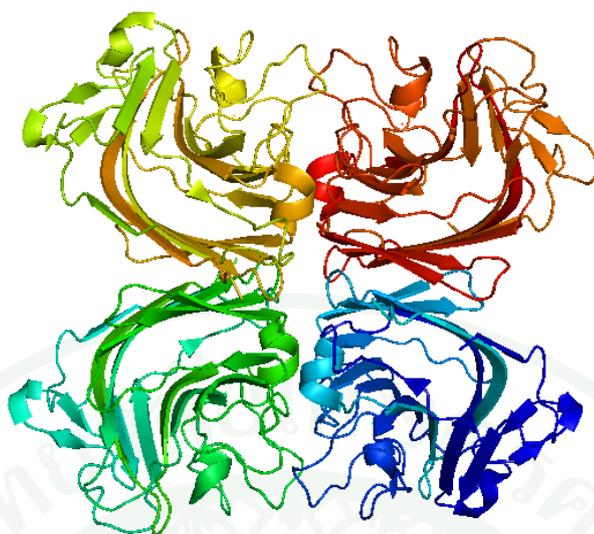
2.3 เลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส/เอ็น-อะเซทิลกาแลคโตซามีน (N-acetylgalactosamine) (Gal/ GalNAc-specific lectin) เช่น เลคตินจาก *Dolichos biflorus* มีน้ำหนักโมเลกุล 110 kDa ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย โดย 2 หน่วย มีขนาด 27 kDa และอีก 2 หน่วย มีขนาด 27.3 kDa (Schnell and Etzler, 1987) (ภาพที่ 11A) เลคตินจากถั่วเขียว (*Cicer arietinum L.*) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120 kDa ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีขนาด 30 kDa มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 7% (Qureshi *et al.*, 2005) และเลคตินจาก *Sambucus nigra* มีขนาด 150

kDa ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย โดย 2 หน่วย มีขนาด 36 kDa และอีก 2 หน่วย มีขนาด 38 kDa (Maveyraud *et al.*, 2009) (ภาพที่ 11B) เป็นต้น

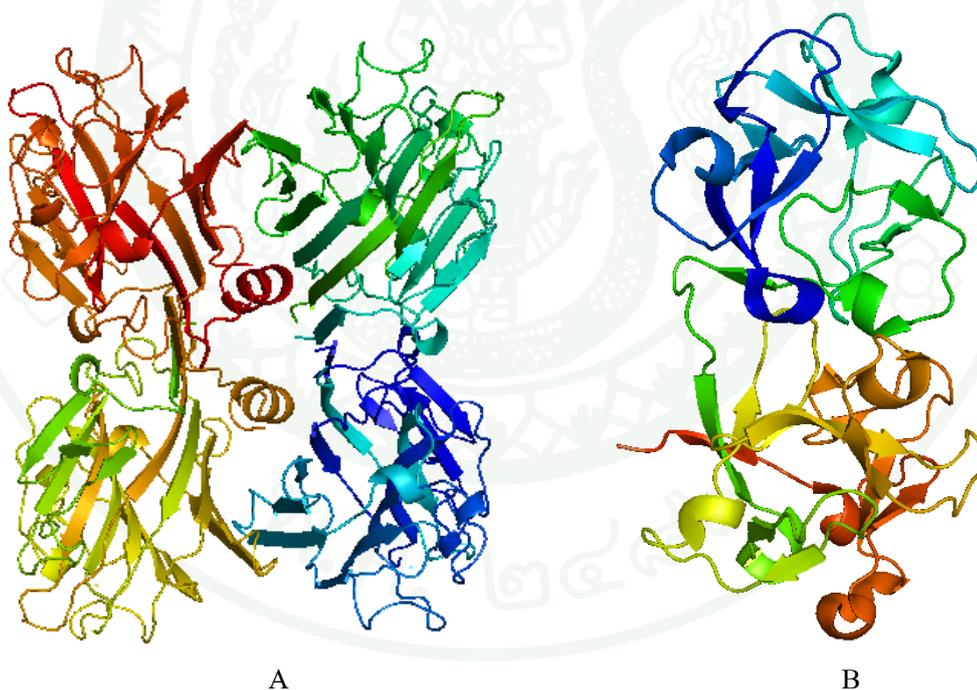


**ภาพที่ 9** โครงสร้างสามมิติของเลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลกลูโคส/แมนโนส เลคตินกลุ่มนี้ต้องการ  $Mn^{2+}$  และ/หรือ  $Ca^{2+}$  ในการจับกับน้ำตาล

- A) โครงสร้างของ Banana lectin จาก *MU.S.A. paradisiaca* (PDB code: 1X1V)
- B) โครงสร้างของเลคตินจาก *Vicia faba* (PDB code: 2B7Y)
- C) โครงสร้างของ Artocarpin (PDB code: 1VBO)
- D) โครงสร้างของเลคตินจาก *Canavalia ensiformis* (PDB code: 1QDO)



ภาพที่ 10 โครงสร้างสามมิติของเลคติน *Lotus tetragonolobus* lectin (LTA) ( PDB code: 2EIG)  
เป็นเลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลฟิวโคส



ภาพที่ 11 โครงสร้างสามมิติของเลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลกาแลกโตส/เอ็น-อะเซทิลกาแลกโตซามีน

A) เลคตินจากเมล็ดของ *Dolichos biflorus* (PDB code: 1LU1) ( Hamelryck *et al.*, 1999)

B) เลคตินจาก *Sambucus nigra* (PDB code: 3CA1)

2.4 เลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลเอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) (GlcNAc-specific lectin) พบในพืชตระกูล Gramineae เป็นส่วนใหญ่ เช่น ข้าว สาลี ข้าวบาร์เลย์ ไรย์และข้าว (Goldstein and Poretz, 1986) เลคตินจากไรย์และข้าวบาร์เลย์สกัดได้จากส่วนเอ็มบริโอ ตัวอย่างเลคตินกลุ่มนี้ เช่น เลคตินจาก *Ulex europaeus* มีขนาดประมาณ 110 kDa มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 4.2% (Loris *et al.*, 2000) (ภาพที่ 12) นอกจากนี้ยังพบเลคตินกลุ่มนี้ในเห็ด *Psathyrella velutina* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa เป็นโปรตีนหนึ่งหน่วย โครงสร้างเป็น  $\beta$ -sheet (Cioci *et al.*, 2006) เลคตินจากฐานดอก (carpophores) ของเห็ด *Polyporus squamosus* มีน้ำหนักโมเลกุล 28 kDa ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (Mo *et al.*, 2000)



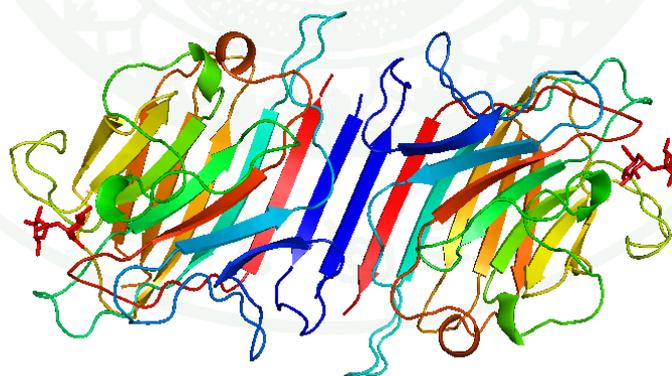
ภาพที่ 12 โครงสร้างสามมิติของเลคตินจาก *Ulex europaeus* (PDB code: 1QOO) เป็นเลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลเอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีน

2.5 เลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลแลคโตส (Lactose-specific lectin) เช่น เลคตินในพืชจำพวกกาฝาก (*Viscum album* L.) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีน้ำหนักโมเลกุล 60 kDa ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีขนาดต่างกัน คือ 29 และ 32 kDa (Olsnes *et al.*, 1982) เลคตินจาก *Ricinus communis* ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีขนาด 30 kDa (PDB code: 2AAI) (Rutenber *et al.*, 1991) เลคตินจากถั่วลิสง (peanut lectin) มีขนาดประมาณ 100 kDa ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (Banerjee *et al.*, 1996) (ภาพที่ 13) จากการศึกษาโครงสร้างคริสตัลของเลคตินในถั่วลิสง (peanut lectin) โดยปรับเปลี่ยนความเป็นกรด-เบส พบว่าเลคตินในถั่วลิสงสามารถจับกับน้ำตาลแลคโตสได้ในสภาพใกล้เคียงสภาวะธรรมชาติ (Natchiar *et al.*, 2004)



**ภาพที่ 13** โครงสร้างสามมิติของเลคตินจากถั่วลันเตา (PDB code: 2PEL) ที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลแล็กโตส

2.6 เลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลซูโครส (Sucrose-specific lectin) เช่น lentil lectin พบในพืช *Lens culinaris* มีน้ำหนักโมเลกุล 52 kDa จากโครงสร้างคริสตัลพบว่า lentil lectin 2 หน่วย จับกับน้ำตาลซูโครสหนึ่งโมเลกุล (Casset *et al.*, 1995) (ภาพที่ 14)



**ภาพที่ 14** โครงสร้างสามมิติของ lentil lectin (PDB code: 1LES) ที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลซูโครส โดย lentil lectin 2 หน่วย จับกับน้ำตาลซูโครสหนึ่งโมเลกุล

2.7 เลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลมอลโตส/ทรีฮาโลส (Maltose/Trehalose-specific lectin) เลคตินในกลุ่มนี้เกิดจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนจากโพรลีนไปเป็นเซอรินที่ตำแหน่ง 202 (P202S) ของ ConA-like lectin ซึ่ง ConA-like lectin พบในพืช *Canavalia maritima* (ConM) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 kDa มีโครงสร้างเป็น  $\beta$ -sheet (Delatorre *et al.*, 2006) (ภาพที่15)



ภาพที่ 15 โครงสร้างสามมิติของ ConA-like lectin (ConM) (PDB code: 2CYF) ที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลทรีฮาโลส

2.8 เลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocot mannose binding lectin) เช่น *Scilla campanulata* agglutinin (SCAman) เป็นเลคตินที่ได้จากส่วนหัว มี 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 kDa (Wright *et al.*, 1999) *Narcissus pseudonarcissus* lectin (NPL) ได้จากส่วนหัวของ daffodils เป็นเลคตินที่มีหนึ่งหน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 12 kDa (Van Damme *et al.*, 1988) เลคตินที่ได้จากหัวกระเทียม *Allium sativum* agglutinin (ASA) มี 2 ชนิด คือ ASA I มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 kDa และ ASAIII มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 48 kDa (Kanti Dam *et al.*, 1998) เลคตินที่ได้จาก snowdrop (*Galanthus nivalis*) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 kDa ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีขนาด 13 kDa (Van Damme *et al.*, 1987) มีโครงสร้างเป็น  $\beta$ -sheet (12-stranded  $\beta$ -barrel) (Hester *et al.*, 1995) เป็นต้น

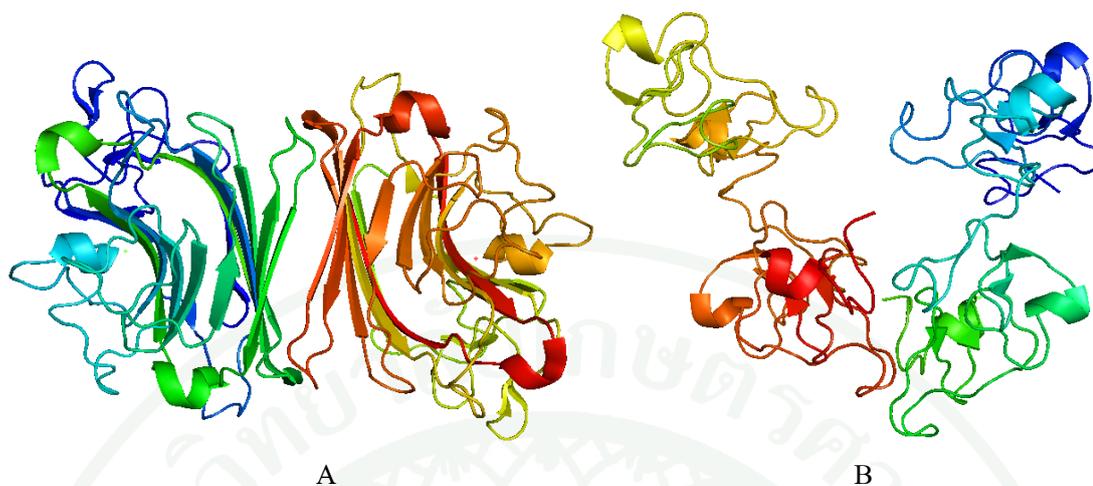
2.9 เลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับกรดเซียลิก (Sialic acid-specific lectin) ส่วนใหญ่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrates) เช่น แมงดาทะเล กุ้งมังกร เพรียง เป็นต้น แต่ในพืชพบเพียงไม่กี่ชนิด (ตารางที่ 2) เช่น เลคตินจากเมล็ดของ *Phaseolus coccineus* L. มีลักษณะเป็นไดเมอร์ที่จับกันเอง (homodimer) ของหน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากัน ประมาณ 29.8 kDa มีความเป็น

พืชต่อเซลล์ ต้านทานเชื้อราและมีแนวโน้มต้านทานเนื้องอก (Chen *et al.*, 2009) เลกตินจากเมล็ดของ *Maackia amurensis* มี 2 ชนิด คือ *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) และ *Maackia amurensis* leukoagglutinin (MAL) (Imberty *et al.*, 2000) (ภาพที่ 16A) MAH มีน้ำหนักโมเลกุล 130 kDa จากการทำให้บริสุทธิ์โดย gel filtration ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีขนาด 33 kDa (Kawaguchi *et al.*, 1974) เลกตินจาก *Triticum vulgare* ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย มีขนาด 35 kDa (ภาพที่ 16B) (Wright, 1990) เลกตินในใบหอมอนสายพันธุ์หอมอนน้อยมีน้ำหนักโมเลกุล 51 kDa ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยมีน้ำหนักโมเลกุล 16.5 kDa (Ratanapo *et al.*, 1998) เป็นต้น

ตารางที่ 2 โปรตีนเลกตินที่จำเพาะกับกรดเซียลิกในพืชชนิดต่างๆ

Species	Lectin	Specificity/ligand	Reference
<i>Maackia amurensis</i>	MAL	Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcNAc	Knibbs <i>et al.</i> , 1991
<i>Maackia amurensis</i>	MAH	Neu5Aca2,3Galβ1,3[Neu5Aca2,6]GalNAc	Wilson <i>et al.</i> , 1981
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	Neu5Aca2,6Gal	Shibuya <i>et al.</i> , 1987
<i>Sambucus canadensis</i>	SCA	Neu5Aca2,6Gal	Shibuya <i>et al.</i> , 1989
<i>Sambucus sieboldiana</i>	SSA	Neu5Aca2,6Gal	Shibuya <i>et al.</i> , 1989
<i>Trichosanthes japonica</i>	TJA	Neu5Aca2,6Galβ1,4GlcNAc	Yamashita <i>et al.</i> , 1992
<i>Viscum album</i>	ML-I	Neu5Aca2,6Galβ1,4GlcNAc	Muthing <i>et al.</i> , 2004
<i>Saraca indica</i>	saracin	Neu5Aca2,6/3Galβ1,4GlcNAc	Ray and Chatterjee, 1995
<i>Artocarpus integrifolia</i>	jacalin	Gal and Man > Neu5Ac	Bourne <i>et al.</i> , 2002
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	internal GlcNAc > Neu5Ac	Gallagher <i>et al.</i> , 1985
<i>Morus rotundiloba</i> <i>Koidz.</i>	MLL	Neu5Gc	Ratanapo <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactuca scariola</i>	PLA	Sia	Yen <i>et al.</i> , 1980
<i>Phaseolus coccineus</i>	PCL	Sia	Chen <i>et al.</i> , 2008

ที่มา: Lehmann *et al.* (2006)



ภาพที่ 16 โครงสร้างสามมิติของเลคตินที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับกรดเซียลิก

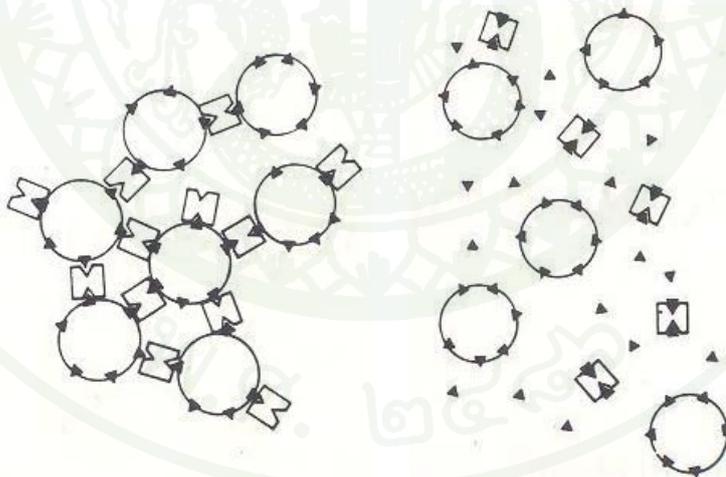
- A) *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL) (PDB code: 1DBN)  
 B) เลคตินจาก *Triticum vulgaris* (PDB code: 1WGC)

โปรตีนเลคตินเมื่อแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนแล้วสามารถแบ่งได้ทั้งหมด 8 กลุ่ม และแบ่งกลุ่มตามความจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตสามารถแบ่งได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม แต่เมื่อสังเกตเลคตินในกลุ่ม legume พบว่าสามารถจับกับน้ำตาลได้หลายชนิด โดยมีโครงสร้างสามมิติที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งมีโครงสร้างสามมิติแบบ canonical  $\beta$ -sandwich หรือ jelly-roll motif ลักษณะที่เลคตินกลุ่มนี้สามารถจับกับน้ำตาลได้หลายชนิดนี้ขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียงไม่กี่ตัวในบริเวณที่จับกับน้ำตาล และความยาวของบริเวณลูป (loop) ที่เกี่ยวข้องกับการจับกับน้ำตาล ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้มีผลอย่างมากต่อการจับกับน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยที่ไม่มีผลต่อ โครงสร้างสามมิติโดยรวม (Young and Oomen, 1992); (Sharma and Surolia, 1997) ซึ่งเลคตินในกลุ่ม jacalin-related lectin (JRL) ก็มีลักษณะเช่นเดียวกัน เมื่อแรกค้นพบ JRL มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันทางโครงสร้างสามมิติแบบ  $\beta$ -prism มีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส ที-แอนติเจน (T-antigen) และน้ำตาลแมนโนส (Sankaranarayanan *et al.*, 1996) เลคตินกลุ่ม JRL ที่สกัดได้มักจะมีความจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส มากกว่าน้ำตาลกาแลคโตสและที-แอนติเจน กลุ่ม JRL ที่สามารถจับกับน้ำตาลกาแลคโตส ได้มักจะสามารถจับกับน้ำตาลอีกหลายชนิดได้เช่นเดียวกัน

## หน้าที่เลคตินในพืช

1. จำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate specificity) การจับของเลคตินกับโมโนแซคคาไรด์ เป็นการจับแบบไม่แน่น (low binding affinity) ในขณะที่การจับกับโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น น้ำตาลกาแลคโตส และ N-acetylgalactosamine จับได้แน่น (Wood, 1995)

2. ตกตะกอนเซลล์ (Cell agglutination) เลคตินแต่ละโมเลกุลจะประกอบด้วยบริเวณจับกับคาร์โบไฮเดรตที่ต่างกัน ซึ่งสามารถจับกับเซลล์ที่มีน้ำตาลบนผิวเซลล์ เชื่อมโยง (crosslinking) ทำให้เซลล์เกิดการรวมกลุ่มและตกตะกอน (ภาพที่ 17) การที่เลคตินสามารถทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มได้ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือ ปัจจัยภายใน คือ คุณสมบัติภายในโมเลกุลของเลคติน เช่น น้ำหนักโมเลกุล จำนวนบริเวณที่สามารถจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต (number of carbohydrate binding sites) คุณสมบัติบริเวณผิวเซลล์ (cell surface properties) จำนวนและความสามารถของบริเวณจับของเลคติน (number and accessibility of lectin to binding sites) (Wood, 1995) และปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ ชนิดของเซลล์และชนิดของเลคตินที่ใช้ ความเข้มข้นของเซลล์ เป็นต้น



ภาพที่ 17 เลคตินจับกับน้ำตาลบนผิวเซลล์ ทำให้เกิดการรวมกลุ่มตกตะกอนของเซลล์ และโมเลกุลของน้ำตาลหรือสารอื่นสามารถยับยั้งการรวมกลุ่มตกตะกอนของเซลล์

ที่มา: Sharon and Lis (1989)

3. ต้านทานไวรัส (Antiviral activity) เลคตินจาก Liliaceae, Amyryllidaceae, และ Orchidaceae ซึ่งป็นเลคตินในกลุ่ม monocot mannose-binding lectins สามารถต้านทาน retroviral ได้ (Wood *et al.*, 1999) และ *Pleurotus ostreatus* lectin (POL) สามารถยับยั้ง HIV-1 reverse transcriptase (Wang *et al.*, 2000)

4. ต้านทานแบคทีเรีย (Antibacterial activity) เลคตินในพืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อช่วยในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ (Peumans and Van Damme, 1995) และมีงานวิจัยที่สนับสนุน เช่น เลคตินจากมันฝรั่งช่วยในการต้านทาน *Pseudomonas solanacearum* (Gozia *et al.*, 1993) เลคตินจากใบหม่อนช่วยต้านทาน *Pseudomonas syringae* pv *mori* (Ratanapo *et al.*, 1998) เป็นต้น

5. ต้านทานเห็ดรา (Antifungal activity) มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับโปรตีนที่ต้านทานเห็ดรา แต่ก็พบว่ามีเลคตินจำนวนน้อยที่สามารถต้านทานเห็ดราได้ เช่น เลคตินจากมันฝรั่ง (Gozia *et al.*, 1993) เลคตินจากเมล็ดของ *Amaranthus caudatus* (Verheyden *et al.*, 1995) เลคตินจากเมล็ดธัญพืช (wheat germ) (Ciopraga *et al.*, 1999) และเลคตินจากเมล็ดของ *Phaseolus vulgaris* เป็นต้น ส่วนใหญ่เลคตินที่สามารถต้านทานเห็ดราได้นั้น เป็นเลคตินในกลุ่ม class I chitinase (Collinge *et al.*, 1993)

6. กระตุ้นการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาว (Mitogenic stimulation of lymphocytes) ในการศึกษาเลคตินจากเห็ดในการควบคุมการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมคโครฟาจ (macrophages) และลิมโฟไซท์ (lymphocyte) (Ngai and Ng, 2004) พบว่า T-cell ถูกกระตุ้นและมีการจับกันของลิแกนด์กับ T-cell receptors เพิ่มขึ้นอย่างมาก แล้วไปกระตุ้นสัญญาณภายในเซลล์ทำให้เกิดเซลล์ลิมโฟไซท์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (proliferation) (Imai, 1998; Ho *et al.*, 2004)

7. ต้านทานการกระจายตัวของเซลล์ (Antiproliferative activity) จากการศึกษาเลคตินในเห็ดพบว่าเลคตินมีแนวโน้มสามารถหยุดการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งได้ (Kenyon, 2001) เช่น เลคตินจาก *Agaricus bisporus* สามารถลดการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ (human colon cancer cell lines HT29) และมะเร็งเต้านมได้ (breast cancer cell lines MCF-7) (Wang *et al.*, 1998b; Yu *et al.*, 1999) เลคตินจาก *Volvariella volvacea* สามารถต่อต้านเซลล์มะเร็งชนิด Sarcoma S-180 ได้ (She *et al.*, 1998) เป็นต้น

8. ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) เลคตินหลายชนิด เช่น Con A เลคตินจากข้าวสาลี เลคตินจาก *Phaseolus vulgaris* (PHA) และเลคตินจาก *Robinia pseudoacacia* มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีความเป็นพิษน้อยกว่าเลคตินโรซินจาก castor bean และอะบรินจาก jequirity seed (Stirp *et al.*, 1978) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เลคตินจาก *Grifola frondosa* เป็นพิษ (cytotoxic) ต่อ HeLa cells ที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 25 µg/ml ถึงจะชักนำให้เซลล์ตายได้ (Guillot and Kanska, 1997) เป็นต้น

### หม่อน

หม่อน (mulberry : *Morus* spp.) สามารถเจริญได้ดังนี้ (Maji and Qadri, 1999)

Phylum Phaenerogamme

Subphylum Angiosperme

Class Dicotyledoneae

Subclass Apetalae

Family Moraceae

Genus *Morus*

หม่อน เป็นไม้ยืนต้นประเภทพุ่ม ลำต้นมีสีเขียวแก่หรือสีน้ำตาล มีตาข้างมากมาย ใบมีสีเขียวเข้ม มีรูปร่างหลายแบบ หลายขนาด อาจเป็นแฉกหรือไม่เป็นแฉก หรือมีทั้งใบแฉกและใบไม่แฉกอยู่ต้นเดียวกัน ดอกตัวเมียเมื่อได้รับการผสมแล้วจะเปลี่ยนเป็นผล ซึ่งมีลักษณะเป็นผลรวม (aggregate fruit) หม่อนเป็นพืชกึ่งร้อน (subtropical) เป็นพืชอาหารตามธรรมชาติชนิดเดียวของหนอนไหม (*Bombyx mori*) และเป็นหัวใจสำคัญของการประกอบอาชีพการปลูกหม่อนเลี้ยงไหม ปริมาณผลผลิตและคุณภาพรังไหมจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับคุณภาพใบหม่อน หม่อนเป็นพืชที่มีอายุยืน 80-100 ปี ถ้าไม่ได้รับความกระทบกระเทือนจากการเก็บเกี่ยวหรือโรค แมลงศัตรู สามารถเจริญได้ดีตั้งแต่เขตอบอุ่นถึงเขตร้อน หม่อนที่เกิดในเขตอากาศหนาว จะหยุดพักตัวไม่เจริญเติบโต นับตั้งแต่ปลายฤดูใบไม้ร่วงจนถึงฤดูใบไม้ผลิ

## การแบ่งประเภทของหม่อนในประเทศไทย

สามารถแบ่งประเภทของหม่อนได้เป็น 5 ประเภท (สถาบันวิจัยหม่อนไหม, 2536) คือ

1. หม่อนพันธุ์ผสม ได้แก่ บุรีรัมย์ 4/2 (BR 4/2) บุรีรัมย์ 51 (BR 51) บุรีรัมย์ 60 (BR 60) นครราชสีมา 60 (NM 60) ศรีสะเกษ (SK 33) P33 PMN 5 เป็นต้น
2. หม่อนพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ ไบมน (BM), หางปลาหลด (HA), จระเข้ (JK), จากนครราชสีมา (CN), จากอุบล (JU), แก้วชนบท (KC), จี่โก้ (KK), คุณไพ (KP), แก้วสะตึก (KT), หม่อนแดง (MD), หม่อนสา (MS), หม่อนน้อย (MN), ฝั่่นนครราชสีมา (PN), ฝั่่นอุบล (PU), ส้ม, ส้มใหญ่ (SY), ตาก (TA), ตาแดง (TD), ตาดำ (TU) ใหญ่บุรีรัมย์ (YB) เป็นต้น
3. หม่อนป่า ได้แก่ หัวขลุ่ย (HPL) คอนสาร (KS) ระมิง 1 (RM1) ระมิง 2 (RM2) เป็นต้น
4. หม่อนกินผล ได้แก่ บ้านหลวง (BL) โคราชกินผล (KKP) ปางโสัง (PH) ผลใหญ่ว่าว เป็นต้น
5. หม่อนสายพันธุ์ต่างประเทศ ได้แก่ *Morus acidosa* (AC) *Morus alba* (AL) *Morus australis* (AU) *Morus nigra* (NI) Kenmochi (KM) Kenva-2 (KV) Lunjiew (LJ) เป็นต้น

### หม่อนน้อย

หม่อนน้อย ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Morus rotunbiloba* Koidz. เป็นหม่อนเพศผู้ ชื่อสามัญ คือ mulberry อยู่ในวงศ์ Moraceae หม่อนน้อยเป็นหม่อนสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย มีลักษณะใบใหญ่ค่อนข้างบาง เรียบเป็นมัน ไม่มีขน และไม่มีแฉก ใบมีลักษณะคล้ายใบโพธิ์ ปลายใบแหลมขอบหยักถี่ (ภาพที่ 18) การศึกษาเกี่ยวกับหม่อนมีมากมายเพื่อนำไปพัฒนาให้หม่อนมีคุณภาพที่ดี เนื่องจากหม่อนเป็นอาหารตามธรรมชาติชนิดเดียวของหนอนไหม และที่ศึกษาในหม่อนสายพันธุ์หม่อนน้อย เนื่องจากเป็นหม่อนสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย



ภาพที่ 18 หม่อนสายพันธุ์หม่อนน้อย

ที่มา: แปลงหม่อน ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

### เลคตินในหม่อน

#### 1. เลคตินในเมล็ดหม่อน

การศึกษาเลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสจากเมล็ดหม่อน (*M. alba* L.) เมล็ดหม่อนที่สกัดแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย affinity chromatography (ConA Sepharose) พบว่าเลคตินที่ได้มีหนึ่งหน่วย (monomer) ขนาด 22 kDa ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 28.57% สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มตกตะกอนได้และยังเป็นพิษต่อเซลล์กึ่งด้วย (Absar *et al.*, 2005)

#### 2. เลคตินในเปลือกหม่อน

การศึกษาดูตรวจสอบกิจกรรมและความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตของเลคติน JRL ในกลุ่มที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส (mannose-specific jacalin-related lectin) และกลุ่มที่จำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส (galactose-specific jacalin-related lectin) จากเปลือกของ *M. nigra* (Rouge *et al.*, 2003) พบว่าเลคตินทั้งสองกลุ่มจำเพาะต่อน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส (polyspecific lectins) และเมื่อศึกษาควบคู่กับ JRL ในกลุ่มที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสตัวอื่น ก็พบว่าเลคตินกลุ่มที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสมีความจำเพาะทั้งต่อน้ำตาลแมนโนสและกลูโคส

การศึกษาโครงสร้างของ jacalin-related lectin MornigaM และ MornigaM-mannose complex จากเปลือกของ *M. nigra* ที่จับอยู่กับน้ำตาลแมนโนส พบว่ามีโครงสร้างเป็น  $\beta$ -prism ซึ่งเหมือนกับ JRL ตัวอื่น มีขนาด 1.8 และ 2.0 อังสตรอม โปรตีนทั้ง 2 แบบ ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (tetrameric structure) และสามารถจับกับน้ำตาลแมนโนสได้อย่างรวดเร็ว (Rabijns *et al.*, 2005)

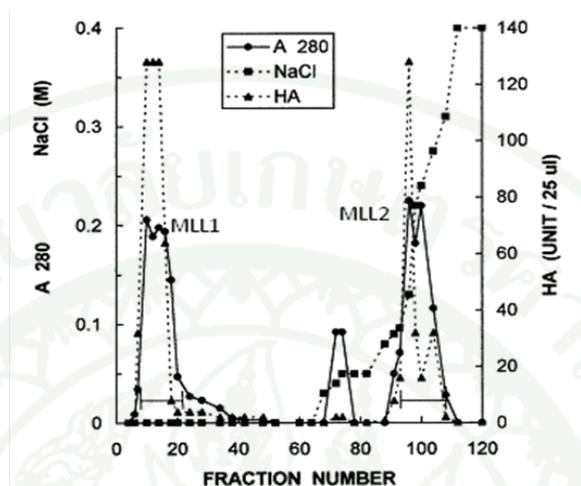
### 3. เลคตินในใบหม่อน

#### เลคตินในใบหม่อน สายพันธุ์หม่อนน้อย

การศึกษายีนของเลคตินในใบหม่อน ซึ่งค้นพบเป็นครั้งแรกในห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Ratanapo *et al.*, 1998) ได้ทำการศึกษาโปรตีนโดยทำการแยกเลคตินจากใบหม่อนพันธุ์พื้นเมือง สายพันธุ์หม่อนน้อย (*M. rotundiloba* Koidz.) ได้ 2 ชนิด คือ MLL 1 และ MLL 2 (ภาพที่ 19) พบว่าเลคตินทั้ง 2 ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อกรดเซียลิก โดย MLL1 และ MLL2 มีน้ำหนักโมเลกุลในธรรมชาติ 51 kDa แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 16.5 kDa ต่อมาได้ทำการศึกษาสมบัติของเลคตินทั้ง 2 ชนิด ต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv *mori* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในหม่อน จากการศึกษาพบว่า มีเฉพาะ MLL1 ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนของ *P. syringae* pv *mori* ได้ ส่วน MLL2 ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนของ *P. syringae* pv *mori* ได้ (Ratanapo *et al.*, 2001) แต่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลด์โปรติเอส (Alkaline Protease) ในทางเดินอาหารของหนอนไหม อันอาจส่งผลให้หนอนไหมโตช้าและสร้างเส้นไหมลดลง (Ratanapo *et al.*, 2005)

การศึกษาคูณสมบัติของ MLL1 ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนของ *P. syringae* pv *mori* ทำให้มีการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MLL1 ด้วยการทำ RT-PCR และ RACE ได้ 895 นิวคลีโอไทด์ มีส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ (open reading frame) 648 นิวคลีโอไทด์ ให้กรดอะมิโน 216 เรซิดิว (Kankamol, 2003) จากนั้นจึงมีการโคลนและการแสดงออกของ MLL1 ในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่ง MLL1 ให้กรดอะมิโน 216 เรซิดิว คำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 25 kDa แต่โปรตีนที่ได้จากการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรียนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 kDa และไม่สามารถทำงานได้ (Getsang, 2007) จากการศึกษาความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินจากใบหม่อน MLL ด้วยการจับกับน้ำตาล เช่น น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลกาแลคโตส N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine,

N-glycolylneuraminic acid และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ในการยับยั้งการจับกลุ่มตตะคอนของเม็ดเลือดแดงของแกะ พบว่าเลคตินจากไบหม่อน MLL มีความจำเพาะต่อ N-glycolylneuraminic acid แต่ยังสามารถจับกับน้ำตาลอื่นๆ ได้เช่นกัน (ตารางที่ 3) (Ratanapo *et al.*, 1998)



ภาพที่ 19 การทำให้เลคตินในไบหม่อนบริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sephacel column

ที่มา: Ratanapo *et al.* (1998)

ตารางที่ 3 การยับยั้งการจับกลุ่มตตะคอนของเม็ดเลือดแดงของแกะ โดยเลคตินจากไบหม่อน

Purified lectin from	Sugar (mM)				Glycoprotein (mg/ml)		
	NeuGc	GalNAc	Gal	Lactose	BSM	Fetuin	$\alpha_1$ -acid glycoprotein
MLL1	0.78	100	100	-	0.39	3.125	-
MLL2	1.56	50	100	50	3.125	6.25	0.0038

NeuAc, Glc, Man, Glucosamine, GluNAc และ ManNAc ไม่ยับยั้งการจับกลุ่มตตะคอนของเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 100 mM Thyroglobulin ไม่ยับยั้งการจับกลุ่มตตะคอนของเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml

ที่มา: Ratanapo *et al.* (1998)

นอกจากนี้ Sahasrabudde และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาเลคตินในกลุ่ม JRL จาก *Artocarpus integrifolia* เพื่อเปรียบเทียบระหว่างเลคตินที่สกัดได้จากพืชและแสดงออกในแบคทีเรีย พบว่าเลคตินที่แสดงออกในแบคทีเรีย ความจำเพาะต่อน้ำตาลน้อยกว่าเลคตินที่สกัดได้จากพืช โดยตรง ซึ่งการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าไกลโคซิเลชันในเลคตินอาจมีผลต่อความจำเพาะต่อน้ำตาลใน JRL บางตัว (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4** การเปรียบเทียบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินระหว่างเลคตินที่สกัดได้จากพืช และเลคตินที่แสดงออกในแบคทีเรีย

S number	Sugar	Association constants ( $K_a$ )	
		N-Jac	R-Jac
1	Galactose	$1.20 \times 10^3 (\pm 0.64 \times 10^2)$	NS
2	Me- $\alpha$ -Gal	$1.58 \times 10^4 (\pm 0.31 \times 10^3)$	$2.48 \times 10^2 (\pm 0.24 \times 10^2)$
3	GalNAc	$1.90 \times 10^3 (\pm 0.95 \times 10^2)$	NS
4	Me- $\alpha$ -GalNAc	$9.30 \times 10^4 (\pm 0.18 \times 10^4)$	$2.51 \times 10^2 (\pm 0.12 \times 10^2)$
5	Gal $\beta$ (1-3)GalNAc	$4.00 \times 10^4 (\pm 0.16 \times 10^4)$	NS
6	Gal $\beta$ (1-3)GalNAc $\alpha$ Me	$4.00 \times 10^2 (\pm 0.24 \times 10^5)$	$5.37 \times 10^2 (\pm 0.21 \times 10^2)$
7	Me- $\beta$ -Galactose	$2.00 \times 10^5 (\pm 0.05 \times 10^2)$	NB
8	Mannose	NB	NB
9	Me- $\alpha$ -Mannose	NB	NB
10	Melibiose	$6.25 \times 10^3$	$0.422 \times 10^2$

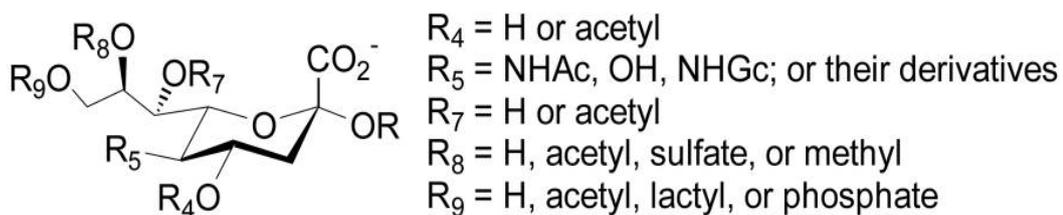
N-Jac คือ native Jacalin, R-Jac คือ recombinant Jacalin

NB คือ not binding, NS คือ not significant

ที่มา: Sahasrabudde *et al.* (2004)

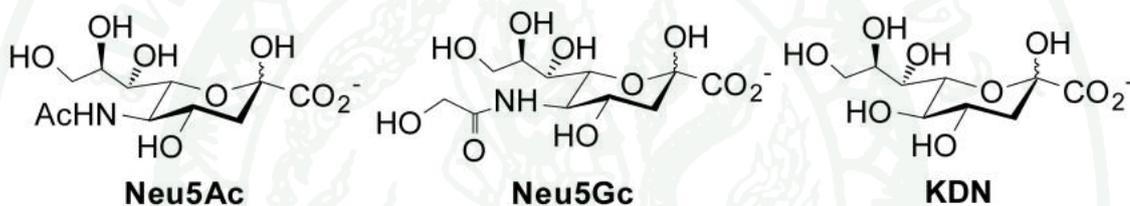
## ความจำเพาะต่อกรดเซียลิกของเลคติน

กรดเซียลิก (Sialic acids) เป็นกลุ่มของน้ำตาลที่ประกอบด้วยคาร์บอน 9 อะตอม (nine-carbon  $\alpha$ -keto acids) พบที่ปลายของสายโอลิโกแซคคาไรด์ที่เชื่อมต่อกับน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (ตำแหน่ง  $\alpha$ 2,3,  $\alpha$ 2,6 หรือ  $\alpha$ 2,8) บนไกลโคโปรตีน ไกลโคลิพิด บนเซลล์ที่หลากหลาย แต่เป็นน้ำตาลที่ไม่พบในพืช กรดเซียลิกในธรรมชาติมีโครงสร้างที่หลากหลายมากกว่า 50 โครงสร้าง จัดเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ 5-*N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), 5-*N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) และ deaminoneuraminic acids (KDN) (ภาพที่ 20) ซึ่งจะเห็นว่าโครงสร้างของกรดเซียลิกที่มีมากมายนั้นเกิดจากการเปลี่ยนหมู่ต่างๆ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (C-5) และการปรับเปลี่ยนตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4, 7, 8 และ 9 (C-4, C-7, C-8 และ C-9) (Lehmann *et al.*, 2006) โครงสร้างที่หลากหลายของกรดเซียลิกนั้นเป็นผลเนื่องจากบทบาทหน้าที่ที่หลากหลาย คุณสมบัติเฉพาะทางเคมี เช่น ประจุ (charge) และขนาด กรดเซียลิกสามารถจดจำเซลล์ต่างๆ ได้โดยตรง เช่น จุลินทรีย์ ไวรัส ฮอว์ม สารพิษ หรือจดจำเซลล์ต่อเซลล์ (cell-cell communication) (ภาพที่ 21) และนอกจากนี้กรดเซียลิกยังสามารถเป็นตัวกลางในกระบวนการจดจำเซลล์อื่นๆ ด้วย (Kelm and Schauer, 1997) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของกรดเซียลิกด้วยกระบวนการ *O*-acetylation, *O*-lactylation, *O*-sulfation, และ lactonization ก็จะทำให้การเกิด glycoconjugates กับเซลล์เปลี่ยนไป (Lewis *et al.*, 2004) กรดเซียลิกกลุ่ม Neu5Ac และ Neu5Gc เป็นกรดเซียลิกที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป แต่ไม่พบ Neu5Gc ในเซลล์ปกติของคน แต่จะพบ Neu5Gc ที่ปลายของ glycoconjugates บนเซลล์มะเร็งของคน เลคตินที่จำเพาะกับกรดเซียลิกพบได้ทั้งใน vertebrates, arthropods, mollusks, protozoa, virus, bacteria และพืช เลคตินบางตัวจากยังสามารถใช้เป็น biological marker หรือ ใช้เป็น medical probes ในการตรวจสอบน้ำตาลบางชนิดที่อยู่ปลายของ glycoconjugates บนพื้นผิวเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดและเซลล์มะเร็งได้



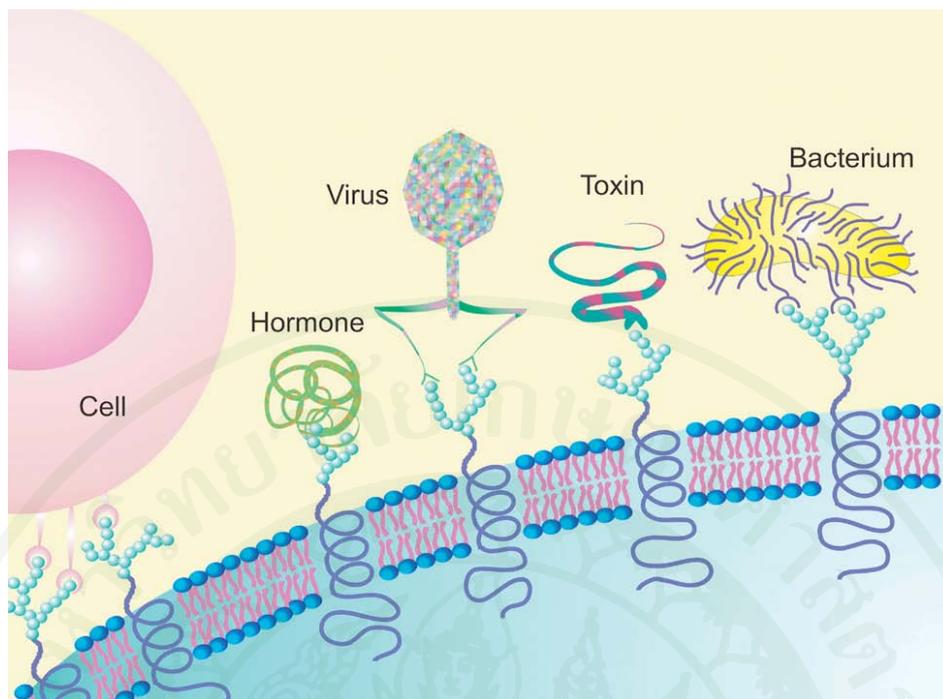
ภาพที่ 20 โครงสร้างโดยทั่วไปของกรดเซียลิก สามารถทำให้เกิดโครงสร้างที่ต่างกันมากมาย จากการเปลี่ยนหมู่ต่างๆ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และการปรับเปลี่ยนตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล(-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4, 7, 8 และ 9

ที่มา: Yu *et al.* (2006)



ภาพที่ 21 โครงสร้างของกรดเซียลิกแบ่งได้ 3 กลุ่ม โดยเปลี่ยนหมู่ NHAc, NHGc และ OH ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ได้กรดเซียลิกกลุ่มคือ Neu5Ac, Neu5Gc และ KDN

ที่มา: Yu *et al.* (2006)



ภาพที่ 22 กรดเซียลิกพบที่ปลายของสายโพลิโกแซคคาร์ไรด์บนไกลโคโปรตีน ไกลโคลิพิด กรดเซียลิกสามารถจดจำเซลล์ต่างๆ ได้โดยตรง จากภาพทางซ้ายมือคือ cell-cell communication ในหลายๆอวัยวะ ถัดจากนั้นเป็น host-pathogen interactions

ที่มา: Lehmann *et al.* (2006)

### 3. การทำนายโครงสร้างของโปรตีน (Protein structure prediction) และศึกษาการจับกัน (Molecular docking) ระหว่างโปรตีนกับน้ำตาลด้วยคอมพิวเตอร์

การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของโปรตีนด้วยคอมพิวเตอร์ เป็นการศึกษาที่ใช้คาดเดาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนหรือจำลองโครงสร้างโปรตีนที่สนใจโดยเทียบจากฐานข้อมูล ทำให้ง่ายต่อการศึกษาเพื่อศึกษาโปรตีน ช่นระยะเวลาและไม่สิ้นเปลืองทรัพยากร และยังทำให้ขอบเขตของเป้าหมายแคบลง และสามารถทำการออกแบบและวิศวกรรมโปรตีนเพื่อเพิ่มหรือลดประสิทธิภาพในการทำงานได้ด้วย เทคนิคทางคอมพิวเตอร์ยังสามารถใช้ทำนายการจับกับระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์ ซึ่งมีชื่อเรียกว่า molecular docking โดยในการทดลองนี้จะเกี่ยวข้องกับ 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การจำลองโครงสร้างของโปรตีน (homology modeling) การเตรียมโครงสร้างของลิแกนด์ และการศึกษาการจับกันระหว่างแบบจำลองโปรตีนกับลิแกนด์

#### 3.1 การจำลองโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธี Homology modeling

การจำลองโครงสร้างของโปรตีนจากลำดับกรดอะมิโน ซึ่งได้มาจากการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการจำลองโครงสร้างของโปรตีนนี้สามารถทำได้โดยโปรแกรม Modeller9v1 (Sali and Blundell, 1995) โดยใช้โครงสร้างของโปรตีนที่ใกล้เคียงที่สุดเป็นต้นแบบ (template) โครงสร้างโปรตีนที่ได้ (homology model) จะถูกประเมินคุณภาพของโครงสร้างด้วยโปรแกรม PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1996)

#### 3.2 การเตรียมโครงสร้างลิแกนด์

โครงสร้างของลิแกนด์อาจจะเป็น inhibitor, co-factor หรือ substrate ซึ่งลิแกนด์จะมีขนาดเล็กกว่าโปรตีน จะถูกสร้างขึ้นโดยใช้โปรแกรม SYBYLv7.3 (Tripos Associates, St. Louis, MO, U.S.A.) จากนั้น โครงสร้างลิแกนด์ที่ได้จะนำมาลดระดับพลังงานให้อยู่ในค่าที่เหมาะสมกับการนำไปใช้ (Geometry optimization)

#### 3.3 การศึกษาการจับกันระหว่างแบบจำลองโปรตีนกับลิแกนด์ด้วยวิธี Molecular docking

โครงสร้างของโปรตีนและลิแกนด์ต่างๆ ที่ออกแบบไว้ จะถูกนำมาศึกษาการจับกันด้วยโปรแกรม Autodock v3.0.5 (Morris *et al.*, 1998) โดยวิธีนี้สามารถคำนวณค่าพลังงานในการจับ

กัน (estimated docked energy) ระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์นั้นๆ ได้ ซึ่งหากได้ค่าพลังงานต่ำที่สุดจะบ่งบอกถึงโครงสร้างที่จับกันที่ดีที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการออกแบบโครงสร้างโปรตีนให้มีความจำเพาะต่อลิแกนด์มากขึ้น จึงออกแบบโครงสร้างโปรตีนโดยเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนบางตำแหน่งในบริเวณจับ (binding site) ซึ่งคล้ายๆ กับการทำ site directed mutagenesis แต่ในคอมพิวเตอร์นั้นสามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ต้องการได้ในหลายๆ ตำแหน่งได้พร้อมกันในเวลาอันสั้น แล้วนำไปทำ molecular docking กับน้ำตาลที่สนใจ และเปรียบเทียบค่าพลังงานในการจับกันระหว่างโครงสร้างโปรตีนแบบต่างๆ กับลิแกนด์

จากหลักการดังกล่าวนี้พบตัวอย่างการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนในการจับกับลิแกนด์ และการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน เช่น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของ O-methyltransferase โดยการทำให้ molecular modeling และ site directed mutagenesis (Park *et al.*, 2007) เป็นต้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Cary 50 Conc Varian, North America)
- 1.2 เครื่อง Nano drop UV/Visible spectrophotometer (NanoDrop Technologies, U.S.A.)
- 1.3 เครื่อง PCR Thermal cycler (TC-28/4 Lio-Labinter, U.S.A.)
- 1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Z383K Hermle Labortechnik GmbH, Germany และ 16M spectrafuge, U.S.A.)
- 1.5 เครื่อง UV Transilluminator (DNR-Bio Imaging Systems, Israel)
- 1.6 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaker) (VS-8480SFN Meditop, England)
- 1.7 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ( Model IPR 150.XX2.C Gallenkamp, U.K.)
- 1.8 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow ) (BH-120, GelmanScience, Austria)
- 1.9 ตู้เย็น 4°C (Hitachi, Japan)
- 1.10 ตู้เย็นแช่แข็ง -20 °C (Sharp, Japan) และ -80 °C (Thermo Scienific, U.S.A.)
- 1.11 pH มิเตอร์ (Seven Easy pH meter Mettler Toledo, U.S.A.)
- 1.12 เครื่อง vortex mixer (VX100 Labnet, U.S.A.)
- 1.13 เครื่องชั่ง (TB-214 Denver Becthai, Thailand)
- 1.14 Autopipette (Pipetteman, Gilson, Germany)
- 1.15 Heat Box (D1100 Labnet, U.S.A.)
- 1.16 ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส ประกอบด้วย
  - เครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแนวนอน (Gel electrophoresis) (Intelligent Power Supply, Japan)
  - เครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแนวตั้ง (SDS-PAGE electrophoresis) (AE 6530 ATTO, Japan)
- 1.17 เครื่อง sonicator (Sonics&Materials Inc., U.S.A.)
- 1.18 เครื่องทำแห้งสารละลาย (freeze-dryer) (Labconco, U.S.A.)
- 1.19 ชุดทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี (Bio-Rad, U.S.A.)
- 1.20 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ( Model HA-300M Astell Scientific, England)

- 1.21 เครื่อง Microplate Reader (Tecan, Austria)
- 1.22 เตาไมโครเวฟ (Goldstar, Korea)
- 1.23 Power supply (Model IMP-1000AP) (Powercom international Co., Thailand)
- 1.24 Magnetic stirrer (Fisher Scientific, U.S.A.)
- 1.25 ตู้อบแห้ง (Hot air oven, Model 838F)(Fisher Scientific, U.S.A.)
- 1.26 Hot plate (Fisher Scientific, U.S.A.)

## 2. สารเคมี

- 2.1 Acrylamide (Bio Basic Inc., U.S.A.)
- 2.2 Agarose (Bio-Active Co., Spain)
- 2.3 Ammonium persulfate ammoniumpersulfate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.4 Ampicillin (Sigma, U.S.A.)
- 2.5 Bacto-Agar (Merck, Germany)
- 2.6 Bovine Serum Albumin (BSA) (Promega,U.S.A.)
- 2.7 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) (Sigma, U.S.A.)
- 2.8 Bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)
- 2.9 Chloroform (Merck, Germany)
- 2.10 Calcium Chloride (Merck, Germany)
- 2.11 Coomassie® brilliant G 250 (Research organics, U.S.A.)
- 2.12 Cellfectin® reagent (Invitrogen, U.S.A.)
- 2.13 Deoxyribonucleic acid (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) (Promega,U.S.A.)
- 2.14 DNA marker, 1 Kb plus DNA ladder and 100 bp ladder (Gibco,U.S.A.)
- 2.15 Ethanol , absolute (Merck, Germany)
- 2.16 Ethidium bromide (EtBr) (Sigma, U.S.A.)
- 2.17 Ethylene diamine tetraacetic acid, disodium salt dihydrate (EDTA)  
(Merck, Germany)
- 2.18 Glacial acetic acid (Carlo Erba, Italy)
- 2.19 Glycerol (Carlo Erba, Italy)
- 2.20 Hydrochloric acid (Carlo Erba, Italy)
- 2.21 Imidazole (Acro organics, U.S.A.)

- 2.22 Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) (Sigma, U.S.A.)
- 2.23 Lactose (Ajax Finechem, Australia)
- 2.24 Metanol (Ajax Finechem, Australia)
- 2.25  $\beta$ -MercaptoEthanol (Merck, Germany)
- 2.26 Molecular weight protein marker (Amersham, UK)
- 2.27 Ni<sup>2+</sup>-NTA resin (Qiagen, U.S.A.)
- 2.28 *N,N'*-methyl-bis-acrylamide (Bio Basic Inc., U.S.A.)
- 2.29 *NNN'*- tetramethyl-1,2-diaminoethane (TEMED)(Bio Basic Inc., U.S.A.)
- 2.30 Phenol (Sigma, U.S.A.)
- 2.31 Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Serva, U.S.A.)
- 2.32 Potassium acetate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.33 Sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)
- 2.34 Sodium dihydrogen orthophosphate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.35 Sodium hydrogen diphosphate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.36 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Bio Basic Inc., U.S.A.)
- 2.37 Tris-(hydroxy methyl)-aminomethane (Sigma, U.S.A.)
- 2.38 Tryptone (Merck, Germany)
- 2.39 Urea (Research Organics Inc., U.S.A.)
- 2.40 Yeast extracts (Merck, Germany)
- 2.41 ชุด gel extraction kit (Qiagen. U.S.A.)
- 2.42 ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป (Fermentas, U.S.A.)

### 3. เอนไซม์ (Enzymes)

- 3.1 Taq DNA polymerase (Fermentas, U.S.A.)
- 3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NcoI* (Fermentas, U.S.A.)
- 3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NheI* (Fermentas, U.S.A.)
- 3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *XhoI* (Fermentas, U.S.A.)
- 3.5 RNase A (Fermentas, U.S.A.)
- 3.6 T<sub>4</sub> DNA ligase (Fermentas, U.S.A.)

#### 4. พลาสมิดพาหะ (Plasmid vectors)

- 4.1 pGEM-T<sup>®</sup> easy vector (Promega, U.S.A.)
- 4.2 pET21a (+) vector (Novagen, Germany) : เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย (MLL overexpression)
- 4.3 pFastbac HT-A vector (Novagen, Germany) : เวกเตอร์สำหรับการโคลนยีนเข้าสู่เซลล์แมลง (MLL gene cloning in insect cell)

#### 5. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (Oligonucleotide primers) (Fermentas, U.S.A.)

สำหรับเซลล์แบคทีเรีย

- Forward fMLL 5' GGAAGCTAGCATGCTGATGGCTTCGTC 3'
- Forward nsMLL 5' GCTAGCATGAACAATCAACAAAGTGGG 3'
- Forward LMLL 5' ATGCTAGCATGGGCGTGGCGTTTGATGAT 3'
- Reverse MLL 5' ATCTCGAGGCTGCCGCGGCCACCAG 3'

สำหรับเซลล์แมลง

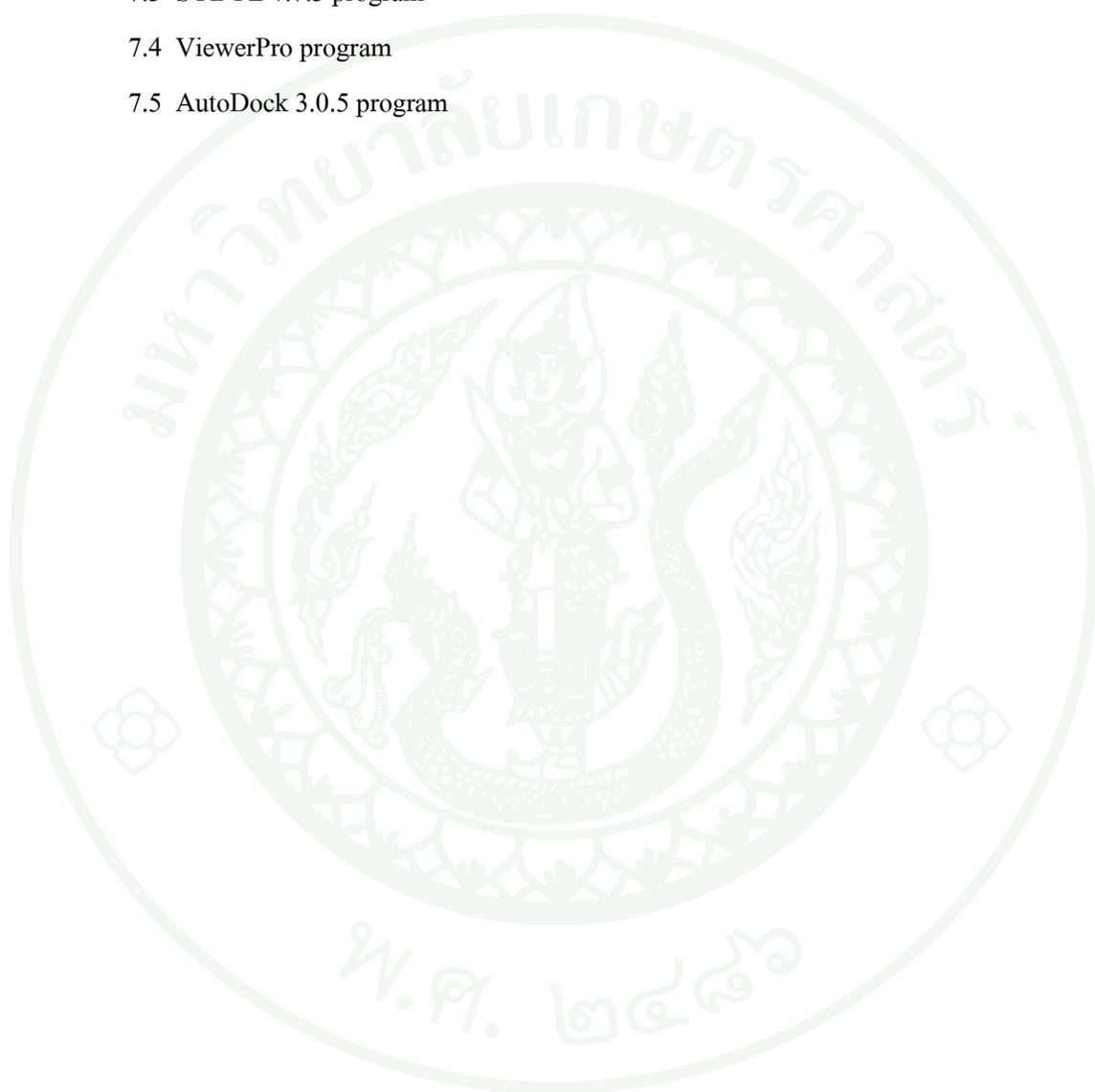
- Forward fMLL 5' GCCATGGCTTCGTCTTCCTTT 3'
- Forward nsMLL 5' GCCATGGGCCAACAAAGTGGGAAAAGT 3'
- Reverse MLL 5' ATCTCGAGGCTGCCGCGGCCACCAG 3'

#### 6. Bacterial strains

- 6.1 *Escherichia coli* BL21(DE3)
- 6.2 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$
- 6.3 *Escherichia coli* DH10Bac

## 7. เครื่องคอมพิวเตอร์ และ โปรแกรม

- 7.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ (HP)
- 7.2 MODELLER9 v.1 program
- 7.3 SYBYL v.7.3 program
- 7.4 ViewerPro program
- 7.5 AutoDock 3.0.5 program



## วิธีการ

### 1. การสร้างและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินในเซลล์แบคทีเรีย

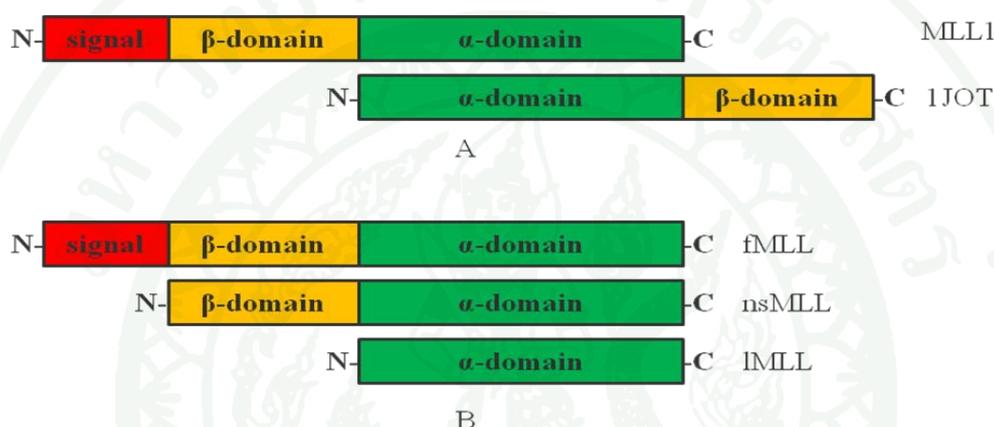
#### 1.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคติน

##### 1.1.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนเลคติน

จากการศึกษาโปรตีนเลคติน MLL1 ในใบหม่อนสายพันธุ์หม่อนน้อย พบว่าเป็นเลคตินที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกาแลคโตส ซึ่งเป็นเลคตินที่มีสายโพลีเปปไทด์เพียงหนึ่งสาย แต่จากการทดลองสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินของยีน MLL1 ตลอดทั้งสาย (full length) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ของนางสาวเดือนตา เกตุแสง (Getsang, 2007) พบว่า MLL1 มีการแสดงออกได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 kDa ซึ่งมีขนาดน้อยกว่าการคาดคะเนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 kDa โปรตีนที่ได้ไม่มีกิจกรรมของโปรตีน และอธิบายไว้ว่าโปรตีนเลคตินน่าจะมียูนิทโปรตีน (signal peptide) ส่วนการศึกษาในธรรมชาติพบว่า MLL1 มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 51 kDa แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 16.5 kDa มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 8.8 % (Ratanapo *et al.*, 1998) สังเกตได้ว่า MLL1 ในธรรมชาติ และ MLL1 จากการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย มีน้ำหนักโมเลกุลไม่สอดคล้องกัน ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีน MLL1 โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ด้วยการใช้ jacalin related lectin จาก *Maclura pomifera* (MPA) (PDB code : 1JOT) เป็นโปรตีนเทียบในการแบ่งส่วนต่างๆ เนื่องจาก MPA มีความเหมือนกับ MLL ถึง 78.2%

โปรตีน 1JOT ประกอบด้วย 2 สายโพลีเปปไทด์ที่เกิดจากการตัดภายในโปรตีนคือ สาย A ( $\alpha$ -chain) เป็นสายที่อยู่ด้าน N-terminal และสาย B ( $\beta$ -chain) เป็นสายที่อยู่ด้าน C-terminal นำแต่ละ โพลีเปปไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับโปรตีน MLL1 ได้ดังนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MLL1 ที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์สาย A ของ 1JOT เป็น  $\alpha$ -domain ซึ่งมีความเหมือนกับ 1JOT ถึง 78% ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MLL1 ที่คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์สาย B ของ 1JOT เป็น  $\beta$ -domain ซึ่งมีความเหมือนกับ 1JOT ถึง 50 % และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MLL1 ที่ไม่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 1JOT เป็นส่วนของสัญญาณโปรตีน (ภาพที่ 23A) จากนั้นแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับสร้างรีคอมบิแนนท์ยีนของ MLL1 ทั้ง 3 ส่วน มีดังนี้ ส่วนแรกเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของเลคติน (full length, fMLL) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปล

รหัสเป็น โพรตีน (open reading frame, ORF) 654 นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่ 2 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วย  $\alpha$ -chain และ  $\beta$ -chain ตัดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณออก (no signal MLL, nsMLL) มี ORF 474 นิวคลีโอไทด์ และส่วนที่ 3 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเฉพาะส่วนของ  $\alpha$ -chain (large subunit, LMLL) มี ORF 402 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 23B) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MLLc20 มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 895 นิวคลีโอไทด์ มี ORF 648 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 24) และทำการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในส่วนปลาย C-terminal เล็กน้อยเพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสม



**ภาพที่ 23** การแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MLL1 เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 1JOT

A คือ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MLL1 และ 1JOT

B คือ การแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MLL1 ได้ 3 ส่วน ดังนี้

fMLL คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดทั้งสาย

nsMLL คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วย  $\alpha$ -chain และ  $\beta$ -chain ตัดส่วนของสัญญาณโปรตีนออก

LMLL คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเฉพาะส่วนของ  $\alpha$ -chain และมีความเหมือนกับ 1JOT

CTAGAATTCAGCGGCCGCTGAATTCTAGAACCATTTACGTCAAACTAGTTTTCAAATATTTTCATGCTG  
**ATGGCTTCGTCTTCTCTCCCTCTCCCTCCTCGTCCCTCTTCTCTATCTCCTCTGCCAACACC**  
 CGAAAGTGGTCTTTGTCAAATGTTCTCGATCAGAAACCAGATCAGCATAATCGAGGCCGCCATTTGGAGTT  
 TCTGAAGACCTTCTTAATCTCAATGGGATGGAAGCTAAAAACAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACG  
 ATAGTTGTAGGAACATGGGGAGCCCAAGCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGTATGACGGTTCATAC  
 ACCGGAATAAGAGAAATCAATTTTGAATATAATAATGAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTAC  
 GATGTGAATGGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCAGTGAAG  
 ATTTCCCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGTTGAAGTGAGCGGGTACACTGGTAAAAGTGAGCGGGTAT  
 ATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACCAACAAAGAACTTATGGACCATATGGAGTTACAAGCGGC  
 ACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTTAATTGTTGGATTTAAAGGAAGTGTGGCTATTGGTTG  
 GACTACATTGGGTTTCACTTAGCACTTTAAAGATTACTTATAAAAATAATGATGCTACTAAGATGGATCTT  
 GTTGTCTATAAAATAAGTTCAAATCGCCAAGTATGTAATGGGAGTATTATATATATGTTGGTTTTGCTA  
 GCAATCTTATTACCATATATATAACAAGGAATGATTTGATGTTTCAAATAAAGGTTTCGTATATTGAGTA

ภาพที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MLLc20 จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 895 นิวคลีโอไทด์ ส่วน  
 ที่แปลเป็นโปรตีนมี 651 นิวคลีโอไทด์

ที่มา: Kankamol (2003)

### 1.1.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนเลคติน MLL1

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน MLL1 ทั้ง 3 ส่วน ออกแบบจาก  
 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MLLc20 (Kankamol, 2003) และออกแบบให้มีบริเวณเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ  
 ด้วย *NheI* และ *XhoI* ซึ่งเป็นบริเวณตัดที่พบในเวกเตอร์ pET21a การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน  
 เลคตินในครั้งนี้เลือกเวกเตอร์ pET21a (ภาพที่ 25) ซึ่งมี T7 promoter คัดเลือกโคลนด้วยแอมพิซิลิน  
 (ampicillin selection) และมี His tag อยู่ด้าน C-terminal โดยด้าน forward primer ของแต่ละส่วน  
 ของเลคตินเพิ่มนิวคลีโอไทด์ของเอ็นไซม์ *NheI* ลงไปก่อนบริเวณด้านหน้าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ  
 ยีน MLL1 ทั้ง 3 ส่วน และด้าน reverse primer ทำการเติมลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นไซม์ *XhoI* ลง  
 ไปต่อจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นจะมีขนาดสั้นประมาณ 20-30  
 nucleotides และมี GC content ประมาณ 50% ไพรเมอร์สำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง  
 3 ส่วนมีดังนี้

Forward fMLL 5' GGAAGCTAGCATGCTGATGGCTTCGTC 3'

Forward nsMLL 5' GCTAGCATGAACAATCAACAAAGTGGG 3'

Forward LMLL 5' ATGCTAGCATGGGCGTGGCGTTTGATGAT 3'

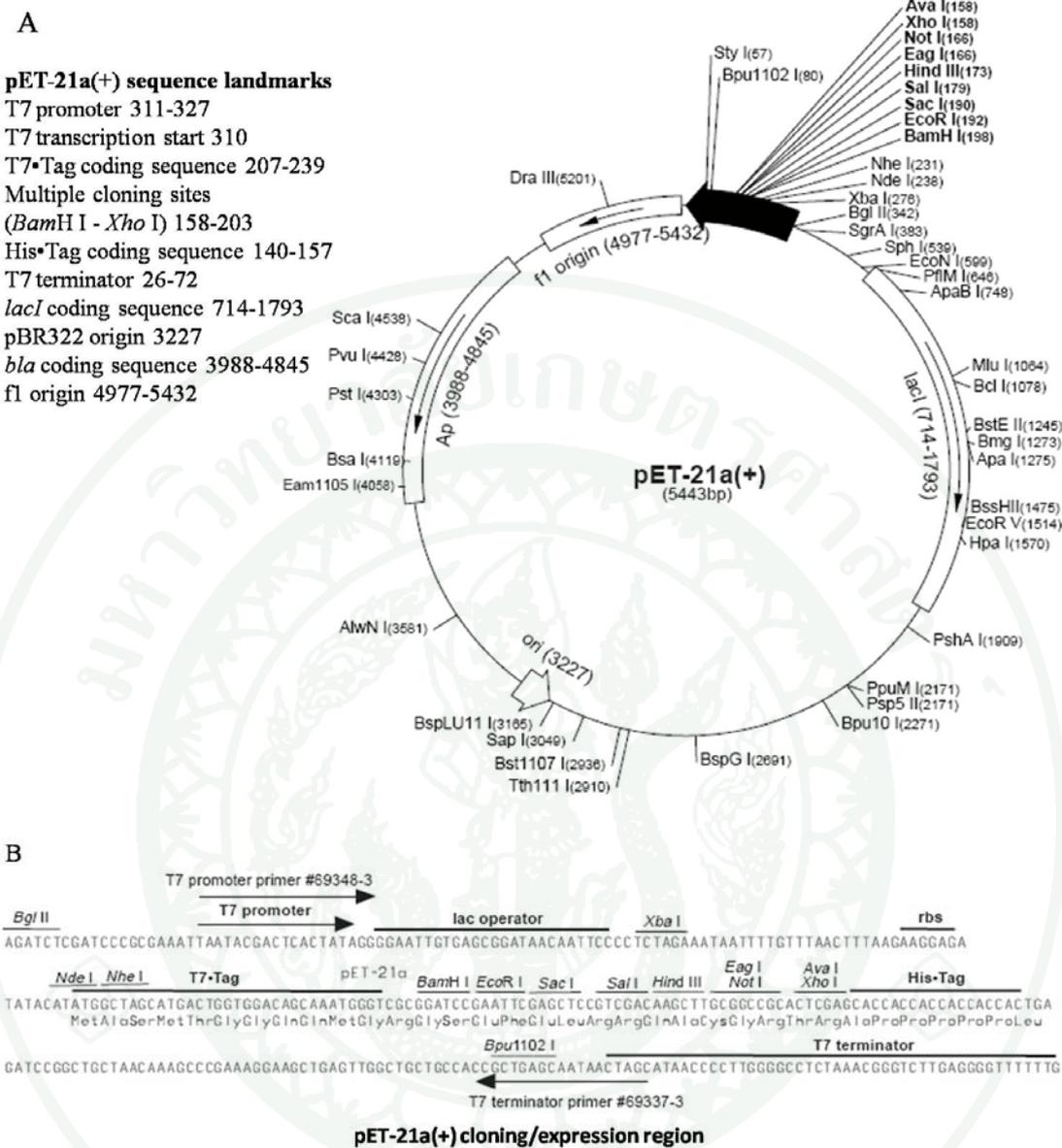
Reverse MLL 5' ATCTCGAGGCTGCCGCGGCCACCAG 3'

### 1.1.3 การเพิ่มปริมาณยีน MLL1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณยีน MLL1 โดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (polymerase chain reaction (PCR)) แต่ละส่วนนั้นจะใช้ยีนจาก cDNA ของ MLLc20 คีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) และในหนึ่งปฏิกิริยาจะทำในปริมาตร 20  $\mu$ l ซึ่งสารละลายที่ใช้ในกระบวนการพีซีอาร์ประกอบด้วย 1X PCR reaction buffer +  $MgCl_2$ , 10 pg - 1 ng Recombinant DNA, 2.5 mM dNTP Mix, 5 pmol/ $\mu$ l Primers forward, 5 pmol/ $\mu$ l Primers reverse, 5 U Taq- DNA polymerase และสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ ขั้นที่ 1 Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และขั้นที่ 3 Last-extension บ่มด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที การทำปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 2 ทั้งหมด 30 รอบ จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของยีน MLL1 แต่ละส่วน ด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลในสารละลายด้วย ethidium bromide นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของยีนด้วยเครื่อง UV Transilluminator

### 1.1.4 การทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยการทำพีซีอาร์ จากนั้นทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์ โดยเติมน้ำกลั่นในผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จนปริมาตรครบ 300  $\mu$ l แล้วเติม 3 M โซเดียมอะซิเตท (NaOAc) 1/10 เท่าของปริมาตร และเติมเอทานอลบริสุทธิ์ (absolute Ethanol) 2 เท่าของปริมาตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ตกตะกอน จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง แล้วทำให้แห้ง เติมน้ำกลั่น 20  $\mu$ l จะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่บริสุทธิ์



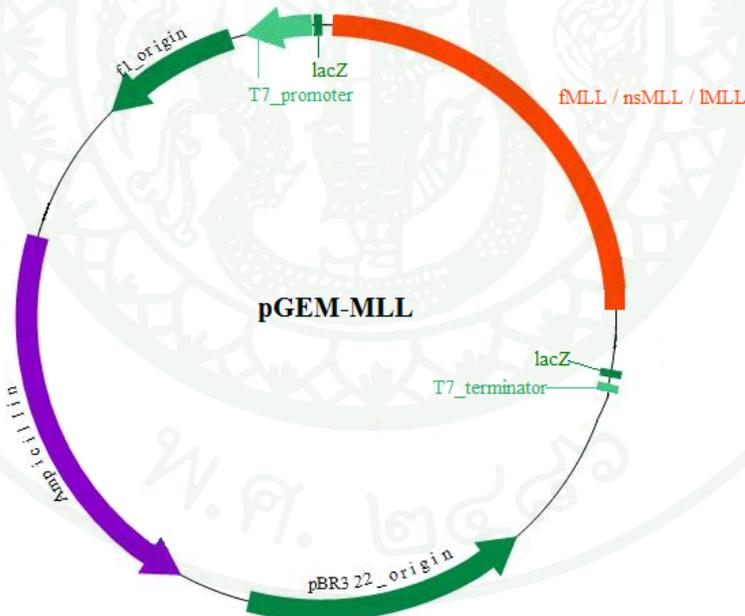
ภาพที่ 25 แผนภาพของเวกเตอร์ pET21a (Novagen)

(A) แผนภาพวงกลมของเวกเตอร์ pET21a ประกอบด้วย T7 promoter, ampicillin selection และมี His tag ติดอยู่ด้าน C-terminal

(B) นิวคลีโอไทด์ส่วนของโปรโมเตอร์ และ multiple cloning sequence ของ pET21a vector

### 1.1.5 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pGEM-T<sup>®</sup> - easy vector

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแต่ละส่วนที่บริสุทธิ์ มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T โดยใช้ pGEM-T easy vector kit (Promega, U.S.A.) ประกอบด้วย 1x rapid ligation buffer, 2.5 ng/μl pGEM-T easy vector, 5 ng/μl ผลิตภัณฑ์ PCR, 3 U T4 DNA ligase ทำการผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นขนย้ายส่วนผสมเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) แล้วทำการคัดเลือก recombinant pGEM-MLL (pGEM-fMLL, pGEM-nsMLL และ pGEM-LMLL) บนอาหารแข็งสูตร Luria-Bertani agar (LB agar) ที่มี 100 μg/ml ampicillin, 0.5 M IPTG และ 40 μg/ml X-Gal บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง ตรวจสอบพลาสมิดที่มี recombinant pGEM-MLL (ภาพที่ 26) ที่ได้ด้วยการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)



ภาพที่ 26 แผนภาพของพลาสมิด pGEM-MLL ซึ่งประกอบด้วย จุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีน fMLL / nsMLL / LMLL

### 1.1.6 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอและเตรียมพลาสมิด เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์ของยีน MLL1

นำพลาสมิด pGEM-MLL ทั้ง 3 โคลน และพลาสมิด pET21a มาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *XhoI* ตัดครั้งละ 1 เอนไซม์ ซึ่งในปฏิกิริยา 25  $\mu$ l ประกอบด้วย 10 ng pGEM-MLL, 1x restriction enzyme buffer และ 10 U *NheI* หรือ *XhoI* แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำการวิเคราะห์ DNA fragment ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของ DNA fragment ด้วยเครื่อง UV Transilluminator จากนั้นทำให้ DNA fragment บริสุทธิ์ โดยเติมน้ำกลั่นในส่วนผสมของ DNA fragment ปริมาตรครบ 300  $\mu$ l เติม 3 M โซเดียมอะซิเตท (NaOAc) 1/10 เท่าของปริมาตร และเติมเอทานอลบริสุทธิ์ (absolute Ethanol) 2 เท่าของปริมาตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้ส่วนผสมดังกล่าวตกตะกอน จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 2 ครั้ง แล้วทำให้แห้ง (air dry) เติมน้ำกลั่น 20  $\mu$ l แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอีกเอนไซม์ ตามขั้นตอนดังกล่าว แล้วทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง จะได้เวกเตอร์ และยีนที่พร้อมนำมาเชื่อมต่อเป็นรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

### 1.1.7 การเชื่อมต่อเวกเตอร์ pET21a กับยีน MLL1 แต่ละส่วน

เมื่อได้เวกเตอร์ pET21a และยีนแต่ละส่วนที่ถูกตัดแล้ว ทำการเชื่อมต่อเวกเตอร์ กับยีน เพื่อให้ได้ recombinant pET-MLL โดยอัตราส่วนที่ใช้คือ 2:1 ของ insert DNA ต่อ vector molar ซึ่งทำในปริมาตรทั้งหมด 10  $\mu$ l ที่ประกอบด้วย 1x ligase buffer, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 10 ng/ $\mu$ l insert DNA, 5 ng/ $\mu$ l pET21a vector และ 10 U  $T_4$  DNA ligase จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง จะได้ recombinant pET-MLL (pET-fMLL, pET-nsMLL และ pET-LMLL) (ภาพที่ 27) แต่ละส่วนพร้อมนำไปทำการขนย้ายยีนเข้าสู่เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  (Sambrook and Russell, 2001)

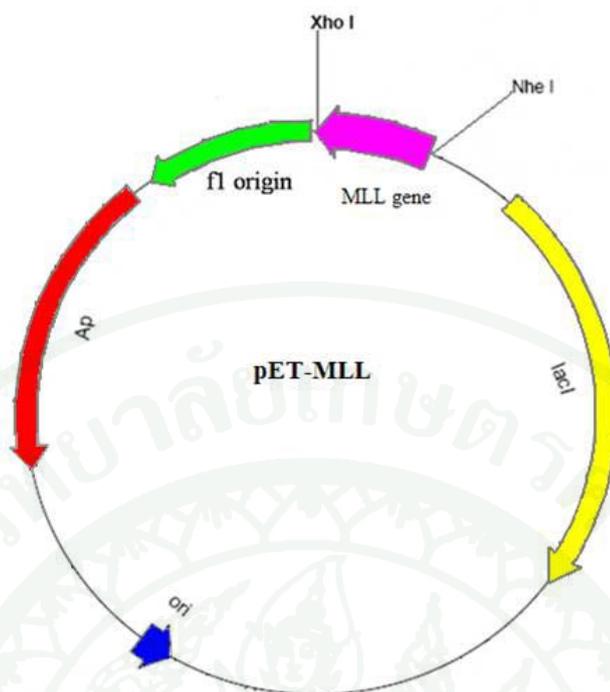
### 1.1.8 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนท์ (competent cell)

เลือกโคโลนีของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5- $\alpha$  ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ด้วยเข็ม เขี่ยเชื้อ เลี้ยงในอาหารเหลว LB 3 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว

200 rpm เป็นเวลา 1 คืน นำเชื้อที่เลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน ปริมาตร 1 ml ย้ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 ml ที่มีอาหารเหลว LB 500 ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 nm (O.D.600) ได้เท่ากับ 0.5-0.6 ด้วยเครื่อง spectrophotometer เก็บเซลล์ลงในขวด centrifuge 250 ml แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 0.1 M CaCl<sub>2</sub> เย็นจัด ที่ฆ่าเชื้อปริมาตร 100 ml จากนั้นละลายเซลล์ที่ตกตะกอนให้อยู่ในลักษณะ cell suspension อย่างช้าๆ ในสภาพเย็น นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 0.1 M CaCl<sub>2</sub> เย็นจัด ปริมาตร 100 ml จากนั้นละลายเซลล์ที่ตกตะกอนให้อยู่ในลักษณะ cell suspension อย่างช้าๆ ในสภาพเย็นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 20 % glycerol ใน 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ปริมาตร 10 ml ละลายเซลล์ที่ตกตะกอนให้อยู่ในลักษณะ cell suspension อย่างช้าๆ ในสภาพเย็น แบ่งเก็บเซลล์ในหลอด (eppendorf) ขนาด 1.5 ml ปริมาตร 50 µl/หลอด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิดต่อไป

#### 1.1.9 การขนย้าย recombinant pET-MLL เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α

นำ recombinant pET-MLL (pET-fMLL, pET-nsMLL และ pET-LMLL) ที่ได้จากการเชื่อมต่อมาขนย้ายเข้าสู่เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation โดยใช้ pET-MLL 5 µl ใส่ใน competent cells 50 µl ในหลอด 1.5 ml แล้วบ่มไว้บนน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไป shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90-120 วินาที แล้วนำไปไว้บนน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth ลงไป 600 µl แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำมาเขย่าต่อที่ 220 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาหมุนเหวี่ยง 5,000 rpm นาน 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มี 100 µg/ml ampicillin บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง (Sambrook and Russell, 2001)



ภาพที่ 27 แผนภาพของพลาสมิด pET-MLL ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), lac operon, ampicillin resistant gene และยีน MLL โดยยีนแต่ละส่วนที่แบ่งจะถูกเชื่อมต่อบริเวณเดียวกัน

### 1.1.10 การคัดเลือกโคลน

1.1.10.1 การทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ (colony PCR) การคัดเลือกโคลนครั้งแรกสามารถตรวจสอบได้ด้วยการเลือกโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ซึ่งคาดว่ามิพลาสมิด recombinant pET-MLL แล้วทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ โดยเขียนเชื้อใส่ในบัพเฟอร์พีซีอาร์และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ แล้วเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ PCR ของแต่ละส่วน และเทียบกับ 100 bp DNA ladder ด้วยการนำไปแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis

1.1.10.2 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เมื่อได้โคลนแล้วนำไปสกัดพลาสมิด เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด pET-MLL ให้ได้ปริมาณมาก โดยการขนย้ายยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock transformation เลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ในอาหาร LB broth ปริมาตร 3 ml ที่มี 100  $\mu$ g/ml ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 220 rpm นาน 12-16 ชั่วโมง สกัดแยกพลาสมิด pET-MLL จากเซลล์โดยวิธี alkaline lysis method (Sambrook and

Russell, 2001) โดยเก็บเซลล์ด้วยการหมุนเหวี่ยง 10,000 rpm ทิ้งอาหารเก่าแล้วเติม solution I ปริมาตร 100  $\mu$ l ละลายตะกอนด้วยเครื่อง vortex แล้วเติม solution II ปริมาตร 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดขึ้นลง แล้วเติม solution III ปริมาตร 150  $\mu$ l นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 15 นาที เก็บส่วนใสประมาณ 400  $\mu$ l แล้วเติมส่วนผสมของ phenol : chloroform ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 15 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่ แล้วเติม 3 M โซเดียมอะซิเตท 1/10 เท่าของปริมาตร แล้วเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ได้ พลิกหลอดกลับไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 15 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างตะกอนพลาสติกด้วย 70% Ethanol 2 รอบ ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 30  $\mu$ l ที่มีเอนไซม์ RNaseA ปริมาตร 20 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัด RNA แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis แล้วนำพลาสติกมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* หรือ *XhoI* แล้วตรวจสอบ DNA fragment ด้วยการนำไปแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis เทียบกับ 100 bp DNA ladder

1.1.10.3 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยทำการสกัดพลาสติกให้มีความบริสุทธิ์ แล้วส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ MacroGen (Korea) จากนั้นวิเคราะห์สัญญาณและนิวคลีโอไทด์ที่ได้ แล้วเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ นิวคลีโอไทด์ของยีนเริ่มต้น ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

## 1.2 การเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน

### 1.2.1 การขนย้ายพลาสมิด recombinant pET-MLL เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)

เมื่อได้พลาสมิดของแต่ละโคลนที่ต้องการแล้ว สามารถนำ pET-fMLL, pET-nsMLL และ pET-LMLL แต่ละโคลนมาเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์โปรตีนได้ โดยนำพลาสมิดมาขนย้ายขึ้นเข้าสู่เซลล์ *E.coli* BL21(DE3) ด้วยวิธี heat shock transformation โดยใช้พลาสมิด 1  $\mu$ l ใส่ใน competent cells (*E.coli* BL21(DE3)) 50  $\mu$ l ในหลอด 1.5 ml บ่มไว้บนน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไป shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90-120 วินาที แล้วนำไปไว้บนน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ลงไป 600  $\mu$ l แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำมาเขย่าต่อที่ 220 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมา

หมุนเหวี่ยง 5,000 rpm นาน 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มี 100 µg/ml ampicillin บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง (Sambrook and Russell, 2001)

### 1.2.2 การเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนแสดงออก

เลือกโคโลนี pET-fMLL, pET-nsMML และ pET-LMML แต่ละโคลนมาเลี้ยงในอาหาร LB broth 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วเลี้ยงเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารใหม่โดยใส่เชื้อ 3 µl ในอาหารใหม่ 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสามารถวัดความขุ่นของเซลล์ที่การดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้ประมาณ 0.6-0.8 แล้วเหนี่ยวนำด้วย 0.2% Lactose จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยง 10,000 rpm เพื่อเก็บเซลล์ และตรวจสอบโปรตีนด้วยการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 µl ผสมให้ตะกอนเซลล์ละลาย เติม loading dye 10 µl ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ และแยกขนาดของโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE เปรียบเทียบกับขนาดโปรตีนมาตรฐาน

### 1.2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน

1.2.3.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 16 และ 37 องศาเซลเซียส จึงทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย pET-fMML, pET-nsMML และ pET-LMML แต่ละโคลนมาเลี้ยงในอาหาร LB broth 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วเลี้ยงเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารใหม่โดยใส่เชื้อ 3 µl ในอาหารใหม่ 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสามารถวัดความขุ่นของเซลล์ที่การดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้ประมาณ 0.6 แล้วเหนี่ยวนำด้วย 0.2% Lactose จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เปรียบเทียบกัน จากนั้นนำสารละลายเซลล์มาวิเคราะห์แยกขนาดโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE เปรียบเทียบกับขนาดโปรตีนมาตรฐาน

1.2.3.2 การหาสารเหนี่ยวนำ (inducer) ที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเพื่อเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลแลคโตส และ IPTG จึงทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย pET-fMML, pET-nsMML และ pET-LMML แต่ละโคลนมาเลี้ยงในอาหาร LB broth 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วเลี้ยงเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารใหม่โดยใส่เชื้อ 3 µl

ในอาหารใหม่ 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสามารถวัดความขุ่นของเซลล์ที่การดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้ประมาณ 0.6 แล้วเหนี่ยวนำด้วย 0.2% Lactose และ 1 mM IPTG เปรียบเทียบกัน จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเซลล์มาวิเคราะห์แยกขนาดโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE เปรียบเทียบกับขนาดโปรตีนมาตรฐาน

1.2.3.3 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย pET-fMLL, pET-nsMLL และ pET-LMLL แต่ละโคลนมาเลี้ยงในอาหาร LB broth 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วเลี้ยงเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารใหม่โดยใส่เชื้อ 3 µl ในอาหารใหม่ 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสามารถวัดความขุ่นของเซลล์ที่การดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้ประมาณ 0.6 แล้วเหนี่ยวนำด้วย 0.2% Lactose จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเลี้ยงและเก็บเซลล์ในชั่วโมงที่ 1, 2, 4 และ 6 ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายเซลล์มาวิเคราะห์แยกขนาดโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE เปรียบเทียบกับขนาดโปรตีนมาตรฐาน

### 1.3 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย Western blot

การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินเข้าสู่เวกเตอร์ pET21a ซึ่งมี His-tag อยู่ด้าน C-terminal นั้นสามารถทำการตรวจสอบโปรตีนได้ด้วยการทำ Western blot ซึ่งใช้ Penta-His Alexa Fluor Conjugates (Qiagen, U.S.A.) ในการจับกับ His Tag ที่ติดอยู่กับโปรตีนเลคตินได้ โดยนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนมาแยกขนาดด้วย 15% SDS-PAGE แล้วขนย้ายโปรตีน (transfer protein) ไปบนเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose Membrane, Amersham) แล้วนำเมมเบรนมาล้างด้วย TBS buffer 2 รอบ รอบละ 10 นาที แล้วบ่มด้วย blocking buffer อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย TBS-Tween/Triton buffer 2 รอบ รอบละ 10 นาที แล้วบ่มด้วย Penta-His Alexa Fluor Conjugates 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย TBS-Tween/Triton buffer 2 รอบ รอบละ 10 นาที ล้างเมมเบรนด้วย TBS buffer อีก 10 นาที ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย chemiluminescence ด้วยแผ่นฟิล์ม X-ray (Sambrook and Russell, 2001)

#### 1.4 การทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง pET-fMLL, pET-nsMLL และ pET-LMLL แล้ว นำสภาวะที่ได้มาเลี้ยงเซลล์ในปริมาณมาก เพื่อเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยผ่านคอลัมน์ที่มี nickel chelate resin เนื่องจาก recombinant pET-MLL มี His-tag อยู่ด้าน C-terminal เริ่มจากเลือกโคโลนี recombinant pET-MLL แต่ละโคลนมาเลี้ยงในอาหาร LB broth 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วเลี้ยงเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงเชื้อในอาหารใหม่โดยใส่เชื้อ 500 µl ในอาหารใหม่ 500 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin จนสามารถวัดความขุ่นของเซลล์ที่การดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้ประมาณ 0.6-0.8 แล้วเหนี่ยวนำด้วย 0.2% lactose เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นหมุนเหวี่ยง 10,000 rpm เก็บเซลล์ แล้วนำมาทำให้เซลล์แตกในสารละลาย lysis buffer และทำให้ผนังเซลล์แตกมากขึ้นด้วยคลื่นเสียง (Ultrasonicator) จากนั้นนำสารละลายเซลล์มาแยกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสผ่านคอลัมน์ที่มี nickel chelate resin ล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer ล้างคอลัมน์อีกรอบด้วย equilibrate buffer จากนั้นทำการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer โดยเก็บแต่ละส่วนไปตรวจสอบโปรตีนและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE (การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย nickel chelate resin ทำทั้งในสภาวะธรรมชาติ และในสภาวะเสียสภาพธรรมชาติ โดยในสภาวะเสียสภาพธรรมชาติจะมี 8 M Urea อยู่ในบัฟเฟอร์ตลอดทั้งระบบการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำโปรตีนมาทำให้อยู่ในสภาพธรรมชาติมีการม้วนพับของโปรตีนที่มีโครงสร้างที่ถูกต้องต่อไป)

#### 1.5 การทดลองการม้วนพับของโปรตีน (Refold Protein)

การศึกษาการแสดงออกของ pET-fMLL, pET-nsMLL และ pET-LMLL ในแบคทีเรีย นั้น ได้โปรตีนที่มีการแสดงออกในส่วนของ cell pellet เมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วเพิ่มความเข้มข้นโปรตีน โปรตีนเกิดการรวมกลุ่มตกตะกอนไม่สามารถทำงานได้ จึงทำการทดลองการม้วนพับของโปรตีนเพื่อให้โปรตีนสามารถทำงานได้ สภาวะในการทดลองการม้วนพับของโปรตีนพัฒนามาจาก Vincentelli และคณะ (2004) แล้วนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมกับ recombinant pET-MLL ทั้ง 3 โคลน ด้วยการทำใน 96-well plate สารละลายที่เตรียมใช้ในการหาสภาวะในการม้วนพับมีดังนี้ 500 mM NaOAc pH4, 5, 6 , 500 mM Tris pH 7, 8, 8.2 , 1 M NaCl, 1 M KCl, 2 M Glucose, 2 M Arginine Hydrochloride, 0.5% PEG4000, 50% Glycerol, 20 mM KCl, 5 mM EDTA, 4 M Guanidine hydrochloride และ 500 mM DTT

การม้วนพับของโปรตีนที่ต้องการ จะนำเอาโปรตีนที่ได้หลังจากทำให้บริสุทธิ์มาละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl pH8.0, 300 mM NaCl และ 8 M Urea เมื่อโปรตีนละลายนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 rpm เพื่อแยกโปรตีนบางส่วนที่ไม่ละลายออก เก็บส่วนใสมาทำการม้วนพับโปรตีน ซึ่งทดลองหาสภาวะของ refold buffer ที่เหมาะสมใน 96-well plate (ตาราง 5) โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการม้วนพับโปรตีนด้วยการวัดความขุ่นที่การดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจึงนำมาทำการม้วนพับโปรตีนในปริมาณมาก โดยสามารถทำได้ด้วยการนำส่วนใสมา dialysis ใน refold buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยน refold buffer ทุก ๆ 2 ชั่วโมง 4 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือจนกว่าจะเริ่มเห็นโปรตีนตกตะกอน จากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 rpm เก็บส่วนใส และเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการทำ freeze-dry แล้วเก็บโปรตีนไว้ทดสอบกิจกรรมโปรตีนต่อไป อีกวิธีคือ การทำ drop-wise ด้วยการใส่ refold buffer ในบีกเกอร์ แล้วค่อยๆ หยดส่วนใสของสารละลายโปรตีนลงไป จนกว่าจะเห็นโปรตีนเริ่มตกตะกอน จากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 rpm เก็บส่วนใส และเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการทำ freeze-dry แล้วเก็บโปรตีนไว้ทดสอบกิจกรรมโปรตีนต่อไปเช่นกัน

ตารางที่ 5 สภาวะการหมักของโปรตีนใน 96-well plate ปรับปรุงจาก Vincentelli *et al.* (2004)

Well No.	1	2	3	4	5	6
A	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 100 mM NaCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 100 mM NaCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 100 mM NaCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA
B	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl
C	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 0.05% PEG4000 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 0.05% PEG4000 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 0.05% PEG4000 500 mM Glucose
D	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 800 mM Arg-HCl

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Well No.	7	8	9	10	11	12
A	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 100 mM NaCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 100 mM NaCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA	50 mM Tris pH8.2 2 mM DTT 20 mM NaCl 20mM KCl	50 mM Tris pH8.2 2 mM DTT 100 mM Gd-HCl 440 mM Arg-HCl 20 mM NaCl 20mM KCl
B	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8.2 2 mM DTT 20 mM NaCl 400 mM Arg-HCl 20mM KCl	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT
C	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 500 mM Glucose	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 0.05% PEG4000 500 mM Glucose	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 100 mM NaCl 0.05% PEG4000 500 mM Glucose	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 0.05% PEG4000 500 mM Glucose	50 mM Tris pH8.2 2 mM DTT 800 mM Arg-HCl 20 mM NaCl 20mM KCl	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT
D	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8.2 50 mM Gd-HCl 2 mM DTT, 20mM KCl 20 mM NaCl	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Well No.	1	2	3	4	5	6
E	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 200 mM NaCl 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 200 mM NaCl 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 200 mM NaCl 500 mM Glucose
F	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 100 mM KCl 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 100 mM KCl 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 100 mM KCl 800 mM Arg-HCl
G	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol
H	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH4 2 mM DTT 0.05% PEG4000	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH5 2 mM DTT 0.05% PEG4000	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM NaOAc pH6 2 mM DTT 0.05% PEG4000

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Well No.	7	8	9	10	11	12
E	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 200 mM NaCl 500 mM Glucose	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 200 mM NaCl 500 mM Glucose	50 mM Tris pH8.2 2 mM DTT 50 mM Gd-HCl 20 mM NaCl 20mM KCl 400 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH7 2 mM DTT
F	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 100 mM KCl 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 200 mM NaCl 0.05% PEG4000 1 mM EDTA	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 100 mM KCl 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8.2 2 mM DTT 50 mM Gd-HCl 20 mM NaCl 20mM KCl 400 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8 2 mM DTT
G	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol 500 mM Glucose	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 100 mM KCl 20% Glycerol	50 mM Tris pH8.2 2 mM DTT 20 mM NaCl 20mM KCl	H <sub>2</sub> O
H	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH7 2 mM DTT 0.05% PEG4000	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 100 mM KCl 0.05% PEG4000 800 mM Arg-HCl	50 mM Tris pH8 2 mM DTT 0.05% PEG4000	50 mM Tris pH8.2 100 mM Gd-HCl 400 mM Arg-HCl 20 mM NaCl, 2 mM DTT, 20mM KCl	H <sub>2</sub> O

## 1.6 การตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนด้วยวิธีฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutination assay)

เมื่อได้โปรตีนที่บริสุทธิ์แล้ว ทำการตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน (activity) ด้วยการ  
ทำ Hemagglutination assay โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายในการทดสอบ เนื่องจาก MLL1  
เป็นโปรตีนเลคตินที่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มตกตะกอนได้ การทำ  
Hemagglutination จะทำการเตรียม 2% เม็ดเลือดแดงของกระต่ายในสารละลาย TBS buffer จากนั้น  
ทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการทดสอบมีความเข้มข้นลดลงแบบต่อเนื่อง (serial dilution)  
โดยใส่ TBS buffer ลงไปก่อน 25  $\mu$ l ใน 96 well-plate แล้วใส่โปรตีนบริสุทธิ์ 25  $\mu$ l ลงในหลุมแรก  
ที่ไม่มี TBS buffer และใส่โปรตีนบริสุทธิ์อีก 25  $\mu$ l ในหลุมถัดไป แล้วทำเป็น serial dilution  
จากนั้นใส่ 2% เม็ดเลือดแดงของกระต่ายลงไปทุกหลุม ผสมให้เข้ากันปล่อยให้ประมาณ 45-60 นาที  
แล้วตรวจสอบการตกตะกอน จากการอ่านค่าเป็น Haemagglutination activity (HA) unit ซึ่งเท่ากับ  
จำนวนเท่าของเลคตินที่เจือจางแล้วยังคงทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มตกตะกอนโดยสมบูรณ์  
เปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมที่ไม่ใส่โปรตีนลงไป (การตรวจสอบกิจกรรมโปรตีนได้ทำการ  
ตรวจสอบด้วยการนำโปรตีนทั้งหมด (crude protein) ทดสอบด้วย)

## 2. การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีน MLL1 และการแสดงออกในเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line

### 2.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีน MLL1 สำหรับการแสดงออกในเซลล์แมลง

#### 2.1.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับสร้างรีคอมบิแนนท์ยีน MLL1

การศึกษา MLL1 ในธรรมชาติมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 8.8 % (Ratanapo *et al.*, 1998) แต่โปรตีนที่ได้จากเซลล์แบคทีเรียไม่เกิดไกลโคซิเลชัน ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเพื่อให้โปรตีนเกิดไกลโคซิเลชันจึงทำการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีน MLL1 เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนในเซลล์แมลง โดยการแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของเลคตินเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดทั้งสายของเลคติน (full length, fMLL) ส่วนที่ 2 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วย  $\alpha$ -chain และ  $\beta$ -chain ตัดส่วนของสัญญาณโปรตีนออก (no signal MLL, nsMLL) (ภาพที่ 28)



**ภาพที่ 28** การแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ในการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีนเพื่อให้แสดงออกในเซลล์แมลง  
fMLL คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดทั้งสาย  
nsMLL คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วย  $\alpha$ -chain และ  $\beta$ -chain ตัดส่วนของสัญญาณโปรตีนออก

#### 2.1.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนเลคติน MLL1

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน MLL1 ทั้ง 2 ส่วนใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM-MLL1 เป็นต้นแบบ และออกแบบให้มีบริเวณเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย *NcoI* และ *XhoI* ซึ่งเป็นบริเวณตัดที่พบในเวกเตอร์ pFastbac HT-A การโคลนเลคตินในครั้งนี้เลือกใช้เวกเตอร์

pFastbac HT-A (ภาพที่ 29) ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ มี Polyhedrin promoter (PPH) ที่ช่วยให้ยีนที่สนใจมีการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมาก (high-level expression) ในเซลล์แมลง มี Tn7L และ Tn7R (Mini Tn7 elements) เป็นส่วนที่ช่วยขนย้ายยีนที่สนใจเข้าสู่จีโนมของไวรัส (baculovirus genome) และมี His-tag อยู่ด้าน N-terminal โดยด้าน forward primer ของแต่ละส่วนของเลคตินทำการเติมลำดับเบสของเอนไซม์ *NcoI* ลงไปก่อนบริเวณด้านหน้าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน และ ด้าน reverse primer ทำการเติมลำดับเบสของเอนไซม์ *XhoI* ลงไปต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นจะมีขนาดสั้นประมาณ 20-30 nucleotides และมี GC content ประมาณ 50% ไพรเมอร์สำหรับการโคลนทั้ง 2 ส่วนมีดังนี้

Forward fMLL 5' GCCATGGCTTCGTCTTCCTTT 3'

Forward nsMLL 5' GCCATGGGCCAACAAAGTGGGAAAAGT 3'

Reverse MLL 5' ATCTCGAGGCTGCCGCGGCCACCAG 3'

### 2.1.3 การเพิ่มปริมาณยีน MLL1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

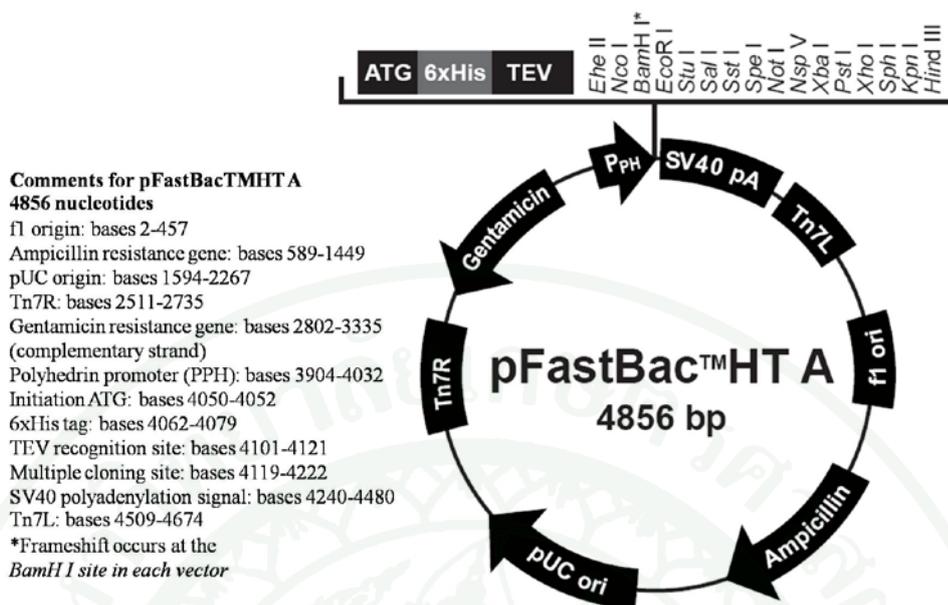
การเพิ่มปริมาณยีน MLL1 โดยใช้วิธี PCR แต่ละส่วนนั้นจะใช้ยีนจาก pGEM-MLL1 ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) จากนั้นเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์และกระบวนการดั่งขั้นตอน 1.1.3

### 2.1.4 การทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี PCR จากนั้นทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์ตามขั้นตอน 1.1.4

### 2.1.5 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอและเตรียมพลาสมิด เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์ของยีน MLL1

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ และพลาสมิดของเวกเตอร์ pFastbac HT-A ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* ตัดครั้งละ 1 เอนไซม์ ตามขั้นตอน 1.1.6



**ภาพที่ 29** แผนภาพของเวกเตอร์ pFastbac HT-A (Novagen) ประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), Polyhedrin promoter (PPH), Tn7L และ Tn7R (Mini Tn7 elements), ampicillin resistant gene, gentamicin resistant gene และ His tag ด้าน N-terminal

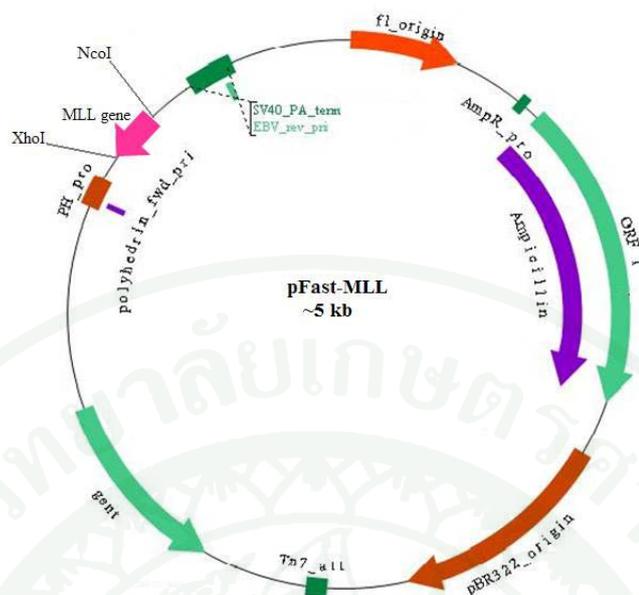
### 2.1.6 การเชื่อมต่อยีน MLL1 กับเวกเตอร์ pFastbac HT-A

เมื่อได้ชิ้นยีนแต่ละส่วน และเวกเตอร์ pFastbac HT-A ที่ถูกตัด จากนั้นทำการเชื่อมต่อเพื่อให้ได้ recombinant pFastBac-MLL ตามขั้นตอน 1.1.7 จะได้ recombinant pFastBac-MLL (pFast-fMLL และ pFast-nsMLL) (ภาพที่ 30) ที่พร้อมทำการขนย้ายยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

### 2.1.7 การขนย้าย recombinant pFastBac-MLL เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

นำ recombinant pFastBac-MLL (pF-fMLL และ pF-nsMLL) ที่ได้จากการเชื่อมต่อมาขนย้ายเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock transformation ตามขั้นตอน

### 1.1.8



**ภาพที่ 30** แผนภาพของพลาสมิด pFast-MLL ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (Ori), Polyhedrin promoter (PPH), Tn7L และ Tn7R (Mini Tn7 elements), ampicillin resistant gene, gentamicin resistant gene, His-tag ด้าน N-terminal และยีน MLL โดยยีนแต่ละส่วนที่แบ่งจะถูกเชื่อมต่อบริเวณเดียวกัน

## 2.2 การเหนี่ยวนำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนแสดงออกในเซลล์แมลง

### 2.2.1 การขนย้าย recombinant pFastBac-MLL เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH10Bac

นำ recombinant pFastBac-MLL (pFast-fMLL และ pFast-nsMLL) แต่ละโคลนที่ได้แล้วมาขนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH10Bac ด้วยวิธี heat shock transformation เพื่อแทรกชิ้นยีนเข้ากับยีนของ *Baculovirus* โดยใช้ pFastBac-MLL 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ใส่ใน competent cells 50  $\mu\text{l}$  ในหลอด 1.5 ml แล้วบ่มไว้บนน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไป heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90-120 วินาที แล้วนำไปไว้บนน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ S.O.C. Medium ลงไป 600  $\mu\text{l}$  แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำมาเขย่าต่อที่ 220 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-4 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยง 5,000 rpm นาน 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มี 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tetracycline, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  X-gal, และ 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  IPTG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (Anderson *et al.*, 1996)

## 2.2.2 การคัดเลือกโคลน

2.2.2.1 การคัดเลือกโคลนครั้งแรกสามารถตรวจสอบได้จากโคโลนีสีฟ้า/สีขาว (blue/white selection) ที่ขึ้นบนเพลทที่มี 100 µg/ml X-gal และ 40 µg/ml IPTG โคโลนีที่มียีน pFastBac-MLL จะมีสีขาวขุ่น

2.2.2.2 การทำโคโลนีพีซีอาร์ (colony PCR) นำโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบยีนด้วยการทำโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13 แล้วเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb DNA marker) ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ M13 มีดังนี้

M13 Forward (-40) 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

M13 Reverse 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน ประกอบด้วย 10 ng Recombinant bacmid MLL, 1X PCR reaction Buffer, 1 mM dNTP Mix, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM M13 Forward, 1 µM M13 Reverse และ 5 U *Taq* polymerase สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ ขั้นที่ 1 Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ขั้นที่ 3 Last-extension บ่มด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที การทำปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 2 ทั้งหมด 25-30 รอบ จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของยีน MLL1 แต่ละส่วน ด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลในสารละลายด้วย ethidium bromide นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบและขนาดของยีนด้วยเครื่อง UV Transilluminator

2.2.2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยทำการสกัดพลาสมิดให้มีความบริสุทธิ์ แล้วส่งพลาสมิดนั้นตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ MacroGen จากนั้นวิเคราะห์สัญญาณและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ แล้วเปรียบเทียบกับความถูกต้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MLL1 ด้วยโปรแกรม ClustalW

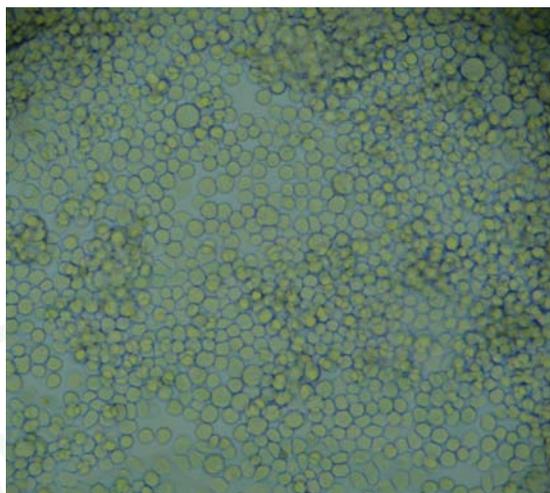
### 2.2.3 การเตรียม recombinant Bacmid-MLL

เมื่อได้ recombinant Bacmid-MLL ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องแล้ว ทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป ให้ได้ recombinant Bacmid-MLL ให้มีความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  เพื่อนำไปขนย้ายยีน (Transfection) เข้าสู่เซลล์แมลง

### 2.2.4 การขนย้าย recombinant Bacmid-MLL เข้าสู่เซลล์แมลงชนิด Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)

การเตรียมเซลล์แมลง Sf9 (ภาพที่ 31) ก่อนการขนย้าย recombinant Bacmid-MLL ควรเตรียมให้เซลล์เรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) มีจำนวนเซลล์  $2 \times 10^6$  cell/well ใน 6 well plate เมื่อเซลล์พร้อมแล้วทำการเตรียมสารละลายที่ 1 (1.2  $\mu\text{g}$  recombinant Bacmid-MLL ใน 50  $\mu\text{l}$  อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีซีรัมและ antibiotics) และสารละลายที่ 2 (3.6  $\mu\text{l}$  Cellfectin ใน 50  $\mu\text{l}$  อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีซีรัมและ antibiotics) จากนั้นผสมสารละลายที่ 1 และ 2 เข้าด้วยกันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้ recombinant Bacmid-MLL แทรกเข้าสู่ Cellfectin แล้วนำสารละลายผสมใส่ใน 6 well plate ผสมอย่างระมัดระวัง บ่มทิ้งไว้ นาน 3-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารที่มีซีรัมและ antibiotics แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง (Anderson *et al.*, 1996) จนสังเกตเห็นลักษณะที่เรียกว่า cytopathic effects (CPE) และเซลล์เริ่มแตก

จากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm นาน 15 นาที แยกเซลล์เก็บส่วนใสที่เป็นอาหารไวรัส (P1 viral baculovirus) ตรวจสอบ Baculovirus ที่ถูกขนย้ายยีนมี recombinant Bacmid-MLL ด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ M13 จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณ Baculovirus โดยนำ P1 Viral Baculovirus ไปผสมกับเซลล์ Sf9 อีก 3-4 รอบ ให้ได้ P3 Viral Baculovirus แล้วเตรียมเซลล์ใน TC-flask ขนาด 75  $\text{cm}^2$  ให้เซลล์เรียงตัวเป็นชั้นเดียว สำหรับการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมาก เมื่อเซลล์พร้อมนำ P3 Viral Baculovirus ไปผสมกับเซลล์ Sf9 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง จนสังเกตเห็น 80% CPE หรือเซลล์เริ่มแตก ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm นาน 15 นาที แยกเก็บเซลล์ แล้วนำมาตรวจสอบโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE จากนั้นทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ และตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน



ภาพที่ 31 เซลล์แมลงชนิด *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line

### 2.3 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย Western blot

การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินเข้าสู่เวกเตอร์ pFastBacHT-A ซึ่งมี His-tag อยู่ด้าน N-terminal นั้นสามารถทำการตรวจสอบโปรตีนได้ด้วยการทำ Western blot ซึ่งใช้ Penta-His Alexa Fluor Conjugates ในการจับกับ His-tag ที่ติดอยู่กับโปรตีนเลคตินได้ จากนั้นทำการตรวจสอบโปรตีนด้วย Western blot ตามขั้นตอน 1.3

### 2.4 การทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์

การเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากเซลล์แมลงให้บริสุทธิ์ ทำได้ด้วยวิธี affinity chromatography โดยผ่านคอลัมน์ที่มี nickel chelate resin เนื่องจาก pFastBacHT A มี 6xHis Tag อยู่ด้าน N-terminal ดังนั้นจึงสามารถนำ recombinant Bac-MLL มาทำให้บริสุทธิ์ได้ ตามขั้นตอน 1.4

### 2.5 การตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนด้วยวิธีฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutination assay)

เมื่อได้โปรตีนที่บริสุทธิ์แล้ว ทำการตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน ตามขั้นตอน 1.6

### 3. การออกแบบและวิศวกรรมโปรตีนโดยเทคนิค computer-based design

การเตรียมโครงสร้างของโปรตีน โดยทำการคาดคะเนลำดับกรดอะมิโนของเลคติน MLL1 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วพบว่า MLL1 มีความคล้ายกับ jacalin related lectin จาก *Maclura pomifera* (MPA) ถึง 78.2% (Getsang, 2007) มีความเหมือนมากที่สุด แล้วนำมาทำการออกแบบโครงสร้าง 3 มิติ ใช้โปรแกรม Modeller9v1 โดยใช้โครงสร้างของ MPA เป็นต้นแบบ (PDB: 1JOT) โดยทำการลบน้ำออกจากโครงสร้างที่ได้และทำการเติมไฮโดรเจน จะได้ homology model ของเลคติน ที่พร้อมนำมาทำการจับกับลิแกนด์ (Docking)

การเตรียมลิแกนด์ที่จะใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้แก่ น้ำตาลเอ็น-อะเซทิลกาแล็กโทซามีน (*N*-acetyl- $\beta$ -galactosamine (GalNAc)), น้ำตาลกลูโคส (Glucose (Glc)), น้ำตาลกาแล็กโทส (Galactose (Gal)), น้ำตาลแมนโนส (Mannose (Man)), น้ำตาลไดแซ็กคาร์ไรด์กาแล็กโทส-เอ็นอะเซทิลกาแล็กโทซามีน (Gal $\beta$ 1,3GalNAc) และอนุพันธ์กรดเซียลิก คือ กรดเอ็น-ไกลโคซิล-นิวรามินิก (*N*-glycolyl- neuraminic acid (Neu5Gc)) สามารถสร้างขึ้นโดยใช้โปรแกรม SYBYL v.7.3 (Tripos Associates, St. Louis, MO, U.S.A.) แล้วทำการลดระดับพลังงานให้อยู่ในค่าที่เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน

หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาระบบการจับกัน (molecular docking) ระหว่าง homology model ของเลคตินที่ได้กับน้ำตาลชนิดต่างๆ (ลิแกนด์ที่เตรียมไว้) โดยใช้โปรแกรม AutoDock3.0.5 โดยทำให้โครงสร้างโปรตีนอยู่ในสภาพแข็ง (rigid) ทำการสร้างกล่องกริด (Grid box) ที่มีขนาด 40, 40 และ 40 (x,y,z) อังสตรอม โดยให้โมเลกุลของลิแกนด์เป็นจุดศูนย์กลางของกล่อง และลิแกนด์สามารถปรับตัวได้ (flexible) ตั้งค่าพารามิเตอร์ดังนี้คือ Genetic Algorithm (GA) จำนวนซ้ำ 50 รอบ จำนวน population size เท่ากับ 150 และอัตราการเกิด gene mutation และ crossover เท่ากับ 0.02 และ 0.8 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์การทำ molecular docking ที่สามารถจับกับน้ำตาลดังกล่าว วิธีนี้สามารถคำนวณหาค่าพลังงานในการจับกัน (estimated docked energy) ระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์นั้นๆ ได้ ซึ่งค่าพลังงานต่ำที่สุดจะบ่งบอกถึงโครงสร้างที่จับกันได้ดีที่สุดในที่สุด

จากนั้นทำการจำลองการจับกันด้วยเทคนิค Molecular Dynamics Simulation เพื่อทำการจำลองความเสถียรในการจับกันของโปรตีนและลิแกนด์ในสถานะที่มีน้ำ และค้นหากรดอะมิโนที่มีอิทธิพลในการจับกันระหว่างเลคตินกับน้ำตาลเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการจับกัน โครงสร้างที่ดีที่สุด

จากการทำ molecular docking ถูกใช้เป็น โครงสร้างเบื้องต้นในการทำ Molecular Dynamics Simulation ด้วยโปรแกรม Discover Studio 2.1 (Accelrys Inc., CA) โดยใช้ CHARMM forcefield ขั้นแรกระบบที่มีโครงสร้างระหว่างเลคตินกับน้ำตาลจะถูกเติมน้ำชนิด TIP3P ในแบบ spherical boundary with harmonic restraint โดยมีขอบเขตจากโมเลกุลของน้ำตาลออกไปในรัศมี 20 อังสตรอม จากนั้นโครงสร้างในระบบดังกล่าวจะถูกลดค่าระดับพลังงานด้วยวิธี steepest descent และ conjugate gradient หลังจากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิแก่ระบบตั้งแต่ 0-300 K เป็นเวลา 5 picoseconds (ps) ต่อด้วย equilibration ที่อุณหภูมิ 300 K อีก 150 ps ขั้นตอนสุดท้ายคือ full MD production ที่ 300 K แบบ NPT ensemble เป็นเวลา 150 ps ผลที่ได้จากขั้นตอน production จะถูกนำมาคำนวณค่าพลังงาน (Interaction energy) โดยใช้ package ภายในโปรแกรม Discover Studio 2.1 (Accelrys Inc., CA)

เนื่องจาก MLL1 สามารถจับกับกรดเซียลิก และ GalNAc ได้ด้วยความจำเพาะในการจับ ( $K_d$ ) ไม่ต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการออกแบบโครงสร้างโปรตีน MLL1 ให้มีความจำเพาะต่อกรดเซียลิกได้ดีกว่า GalNAc (ค่าพลังงานในการจับกันแตกต่างกันมาก) จึงทำการออกแบบโครงสร้างโปรตีนที่มีการเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนบางตำแหน่งในบริเวณจับ (binding site) แล้วนำไปทำ Molecular docking กับลิแกนด์ (Neu5Gc และ GalNAc) แล้วเปรียบเทียบค่าพลังงานในการจับกันระหว่างโครงสร้างโปรตีนแบบต่างๆ กับลิแกนด์

## ผลและวิจารณ์ผล

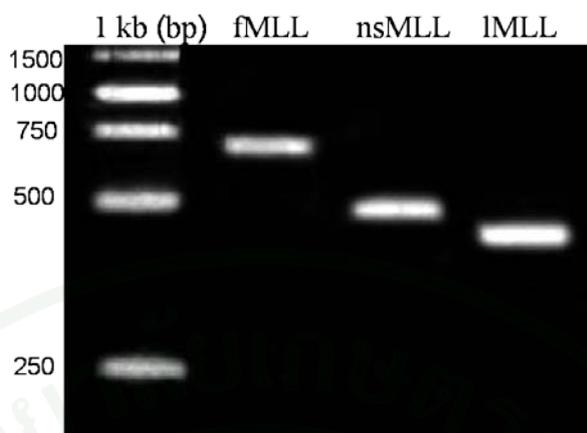
### ผล

#### 1. การสร้างและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินในเซลล์แบคทีเรีย

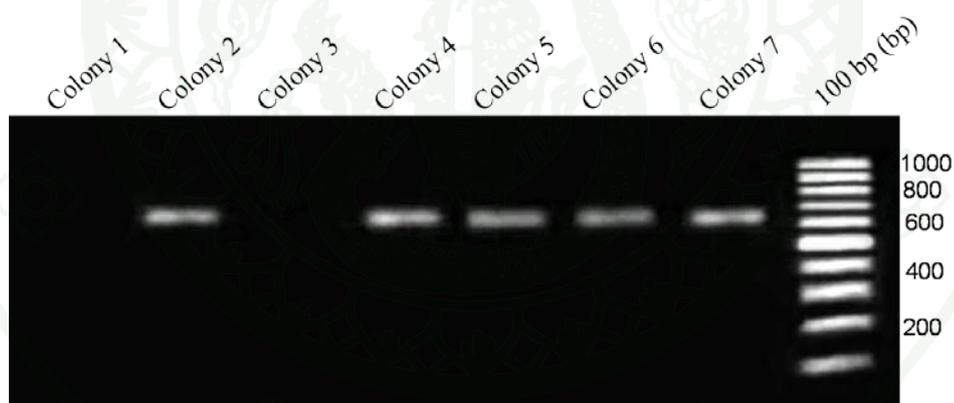
##### 1.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีนเลคตินเข้าเวกเตอร์ pGEM T-Easy

เมื่อได้ไพรเมอร์ของยีนแต่ละส่วน ทำการเพิ่มปริมาณยีน MLL1 ด้วยวิธี PCR โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์รวมกันแล้ว พบว่า fMLL มีจำนวน 690 นิวคลีโอไทด์ nsMLL มีจำนวน 506 นิวคลีโอไทด์ และ LMLL มีจำนวน 436 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ผลจากการเพิ่มปริมาณยีน MLL1 ด้วยวิธี PCR แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ fMLL ที่ขนาดประมาณ 700 คู่เบส ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ nsMLL ที่ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ LMLL ที่ขนาดประมาณ 450 คู่เบส (ภาพที่ 32) จากนั้นทำการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แต่ละส่วนของยีนเข้ากับ pGEM T-easy vector แล้วคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มียีน MLL1 ตรวจสอบการขนถ่ายยีนอีกครั้งด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ พบว่า pGEM-fMLL มียีน fMLL ในโคโลนีที่ 2, 4, 5, 6 และ 7 (ภาพที่33) pGEM-nsMLL มียีน nsMLL ในโคโลนีที่ 2, 3 และ 4 (ภาพที่34) และ pGEM-LMLL มียีน LMLL ในโคโลนีที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 (ภาพที่35) ขนาดของยีน MLL1 แต่ละส่วน มีขนาดเท่ากับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

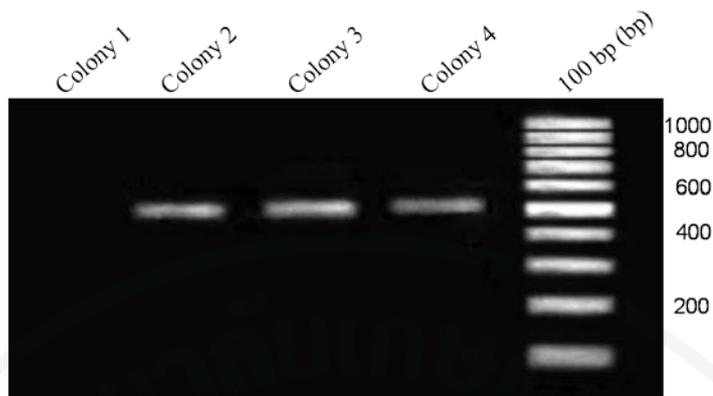
เมื่อได้โคลนที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM T-easy แล้วตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแต่ละส่วนด้วยเทคนิค Sequencing DNA โดยเลือก pGEM-fMLL โคโลนีที่ 5 pGEM-nsMLL โคโลนีที่ 4 และ pGEM-LMLL โคโลนีที่ 5 ไปตรวจสอบและทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแต่ละส่วน โดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่า pGEM-fMLL, pGEM-nsMLL และ pGEM-LMLL ที่เลือกเพื่อตรวจสอบนั้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MLL1 แต่ละส่วนตามที่แบ่งไว้ 100% (ภาพที่ 36, 37 และ 38)



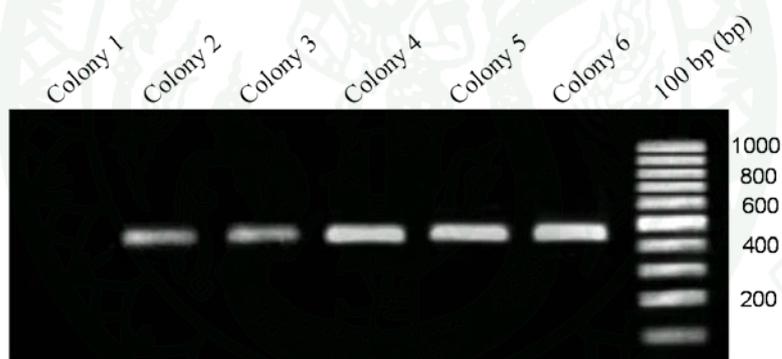
ภาพที่ 32 ขนาดของการสังเคราะห์ยีน MLL1 แต่ละส่วน ด้วยวิธีพีซีอาร์ ยีน fMLL มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส, nsMLL มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส และIMLL มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 33 การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pGEM-fMLL ทั้ง 7 โคลนี มียีน fMLL 5 โคลนี มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค 1% agarose gel electrophoresis



**ภาพที่ 34** การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pGEM-nsMLL ทั้ง 4 โคลนี มียีน nsMLL 3 โคลนี มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ตรวจสอบโดย 1% agarose gel electrophoresis



**ภาพที่ 35** การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pGEM-LMLL ทั้ง 6 โคลนี มียีน LMLL 5 โคลนี มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ตรวจสอบโดย 1% agarose gel electrophoresis

```

pGEM_fMML GGAAGCTAGCATGCTGATGGCTTCGTCTTCCTTTCTCTCCCTCTCCTTCCTCGTCCTCCT 60
fMML      GGAAGCTAGCATGCTGATGGCTTCGTCTTCCTTTCTCTCCCTCTCCTTCCTCGTCCTCCT 60
          *****

pGEM_fMML CTTCTCTATCTCCTCTGCCAACACCCGAAAGTGGTCCTTGTCAAATGTTCTCGATCAGAA 120
fMML      CTTCTCTATCTCCTCTGCCAACACCCGAAAGTGGTCCTTGTCAAATGTTCTCGATCAGAA 120
          *****

pGEM_fMML ACCGATCAGCATAATCGAGGCCGCCATTGGAGTTTCTGAAGACCTTCTTAATCTCAATGG 180
fMML      ACCGATCAGCATAATCGAGGCCGCCATTGGAGTTTCTGAAGACCTTCTTAATCTCAATGG 180
          *****

pGEM_fMML GATGGAAGCTAAAAACAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATG 240
fMML      GATGGAAGCTAAAAACAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATG 240
          *****

pGEM_fMML GGGAGCCCAAGCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGTGATGACGGTTCATACACCCGGAAT 300
fMML      GGGAGCCCAAGCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGTGATGACGGTTCATACACCCGGAAT 300
          *****

pGEM_fMML AAGAGAAATCAATTTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTA 360
fMML      AAGAGAAATCAATTTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTA 360
          *****

pGEM_fMML CGATGTGAATGGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCAC 420
fMML      CGATGTGAATGGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCAC 420
          *****

pGEM_fMML ACCAGTAAAGATTTCCCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACAC 480
fMML      ACCAGTAAAGATTTCCCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACAC 480
          *****

pGEM_fMML TGGTAAAGTGAGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAGACTAACAAAGAAAC 540
fMML      TGGTAAAGTGAGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAGACTAACAAAGAAAC 540
          *****

pGEM_fMML TTATGGACCATATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTT 600
fMML      TTATGGACCATATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTT 600
          *****

pGEM_fMML AATTGTTGGATTTAAAGGAAGTGTCCGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGC 660
fMML      AATTGTTGGATTTAAAGGAAGTGTCCGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGC 660
          *****

pGEM_fMML ACTTCTGGTGGGCCCGCGGCAGCCTCGAGAT 690
fMML      ACTTCTGGTGGGCCCGCGGCAGCCTCGAGAT 690
          *****

```

ภาพที่ 36 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

pGEM-fMML กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMML โดยใช้โปรแกรม ClustalW ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM-fMML ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMML ทุกนิวคลีโอไทด์

```

pGEM_nsMLL GCTAGCATGAACAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATGGGGA 60
nsMLL GCTAGCATGAACAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATGGGGA 60
*****

pGEM_nsMLL GCCCAAGCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGGATGACGGTTCATACACCGGAATAAGA 120
nsMLL GCCCAAGCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGGATGACGGTTCATACACCGGAATAAGA 120
*****

pGEM_nsMLL GAAATCAATTTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGAT 180
nsMLL GAAATCAATTTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGAT 180
*****

pGEM_nsMLL GTGAATGGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCA 240
nsMLL GTGAATGGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCA 240
*****

pGEM_nsMLL GTAAAGATTTCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGT 300
nsMLL GTAAAGATTTCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGT 300
*****

pGEM_nsMLL AAAGTGAGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTAT 360
nsMLL AAAGTGAGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTAT 360
*****

pGEM_nsMLL GGACCATATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTTAATT 420
nsMLL GGACCATATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTTAATT 420
*****

pGEM_nsMLL GTTGGATTTAAAGGAAGTGTGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGCACTT 480
nsMLL GTTGGATTTAAAGGAAGTGTGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGCACTT 480
*****

```

ภาพที่ 37 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

pGEM-nsMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nsMLL โดยใช้โปรแกรม ClustalW ลำดับ  
นิวคลีโอไทด์ของ pGEM-nsMLL ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nsMLL ทุก  
นิวคลีโอไทด์

```

pGEM_LMLL ATGCTAGCATGGGCGTGGCGTTTGATGATGGTTCATACACCGGAATAAGAGAAATCAATT 60
LMLL ATGCTAGCATGGGCGTGGCGTTTGATGATGGTTCATACACCGGAATAAGAGAAATCAATT 60
*****

pGEM_LMLL TTGAATATAATAATGAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGATGTGAATGGTA 120
LMLL TTGAATATAATAATGAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGATGTGAATGGTA 120
*****

pGEM_LMLL CGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCAGTAAAGATTT 180
LMLL CGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCAGTAAAGATTT 180
*****

pGEM_LMLL CCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGTAAAGTGAGCG 240
LMLL CCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGTAAAGTGAGCG 240
*****

pGEM_LMLL GGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTATGGACCATATG 300
LMLL GGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTATGGACCATATG 300
*****

pGEM_LMLL GAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTTAATTGTTGGATTTA 360
LMLL GAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTTAATTGTTGGATTTA 360
*****

pGEM_LMLL AAGGAAGTGTGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGCACTTCTGGTGGGCC 420
LMLL AAGGAAGTGTGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGCACTTCTGGTGGGCC 420
*****

pGEM_LMLL GCGGCAGCCTCGAGAT 436
LMLL GCGGCAGCCTCGAGAT 436
*****

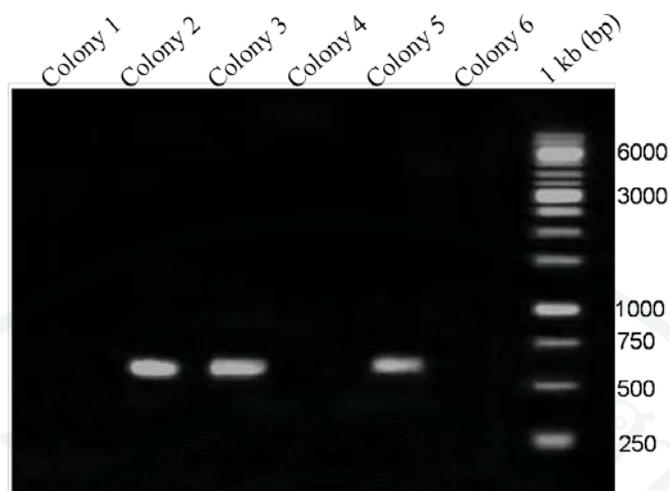
```

**ภาพที่ 38** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

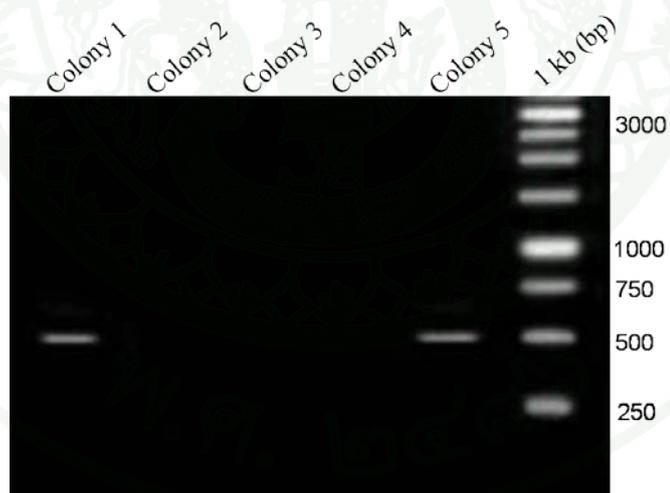
pGEM-LMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LMLL โดยใช้โปรแกรม ClustalW ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM-LMLL ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LMLL ทุกนิวคลีโอไทด์

## 1.2 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด MLL1 ในเวกเตอร์ pET21a

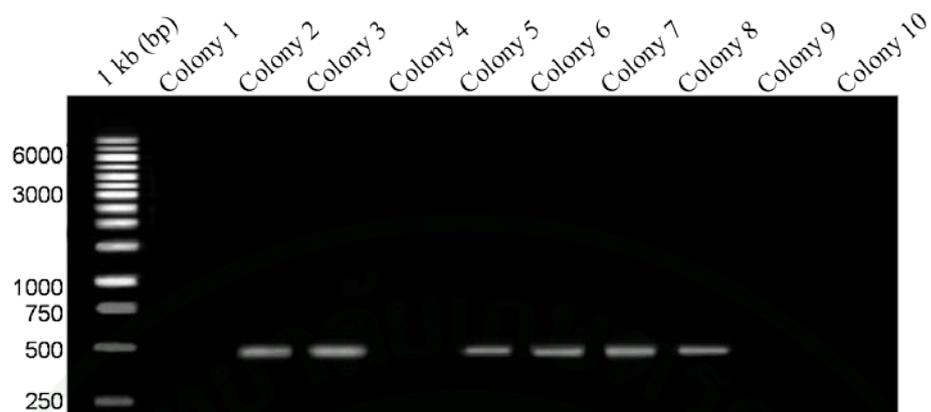
การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีน MLL1 โดยใช้เวกเตอร์ pET21a เป็น expression vector ตัดแต่ละยีนจาก pGEM-fMLL, pGEM-nsMLL และ pGEM-LMLL และตัดพลาสมิดของเวกเตอร์ pET21a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *XhoI* จากนั้นนำส่วนของยีนและพลาสมิดของเวกเตอร์ที่ถูกตัดมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วขนถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  พบว่ายีนของ fMLL, nsMLL และ LMLL สามารถแทรกเข้าสู่พลาสมิดของ pET21a ได้สำเร็จและเรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pET-fMLL, pET-nsMLL และ pET-LMLL ตามลำดับ ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-fMLL ได้ทั้งหมด 6 โคลน ตรวจสอบด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์มียีน fMLL ในโคลนที่ 2, 3 และ 5 (ภาพที่ 39) รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-nsMLL ได้ทั้งหมด 5 โคลน มียีน nsMLL ในโคลนที่ 1 และ 5 (ภาพที่ 40) รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-LMLL ได้ทั้งหมด 10 โคลน มียีน LMLL ในโคลนที่ 2, 3, 5, 6, 7 และ 8 (ภาพที่ 41) จากนั้นเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดอย่างละ 1 โคลน โดย pET-fMLL เลือกโคลนที่ 2, pET-nsMLL เลือกโคลนที่ 5 และ pET-LMLL เลือกโคลนที่ 3 ทำการสกัดพลาสมิด แล้วตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแต่ละโคลน ด้วยเทคนิค Sequencing DNA พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-fMLL และ pET-nsMLL มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMLL และ nsMLL ทุกนิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ (ภาพที่ 42 และภาพที่ 43) แต่รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-LMLL มีลำดับนิวคลีโอไทด์ผิด 1 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 448 (ภาพที่ 44) เมื่อทำการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Translation (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>) และทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่ากรดอะมิโนเปลี่ยนไป 1 ตำแหน่ง จากกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (I) เป็นกรดอะมิโนวาเลีน (V) แต่เนื่องจากกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มไม่มีขั้วเหมือนกัน (ภาพที่ 45) และไม่อยู่ในบริเวณจับจำเพาะ จึงไม่น่าจะมีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของโปรตีนเลคติน จึงนำโคลนที่ได้ทั้ง 3 โคลน มาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนต่อไป



**ภาพที่ 39** การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pET-fMLL ทั้ง 6 โคลโลนี มียีน fMLL 3 โคลโลนี มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis



**ภาพที่ 40** การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pET-nsMLL ทั้ง 5 โคลโลนี มียีน nsMLL 2 โคลโลนี มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 41 การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pET-LMLL ทั้ง 10 โคลนี มียีน LMLL 6 โคลนี มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

```

pET_fMML  GGAAGCTAGCATGCTGATGGCTTCGTCTTCCTTTCTCTCCCTCTCCTTCCTCGTCCCTCCT 60
fMML      GGAAGCTAGCATGCTGATGGCTTCGTCTTCCTTTCTCTCCCTCTCCTTCCTCGTCCCTCCT 60
          *****

pET_fMML  CTTCTCTATCTCCTCTGCCAACACCCGAAAGTGGTCCTTGTCAAATGTTCTCGATCAGAA 120
fMML      CTTCTCTATCTCCTCTGCCAACACCCGAAAGTGGTCCTTGTCAAATGTTCTCGATCAGAA 120
          *****

pET_fMML  ACCGATCAGCATAATCGAGGCCGCCATTGGAGTTTCTGAAGACCTTCTTAATCTCAATGG 180
fMML      ACCGATCAGCATAATCGAGGCCGCCATTGGAGTTTCTGAAGACCTTCTTAATCTCAATGG 180
          *****

pET_fMML  GATGGAAGCTAAAAACAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATG 240
fMML      GATGGAAGCTAAAAACAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATG 240
          *****

pET_fMML  GGGAGCCCAAGCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGTGACGGTTCATACACCCGGAAT 300
fMML      GGGAGCCCAAGCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGTGACGGTTCATACACCCGGAAT 300
          *****

pET_fMML  AAGAGAAATCAATTTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTA 360
fMML      AAGAGAAATCAATTTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTA 360
          *****

pET_fMML  CGATGTGAATGGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCAC 420
fMML      CGATGTGAATGGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCAC 420
          *****

pET_fMML  ACCAGTAAAGATTTCCCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACAC 480
fMML      ACCAGTAAAGATTTCCCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACAC 480
          *****

pET_fMML  TGGTAAAGTGAGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAGACTAACAAAGAAAC 540
fMML      TGGTAAAGTGAGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAGACTAACAAAGAAAC 540
          *****

pET_fMML  TTATGGACCATATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTT 600
fMML      TTATGGACCATATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTT 600
          *****

pET_fMML  AATTGTTGGATTTAAAGGAAGTGTCCGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGC 660
fMML      AATTGTTGGATTTAAAGGAAGTGTCCGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGC 660
          *****

pET_fMML  ACTT 664
fMML      ACTT 664
          ****

```

ภาพที่ 42 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

pET-fMML กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMML โดยใช้โปรแกรม ClustalW ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-fMML ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMML ทุกนิวคลีโอไทด์

```

pET_nsMML  GCTAGCATGAACAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATGGGGA 60
nsMML      GCTAGCATGAACAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATGGGGA 60
*****

pET_nsMML  GCCCAAGCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGTATGACGGTTCATACACCGGAATAAGA 120
nsMML      GCCCAAGCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGTATGACGGTTCATACACCGGAATAAGA 120
*****

pET_nsMML  GAAATCAATTTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGAT 180
nsMML      GAAATCAATTTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGAT 180
*****

pET_nsMML  GTGAATGGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCA 240
nsMML      GTGAATGGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCA 240
*****

pET_nsMML  GTAAAGATTTCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGT 300
nsMML      GTAAAGATTTCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGT 300
*****

pET_nsMML  AAAGTGAGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTAT 360
nsMML      AAAGTGAGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTAT 360
*****

pET_nsMML  GGACCATATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCAATCCAAAATGGCTTAATT 420
nsMML      GGACCATATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCAATCCAAAATGGCTTAATT 420
*****

pET_nsMML  GTTGGATTTAAAGGAAGTGTGCGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTT 473
nsMML      GTTGGATTTAAAGGAAGTGTGCGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTT 473
*****

```

**ภาพที่ 43** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

pET-nsMML กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nsMML โดยใช้โปรแกรม ClustalW ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-nsMML ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nsMML ทุกนิวคลีโอไทด์

```

pET_LMLL ATGCTAGCATGGGCGTGGCGTTTGGATGATGGTTCATACACCCGGAATAAGAGAAATCAATT 60
LMLL ATGCTAGCATGGGCGTGGCGTTTGGATGATGGTTCATACACCCGGAATAAGAGAAATCAATT 60
*****

pET_LMLL TTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGATGTGAATGGTA 120
LMLL TTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGATGTGAATGGTA 120
*****

pET_LMLL CGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCAGTAAAGATTT 180
LMLL CGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCAGTAAAGATTT 180
*****

pET_LMLL CCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGTAAAGTGAGCG 240
LMLL CCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGTAAAGTGAGCG 240
*****

pET_LMLL GGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAGAAACTTATGGACCATATG 300
LMLL GGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAGAAACTTATGGACCATATG 300
*****

pET_LMLL GAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCAATCCAAAATGGCTTAGTTGTTGGATTTA 360
LMLL GAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCAATCCAAAATGGCTTAGTTGTTGGATTTA 360
*****

pET_LMLL AAGGAAGTGTGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGCACTT 410
LMLL AAGGAAGTGTGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGCACTT 410
*****

```

**ภาพที่ 44** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-LMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LMLL โดยใช้โปรแกรม ClustalW ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-LMLL ผิด 1 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 448

```

LMLL MGVAFDDGSYTGIREINFEYNNETAIGSIQVTDVNGTPEAKKHASFITGFTPVKISLD 60
pET-LMLL MGVAFDDGSYTGIREINFEYNNETAIGSIQVTDVNGTPEAKKHASFITGFTPVKISLD 60
*****

LMLL FPSEYIAEVSGYTGKVSQYIVVRSLSLTFKTNKETYGPYGVTSGTHFKLPIQNLIVGFKGS 120
pET-LMLL FPSEYIAEVSGYTGKVSQYIVVRSLSLTFKTNKETYGPYGVTSGTHFKLPIQNLIVGFKGS 120
*****

LMLL VGYWLDYIGFHLALLVGRGSLE 142
pET-LMLL VGYWLDYIGFHLALLVGRGSLE 142
*****

```

**ภาพที่ 45** การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ pET-LMLL กับลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-LMLL พบกรดอะมิโนเปลี่ยนจากกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (I) เป็นกรดอะมิโนวาเลีน (V) (Highlight)

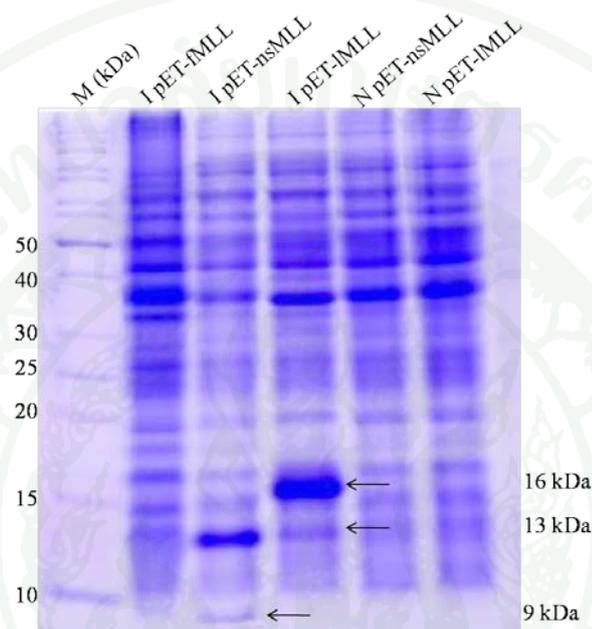
### 1.3 การเหนี่ยวนำให้โปรตีนเลคตินแสดงออก

#### 1.3.1 การถ่ายรีคอมบิแนนท์เลคตินเข้าสู่ *E.coli* BL21(DE3) และการแสดงออก

เมื่อได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pET-fMLL, pET-nsMLL และ pET-LMLL จึงนำมาถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์โปรตีน โดยเซลล์แบคทีเรียจะถูกกระตุ้นให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 0.2% Lactose ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET-fMLL เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนและรวมกรดอะมิโนฮิสติดีนของเวกเตอร์อีก 6 เรซิดิว รวมแล้วมีกรดอะมิโนทั้งหมด 232 เรซิดิว คำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลด้วยโปรแกรม FastPCR ได้ 25.50 kDa, pET-nsMLL มี 172 เรซิดิว ได้ 18.97 kDa และ pET-LMLL มี 148 เรซิดิว ได้ 16.50 kDa ตามลำดับ ตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE พบว่า pET-fMLL ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย จากการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีน ไม่มีแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นมาจากแถบโปรตีนทั่วไปของเซลล์แบคทีเรีย (ภาพที่ 46) ในขณะที่ pET-nsMLL มีแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นมา ซึ่งตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยโปรแกรม Infinity-Capt ได้ขนาดประมาณ 13 kDa และ 9 kDa (ภาพที่ 46 และภาพที่ 47) และ pET-LMLL มีแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นมาที่ขนาดประมาณ 16 kDa และ 13 kDa (ภาพที่ 46 และภาพที่ 47) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่เป็น inclusion bodies อีกด้วย

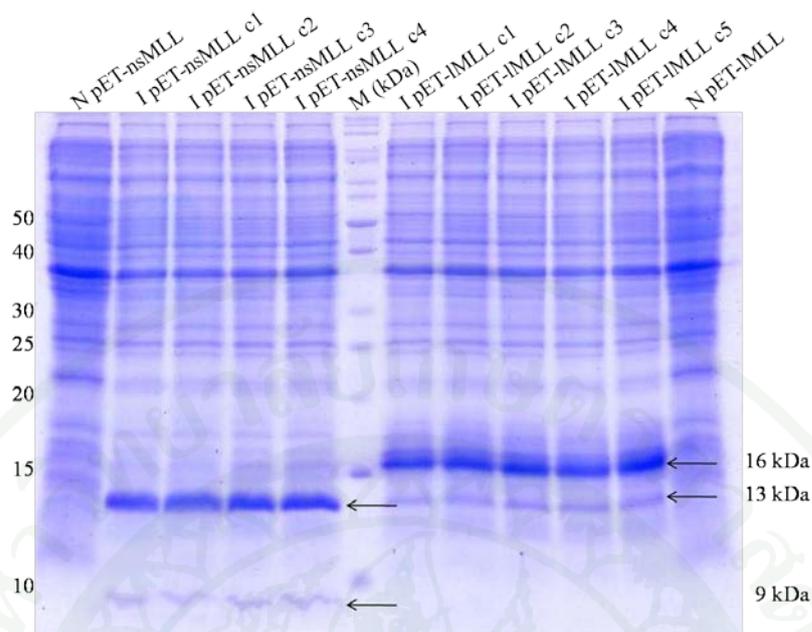
การหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนอยู่ในสถานะละลายน้ำ (soluble) ด้วยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและสารที่ใช้เหนี่ยวนำเซลล์แบคทีเรียให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน เมื่อเปรียบเทียบเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-nsMLL ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เซลล์แบคทีเรียมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนน้อยมาก แต่เซลล์ที่เลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนปกติ ส่วนเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-LMLL ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนปกติ เมื่อเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์แบคทีเรียด้วย 0.2% Lactose และ 1mM IPTG เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณโปรตีนที่ได้ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 48) และการหาเวลาในการเหนี่ยวนำที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของโปรตีนนั้น เปรียบเทียบโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเหนี่ยวนำด้วย 0.2% Lactose เริ่มต้นที่ 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่าการผลิตโปรตีนในชั่วโมงที่ 4 มีการผลิตโปรตีนได้ปริมาณมาก และเริ่มมีปริมาณโปรตีน

คงที่ในชั่วโมงที่ 6 ของการกระตุ้น (ภาพที่ 49) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง pET-nsMLL และ pET-LMLL คือ เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหนี่ยวนำเซลล์ด้วย 0.2% Lactose เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แตริคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMLL และ pET-LMLL ยังคงเป็น inclusion bodies เช่นเดิม (ภาพที่ 50)

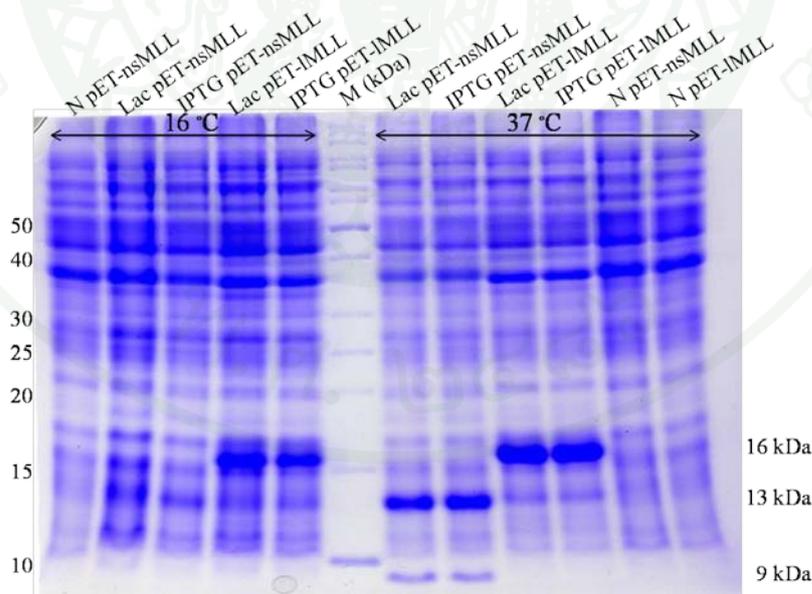


**ภาพที่ 46** การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-fMLL, pET-nsMLL และ pET-LMLL ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.2% Lactose อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE

M คือ Protein Marker, I คือ induced, N คือ non-induced

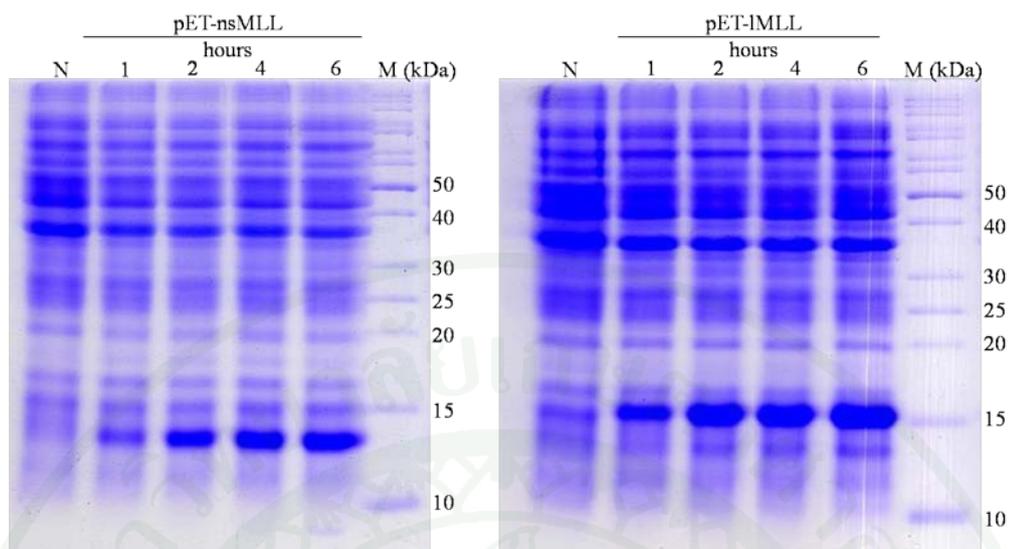


ภาพที่ 47 การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-nsMML และ pET-LMML ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.2% Lactose อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE M คือ Protein Marker, I คือ induced, N คือ non-induced

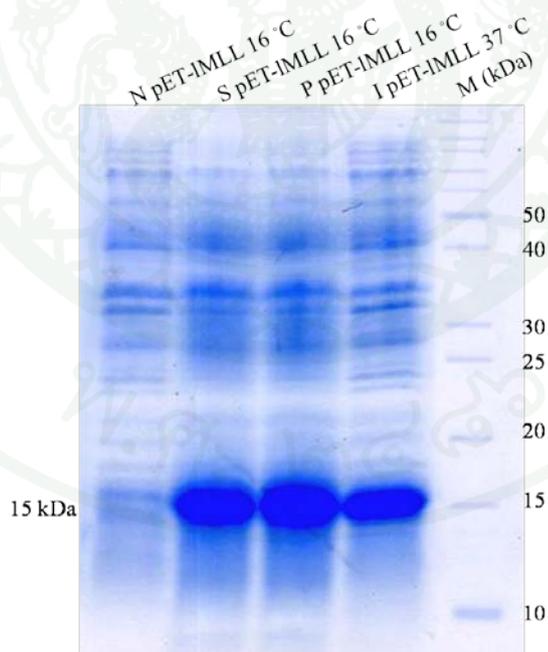


ภาพที่ 48 การหาอุณหภูมิและสารเหนี่ยวนำที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMML และ pET-LMML

M คือ Protein Marker, N คือ non-induced, Lac คือ 0.2% Lactose, IPTG คือ 1 mM IPTG



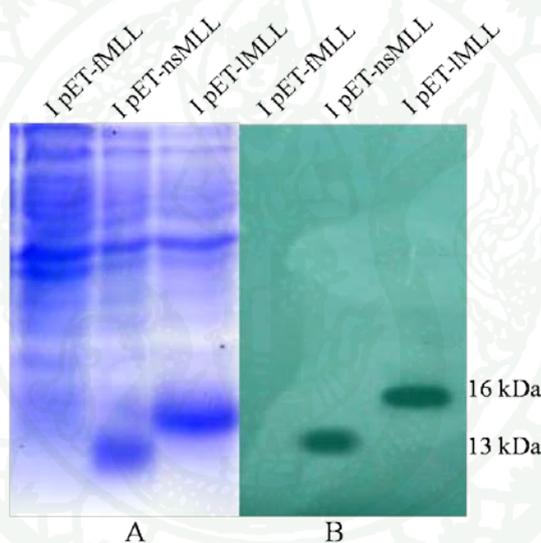
**ภาพที่ 49** การหาเวลาในการเหนี่ยวนำที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน M คือ Protein Marker, N คือ non-induced, หมายเลข 1, 2, 4, 6 คือ จำนวนชั่วโมงในการเหนี่ยวนำ



**ภาพที่ 50** การแสดงออกของโปรตีน pET-LMLL ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส พบโปรตีนทั้งในส่วนใส (supernatant) และตะกอน (pellet)  
M คือ Protein Marker, I คือ induced, N คือ non-induced, S คือ Supernatant, P คือ Pellet

### 1.3 การตรวจสอบโปรตีนด้วย Western blot

การทำ Western blot เพื่อตรวจสอบโปรตีนที่ได้จากการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ในเวกเตอร์ pET21a ที่มี His-tag ติดอยู่ด้าน C-terminal ด้วย Penta-His Alexa Fluor Conjugates พบว่า pET-nsMLL และ pET-LMLL มีความจำเพาะต่อ Penta-His Alexa Fluor Conjugates เมื่อตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย chemiluminescence ด้วยแผ่นฟิล์ม X-ray (ภาพที่ 51) และมีขนาดตรงกับการตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE แสดงว่าการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-nsMLL และ pET-LMLL มีการแสดงออกของยีนที่โคลนเข้าไปในตำแหน่งที่ต้องการ แต่ pET-fMLL ไม่สามารถตรวจสอบด้วยการทำ Western blot ได้ เนื่องจากไม่มีการแสดงออกของโปรตีน



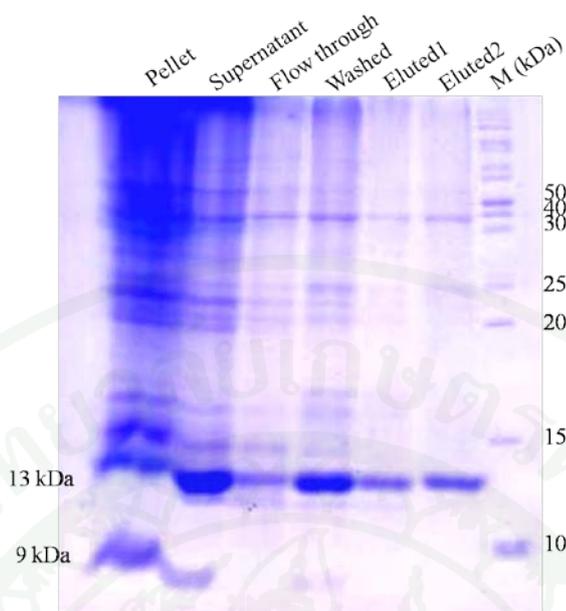
**ภาพที่ 51** การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot เปรียบเทียบกับเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 15% SDS PAGE (I คือ induced)  
 A คือ การตรวจสอบโปรตีนก่อนการขนย้ายโปรตีน  
 B คือ การตรวจสอบโปรตีนด้วย Western blot เกิดปฏิกิริยาด้วย chemiluminescence ด้วยแผ่นฟิล์ม X-ray

#### 1.4 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

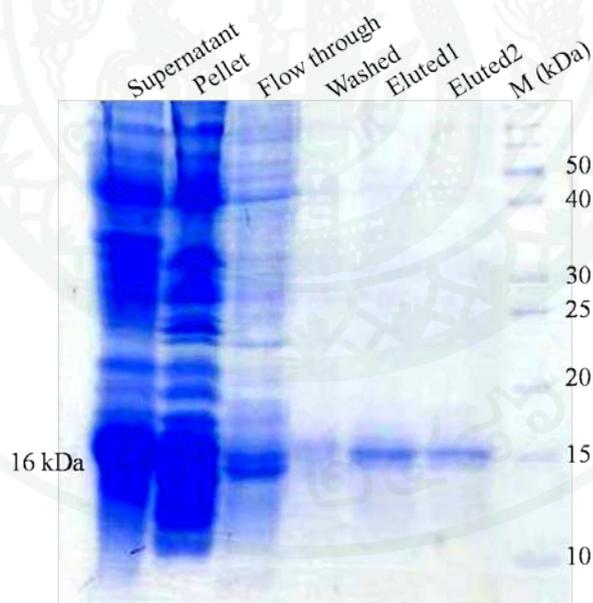
เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMMLL และ pET-LMMLL ที่กระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์แบบเสถียรภาพธรรมชาติด้วยวิธี affinity chromatography ผ่านคอลัมน์ที่มี nickel chelate resin โดยทำให้ผนังเซลล์แตกด้วยสารละลาย lysis buffer แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกมากขึ้นด้วยเครื่อง sonicator และปั่นแยกตะกอนกับส่วนใส นำส่วนใสไปเติมลงในคอลัมน์ ล้างแยกส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออก จะเอาโปรตีนที่ต้องการ แล้วนำโปรตีนที่ได้จากการชะ มาตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ด้วย 15% SDS-PAGE พบว่าได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMMLL ที่มีขนาดประมาณ 13 kDa โปรตีนที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เมื่อเทียบกับส่วนใสที่ยังไม่ได้เติมลงในคอลัมน์ (ภาพที่ 52) ในขณะที่รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-LMMLL นั้นมีแถบโปรตีนแถบเดียวที่ขนาดประมาณ 16 kDa โปรตีนที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เมื่อเทียบกับส่วนใส (ภาพที่ 53) จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง pET-nsMMLL และ pET-LMMLL ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ มาเพิ่มความเข้มข้น ปรากฏว่าโปรตีนเกิดการรวมกลุ่มตกตะกอน จึงไม่สามารถนำไปตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนได้ จึงทำการหาสภาวะที่ทำให้โปรตีนอยู่ในโครงสร้างที่ถูกต้องและสามารถทำงานได้

#### 1.5 การม้วนพับของโปรตีน (Refold Protein)

การปรับสภาวะเพื่อทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนอยู่ในโครงสร้างที่ถูกต้องและสามารถทำงานได้ โดยนำไปทำ Refold Protein ใน 96 well-plate พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง pET-nsMMLL และ pET-LMMLL ประกอบด้วย 50 mM Tris pH 8.0, 2 mM DTT, 200 mM NaCl, 0.5% PEG-4000 และ 800 mM Arg-HCl และนำสภาวะที่ได้นี้ไปทำให้โปรตีนเกิดการม้วนพับในปริมาณมากแล้วนำไปตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนด้วยวิธี Hemagglutination assay



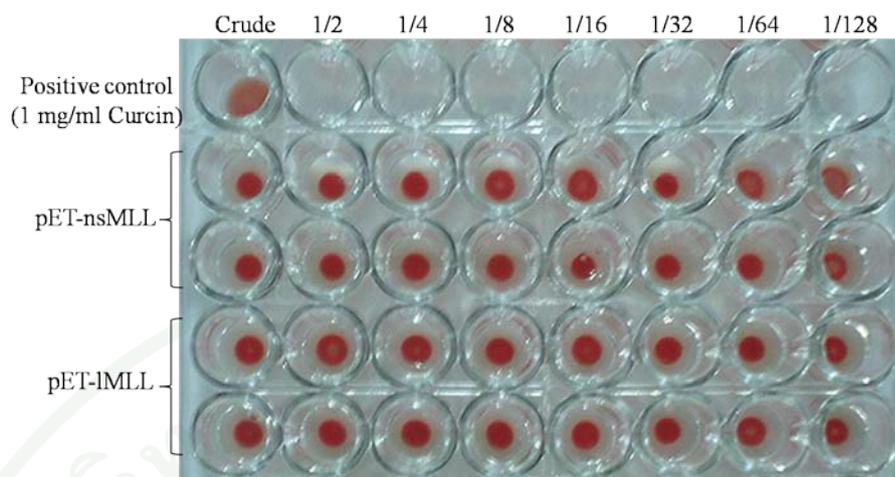
ภาพที่ 52 การตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMLL ด้วย 15% SDS-PAGE



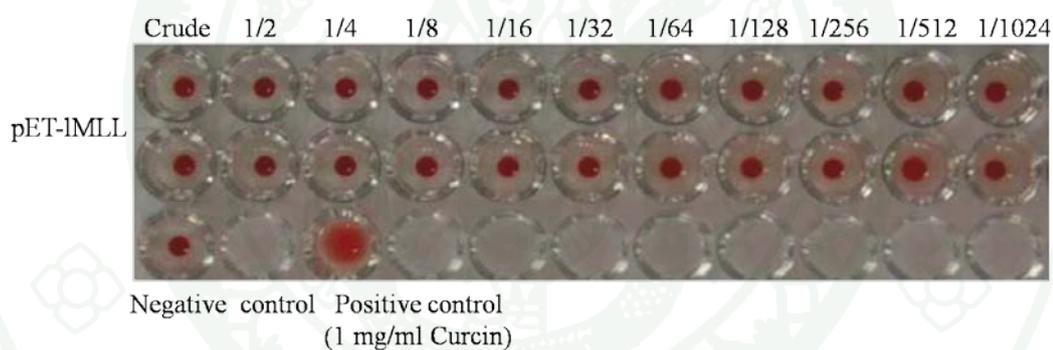
ภาพที่ 53 การตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-LMLL ด้วย 15% SDS-PAGE

## 1.6 การตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนด้วยวิธีฮีแมกกลูตินินชัน (Hemagglutination assay)

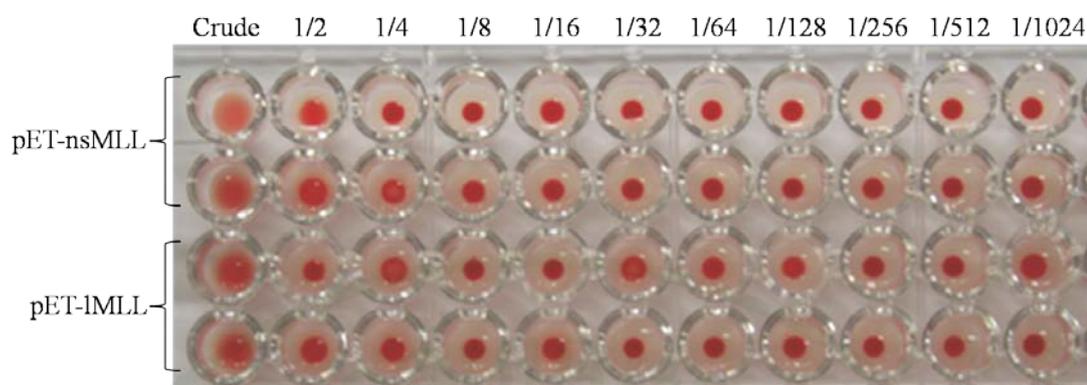
การตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนด้วยวิธีฮีแมกกลูตินินชัน จะตรวจสอบกับโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ (crude protein) และโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง pET-nsMLL และ pET-LMLL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์แตก ปั่นแยกตะกอนกับส่วนใส นำส่วนใสตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนด้วยวิธีฮีแมกกลูตินินชัน พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนจากทั้ง pET-nsMLL และ pET-LMLL ไม่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายรวมกลุ่มตกตะกอนได้ (ภาพที่ 54) จากนั้นเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง pET-nsMLL และ pET-LMLL ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMLL มีการแสดงออกของโปรตีนน้อยมาก ไม่สามารถนำมาตรวจสอบกิจกรรมโปรตีนได้ ส่วนรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-LMLL มีการแสดงออกของโปรตีน จึงนำมาทำให้เซลล์แตก ปั่นแยกตะกอนกับส่วนใส นำส่วนใสมาตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน พบว่า pET-LMLL ก็ไม่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายรวมกลุ่มตกตะกอนได้เช่นกัน (ภาพที่ 55) จากนั้นเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจาก pET-nsMLL และ pET-LMLL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำให้บริสุทธิ์ แล้วเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน ปรากฏว่าโปรตีนเกิดการรวมกลุ่มตกตะกอน ไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนได้ จึงทำให้เกิดการม้วนพับของโปรตีน เพื่อให้โปรตีนอยู่ในโครงสร้างที่เหมาะสมและสามารถทำงานได้ แล้วนำมาตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีน พบว่า crude protein จากการม้วนพับของโปรตีนทั้ง pET-nsMLL และ pET-LMLL ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงรวมกลุ่มตกตะกอนได้ แต่เมื่อความเข้มข้นโปรตีนลดลงครึ่งหนึ่ง เซลล์เม็ดเลือดแดงไม่รวมกลุ่มตกตะกอน ทำให้ผลการทดลองไม่น่าเชื่อถือ จึงทำการเพิ่มความเข้มข้นโปรตีน แต่โปรตีนเกิดการรวมกันเป็นตะกอนจึงไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมโปรตีนต่อได้ ดังนั้นจึงสรุปว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนจากทั้ง pET-nsMLL และ pET-LMLL ไม่มีกิจกรรมโปรตีนเมื่อเทียบกับ 1 mg/ml RIP 1 inactive lectin (circin จากเนื้อเมล็ดคัสบูดำ) ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุม (ภาพที่ 56)



ภาพที่ 54 การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMLL และ pET-LMLL โดย  
 เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับ Positive control



ภาพที่ 55 การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-LMLL โดยเลี้ยงเซลล์ที่  
 อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับ Negative และ Positive control



ภาพที่ 56 การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMLL และ pET-LMLL จากโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์และทำให้เกิดการม้วนพับของโปรตีน

การศึกษาการแสดงออกของ MLL1 ในเซลล์แบคทีเรีย ที่แบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 3 ส่วน พบว่าโคลนที่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน คือ pET-nsMLL และ pET-LMLL จากการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากแถบโปรตีนที่เพิ่มขึ้นมาจาก 15% SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMLL มีน้ำหนักโมเลกุล 13 kDa และ 9 kDa ส่วนรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-LMLL มีน้ำหนักโมเลกุล 16 kDa และ 13 kDa แต่รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง pET-nsMLL และ pET-LMLL ไม่มีกิจกรรมโปรตีนเมื่อตรวจสอบด้วยฮีแมกกลูตินินชัน

จากการศึกษาโปรตีนเลคติน MLL1 ในธรรมชาติมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 8.8 % (Ratanapo *et al.*, 1998) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรียไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากไม่มีไกลโคซิเลชันเกิดขึ้น ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ไม่มีกิจกรรมของโปรตีน จึงทำการเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีนจากการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย เปลี่ยนเป็นเซลล์แมลงเพื่อให้โปรตีนเกิดไกลโคซิเลชันและสามารถทำงานได้

## 2. การสร้างและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินในเซลล์แมลง

### 2.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีนเลคตินเข้าเวกเตอร์ pFastBacHT-A

การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีน MLL1 เข้าเวกเตอร์ pFastBacHT-A โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์แต่ละส่วน จาก pGEM-fMLL แล้วตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และเวกเตอร์ pFastBacHT A ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* จากนั้นนำส่วนของยีนและเวกเตอร์ที่ถูกตัดมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วขนย้ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ตรวจสอบการขนย้ายรีคอมบิแนนท์ยีนที่ได้ด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ โดยเลือกมาตรวจสอบอย่างละ 4 โคลนนี้ พบว่า pFast-fMLL ตรวจสอบแล้วมียีน fMLL ในโคลนนี้ที่ 1 และ 2 ที่ขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 57) pFast-nsMLL ตรวจสอบแล้วมียีน nsMLL ทั้ง 4 โคลนนี้ ที่ขนาดประมาณ 500 คู่เบส (ภาพที่ 58)



ภาพที่ 57 การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pFast-fMLL ทั้งหมด 4 โคลนนี้ มียีน fMLL 2 โคลนนี้ มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

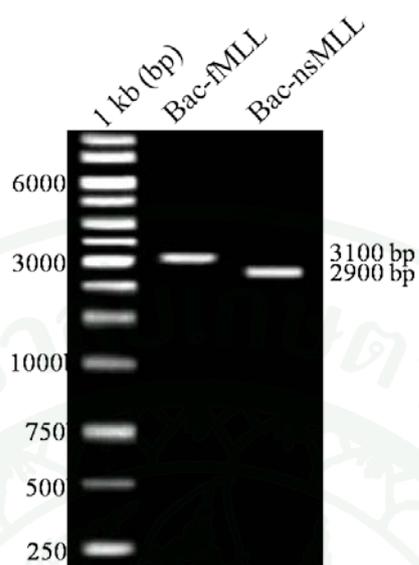


ภาพที่ 58 การตรวจสอบยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ของ pFast-nsMML ทั้งหมด 4 โคลนี มียีน nsMML 4 โคลนี มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ตรวจสอบด้วยเทคนิค 1% agarose gel electrophoresis

## 2.2 การเหนี่ยวนำให้โปรตีนแสดงออกในเซลล์แมลง

### 2.2.1 การขนย้ายยีนเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH10Bac

เมื่อได้รับคอมปีแนนท์พลาสมิดของ pFast-fMML และ pFast-nsMML สกัดพลาสมิด จากโคลนที่ 1 ทั้ง 2 โคลน แล้วนำรีคอมปีแนนท์พลาสมิดของ pFast-fMML และ pFast-nsMML มาขนย้ายยีนเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH10Bac จากนั้นเลือกโคลนสีขาวขุนมาตรวจสอบด้วยวิธีโคลนพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13 เพื่อตรวจสอบรีคอมปีแนนท์ยีนที่แทรกเข้าไปในจีโนมของไวรัส การตรวจสอบส่วนของ Bacmid transposed ที่มี pFastBacHT-A ด้วยไพรเมอร์ M13 จะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาด 2.4 kb และเมื่อ pFastBacHT-A มีการแทรกของ MLL1 แต่ละส่วน พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ pFast-fMML ที่เข้าแทรกในจีโนมของไวรัสมีขนาดประมาณ 3.1 kb และ pFast-nsMML มีขนาดประมาณ 2.9 kb (ภาพที่ 59) เมื่อรีคอมปีแนนท์ยีน pFast-fMML และ pFast-nsMML แทรกเข้าไปในจีโนมของไวรัสแล้ว ทำการสกัดพลาสมิดแล้วตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA Sequencing พบว่า Bacmid-pFast-fMML (Bac-fMML) และ Bacmid-pFast-nsMML (Bac-nsMML) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MLL1 ทุกนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 60 และภาพที่ 61) จากนั้นศึกษาการแสดงออกของรีคอมปีแนนท์โปรตีนยีน Bac-fMML และ Bac-nsMML ในเซลล์แมลงต่อไป



ภาพที่ 59 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ยีนของ Bac-fMLL และ Bac-nsMLL ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13 เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb

```

Bac_fMLL GCCATGGCTTCGTCTTCCTTTCTCTCCCTCTCCTTCCTCGTCTCCTCTTCTCTATCTCC 60
fMLL      GCCATGGCTTCGTCTTCCTTTCTCTCCCTCTCCTTCCTCGTCTCCTCTTCTCTATCTCC 60
          *****

Bac_fMLL TCTGCCAACACCCGAAAGTGGTCCTTGTCAAATGTTCTCGATCAGAAACCGATCAGCATA 120
fMLL      TCTGCCAACACCCGAAAGTGGTCCTTGTCAAATGTTCTCGATCAGAAACCGATCAGCATA 120
          *****

Bac_fMLL ATCGAGGCCGCCATTGGAGTTTCTGAAGACCTTCTTAATCTCAATGGGATGGAAGCTAAA 180
fMLL      ATCGAGGCCGCCATTGGAGTTTCTGAAGACCTTCTTAATCTCAATGGGATGGAAGCTAAA 180
          *****

Bac_fMLL AACAAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATGGGGAGCCCAAGCG 240
fMLL      AACAAATCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATGGGGAGCCCAAGCG 240
          *****

Bac_fMLL ACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGATGACGGTTCATACACCGGAATAAGAGAAATCAAT 300
fMLL      ACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGATGACGGTTCATACACCGGAATAAGAGAAATCAAT 300
          *****

Bac_fMLL TTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGATGTGAATGGT 360
fMLL      TTTGAATATAATAATGAAACTGCTATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGATGTGAATGGT 360
          *****

Bac_fMLL ACGCCATTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCAGTAAAGATT 420
fMLL      ACGCCATTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCAGTAAAGATT 420
          *****

Bac_fMLL TCCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGTAAAGTGAGC 480
fMLL      TCCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGTAAAGTGAGC 480
          *****

Bac_fMLL GGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTATGGACCATAT 540
fMLL      GGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTATGGACCATAT 540
          *****

Bac_fMLL GGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTTAATTGTTGGATTT 600
fMLL      GGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAGCTCCCAATCCAAAATGGCTTAATTGTTGGATTT 600
          *****

Bac_fMLL AAAGGAAGTGTGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGCACTT 651
fMLL      AAAGGAAGTGTGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACTTAGCACTT 651
          *****

```

ภาพที่ 60 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

Bac-fMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMLL โดยใช้โปรแกรม ClustalW ลำดับ  
 นิวคลีโอไทด์ของ Bac-fMLL ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMLL ทุก  
 นิวคลีโอไทด์

```

Bac_nsMLL  GCCATGGGCCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATGGGGAGCCCAA 60
nsMLL      GCCATGGGCCAACAAAGTGGGAAAAGTCAGACGATAGTTGTAGGAACATGGGGAGCCCAA 60
*****

Bac_nsMLL  GCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGTATGACGGTTCATACACCGGAATAAGAGAAATC 120
nsMLL      GCGACTAGCTCTAATGGTGTGGCTTTTGTATGACGGTTCATACACCGGAATAAGAGAAATC 120
*****

Bac_nsMLL  AATTTTGAATATAATAATGAAACTGCATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGATGTGAAT 180
nsMLL      AATTTTGAATATAATAATGAAACTGCATCGGGAGTATTCAAGTGACCTACGATGTGAAT 180
*****

Bac_nsMLL  GGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCAGTAAAG 240
nsMLL      GGTACGCCATTTGAAGCAAAAAACATGCCAGCTTTATAACAGGCTTCACACCAGTAAAG 240
*****

Bac_nsMLL  ATTTCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGTAAAGTG 300
nsMLL      ATTTCTTAGACTTTCCAAGTGAGTATATAGCTGAAGTGAGCGGGTACACTGGTAAAGTG 300
*****

Bac_nsMLL  AGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTATGGACCA 360
nsMLL      AGCGGGTATATAGTAGTACGCTCTTTAACATTCAAGACTAACAAAGAACTTATGGACCA 360
*****

Bac_nsMLL  TATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAAGTCCCAATCCAAAATGGCTTAATTGTTGGA 420
nsMLL      TATGGAGTTACAAGCGGCACACATTTTAAAGTCCCAATCCAAAATGGCTTAATTGTTGGA 420
*****

Bac_nsMLL  TTTAAAGGAAGTGTTCGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACCTTAGCACTTC 475
nsMLL      TTTAAAGGAAGTGTTCGGCTATTGGTTGGACTACATTGGGTTTCACCTTAGCACTTC 475
*****

```

### ภาพที่ 61 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

Bac-nsMLL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nsMLL โดยใช้โปรแกรม ClustalW ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Bac-nsMLL ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nsMLL ทุกนิวคลีโอไทด์

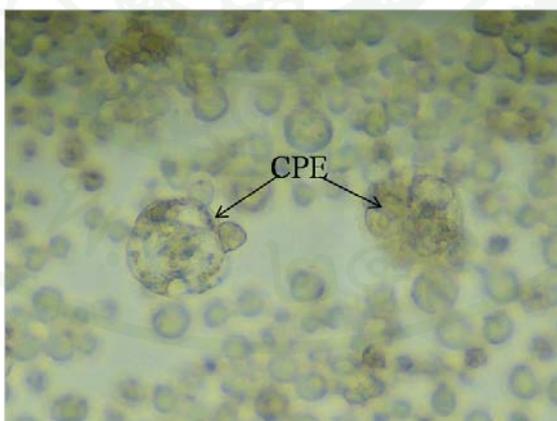
#### 2.2.2 การขนย้ายรีคอมบิแนนท์ยีน Bac-fMLL และ Bac-nsMLL เข้าสู่เซลล์แมลง และการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แมลง

เมื่อสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด Bac-fMLL และ Bac-nsMLL จาก *E.coli* สายพันธุ์ DH10Bac ด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป แล้วย่นำไปขนย้ายยีนเข้าสู่เซลล์แมลง Sf9 ที่เลี้ยงไว้ 3-5 วัน หรือจนกระทั่งสามารถมองเห็นแกรนูลภายในเซลล์แมลง (ภาพที่ 62) จากนั้นนำเซลล์แมลงมาตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13 พบว่า Bac-fMLL มีรีคอมบิแนนท์ยีนขนาดประมาณ 3.1 kb และ Bac-nsMLL มีรีคอมบิแนนท์ยีนขนาดประมาณ 2.9 kb (ภาพที่ 63) แสดงว่ามีการแทรกรีคอมบิแนนท์ยีนเข้าสู่จีโนมของไวรัส ตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Bac-fMLL เมื่อแปลรหัสเป็นกรด

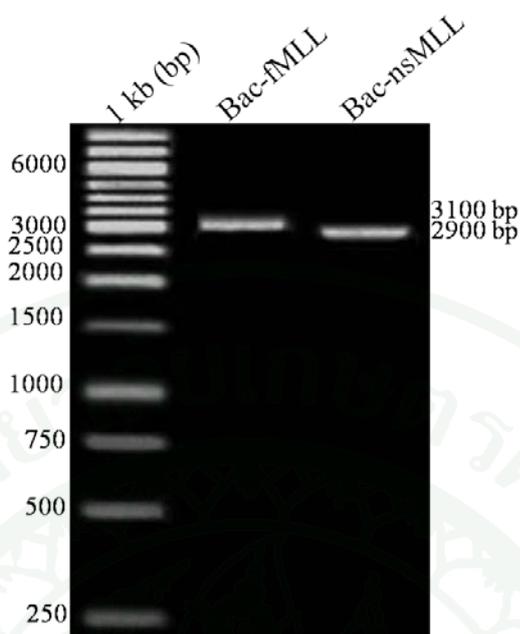
อะมิโนตั้งแต่ ATG ที่ติดกับ His-tag ด้าน N-terminal จนถึง TAA รวมแล้วมีกรดอะมิโนทั้งหมด 258 เรซิดิว คำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลได้ 28.60 kDa ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Bac-nsMML เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนมีกรดอะมิโนทั้งหมด 198 เรซิดิว คำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.08 kDa ซึ่งการตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE การตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่าเซลล์แมลงที่มี Bac-fMML และ Bac-nsMML ไม่มีแถบโปรตีนที่เพิ่มขึ้นหรือต่างจากแถบโปรตีนของเซลล์แมลง (ภาพที่ 64) อาจเนื่องจากแถบโปรตีนของเซลล์แมลงบดบังแถบโปรตีนที่มีรีคอมบิแนนท์ขึ้น จึงทำการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยการทำ Western blot

### 2.3 การตรวจสอบโปรตีนด้วย Western blot

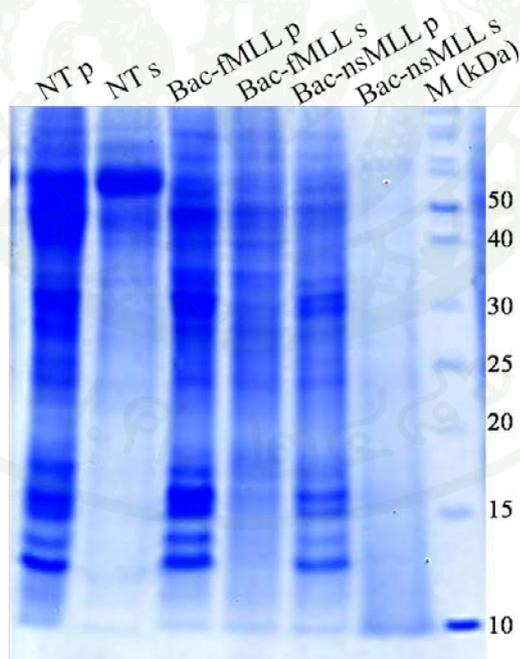
การทำ Western blot เพื่อตรวจสอบโปรตีนที่ได้จากการสร้างรีคอมบิแนนท์ขึ้นเข้าเวกเตอร์ pFastBacHT-A ที่มี His-tag ซึ่งอยู่ด้าน N-terminal ตรวจสอบโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE จากนั้นขนย้ายโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรน และตรวจสอบโปรตีนด้วย chemiluminescence พบว่าไม่มีแถบโปรตีนของ Bac-fMML และ Bac-nsMML ที่เกิดปฏิกิริยากับ chemiluminescence บนแผ่นฟิล์ม X-ray โดยเปรียบเทียบกับ pET-LMML (ภาพที่ 65) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณโปรตีนมีน้อยเกินไป จึงอาจทำให้มองไม่เห็นแถบโปรตีนที่เกิดปฏิกิริยากับ chemiluminescence ดังนั้นจึงทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ แล้วนำไปตรวจสอบกิจกรรมโปรตีน



ภาพที่ 62 ลักษณะของเซลล์แมลง S9 ที่มีรีคอมบิแนนท์ขึ้น Bac-fMML หรือ Bac-nsMML เลี้ยงไว้จนกระทั่งสามารถมองเห็น cytopathic effects (CPE) ภายในเซลล์แมลง

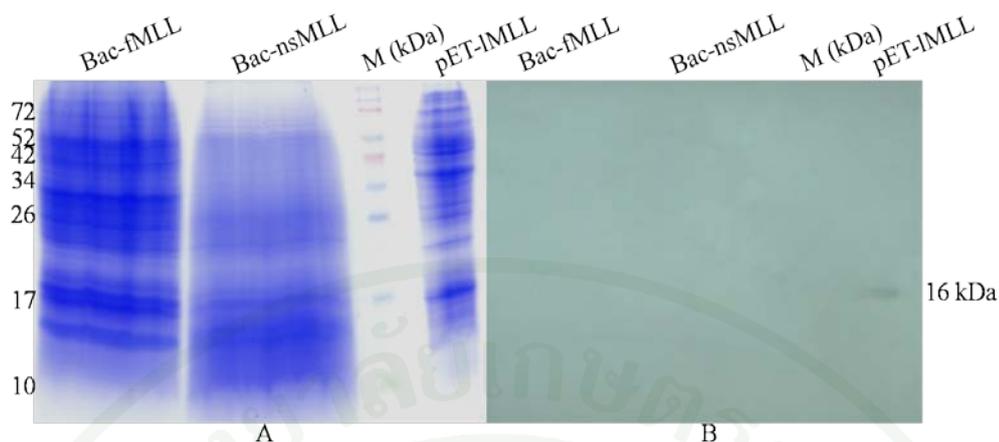


ภาพที่ 63 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ยีนของ Bac-fMMLL และ Bac-nsMMLL จากเซลล์แมลงด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13 เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb



ภาพที่ 64 การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์แมลงของ Bac-fMMLL และ Bac-nsMMLL เปรียบเทียบกับเซลล์แมลงที่ไม่มีพลาสมิด ตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE

NT คือ non transfect, p คือ pellet, s คือ supernatant, M คือ Protein Marker



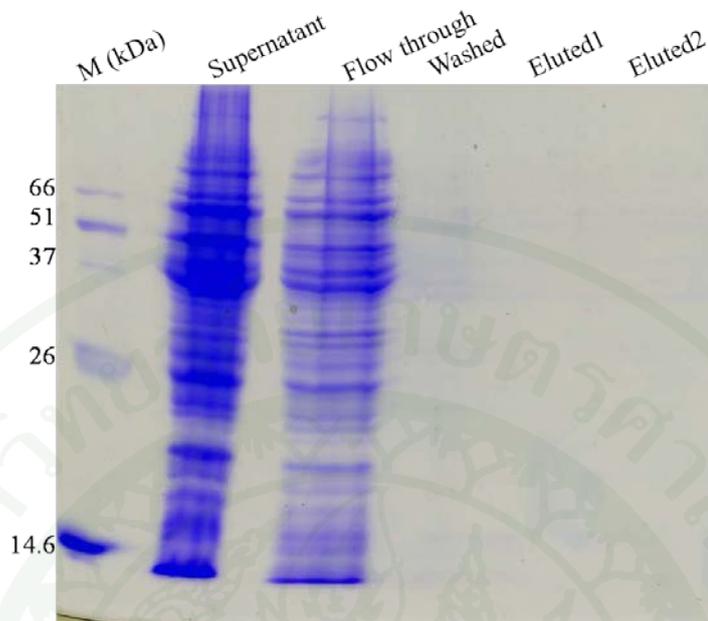
ภาพที่ 65 การตรวจสอบโปรตีนจากเซลล์แมลงด้วย Western blot

A คือ การตรวจสอบโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE ก่อนการขนย้ายโปรตีน

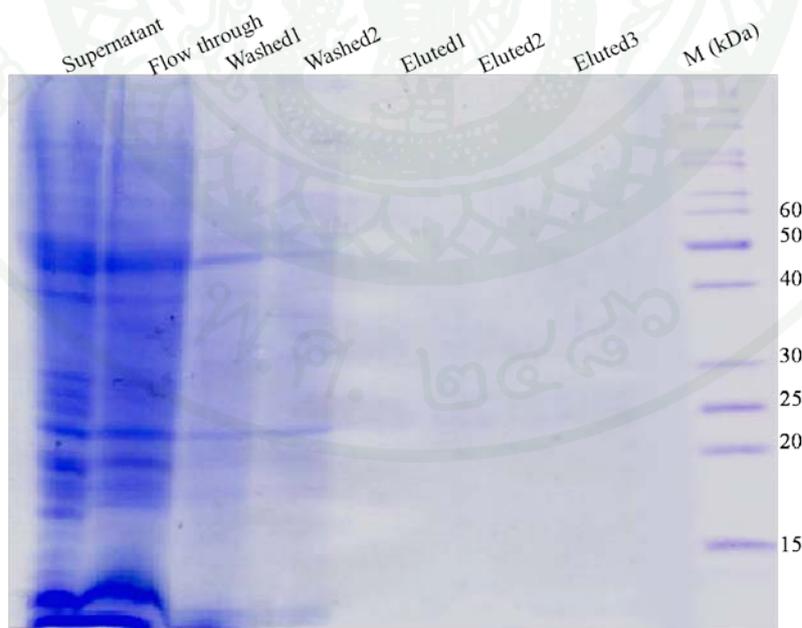
B คือ การทำ Western blot เกิดปฏิกิริยาคู่ด้วย chemiluminescence บนแผ่นฟิล์ม X-ray

#### 2.4 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากการแสดงออกในเซลล์แมลงให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยผ่านคอลัมน์ที่มี nickel chelate resin โดยทำให้ผนังเซลล์แตกด้วยสารละลาย lysis buffer แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกเพิ่มขึ้นด้วยเครื่อง sonicator และปั่นแยกตะกอนกับส่วนใส นำส่วนใสไปเติมลงในคอลัมน์ ล้างแยกส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออก ชะเอาโปรตีนที่ต้องการ แล้วนำโปรตีนที่ได้จากการชะ มาตรวจสอบขนาด และความบริสุทธิ์ด้วย 15% SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-fMMLL และ Bac-nsMMLL ไม่มีแถบโปรตีนหลังจากใส่ elution buffer (ภาพที่ 66 และภาพที่ 67) อาจเป็นเพราะโปรตีนถูกตัดเหมือนกับการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย โดยใน pFastBact HT-A มี His-tag ติดอยู่ด้าน N-terminal โปรตีนที่ได้จากการตัดด้าน N-terminal อาจถูกสลายด้วยเอนไซม์ของเซลล์แมลง เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ โปรตีนด้าน C-terminal ไม่สามารถจับกับ nickel chelate resin ได้ จึงไม่สามารถตรวจสอบโปรตีนจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย 15% SDS-PAGE ได้เช่นกัน จากนั้นก็ทำการตรวจสอบกิจกรรมโปรตีนจากเซลล์แมลง เพื่อตรวจสอบว่ามี การแสดงออกของโปรตีน



ภาพที่ 66 การตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-fMLL ด้วย 15% SDS PAGE

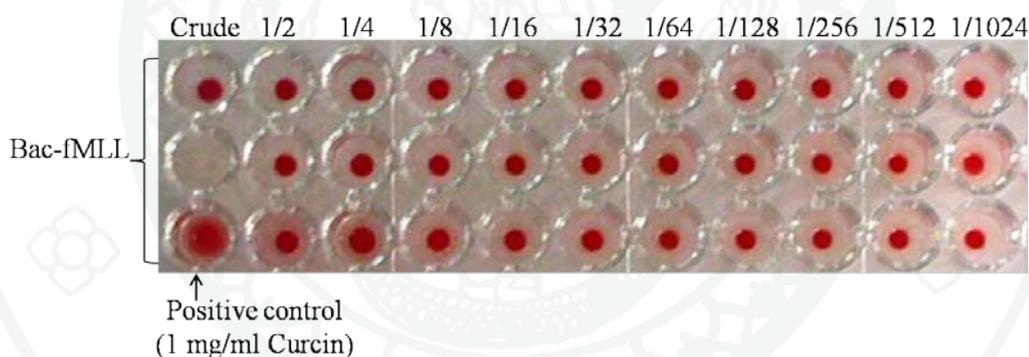


ภาพที่ 67 การตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-nsMLL ด้วย 15% SDS PAGE

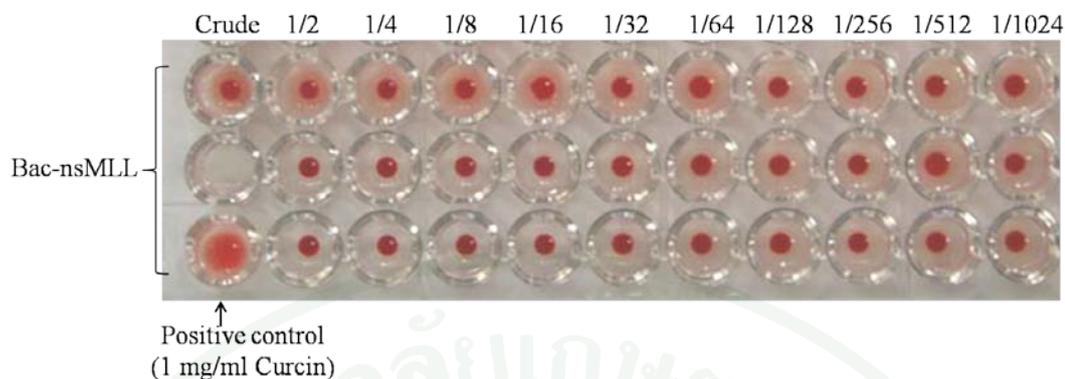
## 2.5 การตรวจสอบกิจกรรมโปรตีนด้วยวิธีฮีแมกกลูตินินชัน (Hemagglutination assay)

การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากเซลล์แมลงนั้น นำเซลล์แมลงมาทำให้เซลล์แตก ปั่นแยกตะกอนกับส่วนใส นำส่วนใสมาตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนด้วยวิธีฮีแมกกลูตินินชัน พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-fMLL และ Bac-nsMLL ไม่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายรวมกลุ่มตกตะกอนได้ (ภาพที่ 68 และภาพที่ 69) เมื่อเทียบกับโปรตีนควบคุม

การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ MLL1 ที่แบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ออกเป็น 2 ส่วน เพื่อโคลนเข้าเซลล์แมลง จากการตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE, Western blot, การทำบริสุทธิ์ด้วย affinity chromatography และการตรวจสอบกิจกรรมโปรตีน พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 2 โคลน ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน



ภาพที่ 68 การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-fMLL ด้วยวิธี Hemagglutination assay เปรียบเทียบกับ Positive control



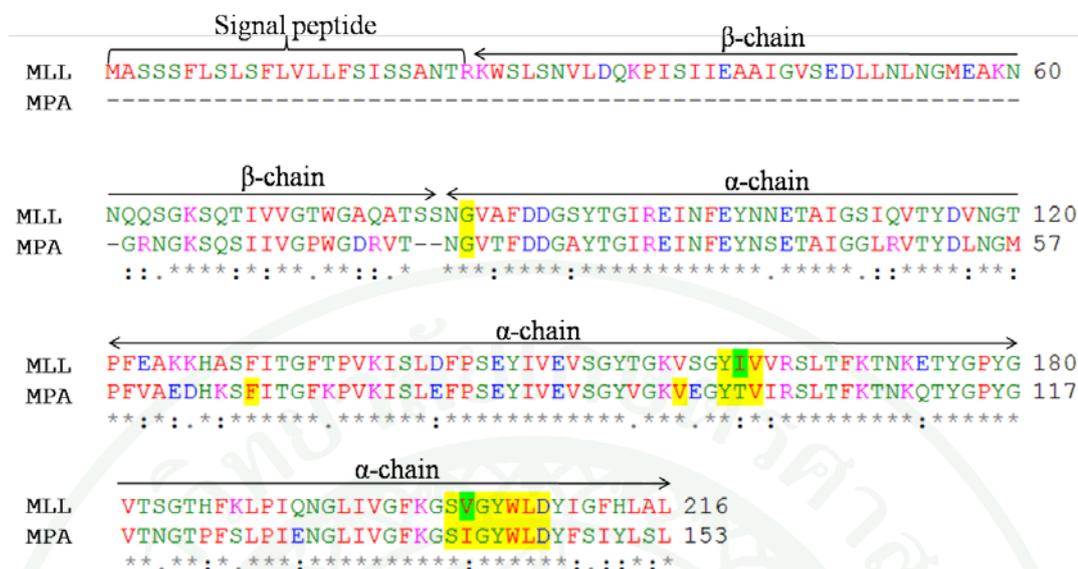
ภาพที่ 69 การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-nsMLL ด้วยวิธี Hemagglutination assay เปรียบเทียบกับ Positive control

### 3. การออกแบบและวิศวกรรมโปรตีนโดยเทคนิค computer-based design

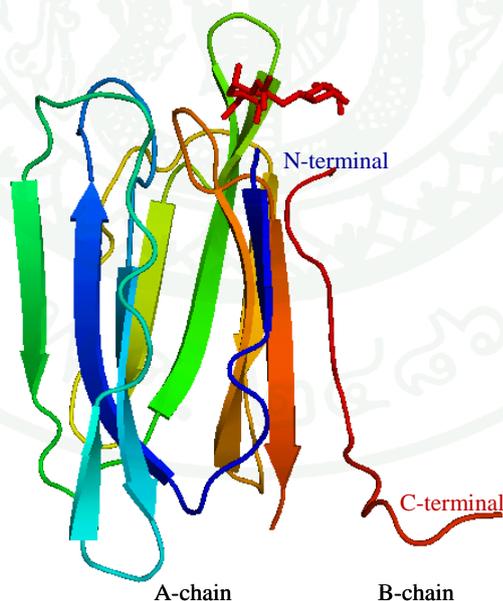
#### 3.1 Homology modeling และ molecular study

การทดลองสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินของยีน MLL1 ตลอดทั้งสาย (full length) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ของนางสาวเดือนดา เกตุแสง (Getsang, 2007) พบว่า MLL1 มีการแสดงออกได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 kDa ซึ่งมีขนาดน้อยกว่าการคาดคะเนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 kDa และอธิบายไว้ว่าโปรตีนเลคตินน่าจะมีสัญญาณโปรตีน (signal peptide) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษหาบริเวณสัญญาณโปรตีนของ MLL1 ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 Server ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) พบว่าโปรตีนเลคติน MLL1 มีสัญญาณโปรตีนประมาณ 24 เรซิดิว (ภาพที่ 70 ภาพภาคผนวกที่ 14 และ 15) จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ MLL1 (fMLL) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า fMLL มีความคล้ายกับโปรตีน *Maclura pomifera* agglutinin (MPA) (PDB : 1JOT) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม jacalin related lectin เป็นโปรตีนที่มี 2 สายโพลีเปปไทด์ที่เกิดจากการถูกตัดภายในโมเลกุลของโปรตีน คือสาย A จะอยู่ด้าน N-terminal และสาย B อยู่ด้าน C-terminal (ภาพที่ 71) ส่วนลำดับกรดอะมิโนของ fMLL บริเวณที่มีความเหมือนกับ 1JOT คือ ส่วนของ LMLL มีความเหมือน 78% ส่วนสาย B ของ 1JOT จะมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณด้านหน้าก่อนถึง N-terminal ของ LMLL 50% เมื่อเปรียบเทียบ fMLL เฉพาะส่วนที่เหมือนกับสาย B ของ 1JOT จะเห็นว่าสาย B ของ fMLL มีความยาวมากกว่าสาย B ของ 1JOT จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนของ fMLL มาทำการออกแบบ

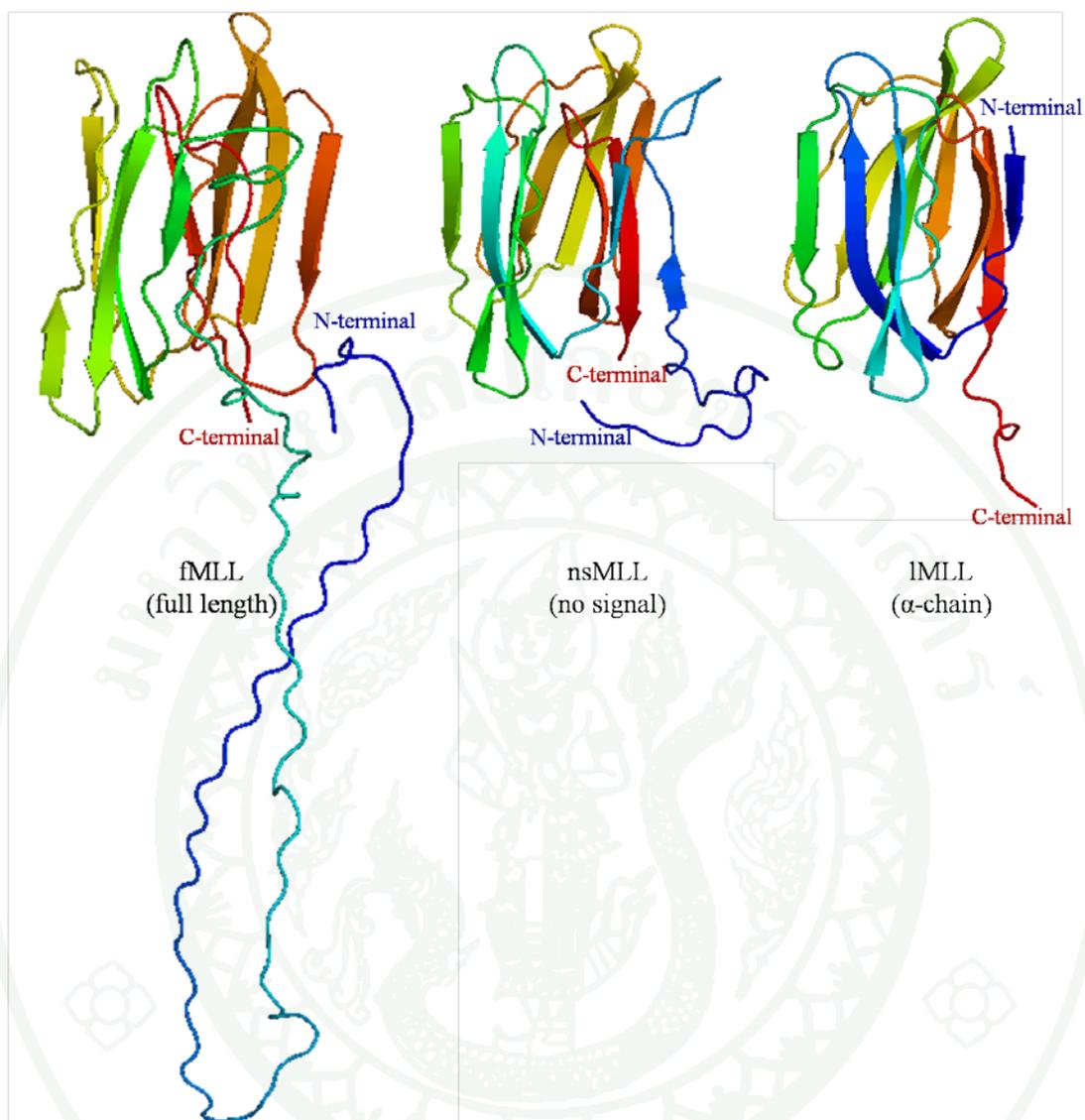
โครงสร้าง 3 มิติ ใช้โปรแกรม Modeller 9v1 โดยใช้โครงสร้างของ 1JOT เป็นแม่แบบ ซึ่ง homology model ของ fMLL ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ โครงสร้างของ 1JOT มาก และการจัดเรียงตัว ส่วนใหญ่ของโครงสร้างเป็น  $\beta$ -sheet และ random coil จากนั้นตัดส่วนของสัญญาณโปรตีนออก (msMLL) แล้วออกแบบโครงสร้าง 3 มิติ พบว่าโครงสร้างส่วนใหญ่ยังเป็น  $\beta$ -sheet แต่โครงสร้างที่เป็น random coil มีขนาดสั้นลง และการออกแบบโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่ตัดสัญญาณ โปรตีนและสาย B ออก (LMLL) ได้โครงสร้างส่วนใหญ่เป็น  $\beta$ -sheet ส่วนโครงสร้างที่เป็น random coil มีขนาดสั้นลงมาก และเป็นส่วนที่เหมือนกับสาย A ของ 1JOT (ภาพที่ 72) การออกแบบ โครงสร้าง 3 มิติ ของ fMLL ใช้โปรแกรม Modeller 9v1 โดยใช้โครงสร้างของ 1JOT เป็นแม่แบบ นั้น จะสามารถสร้างโครงสร้างได้เฉพาะบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันเท่านั้น ในขณะที่ บริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนที่ไม่เหมือนกัน โปรแกรม Modeller 9v1 จะไม่สามารถสร้างโครงสร้าง บริเวณนั้นได้ และโครงสร้างบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนที่ไม่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนแม่แบบ จะได้โครงสร้างเป็น random coil ดังนั้นการออกแบบโครงสร้าง 3 มิติ ของ fMLL ใช้โปรแกรม Modeller 9v1 โดยใช้โครงสร้างของ 1JOT เป็นแม่แบบจึงสามารถสร้างโครงสร้างที่น่าเชื่อถือที่สุด ได้เฉพาะ โครงสร้างของ LMLL เพราะเป็นบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับลำดับ กรดอะมิโนแม่แบบมากที่สุด (ภาพที่ 73) โดยจะนำเอาโครงสร้างของ LMLL นี้มาศึกษาความ จำเพาะกับน้ำตาล ซึ่ง 1JOT มีความจำเพาะต่อ T-antigen ที่มีน้ำตาลโมเลกุลคู่กาแลคโตส-เฮ็น อะเซทิล-กาแลคโตซามีน (Gal $\beta$ 1,3GalNAc) ส่วน fMLL มีความจำเพาะต่อ N- Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดเซียลิก โครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่เหมือนกันแต่มีความ จำเพาะต่อน้ำตาลต่างกัน จึงนำมาสู่การศึกษาการจับกันของโปรตีนเลคตินกับน้ำตาล



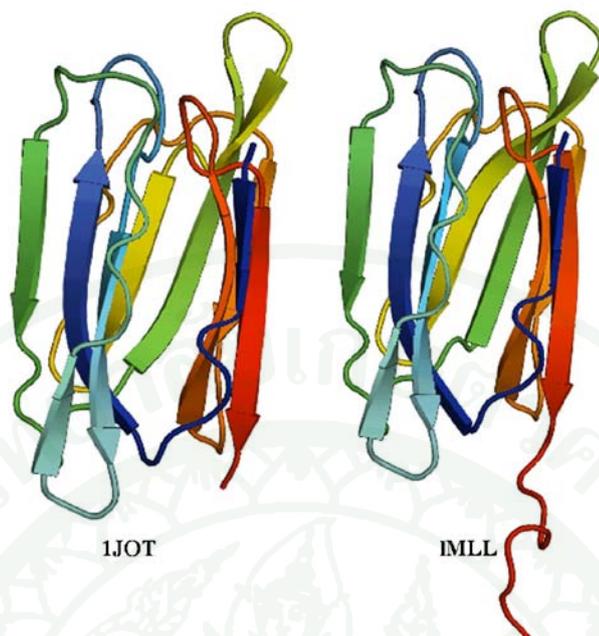
ภาพที่ 70 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ fMLL และ MPA โดย fMLL มีสัญญาณโปรตีนประมาณ 24 เรซิดิว ด้าน N-terminal และบริเวณกรดอะมิโนที่ Highlight คือกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะของแต่ละโปรตีน



ภาพที่ 71 โครงสร้างระดับตติยภูมิของ MPA (PDB : 1JOT) ที่ได้จากการศึกษาการตกผลึกโปรตีน นำมาจากฐานข้อมูล ประกอบด้วย 2 สายโพลีเปปไทด์ โครงสร้างส่วนใหญ่เป็น  $\beta$ -sheet และบริเวณจับจำเพาะอยู่ด้านปลาย N-terminal ของสาย A ซึ่งจับกับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc

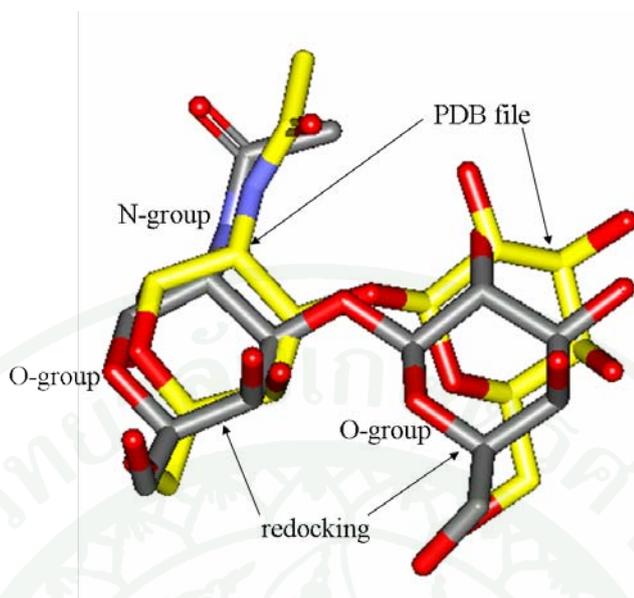


ภาพที่ 72 การออกแบบโครงสร้างระดับตติยภูมิของ fMLL (full length), nsMLL (no signal) และ LMLL ( $\alpha$ -chain) โดยใช้โปรแกรม Modeller 9v1 แสดงโครงสร้างโปรตีนด้วยโปรแกรม Pymol v0.99

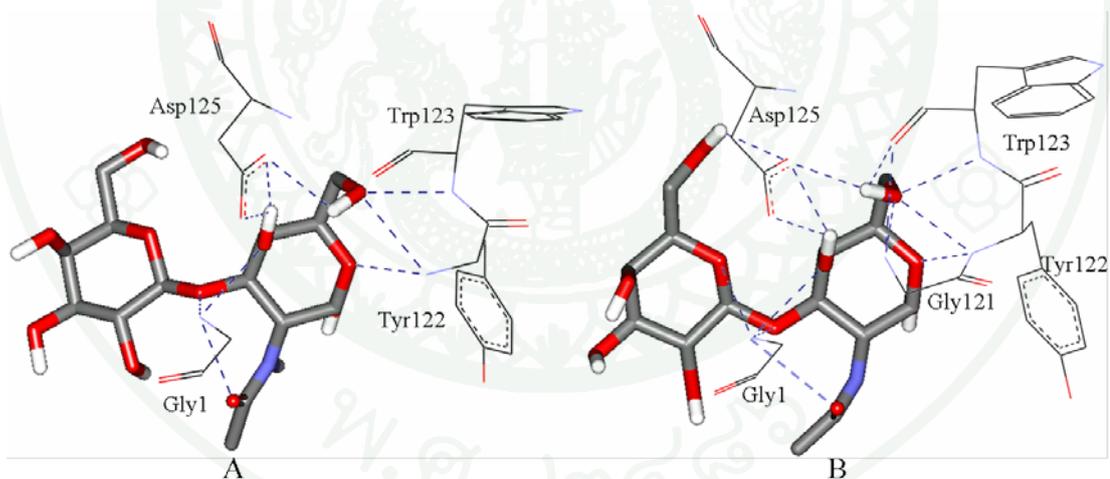


**ภาพที่ 73** การเปรียบเทียบโครงสร้างระดับตติยภูมิของ 1JOT และ LMLL จากการสร้างโดยใช้โปรแกรม Modeller 9v1 แสดงโครงสร้างโปรตีนด้วยโปรแกรม Pymol v0.99

เนื่องจากโครงสร้างของ LMLL ได้จากการสร้างขึ้นด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ จึงทำการศึกษากระบวนการวิธจากการจับจำเพาะของ 1JOT กับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc ด้วยการนำ 1JOT และ Gal $\beta$ 1,3GalNAc ทำการ redocking จากนั้นนำโครงสร้างของ Gal $\beta$ 1,3GalNAc ที่ได้จากการ redocking เปรียบเทียบกับโครงสร้างของ Gal $\beta$ 1,3GalNAc ที่จำเพาะต่อ 1JOT จากฐานข้อมูล พบว่าโครงสร้างของ Gal $\beta$ 1,3GalNAc ที่ได้จากการ redocking มีค่า RMSD 2.38 Å (ภาพที่ 74) ลักษณะการสร้างพันธะกับกรดอะมิโนอื่นๆ คล้ายกันแต่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Gly121 เพิ่มขึ้นหนึ่งตำแหน่ง (ภาพที่ 75) และระยะห่างของพันธะระหว่างอะมิโนและน้ำตาลใกล้เคียงกับโครงสร้างจาก 1JOT PDB file (ตารางที่ 6) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการวิธ docking ที่ศึกษานี้เชื่อถือได้ จึงนำมาศึกษาความจำเพาะของการจับกันของ LMLL กับน้ำตาล



ภาพที่ 74 การเปรียบเทียบโครงสร้างของ Gal $\beta$ 1,3GalNAc ที่ได้จากโครงสร้างคริสตัล (PDB file) และโครงสร้างที่ได้จากการ redocking มีค่า RMSD 2.38



ภาพที่ 75 การแสดงพันธะไฮโดรเจนของการจับกันระหว่าง 1JOT กับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc โดยเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างจากฐานข้อมูล (PDB file) (A) และโครงสร้างจากการทดลองการจับกับน้ำตาลอีกครั้ง (B) พบว่าในการทดลองจับกับน้ำตาลอีกครั้ง Gal $\beta$ 1,3GalNAc สามารถจับกับ Gly121 เพิ่มขึ้นอีกหนึ่งอะมิโน

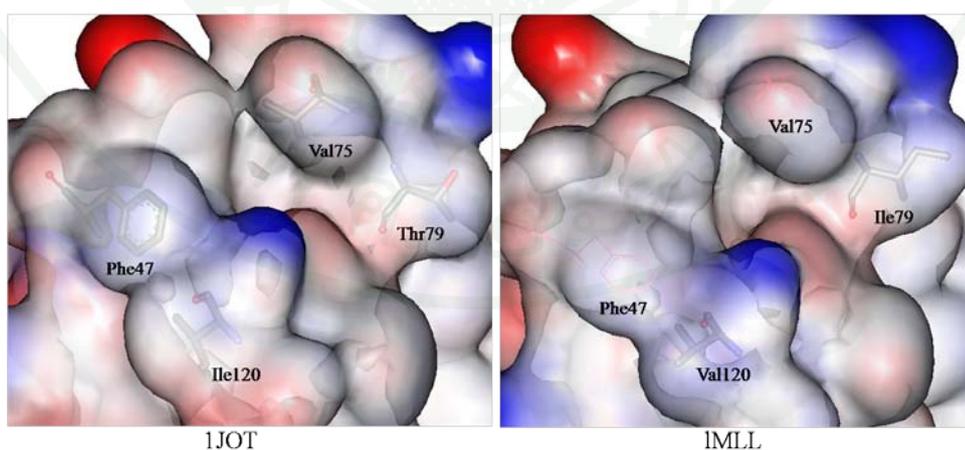
ตารางที่ 6 การแสดงค่าระยะห่างของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง 1JOT กับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc

Complex	H-Donor	H-Acceptor	Distance(A $^{\circ}$ )
1JOT- Gal $\beta$ 1,3GalNAc	Protein	Ligand	
(PDB file)	Gly1: NH	C3-O:GalNAc	2.704
	Gly1: NH	C4-O:GalNAc	2.848
	Tyr122:NH	C5-O:GalNAc	3.148
	Tyr122:NH	C6-O:GalNAc	2.984
	Trp123:NH	C6-O:GalNAc	3.079
	Gly1: NH	C7-O:GalNAc	3.094
	Ligand	Protein	
	GalNAc:C4-OH	O $\delta$ 1:ASP125	2.810
	GalNAc:C4-OH	O $\delta$ 2:ASP125	2.870
1JOT- Gal $\beta$ 1,3GalNAc	Protein	Ligand	
(Redocking)	Gly1: NH	C3-O:GalNAc	2.700
	Gly1: NH	C4-O:GalNAc	2.892
	Tyr122:NH	C5-O:GalNAc	2.832
	Tyr122:NH	C6-O:GalNAc	2.602
	Trp123:NH	C6-O:GalNAc	2.664
	Gly121: NH	C6-O:GalNAc	3.018
	Gly1: NH	C5-O:Gal	3.082
	Ligand	Protein	
	GalNAc:C4-OH	O $\delta$ 1:ASP125	2.913
	GalNAc:C6-OH	O $\delta$ 1:ASP125	2.964
	Gal:C6-OH	O $\delta$ 1:ASP125	2.893
	GalNAc:C4-OH	O $\delta$ 2:ASP125	2.741

เมื่อได้กระบวนการวิธีการศึกษาที่น่าเชื่อถือ ได้ใช้วิธีนี้ในการหาบริเวณจับจำเพาะของโปรตีน โดยกำหนดให้บริเวณจับจำเพาะในการจดจำน้ำตาลของ LMLL เป็นบริเวณเดียวกับบริเวณจับจำเพาะในการจดจำน้ำตาลของ 1JOT ซึ่งอยู่บริเวณปลาย N-terminal ของสาย A จากนั้นทำ molecular docking กับ Neu5Gc เพื่อหากรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะ พบว่าในโครงสร้างของ 1JOT พบ Phe47 และ Val75 ในบริเวณจับจำเพาะ ในขณะที่โครงสร้างของ LMLL พบกรดอะมิโนทั้งสองในระยะห่างจากรัศมีบริเวณจับจำเพาะ นอกจากนี้กรดอะมิโนที่พบใน 1JOT ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 79 และ 120 ต่างจากกรดอะมิโนที่พบใน LMLL โดยเปลี่ยนจาก Thr79 ใน 1JOT เป็น Ile79 ใน LMLL และ Ile120 ใน 1JOT เป็น Val120 ใน LMLL ตามลำดับ แต่ความต่างของทั้ง 4 กรดอะมิโนนี้มีเพียง Ile79 ใน โครงสร้างของ LMLL เท่านั้นที่จับกับน้ำตาล (ตารางที่ 7 ภาพที่ 76)

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะระหว่าง 1JOT และ LMLL

Protein	No. of residues	List of residues
1JOT	13	Gly1, Phe47, Val75, Tyr78, Thr79, Val80, Ser119, Ile120, Gly121, Tyr122, Trp123, Leu124, Asp125
LMLL	11	Gly1, Tyr78, Ile79, Val80, Ser119, Val120, Gly121, Tyr122, Trp123, Leu124, Asp125



ภาพที่ 76 การเปรียบเทียบลักษณะผิวของบริเวณจับจำเพาะระหว่าง 1JOT และ LMLL มีกรดอะมิโนต่างกัน คือ Thr79 และ Ile120 พบใน 1JOT ส่วน Ile79 และ Val120 พบใน LMLL และ Phe47 และ Val75 ไม่พบในรัศมีบริเวณจับจำเพาะของ LMLL

การศึกษาการจับกัน (molecular docking) ระหว่างโครงสร้างของ LMLL กับน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ GalNAc, Glc, Gal, Man, Neu5Ac, Neu5Gc และ Gal $\beta$ 1,3GalNAc โดยใช้โปรแกรม AutoDock 3.0.5. การทำ molecular docking พบว่า LMLL สามารถจับกับ Neu5Gc ได้ค่าพลังงานในการจับ (binding energy) ต่ำที่สุด (หมายถึงการจับได้ดีที่สุด) ในน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ทดลอง และจับได้ดีกว่า 1JOT (ตารางที่ 8) นอกจากนี้ LMLL ยังสามารถจับกับน้ำตาลอื่นได้อีก แสดงว่า LMLL สามารถจับกับน้ำตาลได้หลายชนิด สอดคล้องกับการทดลองในห้องปฏิบัติการของ รศ.ดร.สุนันทา และคณะ (Ratanapo *et al.*, 1998) ที่รายงานว่า MLL1 มีความจำเพาะต่อ Neu5Gc โดยพบว่า Neu5Gc สามารถยับยั้งการทำงานของ MLL1 ด้วยความเข้มข้น 0.78 mM ในขณะที่ GalNAc และน้ำตาลกาแลคโตสใช้ความเข้มข้น 100 mM จึงสามารถยับยั้งการทำงานของ MLL1 ได้ (ตารางที่ 8)

**ตารางที่ 8** การเปรียบเทียบค่าพลังงานในการจับกับน้ำตาลชนิดต่างๆ ระหว่าง LMLL กับ 1JOT และเปรียบเทียบกับค่าพลังงานในการทดลองในห้องปฏิบัติการ

Sugar	*Inhibition of MLL1 (mM)	Modeling LMLL	Modeling MPA(1JOT)
		Final Dock Energy (kcal/mol)	Final Dock Energy (kcal/mol)
Neu5Gc	0.78	-7.64	-6.24
Gal $\beta$ 1,3GalNAc	N.D.	-7.36	-8.42
Neu5Ac	>100	-7.46	N.D.
GalNAc	100	-5.16	-5.73
Glc	>100	-5.04	-5.75
Man	>100	-4.83	-5.56
Gal	100	N.D.	N.D.

ND คือ not determine

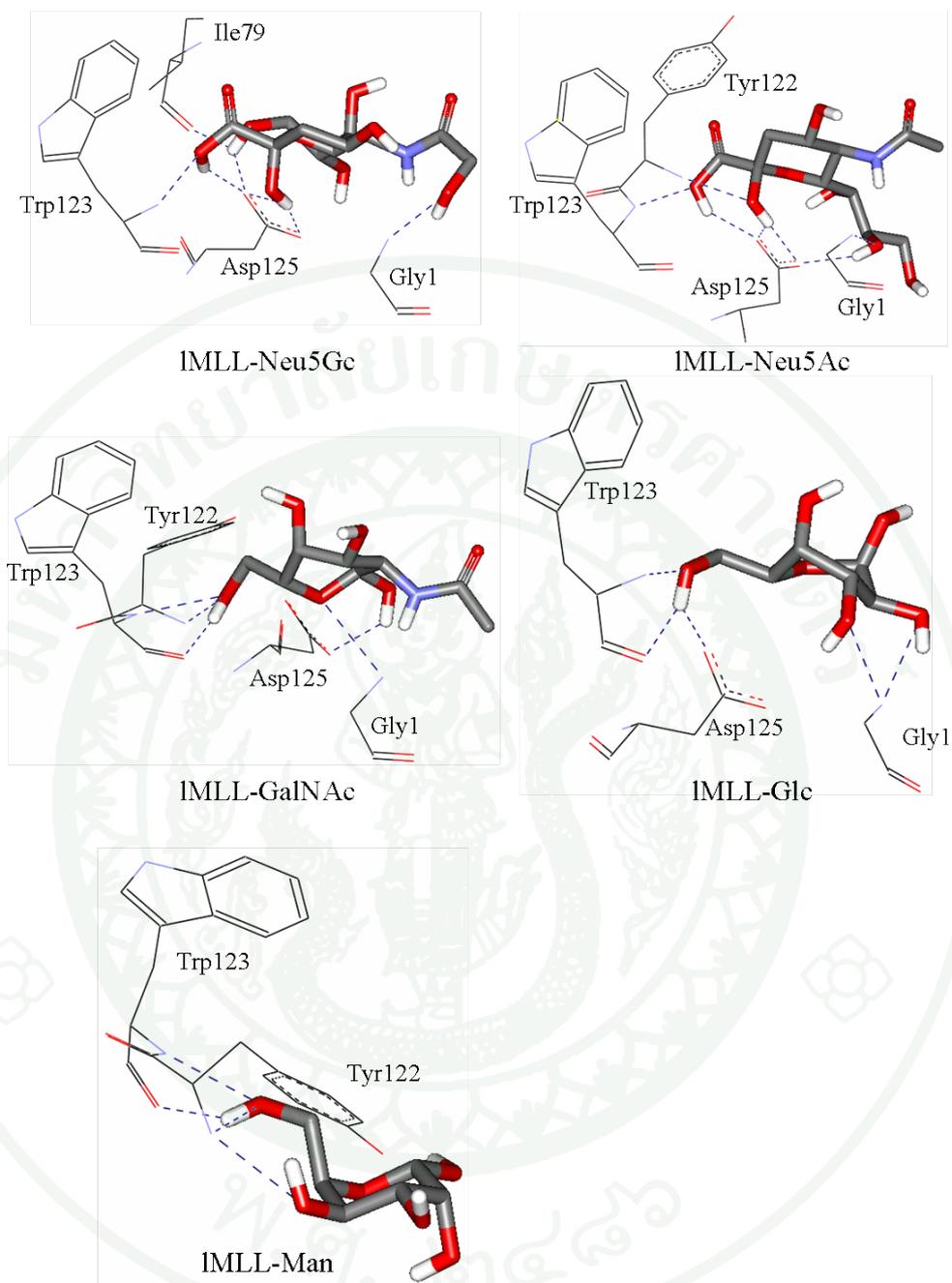
\*การยับยั้งการรวมกลุ่มมดตะกอนของเม็ดเลือดแดงของน้ำตาล Neu5Ac, Glc และ Man ที่ความเข้มข้น 100 mM และ 0.5 mg/ml thyroglobulin ไม่สามารถยับยั้งได้

\*ที่มา : Ratanapo *et al.* (1998)

การวิเคราะห์การสร้างพันธะไฮโดรเจนในบริเวณจับจำเพาะของ LMLL กับน้ำตาลชนิดต่างๆ ซึ่งน้ำตาลแต่ละชนิดมีความสามารถในการจับกับโปรตีนได้ต่างกัน พบว่า LMLL สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำตาลต่างๆ ได้โดยอาศัยกรดอะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ Gly1, Tyr122, Trp123 และ Asp125 แต่ LMLL ที่จับกับ Neu5Gc ซึ่งมีค่าพลังงานในการจับกับโปรตีนต่ำกว่าน้ำตาลชนิดอื่น สร้างพันธะไฮโดรเจนโดยอาศัย Gly1, Ile79, Trp123 และ Asp125 จากนั้นเมื่อทำการวัดระยะห่างของพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาล ส่วนใหญ่พบว่า LMLL ที่จับกับ Neu5Gc มีระยะห่างน้อยกว่าระยะห่างของ LMLL ที่จับกับน้ำตาลอื่นๆ และหมู่ที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนส่วนใหญ่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1, 2, 8 และ 9 (C1, C2, C8, C9) ส่วน LMLL ที่จับกับ Neu5Ac ส่วนใหญ่คล้ายกับ Neu5Gc ในขณะที่การจับของ LMLL กับ GalNAc, Glc และ Man นั้น ระยะห่างของพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาล มีระยะห่างเพิ่มขึ้น และหมู่ที่สร้างพันธะไฮโดรเจนส่วนใหญ่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (C6) (ตารางที่ 9) (ภาพที่ 77)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบโครงสร้างของน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด ที่เข้าจับกับ LMLL มีลักษณะการเข้าจับกับโปรตีนที่คล้ายกัน โดยการเรียงตัวของวงแหวนของน้ำตาลเรียงตัวไปทางเดียวกัน โดยด้านหมู่ O เข้าจับกับโปรตีนในร่องบริเวณจับจำเพาะ แต่การเข้าจับกับโปรตีนนั้นมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาลที่ต่างกัน จึงทำให้ลักษณะโครงสร้างของน้ำตาลที่เข้าจับกับโปรตีนต่างกันเล็กน้อย (ภาพที่ 78)

การศึกษา molecular docking ของ LMLL กับน้ำตาลต่างๆ มีเพียง Neu5Ac ที่ไม่สอดคล้องกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่ง LMLL ไม่จำเพาะต่อ Neu5Ac แต่การศึกษา molecular docking ให้ค่าพลังงาน -7.46 kcal/mol ต่างจากการจับกับ Neu5Gc เล็กน้อย โดยการจับกับ Neu5Gc ให้ค่าพลังงาน -7.64 kcal/mol ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาต่อไป ส่วนในบริเวณจับจำเพาะของ LMLL มีกรดอะมิโน ที่สำคัญต่อการจับกับน้ำตาล 4 อะมิโน ได้แก่ Gly1, Tyr122, Trp123 และ Asp125 ซึ่งคล้ายกับกรดอะมิโนในบริเวณจับของ IJOT (ตารางที่ 10) โดยกรดอะมิโนสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำตาลได้ต่างกัน การทำ molecular docking สามารถบอกถึงความจำเพาะต่อลิแกนด์ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดจับกับลิแกนด์อย่างไร ดังนั้นจึงทำการศึกษา Restrained-Molecular Dynamic (MD) Simulation เพื่อศึกษาการจำลองสถานะเสมือนธรรมชาติในการจับกันระหว่างโปรตีนกับน้ำตาล และศึกษาการจับกันของกรดอะมิโนแต่ละชนิดกับน้ำตาล



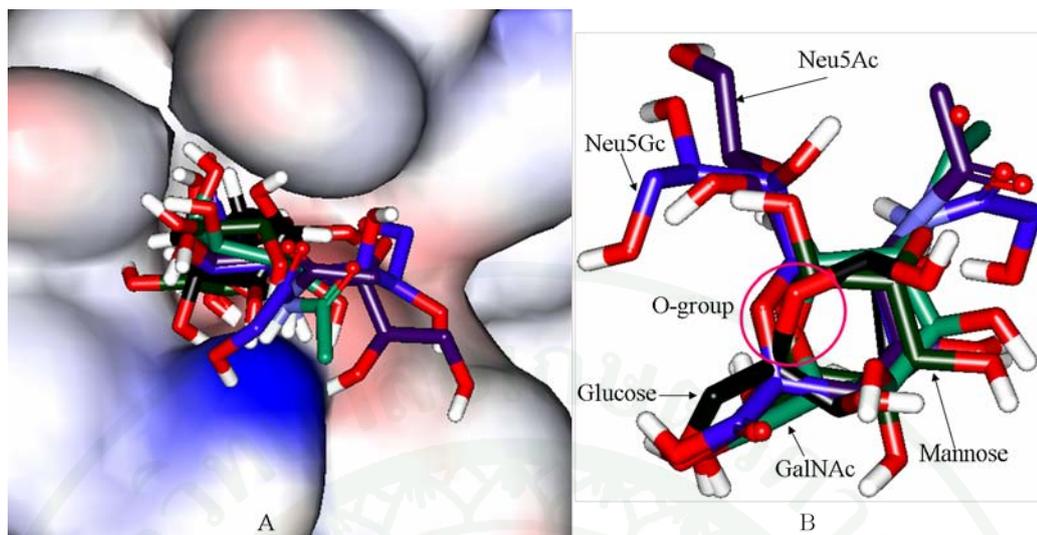
ภาพที่ 77 การแสดงพันธะไฮโดรเจนของการจับกันระหว่าง LMLL กับน้ำตาลชนิดต่างๆ ในบริเวณจับจำเพาะของ LMLL มีกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการจับกับน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ Gly1, Tyr122, Trp123 และ Asp125 แต่ในการจับของ LMLL กับ Neu5Gc ที่กำลังงานในการจับต่ำที่สุด มีการสร้างพันธะไฮโดรเจน กับ Ile79 ได้ต่างจากน้ำตาลชนิดอื่น

ตารางที่ 9 การแสดงค่าระยะห่างของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง LMLL กับน้ำตาล

Complex	H-Donor	H-Acceptor	Distance(A°)
LMLL- Neu5Gc	Protein	Ligand	
	Trp123:NH	C1-O	2.974
	Gly1: NH	O:NHGc	3.058
	Ligand	Protein	
	C1-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.968
	C2-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.619
	C2-OH	O <sub>δ2</sub> :ASP125	2.813
	C9-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.524
	C9-OH	CO:Ile79	2.806
LMLL-Neu5Ac	Protein	Ligand	
	Trp123:NH	C1-O	2.776
	Tyr122:NH	C2-O	3.209
	Gly1: NH	C8-O	2.634
	Ligand	Protein	
	C1-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.978
	C2-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.785
	C2-OH	O <sub>δ2</sub> :ASP125	2.863
	C8-OH	O <sub>δ2</sub> :ASP125	2.824
LMLL-GalNAc	Protein	Ligand	
	Gly1: NH	C5-O	3.194
	Tyr122:NH	C6-O	3.020
	Trp123:NH	C6-O	2.808
	Ligand	Protein	
	C1-OH	O <sub>δ2</sub> :ASP125	2.855
	C6-OH	CO:Trp123	2.639

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Complex	H-Donor	H-Acceptor	Distance(A°)
LMLL- Glc	Protein	Ligand	
	Gly1: NH	C2-O	2.745
	Gly1: NH	C3-O	2.811
	Trp123:NH	C6-O	2.807
	Ligand	Protein	
	C6-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.883
	C6-OH	CO:Trp123	3.009
LMLL-Man	Protein	Ligand	
	Tyr122:NH	C4-O	2.749
	Tyr122:NH	C6-O	3.072
	Trp123:NH	C6-O	2.839
	Ligand	Protein	
	C6-OH	CO:Trp123	2.645



ภาพที่ 78 การเปรียบเทียบโครงสร้างน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด ขณะจับกับโปรตีน LMLL ได้แก่ Neu5Gc, Neu5Ac, GalNAc, Glc และ Man

A คือ ลักษณะการเข้าจับของน้ำตาล ซึ่งหันด้านหมู่ O เข้าจับกับ LMLL

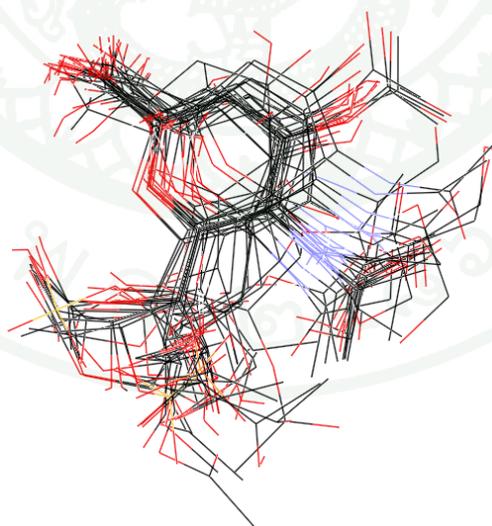
B คือ การเปรียบเทียบโครงสร้างของน้ำตาลที่มีลักษณะการเข้าจับกับโปรตีนที่คล้ายกัน

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีนกับน้ำตาล

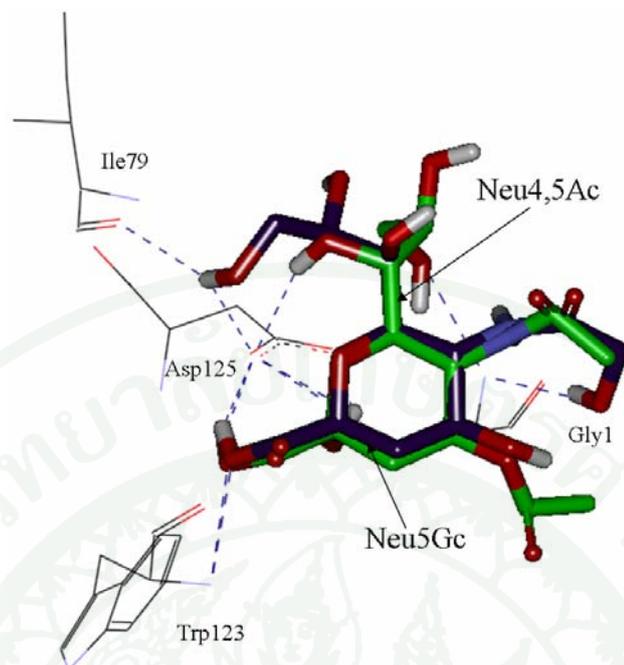
Complex	No. of residues	List of residues
1JOT- Gal $\beta$ 1,3GalNAc	4	Gly1, Tyr122, Trp123, Asp125
LMLL-Neu5Gc	4	Gly1, Ile79, Trp123, Asp125
LMLL-Neu5Ac	4	Gly1, Tyr122, Trp123, Asp125
LMLL-GalNAc	4	Gly1, Tyr122, Trp123, Asp125
LMLL-Glc	3	Gly1, Trp123, Asp125
LMLL-Man	2	Tyr122, Trp123

### 3.2 การศึกษาความจำเพาะของ LMLL ต่ออนุพันธ์ของกรดเซียลิกอื่นๆ

การศึกษาโปรตีน LMLL ในการจับกับอนุพันธ์ของกรดเซียลิกอื่นๆ โดยทำการศึกษากับอนุพันธ์ของกรดเซียลิกทั้งหมด 24 โครงสร้าง ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ Neu5Ac และ Neu5Gc โดยกรดเซียลิกแต่ละโครงสร้างจะพบบนเซลล์ต่างชนิดกัน และที่สำคัญพบกรดเซียลิกบางชนิดบนเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงต้องการศึกษาเพื่อพัฒนาโปรตีนให้สามารถจับกับกรดเซียลิกได้หลายชนิดเพื่อใช้ตรวจสอบเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ การศึกษาพบว่าโครงสร้างอนุพันธ์ของกรดเซียลิกทั้ง 24 โครงสร้าง ที่เข้าจับกับ LMLL ส่วนใหญ่คล้ายกันคือ หมู่คาร์บอกซิลิก และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) บริเวณกิ่งของคาร์บอนตำแหน่งที่ 7, 8 และ 9 เข้าจับกับโปรตีน โดยหมู่ O ชี้ไปทางเดียวกัน (ภาพที่ 79) การจับกับอนุพันธ์ของกรดเซียลิกอื่นๆ พบว่าค่าพลังงานในการจับต่างกันเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 11-12) เมื่อเปรียบเทียบ โครงสร้างกรดเซียลิกที่มีค่าพลังงานต่ำสุดคือ Neu4,5Ac กับ Neu5Gc ที่ศึกษา พบว่าทั้งสองมีการวางโครงสร้างในการจับคล้ายคลึงกันมาก กรดอะมิโนที่สามารถจับกับ Neu4,5Ac ได้แก่ Gly1, Trp123 และ Asp125 (ภาพที่ 80) ซึ่งต่างจากการจับกับ Neu5Gc ที่มีกรดอะมิโนมากกว่า จากการศึกษาด้วย molecular docking ไม่สามารถบอกได้ว่าค่าพลังงานที่ต่ำกว่าเกิดจากการจับกันของกรดอะมิโนชนิดใด ดังนั้นการศึกษาโปรตีน LMLL ในการจับกับอนุพันธ์ของกรดเซียลิกมีทิศทางเดียวกัน จึงควรศึกษาในห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม

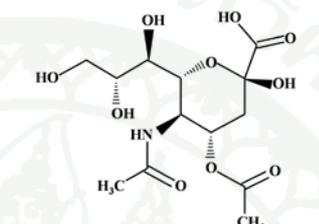
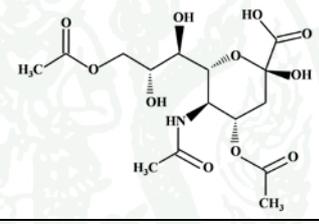
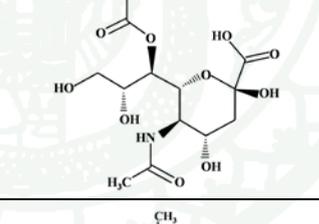
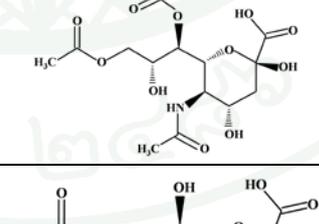
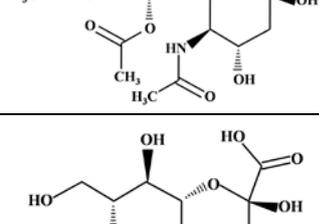
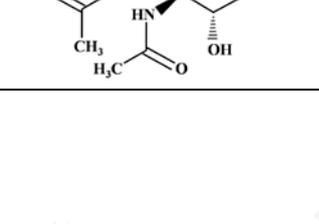


**ภาพที่ 79** โครงสร้างของอนุพันธ์กรดเซียลิกที่ได้จากการศึกษาการจับกับ LMLL ทั้ง 24 โครงสร้าง มีลักษณะการเข้าจับคล้ายกัน โดยหมู่คาร์บอกซิลิก และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C7, C8 และ C9 เข้าจับกับโปรตีน



**ภาพที่ 80** การเปรียบเทียบโครงสร้างของ Neu4,5Ac กับ Neu5Gc และการจับกับกรดอะมิโน ซึ่งการจับของกรดอะมิโนกับ Neu4,5Ac สามารถจับกับกรดอะมิโนได้ 3 रेซิดิว

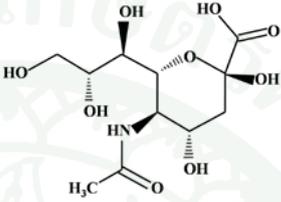
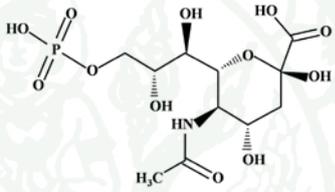
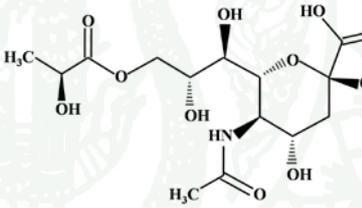
ตารางที่ 11 การแสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของกรดเซียลิกกลุ่ม N-Acetylneuraminic acid และแสดงการศึกษาการจับกันของ LMLL กับอนุพันธ์ของกรดเซียลิก

ชื่อเต็มของน้ำตาล	ชื่อย่อน้ำตาล	โครงสร้างน้ำตาล	Modeling LMLL Final Dock Energy (kcal/mol)
N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	Neu4,5Ac <sub>2</sub>		-8.63
N-Acetyl-4,9-di-O-acetylneuraminic acid	Neu4,5,9Ac <sub>3</sub>		-8.54
N-Acetyl-7-O-acetylneuraminic acid	Neu5,7Ac <sub>2</sub>		-8.41
N-Acetyl-7,9-di-O-acetylneuraminic acid	Neu5,7,9Ac <sub>3</sub>		-8.25
N-Acetyl-8,9-di-O-acetylneuraminic acid	Neu5,8,9Ac <sub>3</sub>		-8.17
N-Acetyl-8-O-acetylneuraminic acid	Neu5,8Ac <sub>2</sub>		-8.14

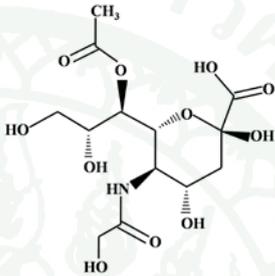
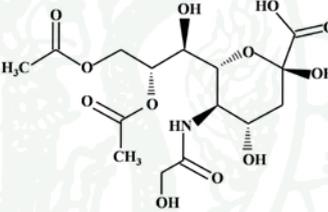
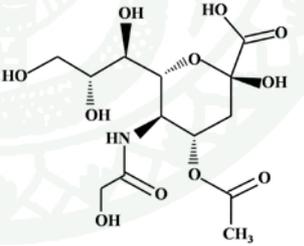
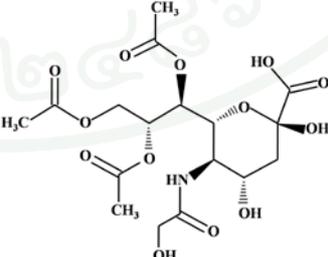
ตารางที่ 11 (ต่อ)

ชื่อเต็มของน้ำตาล	ชื่อย่อน้ำตาล	โครงสร้างน้ำตาล	Modeling LMLL Final Dock Energy (kcal/mol)
N-Acetyl-4-O-acetyl-9-O-lactylneuraminic acid	Neu4,5Ac <sub>2</sub> 9Lt		-8.05
N-Acetyl-2-deoxy-2,3-dehydroneuraminic acid	Neu5Ac2en		-7.98
N-Acetyl-8-O-sulphoneuraminic acid	Neu5Ac8S		-7.90
N-Acetyl-8-O-methylnuraminic acid	Neu5Ac8Me		-7.88
N-Acetyl-9-O-acetylneuraminic acid	Neu5,9Ac <sub>2</sub>		-7.81
N-Acetyl-7,8,9-tri-O-acetylneuraminic acid	Neu5,7,8,9Ac <sub>4</sub>		-7.73

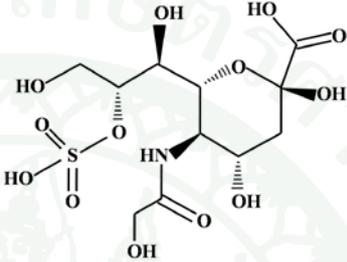
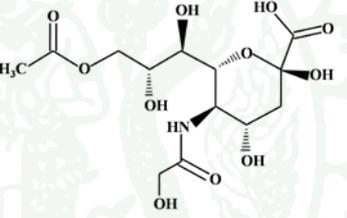
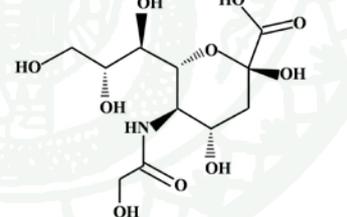
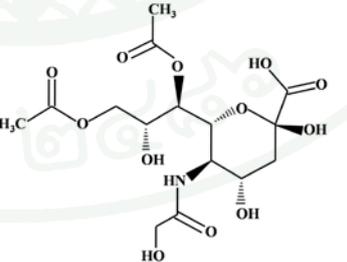
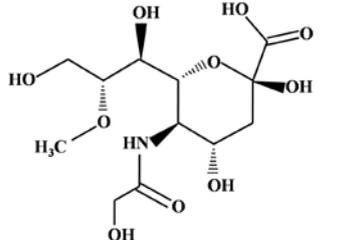
ตารางที่ 11 (ต่อ)

ชื่อเต็มของน้ำตาล	ชื่อย่อน้ำตาล	โครงสร้างน้ำตาล	Modeling LMLL Final Dock Energy (kcal/mol)
N-Acetylneuraminic acid	Neu5Ac		-7.46
N-Acetyl-9-O-phosphoneuraminic acid	Neu5Ac9P		-7.66
N-Acetyl-9-O-L-lactylneuraminic acid	Neu5Ac9Lt		-7.49

ตารางที่ 12 การแสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของกรดเซียลิกกลุ่ม N-Glycolylneuraminic acid และ  
แสดงการศึกษาการจับกันของ LMLL กับอนุพันธ์ของกรดเซียลิก

ชื่อเต็มของน้ำตาล	ชื่อย่อน้ำตาล	โครงสร้างน้ำตาล	Modeling LMLL Final Dock Energy (kcal/mol)
N-Glycolyl-7-O-acetylneuraminic acid	Neu7Ac5Gc		-8.51
N-Glycolyl-8,9-di-O-acetylneuraminic acid	Neu8,9Ac <sub>2</sub> 5Gc		-8.37
N-Glycolyl-4-O-acetylneuraminic acid	Neu4Ac5Gc		-8.33
N-Glycolyl-7,8,9-tri-O-acetylneuraminic acid	Neu7,8,9,Ac <sub>3</sub> 5Gc		-8.33

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ชื่อเต็มของน้ำตาล	ชื่อย่อน้ำตาล	โครงสร้างน้ำตาล	Modeling LMLL Final Dock Energy (kcal/mol)
N-Glycolyl-8-O-sulphoneuraminic acid	Neu5Gc8S		-7.88
N-Glycolyl-9-O-acetylneuraminic acid	Neu9Ac5Gc		-7.81
N-Glycolylneuraminic acid	Neu5Gc		-7.64
N-Glycolyl-7-O-acetylneuraminic acid	Neu7,9Ac5Gc		-7.74
N-Glycolyl-8-O-methylneuraminic acid	Neu5Gc8Me		-7.70

### 3.3 Restrained-Molecular Dynamic (MD) Simulation

การศึกษา Restrained-Molecular Dynamic (MD) Simulation ด้วยโปรแกรม Discovery Studio 2.1 เพื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานระหว่างกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะของ LMLL ที่จับกับน้ำตาลแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างของ 1JOT ที่จับกับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc ซึ่งได้จากการศึกษาโครงสร้างผลึก (Lee *et al.*, 1998) ซึ่งการศึกษาการจับกันของ 1JOT กับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc พบว่ากรดอะมิโนส่วนใหญ่ในบริเวณจับจำเพาะของ 1JOT จับกับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc ด้วยแรง electrostatics (ตารางที่ 13) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาด้วย molecular docking พบว่า 1JOT มีกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการจับกับน้ำตาลเหมือนกัน และค่าพลังงานที่ได้สอดคล้องกัน ดังนั้นกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะของ 1JOT ที่สำคัญต่อการจับกับน้ำตาล จากการศึกษาด้วย AutoDock 3.0.5. และ Discovery Studio 2.1 ได้แก่ Gly1, Tyr122, Trp123 และ Asp125

จากนั้นทำการศึกษา MD Simulation ของ LMLL ในการจับกับน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด พบว่ากรดอะมิโนส่วนใหญ่ในบริเวณจับจำเพาะของ LMLL จับกับน้ำตาล ด้วยแรง electrostatics มากกว่าแรง Van der Waals ส่วนกรดอะมิโนที่จับด้วยแรง Van der Waals มีเพียง Gly1 และ Tyr78 โดยกรดอะมิโน Tyr78 ที่จับกับ Neu5Gc สามารถจับด้วยแรง electrostatics และแรง Van der Waals ด้วยค่าพลังงานใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 14, 15 และ 16)

เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการจับกับน้ำตาลของ LMLL จากการศึกษาด้วย AutoDock 3.0.5. และ Discovery Studio 2.1 ให้ผลสอดคล้องกัน (ตารางที่ 10 และ 17) คือประกอบด้วยกรดอะมิโนอย่างน้อย 4 ชนิด ได้แก่ Gly1, Tyr122, Trp123 และ Asp125 และค่าพลังงานที่ได้จากการศึกษา MD Simulation ก็ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ต่างจากการศึกษา molecular docking เฉพาะค่าพลังงานของ Neu5Ac ซึ่งอาจต้องทำการศึกษามุมต่างๆ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3, 4, 7, 8 และ 9 ของ Neu5Ac ต่อไป (ตารางที่ 18) เมื่อวิเคราะห์การศึกษาทั้ง 2 โปรแกรม LMLL จับกับ Neu5Gc ดีที่สุด อาจเนื่องจาก Tyr78 ที่สามารถจับด้วยแรง electrostatics และแรง Van der Waals ซึ่งมีค่าพลังงานต่ำ ในขณะที่การจับกับน้ำตาลอื่นค่าพลังงานสูง และเป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวที่จับด้วยแรง Van der Waals ได้ต่ำกว่าแรง electrostatics ส่วน Ile79 สามารถจับด้วยแรง electrostatics ที่มีค่าพลังงานต่ำกว่าน้ำตาลอื่นยกเว้น GalNAc ซึ่ง Ile79 มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Neu5Gc เพียงชนิดเดียว

ตารางที่ 13 การแสดงค่าพลังงานจากการศึกษา MD Simulation ของ 1JOT กับ Gal $\beta$ 1,3GalNAc

1JOT	Gal $\beta$ 1,3GalNAc		
	Energy (kcal/mol)		
	Van der Waals	Electrostatics	Potential
Gly1	-3.36	-22.75	-26.11
Phe47	-1.71	-0.54	-2.25
Val75	-0.07	-5.65	-5.71
Tyr78	-0.97	-1.03	-2.00
Thr79	-0.17	-11.43	-11.61
Val80	-0.75	-7.93	-8.68
Ser119	-0.24	-0.73	-0.97
Ile120	-0.28	-1.04	-1.32
Gly121	-2.37	-3.91	-6.28
Tyr122	0.03	-11.17	-11.14
Trp123	-1.20	-9.79	-10.98
Leu124	-0.22	-7.20	-7.42
Asp125	-1.64	-21.88	-23.52
Total	-12.94	-105.05	-117.99

ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบแรง Electrostatics จากการศึกษาด้าน MD Simulation ของ LMLL กับ น้ำตาลทั้ง 5 ชนิด

LMLL	Electrostatics Energy (kcal/mol)				
	Neu5Gc	Neu5Ac	GalNAc	Glc	Man
Gly1	4.42	20.40	-1.25	-12.19	7.64
Phe47	-4.69	-5.75	-3.51	-2.98	-3.12
Val75	1.90	-6.72	-2.85	-3.13	-3.30
Tyr78	-5.12	2.22	-0.67	-0.11	-1.83
Ile79	-8.71	-4.13	-9.88	-1.85	-1.31
Val80	0.74	-0.33	-7.08	-1.10	0.00
Ser119	-2.11	-0.36	-2.20	-2.24	-7.03
Val120	-0.02	0.88	-1.60	0.49	-0.50
Gly121	-7.86	-0.82	-4.98	-3.01	-0.83
Tyr122	-10.51	-7.87	-2.17	-4.19	-0.01
Trp123	-6.09	-7.57	-7.04	-2.78	-5.85
Leu124	-0.89	-2.99	-1.12	1.76	-3.57
Asp125	-22.60	-36.79	-11.41	-17.68	-6.66
Total	-61.52	-49.82	-55.76	-48.99	-26.38

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบแรง Van der Waals จากการศึกษา MD Simulation ของ LMLL กับ น้ำตาลทั้ง 5 ชนิด

LMLL	Van der Waals Energy (kcal/mol)				
	Neu5Gc	Neu5Ac	GalNAc	Glc	Man
Gly1	-2.96	-2.06	-2.87	-0.41	-1.64
Phe47	-1.18	-1.09	-0.15	-0.46	-0.95
Val75	-0.22	-0.10	-0.11	0.07	-0.19
Tyr78	-4.63	-3.46	-2.51	-4.27	-2.79
Ile79	-2.15	-0.27	-0.07	-0.63	-0.37
Val80	-1.88	-0.62	-0.12	-1.43	-0.83
Ser119	-0.22	-0.93	-0.25	-0.25	-0.19
Val120	-0.37	-0.52	-0.80	-0.96	-0.75
Gly121	-0.99	-0.76	-1.12	0.37	-0.93
Tyr122	-1.74	-1.87	-1.22	-0.60	-2.58
Trp123	-1.83	-1.64	-1.11	-4.04	-2.10
Leu124	-0.17	-0.18	-0.11	-0.50	-0.45
Asp125	-2.91	-3.45	-2.48	3.71	0.08
Total	-21.23	-16.93	-12.92	-9.40	-13.69

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบค่าพลังงานจาก Discovery Studio 2.1 ของ LMLL ในการจับกับ น้ำตาล

Ligand	Energy (kcal/mol)	
	Van der Waals	Electrostatics
Neu5Gc	-21.23	-61.52
Neu5Ac	-16.93	-49.82
GalNAc	-12.92	-55.76
Glc	-8.59	-48.99
Man	-13.69	-26.37

ตารางที่ 17 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนจาก Discovery Studio 2.1 ของ LMLL ในการจับกับ น้ำตาล

Energy	List of residues
Van der Waals	Gly1, Tyr78, Tyr122, Trp123
Electrostatics	Phe47, Ile79, Tyr122, Trp123, Asp125

ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบค่าพลังงานจาก AutoDock 3.0.5. และ Discovery Studio 2.1 ของ LMLL ในการจับกับน้ำตาล

Ligand	Molecular Docking	MD Simulation
	Final Dock Energy (kcal/mol)	Final Dock Energy (kcal/mol)
Neu5Gc	-7.64	-82.75
Neu5Ac	-7.46	-66.75
GalNAc	-5.16	-68.68
Glc	-5.04	-58.39
Man	-4.83	-40.07

### 3.4 การทำนายโครงสร้างโปรตีนเลคตินกลายพันธุ์ที่สามารถจับกับกรดเซียลิกได้ดี

บริเวณจับจำเพาะของ LMLL มีกรดอะมิโนเกี่ยวข้องทั้งหมด 12 เรซิดิว จึงได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนทั้ง 12 เรซิดิว เพื่อทำการศึกษาว่าจะสามารถทำให้ LMLL จับกับ Neu5Gc ได้เพิ่มขึ้นและจับกับน้ำตาลชนิดอื่นได้ลดลงหรือไม่ โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะทั้ง 12 เรซิดิว เป็นกรดอะมิโนอีก 19 ชนิดที่เหลือ จากนั้นนำ LMLL ที่เปลี่ยนกรดอะมิโน (mutant LMLL) แล้วไปทำการศึกษา molecular docking กับ Neu5Gc, GalNAc และ Man แล้วเปรียบเทียบพลังงานในการจับกับน้ำตาล พบว่า mutant LMLL จับกับ Neu5Gc ที่ให้ค่าพลังงานในการจับต่ำสุด คือ GIY-LMLL จากนั้นเปรียบเทียบการจับกับ GalNAc และ Man พบว่า GIY-LMLL สามารถจับกับน้ำตาลทั้งสองได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน (ตารางที่ 19-21) การศึกษาครั้งนี้เพื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนให้มีความจำเพาะต่อ Neu5Gc เพิ่มมากขึ้น โดยการวิเคราะห์หากลกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแล้วทำให้ค่าพลังงานในการจับกับ Neu5Gc ต่างจาก GalNAc มากที่สุด เนื่องจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ GalNAc เป็นน้ำตาลที่มีความจำเพาะต่อ LMLL เช่นกัน และเทียบกับ Man ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ไม่จำเพาะต่อ LMLL พบว่า F47N-LMLL จับกับ Neu5Gc ได้ค่าพลังงานในการจับกับน้ำตาลต่างจาก GalNAc มากที่สุด แล้วเทียบกับการจับกับ Man มีค่าความต่างของพลังงานในการจับกับน้ำตาลใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบค่าความต่างในการจับกับ LMLL พบว่า F47N-LMLL มีความต่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ตารางที่ 22) จากนั้นนำค่าพลังงานในการจับกับน้ำตาลของ F47N-LMLL เปรียบเทียบกับ LMLL พบว่า F47N-LMLL สามารถจับกับ Neu5Gc ได้เพิ่มขึ้นจาก LMLL น้อย แต่ทำให้ค่าความต่างในการจับกับน้ำตาลอื่นเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 23) ในขณะที่ GIY-LMLL สามารถจับกับ Neu5Gc ได้เพิ่มมากที่สุด แต่ค่าความต่างของพลังงานในการจับกับน้ำตาลอื่นน้อยกว่าค่าความต่างในการจับของ F47N-LMLL และ LMLL จากนั้นทำการศึกษาโครงสร้างของ F47N-LMLL ที่จับกับน้ำตาล

ตารางที่ 19 การแสดงค่าพลังงาน (kcal/mol) ในการจับของ LMLL ที่ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับ Neu5Gc

change wild type	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
G1	-7.83	-8.13	-8.06	-8.35	-8.07	-7.50	-8.24	-8.39	-7.99	-7.62	-8.26	-8.22	-8.05	-7.86	-8.15	-8.23	-8.28	-7.72	-7.91	-8.69
F47	-8.24	-7.84	-7.69	-7.66	-7.55	-7.03	-7.59	-7.81	-7.88	-7.96	-7.55	-8.30	-7.53	-7.44	-8.04	-7.42	-7.49	-7.46	-7.81	-8.31
Y78	-6.76	-7.02	-7.03	-7.15	-7.55	-7.35	-7.13	-6.63	-7.37	-6.80	-7.09	-6.75	-6.84	-7.41	-7.24	-7.40	-7.32	-6.80	-8.13	-7.63
I79	-7.46	-7.98	-7.78	-7.65	-7.78	-7.69	-8.03	-7.76	-7.83	-8.09	-7.75	-7.87	-8.05	-7.97	-7.65	-7.69	-7.83	-7.78	-7.68	-8.09
V80	-7.67	-8.07	-7.65	-7.88	-8.14	-7.88	-7.52	-7.44	-8.27	-7.93	-7.09	-7.68	-8.12	-7.26	-8.00	-6.37	-7.70	-7.53	-7.15	-8.13
S119	-7.95	-7.68	-8.15	-7.97	-7.56	-7.65	-7.77	-7.82	-7.68	-7.72	-7.85	-7.83	-7.54	-7.78	-8.02	-7.46	-7.31	-8.13	-7.78	-8.19
V120	-8.07	-7.95	-8.02	-7.89	-7.80	-7.59	-7.74	-7.97	-7.53	-8.10	-7.54	-7.81	-7.45	-7.74	-7.53	-8.08	-7.78	-7.75	-7.60	-7.81
G121	-8.06	-7.10	-7.33	-6.55	-7.61	-7.62	-5.97	-5.87	-5.72	-6.84	-5.19	-6.63	-7.23	-5.28	-7.33	-6.86	-5.30	-6.10	-8.03	-8.16
Y122	-7.50	-7.51	-8.07	-7.83	-8.05	-7.24	-7.52	-7.69	-8.07	-7.74	-7.40	-7.58	-7.20	-7.61	-8.19	-7.41	-7.16	-7.44	-7.54	-7.72
W123	-7.99	-7.85	-7.18	-7.55	-8.16	-7.79	-7.82	-7.88	-7.10	-7.83	-7.71	-8.06	-8.11	-7.51	-8.04	-7.89	-8.01	-7.96	-7.87	-8.14
L124	-7.80	-8.19	-7.73	-8.19	-7.82	-7.82	-7.71	-8.02	-8.11	-7.97	-7.93	-7.98	-7.79	-7.91	-7.72	-7.86	-7.72	-7.60	-7.68	-7.70
D125	-7.64	-6.71	-7.60	-8.10	-6.79	-7.82	-7.07	-8.25	-7.76	-6.73	-7.16	-7.77	-8.00	-8.05	-8.21	-7.92	-7.94	-6.98	-8.10	-4.74

ตารางที่ 20 การแสดงค่าพลังงาน (kcal/mol) ในการจับของ LMLL ที่ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับ GalNAc

change wild type	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
G1	-7.44	-6.82	-6.81	-6.51	-7.22	-6.94	-6.63	-5.95	-7.08	-6.71	-7.02	-6.18	-6.65	-7.13	-7.57	-7.75	-6.35	-7.05	-6.81	-6.96
F47	-6.63	-7.04	-6.84	-6.66	-6.45	-6.46	-6.17	-6.35	-6.44	-6.39	-6.63	-5.32	-6.55	-6.48	-6.96	-7.28	-6.88	-6.85	-6.33	-5.42
Y78	-6.19	-6.23	-6.06	-6.36	-6.93	-6.79	-6.32	-6.03	-6.18	-6.36	-6.22	-5.98	-6.18	-5.74	-6.17	-5.82	-6.17	-6.07	-6.52	-6.92
I79	-6.74	-6.53	-6.58	-6.26	-6.22	-7.34	-6.89	-6.90	-6.44	-6.51	-6.58	-7.19	-6.99	-6.34	-6.63	-7.38	-6.48	-6.93	-6.81	-6.59
V80	-5.97	-6.43	-6.71	-6.70	-5.73	-6.66	-6.48	-7.00	-7.21	-6.59	-6.74	-5.72	-6.72	-6.52	-6.51	-6.56	-6.60	-6.93	-6.50	-6.81
S119	-6.50	-6.81	-6.55	-3.4	-6.41	-6.08	-6.93	-6.80	-6.72	-6.77	-6.76	-7.61	-6.55	-6.32	-6.52	-6.94	-6.48	-7.11	-6.63	-6.63
V120	-6.47	-6.87	-7.24	-6.87	-7.25	-6.65	-6.32	-6.61	-6.72	-6.97	-6.62	-6.45	-6.73	-6.31	-6.27	-6.78	-6.73	-6.92	-6.31	-6.49
G121	-6.24	-6.53	-6.05	-6.12	-6.38	-6.92	-5.42	-5.25	-6.59	-5.88	-4.13	-5.99	-6.42	-5.85	-7.04	-5.78	-6.44	-5.06	-6.57	-6.41
Y122	-6.56	-6.11	-6.63	-6.80	-6.62	-5.88	-6.59	-6.55	-6.80	-6.08	-7.16	-6.80	-5.66	-6.36	-7.34	-6.49	-6.29	-6.03	-6.49	-6.95
W123	-6.94	-6.32	-6.44	-6.55	-6.52	-6.56	-6.85	-6.82	-6.29	-6.46	-6.88	-6.53	-6.47	-6.72	-6.59	-6.48	-6.42	-6.52	-6.93	-6.74
L124	-6.93	-7.03	-6.76	-6.46	-6.63	-6.59	-6.13	-7.17	-6.98	-6.94	-7.09	-7.06	-6.78	-6.75	-6.57	-6.82	-6.80	-6.67	-6.69	-6.53
D125	-6.53	-6.38	-6.53	-6.53	-6.27	-6.51	-5.34	-6.65	-6.67	-5.43	-5.64	-6.49	-6.43	-6.75	-6.84	-6.96	-6.57	-5.55	-6.55	-4.66

ตารางที่ 21 การแสดงค่าพลังงาน (kcal/mol) ในการจับของ LMLL ที่ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับ Man

change wild type	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
G1	-6.71	-6.26	-6.00	-5.30	-6.41	-5.94	-6.48	-5.09	-6.47	-6.34	-6.74	-5.96	-6.68	-6.62	-6.42	-6.73	-6.03	-6.54	-6.59	-5.79
F47	-5.99	-5.86	-6.71	-5.63	-5.78	-6.21	-5.74	-5.64	-6.05	-5.88	-5.73	-5.10	-5.59	-5.83	-5.73	-5.71	-5.90	-6.12	-5.94	-5.30
Y78	-5.78	-5.51	-5.95	-5.80	-5.92	-5.77	-5.81	-5.49	-5.46	-5.36	-5.04	-5.54	-5.63	-5.33	-5.56	-5.44	-5.41	-5.65	-6.12	-5.95
I79	-6.06	-5.95	-5.95	-6.06	-5.93	-6.11	-5.93	-5.92	-5.90	-5.76	-5.80	-6.17	-5.97	-6.03	-6.00	-5.96	-5.89	-5.88	-6.10	-6.14
V80	-5.44	-5.83	-6.25	-6.33	-5.23	-5.75	-5.97	-6.33	-6.85	-6.11	-6.10	-4.93	-5.86	-5.89	-5.85	-6.10	-5.92	-5.87	-5.08	-6.22
S119	-5.87	-5.72	-5.90	-5.76	-5.94	-5.84	-6.08	-5.80	-6.03	-5.87	-6.14	-6.24	-5.64	-5.86	-5.89	-5.83	-6.18	-6.15	-5.81	-5.91
V120	-5.83	-6.26	-6.36	-6.35	-6.01	-5.91	-6.01	-6.10	-5.93	-5.93	-6.26	-5.76	-5.86	-5.90	-5.91	-6.25	-6.20	-5.89	-5.86	-5.81
G121	-5.46	-4.60	-5.23	-5.00	-5.16	-5.92	-4.21	-4.38	-4.77	-4.91	-4.07	-4.33	-4.72	-4.70	-5.81	-5.26	-4.26	-3.98	-5.29	-5.91
Y122	-6.01	-5.75	-6.44	-6.15	-5.90	-5.98	-5.86	-5.76	-6.00	-5.48	-6.45	-6.29	-4.75	-5.76	-6.94	-5.82	-5.71	-5.40	-5.40	-5.94
W123	-6.40	-5.80	-5.85	-5.69	-5.90	-5.90	-5.96	-5.90	-5.73	-5.71	-5.83	-5.89	-5.34	-6.01	-5.99	-5.80	-5.80	-5.71	-5.84	-5.90
L124	-6.18	-5.99	-5.99	-6.25	-5.97	-6.04	-5.76	-6.03	-6.68	-5.91	-6.25	-6.07	-5.89	-6.57	-6.06	-6.05	-5.84	-6.24	-5.90	-5.99
D125	-6.72	-6.10	-5.91	-6.93	-5.78	-6.97	-5.78	-6.60	-6.76	-5.21	-6.60	-5.72	-6.52	-7.02	-6.82	-6.82	-6.71	-5.79	-7.18	-3.91

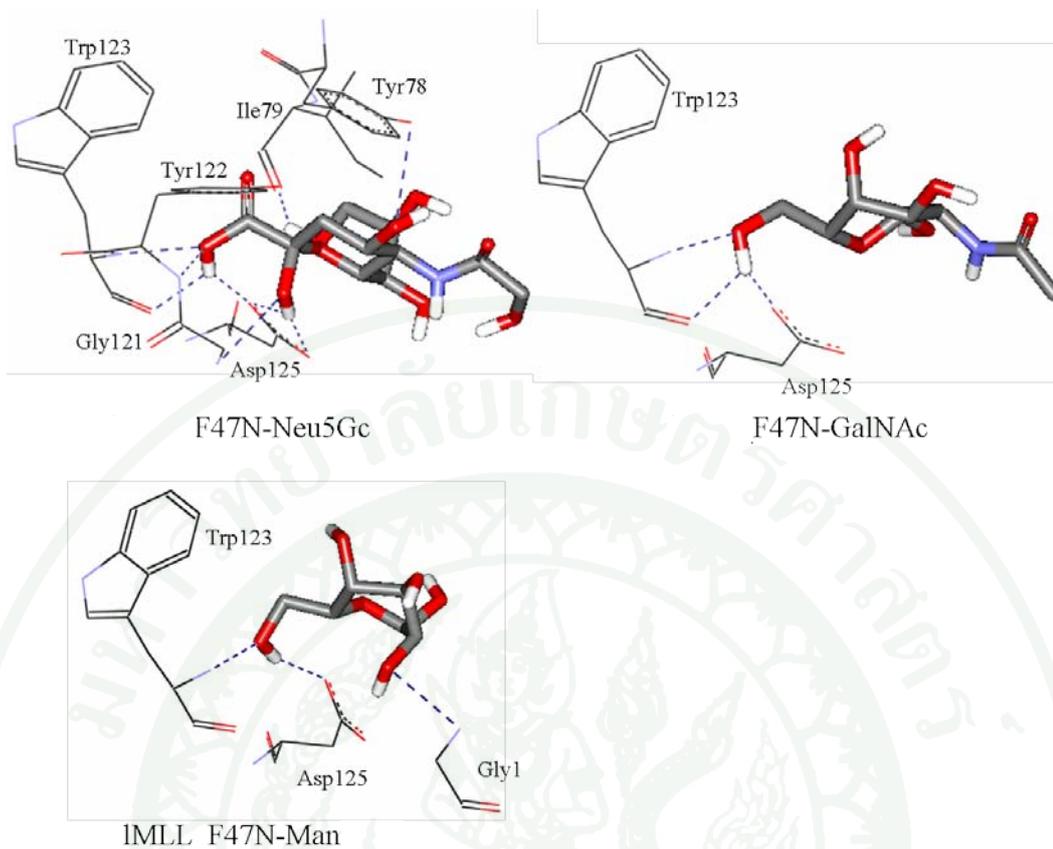
ตารางที่ 22 การเปรียบเทียบค่าพลังงาน (kcal/mol) การจับของ LMLL ที่ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับ Neu5Gc, GalNAc และ Man และเปรียบเทียบความสามารถในการจับของน้ำตาลแต่ละชนิด โดยเทียบจาก Neu5Gc

MLL	Modeling LMLL			Ratio	
	Final Dock Energy (kcal/mol)			Neu5Gc/GalNAc	Neu5Gc/Man
	Neu5Gc	GalNAc	Man		
LMLL	-7.64	-5.16	-4.83	1.48	1.58
F47N-LMLL	-8.30	-5.10	-5.32	1.56	1.63
F47Y- LMLL	-8.31	-5.30	-5.42	1.53	1.57
V80F-LMLL	-8.14	-5.23	-5.73	1.42	1.56
G1I-LMLL	-8.39	-5.09	-5.95	1.41	1.65
G1Y-LMLL	-8.69	-5.79	-6.29	1.39	1.50
V80N-LMLL	-7.68	-4.93	-5.72	1.34	1.56
G1N-LMLL	-8.22	-5.96	-6.18	1.33	1.38
D125H-LMLL	-7.07	-5.78	-5.34	1.32	1.22
G1T-LMLL	-8.28	-6.03	-6.35	1.30	1.37
G121A-LMLL	-8.06	-5.46	-6.24	1.29	1.48

ตารางที่ 23 การเปรียบเทียบการจับของ LMLL กับน้ำตาล Neu5Gc, GalNAc และ Man ระหว่าง mutant LMLL กับ LMLL

Mutant MLL	Ratio		
	Neu5Gc_M/ Neu5Gc_W	GalNAc_M/ GalNAc_W	Man_M/ Man_W
G1Y-LMLL	1.14	1.22	1.20
G1I-LMLL	1.10	1.15	1.05
F47N-LMLL	1.09	1.03	1.06
F47Y-LMLL	1.09	1.05	1.10
G1N-LMLL	1.08	1.20	1.23
G1T-LMLL	1.08	1.23	1.25
V80F-LMLL	1.07	1.11	1.09
G121A-LMLL	1.06	1.21	1.13
V80N-LMLL	1.01	1.11	1.02
D125H-LMLL	0.93	1.04	1.20

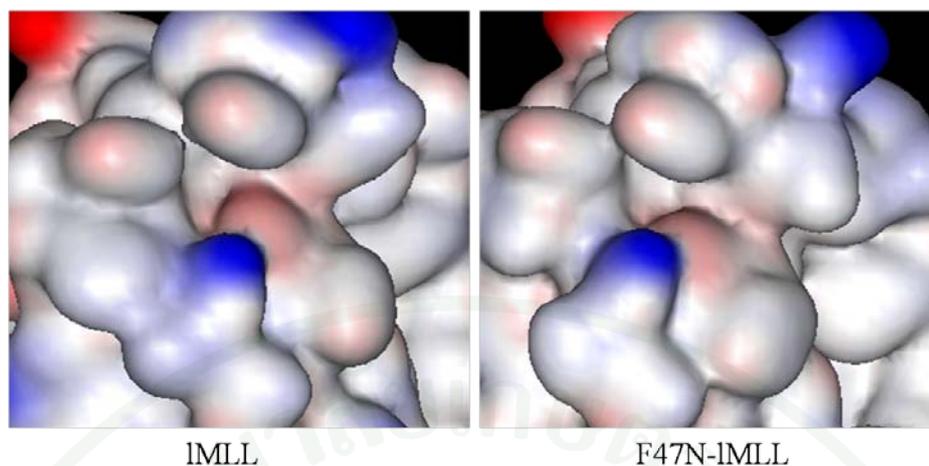
การศึกษาโครงสร้างของ F47N-LMLL ที่ทำให้ค่าพลังงานในการจับกับ Neu5Gc ต่างจากการจับกับ GalNAc และ Man พบว่า F47N-LMLL มีกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการจับกับน้ำตาล เปลี่ยนไปโดย F47N-LMLL จับกับ Neu5Gc มี Tyr78, Gly121 และ Tyr122 เพิ่มเข้ามาจากกรดอะมิโนใน LMLL ในขณะที่กรดอะมิโนของ F47N-LMLL ที่จับกับ GalNAc และ Man เป็นกรดอะมิโน Gly1, Trp123 และ Asp125 (ภาพที่ 81) คล้ายกับกรดอะมิโนใน LMLL จากนั้นศึกษา ระยะห่างของพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาล พบว่ากรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะส่วนใหญ่มีระยะห่างของกรดอะมิโนกับน้ำตาลน้อยลงจากเดิม (ตารางที่ 24) และเปรียบเทียบจากลักษณะผิวของโปรตีนจะเห็นว่าบริเวณจับมีลักษณะแคบลง (ภาพที่ 82) ซึ่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะอาจส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลง ทำให้น้ำตาลสามารถเข้าจับได้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะการเข้าจับกับโปรตีนคล้ายกันเทียบจากหมู่ O ที่อยู่ในวงแหวนของน้ำตาลที่เรียงตัวไปทางเดียวกันโดยหันด้านหมู่ O เข้าจับกับโปรตีนในร่องบริเวณจับจำเพาะ (ภาพที่ 83) และกรดอะมิโนที่สำคัญในการจับของ F47N-LMLL กับ Neu5Gc มี Tyr78, Gly121 และ Tyr122 เพิ่มมาและต่างจากการจับของ LMLL กับ Neu5Gc ส่วนการจับของ F47N-LMLL กับ GalNAc และ Man มีกรดอะมิโน Trp123 และ Asp125 เป็นอะมิโนหลักที่จับกับน้ำตาล (ตารางที่ 25)



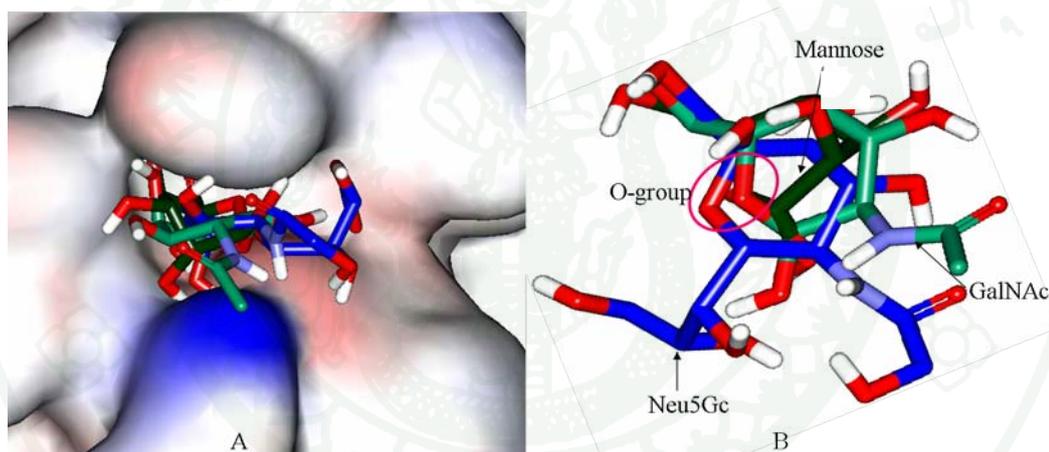
**ภาพที่ 81** การแสดงพันธะไฮโดรเจนของการจับกันระหว่าง F47N-LMLL กับ Neu5Gc, GalNAc และ Man พบว่ากรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการจับกับน้ำตาลเปลี่ยน โดย F47N-LMLL จับกับ Neu5Gc มี Tyr78 และ Gly121 เพิ่มเข้ามา ในขณะที่กรดอะมิโนของ F47N-LMLL จับกับ GalNAc และ Man เป็นกรดอะมิโน Gly1, Trp123 และ Asp125 คล้ายกับกรดอะมิโนใน LMLL

ตารางที่ 24 การแสดงค่าระยะห่างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง F47N-LMLL กับ Neu5Gc, GalNAc และ Man

Complex	H-Donor	H-Acceptor	Distance <sub>m</sub> (Å°)	Distance <sub>w</sub> (Å°)
F47N-LMLL- Neu5Gc	Protein	Ligand		
	Tyr122:NH	C1-O	2.960	
	Trp123:NH	C1-O	2.497	2.974
	Gly121: NH	C2-O	2.822	
	Tyr78:OH	C4-O	3.007	
	Ligand	Protein		
	C1-OH	CO:Trp123	2.630	
	C1-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.752	2.968
	C2-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.698	2.619
	C2-OH	O <sub>δ2</sub> :ASP125	3.013	2.813
	C9-OH	CO:Ile79	2.518	2.806
F47N-LMLL- GalNAc	Protein	Ligand		
	Trp123:NH	C6-O	2.684	2.808
	Ligand	Protein		
	C6-OH	CO:Trp123	2.774	2.639
	C6-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.732	
F47N-LMLL- Man	Protein	Ligand		
	Gly1: NH	C2-O	3.034	
	Trp123:NH	C6-O	2.662	2.839
	Ligand	Protein		
	C6-OH	O <sub>δ1</sub> :ASP125	2.761	



ภาพที่ 82 การเปรียบเทียบโครงสร้างและลักษณะผิวของ LMLL และ F47N-LMLL พบว่าบริเวณจับมีลักษณะแคบลง



ภาพที่ 83 การเปรียบเทียบโครงสร้างน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ขณะจับกับโปรตีน F47N-LMLL ได้แก่ Neu5Gc, GalNAc และ Man  
 A คือ ลักษณะการเข้าจับของน้ำตาล ซึ่งหันด้านหมู่ O เข้าจับกับ F47N-LMLL  
 B คือ การเปรียบเทียบ โครงสร้างของน้ำตาลที่มีลักษณะการเข้าจับกับโปรตีนที่คล้ายกัน

ตารางที่ 25 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง LMLL กับ F47N-LMLL

Ligand	No. of residues	List of residues	
		LMLL	F47N-LMLL
Neu5Gc	4	Gly1, Ile79, Trp123, Asp125	Tyr78, Ile79, Gly121, Tyr122, Trp123, Asp125
GalNAc	4	Gly1, Tyr122, Trp123, Asp125	Trp123, Asp125
Man	2	Tyr122, Trp123	Gly1, Trp123, Asp125

จากนั้นศึกษา MD Simulation ด้วยโปรแกรม Discovery Studio 2.1 เพื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานระหว่างกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะของ F47N-LMLL ที่จับกับ Neu5Gc, GalNAc และ Man พบว่ากรดอะมิโนส่วนใหญ่ในบริเวณจับจำเพาะของ F47N-LMLL จับกับน้ำตาลด้วยแรง electrostatics มากกว่าแรง Van der Waals เหมือนกับ LMLL ส่วนกรดอะมิโน Tyr78 ของ F47N-LMLL จับกับ Neu5Gc ด้วยแรง Van der Waals มากกว่าแรง electrostatics ต่างจากการศึกษาการจับกันของ LMLL กับ Neu5Gc โดย Tyr78 จับกับ Neu5Gc ด้วยแรง electrostatics มากกว่าแรง Van der Waals และมากกว่าเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วน Ile79 จับกับ Neu5Gc ด้วยแรง electrostatics และแรง Van der Waals ด้วยค่าพลังงานใกล้เคียงกัน แต่ค่าพลังงานสูงกว่าการจับกันของ Ile79 ใน LMLL ที่จับกับ Neu5Gc อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบแรง electrostatics และแรง Van der Waals ของ F47N-LMLL กับ LMLL พบว่า F47N-LMLL จับกับ Neu5Gc ด้วยแรง electrostatics และแรง Van der Waals ได้ดีกว่าการจับของ LMLL กับ Neu5Gc ในขณะที่การจับของ F47N-LMLL กับ GalNAc จับได้ไม่ดีค่าพลังงานเพิ่มขึ้น ส่วนการจับกับ Man จับได้ดีขึ้นด้วยแรง electrostatics ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 26 และ 27)

ตารางที่ 26 การเปรียบเทียบแรง Electrostatics จากการศึกษา MD Simulation ของ F47N-LMLL กับน้ำตาล 3 ชนิด

F47N-LMLL	Electrostatics Energy (kcal/mol)		
	Neu5Gc	GalNAc	Man
Gly1	0.20	0.22	3.19
Asn47	-8.02	-0.09	-9.00
Val75	-1.40	2.56	-3.70
Tyr78	-1.23	5.60	-0.67
Ile79	-3.39	-2.73	-0.55
Val80	-3.46	-1.94	-4.70
Ser119	-2.46	-2.68	-1.69
Val120	0.60	1.07	0.34
Gly121	-2.86	-0.64	0.81
Tyr122	-12.69	-10.36	-1.60
Trp123	-12.57	-5.50	-4.99
Leu124	2.00	-5.73	-0.03
Asp125	-33.21	-23.04	-15.14
Total	-78.46	-43.26	-37.73

ตารางที่ 27 การเปรียบเทียบแรง Van der Waals จากการศึกษาด้าน MD Simulation ของ F47N-LMLL กับน้ำตาล 3 ชนิด

F47N-LMLL	Van der Waals Energy (kcal/mol)		
	Neu5Gc	GalNAc	Man
Gly1	-1.84	0.01	-1.04
Asn47	-0.28	-0.24	-0.15
Val75	-0.16	-0.10	-0.31
Tyr78	-5.17	-2.85	-4.30
Ile79	-3.38	-0.28	-0.74
Val80	-0.57	-0.76	-0.98
Ser119	-0.32	-0.28	-0.44
Val120	-0.37	-0.64	-0.40
Gly121	-1.46	-1.58	-0.54
Tyr122	-2.62	-2.35	-0.49
Trp123	-2.26	-2.34	-0.14
Leu124	-0.26	-0.16	-0.46
Asp125	-4.48	0.25	-0.28
Total	-23.17	-11.33	-10.26

จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ 1MLL มีโครงสร้างเป็น  $\beta$ -sheet มีความจำเพาะต่อกรดเซียลิก และสามารถจับกับน้ำตาลอื่นๆ ได้ เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะ ทำให้โปรตีนจับกับน้ำตาลด้วยค่าพลังงานที่มีแนวโน้มไปทางเดียวกัน จึงเลือกโครงสร้างโปรตีนที่เปลี่ยนแล้วทำให้โปรตีนจับกับน้ำตาลด้วยค่าพลังงานต่างกันมากที่สุด และต่างจากเดิมเพิ่มขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนนั้นคือ ฟีนิลอะลานีนเปลี่ยนเป็นแอสพาราจินที่ตำแหน่ง 47 (F47N)

## วิจารณ์ผล

### 1. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย พบว่า pET-fMLL ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน ในขณะที่ pET-nsMLL มีการสังเคราะห์โปรตีนที่ขนาดประมาณ 13 kDa และ 9 kDa ส่วน pET-LMLL มีการสังเคราะห์โปรตีนที่ขนาดประมาณ 16 kDa และขนาด 13 kDa แต่โปรตีนขนาด 13 kDa มีปริมาณน้อย แถบโปรตีนไม่ชัดเจน การที่ pET-fMLL ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน อาจเนื่องมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ fMLL มีรหัสที่ไม่สามารถแปลเป็นกรดอะมิโน (rare codon) (Dethlefsen and Schmidt, 2005) 8 รหัส และ 1 ใน 8 รหัส คือ CGA (0.3%) เป็นรหัสที่พบเฉพาะในบริเวณสัญญาณโปรตีน (signal peptide) เท่านั้น (ภาพที่ 84 และตารางภาคผนวกที่ 16) ในขณะที่ส่วนของ pET-nsMLL และ pET-LMLL นั้นไม่มีรหัส CGA ดังนั้น pET-fMLL ที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน อาจมีสาเหตุจากการแปลรหัสโปรตีนไม่สมบูรณ์

```

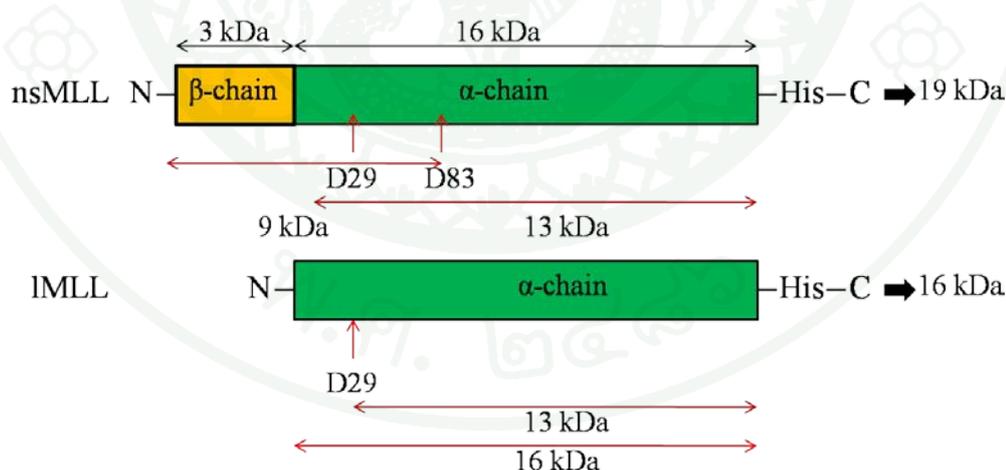
ATG GCT TCG TCT TCC TTT CTC TCC CTC TCC TTC CTC GTC CTC CTC TTC TCT ATC TCC
TCT GCC AAC ACC CGA AAG TGG TCC TTG TCA AAT GTT CTC GAT CAG AAA CCG ATC AGC
AUA ATC GAG GCC GCC ATT GGA GTT TCT GAA GAC CTT CTT AAT CTC AAT GGG ATG GAA
GCT AAA AAC AAT CAA CAA AGT GGG AAA AGT CAG ACG AUA GTT GTA GGA ACA TGG GGA
GCC CAA GCG ACT AGC TCT AAT GGT GTG GCT TTT GAT GAC GGT TCA TAC ACC GGA AUA
AGA GAA ATC AAT TTT GAA TAT AAT AAT GAA ACT GCT ATC GGG AGT ATT CAA GTG ACC
TAC GAT GTG AAT GGT ACG CCA TTT GAA GCA AAA AAA CAT GCC AGC TTT AUA ACA GGC
TTC ACA CCA GTA AAG ATT TCC TTA GAC TTT CCA AGT GAG TAT AUA GCT GAA GTG AGC
GGG TAC ACT GGT AAA GTG AGC GGG TAT AUA GTA GTA CGC TCT TTA ACA TTC AAG ACT
AAC AAA GAA ACT TAT GGA CCA TAT GGA GTT ACA AGC GGC ACA CAT TTT AAG CTC CCA
ATC CAA AAT GGC TTA ATT GTT GGA TTT AAA GGA AGT GTC GGC TAT TGG TTG GAC TAC
ATT GGG TTT CAC TTA GCA CTT CTG GTG GGC CGC GGC AGC CTC GAG

```

**ภาพที่ 84** ลำดับอาร์เอ็นเอของ fMLL พบว่าในบริเวณสัญญาณโปรตีน (signal peptide) (ตัวเข้ม) มีรหัส CGA (rare codon) (สีแดง) ที่พบทั้งใน *E. coli* และ sf9 รหัสสีน้ำเงินเป็น rare codon ที่พบใน *E. coli* รหัสสีชมพูเป็น rare codon ที่พบใน sf9

การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMLL จากลำดับนิวคลีโอไทด์จะได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 kDa แต่พบว่า pET-nsMLL มีแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นมาที่ขนาดประมาณ 13 kDa และ 9 kDa อาจเนื่องจากโปรตีนถูกตัดภายในโมเลกุลโดยมีบริเวณตัดที่จำเพาะ โดยจากน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จาก 15% SDS-PAGE คาดว่า pET-nsMLL น่าจะถูกตัดได้ 2 ตำแหน่ง เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลรวมมากกว่าน้ำหนักโมเลกุลที่ควรได้ ซึ่งขนาดประมาณ 13 kDa อยู่ด้าน C-terminal เพราะสามารถตรวจสอบด้วย Western blot และทำให้บริสุทธิ์ได้ ส่วนขนาดประมาณ 9

kDa อยู่ด้าน N-terminal (ภาพที่ 85) เพราะไม่สามารถตรวจสอบด้วย Western blot และทำให้บริสุทธิ์แล้วตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE ไม่พบโปรตีนขนาด 9 kDa แต่จากการหาบริเวณที่สามารถถูกตัด (putative site) เทียบกับโปรตีนอื่นๆ ของยูคาริโอต (Eukaryote Protein) ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 Server, LipoP 1.0 Server และ TatP 1.0 server ทั้ง 3 โปรแกรม เป็นโปรแกรมการคาดคะเนสัญญาณโปรตีนและตำแหน่งตัดของพอลิเปปไทด์ (Stephen *et al.*, 2003) พบว่าทั้ง 3 โปรแกรมให้ตำแหน่งตัดของพอลิเปปไทด์ที่พันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนแอสพาทิก (Aspartic acid) ตำแหน่ง 29 (D29) ซึ่งอยู่ในส่วนของ  $\alpha$ -chain น้ำหนักโมเลกุลที่ได้หลังการตัดนั้นประมาณ 14 kDa ด้าน C-terminal ใกล้เคียงกับโปรตีนหลักที่น้ำหนักโมเลกุล 13 kDa ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 9 kDa ที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนด้าน N-terminal ไม่พบตำแหน่งตัดที่ทำให้ได้โปรตีนด้าน N-terminal มีขนาด 9 kDa ทั้งนี้อาจทำการศึกษาด้วยการนำโปรตีนแต่ละขนาดไปตรวจสอบด้วยการทำ Mass spectrometry ต่อไป ส่วน pET-LMLL ที่ได้โปรตีน 2 ขนาด คือน้ำหนักโมเลกุล 16 kDa ซึ่งตรงกับการคาดคะเน และน้ำหนักโมเลกุล 13 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นการตัดของกรดอะมิโนตำแหน่ง D29 เช่นเดียวกับการตัดใน pET-nsMML แต่สัญญาณการตัดอาจไม่สมบูรณ์จึงสามารถตัดโปรตีนได้เพียงบางส่วน ซึ่งสัญญาณการตัดอาจอยู่ที่รอยต่อของ  $\beta$ -chain และ  $\alpha$ -chain เนื่องจากโปรตีนที่มีทั้ง  $\beta$ -chain และ  $\alpha$ -chain (pET-nsMML) เกิดการตัดได้สมบูรณ์ ส่วนโปรตีนที่มีเพียง  $\alpha$ -chain ตัดได้บางส่วน ดังนั้นอาจทำการศึกษาหาสัญญาณการตัดโปรตีนต่อไป



ภาพที่ 85 ไลอะแกรมจำลองการคาดคะเนบริเวณตัดใน pET-nsMML และ pET-LMLL ซึ่งคาดว่าน่าจะมีบริเวณตัด 2 ตำแหน่ง

โปรตีนบางส่วนอาจถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของแบคทีเรีย (Nagatal *et al.*, 1998) เช่น Aminopeptidase (exopeptidases) จะย่อยด้าน N-terminal (Gonzales and Robert-Baudouy, 1996) หรือ Type I signal peptidase เป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในแบคทีเรีย รา พืช หรือสัตว์ จะตัดด้าน N-terminal (Tuteja, 2005) แล้วอาจทำให้ได้ pET-nsMMLL ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 13 kDa จากการวิเคราะห์หาเอนไซม์ที่สามารถตัดพอลิเปปไทด์ด้วยโปรแกรม PeptideCutter (ExPASy Proteomics Server) พบเอนไซม์ที่สามารถตัด pET-nsMMLL ได้ขนาดที่ใกล้เคียงกับการตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE คือ Asp/Glu-N endopeptidase เป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดพันธะเปปไทด์ตำแหน่งของกรดอะมิโนแอสพาทิก (Aspartic acid) หรือกลูตามิก (Glutamic acid) (Ingrosso *et al.*, 1989) ได้หลายตำแหน่ง และตำแหน่งที่ตัดแล้วได้โปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียง 13 kDa คือ D29, D30, E38 และ E42 ตำแหน่งที่ตัดแล้วได้โปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียง 9 kDa คือ D83 และ E87 (ภาพภาคผนวกที่ 12) โปรตีนเลคตินที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ของแบคทีเรียอาจทำให้ได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลดังกล่าวแล้ว ยังอาจทำให้โปรตีนถูกย่อยและมีขนาดเล็กจนไม่สามารถตรวจสอบได้ จึงทำให้เห็นแถบโปรตีนที่ถูกตัดมีปริมาณไม่เท่ากัน จากการวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดจำเพาะและเอนไซม์จากแบคทีเรียที่อาจส่งผลต่อขนาดโปรตีน พบข้อมูลที่อาจทำให้เข้าใจได้ว่าโปรตีนเลคตินน่าจะมีตำแหน่งตัดจำเพาะและถูกย่อยด้วยเอนไซม์แบคทีเรีย เนื่องจากทั้ง pET-nsMMLL และ pET-LMML มีโปรตีนขนาด 13 kDa เหมือนกันน่าจะถูกตัดตำแหน่งเดียวกัน ส่วนโปรตีนขนาด 9 kDa ของ pET-nsMMLL แถบโปรตีนบาง ปริมาณโปรตีนน้อย บางส่วนน่าจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์แบคทีเรีย อย่างไรก็ตามตำแหน่งตัดจำเพาะและเอนไซม์จากแบคทีเรียที่คาดการณ์ไว้นั้นอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เมื่อตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ด้วยการทำ Western blot พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMMLL และ pET-LMML ปรากฏแถบโปรตีนที่ตำแหน่งตรงกับแถบโปรตีนที่ได้จาก 15% SDS-PAGE แสดงว่าการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMMLL และ pET-LMML มีการแสดงออกของยีนตามที่คาดหมาย แต่ pET-LMML ไม่สามารถตรวจได้เนื่องจากไม่มีการแสดงออกของโปรตีน และแถบโปรตีนที่เพิ่มขึ้นมาที่ขนาด 13 kDa ของ pET-nsMMLL เป็นโปรตีนทางด้าน C-terminal ที่อาจได้จากการถูกตัดภายในโมเลกุลหรือการย่อยด้วยเอนไซม์แบคทีเรีย เนื่องจากตรวจสอบด้วย Western blot ได้ ส่วนแถบโปรตีนที่เพิ่มขึ้นมาที่ขนาด 13 kDa ของ pET-LMML น่าเป็นโปรตีนด้าน C-terminal เพราะมีขนาดเท่ากับแถบโปรตีนที่ขนาด 13 kDa ของ pET-nsMMLL แต่ตรวจสอบด้วย Western blot แล้วไม่พบการเกิดปฏิกิริยาคด้วย chemiluminescence บนแผ่นฟิล์ม X-ray ในตำแหน่งดังกล่าว อาจเป็นเพราะโปรตีนขนาด 13 kDa ของ pET-LMML มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับโปรตีนขนาด 16 kDa ของ pET-LMML

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนพีชในเซลล์แบคทีเรียของ Roychoudhury and Basu (2008) ที่ศึกษาการแสดงออกของ RAB16A ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกิดจากความเครียดในสภาวะเกลือ (salt-stress) ของข้าว พบว่าโปรตีนสามารถทำงานได้เช่นเดียวกับในธรรมชาติ ดังนั้นจึงทำการศึกษากการแสดงออกของ MLL1 ในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET-nsMLL และ pET-LMLL จากนั้นทำให้โปรตีนบริสุทธิ์และเพิ่มความเข้มข้นเพื่อตรวจสอบกิจกรรมโปรตีนด้วยวิธีอิมมูโนบลอตติง แต่โปรตีนทั้ง 2 ชนิด เกิดการรวมกลุ่มตกตะกอนจึงไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมโปรตีนได้ จากนั้นนำโปรตีนที่เกิดการรวมกลุ่มตกตะกอนปรับสภาวะโปรตีนให้อยู่ในโครงสร้างที่เหมาะสม โดยนำไปทำ Refold Protein ซึ่งการทำ Refold Protein ของโปรตีนที่เป็น inclusion bodies นั้นสามารถทำให้โปรตีนอยู่ในโครงสร้างที่เหมาะสมและทำงานได้ เช่น การแสดงออกของ *Arabidopsis thaliana* RGL-3 ((At) RGL-3) ซึ่งเป็นโปรตีนในกระบวนการเปลี่ยนดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอ (transcription factor) โปรตีน (At) RGL-3 แสดงออกในเซลล์แบคทีเรียในส่วน of inclusion bodies ทำการ Refold Protein แล้วทำให้ (At) RGL-3 สามารถเกิดการรวมกันของ 2 หน่วยย่อย (dimer) (Al-Samarrai *et al.*, 2007) แต่เมื่อทำการ Refold Protein ของ pET-nsMLL และ pET-LMLL ในปริมาณมากเพื่อนำไปเพิ่มความเข้มข้นโปรตีน โปรตีนเกิดการรวมกลุ่มตกตะกอน จึงทำการแยกตะกอนและส่วนใส แล้วนำส่วนใสมาตรวจสอบกิจกรรมโปรตีน พบว่าโปรตีนไม่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายเกิดการรวมกลุ่มตกตะกอนได้ เมื่อเทียบกับโปรตีนควบคุม อาจเป็นเพราะโปรตีนมีความเข้มข้นต่ำ โดยการหาปริมาณโปรตีนหาได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm เทียบกับบัฟเฟอร์ ได้โปรตีนที่มีความเข้มข้น 0.01 mg/ml การ Refold Protein ยังมีอยู่เยื่ออยู่ในระบบทำให้ไม่สามารถหาปริมาณโปรตีนได้ด้วยวิธี Lowry's หรือ Bradford's และเป็นไปได้ว่าเมื่อปรับสภาวะโปรตีนแล้ว แต่โปรตีนยังคงมีโครงสร้างที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้ไม่มีกิจกรรมโปรตีน แต่เมื่อนำโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์แบคทีเรีย (crude protein) มาตรวจสอบกิจกรรม พบว่าโปรตีนทั้งหมดยังคงไม่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดการรวมกลุ่มตกตะกอนได้เช่นกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโปรตีนเลคติน MLL1 ในธรรมชาติ ที่สามารถทำงานได้ต้องอยู่ในโครงสร้างที่ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 51 kDa และมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 8.8 % (Ratanapo *et al.*, 1998) ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินที่ได้จากการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรียเป็น inclusion body ไม่สามารถรวมกันเป็น trimer และไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากไม่มีไกลโคซิเลชันเกิดขึ้น เหมือนโครงสร้างในสภาพธรรมชาติได้ ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ไม่มีกิจกรรมโปรตีน ดังนั้นจึงทำการศึกษากการแสดงออกของโปรตีนเลคตินในเซลล์แมลง (sf9) เพื่อให้โปรตีนเกิดไกลโคซิเลชัน เช่นเดียวกับโปรตีนเลคตินในธรรมชาติ

## 2. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แมลง

การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเลคติน MLL1 เข้าสู่เซลล์แมลง เนื่องจากการเกิดไกลโคซิเลชันของเซลล์แมลง มีลักษณะคล้ายกับไกลโคซิเลชันในพืชคือ ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส 3 โมเลกุล แต่ในพืชจะมี N-acetylglucosamine 2 โมเลกุล และ xylose 1 โมเลกุล (Rayon *et al.*, 1998) ในขณะที่เซลล์แมลงไม่มีน้ำตาล 2 ชนิดนี้ (Rendic *et al.*, 2007) ส่วนไกลโคซิเลชันในยีสต์นั้นประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสจำนวนมาก (Tanner and Lehle, 1987) อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเลคติน และการแสดงออกของโปรตีนในต้นยาสูบ (Tobacco) ใช้เวลาในการศึกษานาน จึงเลือกใช้เซลล์แมลงในการศึกษา ตัวอย่างของโปรตีนพืชที่แสดงออกในเซลล์แมลง เช่น auxin-binding protein (ABP1) มีสัญญาณโปรตีนและโปรตีนถูกส่งออกนอกเซลล์ (Henderson *et al.*, 1995) ดังนั้นเพื่อต้องการให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน MLL1 มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบและมีกิจกรรมโปรตีนเช่นเดียวกับ MLL1 ในธรรมชาติ และคาดหวังว่าจะมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งส่วนของสัญญาณโปรตีน สาย A และสาย B เมื่อมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทุกส่วน และรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีสัญญาณโปรตีนตามที่คาดคะเน โปรตีนจะต้องมีการตัดส่วนของสัญญาณโปรตีน จึงทำการแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MLL1 เป็น 2 ส่วน ได้แก่ fMLL และ nsMLL การสร้าง pFast-MLL มี His-tag อยู่ด้าน N-terminal ในการแปลรหัสโปรตีนจะเริ่มแปลรหัสตั้งแต่ His-tag ซึ่งอยู่ด้านหน้ายีนของเลคตินและในการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการตรวจสอบนั้นเข้าสู่โปรแกรม Translate (ExpASY Proteomics Server) เพื่อตรวจสอบการแปลรหัส (Frame) พบว่าได้กรดอะมิโนตามที่ต้องการ

การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE ไม่พบความแตกต่างของแถบโปรตีนระหว่างเซลล์แมลงที่ถูกขนถ่ายยีน (transfected) และไม่ถูกขนถ่ายยีน (non-transfected) อาจเนื่องจากการแสดงออกของโปรตีนน้อย แต่เมื่อตรวจสอบด้วยการทำ Western blot แล้วพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน Bac-fMLL และ Bac-nsMLL ไม่มีความจำเพาะต่อ Penta-His Alexa Fluor Conjugates อาจแสดงให้เห็นว่าไม่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน หรือโปรตีนมีปริมาณน้อย (0.005 mg/ml) ซึ่งการตรวจสอบโปรตีนที่มีการแสดงออกในเซลล์แมลงที่ได้ปริมาณโปรตีนน้อย อาจตรวจสอบน้ำตาลบน 15% SDS-PAGE ด้วยการย้อมเจลใน Cationic dyes หรือ Hydrazine derivat (Holger *et al.*, 2007) ก็ได้ เมื่อนำโปรตีนไปทำบริสุทธิ์ และตรวจสอบกิจกรรมโปรตีน พบว่า Bac-fMLL และ Bac-nsMLL ไม่สามารถทำงานได้ เมื่อตรวจสอบรหัสโปรตีนใน fMLL และ nsMLL พบรหัส CGA และ GGG เป็น rare codon ใน sf9 (ตารางภาคผนวกที่ 17) รหัส CGA พบ

ในบริเวณสัญญาณ โปรตีน (fMLL) ส่วน GGG เป็น rare codon ที่พบใน nsMLL จึงอาจส่งผลให้ Bac-fMLL และ Bac-nsMLL ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนใน sf9 การศึกษาการแสดงออกของ pET-fMLL และ Bac-fMLL มีรหัส CGA ซึ่งเป็น rare codon ที่พบทั้งใน *E. coli* (0.3%) และ sf9 (0.54%) เป็นรหัสและตำแหน่งเดียวกันอาจทำให้ Bac-fMLL ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกับ pET-fMLL ในขณะที่ Bac-nsMLL มีรหัส GGG (0.46%) หลายตำแหน่งและตำแหน่งแรกเป็นรหัส โปรตีนตำแหน่งที่ 4 ซึ่งอยู่ในบริเวณเริ่มแรกของการสังเคราะห์โปรตีน โดยบริเวณที่พบตำแหน่งของ rare codon อยู่ในบริเวณเริ่มการสังเคราะห์โปรตีนจะทำให้มีโอกาสสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นน้อย (Dethlefsen and Schmidt, 2005) ดังนั้นจึงอาจไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน Bac-nsMLL

### 3. การออกแบบและวิศวกรรมโปรตีนโดยเทคนิค computer-based design

การศึกษาโครงสร้างโปรตีนเลคตินและเพิ่มความจำเพาะต่อกรดเซียลิก (Neu5Gc) ด้วยคอมพิวเตอร์ ทำ homology modeling โปรตีนเลคตินจากโปรตีนที่มีความเหมือนกับโปรตีนที่สนใจ ซึ่งมีโครงสร้างในฐานข้อมูล มีการศึกษา homology modeling ของโปรตีนหลายชนิดที่ศึกษา เช่นเดียวกันนี้ เช่น การศึกษา homology modeling ของ Cdc25A phosphatases จากโครงสร้างที่ได้จากการตกผลึกโปรตีนของ Cdc25B แล้วนำไปศึกษาต่อด้วย โปรแกรม AutoDock 3.0.5 (Park and Jeon, 2008) การศึกษา Molecular modeling และ dynamics simulations ของ PNP จาก *Streptococcus agalactiae* (SaPNP) โดยทำการ homology modeling โปรตีน SaPNP จากโปรตีน HsPNP แล้วศึกษาความจำเพาะต่อลิแกนด์และความสำคัญของ motif (Caceres *et al.*, 2008) เป็นต้น การศึกษาโครงสร้างโปรตีนเลคตินและความจำเพาะต่อกรดเซียลิกจะทำการเตรียมโครงสร้างโปรตีนเลคตินด้วยการทำ homology modeling กับ 1JOT ได้โครงสร้างของ LMLL ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เหมือนกับแม่แบบ จากนั้นเตรียมลิแกนด์ ซึ่งลิแกนด์ที่นำมาศึกษาคือน้ำตาลที่ศึกษาความจำเพาะในห้วงปฏิบัติการ ทั้งที่มีความจำเพาะและไม่จำเพาะต่อ 1MLL เพื่อเปรียบเทียบพลังงานในการจับระหว่างน้ำตาลแต่ละชนิด และเปรียบเทียบระหว่าง wildtype และ mutant LMLL เมื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะ แล้วส่งผลต่อความจำเพาะของน้ำตาลอย่างไร จากนั้นทำการศึกษา Molecular Docking โดยทำการ ReDocking 1JOT เพื่อตรวจสอบระเบียบวิธีการทำงาน (algorithm) ถ้า ReDocking แล้วโครงสร้างต่างๆ ไม่เปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงแล้วหมู่ต่างๆ ของลิแกนด์มีทิศทางเดียวกัน ค่า RMSD น้อยกว่า 3 Å (Magalhaes *et al.*, 2004) ก็สามารถนำระเบียบวิธีที่ได้จากการ ReDocking ไปศึกษากับ LMLL ต่อไป เมื่อได้โครงสร้าง LMLL, โครงสร้างลิแกนด์และระเบียบวิธีศึกษา ก็ทำการ Docking เพื่อศึกษาความสามารถในการจับกับน้ำตาลแต่ละชนิด โดยให้โครงสร้างโปรตีนอยู่กับที่ (fixed) ส่วนลิแกนด์สามารถเคลื่อนที่ได้ ผล

ของการ Docking ในการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า LMLL สามารถจับกับ Neu5Gc ได้ดีที่สุด รองมาคือ Neu5Ac แต่การศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่า MLL1 ไม่จำเพาะต่อ Neu5Ac ส่วนน้ำตาลอื่นให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยน้ำตาลที่ไม่มี ความจำเพาะต่อ MLL1 จะมีค่าพลังงานในการจับกับ LMLL สูง การศึกษาการจับกันระหว่าง LMLL กับ Neu5Ac ที่มีค่าพลังงานใกล้เคียงกับ Neu5Gc อาจเนื่องจากหมู่ฟังก์ชันคล้ายกัน ซึ่งโครงสร้างของ Neu5Gc และ Neu5Ac ต่างกันที่ Neu5Gc มีหมู่ไกลโคลิล (glycolyl) ที่มีโครงสร้างเป็น C5-CO-CH<sub>2</sub>-OH ส่วน Neu5Ac มีหมู่อะเซทิล (acetyl) ที่มีโครงสร้างเป็น C5-CO-CH<sub>3</sub> โดยหมู่ที่ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนคือหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จึงทำให้ค่าพลังงานที่ได้จากการ Docking ของการจับกันระหว่าง LMLL กับ Neu5Gc ต่ำกว่า Neu5Ac และค่าพลังงานที่ได้ใกล้เคียงกัน เพราะหมู่ไฮดรอกซิลที่ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วนใหญ่อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1, 4, 7,8, และ 9 ในขณะที่การศึกษาในห้องปฏิบัติการนั้น MLL1 ไม่จำเพาะต่อ Neu5Ac อาจเกิดจากในสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์ต่างๆ มีเอนไซม์ sialyltransferase ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งกรดเซียลิกให้กับตัวรับ ทำให้ไกลโคโปรตีนในธรรมชาติจับกับเซลล์ หรือไกลโคโปรตีนอื่นๆ ต่างกัน ขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Chiu *et al.*, 2004) หรืออาจเกิดจากความจำเพาะต่อลักษณะการเกิดไกลโคซิเลชัน (Raman *et al.*, 2005) ซึ่งการศึกษาในคอมพิวเตอร์ไม่สามารถศึกษาในส่วนนี้ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาความจำเพาะต่อกรดเซียลิกอีก 24 โครงสร้าง ฉะนั้นการศึกษาความจำเพาะของ LMLL ต่อกรดเซียลิกอื่นๆ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมในห้องปฏิบัติการ

การศึกษา MD Simulation เป็นการจำลองสภาวะเสมือนธรรมชาติของโปรตีน (Karplus and McCammon, 2002) เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของกรดอะมิโนที่มีผลต่อการจับกับน้ำตาล พบว่ากรดอะมิโนที่สำคัญจากการศึกษา MD Simulation เป็นกรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกับกรดอะมิโนที่ทำให้โปรตีนจับกับน้ำตาลจากการศึกษา Molecular Docking ซึ่งพิจารณาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจน แต่การศึกษาจาก MD Simulation จะพบกรดอะมิโนที่สำคัญมากกว่า เนื่องจากพิจารณาจากค่าพลังงานของแรง Electrostatics และ Van der Waals แสดงให้เห็นความต่างที่ทำให้ LMLL จับกับน้ำตาลต่างกัน กรดอะมิโนของ LMLL ส่วนมากจะจับกับน้ำตาลด้วยแรง Electrostatics มีเพียงกรดอะมิโนบางชนิดที่จับด้วยแรง Van der Waals ซึ่งเป็นแรงอย่างอ่อน แต่สามารถทำให้โปรตีนจับกับน้ำตาลได้ การศึกษาความจำเพาะต่อ Neu5Gc ของ LMLL ทั้ง 2 โปรแกรมให้การศึกษาที่สอดคล้องกัน

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะของ LMLL เพื่อเพิ่มความจำเพาะต่อ Neu5Gc ซึ่งการศึกษา Molecular Docking ของ mutant LMLL พบว่าเปลี่ยนกรดอะมิโน

แล้วทำให้ mutant LMLL จับกับน้ำตาลแต่ละชนิดมีแนวโน้มของค่าพลังงานในการจับที่สหทางเดียวกัน คือ mutant LMLL แล้วจับกับ Neu5Gc ให้ค่าพลังงานต่ำกว่า wildtype และเทียบกับการจับกับน้ำตาลชนิดอื่นก็ให้ค่าพลังงานต่ำกว่า wildtype เช่นกัน หรือจับแล้วให้ค่าพลังงานสูงเหมือนกัน ดังนั้นจึงเลือกโครงสร้าง mutant LMLL ที่สามารถจับกับ Neu5Gc ได้ค่าพลังงานในการจับต่างจากการจับกับน้ำตาลชนิดอื่น และต่างกันมากกว่า wildtype นั่นคือ F47N จากค่าพลังงานในการจับของ mutant LMLL จะเห็นว่ามีความต่างของค่าพลังงานน้อย อาจต้องศึกษาการเปลี่ยนกรดอะมิโนอีกครั้ง (Double Mutant) โดยนำโครงสร้าง mutant LMLL ที่ได้ครั้งแรกมาเปลี่ยนกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะ เพื่อให้ได้ค่าพลังงานในการจับที่ต่างกันมากขึ้น (Cordente *et al.*, 2006) เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของ LMLL ระหว่าง wildtype และ mutant LMLL พบว่า mutant LMLL มีระยะห่างของพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีนและน้ำตาลน้อยลง แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนเกิดขึ้น เมื่อศึกษา mutant LMLL ด้วย MD Simulation เพื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนสำคัญในการจับกับน้ำตาล พบว่ากรดอะมิโนของ mutant LMLL ส่วนใหญ่ยังคงสามารถจับกับน้ำตาลได้ด้วยแรง Electrostatics และมีค่าต่ำกว่า wildtype ส่วนการจับด้วยแรง Van der Waals เป็นกรดอะมิโนกลุ่มเดิม เมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานรวมในการจับของ mutant LMLL กับ Neu5Gc มีค่าพลังงานต่ำกว่า wildtype ส่วนการจับกับน้ำตาลอื่นค่าพลังงานสูงขึ้น แสดงให้เห็นความต่างของค่าพลังงานระหว่างน้ำตาลต่างกันมากขึ้น อย่างไรก็ตามค่าพลังงานที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะทั้งที่ศึกษาด้วย Molecular Docking และ MD Simulation นั้นยังต่างกันน้อย อาจยังไม่เพียงพอที่จะนำข้อมูลจากการศึกษาด้วยคอมพิวเตอร์ไปศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงควรศึกษา Double Mutant ด้วยคอมพิวเตอร์เพิ่มเติม แล้วค่อยทำ site-directed mutagenesis ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษา Molecular Docking ในแต่ละครั้งจะให้ค่าพลังงานแตกต่างกันเล็กน้อย ขึ้นอยู่พารามิเตอร์ต่างๆ ที่กำหนด ระยะเวลาในการทำงาน และจำนวน โครงสร้าง หรือแม้แต่เครื่องคอมพิวเตอร์ ซึ่งโครงสร้างลิแกนด์ที่ดีที่สุดแต่ละครั้งอาจไม่ใช่โครงสร้างเดิม และโครงสร้างลิแกนด์ที่มีค่าพลังงานในการจับต่ำที่สุด อาจไม่ใช่โครงสร้างที่ดีที่สุด โดยการเลือกโครงสร้างลิแกนด์ที่จะนำมาศึกษาต้องพิจารณาจากหลายๆ ปัจจัย โดยเลือกโครงสร้างที่มีค่าพลังงานต่ำที่สุดก่อน แล้ววิเคราะห์ลักษณะโครงสร้าง ลักษณะการเข้าจับ ค่า RMSD ซึ่งจะให้ได้โครงสร้างที่ดีที่สุดในการศึกษาต่อไป

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

1. ยีนเลคติน pET-fMLL และ pET-nsMMLL ที่แสดงออกในเซลล์แบคทีเรียมีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMMLL และ nsMMLL แต่มีเพียง pET-LMML เท่านั้นที่ลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนไปหนึ่งตำแหน่ง จากกวานีน (G) เป็นอะดีนีน (A) ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจากไอโซลิวซีน (I) เป็นวาลีน (V) แต่ไม่มีผลต่อโครงสร้างของโปรตีน เพราะเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกัน
2. การแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย pET-fMMLL ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้น ส่วน pET-nsMMLL มีการสังเคราะห์โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 kDa และ 9.0 kDa ซึ่งขนาดโปรตีนที่ได้ต่ำกว่าขนาดที่ตามต้องการ และ pET-LMML มีการสังเคราะห์โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16 kDa และ 13 kDa ซึ่งโปรตีนขนาด 16 kDa มีขนาดเท่ากับขนาดที่ต้องการ แต่โปรตีนขนาด 13 kDa น่าจะเกิดจากการถูกตัดด้วยเอนไซม์หรือถูกตัดภายในโมเลกุลของโปรตีนเอง เมื่อทำ Western blot ให้โปรตีนที่มีขนาด 13 kDa
3. โปรตีนที่ได้จากแสดงออกในเซลล์แบคทีเรียไม่สามารถทำงานได้ คือไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายรวมกลุ่มตกตะกอน แม้ว่าจะมีการ Refold Protein แล้วก็ตาม
4. การโคลนยีนเลคตินเข้าสู่ pFastBacHT-A vector เพื่อให้แสดงออกในเซลล์แมลง ตรวจสอบ Bac-fMMLL และ Bac-nsMMLL มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน fMMLL และ nsMMLL
5. การแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แมลง (sf9) ทั้ง Bac-fMMLL และ Bac-nsMMLL ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้น
6. การศึกษาความจำเพาะของโปรตีนเลคตินกับน้ำตาลด้วยคอมพิวเตอร์ พบว่าโปรตีนเลคตินมีความจำเพาะต่อกรดเซียลิก (Neu5Gc) มากกว่า GalNAc, Man, Glc และ Neu5Ac ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ

7. กรดอะมิโนในบริเวณจับจำเพาะของเลคตินที่มีความสำคัญในการจับกับน้ำตาลได้แก่ Gly1, Tyr122, Trp123 และ Asp125 ให้ผลการศึกษาสอดคล้องกันทั้งในโปรแกรม AutoDock 3.0.5. และ Discovery Studio 2.1

8. การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ทำให้โปรตีนเลคตินจับกับกรดเซียลิก (Neu5Gc) ได้ค่าพลังงานในการจับต่ำกว่าการจับกับน้ำตาลอื่น (GalNAc และ Man) และมีความต่างของค่าพลังงานในการจับกับน้ำตาลอื่นมากที่สุด คือ การเปลี่ยนฟีนิลอะลานีน (F) เป็นแอสพาราจिन (N) ที่ตำแหน่ง 47 (F47N)

### ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านทั้งในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง รีคอมบิแนนท์โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นเพื่อทำการศึกษาต่อ ยอดจากงานวิจัยนี้ ควรจะ

1. เปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะ (vector) เป็นดีเอ็นเอพาหะที่มี Fusion Protein เพื่อให้โปรตีนอยู่ในส่วนของ soluble form
2. เปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้เซลล์ชนิดอื่นๆ ที่สามารถเกิดไกลโคซิเลชัน เช่น เซลล์ยีสต์ เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีความสามารถในการเกิดไกลโคซิเลชันสูง หรือการทำ tissue culture (Tobacco) เพราะ MLL1 ที่ศึกษาในการทดลองนี้มีต้นกำเนิดมาจากพืชจึงน่าจะมีการแสดงออกของโปรตีนใน Tobacco ได้
3. เมื่อได้เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม โปรตีนสามารถทำงานได้ ควรศึกษาโครงสร้างโปรตีนด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การทำ Circular dichroism (CD) spectroscopy, ตกผลึกโปรตีน หรือการทำ Nuclear magnetic resonance (NMR) เพื่อให้ได้โครงสร้างที่ถูกต้องแล้วนำไปศึกษาเพื่อเพิ่มความจำเพาะต่อกรดเซียลิก และพัฒนาโปรตีนเพื่อนำไปใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

4. เมื่อได้โปรตีนที่สามารถทำงานได้ ทำการศึกษาความจำเพาะต่อกรดเชียลิก โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนตามที่ได้ศึกษาทางคอมพิวเตอร์ โดยการทำให้ site-directed mutagenesis เพื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนในห้องปฏิบัติการให้ได้โปรตีนที่มีความจำเพาะต่อกรดเชียลิก

5. การศึกษาด้วยคอมพิวเตอร์ควรลองเปลี่ยนกรดอะมิโนอีกครั้ง (Double mutation) เพื่อให้ได้ค่าพลังงานในการจับกับน้ำตาลแตกต่างกันมากขึ้น จากนั้นทำ site-directed mutagenesis ในห้องปฏิบัติการ ตามการศึกษาด้วยคอมพิวเตอร์

6. ควรทำการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนเลคตินจากธรรมชาติ ด้วยการตกผลึกโปรตีน หรือการทำ NMR เพื่อให้ได้โครงสร้างที่ถูกต้อง และนำไปศึกษาต่อด้านอื่นๆ ได้ง่าย

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

สถาบันวิจัยหม่อนไหม. 2536. **ไหมไทย**. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.  
กรุงเทพฯ.

Absar, N., T. Yeasmin, M. Salim Raza, S. Kumar Sarkar and F. Arisaka, 2005. Single step purification, characterization and N-terminal sequences of a mannose specific lectin from mulberry seeds. **Protein J.** 24: 369-377.

Al-Samarrai, T.H., C.A. Kirk, W.T. Jones, D. Harvey and X. Sun. 2007. Expression in *Escherichia coli* and in vitro refolding of the plant transcription factor *Arabidopsis thaliana* RGL3. **Protein. Expr. Purif.** 53: 289-92.

Allen, A.K. 1979. A lectin from the exudate of the fruit of the vegetable marrow (*Cucurbita pepo*) that has a specificity for  $\beta$ 1,4-Linked N-acetylglucosamine oligosaccharides. **Biochem. J.** 183: 133-137.

\_\_\_\_\_. and A. Neuberger. 1972. The purification and some properties of wheat-germ agglutinin. **Biochem. J.** 130: 35P.

\_\_\_\_\_, N.N. Dcsai, A. Neuberger and J.M. Creeth. 1978. Properties of potato lectin and the nature of its glycoprotein linkages. **Biochem. J.** 171: 665-674.

Anderson, D., R. Harris, D. Polayes, V. Ciccarone, R. Donahue, G. Gerard and J. Jessee. 1996. Rapid Generation of Recombinant Baculoviruses and Expression of Foreign Genes Using the Bac-To-Bac<sup>®</sup> Baculovirus Expression System. **Focus.** 17: 53-58.

Arakawa, T. and K. Tsumoto. 2003. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 304: 148-152.

- Babino, A., D. Tello, A. Rojas, S. Bay, E. Osinaga and P.M. Alzari. 2003. The crystal structure of a plant lectin in complex with the T-antigen. **FEBS Lett.** 536: 106-110.
- Banerjee, R., K. Das, R. Ravishankar, K. Suguna, A. Surolia and M. Vijayan. 1996. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **J. Mol. Biol.** 259: 281-296.
- Banerjee, S., J. Chaki, J. Bhowal and B.P. Chatterjee. 2004. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Arch. Biochem. Biophys.** 421: 125-134.
- Barbieri, L., G.B. Batelli and F. Stirpe. 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants. **Biochem. Biophys. Acta.** 1154: 237-282.
- Barondes. S. H.. 1981. Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. **Ann.Rev. Biochem.** 50: 207-231.
- Barre, A., E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans and P. Rouge. 1996. Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins. **Plant Physiol.** 112: 1531-1540.
- Bloch, R., and M.M. Burger. 1974. Purification of wheat germ agglutinin using affinity chromatography on chitin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 58: 13-19.
- Bouckaert, J., T. Hamelryck, L. Wyns and R. Loris. 1999. The crystal structures of Man(alpha1-3)Man (alpha1-O)Me and Man(alpha1-6)Man(alpha1-O)Me in complex with concanavalin A. **J.Biol.Chem.** 274: 29188-29195.
- Bourne, Y., C. Houles Astoul, V. Zamboni, W.J. Peumans, L. Menu-Bouaouiche and E.J.M. Van Damme. 2002. Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. **Biochem. J.** 364: 173-180.

Bourne, Y., V. Roig-Zamboni, A. Barre, W.J. Peumans, C. Houles Astoul, E.J.M. Van Damme, P. Rouge. 2004. The crystal structure of the *Calystegia sepium* agglutinin reveals a novel quaternary arrangement of lectin subunits with a beta -prism fold. **J. Biol. Chem.** 279: 527-533.

\_\_\_\_\_, V. Zamboni, A. Barre, W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme and P. Rouge. 1999. *Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. **Structure.** 7: 1473-1482.

Caceres, R.A., L.F.S. Timmers, R. Dias, L.A. Basso, D.S. Santos and W.F. Azevedo, Jr. 2008. Molecular modeling and dynamics simulations of PNP from *Streptococcus agalactiae*. **Bioorg. Med. Chem.** 16: 4984–4993.

Cammue, B.P.A., B. Peeters and W.J. Peumans. 1986. A new lectin from tulip (*Tulipa*) bulbs. **Planta.** 169: 583-588.

Casset, F., T. Hamelryck, R. Loris, J.R. Brisson, C. Tellier, M.H. Dao-Thi, L. Wyns, F. Poortmans, S. Perez and A. Imberty. 1995. NMR, molecular modeling, and crystallographic studies of lentil lectin-sucrose interaction. **J. Biol. Chem.** 270: 25619-25628.

\_\_\_\_\_, T. Hamelryck, R. Loris, J. Brisson, C. Tellier, M. Dao-Thi, L. Wyns, F. Poortmans, S. Pe´rez and A. Imberty. 1995. NMR, Molecular modeling and crystallographic studies of lentil lectin-sucrose interaction. **J. Biol. Chem.** 270: 25619–25628.

Chen, J., B. Liu, N. Ji, J. Zhou, H.J. Bian, C.Y. Li, F. Chen and J.K. Bao. 2009. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. **Phytomedicine.** 4: 352-360.

Chiu, C.P.C., A.G Watts, L.L. Lairson, M. Gilbert, D. Lim, W.W. Wakarchuk, S.G. Withers and N.C.J. Strynadka. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 11: 163 –170.

Chrispeels, M.J. and N.V. Raikhel. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense.

**Plant Cell** 3: 1-9.

Chumkhunthod P. 2004. Lectins from tropical mushrooms. Ph.D. Thesis, Suranaree University of Technology.

Cioci, G., E.P. Mitchell, V. Chazalet, H. Debray, S. Oscarson, M. Lahmann, C. Gautier, C. Breton, S. Perez and A. Imberty. 2006.  $\beta$ -Propeller crystal structure of *Psathyrella velutina* lectin: An integrin-like fungal protein interacting with monosaccharides and calcium. **Mol. Biol.** 357: 1575-1591.

Ciopraga, J., O. Gozia, R. Tudor, L. Brezuica and R.J. Doyle. 1999. *FUSARIUM* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochim. Biophys. Acta.** 1428: 424-432.

Clarke, D.H. and J. Casals. 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 5: 561-573.

Collinge, D.B., K.M. Kragh, J.D. Mikkelsen, K.K. Nielsen, U. Rasmussen and K. Vad. 1993. Plant chitinases. **Plant J.** 3: 31-40.

Cordente, A.G., E. Lopez-Vinas, M.I. Vazquez, P. Gomez-Puertas, G. Asins, D. Serra and F.G. Hegardt. 2006. Mutagenesis of specific amino acids converts carnitine acetyltransferase into carnitine palmitoyltransferase. **Biochemistry.** 45: 6133-6141.

Crenshaw, R.W., S.N. Harper, M. Moyer and L.S. Privalle. 1995. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a lectin gene from *Agaricus bisporus*. **Plant Physiol.** 107: 1465-1466.

- Delatorre, P., B.A. Rocha, C.A. Gadelha, T. Santi-Gadelha, J.B. Cajazeiras, E.P. Souza, K.S. Nascimento, V.N. Freire, A.H. Sampaio, W.F. Azevedo Jr. and B.S. Cavada. 2006. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **J. Struct. Biol.** 154: 280-286.
- Dethlefsen, L. and T.M. Schmidt. 2005. Differences in codon bias cannot explain differences in translational power among microbes. **BMC Bioinformatics.** 6: 1471-2105.
- Dodd, R.B. and K. Drickamer. 2001. Lectin-like proteins in model organisms: Implication for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology.** 11(5): 71R-79R.
- Dormitzer, P.R., Z.J. Sun, G. Wagner and S.C. Harrison. 2002. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. **EMBO J.** 21: 885-897.
- Drickamer, K. and M.E. Taylor. 1998. Evolving views of protein glycosylation. **Trends. Biochem. Sci.** 23: 321-324.
- Edmundson, A.B., K.R. Ely, D.A. Sly, F.A. Westholm, D.A. Powers and I.E. Liener. 1971. Isolation and characterization of concanavalin A polypeptide chains. **Biochem.** 10: 3554-3559.
- Endo, Y., K. Mitsui, M. Motizuki and K. Tsurrugi. 1987. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. **J. Biol. Chem.** 262: 5908-5912.
- Etzler M. E. 1986. Distribution and function of plant lectins. pp. 371-425. *In* I. E. Liener, I. J. Goldstein and N. Sharon, eds. **The Lectin: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine.** Academic Press, New York.

- Falasca, A.I., A. Abbondanza, L. Barbieri, A. Bolognesi, C.A. Rossi and F. Stirpe. 1989. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Trichosanthes kirilowii Maximowicz*. **FEBS Lett.** 246: 159-62.
- Freire M.G.M., V.M. Gomes, R.E. Corsini, O.L.T. Machado, S.G. De Simone, J.C. Novello, S. Marangoni and M.L.R. Macedo. 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiol. Biochem.** 40: 61-68.
- Gallagher, J.T., A. Morris and T.M. Dexter. 1985. Identification of two binding sites for wheat-germ agglutinin on polylectosamine type oligosaccharides. **Biochem. J.** 231: 115-122.
- Getsang T. 2007. Expression of a recombinant mulberry leaf lectin in bacterial host and computational structure analysis. MS.D. Thesis, Kasetsart University.
- Gilboa-Garber, N. 1972. Purification and properties of haemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* and its reaction with human blood cells. **Biochim. Biophys. Acta.** 273: 165–173.
- Goldstein, I.J. and R.D. Poretz. 1986. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. pp 33-327. *In* I. E. Liener, I. J. Goldstein and N. Sharon, eds. **The Lectins - Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**. Academic Press, Orlando.
- Gonzales, T. and J. Robert-Baudouy. 1996. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. **FEMS Microbiol. Rev.** 18: 319-44.
- Gomez, S.M., K.Y. Bil, R. Aguilera, J.N. Nishio, K.F. Faull and J.P. Whitelegge. 2003. Transit peptide cleavage sites of integral thylakoid membrane proteins. **Mol. Cell. Proteomics.** 2: 1068-1085.

- Gozia, O., J. Ciopraga, T. Bentia, M. Lungu, I. Zamfirescu, R. Tudor, A. Roseanu and F. Nitu. 1993. Antifungal properties of lectin and new chitinase from potato tubers. **FEBS Lett.** 370: 245-249.
- Guillot, J. and G. Kanska. 1997. Lectins in higher fungi. **Biochem. Systemat. Ecol.** 25: 203-230.
- Hamelryck, T.W., R. Loris, J. Bouckaert, M.H. Dao-Thi, G. Strecker, A. Imberty, E. Fernandez, L. Wyns and M.E. Etzler. 1999. Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos Biflorus*. **J.Mol.Biol.** 286: 1161-1177.
- Hamelryck, T.W., R. Loris, J. Bouckaert, M.H. Dao-Thi, G. Strecker, A. Imberty, E. Fernandez, L. Wyns and M.E. Etzler. 1999. Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. **J.Mol.Biol.** 286: 1161-1177.
- Harata, K., H. Nagahora and Y. Jigami. 1995. X-ray structure of wheat germ agglutinin isolectin 3. **Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** 51: 1013-1019.
- Hayashida, M., T. Fujii, M. Hamasu, M. Ishiguro and Y. Hata. 2003. Similarity between protein-protein and protein-carbohydrate interactions, revealed by two crystal structures of lectins from the roots of pokeweed. **J. Mol. Biol.** 334: 551-565.
- Henderson, J., A.E. Atkinson, C.M. Lazarus, C.R. Hawes, R.M. Napier, H. Macdonald and L.A. King. 1995. Stable expression of maize auxin-binding protein in insect cell lines. **FEBS Lett.** 371: 293-296.
- Hester, G., H. Kaku, I.J. Goldstein and C.S. Wright. 1995. Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. **Nat. Struct. Biol.** 2: 472 – 479.

- Ho, J.C.K., S.C.W. Sze, W.Z. Shen and W.K. Liu. 2004. Mitogenic activity of edible mushroom lectins. **Biochem. Biophys. Acta.** 1570: 153-159.
- Houles Astoul, C., W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme, A. Barre, Y. Bourne and P. Rouge. 2002. The size, shape and specificity of the sugar-binding site of the jacalin-related lectins is profoundly affected by the proteolytic cleavage of the subunits. **Biochem.J.** 367: 817–824.
- Imai, Y. 1998. **C-Type Lectins** [Online]. Available :  
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA04E.html>.
- Imberty, A., C. Gautier, J. Lescar, S. Pe´rez, L. Wynsi and R. Lorisi. 2000. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. **J. Biol. Chem.** 275: 17541–17548.
- \_\_\_\_\_, C. Gautier, J. Lescar, S. Perez, L. Wyns and R. Loris. 2000. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. **J. Biol. Chem.** 275: 17541-17548.
- Ingrasso, D., A.V. Fowler, J. Bleibaum and S. Clarke. 1989. Specificity of endoproteinase Asp-N (*Pseudomonas fragi*): cleavage at glutamyl residues in two proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 162: 1528-1534.
- Jarvis, D.L. and E.E. Finn . 1996. Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. **Nat. Biotechnol.** 14:1288-92.
- Jeyaprakash, A.A., A. Srivastav, A. Surolia and M. Vijayan. 2004. Structural basis for the carbohydrate specificities of artocarpin: variation in the length of a loop as a strategy for generating ligand specificity. **J. Mol. Biol.** 338: 757-770.

- Jung, W.K., P.J. Park and S.K. Kim. 2003. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 35: 255-265.
- Kalsi, G., H.R. Das, C.R. Babu and R.H. Das. 1992. Isolation and characterization of a lectin from peanut roots. **Biochim. Biophys. Acta.** 1117: 114-119.
- Kankamol C. 2003. Molecular cloning and expression of mulberry leaf lectin (MLL) genes. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- Kanti Dam, T., K. Bachhawat, P. Geetha Rani, and A. Surolia. 1998. Garlic (*Allium sativum*) lectins bind to high mannose oligosaccharide chains. **J. Biol. Chem.** 273: 5528–5535.
- Karplus, M. and J.A. McCammon. 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nat. Struct. Biol.** 9: 646-652.
- Kassab, B.H., D.D. de Carvalho, M.A. Oliveira, G.R. Baptista, G.A.G. Pereira and J. C. Novelloa. 2004. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. **Protein Expr. Purif.** 35: 344–352.
- Kawaguchi, T., I. Matsumoto and T. Osawa. 1974. Studies on hemagglutinins from maackia amurensis seeds. **J. Biol. Chem.** 249: 2786-2792.
- Kelm, S. and R. Schauer. 1997. Sialic acids in molecular and cellular interactions. **Int. Rev. Cytol.** 175: 137-240.
- Kelm, S. and R. Schauer. 1997. Sialic acids in molecular and cellular interactions. **Int. Rev. Cytol.** 175: 137-240.
- Kenyon, G. (2001, December 29). Mushroom: The new medicine. **BBC News.**

- Knibbs, R.N., I.J. Goldstein, R.M. Ratcliffe and N. Shibuya. 1991. Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other sialic acid-specific lectins. **J. Biol. Chem.** 266: 83-88.
- Kobayashi, Y., K. Kobayashi, K. Umehara, H. Dohra, T. Murata, T. Usui and H. Kawagishi. 2004. Purification, characterization, and sugar binding specificity of an *N*-Glycolylneuraminic acid-specific lectin from the mushroom *Chlorophyllummolybdites*. **J. Biol. Chem.** 279: 53048–53055.
- Kochibe, N. and K. Furukawa. 1980. Purification and properties of a novel fucose-specific hemagglutinin of *Aleuria aurantia*. **Biochemistry.** 19: 2841-2846.
- Komath, S.S. and M.J. Swamy. 1998. Further characterization of snake gourd (*Trichosanthes anguina*) seed lectin. **Curr. Sci.** 75: 608-611.
- Konozy, E.H.E., R. Mulay, V. Faca, R.J. Ward, L.J. Greene, M.C. Roque-Barriera, S. Sabharwal and S.V. Bhide. 2002. Purification some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. **Biochimie.** 84: 1035-1043.
- Kulkarni, K.A., S. Katiyar, A. Surolia, M. Vijayan and K. Suguna. 2006. Structural basis for the carbohydrate-specificity of basic winged-bean lectin and its differential affinity for Gal and GalNAc. **Acta Cryst.** D62: 1319-1324.
- Laskowski R.A., J.A.C. Rullmann, M.W. MacArthur, R. Kaptein and J.M. Thornton. 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **J. Biomol. NMR.** 8: 477-496.

- Lee, X., A. Thompson, Z. Zhang, H. Ton-that, J. Biesterfeldt, C. Ogatai, L. Xu, R.A.Z. Johnston and N.M. Young. 1998. Structure of the complex of *Maclura pomifera* agglutinin and the T-antigen disaccharide, Galb1, 3GalNAc. **J. Biol. Chem.** 273: 6312-6318.
- Lehmann, F., E. Tiralongob and J. Tiralongo. 2006. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. **Cell Mol. Life Sci.** 63: 1331–1354.
- Lewis, A.L., V. Nizet and A. Varki. 2004. Discovery and characterization of sialic acid *O*-acetylation in group B Streptococcus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 101: 11123-11128.
- Li, M., J.J. Chai, Y.P. Wang, K.Y. Wang and R.C. Bi. 2003. Crystal structure of *Trichosanthes kirilowii* lectin-1 and its relation to the type 2 ribosome inactivating proteins. **Protein Pept. Lett.** 8: 81-87.
- Lilie, H., E. Schwarz and R. Rudolph. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E.coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.** 9: 497-501.
- Lis, H. and N. Sharon. 1998. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.** 98: 637-674.
- Liu R., G. Wei, Q. Yang, W. He and W. Liu. 2002. Cinnamomin, a type II ribosome-inactivating protein, is a storage protein in the seed of the camphor tree (*Cinnamomum camphora*). **Biochem. J.** 362: 659-663.
- Lord, J.M., L.M. Roberts and J.D. Robertus. 1994. Ricin: Structure, mode of action, and some current applications. **FASEB. J.** 8: 201-208.
- Loris, R., H. De Greve, M.H. Dao-Thi, J. Messens, A. Imberty and L. Wyns. 2000. Structural basis of carbohydrate recognition by Lectin II from *Ulex europaeus*, a protein with a promiscuous carbohydrate binding site. **J. Mol. Biol.** 301: 987-1002.

- Loris, R., I. Van Walle, H. De Greve, S. Beeckmans, F. Deboeck, L. Wyns and J. Bouckaert. 2004. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **J. Mol. Biol.** 335: 1227-1240.
- \_\_\_\_\_, T. Hamelryck, J. Bouckaert and L. Wyns. 1998. Legume lectin structure. **Biochem. Biophys. Acta.** 1383: 9-36.
- Lutsik, M.D. and V.A. Antoniuk. 1982. New fucose-specific lectin from the bark of dwarf almond golden rain *Laburnum anagyroides* Medik: purification, properties and immunochemical specificity. **Biokhimiia.** 47: 1710-1715.
- Magalhaes, C.S., H.J.C. Barbosa and L.E. Dardenne. 2004. A genetic algorithm for the ligand-protein docking problem. **Genet. Mol. Biol.** 27: 605-610.
- Maheswari, R., P. Mullainadhan and M. Arumugam. 1997. Characterization of a natural haemagglutinin with affinity for acetylated aminosugars in the serum of the marine prawn, *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards). **Fish. Shellfish Immunol.** 7: 17-28.
- Maji, M.D. and S.M.H. Qadri. 1999. Bacterial disease of mulberry (*Morus* spp.). **Sericologia.** 39: 1 - 7.
- Maveyraud, L., H. Niwa, V. Guillet, D.I. Svergun, P.V. Konarev, R.A. Palmer, W.J. Peumans, P. Rouge, E.J.M. Van Damme, C.D. Reynolds and L. Mourey. 2009. Structural basis for sugar recognition, including the Tn carcinoma antigen, by the lectin SNA-II from *Sambucus nigra*. **Proteins.** 75: 89-103.
- Meagher, J.L., C.W. Harry, E. Porscha, J.G. Irwi and A.S. Jeanne. 2005. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiology.** 15: 1033-1042.

- Miarons, P.B. and M. Fresno. 2000. Lectins from tropical sponges: Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. **J. Biol. Chem.** 275(38): 29283-29289.
- Mo, H., H.C. Winter and I.J. Goldstein. 2000. Purification and characterization of a Neu5Aca2–6Galb1–4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **J. Biol. Chem.** 275: 10623–10629.
- Moller, H.J. and J.H. Poulsen. 2007. Staining of glycoproteins/proteoglycans in SDS-Gels. pp. 773-777. In: J.M. Walker., eds. **The Protein Protocols Handbook, Second Edition**. Humana Press, Denmark.
- Montecucco, C. and G. Schiavo. 1995. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. **Q. Rev. Biophys.** 28: 423–472.
- Morris, G.M., D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew and A.J. Olson. 1998. Automated docking using lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **J. Comp. Chem.** 19(14):1639-1662.
- \_\_\_\_\_, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew and A.J. Olson. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free-energy function. **J. Comput. Chem.** 19: 1639-1662.
- Muraki, M., M. Ishimura and K. Harata. 2002. Interactions of wheat-germ agglutinin with GlcNAc beta 1,6Gal sequence. **Biochim. Biophys. Acta.** 1569: 10-20.
- Muthing, J., I. Meisen, P. Bulau, M. Langer, K. Witthohn and H. Lentzen. 2004. Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac alpha 2-6Gal beta 1-4GlcNAc residues. **Biochemistry.** 43: 2996-3007.

- Nagatal, T., R. Fukuda, I. Koike, K. Kogure and D.L. Kirchman. 1998. Degradation by bacteria of membrane and soluble protein in seawater. **Aquat. Microb. Ecol.** 14: 29-37.
- Natchiar, S.K., A.A. Jeyaprakash, T.N.C. Ramya, C.J. Thomas, K. Suguna, A. Suroliya and M. Vijayan. 2004. Structural plasticity of peanut lectin: an X-ray analysis involving variation in pH, ligand binding and crystal structure. **Acta Cryst.** 60: 211-219.
- Ngai, P-H.K. and T.B. Ng. 2004. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferation activity toward tumor cells. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 314: 988-993.
- Olausson, J., L. Tibell, B.H. Jonsson and P. Pahlsson. 2008. Detection of a high affinity binding site in recombinant *Aleuria aurantia* lectin. **Glycoconj. J.** 25: 753-762.
- Olsnes, S., F. Stirpe, S. K. Sandvig and A. Pihl. 1982. Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album L.* (Mistletoe). **J. Biol. Chem.** 257: 13263-13270.
- Padma, P., S.S. Komath, S.K. Nadimpalli, and M.J. Swamy. 1999. Purification in high yield and characterization of a new galactose-specific lectin from the seeds of *Trichosanthes cucumerina*. **Phytochemistry.** 50: 363-371.
- Park, H. and Y.H. Jeon. 2008. Toward the virtual screening of Cdc25A phosphatase inhibitors with the homology modeled protein structure. **J. Mol. Model.** 14: 833-841.
- Park, S.H., B.G. Kim, S.H. Lee, Y. Lim, Y. Cheong, and J.H. Ahn. 2007. Molecular modeling and site directed mutagenesis of the O-methyltransferase, SOMT-9 reveal amino acids important for its reaction and regioselectivity. **Bull. Korean Chem. Soc.** 28: 2248-2252.
- Parkin, S., B. Rupp and H. Hope. 1996. Atomic resolution structure of concanavalin A at 120 K. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** 52: 1161-1168.

- Peumans, W.J. and E.J.M. Van Damme. 1995. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.** 109: 347-352.
- \_\_\_\_\_, B. Hause and E.J.M. Van Damme. 2000. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS Lett.** 477: 186-192.
- \_\_\_\_\_, U.P. Verhaert and E.J.M. Van Damme. 1996. Isolation and partial characterization of a small chitin binding lectin from mistletoe (*Viscum album*) leaves. **FEBS Lett.** 396: 261-265.
- Pueppke, S.G. 1979. Distribution of lectins in the jumbo virginia and spanish varieties of the peanut, *Arachis hypogaea* L. **Plant Physiol.** 64: 575-580.
- \_\_\_\_\_, W.D. Bauer, K. Keegstra and A.L. Ferguson. 1978. Role of lectins in plant-microorganism interactions. II Distribution of soybean lectin in tissues of *Glycine max* (L.) Merr. **Plant Physiol.** 61: 779-784.
- Pusztai, A. 1991. **Plant Lectins**. Cambridge: The Rowett Research Institute, Aberdeen Cambridge University Press.
- Qureshi, I.A., P. Dash, P.S. Srivastava and K.R. Koundal. 2005. Purification and characterization of an N-acetyl-d-galactosamine-specific lectin from seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Phytochem. Anal.** 17: 350-356.
- Rabijns, A., A. Barre, E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, C.J. De Ranter and P. Rouge. 2005. Structural analysis of the jacalin-related lectin MornigaM from the black mulberry (*Morus nigra*) in complex with mannose. **FEBS J.** 272: 3725-3732.
- Raikhel, NV., H.I. Lee and W.F. Broekaert. 1993. Structure and function of chitin binding proteins. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 44: 591-615.

- Raman, R., S. Raguram, G. Venkataraman, J.C. Paulson and R. Sasisekharan. 2005. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. **Nat. Methods**. 2: 817-24.
- Rao, K.N., C.G. Suresh, U.V. Katre, S.M. Gaikwad and M.I. Khan. 2004. Two orthorhombic crystal structures of a galactose-specific lectin from *Artocarpus hirsuta* in complex with methyl-alpha-D-galactose. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** 60: 1404-1412.
- Ratanapo, S., W. Ngamjunyaporn and M. Chulavatnatol. 1998. Sialic acid binding Phytopathogenic bacterium, *P.syringae pvmori*. **Plant Sci.** 160: 739-744.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and \_\_\_\_\_. 2001. Interaction of a mulberry leaf lectin with a lectin from leaf of mulberry (*Morus alba*). **Plant Sci.** 139: 141-148.
- \_\_\_\_\_, Y. Thawalvichit and A. Promboon. 2005. Inhibitory effects of mulberry leaf lectins to silkworm proteases. **KU J. (Nat. Sci.)** 39, 125-135.
- Ray, S. and B.P. Chatterjee. 1995. Saracin: a lectin from *Saraca indica* seed integument recognizes complex carbohydrates. **Phytochemistry**. 40: 643-649.
- Rayon, C., P. Lerouge and L. Faye. 1998. The protein N-glycosylation in plants. **J. Exp. Bot.** 49: 1463-1472.
- Reeke, Jr., G.N. and J.W. Becker. 1986. Three-dimensional structure of favin: saccharide binding-cyclic permutation in leguminous lectins. **Science**. 234: 1108-1111.
- Rendic, D., I.B.H. Wilson and K. Paschinger. 2008. The glycosylation capacity of insect cells. **Croat. Chem. Acta.** 81: 7-21.
- Richards, R.L., J. Moss, C.R Alving, P.H. Fishman and R.O. Brady. 1979. Cholera toxin: A bacterial lectin. **Proc. Natt. Acad. Sci. USA.** 76: 1673-1676.

- Rinderle, S.J., I.J. Goldstein, K.L. Matta and R.M. Ratcliffe. 1989. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T (or cryptic T)-antigen. **J. Biol. Chem.** 264: 16123-16131.
- Roberta, L. R., J. Moss, C.R. Alving, P.H. Fishman and R.O. Brady. 1979. Cholera toxin: A bacterial lectin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76: 1673-1676.
- Rouge, P., C. Cambillu and Y. Bourne. 1991. The three-dimensional structure of legume lectins. pp. 1: 143-159. In: Kilpatrick, D.C., E. Van Driessche and T.C. Bog-Hansen. eds. **Lectin Reviews.** Sigma Chemical co., St.Louis, U.S.A.
- \_\_\_\_\_, W.J. Peuman, A. Barre and E.J.M. Van Damme. 2003. A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 304: 91-97.
- Roychoudhury, A. and S. Basu. 2008. Overexpression of an abiotic-stress inducible plant protein in the bacteria *Escherichia coli*. **Afr. J. Biotechnol.** 7: 3231-3234.
- Rutenber, E., B.J. Katzin, S. Ernst, E.J. Collins, D. Mlsna, M.P. Ready and J.D. Robertus. 1991. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. **Proteins.** 10: 240-250.
- Sahasrabudde, A.A., M.G. Sushama, M.V. Krishnasastri and M. Islam Khan. 2004. Studies on recombinant single chain Jacalin lectin reveal reduced affinity for saccharides despite normal folding like native Jacalin. **Protein Sci.** 13: 3264-3273.
- Sali, A., and T. L. Blundell. 1995. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.** 234: 779-815.
- Sambrook, J. and Russell, D. 2001. **Molecular Cloning a Laboratory Manual.** 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

- Sankaranarayanan, R., K. Sekar, R. Banerjee, V. Sharma, A. Surolia, M. Vijayan. 1996. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moraceae* plant lectin with a beta-prism fold. **Nat. Struct. Biol.** 3: 596-603.
- Saul, F.A., P. Rovira, G. Boulot, E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, P. Truffa-Bachi and G.A. Bentley. 2000. Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen presented by MHC molecules of class I and class II. **Structure (London)**. 8: 593-603.
- Sauter, N.K., J.E. Hanson, G.D. Glick, J.H. Brown, R.L. Crowther, S.J. Park, J.J. Skehel and D.C. Wiley. 1992. Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. **Biochemistry**. 31: 9609-9621.
- Schnell D.J. and M.E. Etzler. 1987. Primary structure of the *Dolichos biflorus* seed lectin. **J. Biol. Chem.** 262: 7220-7225.
- Sharma, V., and A. Surolia. 1997. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **J. Mol. Biol.** 267: 433-445.
- Sharon, N. and H. Lis. 1972. Lectins: cell-agglutinating and sugarspecific proteins. **Science**. 177: 949-959.
- Sharon, N. and H. Lis. 1989. Lectins as cell recognition molecules. **Science**. 246: 227-234.
- \_\_\_\_\_. and \_\_\_\_\_. 1990. Legume lectins-a large family of homologous proteins. **FASEB J.** 4: 3198-3208.
- She, Q.B., T.B. Ng and W.K. Liu. 1998. A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 247: 106-111.

- Shibuya, N., I.J. Goldstein, W.F. Broekaert, M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters and W.J. Peumans. 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. **J. Biol. Chem.** 262: 1596-1601.
- \_\_\_\_\_, K. Tazaki, Z.W. Song, G.E. Tarr, J.J. Goldstein and W.J. Peumans. 1989. A comparative study of bark lectins from three elderberry (*Sambucus*) species. **J. Biochem.** 106: 1098-1103.
- Singh, D.D., K. Saikrishnan, P. Kumar, A. Surolia, K. Sekar and M. Vijayan. 2005. Unusual sugar specificity of banana lectin from *MU.S.A. paradisiaca* and its probable evolutionary origin. Crystallographic and modelling studies. **Glycobiology.** 15: 1025-1032.
- Singh, T., J.H. Wu, W.J. Peumans, P. Roug, El.J.M. Van Damme and A.M. Wu. 2007. Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (*Morniga G*) expressed by monomeric ligands, simple clusters and mammalian polyvalent glycotopes. **Mol. Immunol.** 44: 451-462.
- Stehle, T., Y. Yan, T.L. Benjamin and S.C. Harrison. 1994. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. **Nature.** 369: 160-163.
- Stirpe, F., A. Gasperi-Campani, L. Barbieri, E. Lorenzoni, L. Montanaro, S. Sperti, E. Bonetti. 1978. Inhibition of protein synthesis by modeccin, the toxin of *Modecca digitata*. **FEBS Lett.** 85: 65-67.
- Subnis, D.D. and J.W. Hart. 1978. The isolation and some properties of a lectin (haemagglutinin) from *Cucurbita* phloem exudates. **Planta.** 142: 97-101.
- Tahirov, T.H., T.H. Lu, Y.C. Liaw, Y.L. Chen and J.Y. Lin. 1995. Crystal structure of abrin-a at 2.14 angstroms. **J. Mol. Biol.** 250: 354-367.

- Tanner, W. and L. Lehle. 1987. Protein glycosylation in yeast. **Biochim. Biophys. Acta.** 906: 81-99.
- Taylor, M.E., and K. Drickamer. 2003. Introduction to Glycobiology. Oxford University Press, United Kingdom.
- Tuteja, R. 2005. Type I signal peptidase: An overview. **Arch. Biochem. Biophys.** 441: 107-111.
- Transue, T.R., A.K. Smith, H. Mo, I.J. Goldstein and M.A. Saper. 1997. Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. **Nat. Struct. Biol.** 10: 779-783.
- \_\_\_\_\_, K.S. Alexander, M. Hanqing, J.G. Irwin and A.S. Mark. 1997. Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. **Nat. Struct. Biol.** 4: 779-783.
- Van Damme, E.J.M., K. Coossens, K. Smeets, F.V. Leuven, P. Verhaert and W.J. Peumans. 1995. The major tuber storage protein of araceae species is a lectin (characterization and molecular cloning of the lectin from *Arum maculatum* L.). **Plant Physiol.** 107: 1147-1158.
- Van Damme, E.J.M. and W.J. Peumans. 1991. Biosynthesis, primary structure and molecular cloning of snowdrop lectin. **Eur. J. Biochem.** 202: 23-30.
- \_\_\_\_\_, A. Barre, P. Verhaert, P. Rouge and W.J. Peumans. 1996. Molecular cloning of the mitogenic mannose/maltose-specific rhizome lectin from *Calystegia sepium*. **FEBS Lett.** 397: 352-356.
- \_\_\_\_\_, A.K. Allen and W.J. Peumans. 1987. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS Lett.** 215: 140-144.

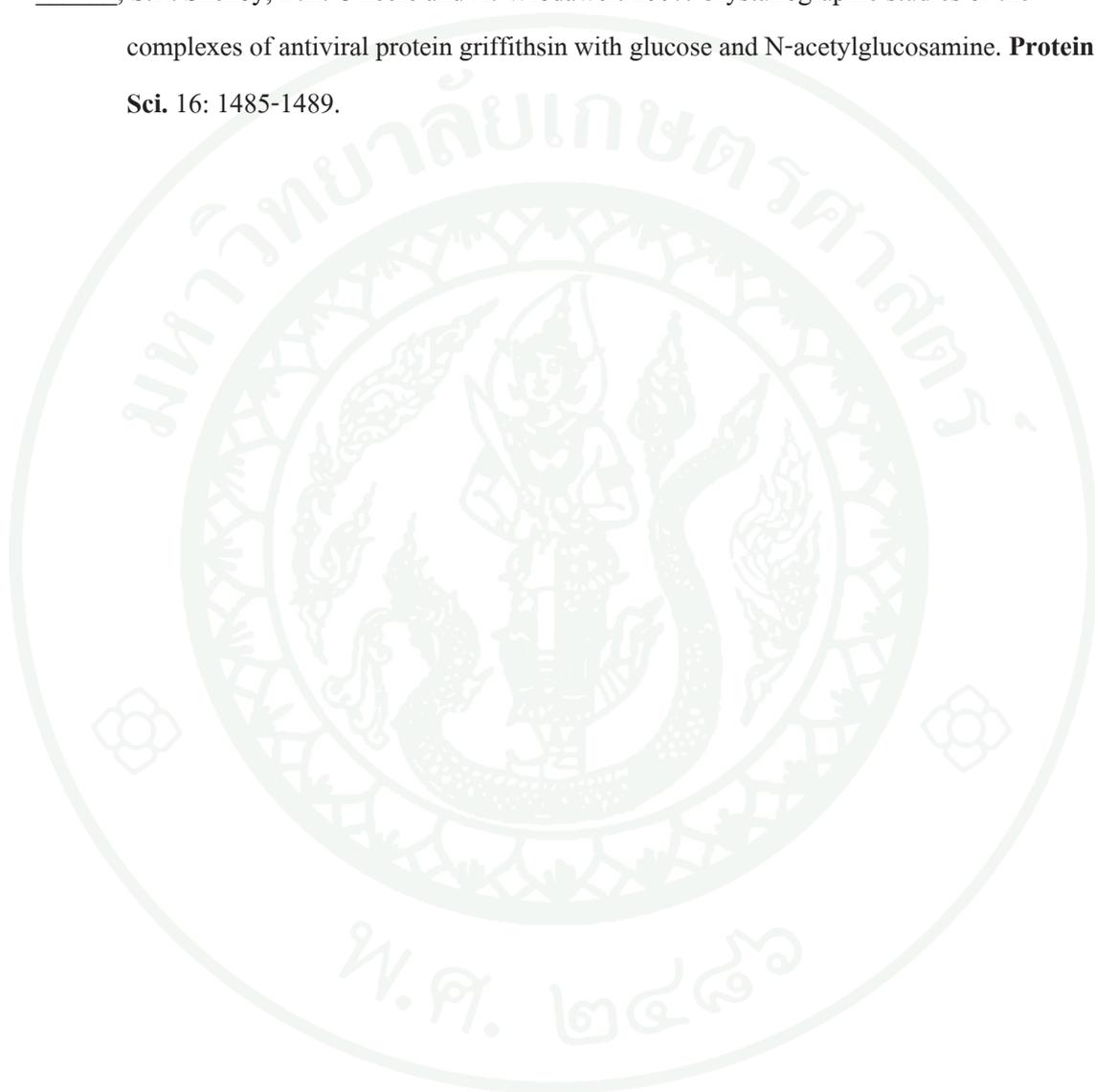
- Van Damme, E.J.M., A.K. Allen and W.J. Peumans. 1988. Related mannose-specific lectins from different species of the family of Amaryllidaceae. **Plant Physiol.** 73: 52-57.
- \_\_\_\_\_, B. Hause, J. Hu, A. Barre, P. Rouge, P. Proost and W.J. Peumans. 2002. Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. **Plant Physiol.** 130: 757-769.
- \_\_\_\_\_, K. Smith, and W.J. Peumans. 1995. The mannose-binding monocot lectins and their genes. pp.59-80. *In* **Lectins Biomedical Perspectives**. Taylor and Francis, Inc., London.
- \_\_\_\_\_, W.J. Peumans, A. Barre and P. Rouge. 1998. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse. **Crit. Rev. Plant Sci.** 17:575-692.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, A. Pusztai and S. Bardocz. 1998. Plant lectins: A special class of plant proteins. pp. 3-25. *In* **Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications**. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Verheyden, R., M. Pletinckxx, D. Pepermans, H. Wyns, I. Willem and J. Martin. 1995. 1H NMR study of the interaction of N', N', N''-triacyl chitotriose with Ac-AMP2, sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. **CR Acad. Sci.** III. 316: 788-792.
- Vincentelli, R., S. Canaan, V. Campanacci, C. Valencia, D. Maurin, F. Frassinetti, L. S. Calvo, Y. Bourne, C. Cambillau and C. Bignon. 2004. High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. **Protein Sci.** 13: 2782-2792.
- Wang, H., J. Gao and T.B. Ng. 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 275: 810-816.

- Wang, M.B., D. Boulter and J. Gatehouse. 1994. Characterization and sequencing of cDNA clone encoding for phloem protein PP2 of *Cucurbita pepo*. **Plant Mol. Biol.** 24: 159-170.
- Wang, H., T.B. Ng and V.E.C. Ooi. 1998b. Lectins from mushrooms. **Mycol. Res.** 102(8): 897-906.
- Weis W. I., 1996. Structure basis of recognition lectin-carbohydrate. **Ann. Rev. Inc.** 65: 441-473.
- Wilson, I. A., J.J. Skehel and D.C. Wiley. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. **Nature.** 289: 366-373.
- Wolfgang, W. and G. Janet. 1987. Fucose-specific lectins disclose perpetuation of root primordia in callus cultures of maize (*Zea mays* L.). **Develop. Biol.** 120: 85-91.
- Wood, S.D. 1995. Crystallographic studies of molecules of biological and chemical interest. Ph.D. Thesis, Liverpool John Moores University, England.
- \_\_\_\_\_, L. M. Wright, C. D. Reynolds, P. J. Rizkallah, A. K. Allen, W. J. Peumans and E. J. M. Van Damme., 1999. Structure of the native (unligated) mannose-specific bulb lectin from *Scilla campanulata* (bluebell) at 1.7 Å resolution. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** 55: 1264-1272.
- Wright, C.S. 1990. 2.2 Angstroms resolution structure analysis of two refined N-acetylneuraminylactose-wheat germ agglutinin isolectin complexes. **J. Mol. Biol.** 215: 635-651.

- Wright, L.M., E.J.M. Van Damme, A. Barre, A.K. Allen, F. Van Leuven, C.D. Reynolds, P. Rouge and W.J. Peumans. 1999. Isolation, characterization, molecular cloning and molecular modelling of two lectins of different specificities from bluebell (*Scilla campanulata*) bulbs. **Biochem. J.** 340: 299-308.
- Yamashita, K., K. Umetsu, T. Suzuki and T. Ohkura. 1992. Purification and characterization of a Neu5Ac alpha 2-->6Gal beta 1-->4GlcNAc and HSO3(-)-->6Gal beta 1-->GlcNAc specific lectin in tuberous roots of *Trichosanthes japonica*. **Biochemistry.** 31: 11647-11650.
- Yang, H. and T.H. Czaplá. 1993. Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. **J. Biol. Chem.** 268: 5905-5910.
- Yen, S.E., J.M. Mansfield and J.H. Wallace. 1980. The prickly lettuce agglutinin. I. Isolation from leaves of the prickly lettuce plant (*Lactuca scariola*). **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** 61: 32-39.
- Young, N. M. and R. P. Oomen. 1992. Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. **J. Mol. Biol.** 228: 924-934.
- Yu, H., S. Huang, H. Chokhawala, M. Sun, H. Zheng, and X. Chen. 2006. Highly efficient chemoenzymatic synthesis of naturally occurring and unnatural  $\alpha$ 2,6-linked sialosides: A *P. damsel*  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase with extremely flexible donor substrate specificity. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 45: 3938–3944.
- Yu, L.G., D.G. Fernig, M.R.H. White, D.G. Spiller, P. Appleton, R.C. Evans, I. Grierson, J.A. Smith, H. Davies, O.V. Gerasimenko, O.H. Petersen, J.D. Milton and J.M. Rhodes. 1999. Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequencedependent nuclear protein import. **J. Biol. Chem.** 274: 4890-4899.

Ziołkowska, N.E. and A. Włodawer. 2006. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. **Acta Biochim. Pol.** 53: 617-626.

\_\_\_\_\_, S.R. Shenoy, B.R. O'keefe and A. Włodawer. 2007. Crystallographic studies of the complexes of antiviral protein griffithsin with glucose and N-acetylglucosamine. **Protein Sci.** 16: 1485-1489.







### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหาร LB broth	1% Tryptone 0.5% Yest extract 0.5% NaCl
อาหาร LB agar	1% Tryptone 0.5% Yest extract 0.5% NaCl 1.5% Agarose

### 2. อาหารเลี้ยงเซลล์แมลง

S.O.C. Medium	2% (w/v)Tryptone, 0.5% (w/v) Yeast extract 8.6 mM NaCl 2.5 mM KCl 20 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose
---------------	--

### 3. สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิด

Alkaline lysis Solution I ( Resuspension buffer)	50 mM Glucose 25 mM Tris-Hcl, pH 8 10 mM EDTA
Alkaline lysis Solution II (Lysis buffer)	0.2 M NaOH 1% (w/v SDS)
Alkaline lysis Solution III / 100 ml	5 M Potassium acetate 0.2 M Glacial acetic acid

#### 4. สารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ

10X TBE stock solution	0.89 M Tris base 0.89 M Boric acid 0.5 M EDTA
TE buffer	10 mM Tris-Cl, pH 7.5 1 mM EDTA
DNA Loading dye	0.25% bromophenol blue 30% glycerol ละลายใน TE

#### 5. สารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาดโปรตีน

30 % Acrylamide (30.8 % T, 2.6% C)
30% Acrylamide acrylamide
5 mM <i>N,N'</i> -Methylenebisacrylamide (BIS)
Separating sol 1.5 M Tris pH 8.8
Stacking sol 0.5 M Tris pH 6.8
10% Amonium persulfate
10% SDS

#### ตารางผนวกที่ ก1 การเตรียม SDS-PAGE

Reagent	15% Separating (ml)	12% Separating (ml)	5% Stacking (ml)
30 % Bis-Acrylamide	3.5	2.8	0.33
Separating solution	1.8	1.8	-
Stacking solution	-	-	0.25
10% Amonium persulfate	0.07	0.07	0.02
10% SDS	0.07	0.07	0.02
TEMED	0.004	0.004	0.002
Water	1.6	2.26	1.4
Total	7.0	7.0	2.0

6x Protein loading dye	0.5 M Tris pH 6.8 60% Glycerol 10% SDS 0.03% Bromophenol blue
5x running buffer	0.125 M Tris base 0.96 M Glycine 0.5%w/v SDS
5x Staining solution	0.5%w/v coomassie blue R250 40% mEthanol 10% Acetic acid
Destains	40 % Methanol , or Ethanol 10 % Acetic acid

#### 6. สารเคมีสำหรับตรวจสอบโปรตีนด้วย Western blot

TBS buffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl
TBS-Tween buffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 500 mM NaCl 0.05%(v/v) Tween20
TBS-Tween/Triton buffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 500 mM NaCl 0.05%(v/v) Tween-20 0.2%(v/v) Triton X-100
Blocking buffer	5% milk ใน TBS-Tween buffer

## 7. สารละลายสำหรับการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

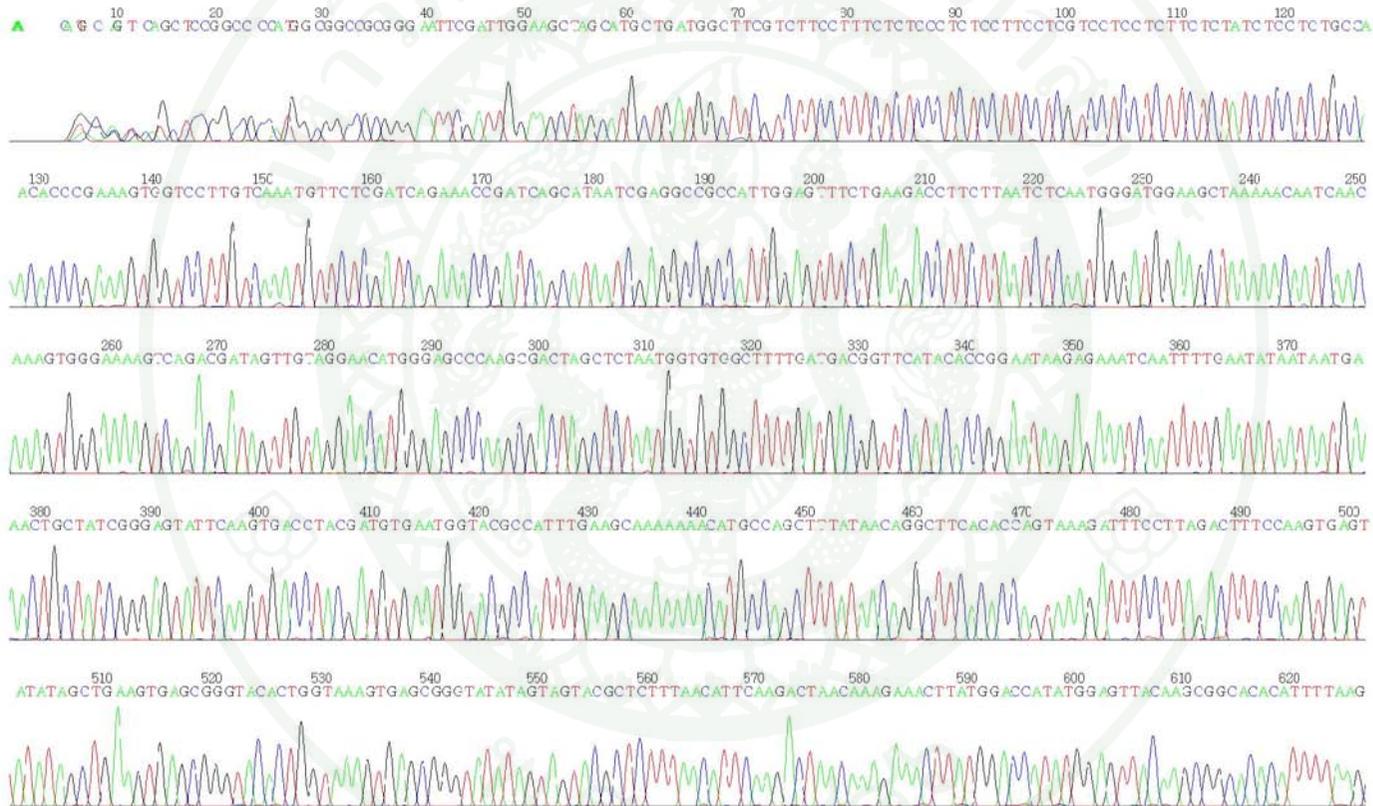
Lysis buffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0 300 mM NaCl 2 mM DTT 1 mM PMSF 1 mM EDTA (8 M Urea)
Equilibrate buffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0 300 mM NaCl 2 mM DTT 50 mM Imidazole (8 M Urea)
Wash buffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0 300 mM NaCl 2 mM DTT (8 M Urea)
Elution buffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0 300 mM NaCl 2 mM DTT 250 mM imidazole (8 M Urea)

## 8. Bradford Reagent

Bradford buffer	95% Ethanol 88% Phosphoric Serva Blue G Water
-----------------	--



File: 071128-19\_P06\_pGEM\_fMLL-T7.ab1 Run Ended: 2007/11/30 0:55:29 Signal G:817 A:963 C:726 T:847  
Sample: pGEM\_fMLL\_T7 Lane: 17 Base spacing: 14.63 859 bases in 10276 scans Page 1 of 2



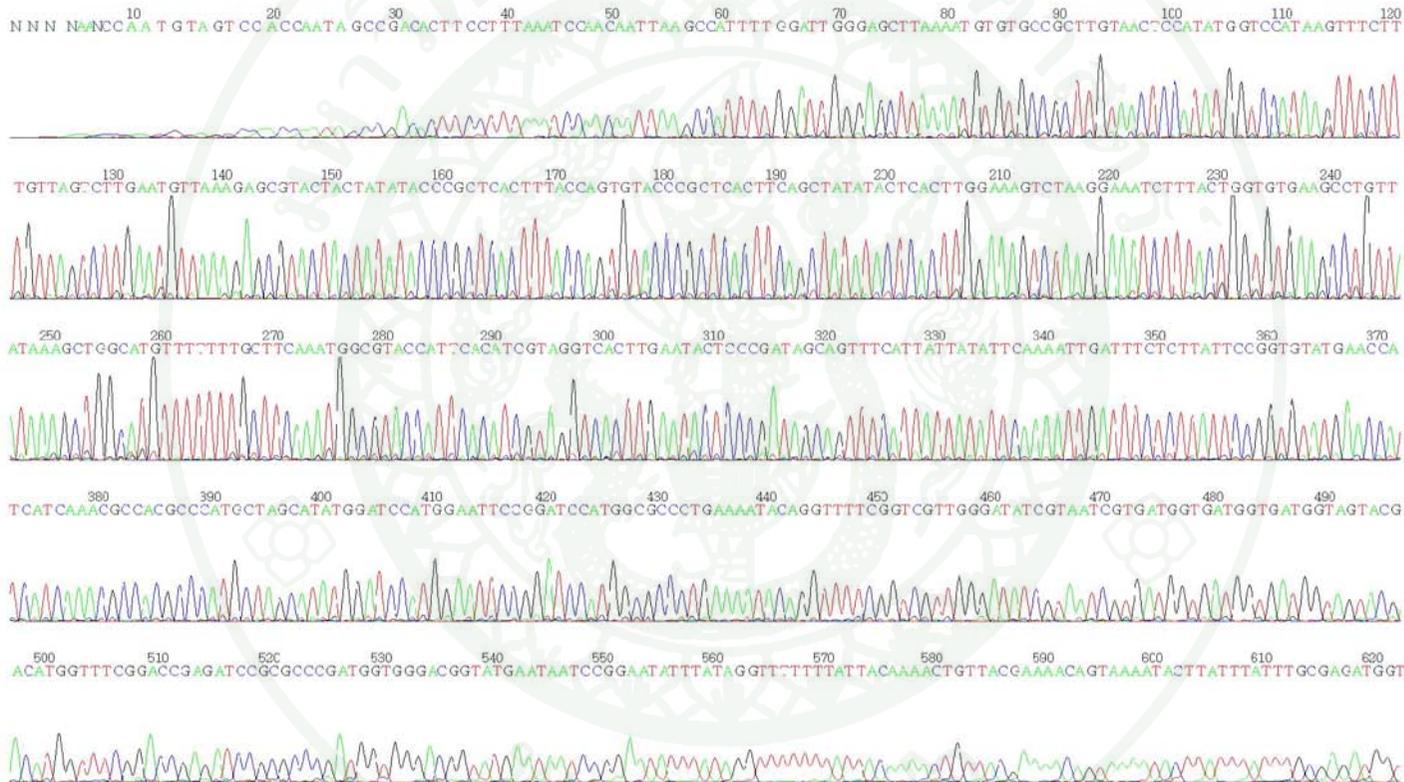
ภาพผนวกที่ ข1 การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pGEM-fMLL ด้าน N-terminal

File: 071128-19\_P06\_pGEM\_fMLL-T7.ab1 Run Ended: 2007/11/30 0:55:29 Signal G:817 A:963 C:726 T:847  
Sample: pGEM\_fMLL\_T7 Lane: 17 Base spacing: 14.63 559 bases in 10276 scans Page 2 of 2



ภาพผนวกที่ ข1 (ต่อ)

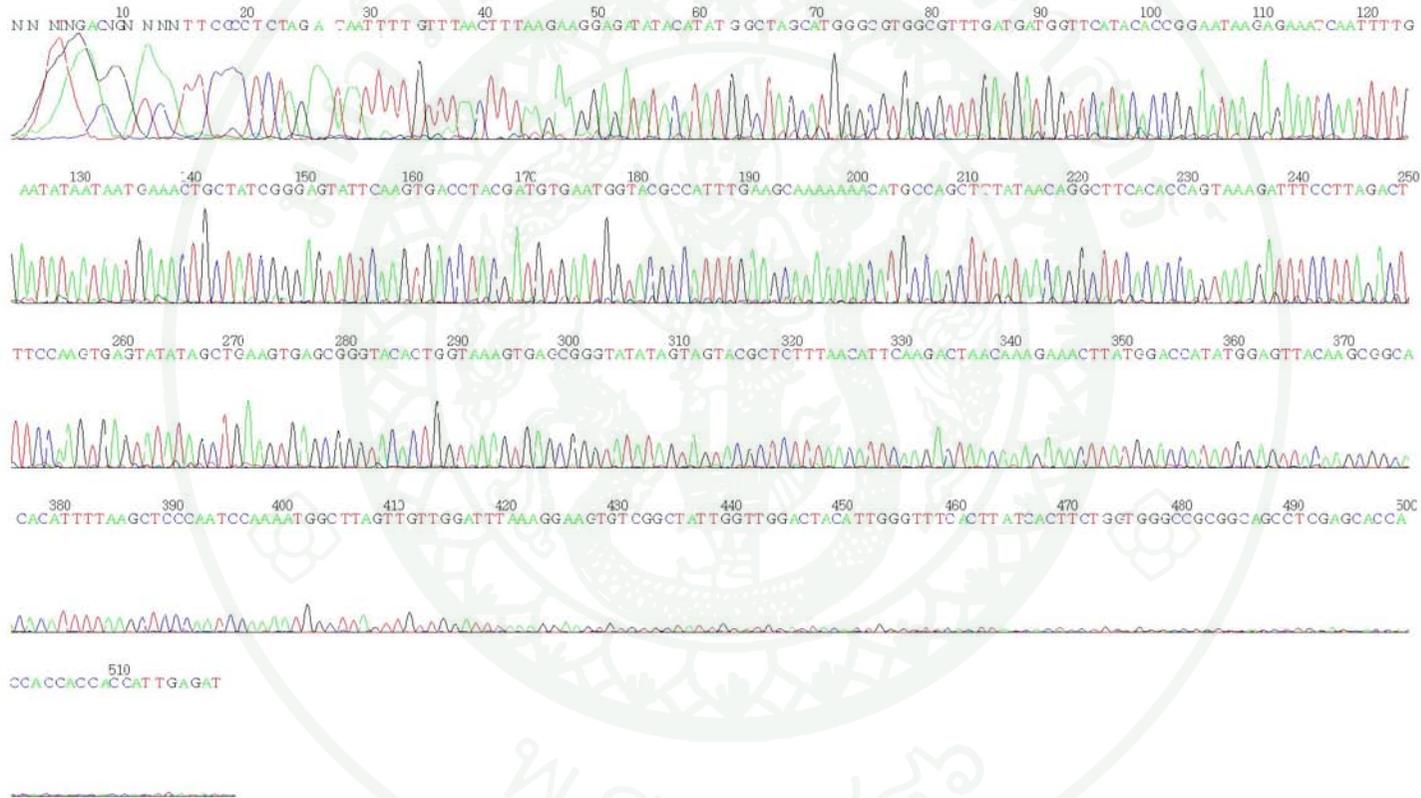
File: pGEM\_nsMLL-MLLR.ab1 Run Ended: 2009/3/17 14:24:41 Signal G:712 A:624 C:524 T:706  
Sample: pGEM\_nsMLL\_MLLR Lane: 49 Base spacing: 15.852917 623 bases in 8406 scans Page 1 of 1



ภาพผนวกที่ ข2 การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pGEM-nsMLL ด้าน C-terminal

File: pGEM\_IMLL-T7promoter.ab1  
Sample: pGEM\_IMLL\_T7promoter

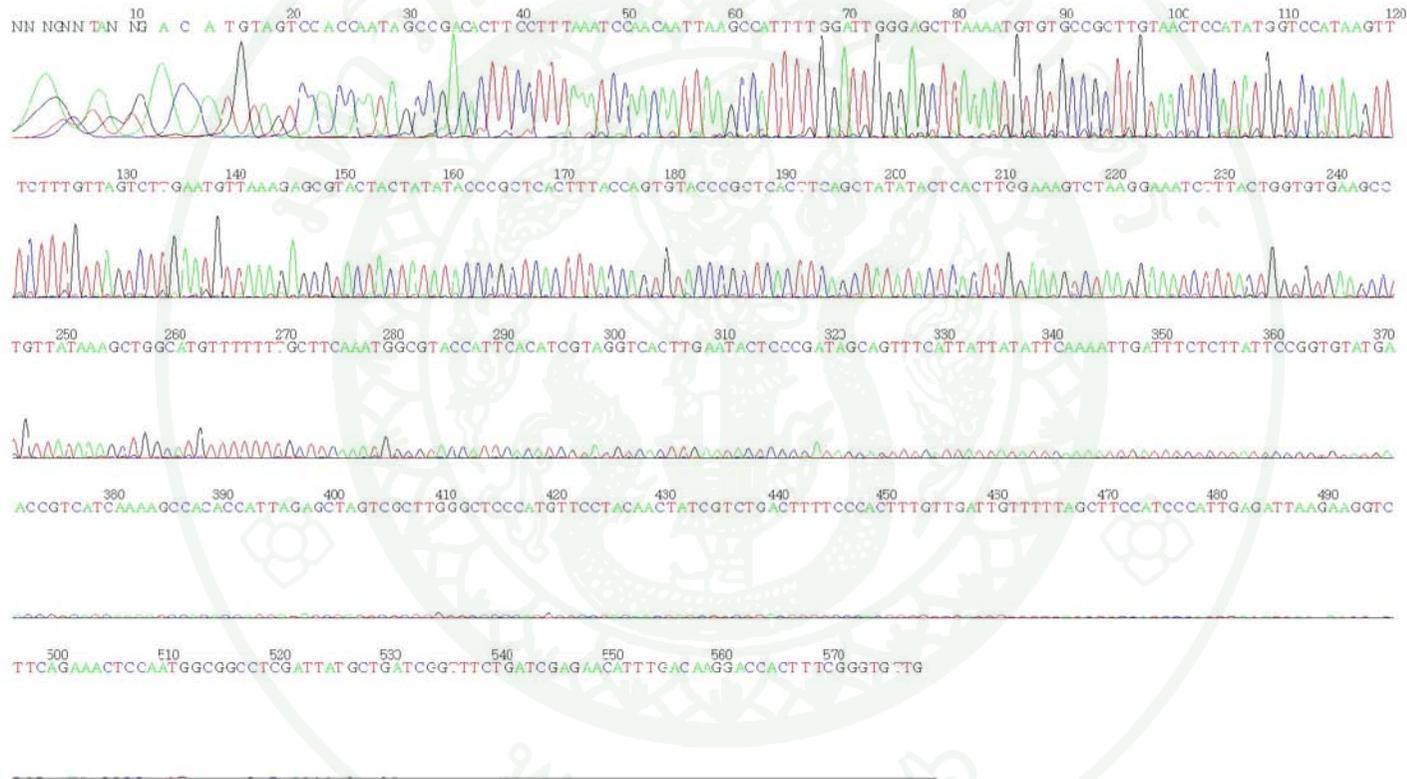
Run Ended: 2009/3/17 14:24:41  
Lane: 56 Base spacing: 15.639855 519 bases in 6240 scans Page 1 of 1



ภาพผนวกที่ ข3 การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pGEM-LMLL ด้าน N-terminal

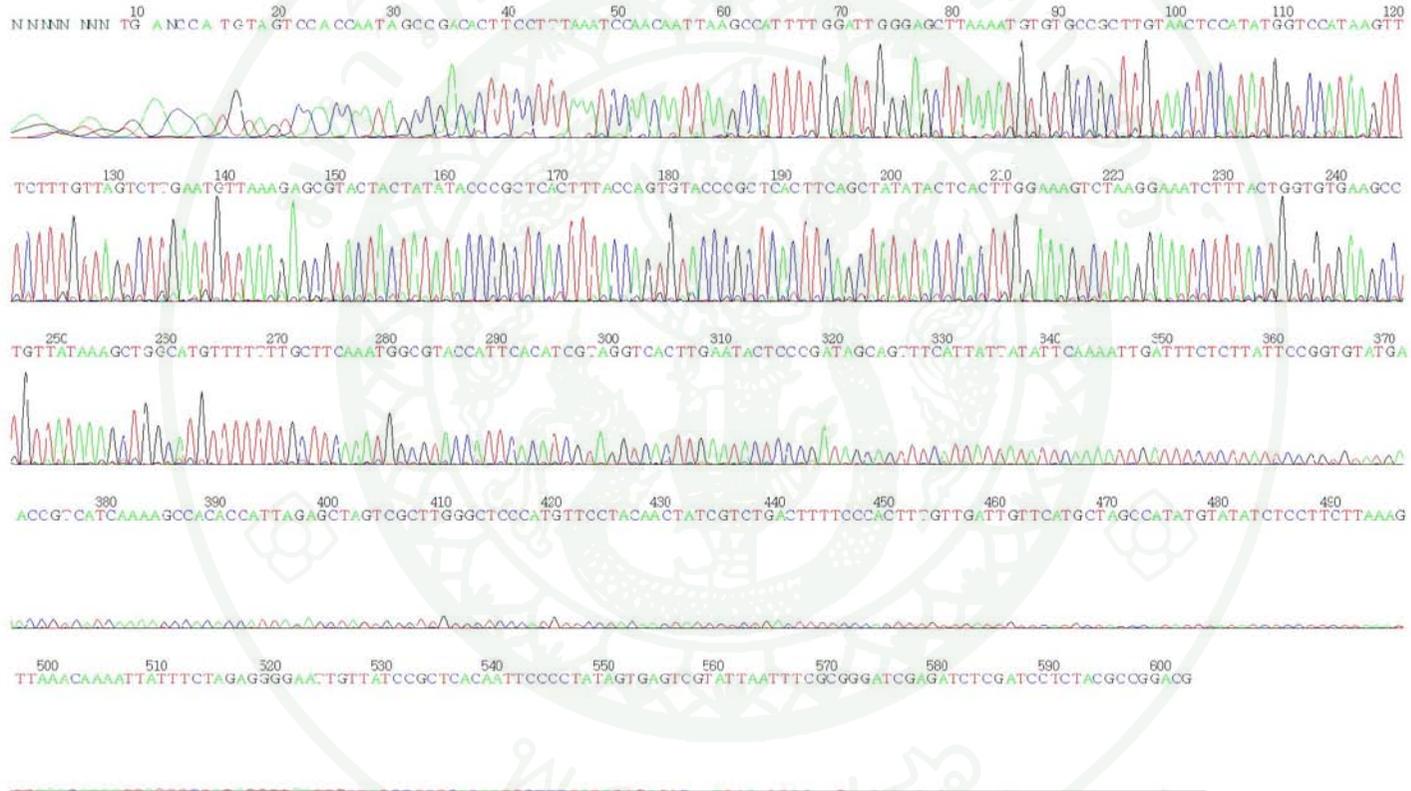


File: pET\_fMLL-MLLR.ab1 Run Ended: 2009/3/17 14:24:41 Signal G:1220 A:891 C:1023 T:955  
 Sample: pET\_fMLL\_MLLR Lane: 62 Base spacing: 15.6848345 578 bases in 7003 scans Page 1 of 1



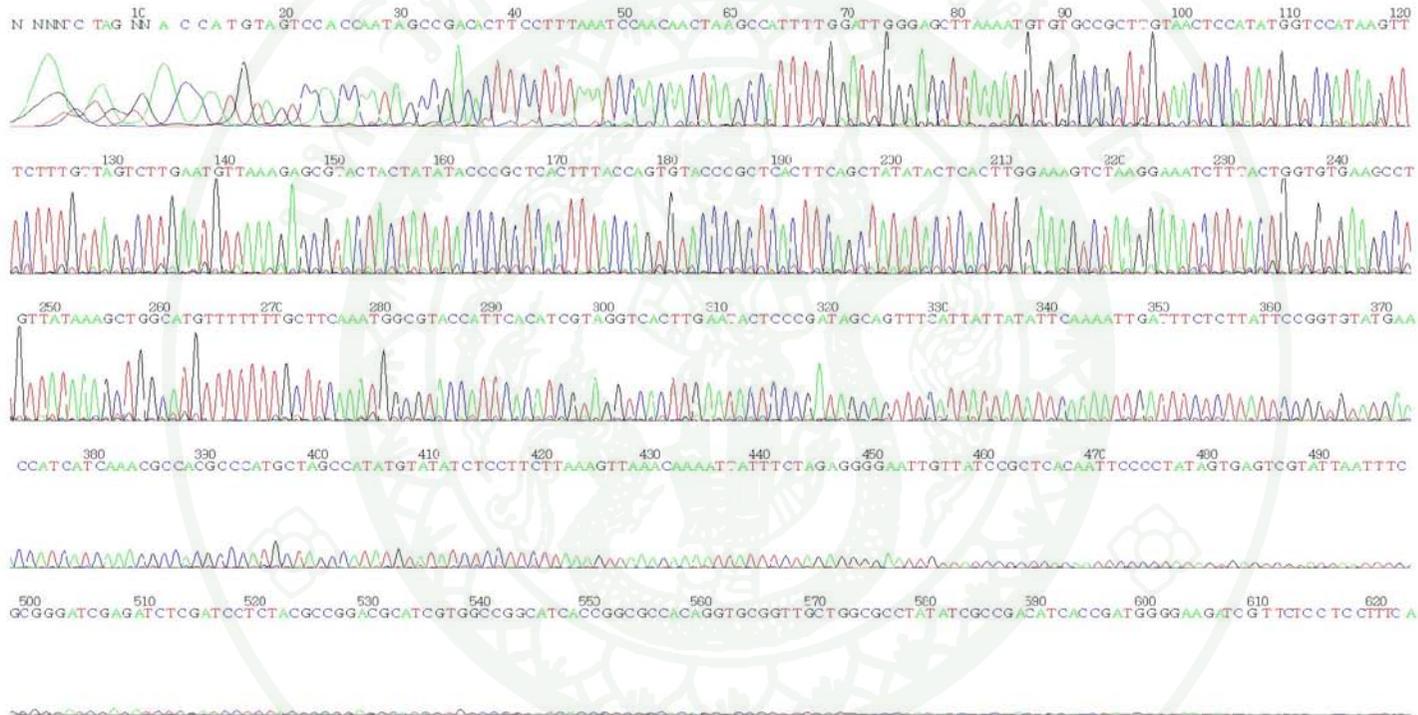
ภาพผนวกที่ ข5 การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pET-fMLL ด้าน C-terminal

File: pET\_nsMLL-MLLR.ab1 Run Ended: 2009/3/17 14:24:41 Signal G:1683 A:1108 C:1204 T:1100  
 Sample: pET\_nsMLL\_MLLR Lane: 58 Base spacing: 15.544791 603 bases in 7287 scans Page 1 of 1



ภาพผนวกที่ ๖6 การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pET-nsMLL ด้าน C-terminal

File: pET\_LMLL-MLLR.ab1 Run Ended: 2009/3/17 14:24:41 Signal G:766 A:591 C:629 T:565  
Sample:pET\_LMLL\_MLLR Lane: 54 Base spacing: 15.677553 679 bases in 8178 scans Page 1 of 2



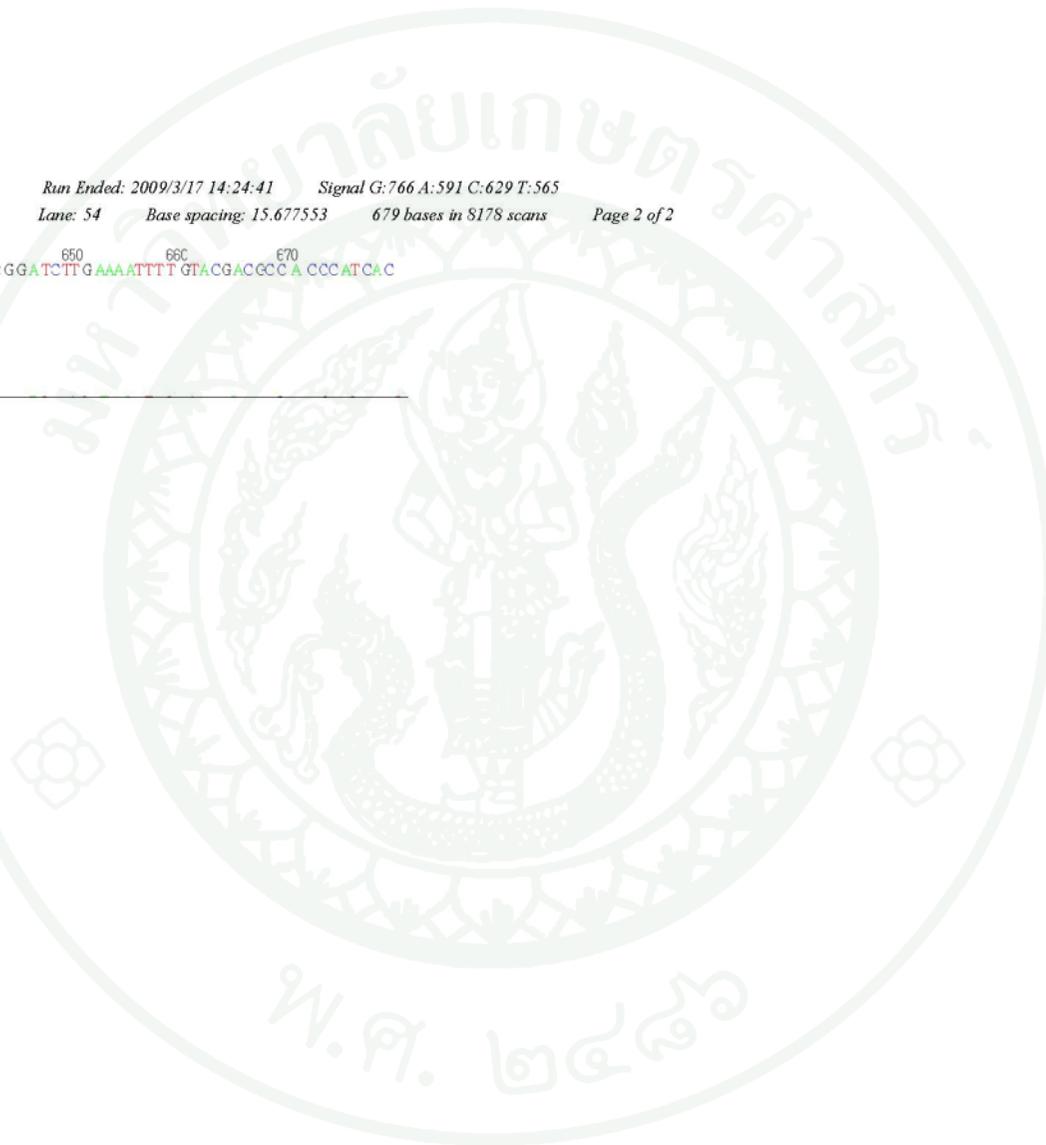
ภาพผนวกที่ ข7 การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ pET-LMLL ด้าน C-terminal

File: pET\_IMLL-MLLR.ab1 Run Ended: 2009/3/17 14:24:41 Signal G:766 A:591 C:629 T:565  
Sample: pET\_IMLL\_MLLR Lane: 54 Base spacing: 15.677553 679 bases in 8178 scans Page 2 of 2

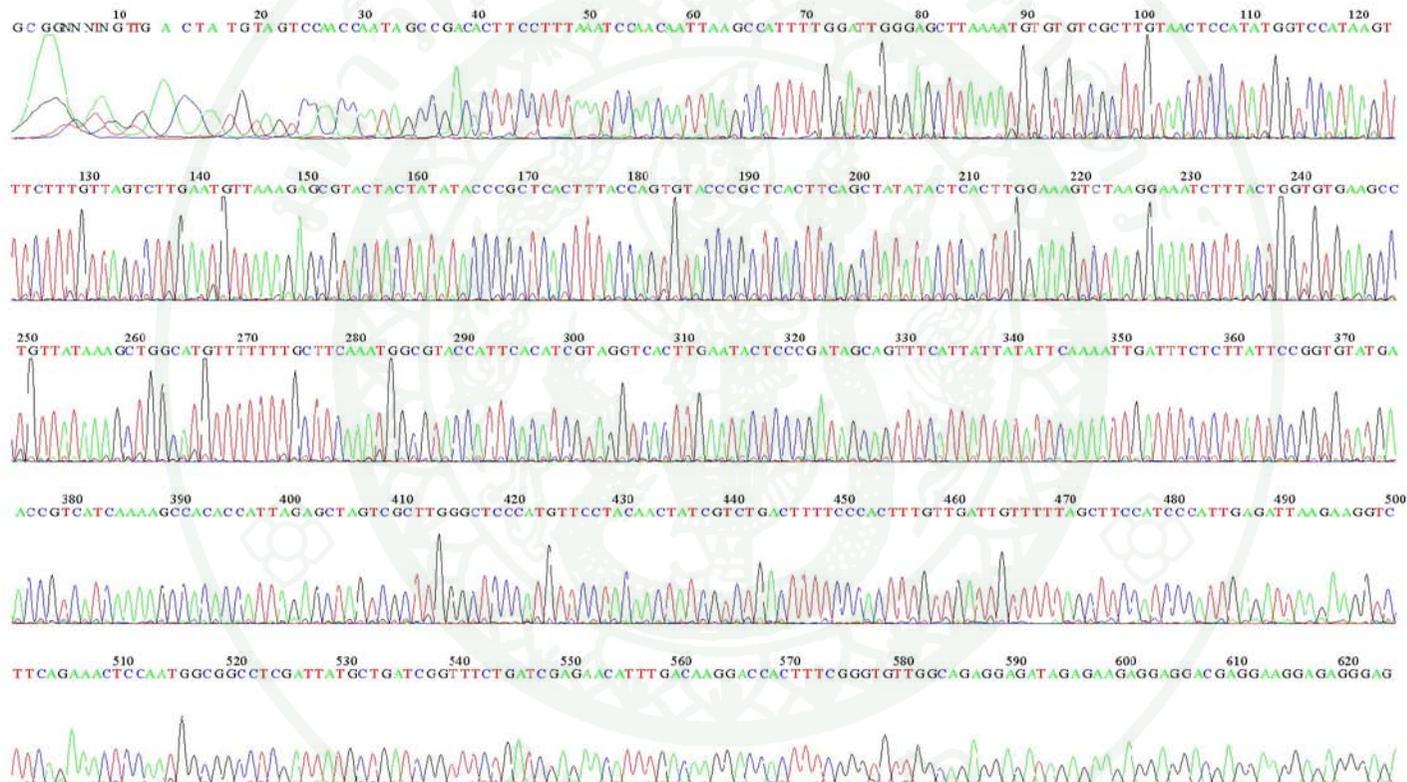
630 640 650 660 670  
TT T CAT GA GCTTC CTG TTTC GGA TCTTG AAAATTTT GTACGACCC A CCCATCAC

---

ภาพผนวกที่ ข7 (ต่อ)

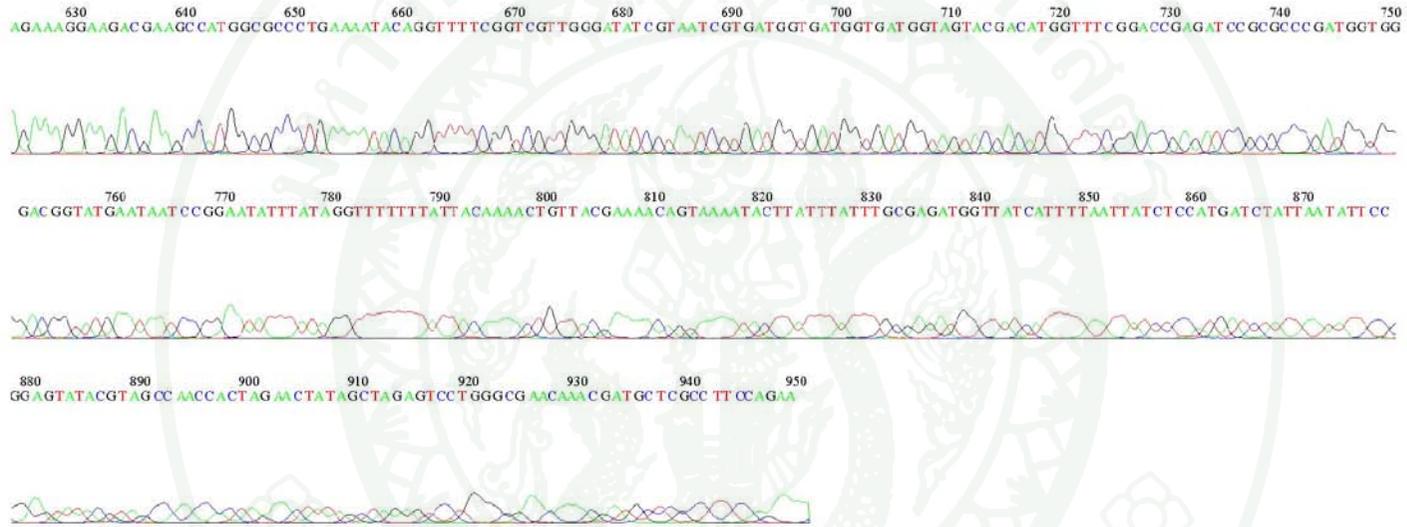


File: Bac\_fMLL\_R.ab1 Run Ended: 2009/10/8 16:4:6 Signal G:1061 A:1539 C:1083 T:1416  
Sample: Bac\_fMLL\_R Lane: 27 Base spacing: 14.687446 950 bases in 11365 scans Page 1 of 2



ภาพผนวกที่ ข8 การตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ Bac-fMLL ด้าน C-terminal

File: Bac\_fMLL\_R.ab1 Run Ended: 2009/10/8 16:4:6 Signal G:1061 A:1539 C:1083 T:1416  
Sample: Bac\_fMLL\_R Lane: 27 Base spacing: 14.687446 950 bases in 11365 scans Page 2 of 2



ภาพผนวกที่ ข8 (ต่อ)





ภาพผนวกที่ ข9 (ต่อ)

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 1 ชั่วโมง

lh	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	0.001	0.017	0.025	0.022	0.014	0.006	0.023	-0.001	-0.002	-0.003	0.006
B	0.003	0.003	0.008	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	0.002	0.002	0.006	0.005	0.000
C	-0.002	-0.002	0.030	0.001	0.053	0.058	0.017	0.019	-0.003	-0.005	0.002	0.011
D	0.015	0.001	0.007	0.000	0.011	0.001	0.007	0.000	0.004	0.006	-0.002	0.018
E	0.014	0.012	0.002	0.033	0.000	0.015	0.000	0.023	0.005	-0.003	-0.001	0.011
F	0.012	0.003	0.032	0.001	0.007	0.001	0.011	0.000	0.000	0.002	0.003	-0.003
G	0.000	-0.002	0.018	0.019	0.021	0.022	0.012	0.015	-0.001	-0.003	-0.003	-0.001
H	0.007	-0.001	0.001	0.002	-0.001	0.015	0.000	0.016	0.001	-0.004	0.000	0.000

ตารางผนวกที่ ข2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 24 ชั่วโมง

24 h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.001	0.002	0.024	0.020	0.034	0.012	0.006	0.033	-0.002	-0.001	0.000	0.002
B	0.003	0.001	0.008	0.000	-0.003	0.000	-0.001	0.011	0.002	0.01	0.005	0.002
C	0.002	-0.004	0.051	0.002	0.061	0.061	0.023	0.017	-0.003	-0.001	-0.001	0.015
D	0.023	0.000	0.070	0.003	0.007	-0.001	0.019	0.001	0.013	0.012	-0.005	0.054
E	0.015	0.015	0.000	0.046	0.000	0.023	-0.001	0.022	0.005	-0.003	-0.002	0.023
F	0.020	0.003	0.032	0.002	0.006	-0.001	0.047	0.000	-0.001	0.002	0.000	-0.001
G	-0.002	-0.003	0.018	0.045	0.030	0.045	0.012	0.019	-0.002	-0.003	-0.002	0.018
H	0.008	-0.003	0.002	0.007	-0.001	0.043	-0.001	0.028	0.001	-0.004	0.002	0.000

ตารางผนวกที่ ๖3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 48 ชั่วโมง

48h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.005	0.005	0.036	0.012	0.056	0.034	0.013	0.04	0.001	0.001	0.002	0.004
B	0.008	0.006	0.010	0.003	0.000	0.003	0.002	0.013	0.005	0.013	0.009	0.007
C	0.001	-0.001	0.067	0.006	0.065	0.067	0.029	0.021	0.000	0.002	0.004	0.028
D	0.025	0.004	0.113	0.007	0.010	0.003	0.024	0.004	0.019	0.018	-0.001	0.077
E	0.020	0.022	0.006	0.061	0.003	0.026	0.003	0.031	0.008	0.001	0.000	0.028
F	0.025	0.008	0.041	0.006	0.010	0.002	0.057	0.003	0.005	0.005	0.002	0.003
G	0.002	0.005	0.023	0.066	0.034	0.048	0.016	0.027	0.000	0.001	0.001	0.032
H	0.012	0.000	0.004	0.013	0.002	0.138	0.002	0.030	0.004	0.000	0.003	0.000

ตารางผนวกที่ ข4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 72 ชั่วโมง

72h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.006	0.005	0.043	0.031	0.068	0.019	0.016	0.041	0.000	0.000	0.000	0.004
B	0.008	0.007	0.01	0.002	0.001	0.003	0.002	0.015	0.007	0.014	0.005	0.008
C	0.000	-0.001	0.006	0.006	0.083	0.082	0.031	0.024	0.000	0.003	0.005	0.049
D	0.025	0.005	0.104	0.009	0.048	0.003	0.026	0.006	0.024	0.027	0.004	0.018
E	0.019	0.025	0.006	0.077	0.004	0.027	0.006	0.038	0.012	0.004	0.006	0.030
F	0.026	0.009	0.102	0.007	0.027	0.003	0.062	0.002	0.006	0.003	0.000	0.004
G	0.001	0.006	0.023	0.077	0.035	0.049	0.017	0.030	0.002	0.002	0.001	0.035
H	0.008	0.000	0.008	0.015	0.003	0.184	0.005	0.034	0.006	0.001	0.005	0.000

ตารางผนวกที่ ๕ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง

1h-24h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.001	-0.001	-0.007	0.005	-0.012	0.002	0.000	-0.01	0.001	-0.001	-0.003	0.004
B	0.000	0.002	0.000	-0.001	0.002	0.000	0.000	-0.009	0.000	-0.004	0.000	-0.002
C	-0.004	0.002	-0.021	-0.001	-0.008	-0.003	-0.006	0.002	0.000	-0.004	0.003	-0.004
D	-0.008	0.001	-0.063	-0.003	0.004	0.002	-0.012	-0.001	-0.009	-0.006	0.003	-0.036
E	-0.001	-0.003	0.002	-0.013	0.000	-0.008	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	-0.012
F	-0.008	0.000	0.000	-0.001	0.001	0.002	-0.036	0.000	0.001	0.000	0.003	-0.002
G	0.002	0.001	0.000	-0.026	-0.009	-0.023	0.000	-0.004	0.001	0.000	-0.001	-0.019
H	-0.001	0.002	-0.001	-0.005	0.000	-0.028	0.001	-0.012	0.000	0.000	-0.002	0.000

ตารางผนวกที่ ข6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง

1h-48h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.005	-0.004	-0.019	0.013	-0.034	-0.02	-0.007	-0.017	-0.002	-0.003	-0.005	0.002
B	-0.005	-0.003	-0.002	-0.004	-0.001	-0.003	-0.003	-0.011	-0.003	-0.007	-0.004	-0.007
C	-0.003	-0.001	-0.037	-0.005	-0.012	-0.009	-0.012	-0.002	-0.003	-0.007	-0.002	-0.017
D	-0.01	-0.003	-0.106	-0.007	0.001	-0.002	-0.017	-0.004	-0.015	-0.012	-0.001	-0.059
E	-0.006	-0.01	-0.004	-0.028	-0.003	-0.011	-0.003	-0.008	-0.003	-0.004	-0.001	-0.017
F	-0.013	-0.005	-0.009	-0.005	-0.003	-0.001	-0.046	-0.003	-0.005	-0.003	0.001	-0.006
G	-0.002	-0.007	-0.005	-0.047	-0.013	-0.026	-0.004	-0.012	-0.001	-0.004	-0.004	-0.033
H	-0.005	-0.001	-0.003	-0.011	-0.003	-0.123	-0.002	-0.014	-0.003	-0.004	-0.003	0.000

ตารางผนวกที่ ข7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-nsMLL ที่เวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง

1h-72h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.006	-0.004	-0.026	-0.006	-0.046	-0.005	-0.01	-0.018	-0.001	-0.002	-0.003	0.002
B	-0.005	-0.004	-0.002	-0.003	-0.002	-0.003	-0.003	-0.013	-0.005	-0.008	0.000	-0.008
C	-0.002	-0.001	0.024	-0.005	-0.030	-0.024	-0.014	-0.005	-0.003	-0.008	-0.003	-0.038
D	-0.010	-0.004	-0.097	-0.009	-0.037	-0.002	-0.019	-0.006	-0.020	-0.021	-0.006	0.000
E	-0.005	-0.013	-0.004	-0.044	-0.004	-0.012	-0.006	-0.015	-0.007	-0.007	-0.007	-0.019
F	-0.014	-0.006	-0.070	-0.006	-0.020	-0.002	-0.051	-0.002	-0.006	-0.001	0.003	-0.007
G	-0.001	-0.008	-0.005	-0.058	-0.014	-0.027	-0.005	-0.015	-0.003	-0.005	-0.004	-0.036
H	-0.001	-0.001	-0.007	-0.013	-0.004	-0.169	-0.005	-0.018	-0.005	-0.005	-0.005	0.000

ตารางผนวกที่ ข8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 1 ชั่วโมง

lh-b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.035	0.010	0.011	0.048	0.005	0.034	0.011	0.018	0.008	0.007	0.001	0.010
B	0.035	0.014	0.014	0.012	0.019	0.013	0.009	0.011	0.007	0.008	0.010	0.004
C	0.036	0.009	0.039	0.034	0.037	0.035	0.004	0.031	0.011	0.004	0.011	0.028
D	0.065	0.041	0.063	0.034	0.092	0.016	0.013	0.012	0.025	0.014	0.006	0.008
E	0.028	0.045	0.022	0.027	0.012	0.024	0.016	0.012	0.040	0.005	0.008	0.017
F	0.019	0.019	0.049	0.020	0.041	0.011	0.012	0.008	0.028	0.008	0.010	0.011
G	0.031	0.033	0.012	0.035	0.010	0.029	0.014	0.015	0.005	0.003	0.002	0.002
H	0.026	0.010	0.014	0.066	0.007	0.022	0.007	0.014	0.018	0.002	0.011	0.000

ตารางผนวกที่ ๗ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 24 ชั่วโมง

24h-b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.051	0.008	0.071	0.104	0.002	0.086	0.007	0.014	0.005	0.007	0.000	0.011
B	0.030	0.013	0.009	0.009	0.021	0.012	0.010	0.012	0.004	0.002	0.006	0.004
C	0.011	0.010	0.037	0.036	0.036	0.032	0.001	0.029	0.014	0.001	0.012	0.052
D	0.176	0.046	0.086	0.031	0.083	0.013	0.008	0.016	0.029	0.024	0.009	0.067
E	0.018	0.072	0.021	0.081	0.016	0.018	0.019	0.009	0.010	0.005	0.010	0.019
F	0.086	0.014	0.069	0.017	0.057	0.013	0.010	0.008	0.034	0.004	0.007	0.014
G	0.047	0.028	0.019	0.053	0.045	0.034	0.011	0.013	0.002	0.001	0.001	0.003
H	0.027	0.013	0.011	0.086	0.006	0.024	0.009	0.011	0.015	0.002	0.008	0.000

ตารางผนวกที่ ข10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 48 ชั่วโมง

48h-b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.018	0.012	0.100	0.037	0.007	0.015	0.010	0.015	0.007	0.008	0.002	0.007
B	0.025	0.017	0.011	0.010	0.023	0.016	0.008	0.014	0.005	0.004	0.008	0.006
C	0.006	0.012	0.042	0.043	0.038	0.034	0.002	0.030	0.017	0.007	0.010	0.098
D	0.091	0.054	0.091	0.034	0.084	0.016	0.010	0.020	0.035	0.019	0.013	0.090
E	0.012	0.059	0.022	0.098	0.016	0.019	0.026	0.010	0.019	0.007	0.011	0.021
F	0.020	0.015	0.076	0.018	0.064	0.016	0.011	0.009	0.026	0.005	0.006	0.020
G	0.044	0.009	0.050	0.062	0.045	0.041	0.013	0.015	0.003	0.002	0.002	0.008
H	0.024	0.019	0.015	0.075	0.009	0.038	0.011	0.014	0.017	0.003	0.009	0.000

ตารางผนวกที่ ข11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 72 ชั่วโมง

72h-b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.013	0.010	0.098	0.009	-0.001	0.005	0.007	0.013	0.003	0.003	-0.001	-0.001
B	0.012	0.005	0.006	0.007	0.015	0.009	0.003	0.006	0.000	-0.003	-0.001	0.000
C	0.000	0.006	0.054	0.062	0.046	0.036	-0.001	0.025	0.011	-0.003	0.005	0.009
D	0.041	0.044	0.105	0.030	0.080	0.010	0.029	0.016	0.034	0.019	0.009	0.008
E	0.007	0.041	0.017	0.015	0.011	0.018	0.020	0.006	0.023	0.000	0.006	0.017
F	0.003	0.020	0.092	0.013	0.084	0.012	0.007	0.004	0.026	0.000	0.003	0.012
G	0.017	0.009	0.051	0.006	0.042	0.058	0.008	0.011	0.000	-0.002	-0.003	0.005
H	0.012	0.014	0.009	0.021	0.004	0.068	0.007	0.004	0.009	-0.001	0.004	0.000

ตารางผนวกที่ ข12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง

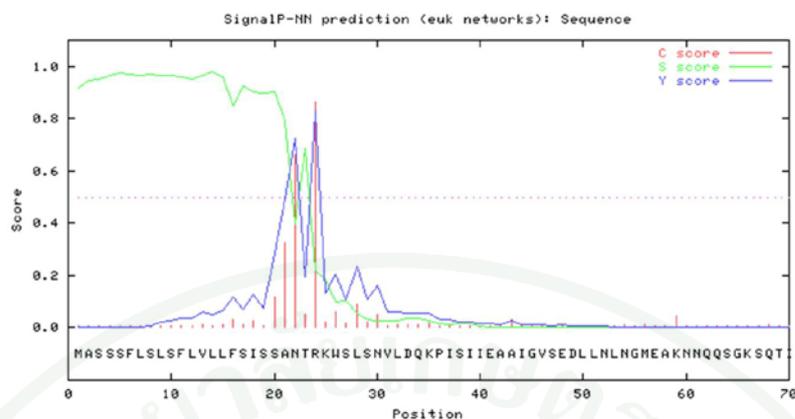
1h-24h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.016	0.002	-0.060	-0.056	0.003	-0.052	0.004	0.004	0.003	0.000	0.001	-0.001
B	0.005	0.001	0.005	0.003	-0.002	0.001	-0.001	-0.001	0.003	0.006	0.004	0.000
C	0.025	-0.001	0.002	-0.002	0.001	0.003	0.003	0.002	-0.003	0.003	-0.001	-0.024
D	-0.111	-0.005	-0.023	0.003	0.009	0.003	0.005	-0.004	-0.004	-0.010	-0.003	-0.059
E	0.010	-0.027	0.001	-0.054	-0.004	0.006	-0.003	0.003	0.030	0.000	-0.002	-0.002
F	-0.067	0.005	-0.020	0.003	-0.016	-0.002	0.002	0.000	-0.006	0.004	0.003	-0.003
G	-0.016	0.005	-0.007	-0.018	-0.035	-0.005	0.003	0.002	0.003	0.002	0.001	-0.001
H	-0.001	-0.003	0.003	-0.020	0.001	-0.002	-0.002	0.003	0.003	0.000	0.003	0.000

ตารางผนวกที่ ข13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง

1h-48h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.017	-0.002	-0.089	0.011	-0.002	0.019	0.001	0.003	0.001	-0.001	-0.001	0.003
B	0.010	-0.003	0.003	0.002	-0.004	-0.003	0.001	-0.003	0.002	0.004	0.002	-0.002
C	0.030	-0.003	-0.003	-0.009	-0.001	0.001	0.002	0.001	-0.006	-0.003	0.001	-0.070
D	-0.026	-0.013	-0.028	0.000	0.008	0.000	0.003	-0.008	-0.010	-0.005	-0.007	-0.082
E	0.016	-0.014	0.000	-0.071	-0.004	0.005	-0.010	0.002	0.021	-0.002	-0.003	-0.004
F	-0.001	0.004	-0.027	0.002	-0.023	-0.005	0.001	-0.001	0.002	0.003	0.004	-0.009
G	-0.013	0.024	-0.038	-0.027	-0.035	-0.012	0.001	0.000	0.002	0.001	0.000	-0.006
H	0.002	-0.009	-0.001	-0.009	-0.002	-0.016	-0.004	0.000	0.001	-0.001	0.002	0.000

ตารางผนวกที่ ข14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองม้วนพับของ pET-LMLL ที่เวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับที่เวลา 1 ชั่วโมง

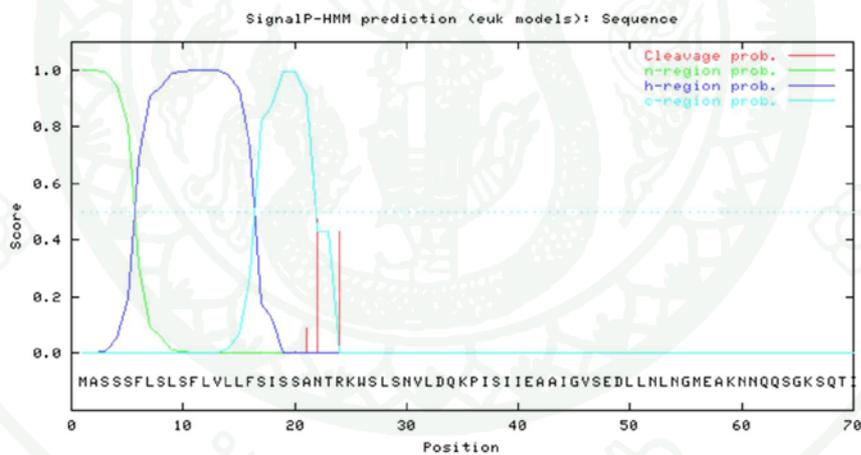
1h-72h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.022	0.000	-0.087	0.039	0.006	0.029	0.004	0.005	0.005	0.004	0.002	0.011
B	0.023	0.009	0.008	0.005	0.004	0.004	0.006	0.005	-0.007	0.011	0.011	0.004
C	0.036	0.003	-0.015	-0.028	-0.009	-0.001	0.005	0.006	0.000	0.007	0.006	0.019
D	0.024	-0.003	-0.042	0.004	0.012	0.006	-0.016	-0.004	-0.009	-0.005	-0.003	0.000
E	0.021	0.004	0.005	0.012	0.001	0.006	-0.004	0.006	0.017	0.005	0.002	0.000
F	0.016	-0.001	-0.043	0.007	-0.043	-0.001	0.005	0.004	0.002	0.008	0.007	-0.001
G	0.014	0.024	-0.039	0.029	-0.032	-0.029	0.006	0.004	0.005	0.005	0.005	-0.003
H	0.014	-0.004	0.005	0.045	0.003	-0.046	0.000	0.010	0.009	0.003	0.007	0.000



Sequence length = 70

Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	24	0.864	0.32	YES
max. Y	24	0.832	0.33	YES
max. S	14	0.978	0.87	YES
mean S	1-23	0.902	0.48	YES
D	1-23	0.867	0.43	YES

Most likely cleavage site between pos. 23 and 24: ANT-RK



>Sequence

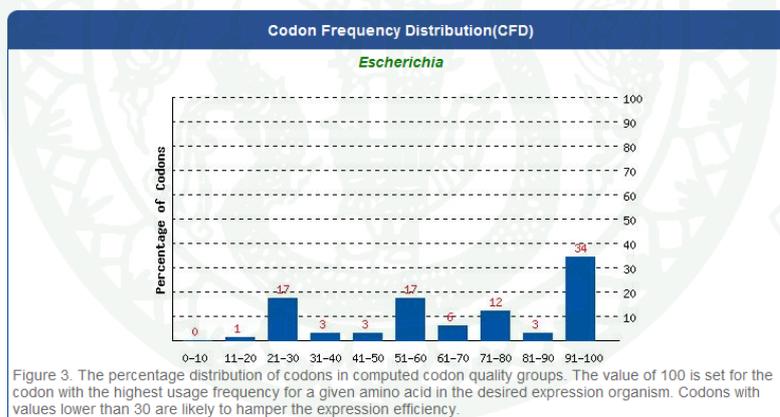
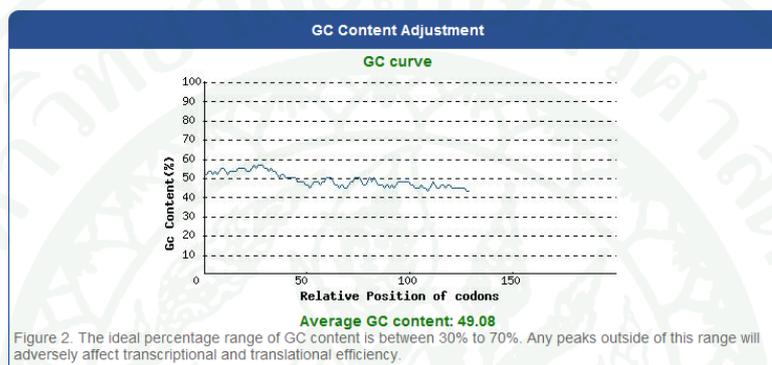
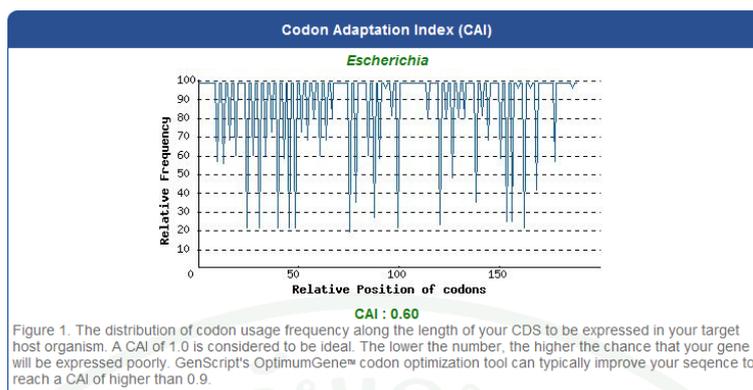
Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Signal anchor probability: 0.000

Max cleavage site probability: 0.474 between pos. 21 and 22

ภาพผนวกที่ ๑๐ การทำนายหาสัญญาณโปรตีนด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 Server



ภาพผนวกที่ ๑๑ การวิเคราะห์ความน่าจะเป็นในการแสดงออกของโปรตีนด้วยโปรแกรม GenScript rare codon analysis tool

ตารางผนวกที่ ๑๑๕ Codon Usage ของ *E. coli*

*Escherichia coli* Codon Usage

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])

UUU 28.9 (109)	UCU 8.5 (32)	UAU 18.6 (70)	UGU 4.2 (16)
UUC 18.8 (71)	UCC 8.0 (30)	UAC 8.5 (32)	UGC 5.8 (22)
UUA 17.5 (66)	UCA 6.1 (23)	UAA 1.9 (7)	UGA 0.8 (3)
UUG 18.6 (70)	UCG 11.4 (43)	UAG 0.3 (1)	UGG 12.7 (48)
CUU 12.7 (48)	CCU 5.8 (22)	CAU 9.3 (35)	CGU 16.4 (62)
CUC 14.1 (53)	CCC 2.4 (9)	CAC 7.2 (27)	CGC 18.8 (71)
CUA 3.4 (13)	CCA 7.4 (28)	CAA 13.5 (51)	CGA 2.4 (9)
CUG 54.9 (207)	CCG 24.9 (94)	CAG 24.7 (93)	CGG 5.0 (19)
AUU 33.9 (128)	ACU 7.7 (29)	AAU 21.2 (80)	AGU 9.0 (34)
AUC 31.0 (117)	ACC 25.2 (95)	AAC 15.9 (60)	AGC 14.3 (54)
AUA 5.0 (19)	ACA 6.1 (23)	AAA 29.2 (110)	AGA 2.4 (9)
AUG 37.4 (141)	ACG 14.6 (55)	AAG 8.8 (33)	AGG 2.1 (8)
GUU 19.6 (74)	GCU 13.8 (52)	GAU 30.0 (113)	GGU 24.4 (92)
GUC 14.3 (54)	GCC 25.5 (96)	GAC 15.1 (57)	GGC 33.1 (125)
GUA 10.6 (40)	GCA 19.6 (74)	GAA 29.4 (111)	GGA 8.2 (31)
GUG 33.9 (128)	GCG 32.6 (123)	GAG 18.0 (68)	GGG 14.3 (54)

ตารางผนวกที่ ๑16 Codon Usage ของ *Spodoptera frugiperda*

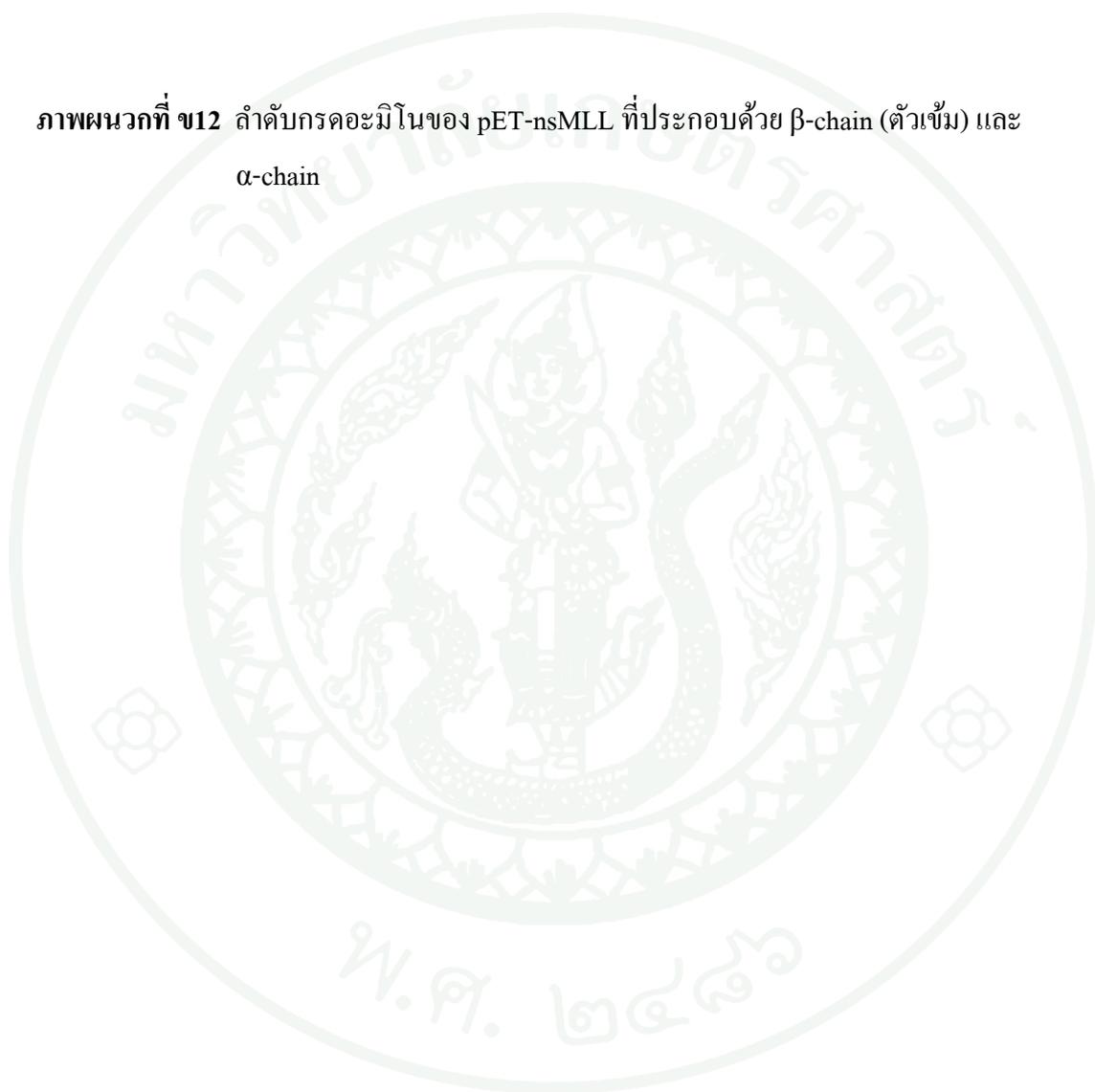
*Spodoptera frugiperda* Codon Usage

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])

UUU 10.1 (392)	UCU 10.7 (413)	UAU 10.0 (389)	UGU 8.5 (330)
UUC 27.5 (1068)	UCC 12.6 (490)	UAC 24.4 (945)	UGC 13.2 (513)
UUA 7.7 (300)	UCA 10.6 (410)	UAA 2.3 (90)	UGA 0.7 (26)
UUG 15.9 (617)	UCG 7.7 (300)	UAG 0.7 (26)	UGG 13.3 (516)
CUU 9.6 (373)	CCU 14.1 (546)	CAU 8.7 (336)	CGU 15.3 (593)
CUC 17.0 (661)	CCC 13.7 (533)	CAC 15.6 (603)	CGC 15.6 (605)
CUA 7.0 (270)	CCA 13.6 (529)	CAA 16.1 (626)	CGA 5.4 (210)
CUG 24.1 (933)	CCG 7.8 (304)	CAG 21.6 (836)	CGG 3.7 (145)
AUU 15.5 (600)	ACU 14.3 (554)	AAU 13.4 (520)	AGU 8.4 (324)
AUC 28.3 (1099)	ACC 17.2 (668)	AAC 28.8 (1115)	AGC 11.1 (430)
AUA 8.3 (323)	ACA 12.3 (478)	AAA 26.8 (1039)	AGA 12.1 (468)
AUG 27.0 (1048)	ACG 9.4 (366)	AAG 49.2 (1908)	AGG 12.6 (487)
GUU 14.1 (546)	GCU 24.6 (953)	GAU 21.9 (849)	GGU 21.5 (833)
GUC 20.1 (778)	GCC 20.8 (805)	GAC 33.4 (1295)	GGC 19.6 (761)
GUA 12.0 (466)	GCA 12.8 (497)	GAA 27.6 (1070)	GGA 17.8 (690)
GUG 24.1 (936)	GCG 12.4 (479)	GAG 33.1 (1285)	GGG 4.6 (179)

10            20            30            40            50            60  
 MNNQQSGKSQ TIVVGTWGAQ ATSSNGVAFD DGSYTGIREI NFEYNNETAI GSIQVTYDVN  
  
               70            80            90            100            110            120  
 GTPFEAKKHA SFITGFTPVK ISLDFPSEYI VEVSGYTGKV SGYIVVRSIT FKTNKETYGP  
  
               130            140            150            160  
 YGVTSGTHFK LPIQNGLIVG FKGSVGYWLD YIGFHLALHH HHHH

ภาพผนวกที่ ๑๒ ลำดับกรดอะมิโนของ pET-nsMLL ที่ประกอบด้วย  $\beta$ -chain (ตัวเข้ม) และ  $\alpha$ -chain



## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นางสาวสุภาภรณ์ สีทะหา Ms. Supaporn Seetaha
ที่อยู่ปัจจุบัน	35/197 ตัดสี่วิสต์ ซ. ลำลูกกา 43 ถ. ลำลูกกา อ. ลำลูกกา จ. ปทุมธานี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 26 เดือนเมษายน พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	อำเภอกุศฉยชัย จังหวัดอุตรธานี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นิสิตปริญญาโท สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	Computational Analysis of Mulberry leaf lectin to sialic acid specificity
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	