

ตารางที่ 3.1 ตารางเปรียบเทียบ *adgstt1* โคลน 1, โคลน 2, โคลน 3 และ โคลน 8 กับ *aggstt1* (Ding Y et. al. 2003)

โคลน	T1 clone 2	T1 clone 3	T1 clone 8	T1 clone 1	<i>aggstt1</i>
T1 clone 2		99%	98%	99%	80%
T1 clone 3			97%	98%	79%
T1 clone 8				97%	78%
T1 clone 1					79%

ส่วนยีน *adgst01* พบว่าได้โคลน 2 โคลนที่มีลำดับเบสแบบเดียว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับยีน *aggst01* พบว่าเหมือนถึง 93 เปอร์เซ็นต์

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
adgst01 : MSNGKHLAKGSTPPVLPNDGKLRLYSMRFCPYAQRVHMLDAKKIPYHAIYINLSEKPEWYFEKNPLGKVPALIPGKEGVTLYES : 86
aggst01 : MSNGKHLAKGSSPPLPDDGKLRLYSMRFCPYAQRVHMLDAKKIPYHAIYINLSEKPEWYLEKNPLGKVPALIPGKEGVTLYES : 86

      *           100          *           120          *           140          *           160          *
adgst01 : LVLSDYIEEAHSAQQRKLYPADPFQKAQDRILIERFNGAVISPYRILFSSEGIPPGAITEFGAGLDIFEKELKERATPYFGGDKP : 172
aggst01 : LVLSDYIEEAYSQAQQRKLYPADPFSKAQDRILIERFAGSVIGPYRILFAADGIPPGAITEFGAGLDIFEKELKARGTPYFGGDKP : 172

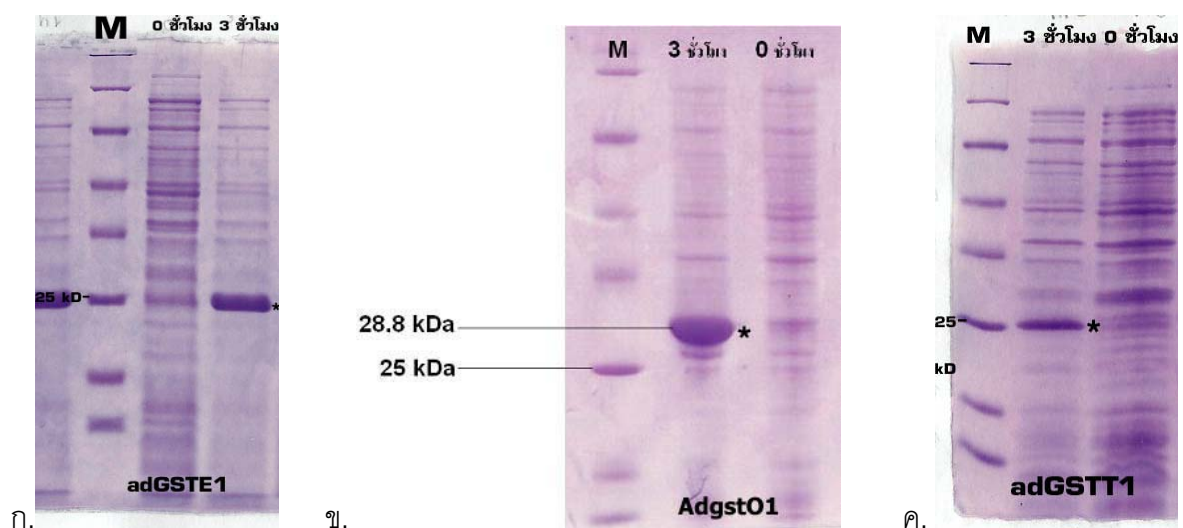
      180           *           200           *           220           *           240
adgst01 : GMIDYMIWPWCERVDLLKFALGDKYELDKERFGKLLQWRDLMEKDDAVKQSFISTEDHTKFLQSRKNGENNYDILA : 248
aggst01 : GMIDYMIWPWCERVDLLKFALGDKYELDKERFGKLLQWREIMEKDDAVKQSFISTEDHTKFLQSRKNGENNYDILA : 248

```

รูปที่ 3.15 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลได้จาก *adgst01* และ *aggst01* ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc หากกรดอะมิโนเหมือนกันใช้อักษรสีแดง

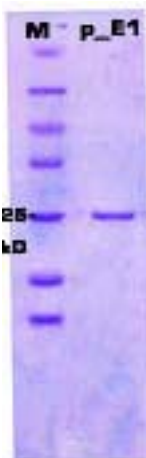
2.1.3 การแสดงออกของยีนที่โคลนได้และการศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์

การแสดงออกของยีนทั้ง 3 พบว่ามีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน โดยโปรตีน adGSTO1 แสดงออกได้มากที่สุด ถัดมาเป็น adGSTE1 และน้อยที่สุดคือ adGSTT1 ดังรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.16 การทำ 12% SDS-PAGE ของโปรตีน ก. adGSTE1 ข. adGSTO1 ค. adGSTT1 โดย M คือ Protein molecular weight marker (Fermentas), 0 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 0 และ 3 ของการชักนำให้มีการแสดงออกของยีนด้วย 0.1 mM IPTG แถบโปรตีนที่ * คือโปรตีนที่แสดงออกหลังการชักนำ

จากนั้นแยกบริสุทธิ์โปรตีนเพื่อศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์พบว่า adGSTE1 สามารถจับกับ GSH-column (GSTrap column) ได้ ซึ่งเมื่อแยกบริสุทธิ์ได้โปรตีนเพียง 1 แถบดังรูปที่ 3.17



รูปที่ 3.17 การทำ 12% SDS-PAGE ของโปรตีน adGSTE1 ที่แยกบริสุทธิ์ได้จาก GSTrap column โดย M คือ Protein molecular weight marker (Fermentas) มีขนาดสอดคล้องกับขนาดของ adGSTE1 ที่คำนวณได้จากลำดับกรดอะมิโน (224 กรดอะมิโน, 25.09 กิโลดาลตัน)

การแยกบริสุทธิ์จากการเพาะเลี้ยง 50 ml ได้เอนไซม์ adGSTE1-WT และ adGSTE1-R139H มี % yield เป็น 3.99 และ 5.53 (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 คุณลักษณะทางเอนไซม์ที่ได้ระหว่างการแยกบริสุทธิ์ได้จาก GSTrap column (จากเชื้อ 50 ml)

ตัวอย่าง	mOD340	Specific activity ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	total activity ($\mu\text{mole}/\text{min}$)	%yield
adGSTE1-WT	28300.0	108.73	516.5	3.99
adGSTE1-R139H	31372.5	86.75	715.7	5.53

หมายเหตุ; mOD340 คือ miliOD340

ตารางที่ 3.3 Kinetic parameter ของ adGSTE1-WT และ adGSTE1- R139H

ตัวอย่าง	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	kcat (S^{-1})	CDNB		GSH	
			Km (mM)	kcat/Km ($\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Km (mM)	kcat/Km ($\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
adgstE1:WT	145 ± 4.23	59.9	0.0476 ± 0.0016	1259	6.63 ± 0.419	9.03
adgstE1:R139H	182 ± 2.16	75.1	0.100 ± 0.006	730	11.9 ± 0.762	6.31

ตารางที่ 3.4 Substrate specificity ของ adGSTE1-WT และ adGSTE1- R139H

ตัวอย่าง	Specific Activity (mmol/min/mg)				
	CDNB	DCNB	EA	PNPB	PNBC
adGSTE1-WT	90.3 ± 1.95	26.6 ± 2.240	nd*	0.604 ± 0.0810	2.12 ± 0.217
adGSTE1- R139H	147 ± 11.2	27.8 ± 0.576	0.080 ± 0.0250	0.730 ± 0.1180	1.70 ± 0.181

หมายเหตุ; nd* = not detectable

จากการวิเคราะห์ Kinetic parameter ของ adGSTE1-WT และ adGSTE1- R139H (ตารางที่ 3.3) ของการเชื่อม 2 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) และ 10 mM glutathione (GSH) พบว่า adGSTE1- R139H มีค่า V_{max} , k_{cat} , K_m GSH และ K_m CDNB มากกว่า adGSTE1-WT แสดงว่าความชอบ (affinity) ของเอนไซม์ adGSTE1-WT ต่อ CDNB และ GSH จะมากกว่า adGSTE1- R139H รวมทั้งอัตราการเร่งปฏิกิริยาและการกลับคืน (Turn over rate) ซึ่งวัดได้จากค่า $k_{cat}/K_m(CDNB)$ มีค่าสูงด้วย (1259) ส่วน substrate specific activity (ตารางที่ 3.4) พบว่า adGSTE1- R139H สามารถเชื่อม CDNB และ Ethacrynic acid (EA) ได้ดีกว่า adGSTE1-WT (147 ± 11.2 และ 90.3 ± 1.95, 0.080 ± 0.0250 และ ตรวจไม่พบ ตามลำดับ) ส่วน 1,2-Dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) และ *p*-Nitrobenzyl bromide (PNPB) ไม่มีความแตกต่าง ในขณะที่ *p*-Nitrobenzyl chloride (PNBC) adGSTE1- R139H เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมได้ช้ากว่า adGSTE1-WT (1.70 ± 0.181 และ 2.12 ± 0.217 ตามลำดับ) ส่วน Thermal stability ของ adGSTE1-WT (26.1 ± 0.636) มากกว่า adGSTE1- R139H (19.4 ± 1.070) แสดงว่ามีความเสถียรมากกว่า (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 Thermal stability ของ adGSTE1-WT และ adGSTE1- R139H

ตัวอย่าง	Half-life (min)
adGSTE1: WT	26.1 ± 0.636
adGSTE1: R139H	19.4 ± 1.070

หากเปรียบเทียบเอนไซม์ adGSTE1 กับเอนไซม์เดียวกันจากยุงพาหะมาลาเรียของทวีปแอฟริกา (*An. gambiae*) คือ agGSTE1 (ตารางที่ 3.6-3.7) พบว่าไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้เนื่องจากในการโคลนของ *aggste1* เข้าที่ตำแหน่ง *Bam*HI ทำให้เมื่อแสดงออกโปรตีนจะมี T7-Tag ด้านปลายอะมิโน ที่อาจทำให้ conformation ของโปรตีนเปลี่ยน แต่ของ *adgste1* เข้าที่ *Nde*I จึงไม่มี T7-Tag ค่าที่ได้จึงควรเป็นคุณลักษณะที่แท้จริงมากกว่าของ agGSTE1

ตารางที่ 3.6 การเปรียบเทียบ Kinetic parameter ของ adGSTE1 และ agGSTE1(Ortelli F. *et al.* 2003)

ตัวอย่าง	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	kcat (S^{-1})	CDNB		GSH	
			Km (mM)	kcat/Km ($\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Km (mM)	kcat/Km ($\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
adgstE1	145 $\pm$ 4.23	59.9	0.048 $\pm$ 0.002	1259	6.63 $\pm$ 0.419	9.03
aggstE1	3.9 $\pm$ 0.182	3.3	0.037 $\pm$ 0.006	89	1.58 $\pm$ 0.345	-

ตารางที่ 3.7 การเปรียบเทียบ substrate specific activity ของ adGSTE1 และ agGSTE1 (Ortelli F. *et al.* 2003)

ตัวอย่าง	Specific Activity (mmol/min/mg)				
	CDNB	DCNB	EA	PNPB	PNBC
adGSTE1	90.3 $\pm$ 1.95	26.6 $\pm$ 2.24	not detectable	0.604 $\pm$ 0.0810	2.12 $\pm$ 0.217
agGSTE1	3.5 $\pm$ 0.492	8.62 $\pm$ 0.83	not determine	not determine	not determine

การแยกบริสุทธิ์ของ adGSTT1 ด้วย GSTrap column (GSH- column) พบว่าสามารถวัดกิจกรรมของ เอนไซม์ (การเชื่อม GSH กับ CDBN) ในส่วนใส่ที่ได้จากการเตรียม cell lysate แต่เมื่อผ่าน GSTrap column พบกิจกรรมของเอนไซม์ส่วนมากในส่วนที่ไหลผ่านออกมาก่อน (flow-through) และส่วนที่ได้จากการล้าง ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในส่วนชะด้วย GSH แสดงให้เห็นว่าโปรตีน adGSTT1 ไม่สามารถจับ GSH- column ได้ ดังนั้นวิธีการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์จึงต้องพัฒนามาก่อน โดยอาจต้องเปลี่ยน affinity column อื่น พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์ adGSTT1 clone 3 ได้ด้วย HITRAP[®] SP XL column (cationic exchanger) และ HITRAP[®] PHENYL SEPHAROSE column (hydrophobic chromatography) ได้ผลการแยกบริสุทธิ์ดังตารางที่ 3.8 และ 3.9 มีค่า %yield 25.32 ส่วนค่า Kinetic parameter พบว่า V_{max} เป็น 1.91 $\pm$ 0.082 k_{cat} เป็น 0.86 , K_{m} CDBN และ K_{m} GSH คือ 2.14 $\pm$ 0.218 และ 0.72 $\pm$ 0.028 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.8 คุณลักษณะทางเอนไซม์ที่ได้ระหว่างการแยกบริสุทธิ์ของ adGSTT1 clone 3

ตัวอย่าง	mOD340	Specific activity ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Total activity (μ mole/min)	%yield
adGSTT1	1188.0	1.40	4.3	25.32

ตารางที่ 3.9 Kinetic parameter ของ adGSTT1 clone 3 (adgstT1:c3)

ตัวอย่าง	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	kcat (S^{-1})	CDNB		GSH	
			Km (mM)	kcat/Km ($\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Km (mM)	kcat/Km ($\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
adgstT1:c3	1.91 ± 0.082	0.86	2.14 ± 0.218	0.403	0.72 ± 0.028	1.20

ส่วน adGSTO1 นั้นพบว่าไม่สามารถใช้สารตั้งต้นมาตรฐาน (GSH และ CDNB) ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ เนื่องจากเอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่มที่ค้นพบใหม่ จึงยังไม่ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่ได้จากแสดงออก

ตารางที่ 3.10 การเปรียบเทียบ Kinetic parameter ของเอนไซม์ GST ทั้งหมดที่แยกได้จาก *An. dirus*

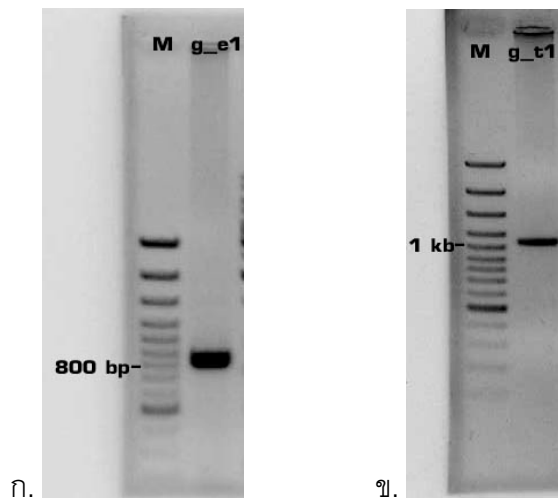
ตัวอย่าง	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	kcat (S^{-1})	CDNB		GSH	
			Km (mM)	kcat/Km ($\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Km (mM)	kcat/Km ($\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
adGSTE1	145 ± 4.23	59.9	0.048 ± 0.002	1259	6.63 ± 0.419	9.03
adGSTT1	1.91 ± 0.082	0.86	2.14 ± 0.218	0.403	0.72 ± 0.028	1.20
adGSTD5-5	167 ± 48	69	14.9 ± 4.9	5	0.21 ± 0.01	400
adGSTD1-1	12.9 ± 0.6	5.03	0.10 ± 0.03	48.4	0.86 ± 0.2	5.86
adGSTD2-2	63.9 ± 3.50	25.9	0.2 ± 0.03	121	1.30 ± 0.15	20
adGSTD3-3	67.5 ± 1.97	26.9	0.10 ± 0.01	269	0.40 ± 0.05	67
adGSTD4-4	40.3 ± 1.89	16.9	0.52 ± 0.67	32	0.83 ± 0.08	20
adGSTD6-6	2.2 ± 0.3	0.9	5.3 ± 0.8	0.2	1.8 ± 0.4	0.5

หมายเหตุ: ข้อมูลของ adGSTD1-1 ถึง adGSTD6-6 จาก Udomsinprasert, R. *et al.* 2005

การเปรียบเทียบ Kinetic parameter ของเอนไซม์ GST ทั้งหมดที่แยกได้จาก *An. dirus* (ตาราง 3.10) พบว่า adGSTE1 มี V_{max} , k_{cat} ในกลุ่มสูง และมีค่า K_m ต่ำต่อ CDNB ต่ำที่สุด แสดงว่า adGSTE1 จับกับ CDNB ได้ดีที่สุด จึงทำค่า k_{cat}/K_m มากที่สุดเช่นกัน แต่สำหรับ K_m (CDNB) ของ adGSTT1 พบว่ามีค่าสูงที่สุดแสดงว่าจับกับ CDNB ได้ไม่ดีที่สุดเช่นกัน

2.2 การแยกยีน *adgste1* และ *adgstt1* จากจีโนมของ *An. dirus* ด้วยเทคนิค PCR

จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *gste1* เดียวกับ 2.1.1 พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ *gstt1* (ไพรเมอร์เดียวกับ 2.1.1) ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.1 กิโลเบส ดังรูปที่ 3.17



รูปที่ 3.17 การทำ 1% agarose gele electrophoresis ของจีโนมที่ดีเอ็นเอ ก. ไพรเมอร์ *gste1* ข. ไพรเมอร์ *gstt1* โดยที่ M คือ GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

ผลผลิตที่ได้แยกบริสุทธิ์ออกจากเจลส่งไปอ่านลำดับเบส ลำดับเบสที่ได้จะใช้เปรียบเทียบกับบริเวณรหัสของยีนเดียวกันที่แยกได้จาก 2.1 แสดงในรูปที่ 3.18

Exon 1 = 144 bp

Genome-E1 : ATGCCGAAACCTGTGCTATACCATCCACCTGAGCCACCCCTGTCGTGCGGTGGAGTTAACGGCCCGGGCACTAGGGCTCGAGTTTGAGCATAAGATTG :100
 cDNA-E1 : ATGCCGAAACCTGTGCTATACCATCCACCTGAGCCACCCCTGTCGTGCGGTGGAGTTAACGGCCCGGGCACTAGGGCTCGAGTTTGAGCATAAGATTG :100

Genome-E1 : TGAACCTCGTGGCCGGAGAACAACTGAAGCCGGAGTTCTGTGAAGGTAGGGTGTCCGACGTGATCAGGCGGTAATTGAAAGTGTAAAGCTTGTCTGCTTG
 cDNA-E1 : TGAACCTCGTGGCCGGAGAACAACTGAAGCCGGAGTTCTGTGAAG-----

Genome-E1 : CTTGACAGCTCAACCCGAAGCATAAGGTTCCGGTGTGGATGATGATGGGACGATCATCACGGAGAGTCATGCGATCATGATCTATTGTTGCGGAAAGTA
 cDNA-E1 : -----CTCAACCCGAAGCATAAGGTTCCGGTGTGGATGATGATGGGACGATCATCACGGAGAGTCATGCGATCATGATCTATTGTTGCGGAAAGTA

Exon 2 = 201 bp

Genome-E1 : CGGCGGTGATGATGCGCTCTACCCGTGGACTTGGTCCAGCAGGCCCGTGTCAACGAGGCACTCCATTTCGAGTCCGGCGTGTGTTTGGCACGGCTGCGA
 cDNA-E1 : CGGCGGTGATGATGCGCTCTACCCGTGGACTTGGTCCAGCAGGCCCGTGTCAACGAGGCACTCCATTTCGAGTCCGGCGTGTGTTTGGCACGGCTGCGA

Genome-E1 : TTCATTACTGTGCGTAGCACCATTCTGCACTGTGTATCTCGTTCTCTGGCAGGATCTTTTCCTATTCAACAGGAGCTTGTATTTTCAAACGCAAGCC
 cDNA-E1 : TTCATTACT-----GAGCTTGTATTTTCAAACGCAAGCC

Genome-E1 : AGAAGTTCCGAAAGACCGCATCGAGCTAGTGCACGGCATAACGCTCTGCTGGAAGACTCACTG6CCGACGACTTTGTGGCCGGACCGCAGCTAACCATC
 cDNA-E1 : AGAAGTTCCGAAAGACCGCATCGAGCTAGTGCACGGCATAACGCTCTGCTGGAAGACTCACTG6CCGACGACTTTGTGGCCGGACCGCAGCTAACCATC

Exon 3 = 321 bp

Genome-E1 : GCTGACTTTAGCTGCGTCTCGACCGTAGCCTCCACGTTGGGCTTCATCACGGCAACCGCGGAGGAGTTCCGCGGATTCATGCGCTGGATCGCGCGCTTGA
 cDNA-E1 : GCTGACTTTAGCTGCGTCTCGACCGTAGCCTCCACGTTGGGCTTCATCACGGCAACCGCGGAGGAGTTCCGCGGATTCATGCGCTGGATCGCGCGCTTGA

Genome-E1 : AGCAGCTGCGCTACTACGAGGAAGCGAAGCGAGTCCGAGCGGCTGAGTTGGGTCAGCTAGTGACGAAGCAGTTGGAAGCGAATCGCCAGGCGTAA : 795
 cDNA-E1 : AGCAGCTGCGCTACTACGAGGAAGCGAAGCGAGTCCGAGCGGCTGAGTTGGGTCAGCTAGTGACGAAGCAGTTGGAAGCGAATCGCCAGGCGTAA : 795

รูปที่ 3.18 การเปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณรหัส (cDNA-E1) กับลำดับเบสจากจีโนม (Genome-E1) ของยีน *adgste1* ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc

Exon 1 = 118 bp

Genome-T1 : ATGTCGAAAATCTAAAATACTACTACGACCTGATGTCGCACCCCTCCGGGCGTTGTGEMTTTCTTGGAGAAACCAAATTCCTATGAAGGGTGTG : 100
cDNA-T1 : ATGTCGAAAATCTAAAATACTACTACGACCTGATGTCGCACCCCTCCGGGCGTTGTGEMTTTCTTGGAGAAACCAAATTCCTATGAAGGGTGTG : 100

TCGTAACCTGGCCAAAGGTAGGTTTGGCATCTAGAACGGGCTTTGTTGTGATGGGAGTTTAGGCTACCGTCCGATCTCTTTTATTACAGCCCTACT :
TCGTAACCTGGCCAAAG-----

GATACCTGTATATCTCTTTGATGTGCTCTGGATCTGCTAGGCCAGTATCCGGCGGCTCCGGCTATTCGGCCGGNC AAAACAAACCCATACCTT :

TTTCACACTTCGTACCTCAGAACATCTTGATTTGACTAGGCATAGACCTCAATGACTACGGCGAARTGATTTACGCTATTTTGTCTGAGTATAGTC :

TAAATCGAATCTCTTTCTTTCTTCGACCGAANCCTGACGGACGATTTCAAGCGGATCAACCGCTTCCAAAGGTCCCGTGCCTCGCGACACACAG :
-----COGANCCTCGACGGAGATTTCAAGCGGATCAACCGCTTCCAAAGGTCCCGTGCCTCGCGACACACAG

ATTAACTTGGCGAGAGTGTGCGATCTGCGCTACTTGTGCCCGAGTACAGGTGCCAGATCATTGCTACCCGACGACTCCGGCGAGGGGACGCG :
ATTAACTTGGCGAGAGTGTGCGATCTGCGCTACTTGTGCCCGAGTACAGGTGCCAGATCATTGCTACCCGACGACTCCGGCGAGGGGACGCG

Exon 2 = 423 bp

TAGACGAGTACCTCGAGTGGCAGCATCACACACACCGACGCGCTCCGGCGTCTACTTTCTGATCATGTGGCTCCGACCGGCTATGTTGGCGACAGGT :
TAGACGAGTACCTCGAGTGGCAGCATCACACACACCGACGCGCTCCGGCGTCTACTTTCTGATCATGTGGCTCCGACCGGCTATGTTGGCGACAGGT

CGACCCGAGCGCTCCGACCGACTACCGGTCAGATGGAGGTGTGCTCGACTTCATCGAGCGGAGTTTCTGGCCAGGCGCACCGCTTCATCTGTCGG :
CGACCCGAGCGCTCCGACCGACTACCGGTCAGATGGAGGTGTGCTCGACTTCATCGAGCGGAGTTTCTGGCCAGGCGCACCGCTTCATCTGTCGG

AACGAGATTTCCGTCGCGGATCTGGTGGCARTCTCGAATTTGACAGCCAGTANGTCAGCCCTGGCAGCAGTTTCGAGCGCGGTTGATGTGGCACTTGG :
AACGAGATTTCCGTCGCGGATCTGGTGGCARTCTCGAATTTGACAGCCAGTANGTCAGCCCTGGCAGCAGTTTCGAGCGCGGTTGATGTGGCACTTGG

Exon 3 = 149 bp

TTAAAACCCCTTTTCTTCTAGAAATGGCCGATACGATCCCTGCATGCTGCTCTATTTGACACAGTGGATGGAGCGGGTTCCGAGGAACTATTC :
-----AATGGCCGATACGATCCCTGCATGCTGCTCTATTTGACACAGTGGATGGAGCGGGTTCCGAGGAACTATTC

CGTTCTACGATCAGGCTCAGAGTTCTGTGACAACTTGCACAGGACTCGATCGCRAAGAACAAATTGTA : 1071
CGCTCTACGATCAGGCTCAGAGTTCTGTGACAACTTGCACAGGACTCGATCGCRAAGAACAAATTGTA : 1071

รูปที่ 3.19 การเปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณรหัส (cDNA-T1) กับลำดับเบสจากจีโนม (Genome-T1) ของ ยีน *adgste1* ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc

จากนั้นนำบริเวณจุดตัด (5'splice site และ 3'splice site) ว่าสอดคล้องกับลำดับพ้อง (consensus sequence) ดังตารางที่ 3.11 ซึ่งแสดงว่าบริเวณดังกล่าวควรทำหน้าที่เป็นจุดตัดได้จริง

ตารางที่ 3.11 การเปรียบเทียบบริเวณจุดตัดกับลำดับพ้องของจุดตัด

Gene	Exon composition Consensus	5'splice site (exon/intron) AG/GTRAGT	3' splice site (intron/exon) Y _N NYAG/NN
<i>adgste1</i>	exon 1.....exon 2 exon 2.....exon 3	AG/GTAGGG CT/GTGGCT	TGACAG/CT CAACAG/GA
<i>adgstt1</i>	exon 1.....exon 2 exon 2.....exon 3	AG/GTAGGT CA/GTAAGT	CTGCAG/CC TTCTAG/AA

จากการเปรียบเทียบเห็นได้ว่ายีน *adgste1* และ *adgstt1* ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน

ตารางที่ 3.12 การเปรียบเทียบขนาดของเอกซอนและอินทรอนของยีน *gste1* จากยุง *An. dirus* (*adgste1*) และยุง *An. gambiae* (*aggste1*) และ *gstt1* จากยุง *An. dirus* (*adgstt1*) และยุง *An. gambiae* (*aggstt1*)

Gene	Exon 1 (bp)	Intron 1 (bp)	Exon 2 (bp)	Intron 2 (bp)	Exon 3 (bp)
<i>adgste1</i> (795 bp)	144	64	210	77	321
<i>aggste1</i> (816 bp)	144	64	201	65	321
<i>adgstt1</i> (1071 bp)	118	311	423	70	149
<i>aggstt1</i> (862 bp)	118	95	423	77	149

จากตารางที่ 3.12 แสดงการอนุรักษ์ของขนาดเอกซอน ยกเว้นในเอกซอน 2 ของยีน *adgste1* ที่มีขนาดเมื่อแปลรหัสสั้นกว่า *aggste1* 3 กรดอะมิโน ซึ่งความแตกต่างนี้อาจทำให้มีคุณลักษณะทางเอนไซม์แตกต่างกันได้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. จากการแยกยีน *gst* ใหม่ด้วยการคัดเลือกจาก Genomic library พบว่าได้โคลนของยีน *adgst1-5* ที่ใช้เป็นโพรบ จำนวน 2 โคลน คือ โคลน 3.3 และ 3.6 เหลือโคลนที่น่าสนใจ 3 โคลนได้แก่ โคลน 3.1, 3.4 และ 3.7 เนื่องจากค่าใช้จ่ายและเวลามากและวิธีนี้มีแนวโน้มจะได้โคลนเดิม และในปี 2546 ได้มีรายงานลำดับเบสของจีโนมของยุงพาหะมาลาเรียของอาฟริกาว่าน่าจะมียีน *gst* 28 ยีนจึงเลือกใช้ข้อมูลนี้และหยุดแยกยีนด้วยวิธีการนี้

2. จากลำดับเบสยีน *gst* ของยุงพาหะมาลาเรียของอาฟริกา (*An. gambiae*) ใช้ในการออกแบบดีเอ็นเอไพรเมอร์ของยีน *gst* 7 ยีน ได้แก่ *gst epsilon1 (gste1)*, *epsilon5 (gste5)*, *epsilon6 (gste6)*, *epsilon 7 (gste7; gst3-8)*, *theta1 (gstt1)*, *theta2 (gstt2)* และ *omega1 (gstt1)* โดยไพรเมอร์ออกแบบจากบริเวณรหัสของยีนเท่านั้นและได้ใส่บริเวณจดจำของเอนไซม์ *NdeI* เพื่อใช้ในการโคลนใส่ดีเอ็นเอพาหะ pET 3a (expression vector) และใช้ในการทำ RT-PCR พบว่าสามารถแยกยีนได้ 3 ยีน คือ *Anopheles dirus* glutathione S-transferase epsilon class sequence 1 (*adgste1*), *Anopheles dirus* glutathione S-transferase omega class sequence 1 (*adgstt1*) และ *Anopheles dirus* glutathione S-transferase theta class sequence 1 (*adgstt1*)

3. ยีน *adgste1* แยกได้ 2 โคลน คือ *adgste1* wild type (WT) และ *adgste1* R139H ที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันเพียงตำแหน่งเดียวจากอาร์จินีนตำแหน่ง 139 เป็นฮิสทีดีน เมื่อชักนำให้แสดงออกและแยก

บริสุทธิ์ด้วย GSTrap column (GSH column) พบว่ามี substrate specificity ต่อ CDNB และ EA แตกต่างกัน โดยที่ adGSTE1 WT ค่า K_m ต่อ CDNB และ GSH มีค่าต่ำกว่า adGSTE1 R139H แสดงว่า adGSTE1 WT สามารถจับกับ CDNB และ GSH ได้ดีกว่า adGSTE1 R139H ส่วนค่าอื่นๆ นั้นใกล้เคียงกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบ adGSTE1 WT กับเอนไซม์เดียวกันจากยุง *An. gambiae* (agGSTE1) พบว่าไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้เนื่องจากการโคลนที่ตำแหน่งแตกต่างกัน แต่อย่างไรคุณลักษณะทางเอนไซม์ adGSTE1 น่าจะถูกต้องมากกว่าของ agGSTE1 ที่มี T7-tag ทางปลายอะมิโน ซึ่งการแสดงออกของยีนนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับความต้องการสารฆ่าแมลงดังที่พบในยุง *An. gambiae* จึงน่าจะศึกษาระดับการแสดงออกของยีนนี้ในยุงที่ต้านทานและไม่ต้านทาน หรือศึกษาบริเวณ promoter ว่ามีการควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างไร

4. ยีน *adgstt1* สามารถแยกได้ 4 โคลนที่แตกต่างกัน ไม่สามารถแยกบริสุทธิ์ด้วย GST column ได้ แต่สามารถแยกบริสุทธิ์เพียง adGSTT1 โคลนที่ 3 ได้จาก HITRAP[®] SP XL column (cationic exchanger) และ HITRAP[®] PHENYL SEPHAROSE column (hydrophobic chromatography) และสามารถวิเคราะห์ค่า Kinetic parameter ได้ ซึ่งเป็นการรายงานค่าครั้งแรกของยีนนี้จากยุง *Anopheles* ดังนั้นควรพัฒนาการแยกบริสุทธิ์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เพื่อการวิเคราะห์คุณลักษณะทางเอนไซม์ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน

5. ยีน *adgstt1* ที่เป็นยีนกลุ่มใหม่ สามารถชักนำให้แสดงออกซึ่งพบว่าแสดงออกได้ดีที่สุด แต่เนื่องจากไม่สามารถวิเคราะห์ enzyme activity ด้วยการเชื่อม CDBN กับ GSH ที่เป็นวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์เอนไซม์ GST ได้จึงไม่สามารถแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ adGSTO1 ได้ จึงควรวิเคราะห์หาสารตั้งต้นที่เหมาะสมกับเอนไซม์กลุ่มนี้ก่อน เนื่องจากยังไม่มีรายงานคุณลักษณะทางเอนไซม์ในแมลงมาก่อน ซึ่งอาจจะได้ความสามารถทำลายความเป็นพิษต่อสารฆ่าแมลงที่ยังไม่เคยรายงานมาก่อนโดย GSTs

6. จากการศึกษาโครงสร้างของยีน *adgstt1* และยีน *adgstt1* พบว่ามี 2 เอกซอน และ 1 อินทรอนจากบริเวณรหัส ซึ่งลักษณะโครงสร้างของยีนทั้งสองนี้อุบัติในยุง *An. dirus* และ *An. gambiae* แสดงว่ายีนทั้งสองน่าจะมีหน้าที่ที่สำคัญจึงอนุรักษ์ไว้ในวิวัฒนาการ

เอกสารอ้างอิง

<http://203.157.44.67/insect/menu/yunghkonplong.php>

Hayes J.D., and Pulford D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. CRC Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 30, 445-600.

Pemble S.E., Wardle A.F., and Taylor J.B. (1996). Glutathione S-transferase class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondria GST and identification of a human homologue. Biochem. J. 319, 749-754

Board P., Baker R.T., Chelvanayagam G., and Jermini L.S. (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. Biochem. J. 328, 929-935.

- Fournier D., Bride J.-M., Poirié M., Bergé J.-B., and Plapp F.W. (1992). Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticide. J. Biol. Chem. 267, 1840-1845.
- Toung Y.-P.S., Hsieh T.-S., and Tu C.-P.D. (1990). *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione S-transferase III. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 31-35.
- Board P., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermini L.S., Schulte G.K., Danley D.E., Gabel C.A., Geoghegan K.F., and Pandit J. (2000). Identification, Characterization, and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases. J. Biol. Chem. 275, 24798-24806.
- Mannervik B., Awasthi Y.C., Board P.G., Hayes J.D., Di Ilio C., Ketterer B., Listowsky I., Morgenstern R., Muramatsu M., Pearson W.R., Pickett C.B., Sato K., Widwersten H., and Wolf C.R. (1992). Nomenclature for human glutathione transferase. Biochem. J. 282, 305-306.
- Prapanthadara L., Hemingway J., and Ketterman A.J. (1993). Partial purification and characterization of glutathione S-transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. Pest. Biochem. Physiol. 47, 119-133.
- Kostaropoulos I., Papadopoulos A.I., Metaxakis A., Boukouvala E., and Papadopoulou-Mourkidou E. (2001). Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 313-9.
- Vontas J. G., Small G. J., and Hemingway J. (2001). Glutathione S-transferase as antioxidant defence agent confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugen*. Biochem. J. 357, 65-72.
- Ding Y., Ortelli F., Rossiter L.C., Hemingway J., Ranson H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family : annotation, phylogeny and expression profiles. BMC Genomics. 4, 1-16
- Ranson H., Rossiter L., Ortelli F., Jensen B., Wang X., Roth C.W., Collins F.H., and Hemingway J. (2001). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochem J. 359, 295-304.
- Ortelli F., Rossiter L.C., Vontas J., Hemingway J. 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochem.J.373 ; 957-963.

- Ding Y., Hawkes N., Meredith J., Eggleston P., Hemingway J., Ranson H. (2005). Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. *Biochem J.* 2005 May 1;387(Pt 3):879-88.
- Pongjaroenkit S., Jirajaroenrat K., Boonchaay C., Chanama U., Leetachewa S., Prapanthadara L. and Kettermann A.J. (2001) Genomic organization and putative promoters of highly conserved glutathione S-transferases originating by alternative splicing in *Anopheles dirus*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 75-85.
- Jirajoenrat K., Pongjaroenkit S., Krittanai C., Prapanthadara L., Kettermann A J. (2001). Heterologous expression and characterization of alternatively spliced glutathione S – transferase from a single *Anopheles* gene. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 31; 867-875.
- Udomsinprasert R. and Kettermann A.J. (2002). Expression and Characterization of a Novel class of Glutathione S-transferase from *Anopheles dirus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 32(4):425-33.
- Udomsinprasert R., Pongjaroenkit S., Wongsantichon J., Oakley A.J., Prapanthadara L.A., Wilce M.C., Kettermann A.J. (2005). Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochem J.* Feb 17; [Epub ahead of print]

Output ที่ได้จากโครงการ

1. Saengtong Pongjaroenkit, La-aied Prapanthadara and Albert J. Kettermann. 2004. The conservation of glutathione S-transferase genes in two malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles dirus*. p 108. ใน 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference on Genomics and Health in the 21st Century. November 22-26, 2004. The Imperial Queen's Park Hotel Bangkok, Thailand.
2. แสงทอง พงษ์เจริญกิต จุฑารัตน์ ลิดจันทร์ และ ละเอียด ประพันธ์ดารา. 2548. การแยกยีนกลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรสกลุ่มโอเมกาจากยุงพาหะมาลาเรียของไทย เพื่อแสดงออกใน *E. coli*. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6 19 – 20 พฤษภาคม 2548 ณ ศูนย์การศึกษานานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. หน้า 347-355.
3. Saengtong Pongjaroenkit, La-aied Prapanthadara, Juthamart Piromjitpong and Albert J. Kettermann. The isolation and characterization of Epsilon class glutathione S-transferase from *Anopheles dirus*. In preparation.

การแยกยีนกลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรสกลุ่มโอเมกาจากยุงพาหะมาลาเรีย
ของไทย เพื่อแสดงออกใน *E. coli*

ISOLATION OF NEW OMEGA CLASS GLUTATHIONE S-TRANSFERASE
GENE FROM THAI MALARIA VECTOR FOR EXPRESSION IN *E. coli*.

จุฑารัตน์ ลิดจันทร์¹ แสงทอง พงษ์เจริญกิต¹ และ ละเอียด ประพันธ์ธรา²

บทคัดย่อ

บริเวณรหัสของยีนกลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรส (*gst*) กลุ่มโอเมกาแยกสกัดได้จากเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยเอนไซม์ Superscript III เอนไซม์ HotStarTaq และไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *gst* กลุ่มเดียวกันซึ่งรายงานใน GenBank จากการอ่านลำดับเบสผลผลิต RT-PCR พบว่าเป็นบริเวณรหัสของยีน *gst* จึงโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะ (pET3a) จากนั้นคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยเทคนิค Rapid size screening และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วอ่านลำดับเบสดีเอ็นเอสายผสม จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากโคลนที่ได้ พบว่าเหมือนกับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรส กลุ่มโอเมกาจากยุงพาหะนำโรคมาลาเรียของอาฟริกา (*aggsto1*) ถึง 93 เปอเซ็นต์ และเหมือนเอนไซม์กลุ่มเดียวกันในสิ่งมีชีวิตอื่น มากกว่า 30 เปอเซ็นต์ จึงตั้งชื่อยีนที่แยกได้ว่า *Anopheles dirus* glutathione S- transferase class Omega sequence 1 (*adgsto1*) เมื่อชักนำให้แสดงออกด้วยสาร isopropyl – B -D thiogalactopyranoside พบโปรตีนขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตันตามที่คาดเดา ซึ่งเอนไซม์ที่แสดงออกจะใช้ในการศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์ต่อไปว่าสามารถทำลายความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงชนิดใด

Abstract

The coding region of omega class glutathione S – transferase gene was isolated by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using Superscript III, HotStarTaq and omega class primers. The RT – PCR product was cloned into expression vector (pET3a). The recombinant clones were screened by rapid size screening and restriction enzyme digestions, which were sequenced. The comparison of deduced amino acid sequence of recombinant clone showed 93% identity to *aggsto1* and more than 30% identity to glutathione S – transferase class omega from other organisms. Then recombinant clone was named *Anopheles dirus* glutathione S- transferase class Omega sequence 1 (*adgsto1*).

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย เชียงใหม่ 50290

² สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

The expression of *adgsto1* showed the presence of 28 kDa band 3 hr after induction with isopropyl-B-D thiogalactopyranoside. The recombinant protein will be further characterized for insecticide specificity.

คำนำ

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อร้ายแรงชนิดหนึ่งที่เกิดจากเชื้อปรสิตสกุล *Plasmodium* 4 ชนิดได้แก่ *falciparum*, *vivax*, *ovale* และ *malaria* โดยปรสิต *Plasmodium* มียุงก้นปล่องเป็นพาหะในการแพร่เชื้อ องค์การอนามัยโลกได้รายงานว่า ทุกปีประชากรโลกจำนวน 400 ล้านคน จะล้มป่วยเป็นไข้และมีอาการหนาวสั่นด้วยโรคมาลาเรีย และ 2 ล้านคน จะเสียชีวิตด้วยโรคนี้ (ที่มา <http://203.157.44.67/insect/menu/yunghkonplong.php>) ดังนั้นการป้องกันกำจัดยุงก้นปล่องจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคมาลาเรีย ซึ่งในอดีตจะทำการกำจัดแหล่งน้ำขังและใช้สารฆ่าแมลง แต่การใช้สารฆ่าแมลงชนิดเดียวกันเป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้ยุงเกิดความต้านทานสารฆ่าแมลงชนิดนั้น ๆ ขึ้น ซึ่งกลไกการต้านทานสารฆ่าแมลงของแมลงมีหลายกลไกแต่ที่สำคัญ คือ กลไกที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (Glutathione S- transferases; GSTs) (Enayati AA. *et. al.* 2005)

เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในทุกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและมีหลายกลุ่มด้วยกัน นิยมจำแนกจากความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน หากมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เอนไซม์นี้มีหน้าที่สำคัญในการปกป้องเซลล์จากสารพิษหรือสารอันตรายที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายภายในเซลล์ เอนไซม์นี้สามารถทำลายความเป็นพิษของสารฆ่าแมลง ประเภทออร์แกนอโฟสเฟต หรือไพรีทรอยด์ (VONTAS J. *et al.* 2001 และ Ortelli F. *et al.* 2003) ด้วยการเชื่อมสารพิษกับกลูตาไธโอนที่เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ทำให้ผลผลิตจากการเชื่อมละลายน้ำได้ดีหรือสลายตัวออกจากร่างกายต่อไป มีการศึกษาใน *gst* ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะในแมลง เพราะสามารถนำไปสู่ความเข้าใจและการแก้ไขการต้านทานสารฆ่าแมลง (แสงทอง, 2547) ที่ผ่านมามีการรายงานลำดับเบสของยีน *gst* กลุ่มโอเมกา ในยุงพาหะมาลาเรียของแอฟริกา (*Anopheles gambiae*; *An. gambiae*) แต่ยังไม่มีการศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์ (Ding Y. *et. al.*, 2003) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงโคลนยีน *gst* กลุ่มโอเมกาจากยุงพาหะมาลาเรียของไทย (*Anopheles dirus*; *An. dirus*) เพื่อใช้ในการศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์กลุ่มนี้ว่าจะสามารถทำลายความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงชนิดใดได้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมยีน *gst* โดยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

สกัด Total RNA จากยุงก้นปล่องของไทยโดยใช้สาร TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen) ทำการถอดรหัสย้อนกลับจากเส้น mRNA (RT) เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ SuperScript[™] III RNaseH⁻ Reverse Transcriptase และ oligo(dT) primer (Invitrogen) โดยใช้ Total RNA ที่สกัดได้ เป็นแม่แบบ จากนั้น

สังเคราะห์ยีน *gst* โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยเอนไซม์ HotStarTaq (QIAGEN) และไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *gst* กลุ่มเดียวกันซึ่งรายงานใน GenBank คือ

aggst O1F (5'CAGTTCCATATGAGCAACGGAAAGCATCT 3') และ

aggst O1R (5'CACCTCCCATATGTTACGCCAAGATATCGTAGT3')

ลำดับเบสตัวหนา คือ start และ stop codon ส่วนลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณจดจำ ของเอนไซม์ *Nde* I (NEB Biolab)

โดยอุณหภูมิที่ใช้คือ เริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (denaturation) และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (annealing) ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (extension) จาก denaturation annealing และ extension เป็น 1 รอบ แล้วเริ่มรอบต่อไปซ้ำ อีก 34 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นเก็บปฏิกิริยาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการทำ RT-PCR ด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis ดูภาพดีเอ็นเอด้วยการย้อมด้วย ethidium bromide แล้วส่องภายใต้แสง UV จากนั้นแยกบริสุทธิ์และส่งผลผลิตที่ได้จากการทำ RT-PCR ไปอ่านลำดับเบส

2. การโคลนและการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม

เตรียมยีน *gst* ที่ต้องการด้วยการแยกบริสุทธิ์จากเจลด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดเก็บไว้สกัดและตัดดีเอ็นเอพาหะ pET3a ด้วยเอนไซม์ *Nde*I แล้วดึงหมู่ฟอสเฟตออกด้วยเอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline phosphatase (NEB Biolab) เพื่อป้องกันการกลับมาเชื่อมต่อกันเองของดีเอ็นเอพาหะแล้วแยก บริสุทธิ์จากเจลเช่นเดียวกับยีน *gst*

เมื่อได้ยีน *gst* และดีเอ็นเอพาหะ pET3a ทำการเชื่อมยีนและดีเอ็นเอพาหะด้วย T4 DNA ligase (NEB Biolab) จากนั้นถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการเชื่อมเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ด้วยการทำให้ Transformation แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้นบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (100 มิลลิกรัม/ลิตร; มก./ล.) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม โดยอาศัยการคัดเลือกรูปร่าง (Rapid size screening) ด้วยการทำให้ 1% agarose gel electrophoresis ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอสายผสมจะมีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอพาหะและจะเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอพาหะ นำโคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกรูปร่างมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (NEB BioLab) และ *Kpn*I (NEB BioLab) ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสผลผลิต RT-PCR แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยการทำให้ 1% agarose gel electrophoresis

3. อ่านลำดับเบสของโคลนที่ได้

อ่านลำดับเบสด้วยการใช้ T7 promoter sequencing primer และ T7 terminator sequencing primer ผลจากการอ่าน 2 ทิศทางที่ได้จะใช้ในการประกอบเป็นลำดับเบสของยีนทั้งชิ้น

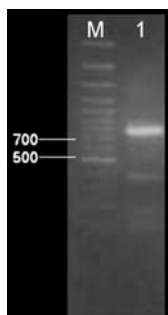
4. การแสดงออกของยีนที่โคลนได้

ถ่ายฝากพลาสมิดที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2 ใน *E. coli* BL21pLysS ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับการแสดงออกของยีนเป็นโปรตีนด้วยการทำ Transformation คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (100 มก./ล.) และคลอแรมฟินิคอล (34 มก./ล.) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน นำโคโลนีที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (100 มก./ล.) และคลอแรมฟินิคอล (34 มก./ล.) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) โดยใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 1% ของอาหารเหลว LB ใหม่ 50 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (100 มก./ล.) และคลอแรมฟินิคอล (34 มก./ล.) เลี้ยงเซลล์บนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 เติมนสาร isopropyl-B-D thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิโมลาร์/ลิตร เพื่อชักนำการแสดงออก จากนั้นเก็บเซลล์ที่เวลา 0 และ 3 ชั่วโมงหลังการชักนำ เก็บเซลล์ที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทำ Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ต่อไป

ผลการทดลอง

1. การเตรียมชิ้นยีน *gst* โดย เทคนิค RT-PCR

จากการทำ 1% agarose gel electrophoresis พบว่าได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบส ดังรูปที่ 1

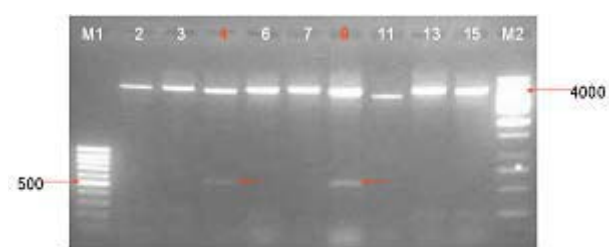


รูปที่ 1 การทำ 1% agarose gel electrophoresis โดย M คือ 100 คู่เบส Molecular weight marker (Generuler™ 100 bp DNA ladder Plus; Fermentas) ส่วน 1 คือ ผลผลิตจาก RT – PCR

จากนั้นแยกบริสุทธิ์ส่งไปอ่านลำดับเบส เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลใน GenBank ซึ่งพบว่าเหมือนยีน *gst* กลุ่มโอเมกาของยุงพาหะมาลาเรียอาฟริกา (*Anopheles gambiae* *gst* class omega ; *aggsto1*) ถึง 87% (520 ใน 597) จึงตั้งชื่อว่า *Anopheles dirus* glutathione S- transferase class Omega sequence 1 (*adgst01*)

2. การโคลนและการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม

เมื่อเชื่อมต่อยีนที่ตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* เข้ากับ pET3a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และผ่านการดิงหมูฟอสเฟตออกจากปลาย 5' (phosphorylation) แล้วถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ได้โคลนที่เกิดขึ้นทั้งหมด 11 โคลน จากนั้นทำการคัดเลือกจากขนาดของพลาสมิด จากการคัดเลือกจะได้โคลนที่มียีน *gst* จำนวน 5 โคลน คือ โคลนที่ 3 โคลนที่ 4 โคลนที่ 6 โคลนที่ 7 และโคลนที่ 9 จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมแบบถูกทิศทางด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ *KpnI* หากถูกทิศทางจะได้ชิ้นขนาดประมาณ 500 คู่เบส แต่ถ้าหากผิดทิศทางจะได้ชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 200 คู่เบส วิเคราะห์ผลการตัดพลาสมิดสายผสมจำนวน 5 โคลนด้วย 1% agarose gel electrophoresis จะได้ดังรูปที่ 2 พบว่าโคลนที่ยีน *gst* แทรกแบบถูกทิศทางได้แก่ โคลนที่ 4 และ โคลนที่ 9



รูปที่ 2 การทำ 1% agarose gel electrophoresis ดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย *BamHI* และ *KpnI* ช่อง M1 คือ 100 คู่เบส DNA ladder (Generuler™ 100 bp DNA ladder; Fermentas) M2 คือ 1 กิโลเบส DNA ladder (Generuler™ 1kb DNA ladder; Fermentas) ช่อง 1-9 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของโคลนที่ 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 13 และ 15 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ *KpnI* ตามลำดับ

3. อ่านลำดับเบสของโคลนที่ได้

นำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโคลนที่ 4 โคลนที่ 7 และ โคลนที่ 9 ส่งไปอ่านลำดับเบส นำลำดับเบสที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกัน ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสพบว่าโคลน 4 และ 9 มีลำดับเบสเหมือนกันจึงเลือกใช้โคลนที่ 9 เป็นตัวแทน เมื่อเปรียบเทียบกับ *aggsto1* พบว่าเหมือนถึง 87 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 3 จากนั้นแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนโดยโปรแกรม Bioedit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *gst* ของ *aggsto1* ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc พบว่ามีความเหมือน 93 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4 และ ตารางที่ 1) เมื่อคำนวณมวลโมเลกุลของโปรตีนที่แปลรหัสได้โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์พบว่ามีความยาว 28.8 กิโลดาลตัน

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ GST กลุ่มโอเมกาจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ พบว่านอกจากเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรสจากยุงก้นปล่องไทยเหมือนยุงก้นปล่องแอฟริกาแล้วยังมีความเหมือนและความคล้ายกับเอนไซม์กลุ่มเดียวกันส่วนใหญ่มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จึงควรจัดกลุ่มเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรสจากยุงก้นปล่องอยู่ในกลุ่มโอเมกาตามหลักการการแบ่งกลุ่มตามความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ที่ควรมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์

```

adgst01 : ATGAGCAACGGAAGCATCTCCGCAAAAGGCTCCACACTGCCCGTTTGGCCACACGATGGTAAGCTGCGCCTCTACTCGATGCGTTCTGCGCCGTACGCTCAGCGCCTT : 109
agGST01 : ATGAGCAACGGAAGCATCTCCGCAAAAGGCTCCACACTGCCCGTTTGGCCACACGATGGTAAGCTGCGCCTCTACTCGATGCGTTCTGCGCCGTACGCTCAGCGCCTT : 109

adgst01 : ATCTGATGCTGGACGCAAGAAAGATCCCTTACCACGCGATCTACATCAATCTGTCCGAAGAGCCGAATGGTACTTCGAGAAAGAACCCGCTCGGCAAGGTACCGGCACT :
agGST01 : ATCTGATGCTGGACGCGAAGAAAGATCCCTTACCACGCGATCTACATCAATCTGTCCGAAGAGCCGAATGGTACTTCGAGAAAGAACCCGCTCGGCAAGGTACCGGCACT :

adgst01 : GCGAGATCCCCGCAAGGAAGGCGTCACGCTGTACGAGTCTGTTGCTGTCTGCGACTACATCAGAGGAGCGCCTCTGCGCCAGCAGCGCAAGCTCTACCCGCGCGACCC :
agGST01 : GCGAGATCCCCGCAAGGAAGGCGTCACGCTGTACGAGTCTGTTGCTGTCTGCGACTACATCAGAGGAGCGCCTCTCTGCGCCAGCAGCGCAAGCTCTACCCGCGCGACCC :

adgst01 : TTCCAGAAAGGCGCAAGATCCGATCCTGATCGAAGCTTTAAATGGTGGCTCATCTCTGCGCTACTACGCGATTTCTATTCTCGAGCGAGGCGCATTCGCGCGCGCATTA :
agGST01 : TTCCAGAAAGGCGCAAGATCCGATCCTGATCGAAGCTTTAAATGGTGGCTCATCTCTGCGCTACTACGCGATTTCTATTCTCGAGCGAGGCGCATTCGCGCGCGCATTA :

adgst01 : CCGAGTTCCGAGCGCGATTAGACATCTTCGAGAAAGGAGCTGAAAGGAGCGCGCGCGAGCCCTACTTCGCGCGCGCAAGAGCCCGGATGATCGACTACATGATCTGCGCGCTG :
agGST01 : CCGAGTTCCGAGCGCGCGATTAGACATCTTCGAGAAAGGAGCTGAAAGGAGCGCGCGCGAGCCCTACTTCGCGCGCGCAAGAGCCCGGATGATCGACTACATGATCTGCGCGCTG :

adgst01 : GTGTGAGCGCGGTGATCTGCTCAAGTTCCGCTCTGCGCGCAAGTACGAGCTGAGCAAGGAGCGGTTCTGCGCGCTGCTTCACTGAGAGAGCTGATGAGAAAGGATGAC :
agGST01 : GTGTGAGCGCGGTGATCTGCTCAAGTTCCGCTCTGCGCGCAAGTACGAGCTGAGCAAGGAGCGGTTCTGCGCGCTGCTTCACTGAGAGAGCTGATGAGAAAGGATGAC :

adgst01 : CCGCTCAAGCATCTGTTCAATTCCACCGAAGACACAGAGTTCTCTGCAAGCGCGCAAGAACGCGCAAAACAACACTACGATATCTTGGCGTAA : 747
agGST01 : CCGCTCAAGCATCTGTTCAATTCCACCGAAGACACAGAGTTCTCTGCAAGCGCGCAAGAACGCGCAAAACAACACTACGATATCTTGGCGTAA : 747

```

รูปที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *adgst01* กับยีน *aggst01* เบสที่ไม่มีสีแสดงว่าแตกต่าง

```

adgst01 : MSNGKHLAKGSTPPVLPNDGKLRLYSMRFCPYAQRVHMLDAAKIPYHAIYINLSEKPEWYFEKNPLGKVPALFIPGKEGVTL : 83
aggst01 : MSNGKHLAKGSSPPSLPDDGKLRLYSMRFCPYAQRVHMLDAAKIPYHAIYINLSEKPEWYLEKNPLGKVPALFIPGKEGVTL :

adgst01 : YESLVLSDYIEEAHSAQQRKLYPADPFSKAQDRILIERFNGAVISPYRILFSSEGIPPGAITEFGAGLDIFEKELKERATPY :
aggst01 : YESLVLSDYIEEAHSAQQRKLYPADPFSKAQDRILIERFAGSVIGPYRILFAADGIPPGAITEFGAGLDIFEKELKARGTPY :

adgst01 : FGGDKPGMIDYMIWPWCERVDLLKFALGDKYELDKERFGKLLQWRDLMEKDDAVKQSFISTEDHTKFLQSRKNGENNYDILA : 247
aggst01 : FGGDKPGMIDYMIWPWCERVDLLKFALGDKYELDKERFGKLLQWRELMEKDDAVKQSFISTEDHTKFLQSRKNGENNYDILA :

```

รูปที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง *adgst01* กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *aggst01* กรดอะมิโนที่ไม่มีสีแสดงว่าแตกต่าง

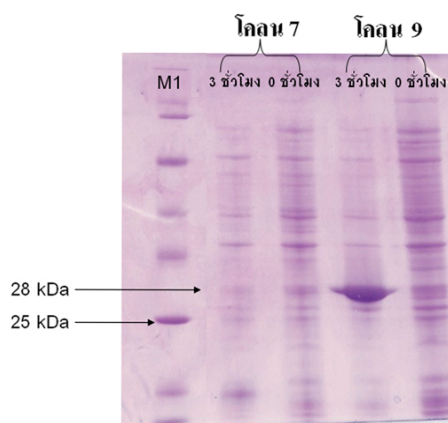
ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรสกลุ่มโอเมก้า จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ

		ยุงก้นปล่อง แอฟริกา	ยุงก้นปล่อง ไทย	หนูบ้าน	หนูออร์แกนี	หมู	คน	แบคทีเรีย
ยุงก้นปล่อง แอฟริกา	% เหมือน		93	32	34	36	36	20
	% คล้าย		97	54	54	52	55	37
ยุงก้นปล่อง ไทย	% เหมือน			32	33	35	35	19
	% คล้าย			54	55	53	55	37
หนูบ้าน	% เหมือน				82	70	72	21
	% คล้าย				91	82	85	41
หนูออร์แกนี	% เหมือน					77	77	22
	% คล้าย					86	90	40
หมู	% เหมือน						81	23
	% คล้าย						90	41
คน	% เหมือน							22
	% คล้าย							41

5. การแสดงออกของยีนที่โคลนได้

ถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสม *adgst01* (โคลนที่ 9) และโคลนที่เข้าผิดทิศทาง (โคลนที่ 7) เพื่อใช้เป็น ตัวควบคุม ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21pLysS เพื่อชักนำให้แสดงออกด้วย IPTG เก็บเซลล์ที่ 0 และ 3 ชั่วโมงหลังการชักนำ เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์โปรตีนที่ได้ด้วยการทำ SDS-PAGE ดังรูปที่ 5 พบว่ามีการ

แสดงออกของโปรตีนในชั่วโมงที่ 3 ของโคลนที่ 9 ที่ยีนแทรกแบบถูกทิศทาง เมื่อคำนวณจากเจลด้วยโปรแกรม QualityOne (BioRad) พบว่าขนาดของโปรตีนที่ได้ใกล้เคียงกับที่คาดไว้คือประมาณ 28 กิโลดาลตัน และในโคลนที่ยีนแทรกแบบผิดทิศทาง (โคลนที่ 7) ไม่พบแถบโปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตัน แสดงให้เห็นว่าแถบโปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตันที่ได้จากโคลนที่ 9 เป็น โปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *adgsto1*



รูปที่ 5 แสดงการทำ 12% SDS PAGE โดย M1 คือ Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) 3 ชั่วโมง และ 0 ชั่วโมง คือ โปรตีนที่แสดงออก ณ ชั่วโมงที่ 3 และ 0 โคลนที่ 7 และโคลนที่ 9 หลังจากการชักนำการแสดงออกด้วย IPTG ตามลำดับ

สรุป และ วิ จ า ร ณ์ ผล การ ทด ล อ ง

การแยกยีนกลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรส (*gst*) กลุ่มโอเมกาโดยเทคนิค RT – PCR จากยุงก้นปล่องพาหะมาลาเรียของไทย โดยเอนไซม์ Superscript III เอนไซม์ HotStarTaq และไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *gst* กลุ่มเดียวกัน แล้วโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะ (pET3a) เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสได้โคลนดีเอ็นเอสายผสมแบบเดียว เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลได้กับข้อมูลยีนต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ปรากฏว่าเหมือน *gst* กลุ่มโอเมกาของยุงพาหะมาลาเรียอาฟริกา (*aggsto1*) 87 เปอร์เซ็นต์ และ 93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเหมือนกับเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรส กลุ่มโอเมกาในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ จึงตั้งชื่อยีนที่แยกได้ว่า *Anopheles dirus* glutathione S- transferase class Omega sequence 1 (*adgsto1*) จากการคำนวณมวลโมเลกุลจากลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป พบว่าโปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *adgsto1* ควรมีขนาด 28.8 กิโลดาลตัน จาก SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน ตามที่คาดหมายไว้ โดยเอนไซม์ที่แสดงออกจะใช้ในการศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์ต่อไปว่าสามารถทำลายความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงชนิดใด เนื่องจากเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรส แต่ละกลุ่มจะมีสารตั้งต้น (substrate) ที่จำเพาะต่อกลุ่มนั้น ๆ เนื่องจากเอนไซม์กลุ่มโอเมกาไม่สามารถวัดคุณลักษณะทางปฏิกิริยาด้วยสารตั้งต้นมาตรฐาน (CDNB และ GSH) ของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรส ได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรส กลุ่มโอเมกาอาจสามารถทำลายความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงที่ยังไม่เคยรายงานมาก่อนโดยเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส – ทรานเฟอเรส

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ และ
ขอขอบคุณ Associate Professor Albert Ketterman ที่เอื้อเฟื้อค่าใช้จ่ายในการอ่านลำดับเบส

บรรณานุกรม

- กลุ่มโรคติดต่อนำโดยแมลง สำนักงานควบคุมโรคที่ 1 กรุงเทพฯ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
ม.ป.ป.“ยุงก้นปล่อง” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://203.157.44.67/insect/menu/yunghkonplong.php> (12 มีนาคม 2548).
- แสงทอง พงษ์เจริญกิต.2547.การแยกสกัดยีนกลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรสจากจีโนมของยุงพาหะนำ
โรคมาลาเรียในประเทศไทย.แม่โจ้ปริทัศน์. 3(6) ; 68-72.
- Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. BMC Genomics. 4:35.
- Enayati AA., Ranson H., and Hemingway J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Insect Mol Biol. 14(1); 3-8.
- John G. Vontas, Graham J. SMALL and Janet HEMINGWAY. 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. Biochem. J. 357; 65-72.
- Ortelli F., Rossiter LC., Vontas J., Ranson H., and Hemingway J. 2003. Heterologous expression of four glutathione S-transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochem J. 373; 957-963.

- [illegible]