

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

1. ขุดโครงการวิจัย : แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. โครงการวิจัย : การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การดัดแปลงพันธุกรรมของ ยีน YAP1 ในยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมักเอทานอล
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Genetic Manipulation of YAP1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* to Improve Ethanol Fermentation.
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : นายพงศกร สรรค์วิทยากุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน : นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ผู้ร่วมวิจัย
: นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

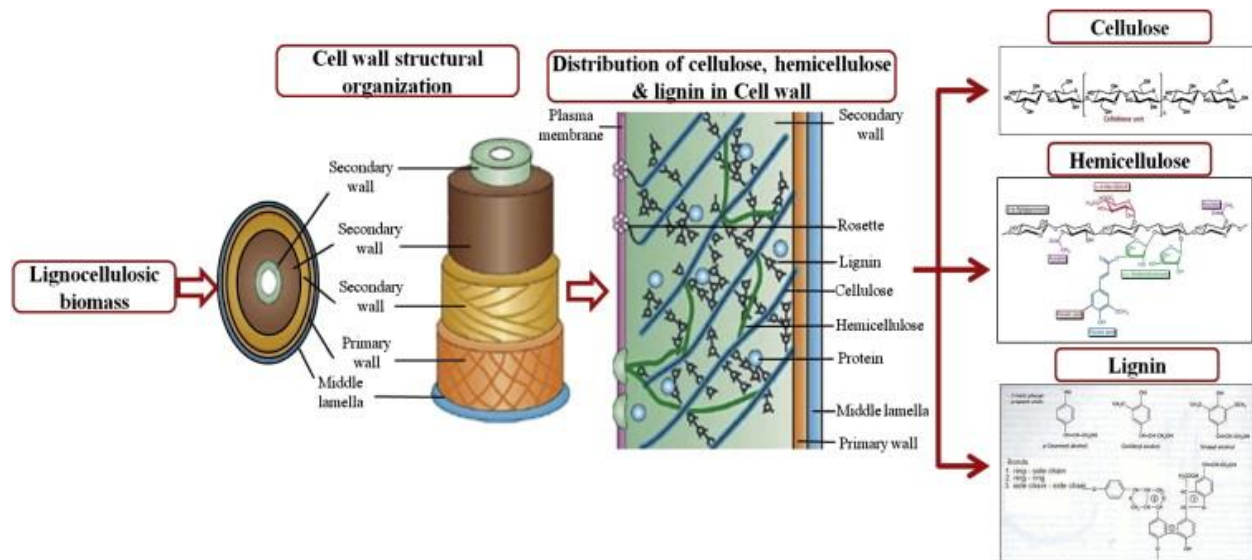
5. บทคัดย่อ

กระบวนการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรจำพวก Lignocellulose โดยใช้ Enzyme อุณหภูมิสูง และกรดเข้มข้นสามารถก่อให้เกิดกรดน้ำตาลและสารต่างๆที่ยับยั้งการเจริญเติบโตและขัดขวางกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนในการผลิตพลังงานชีวมวลจากวัสดุทางการเกษตรเหล่านี้มีมูลค่าสูง การทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน *yap1* ซึ่งเป็นยีนที่มีส่วนสำคัญในการกำจัดสารพิษของยีสต์เข้าสู่จีโนมของยีสต์ และได้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและเร็วกว่ายีสต์ WT นอกจากนี้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้สามารถทนทานต่อสารปฏิชีวนะ Cycloheximide ได้ถึงความเข้มข้น 2 µg/ml และทนทานต่อสารมีพิษ HMF ได้ถึงความเข้มข้นสูงกว่า 30 g/L ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนกระบวนการกลั่นเอทานอล การทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ Over expression vector สำหรับ Cellulase Enzymes พร้อมใช้เพื่อถ่ายเข้าสู่ยีสต์ในการนำไปใช้ย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้

6. คำนำ

วัสดุทางการเกษตรจำพวก Lignocellulose ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกของเซลล์พืช (Primary cell wall) เช่น เศษไม้ เศษฟาง แกล ประกอบด้วย Lignin, Hemicellulose และ Cellulose โดย Hemicellulose เป็นสายโพลิเมอร์แบบผสม (Heterogeneous polymers) ของน้ำตาล pentose, C₅ (xylose, arabinose) hexose, C₆ (mannose, glucose, galactose) และ กรดน้ำตาล (sugar acid) เช่น กรดกลูโคนิก (gluconic acid), กรด D-กลูควิโรนิก (D-glucuronic acid) เป็นต้น ทั้งนี้ Hemicellulose จะแตกต่างจาก

Cellulose ซึ่งเป็นสายโพลิเมอร์ของน้ำตาล D-glucose เชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์ $\beta(1\rightarrow4)$ หรือ Glycosidic bond ในไม้เนื้อแข็งจะประกอบด้วย Hemicellulose ที่มี Xylan เป็นส่วนประกอบหลัก ในส่วนของ ไม้เนื้ออ่อน Hemicellulose จะประกอบด้วย Glucomannans เป็นส่วนประกอบหลัก (J.D. McMillan 1993) ในพืชหลายชนิดส่วนประกอบของ Xylan ประกอบไปด้วยโพลิเมอร์สายผสม (Heteropolysaccharide) เชื่อมกันด้วย พันธะโควาเลนต์ 1,4-linked β -D-xylopyranose นอกจาก xylose ใน xylan อาจมี arabininose กรดกลูโคนิก (gluconic acid) กรด acetic กรด ferulic กรด p-coumaric เป็นส่วนประกอบอีกด้วย ทั้งนี้ความซับซ้อนและส่วนประกอบของ xylan ขึ้นอยู่กับที่มาของ xylan (G.O. Aspinal 1980)



ภาพที่ 1 แสดงองค์ประกอบของ Lignocellulose (V. Menon et al. 2012)

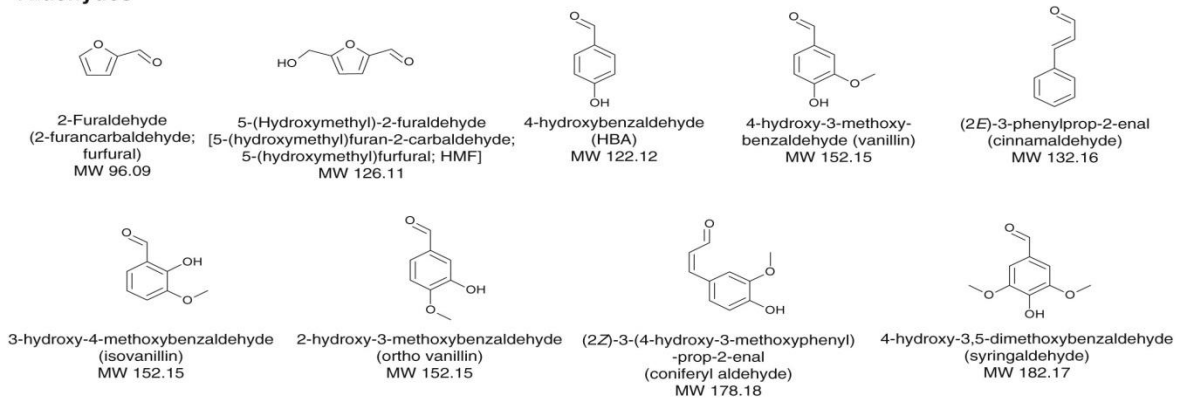
กระบวนการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรจำพวก Lignocellulose โดยใช้ Enzyme อุณหภูมิสูง และกรดเข้มข้น สามารถก่อให้เกิดตรงควัตถุและสารต่างๆที่ยับยั้งการเจริญเติบโตและขัดขวางกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนในการผลิต พลังงานชีวมวลจากวัสดุทางการเกษตรเหล่านี้มีมูลค่าสูง นอกจากนี้กระบวนการกำจัดสารพิษเหล่านี้ทั้งด้วยวิธีทางกายภาพ เคมี เป็นกระบวนการที่มีต้นทุนสูงเกินไป (Liu and Blaschek 2010)

ตัวยับยั้งที่เกิดจากกระบวนการย่อยเบื้องต้นประกอบไปด้วย สารจำพวก Aldehyde, ketone, phenols และกรดออลแกนนิค ตัวอย่างเช่น 5-(hydroxymethyl)-2-fural (HMF), vanillin และ cinnamaldehyde ส่งผลกระทบบ่อยยีสต์ระดับยีน (Fig. 1) (Liu and Moon 2009)

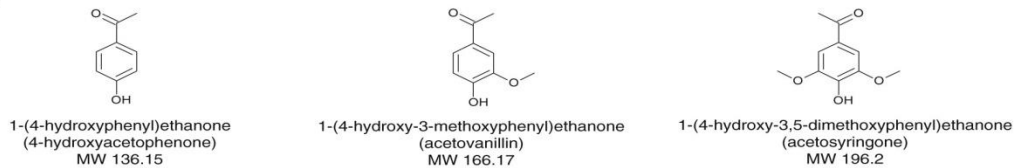
ตัวยับยั้ง Fufaral-HMF complex มีผลทำให้ Glycolysis และ Pentose phosphate pathway ไม่สามารถทำงานได้ โดยยีนใน pathway เหล่านี้ ถูกยับยั้งไว้เกือบทั้งหมด โดย ยีน PFK1, PFK2, PYK2 และ CDC19 ถูกยับยั้งรวมถึง Glucose phosphorylation และนี่อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ Glycolysis หยุดทำงาน (Liu et al. 2009)

ยีนส่วนใหญ่ที่ถูกยับยั้งโดย HMF และ furfural นั้นเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ไบโอบีโอม กรดอะมิโน โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบเมตาบอลิซึมต่างๆ การสังเคราะห์ RNA ระบบขนส่งภายในเซลล์ โปรตีนในไมโทคอนเดรียและอื่นๆ (Ma and Liu 2010) ในจำนวนยีนที่ถูกยับยั้งนั้น ยีนอย่างน้อย 5 ตัวที่มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการควบคุมระบบเซลล์ คือ ยีน ARG80, ARG81, GCN4, RAP1 และ FHL1 สำหรับยีนอื่นๆ ตัวอย่างเช่น ARG1, ARG3, ARG4, ARG5, ARG6, ARG7 และ ARG8 มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ arginine ถูกยับยั้งโดย HMF ยีนเหล่านี้ถูกควบคุมโดยยีน ARG81 และ GCN4 ซึ่ง HMF สามารถยับยั้งการทำงานของยีนเหล่านี้ได้เช่นกัน (De Rijcke et al. 1992; Natarajan et al. 2001; Ma and Liu 2010) นอกจากนี้ยีน GCN4 เป็นยีนที่ควบคุมยีนอื่นๆอีกมากมายซึ่งเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ กรดอะมิโน เช่น Histidine, leucine, lysine เป็นต้น (Natarajan et al. 2001; Ma and Liu 2010)

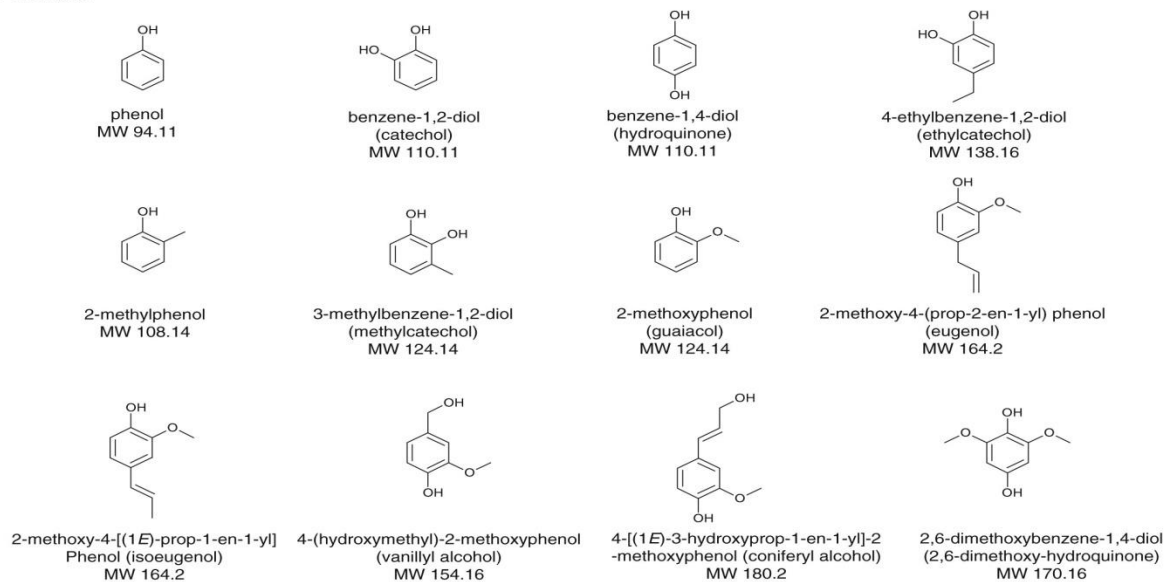
Aldehydes



Ketones



Phenols



Organic Acids

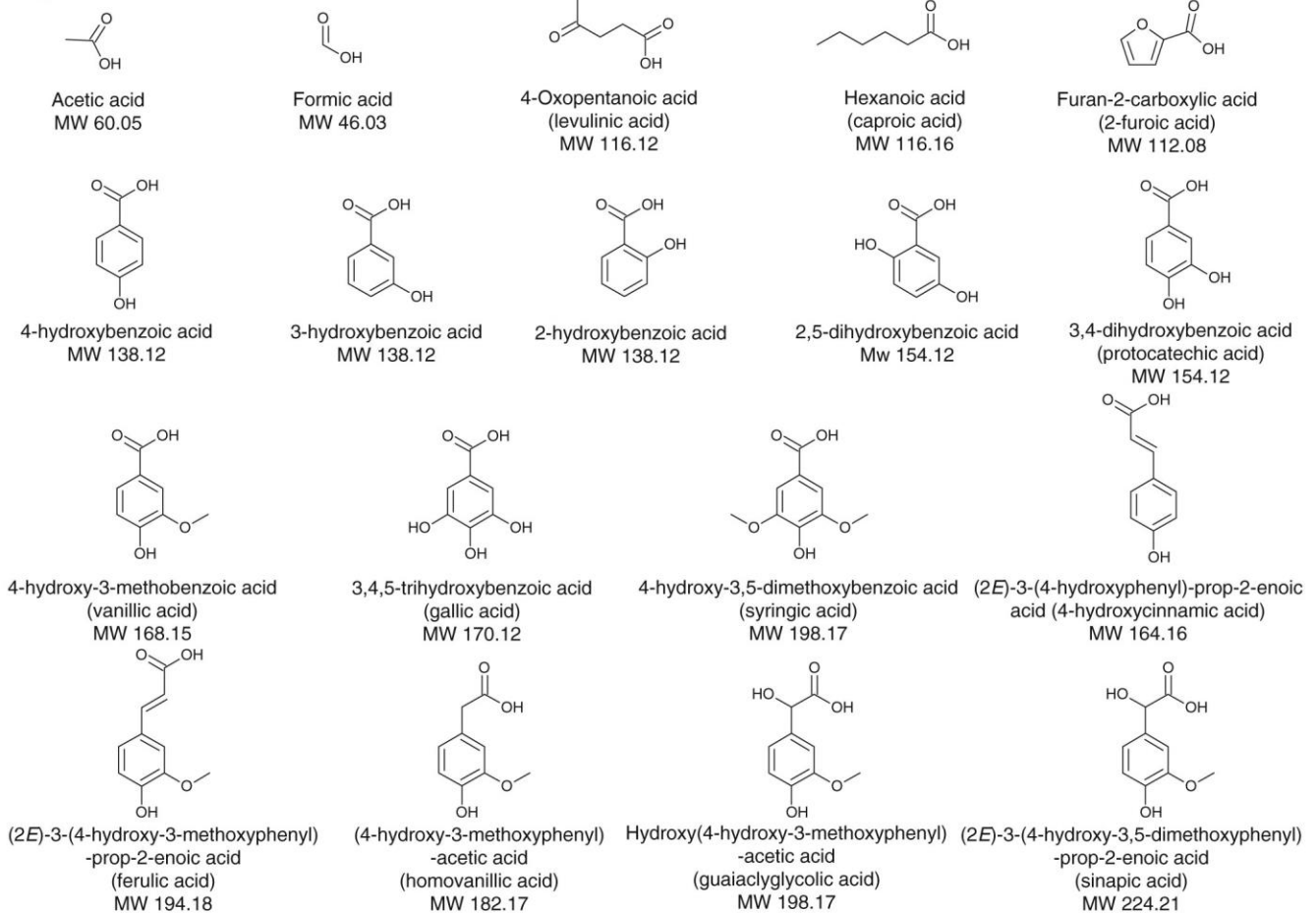


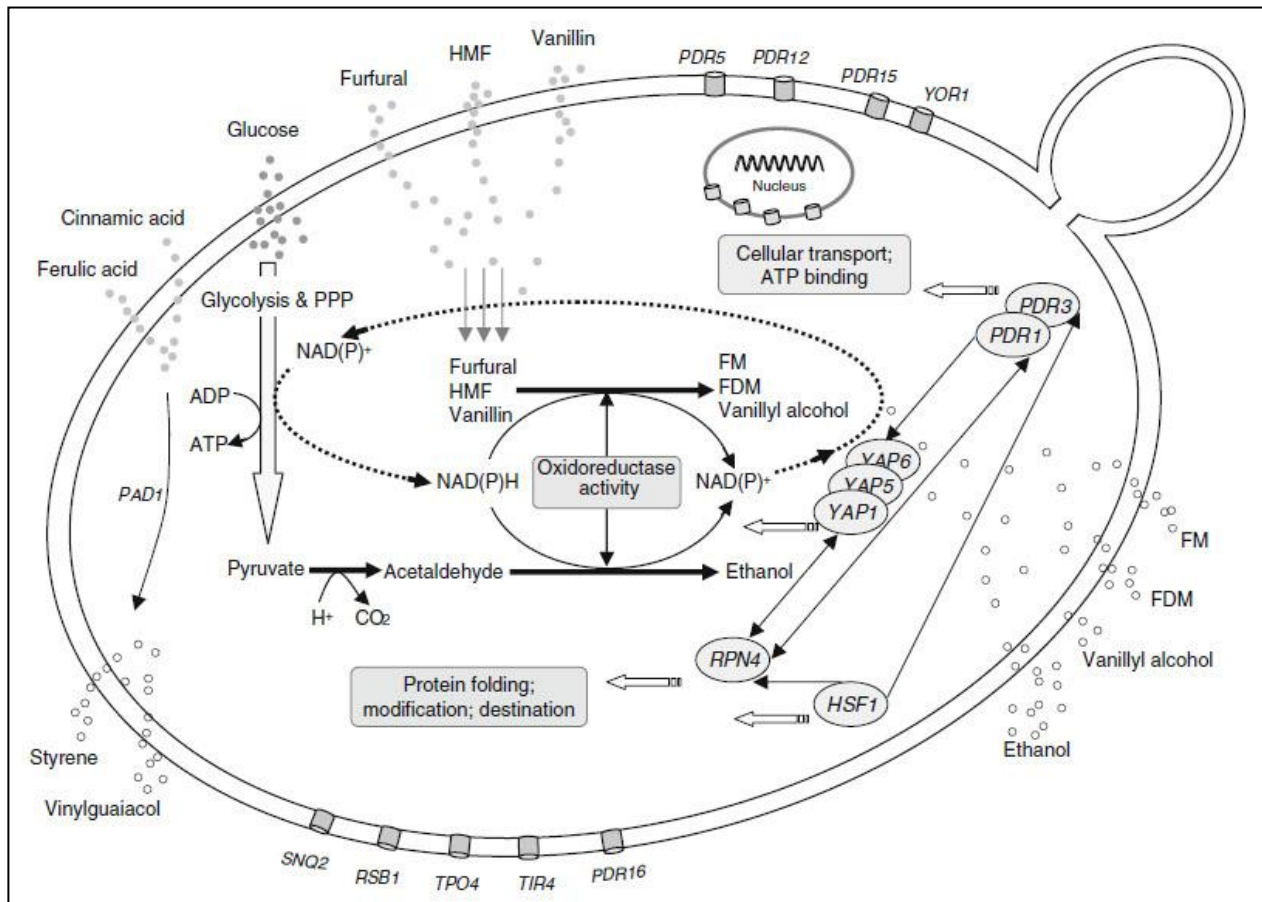
Fig. 1 (continued)

ภาพที่ 2 โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ HMF

เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการค้นพบยีนจำนวน 365 ตัวที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้อง ในการปรับตัวและต้านทาน HMF ของยีสต์ (Ma and Liu 2010) อย่างไรก็ตามส่วนประกอบสามส่วน มีปัจจัยสำคัญบางอย่างร่วมกัน คือ ประการที่หนึ่ง ยีนหลายตัว อาทิ ARI1, ADH6, ADH7 และ OYE3 รวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องในส่วนของกร่อยสลายสารพิษภายในเซลล์ เป็นกำลังหลักในการกำจัด HMF และลดความเสียหายที่เกิดจาก ตัวยับยั้งชนิดนี้

โปรตีน Activator ในยีสต์ สังเคราะห์โดยกลุ่มยีน YAP ประกอบไปด้วย transcription factor 8 ชนิด และ โปรตีน b-ZIP ที่ DNA binding domain (Rodrigues-Pousada et al. 2010) Transcription factor โปรตีน Yap1 เป็นตัวควบคุมหลัก ในส่วนของ Oxidative Stress โดยทำหน้าที่ตรวจจับโมเลกุล Oxidative และกระตุ้น การทำงานของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ anti-oxidant โดยโปรตีน Yap1 นี้จะ recognize แถบ element YRE หรือ 5'-TKACTMA-3' บริเวณโพรโมเตอร์ (Harbison et al. 2004; Fernandes et al. 1997; Dubacq et al. 2006) เมื่อมี HMF ยีน YAP1 จะแสดงออกเป็นสองถึงสามเท่าระหว่างระยะปรับตัว (lag phase) ของยีสต์ (Ma et Liu 2010) มียีนที่ถูกกระตุ้นโดย HMF ทั้งหมด 41 ยีน ซึ่งประกอบด้วย YRE element

ใน promoter ยีนอีกจำนวนมากได้รับการค้นพบว่าถูกควบคุมโดยตรงโดย ยีน YAP1 หรือโดยทางอ้อม โดยยีน YAP5,6 (Fig.2) ยีนส่วนใหญ่ที่ถูกควบคุมโดยยีน YAP1 อยู่ในกลุ่มยีนที่ควบคุม redox metabolism, สังเคราะห์กรดอะมิโน, ตอบสนองต่อสิ่งเร้า, ซ่อมแซม DNA และอื่นๆ เช่น ยีนที่สังเคราะห์โปรตีนจำพวก Oxidoreductase ADH7, GRE2 และ OYE3 ทั้งสามยีนนี้ควบคุมโดยยีน YAP1 (Lee et al.2002;Haugen et al. 2004; Dubacq et al 2006; Ma and Liu 2010) ยีน ARI1 ซึ่งสังเคราะห์ เอนไซม์จำพวก Aldehyde reductase ถูกควบคุมโดยโปรตีน Yap6 ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน YAP1 อีกที (Harbison et al. 2004; Liu and Moon 2009; Ma and Liu 2010) ยีน ADH7 และ GRE2 ซึ่งเป็น ยีนที่ย่อยสลาย HMF โดยสังเคราะห์เอนไซม์จำพวก Ructase ถูกควบคุมโดย โปรตีน Yap5 และ Yap6 ซึ่งมี ยีนYAP1 เป็นตัวควบคุมหรือ Regulon (Harbison et al.2004; workman et al. 2006; Ma and Liu 2010)



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงถึงโปรตีนควบคุมที่สำคัญต่างๆ ในกระบวนการปรับตัวต่อสารยับยั้งและสารพิษ อันเกิดจากขั้นตอนการย่อยสลาย Lignocellulose ในยีสต์

มีรายงานว่าหาก ทำการ Knock down ยีน YAP เพียงหนึ่งยีน ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติหาก ไม่มีการเติมสาร HMF แต่ใน ยีสต์ *Δyap1*, *Δyap4*, *Δyap5* และ *Δyap6* เจริญเติบโตช้ากว่าปกติหากมีการ เติมสาร HMF เข้มข้น 15mM (Ma and Liu 2010) ยีสต์ *Δyap1* มี Lag phase ประมาณ 4 วัน และไม่สามารถ ทนทานต่อสาร coniferyl aldehyde ได้ (Sundstrom et al.2010)

หลักฐานต่างๆเหล่านี้สนับสนุนว่ายีน YAP มีความสำคัญต่อการปรับตัวและทนทานต่อสาร HMF โดยเฉพาะยีน YAP1 ซึ่งเป็น regulon หรือตัวควบคุมของยีนที่เกี่ยวข้องอื่นๆในกระบวนการ Reductase เพื่อย่อย สลายสารพิษ และสารยับยั้งจำพวก Aldehyde เช่น furfural, HMF และ coniferyl aldehyde นี่จึงเป็นแนวทาง หนึ่งที่สำคัญต่อการตัดต่อพันธุกรรมยีสต์เพื่อให้ทนทานมากขึ้น และผลิตเอทานอลได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

อย่างไรก็ตามยีสต์ยังไม่สามารถทำหน้าที่ได้เต็มที่เพราะยีสต์ปกติไม่สามารถย่อยเซลลูโลสเป็นเอทานอลได้ ทั้งนี้ การตัดต่อพันธุกรรมยีสต์โดยดัดแปลงเป็น Surface-engineered recombinant protein กับ Enzyme ซึ่ง อยู่ในกระบวนการย่อย cellulose ต่างๆสามารถทำให้ยีสต์สามารถย่อย cellulose ได้ (Waraporn A. et al. 2011)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันการสร้าง heterologous proteins บนผิวหน้าเซลล์จุลินทรีย์ ได้ถูก นำไปใช้อย่างแพร่หลายในการทดลองทางจุลชีววิทยา ทั้งใน bacteriophage แบคทีเรีย และยีสต์ (D.J. Chiswell et al. 1992, G. Georgiou et al 1993, O. Miki et al. 2013) ระบบต่างๆที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อผลิต ทั้งสาย polypeptides

ไบโอคาตาไลต์ Whole-cell adsorbents และ แม้แต่วัคซีนรักษาโรค การสังเคราะห์โปรตีนหรือ enzyme บน พื้นผิวเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้ทำประโยชน์ได้อย่างมากมายเพราะยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ นิยมใช้ในอุตสาหกรรมทั้งการสังเคราะห์โปรตีนและสารเคมี ทั้งนี้ enzyme-coated yeast cells สามารถใช้เป็น whole-cell biocatalysts เพราะ โปรตีนซึ่งแสดงออกบริเวณพื้นผิวของเซลล์เชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์กับ Glucan ในผนังเซลล์ของยีสต์ซึ่งเป็นส่วนช่วยให้โปรตีนมีความเสถียรและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมของเซลล์ (M. Toshiyuki et al. 1993)

มีความเป็นไปได้ในการดัดแปรพันธุกรรมยีสต์เพื่อใช้ในการย่อยสลาย Cellulose และ Lignocellulose มีรายงานว่า ยีสต์ซึ่งมีการดัดแปลงพื้นผิวของเซลล์สามารถเปลี่ยน Amorphous cellulose เป็นเอทานอลได้ (F. Yasuya et al. 2013) โปรตีน Esterase ซึ่งเป็น carboxylesterase ในแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สามารถแสดงออกได้บนผนังเซลล์ยีสต์และสามารถทำให้ยีสต์เจริญเติบโตบน Carbon source คือ glycerol triacetate (Triacetin) ได้ (B. Frank et al. 2006) นอกจากนี้ยีสต์ที่ดัดแปลงพื้นผิวเซลล์ยังสามารถใช้ย่อยแป้ง มันสัมปะหลังได้อีกด้วย โดยดัดแปรพันธุกรรมให้ยีสต์แสดงออกเอนไซม์ amylases cellulases และ β -glucosidase (Waraporn A. et al. 2011)

การนำ Enzyme ซึ่งสามารถย่อย Lignocellulose มาใช้ในการตัดแปลงพันธุกรรมเซลล์ยีสต์จะช่วยให้ยีสต์มีความสามารถในการย่อยสลาย วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งเป็น Biomass และมีส่วนผสมของ Lignocellulose เป็นส่วนใหญ่ได้ซึ่งจะเป็นงานวิจัยในการทดลองนี้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุียีสต์ด้วยยีน YAP1

7. วิธีดำเนินการ

วิธีการ

การโคลน Cassette และ การตรวจสอบความถูกต้องของ Vector และ Cassette

นำเวกเตอร์ pUC57 ซึ่งมี Cassette ที่ออกแบบไว้อยู่ภายใน Transform เข้าสู่ E-coli สายพันธุ์ DH5 α โดยเตรียม Competent Cell ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ (ดัดแปลงจาก Chung, C. T. *et al.* 1989)

1. Streak เชื้อ E-Coli DH5 α บนอาหาร LB บ่มไว้ในตู้ 37°C 1 คืน
2. นำ Single colony ไปเลี้ยงต่อในอาหาร LB เหลวปริมาณ 2 – 5 ml บ่มไว้ในตู้ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 rpm 1 คืน
3. ดูดเซลล์ที่บ่มไว้ 1 คืน ปริมาตร 250 μ l ผสมในอาหารเหลว LB 25 ml ใน sterile 250 ml flask บ่มไว้ในตู้ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 rpm จนกระทั่งได้ความเข้มข้น 0.5 ที่ OD600 (ประมาณ 2 – 3 ชม.) ทั้งนี้ต้องตรวจค่า OD ถี่ขึ้นหลังจากค่า OD เกิน 0.2 เพื่อป้องกันการ Overgrowth
4. เมื่อเซลล์ที่เลี้ยงไว้มีความเข้มข้นประมาณ 0.5 ที่ OD600 ให้นำ Flask แช่น้ำแข็งไว้ 20 นาที จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C
5. เทส่วนใสทิ้งและผสมตะกอนเซลล์กับ TSS solution (แช่เย็น) เมื่อผสมเสร็จ Competent cell ที่ได้พร้อมที่จะใช้ Transform ได้ทันที
6. แบ่งเซลล์ออกเป็น 100 μ l แยกใส่หลอด 1.5 ml สามารถเก็บไว้ที่ 4°C ได้ 6 ชั่วโมง โดยไม่เสียประสิทธิภาพใน competency และเก็บที่ -80°C สำหรับเก็บระยะยาว

หมายเหตุ : TSS solution

- 85% LB medium
- 10% PEG (wt/vol, MW 8000)
- 5% DMSO (vol/vol)
- 50 mM MgCl₂ (pH6.5)

การ Transform cell E-coli

1. เติม DNA 1 μl (ความเข้มข้น 200 ng/ μl) ผสมกับ Competent cell 100 μl (ซึ่งแช่เย็นไว้และต้องอยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา)
2. แช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าให้เข้ากันเป็นครั้งคราว
3. Heat shock ที่ 42°C เป็นเวลา 2 นาที
4. หลังจาก Heat shock ให้แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที
5. เติมอาหาร LB เหลวปริมาณ 800 μl
6. บ่มไว้ในตู้ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 rpm เป็นเวลา 1 ชม.
7. Spread ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ที่ปริมาตร 50 μl 100 μl และ 200 μl
8. บ่มไว้ในตู้ 37°C 1 คืน
9. ตรวจสอบ Transformants

PCR reaction ผสม Master mix เพื่อใช้ทดสอบ Colony PCR

5x Taq buffer(Go-Taq DNA polymerase)	2 μl
dNTP (2 mM)	2 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2.4 μl
Forward primer (20 μM)	0.2 μl
Reverse primer (20 μM)	0.2 μl
Taq DNA polymerase	0.2 μl
Water	13 μl
รวม	20 μl

โปรแกรมในการทำ PCR ตาม Primer PGK_F2 และ YAP1_R ดังนี้

95°C	5 นาที	} 30 Cycles
94°C	30 วินาที	
55°C	30 วินาที	
72°C	45 วินาที	
72°C	7 นาที	
4°C	∞	

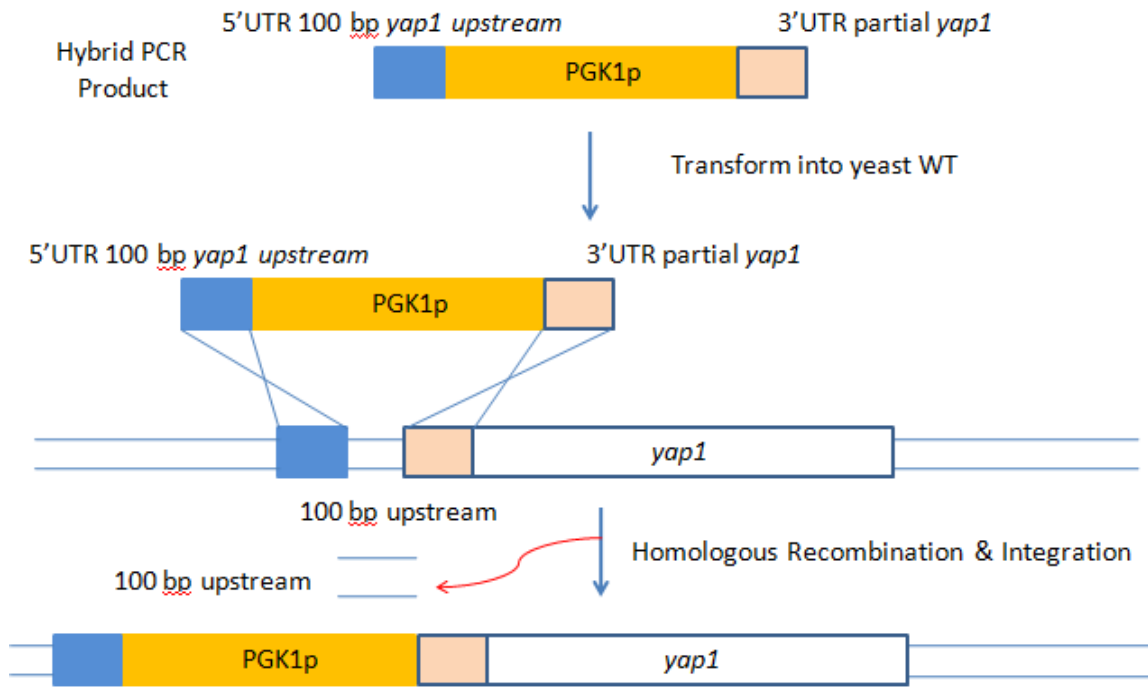
8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลการทดลอง

การศึกษาข้อมูลยีน *yap1* โดยวิธี Bioinformatic เพื่อสังเคราะห์ Transformation cassette

สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน *yap1* ของยีสต์จากฐานข้อมูล GenBank พบข้อมูล Accession No. NC 001145.3 ใน *Saccharomyces cerevisiae* chromosome คู่ที่ 13 (253848..255800) มีขนาด 1,962 bp จำนวน 1 Copy บนจีโนมของยีสต์ และสืบค้นข้อมูลโปรโมเตอร์ PGK1 ซึ่งเป็น Over-expression โปรโมเตอร์ในยีสต์ (Akada R *et al.* 2002) สามารถเร่งกระบวนการสังเคราะห์ mRNA เพื่อผลิตโปรตีนในยีสต์ได้ พบข้อมูล Accession No. FJ415226 *Saccharomyces cerevisiae* 3-phosphoglycerate kinase (PGK1) gene, promoter region และ Cloning and expression vector Accession No. KF366479 นำข้อมูลสายรหัสพันธุกรรม ของยีน *yap1* และ โปรโมเตอร์ PGK1 มาตัดต่อเพื่อออกแบบ Transformation cassette ที่จะใช้ในการถ่ายเข้าสู่ยีสต์เพื่อตัดแปลงพันธุกรรมตามหลัก Homologous recombination (ภาพที่ 4)

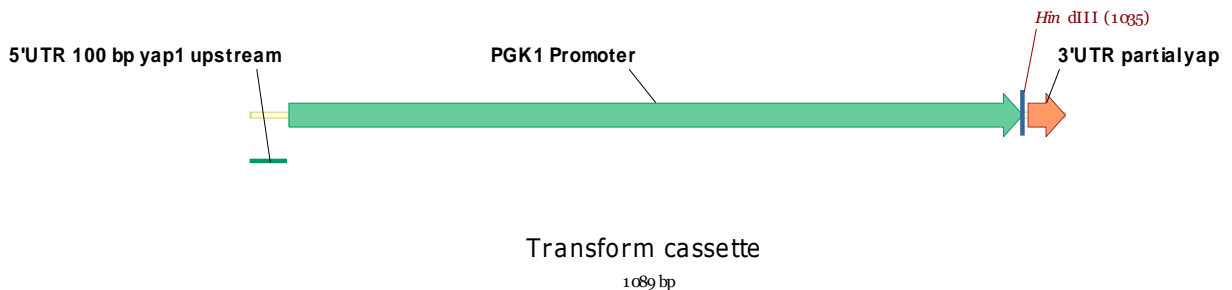
Using Homologous Recombination to replace original promoter



ภาพที่ 4 จำลองกระบวนการ Integration ของ Transform cassette สู่จีโนมยีสต์

การออกแบบ Transformation cassette

ดำเนินการออกแบบ Transformation cassette โดยออกแบบจากข้อมูลจีโนมยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) Chromosome: XIII; NC_001145.3 (253848..255800) โดยกำหนดบริเวณที่ต้องการให้โปรโมเตอร์ PGK1 เข้าแทนที่ที่ 100 bp *yap1* upstream และ คัดลอกอีก 50 bp 5'UTR 100 bp *yap1* upstream นำมาต่อที่ 5'UTR PGK1 โปรโมเตอร์ ในส่วนของ 3'UTR PGK1 ออกแบบโดยเติม Restriction enzyme site HindIII แล้วตามด้วยส่วนของยีน *yap1* 50 bp (ภาพที่ 5)

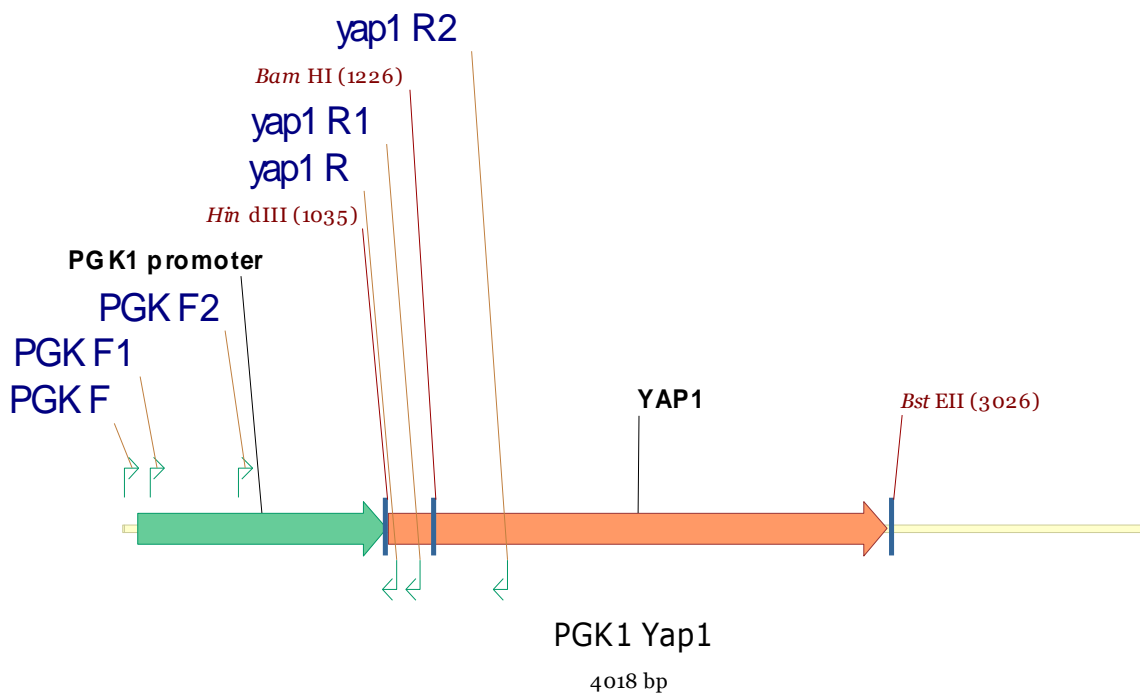


ภาพที่ 5 แสดงแผนภาพ Transform cassette ที่ออกแบบ

ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบ Transformation cassette และยีน *yap1* โดย Forward ไพรเมอร์ PGK_F มี Binding site อยู่ในบริเวณ 5'UTR 100 bp *yap1* นอกโปรโมเตอร์ PGK1 ใช้ตรวจสอบตำแหน่งของยีน cassette บนจีโนมของยีสต์ในกรณีที่มีการ transform Cassette เข้าสู่ Yeast แล้ว PGK_F1 และ PGK_F2 มี Binding site อยู่ในบริเวณ โปรโมเตอร์ PGK1 ใช้ตรวจสอบตำแหน่งของโปรโมเตอร์ PGK1 Reverse ไพรเมอร์ YAP1_R, YAP1_R1, YAP1_R2 ใช้ตรวจสอบยีน *yap1* (ตารางที่ 1, ภาพที่ 6)

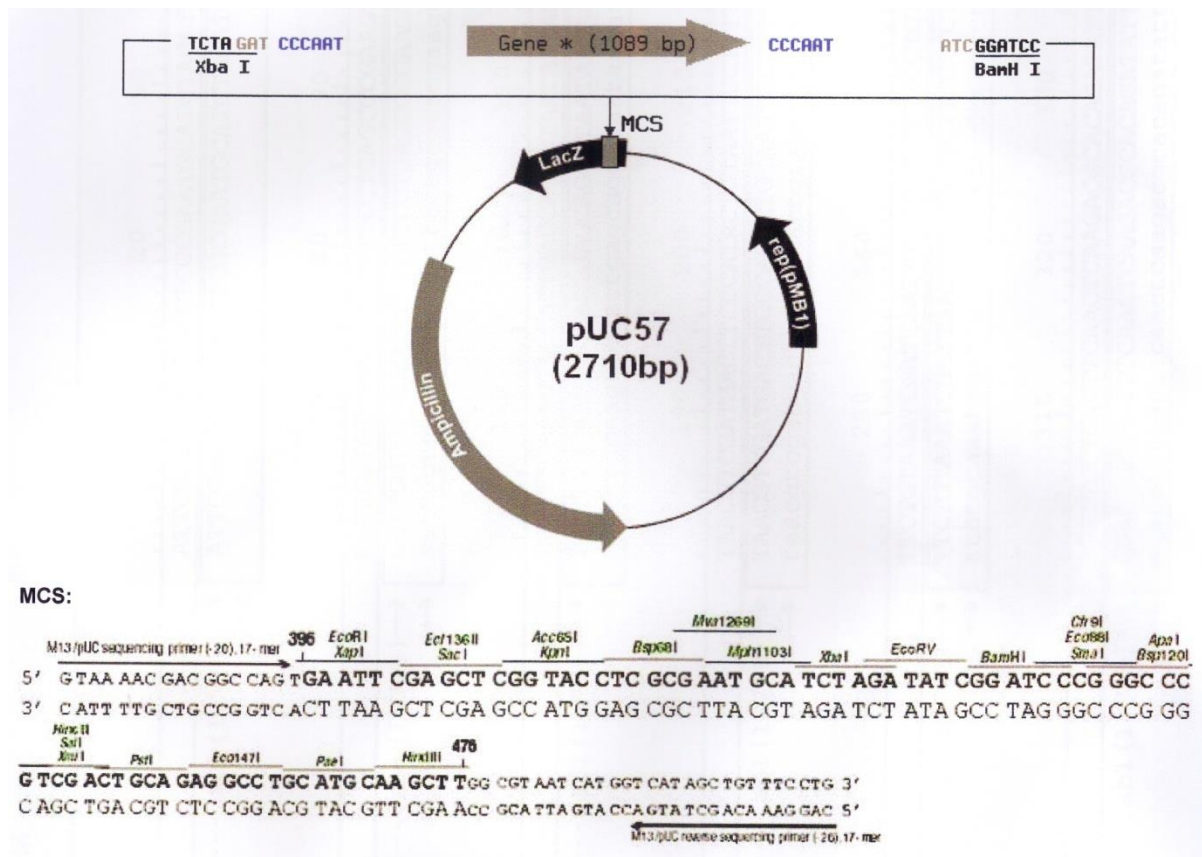
ตารางที่ 1 ตารางแสดงไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบ Transformation cassette และยีน *yap1*

หมายเหตุ	Name	Sequence(5'-3')	Tm(oC)	Size(bp)
ใช้แอมส่วนหัวของ Tranform cassette ของยีน <i>yap1</i>	PGK_F	TACCTTTACGTTATATATAGGATTGGTGTT	62	30
ใช้แอมส่วนปลายของ Tranform cassette ของยีน <i>yap1</i>	YAP1_R	GAACCCGGAGAAACGACATC	66	20
ใช้แอมส่วนต้นของ Tranform cassette ของยีน <i>yap1</i>	PGK_F1	GCAGGATAATAATAGAAATGATAATA	46.2	26
ใช้แอมส่วนต้นของ ของยีน <i>yap1</i>	YAP1_R1	GCTCGCTATCCTCGCCATCA	57.6	20
ใช้แอมส่วนกลางของ Tranform cassette ของยีน <i>yap1</i>	PGK_F2	AGTGTTCCTCCTTCTTGA	47.8	20
ใช้แอมส่วนกลางของยีน <i>yap1</i>	YAP1_R2	TGGCTCGCTATTGCTGTGGT	55.7	20



ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่ง primer ที่ออกแบบบน Transform cassette และบางส่วนของยีน *yap1*

ดำเนินการสังเคราะห์ Cassette ที่ออกแบบไว้ (ภาพที่ 5) เข้าสู่เวกเตอร์ pUC57 (2710bp) (ภาพที่ 7)



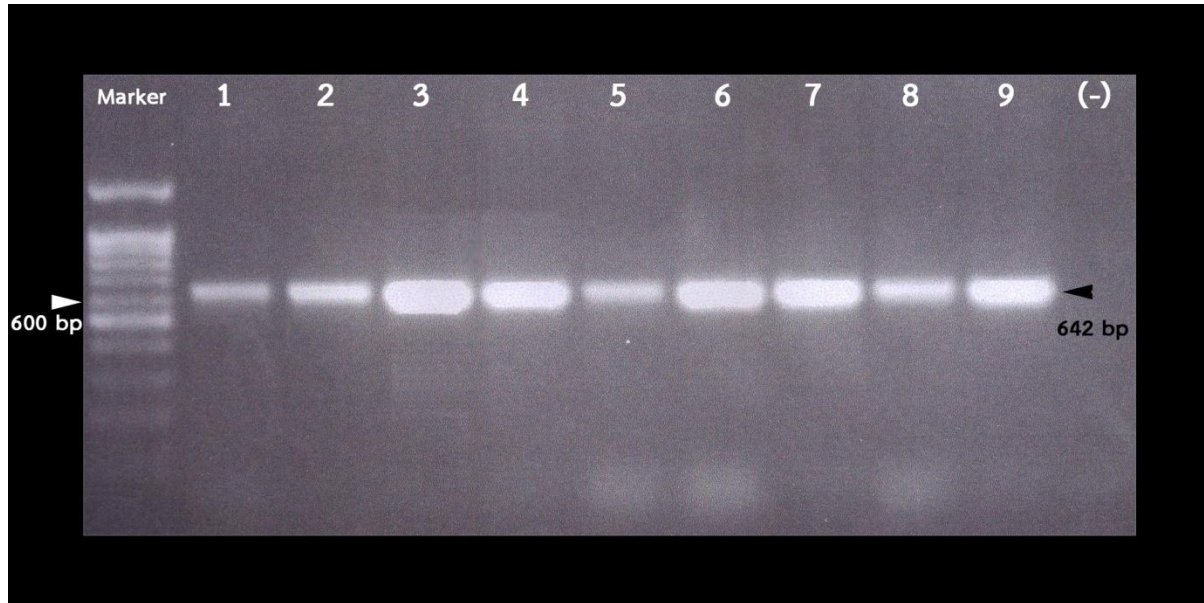
ภาพที่ 7

การตรวจสอบ Transformants

Spread เชื้อที่ได้รับการถ่าย Vector ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml และ Spread เชื้อที่ไม่ได้รับการถ่าย Vector (negative control) ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Ampicillin ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า ไม่มีเชื้อ เชื้อที่ไม่ได้รับการถ่าย Vector (negative control) โตบน Plate เลย และมี Colony ของเชื้อโตบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Ampicillin ประมาณ 1,380 colonies สามารถคำนวณ Transformant efficiency ได้ตามสูตร colonies on plate/ng of DNA plated X 1000 ng/µg โดยใช้จำนวน colony บน Plate ที่ Spread เชื้อปริมาตร 50 µl จำนวนพบ Transformant efficiency มีค่าเท่ากับ 1.38×10^4 Transformants/µg DNA

ดำเนินการตรวจสอบ Transformant โดย Duplicate single colony จำนวน 9 colonies ลง Plate อาหาร LB Agar ผสม Ampicillin และ ตรวจสอบ Vector ที่ได้รับการถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียโดยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ Primer PGK_F2 และ YAP1_R (Ta = 55°C, วิธีการทดลอง, ภาพที่ 3) โดย PCR product มีขนาด 642 bp เพื่อใช้ตรวจสอบทิศของโพรโมเตอร์และยีน

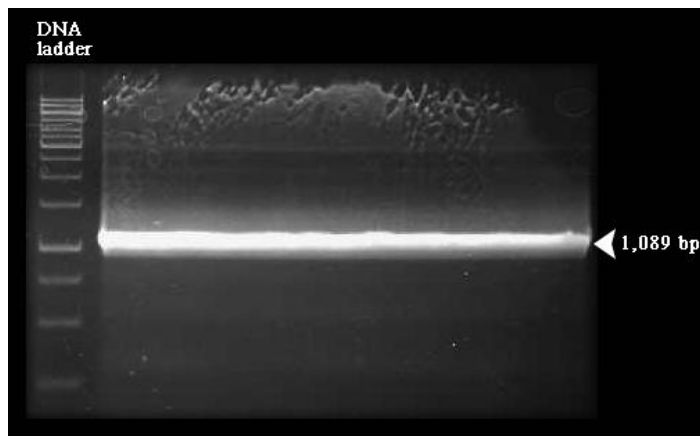
เมื่อดำเนินการตรวจ Colony ทั้ง 9 colonies พบว่าปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นได้ดีและได้ PCR Product ที่ 642 bp ตามที่คาดการณ์ใน Transformant 1 – 9 ที่เลือกมาตรวจสอบ (ภาพที่ 8) ทั้งนี้ได้เลือก E-coli clone ที่ 3 และ 4 ไปทำ Stock และเก็บไว้ที่ -80°C และนำ Clone ที่ 3 มาใช้เพื่อ Clone Vector และสกัด Plasmid ต่อไป



ภาพที่ 8 แสดงผลการทำ Colony PCR ใน Transformant 1 – 9

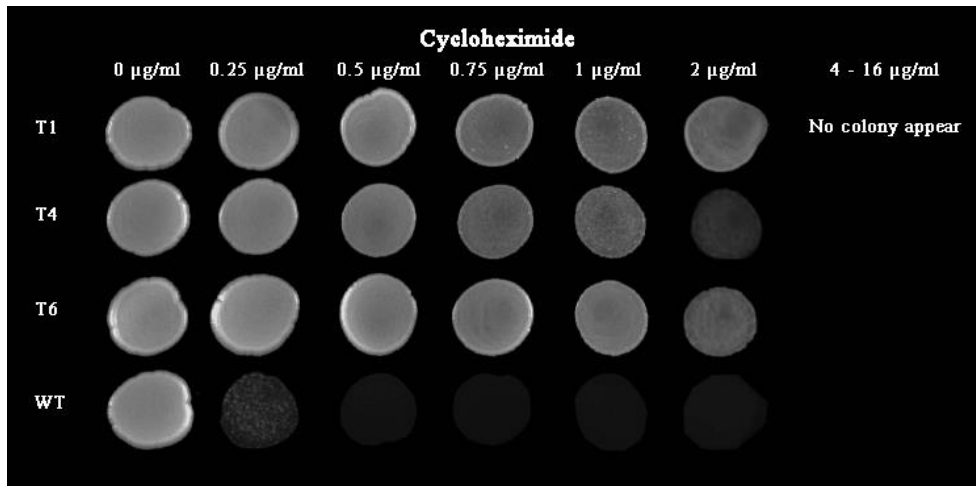
การโคลน Transform cassette จากเวกเตอร์

จากการออกแบบไพรเมอร์ PGK F และ YAPI R พบว่าค่า Ta optimal ที่เหมาะสมคือ 50°C ซึ่งปฏิกิริยา PCR จะให้ขนาดของ Transform cassette ที่ 1,089 bp และมี unspecific band น้อยที่สุด จึงใช้อุณหภูมิที่ 50°C เพื่อโคลน Transform cassette จากนั้นดำเนินการตัดเจลเพื่อนำ band DNA ที่ 1,089 bp ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง (GeneJET gel extraction kit) แล้วจึงส่งวิเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง

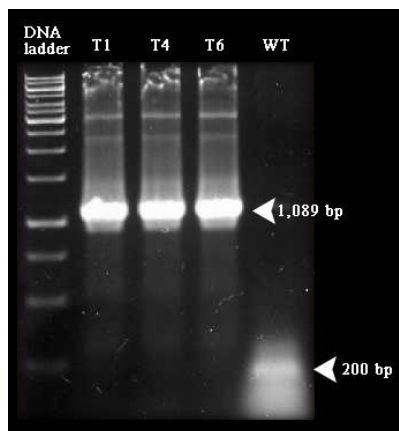


ภาพที่ 9 แสดงผลการทำ PCR เพื่อโคลน Transform cassette ขนาด 1,089 bp และตัดเจลเพื่อนำให้บริสุทธิ์ การถ่ายสายรหัส Transform cassette เข้าสู่ยีสต์

เมื่อยืนยันความถูกต้องสายรหัสพันธุกรรมแล้ว จึงดำเนินการถ่าย สายรหัส Transform cassette เข้าสู่ ยีสต์ (*S. cerevisiae*) โดยวิธี LiAc heat shock (Protocol ดัดแปลงจาก Gietz, R.D. and R.A. Woods (2002)) จากนั้นคัดเลือกโดยสารปฏิชีวนะชนิด Cycloheximide ที่ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Protocol ดัดแปลงจาก Rinji A. et al 2002) ซึ่งสามารถใช้คัดเลือกยีสต์ที่ได้รับการ Overexpression ยีน YAPI ได้ เลี้ยงเชื้อไว้ 4 วัน ที่ 30°C พบ colony บน plate YPD + Cycloheximide 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 11 โคลนิน นำไปเลี้ยงอีกครั้งบน plate YPD + Cycloheximide 1 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีโคลนินที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี 3 โคลนิน คือ Colony T1, T4 และ T6 จึงนำไปทดสอบ Cycloheximide gradient พบว่า Transformant ทั้งสามชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีถึง Cycloheximide ที่ 2 $\mu\text{g/ml}$ และจากปฏิกิริยา PCR โดยไพรเมอร์ PGK F และ YAPI R พบว่า Transformant ทั้งสามชนิดมี Insert ขนาด 1089 bp อยู่ภายในจีโนม ซึ่งใน WT จะพบเพียง 292 bp จึงเตรียมส่ง sequence PCR product เพื่อยืนยันความถูกต้องของ Transformant ต่อไป (ภาพที่ 10,11)



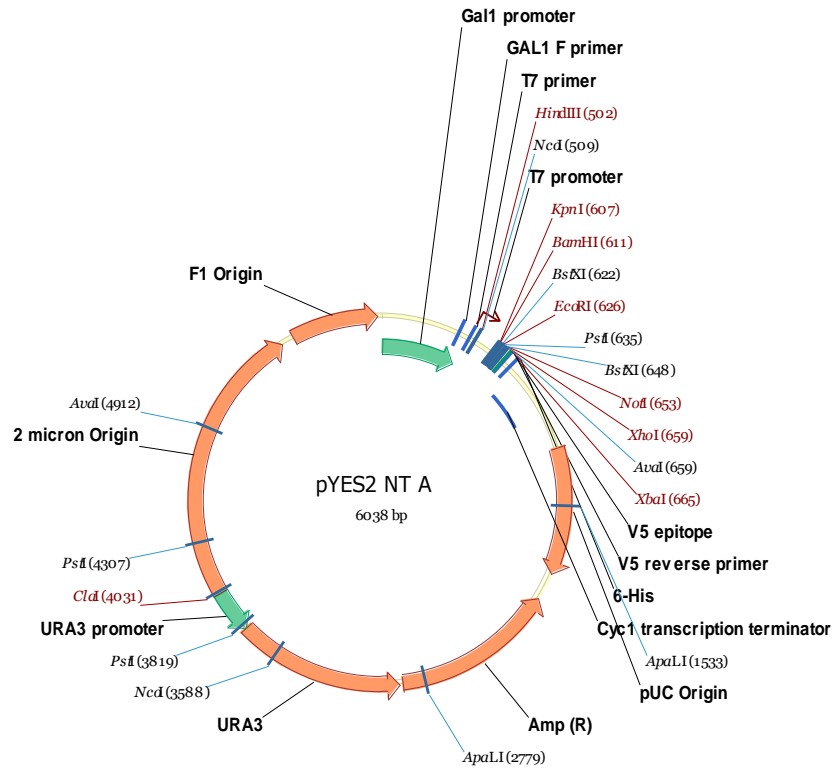
ภาพที่ 10 แสดงผลการทดสอบ Transformant โดย Cycloheximide gradient ที่ความเข้มข้น 0 – 16 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 11 แสดงผลการทดสอบ Insert ของ Transform Cassette ใน Transformant เทียบกับ WT

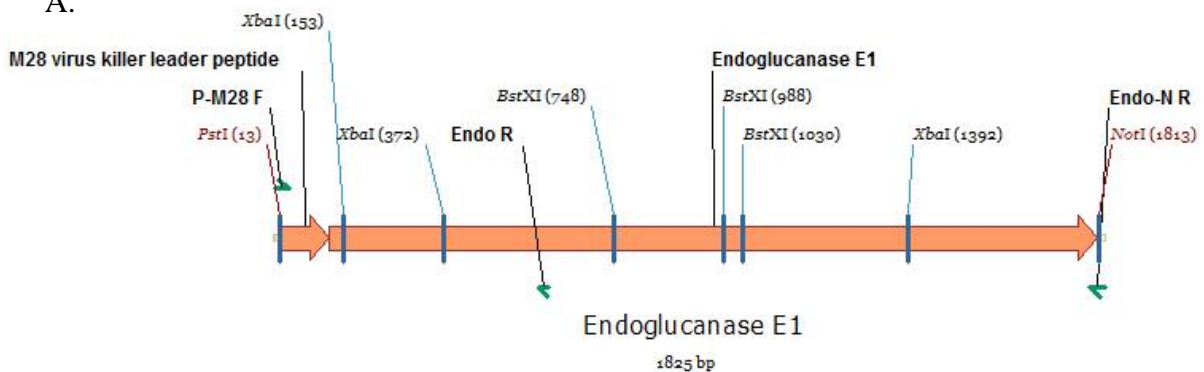
การเตรียม Over expression vector สำหรับ Cellulase Enzymes

สืบค้นข้อมูลยีน Endoglucanases, Cellobiohydrolases และ Beta-glucosidases เพื่อสร้าง Over expression Vector สำหรับยีสต์ โดย ในที่นี้จะใช้ pYES2 NT ซึ่งเป็น Over expression vector สำหรับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (ภาพที่ 8)

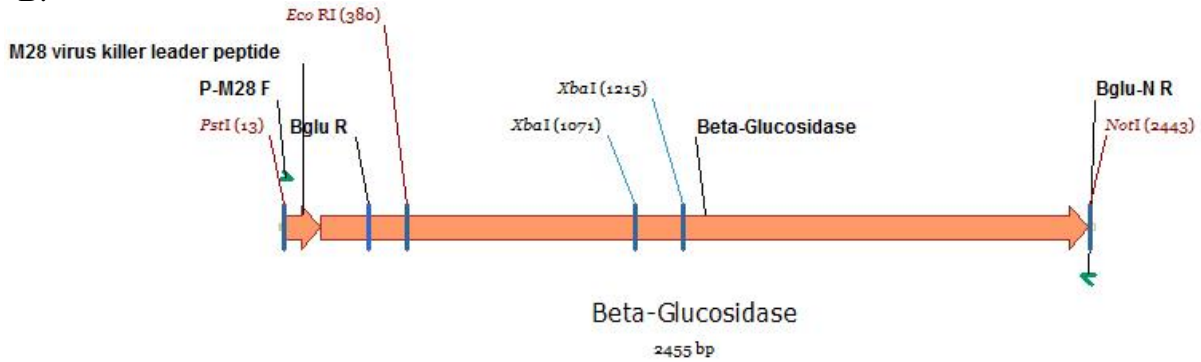


ภาพที่ 12 แสดง Over expression vector pYES2 NT A สำหรับ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

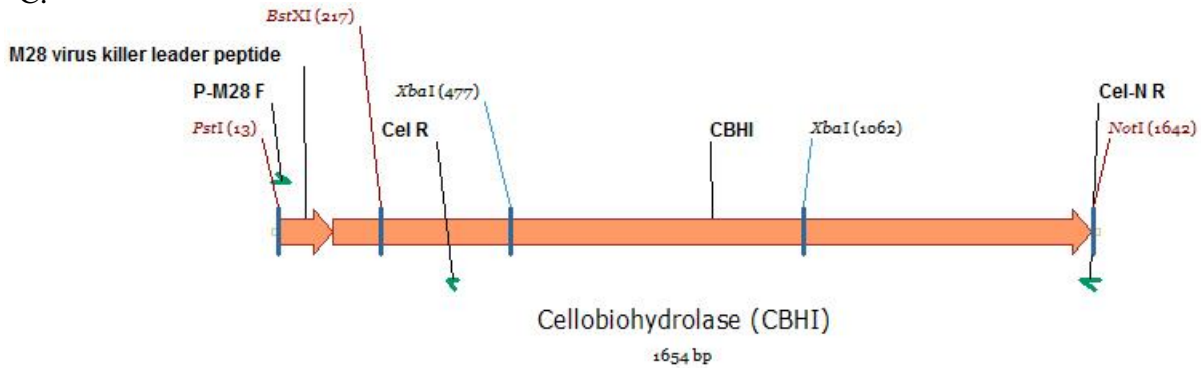
A.



B.



C.



ภาพที่ 13 A. แสดงภาพโครงสร้าง Enzyme Endoglucanase ที่ได้รับการตัดต่อโดยใส่ M28 virus killer leader peptid ไว้ที่ส่วนต้นของโปรตีนสำหรับตัดต่อเข้าสู่ Vector และ ยีสต์ B. แสดงภาพโครงสร้าง Enzyme Beta-Glucosidase ที่ได้รับการตัดต่อโดยใส่ M28 virus killer leader peptid ไว้ที่ส่วนต้นของโปรตีนสำหรับตัดต่อเข้าสู่ Vector และ ยีสต์ C. แสดงภาพโครงสร้าง Enzyme Cellobiohydrolase ที่ได้รับการตัดต่อโดยใส่ M28 virus killer leader peptid ไว้ที่ส่วนต้นของโปรตีนสำหรับตัดต่อเข้าสู่ Vector และ ยีสต์

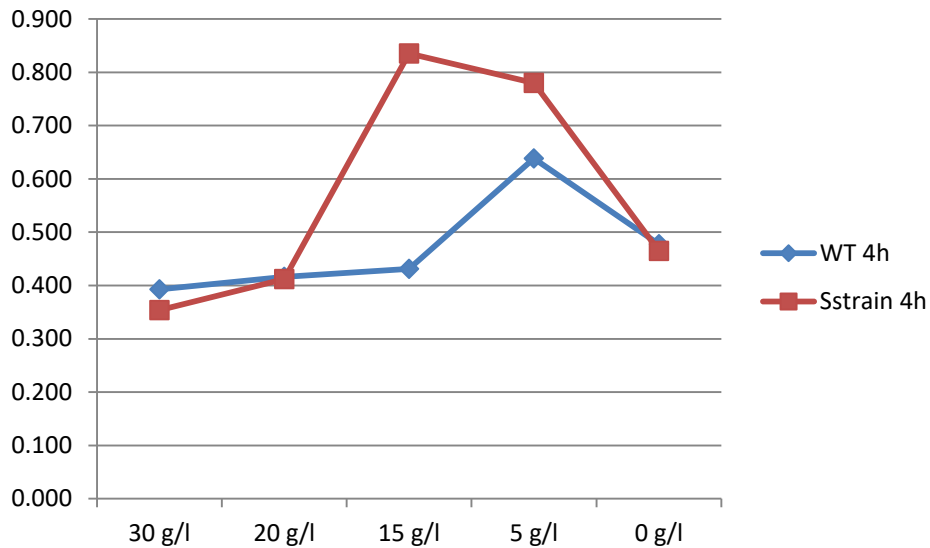
การออกแบบเอนไซม์ที่จะตัดต่อเข้าสู่ expression vector ดำเนินการโดยการสืบค้นสายรหัสเปปไทด์ของเอนไซม์แต่ละตัวแล้วนำมา Translate back เป็น CDS โดยใช้ Codon usage ของ ยีสต์และเติม Stop codon เข้าที่ส่วปลายของ CDS แต่ละเอนไซม์ หนึ่งในส่วนต้นของเอนไซม์แต่ละตัวได้ใส่สายรหัสพันธุกรรมของ M28 virus killer leader peptid เพื่อใช้เป็น Secretion signal และดำเนินการส่งสังเคราะห์เพื่อเตรียมตัดต่อเข้าสู่เวกเตอร์และ Transform เข้าสู่ยีสต์ต่อไป (ภาพที่ 13 A,B,C)

การทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ใน HMF

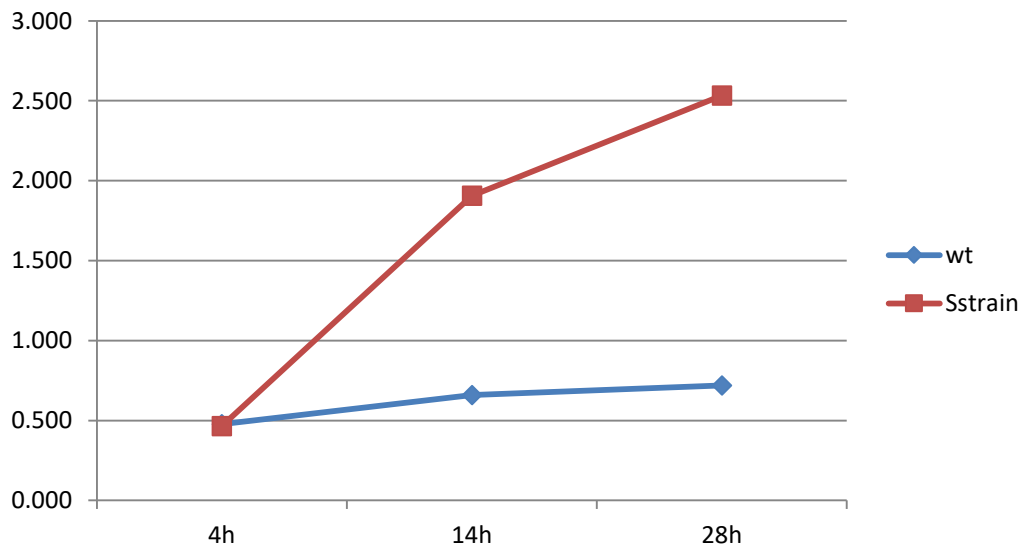
นำยีสต์ที่ได้จากการถ่ายยีนมาทดสอบเปรียบเทียบกับ WT HMF ความเข้มข้น 30 g/L, 20 g/L, 15 g/L, 5 g/L, 0 g/L พบว่ายีสต์ซึ่งได้จากการถ่ายยีนเจริญเติบโตได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ WT อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ WT ยีสต์ที่ได้รับการถ่ายยีน ที่ 4 ชั่วโมง ที่ HMF ความเข้มข้น 30 g/L, 20 g/L และ 15 g/L ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตในเชิงลบต่อ WT ในขณะที่ยีสต์ที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถ

ทนต่อความเข้มข้นของ HMF ได้ถึง 15 g/l และมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นที่ 5 - 15 g/l ในขณะที่ WT สามารถทน HMF ได้ถึงความเข้มข้น 5 g/l

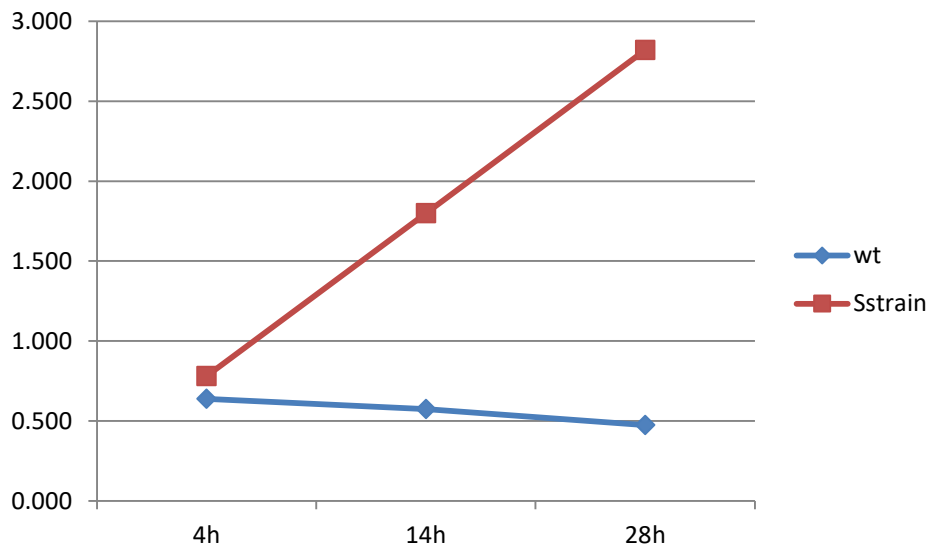
ตารางที่ 2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ดัดแปรพันธุกรรม(SStrain) เทียบกับ WT ใน YPD + HMF ที่ความเข้มข้นต่างๆ



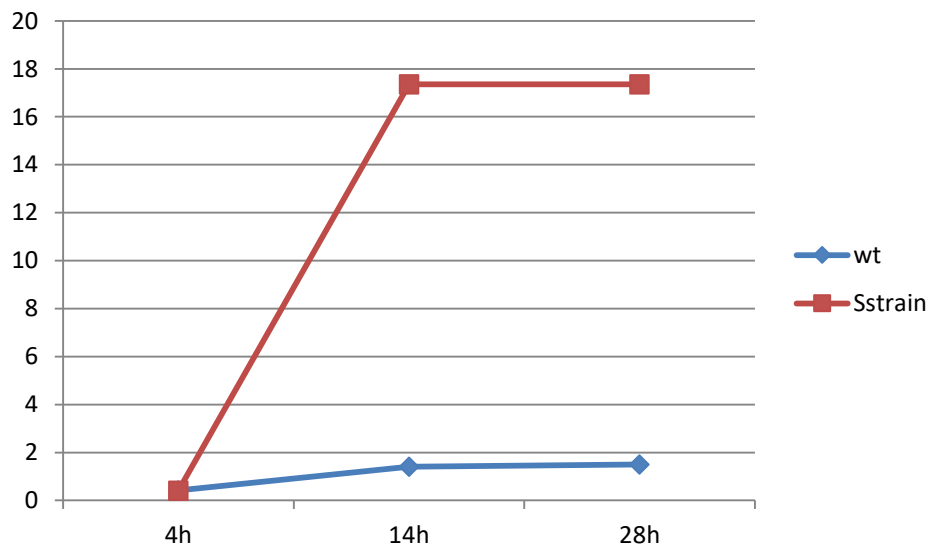
ตารางที่ 3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ดัดแปรพันธุกรรม (SStrain) เทียบกับ WT ใน YPD + HMF ที่ความเข้มข้น 0 g/l



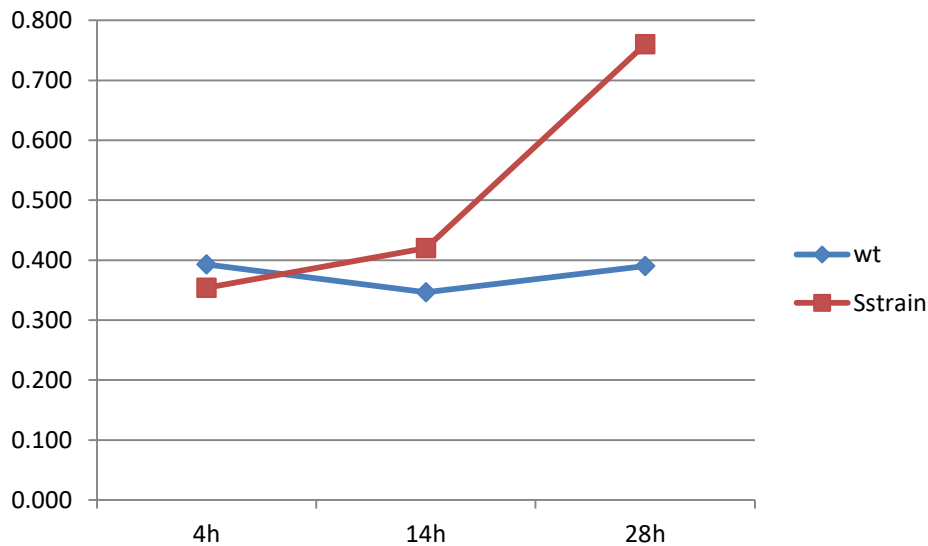
ตารางที่ 4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ดัดแปรพันธุกรรม (SStrain) เทียบกับ WT ใน YPD + HMF ที่ความเข้มข้น 5 g/l



ตารางที่ 5 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ดัดแปรพันธุกรรม (SStrain) เทียบกับ WT ใน YPD + HMF ที่ความเข้มข้น 20 g/l



ตารางที่ 6 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ดัดแปรพันธุกรรม (SStrain) เทียบกับ WT ใน YPD + HMF ที่ความเข้มข้น 30 g/l



จากการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ดัดแปรพันธุกรรม (SStrain) กับ WT ใน YPD + HMF ที่ความเข้มข้น 0 g/l, 5 g/l, 20 g/l, 30 g/l ที่ 4 ชม. 14 ชม. 28 ชม. พบว่า ยีสต์ดัดแปรพันธุกรรม (SStrain) มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่า ในขณะที่ WT มีอัตราการเจริญเติบโตคงที่หรือลดลงที่ความเข้มข้น 5 g/l, 20 g/l, 30 g/l

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน *yap1* เข้าสู่จีโนมของยีสต์และได้ยีสต์ดัดแปรพันธุกรรมที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและเร็วกว่ายีสต์ WT นอกจากนี้ยีสต์ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้สามารถทนทานต่อสารปฏิชีวนะ Cycloheximide ได้ถึงความเข้มข้น 2 µg/ml และทนทานต่อสารมีพิษ HMF ได้ถึงความเข้มข้นสูงกว่า 30 g/l ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนกระบวนการกลั่นเอทานอล

การทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ Over expression vector สำหรับ Cellulase Enzymes พร้อมใช้เพื่อถ่ายเข้าสู่ยีสต์ในการนำไปใช้ย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำยีสต์ดัดแปรพันธุกรรมไปใช้ในขั้นตอนกระบวนการกลั่นเอทานอล และ/หรือนำไปถ่ายเวกเตอร์ Cellulase Enzymes เพื่อนำไปใช้ย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำเวกเตอร์ Cellulase Enzymes ไปใช้ถ่ายเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์อื่นได้

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยและกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน

12. เอกสารอ้างอิง

- De Rijcke M, Seneca S, Punyammalee B, Glansdorff N, Crabeel M (1992) Characterization of the DNA target site for the yeast ARGR regulatory complex, a sequence able to mediate repression or induction by arginine. *Mol Cell Biol* 12:68–81
- Dubacq C, Chevalier A, Courbeyrette R, Petat C, Gidrol X, Mann C (2006) Role of the iron mobilization and oxidative stress regulons in the genomic response of yeast to hydroxyurea. *Mol Genet Genomics* 275:114–124
- Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K (1997) Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* 17:6982–6993
- Hahn JS, Neef DW, Thiele DJ (2006) A stress regulatory network for co-ordinated activation of proteasome expression mediated by yeast heat shock transcription factor. *Mol Microbiol* 60:240–251
- Haugen AC, Kelley R, Collins JB, Tucker CJ, Deng C, Afshari CA, Brown JM, Ideker T, Van Houten B (2004) Integrating phenotypic and expression profiles to map arsenic-response networks. *Genome Biol* 5:R95
- Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK, Hannett NM, Harbison CT, Thompson CM, Simon I, Zeitlinger J, Jennings EG, Murray HL, Gordon DB, Ren B, Wyrick JJ, Tagne JB, Volkert TL, Fraenkel E, Gifford DK, Young RA (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298:799–804
- Liu ZL, Blaschek HP (2010) Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by *Saccharomyces*. In: Vertes A, Qureshi N, Yukawa H, Blaschek H (eds) *Biomass to biofuels: strategies for global industries*. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, UK, pp 17–36

- Liu ZL, Ma M, Song M (2009) Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Mol Genet Genomics* 282:233–244
- Liu ZL, Moon J (2009) A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. *Gene* 446:1–10
- Ma M, Liu ZL (2010) Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover YAP1, PDR1, PDR3, RPN4, and HSF1 as key regulatory genes in genomic adaptation to lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 11:660
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 21:4347–4368
- Rodrigues-Pousada C, Menezes RA, Pimentel C (2010) The Yap family and its role in stress response. *Yeast* 27:245–258
- Sundstrom L, Larsson S, Jonsson LJ (2010) Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in the resistance to phenolic fermentation inhibitors. *Appl Biochem Biotechnol* 161:106–115
- USDA/Agricultural Research Service (2011, August 25). Making tomorrow's bioenergy
- Waraporn A. & Yoshinori M. & Akihiko K. & Ryosuke Y. & Akihiko K. & Takamitsu A. & Prapassorn R. & Yutaka M. Direct ethanol production from cassava pulp using a surface-engineered yeast strain co-displaying two amylases, two cellulases, and β -glucosidase. *Appl Microbiol Biotechnol* (2011) 90:377–384 DOI 10.1007/s00253-011-3115-8
- Workman CT, Mak HC, McCuine S, Tagne JB, Agarwal M, Ozier O, Begley TJ, Samson LD, Ideker T (2006) A systems approach to mapping DNA damage response pathways. *Science* 312:1054–1059