



รายงานการวิจัย

โครงการนำร่องเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของรีคอมบิแนนท์  
วอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ของคน  
(A pilot study of conformational change in  
human von Willebrand factor)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร. นवलน้อย จูฑะพงษ์

สาขาวิชา สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2547

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2550

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor Dr. John C. Kermode จาก Department of Pharmacology and Toxicology, University of Mississippi Medical Center ประเทศสหรัฐอเมริกา ในการให้คำปรึกษาในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยรู้สึกขอบคุณเป็นอย่างสูงต่อผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดอกเตอร์ชาญวิทย์ ลีลาบุวัฒน์ แห่งภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นสำหรับการบริจาคเซลล์ COS-7 ให้มาใช้ในการผลิต recombinant von Willibrand factor A1 domain งานวิจัยนี้คงจะไม่สามารถสำเร็จลงได้ หากปราศจากความช่วยเหลือและน้ำใจจากคณาจารย์ในสาขาวิชาชีววิทยาและจุลชีววิทยาในการให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือ การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2547

## บทคัดย่อภาษาไทย

von Willebrand factor (VWF) เป็น Glycoprotein ในพลาสมาที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการทำให้เลือดหยุดและการเกิดลิ่มเลือด โดยไปส่งเสริมให้เกล็ดเลือดเกาะกับ endothelium ในบริเวณเส้นเลือดที่ได้รับความเสียหาย VWF เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นไป เชื่อมต่อระหว่างกันด้วยพันธะ disulfide ทำให้โมเลกุลมีขนาดแตกต่างกัน โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $20 \times 10^6$  ดาลตัน โมโนเมอร์แต่ละโมโนเมอร์ซึ่งประกอบเป็น VWF นั้นประกอบด้วย domain 4 แบบ (A ถึง D) A1 domain ของ VWF เป็นที่ตั้งของตำแหน่งจับของ GP Ib, heparin, ยาปฏิชีวนะ ristocetin และโปรตีนจากพิษงู botrocetin เชื่อกันว่า A1 domain เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญมากเนื่องจากพบว่ามี point mutation หลายจุดบนยีนของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือดซึ่งมีชื่อโรคว่า von Willebrand disease (VWD) แบบที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ A1 domain เป็นการศึกษาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยการใช้ X-ray crystallography นักวิจัยพบความแตกต่างของโครงสร้างของ recombinant A1 domain ในผู้ป่วยโรค VWD ชนิด 2 ใดๆก็ตามตามข้อมูลดังกล่าวไม่ได้พิสูจน์ว่า wild type A1 domain เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างวัตถุประสงค์หลักของการวิจัยชิ้นนี้เพื่อผลิต VWF A1 domain ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF ในการศึกษาระยะยาวขั้นต่อไป จากการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการโคลน VWF A1 domain ของคนจาก genomic DNA แทนการ clone จาก mRNA ซึ่งวิธีที่ค้นพบนี้จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของ A1 domain ในผู้ที่มี polymorphism ต่างกันใน VWF gene ได้ ผู้วิจัยได้ออกแบบให้ glycosylated protein ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ COS-7 มี hexahistidine tag เพื่อประโยชน์ในการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ ซึ่ง tag ดังกล่าวมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์จึงสามารถตัดออกไปได้ อันจะทำให้โปรตีนที่ผลิตขึ้นมีสภาพที่เหมือนกับโปรตีนที่สร้างขึ้นตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามทั้ง wild type และ mutant ที่เปลี่ยนจาก Cys เป็น Ser ทั้ง 3 ตำแหน่งของ A1 domain ไม่ละลายในสารละลาย PBS และ 1% Triton X-100 ดังนั้นในการสกัดแยกให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไปควรใช้วิธี denaturing และ refolding method

### Abstract

Von Willebrand factor (VWF) is a plasma glycoprotein that plays an important role in hemostasis and thrombosis. It promotes platelet adhesion to damaged vascular endothelium. VWF is a multimeric protein consisting of disulfide-bonded subunits, ranging from dimers to multimers extending up to  $20 \times 10^6$  Daltons. The VWF monomer includes 13 domains, which are multiples of four domain types (A to D). The A1 domain in VWF contains multiple binding sites, including those for platelet glycoprotein Ib, heparin, and the artificial modulators ristocetin and botrocetin. The A1 domain contains multiple binding sites, including those for glycoprotein Ib, heparin, the antibiotic ristocetin and the snake venom protein botrocetin. This domain is thought to be a critical structural motif as several point mutations have been found within this domain in patients with type 2 von Willebrand disease (VWD). Conformational changes in the A1 domain of VWF are a topic of intense interest. Differences in the structure of this domain as a result of natural mutations in VWD have been examined by X-ray crystallography of recombinant A1 domain fragments. Such studies, however, do not prove that the wild type A1 domain can undergo a change in conformation. The goal of this study was to generate a suitable VWF A1 domain for studying the conformational change of VWF in the long term project. In the present study, the A1 domain of human VWF has been cloned from genomic DNA, rather than from mRNA. This approach facilitates subsequent studies of the structural and functional consequences of specific polymorphisms or mutations in the VWF gene. The investigator has designed a construct with a cleavable hexahistidine tag to express the recombinant protein which is for purification of the glycosylated protein after its expression in COS 7 cells. Cleavage of the tag will allow subsequent studies of conformational change to be performed with the protein in its native state. However, the expressed wild type and Cys/Ser (3-point mutations) A1 domain did not dissolve in PBS or 1% triton X-100. Using a denaturing and refolding method is recommended for the purification in the future project.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ค
สารบัญ .....	ง
สารบัญภาพ .....	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	3
ขอบเขตของการวิจัย .....	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย .....	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย .....	5
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง.....	11
บทที่ 4 บทสรุป.....	21
บรรณานุกรม .....	22
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก .....	25
ภาคผนวก ข .....	27
ประวัติผู้วิจัย .....	30

## สารบัญภาพ

รูปที่ 1	แผนภาพแสดงโครงสร้างของ VWF .....	2
รูปที่ 2	การตรวจสอบ recombinant A1 domain gene ของ VWF ที่ได้จากการทำ PCR .....	11
รูปที่ 3a	การเปรียบเทียบการจัดลำดับ nucleotide ระหว่าง VWF ของคนและ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยพื้นฐานข้อมูลจาก NCBI ข้อมูลจากการใช้ forward primer .....	12
รูปที่ 3b	การเปรียบเทียบการจัดลำดับ nucleotide ระหว่าง VWF ของคนและ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยพื้นฐานข้อมูลจาก NCBI ข้อมูลจากการใช้ reverse primer .....	13
รูปที่ 4a	Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์หาการจัดเรียงลำดับ nucleotide ของ Wild type A1 domain gene.....	14
รูปที่ 4b	Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์หาการจัดเรียงลำดับ nucleotide ของ Cys/Ser mutant A1 domain gene .....	15
รูปที่ 5	การจัดเรียงตัวของ nucleotide ใน pcDNA3.1/His vector ที่มี recombinant VWF A1 domain gene แทรกอยู่ .....	17
รูปที่ 6	การแสดงออกของ wild type recombinant VWF A1 domain gene โดยเซลล์ COS-7 .....	17
รูปที่ 7	การคำนวณหาขนาดของ recombinant A1 domain .....	18
รูปที่ 8	การเปรียบเทียบความสามารถในการละลายใน PBS ระหว่าง wild type และ mutant VWF A1 domain protein.....	19
รูปที่ 9	การตรวจสอบการละลายของ mutant VWF A1 domain ใน 1% Triton X-100.....	19

# บทที่ 1

## บทนำ

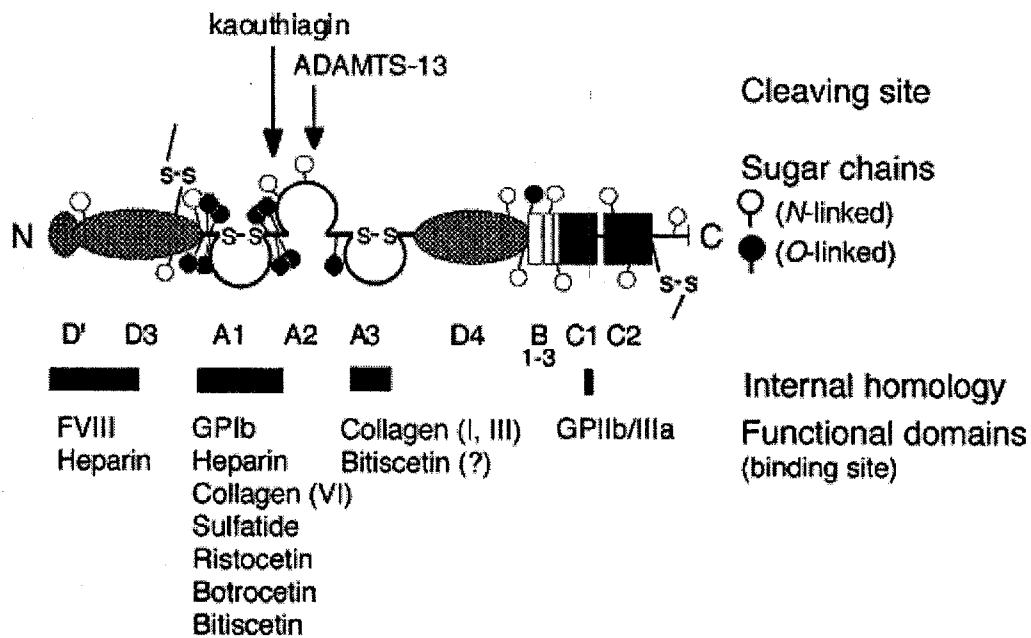
### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การเกาะตัวกันระหว่างเกล็ดเลือด (Platelet) มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกที่ทำให้เลือดหยุดขณะเกิดการฉีกขาดของหลอดเลือดในร่างกาย [1, 2] นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดลิ่มเลือดในภาวะเส้นเลือดแดงตีบ [3] การเกาะตัวกันของเกล็ดเลือดจะเริ่มต้นขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการจับกันระหว่าง von Willebrand factor (VWF) กับ receptor บนเยื่อหุ้มของเกล็ดเลือดที่เรียกว่า Glycoprotein Ib (GP Ib) อย่างไรก็ตามในภาวะปกติ VWF จะไม่ทำปฏิกิริยาจับกับ receptor บนเกล็ดเลือด แต่ปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อ VWF จับกับ collagen ในชั้น subendothelium ของหลอดเลือดเสียก่อน [4] ด้วยเหตุนี้นักวิทยาศาสตร์จึงเชื่อว่า การจับตัวระหว่าง VWF กับ collagen น่าจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางอย่างของ VWF เพื่อให้ตำแหน่งจับของ VWF เปิดออกและเข้าจับกับ GP Ib ได้

VWF เป็น Glycoprotein ที่มีขนาดใหญ่ประกอบด้วยหน่วยย่อยตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นไป เชื่อมต่อระหว่างกันด้วย disulfide bond ทำให้โมเลกุลมีขนาดแตกต่างกัน โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $20 \times 10^6$  dalton (D) [5, 6] monomer แต่ละ monomer ซึ่งประกอบเป็น VWF นั้นประกอบด้วย domain 4 แบบ คือ A, B, C และ D ดังนี้คือ D', D3, A1, A2, A3, D4, B1, B2, B3, C1, C2 ตามลำดับ (รูปที่ 1) A1 domain ซึ่งตรงกับกรดอะมิโน valine ที่ตำแหน่ง 1212 ( $V^{1212}$ ) ถึงกรดอะมิโน leucine ที่ตำแหน่ง 1491 ( $L^{1491}$ ) เป็นที่ตั้งของ binding site ของ GP Ib และ heparin [7, 8] นักวิจัยพบว่าในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือดซึ่งมีชื่อโรคว่า von Willebrand disease แบบ 2B (VWD type 2B) มีการกลายพันธุ์ (point mutation) ภายใน A1 domain [9, 10] ดังนั้น A1 domain น่าจะเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญมากต่อกลไกการทำงานของเกล็ดเลือดในขบวนการทำให้เลือดหยุด รวมทั้งกลไกการเกิดลิ่มเลือดอุดตันในผู้ป่วยเส้นเลือดตีบ

จากผลการทดลองแบบ *in vitro* พบว่า VWF สามารถถูกกระตุ้นให้จับกับเกล็ดเลือดได้ด้วยสารนอกร่างกายหลายประเภท เช่น ristocetin [11] หรือ botrocetin [12] เป็นต้น botrocetin เป็นโปรตีนในพิษงู ส่วน ristocetin เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียซึ่งเคยถูกนำมาทดลองใช้ในระดับคลินิกแต่ไม่ได้รับอนุญาตให้ออกจำหน่ายในตลาด เนื่องจากพบว่ากระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดเกาะตัวกันมากผิดปกติ จากการรายงานการวิจัยโดยใช้ ultraviolet spectroscopy ของ Berndt และคณะ [13] พบว่า ristocetin สามารถ

จับกับ A1 domain ของ VWF ได้ที่ตำแหน่ง C<sup>1237</sup>-P<sup>1251</sup> และ L<sup>1457</sup>-P<sup>1471</sup> ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วว่า ristocetin มีกลไกที่ไปชักนำให้ VWF ทำปฏิกิริยาจับกับ GP Ib receptor แล้วเกิดการเกาะตัวกันได้เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในขณะที่เกิดลิ่มเลือดเฉียดกับสภาวะแรงเสียดทานสูง (shear stress) ระหว่างการเคลื่อนที่ผ่านหลอดเลือดตีบ [14] ด้วยเหตุนี้ ristocetin จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษากลไกการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด ทั้งในการศึกษาแบบ *in vitro* และ *in vivo*



**รูปที่ 1** แผนภาพแสดงโครงสร้างของ VWF แต่ละ subunit ในโครงสร้างของ VWF ประกอบด้วย domain A-D ดังภาพ A1 domain ที่ใช้ในการศึกษารุ่นนี้เป็นตำแหน่งจับของ GP Ib, heparin, collagen ristocetin และ botrocetin จะเห็นได้ว่ามีส่วนที่เป็น glycosylation (sugar chain) ในส่วนที่ไม่ใช่ loop ที่มาของรูป : Matsui and Hamako, 2005 [15]

นักวิจัยหลายกลุ่มได้ทำการศึกษาโครงสร้างของ VWF ในผู้ป่วยโรค VWD ชนิด 2 บี ด้วยวิธี X-ray crystallography โดยเปรียบเทียบโครงสร้างของ recombinant A1 domain พบว่ามีความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยและคนปกติ [16-18] อย่างไรก็ตาม การศึกษาดังกล่าวจัดเป็นเพียงหลักฐานทางอ้อมที่ชี้แนะว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF เท่านั้น แต่มีหลักฐานโดยตรงน้อยมากที่จะสามารถสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า “เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF หลังการถูกกระตุ้น เช่น จากแรง



เสียดทาน หรือจากการจับกับ collagen หรือ ristocetin” การศึกษาที่เป็นหลักฐานโดยตรงเท่าที่พบมีเพียงการศึกษาของ Kang และคณะ [19, 20] โดยพบว่า ristocetin ไปเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการตัดย่อย VWF ของคนด้วยเอนไซม์ trypsin และ elastase อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวโดยการใช้ VWF ที่ร่างกายสร้างขึ้นตามธรรมชาติมีข้อจำกัดคือ VWF จากธรรมชาติมีขนาดใหญ่ (ประมาณ 250 kDa) ทำให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัวหนึ่ง ๆ มากมายหลายตำแหน่ง ดังนั้นการศึกษาโดยการใช้ recombinant A1 domain ของ VWF ซึ่งจะมีขนาดโมเลกุลไม่เกิน 50 kD น่าจะทำให้จำนวนตำแหน่งตัดน้อยลง และสามารถเจาะจงศึกษาเฉพาะโครงสร้างของ A1 domain ได้ นอกจากนี้หากใช้เอนไซม์ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงเพียงกรดอะมิโนตัวเดียวแทนการใช้ trypsin เช่น lysylendopeptidase ตัดเฉพาะที่ตำแหน่งกรดอะมิโน lysine หรือ arginylendopeptidase ตัดเฉพาะที่ตำแหน่งกรดอะมิโน arginine ก็จะทำให้สามารถชี้ตำแหน่งของ VWF A1 domain ที่เอนไซม์แต่ละตัวเข้าตัดขณะที่มี ristocetin ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น ความเข้าใจอย่างลึกซึ้งในรายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF A1 domain จะช่วยเปิดทางไปสู่การพัฒนาใหม่ในการรักษาการเกิดลิ่มเลือดอุดตันได้เป็นอย่างดี เช่น การผลิต A1 domain antibody ที่เฉพาะเจาะจงกับตำแหน่งตัดที่สำคัญ เป็นต้น งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการทดลองเบื้องต้น โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อผลิต recombinant A1 domain ของ VWF ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ A1 domain ในขั้นต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการผลิต recombinant A1 domain ของ VWF เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF ในงานวิจัยระยะยาวขั้นต่อไป โครงสร้างของ A1 domain มี cysteine ทั้งหมด 5 ตัว คือ ที่ตำแหน่ง 1227, 1234, 1237, 1272 และ 1458 โดยจะมีการเชื่อมต่อกันเป็น domain ด้วย disulfide bond ระหว่าง cysteine ตัวที่ 1272 และ 1458 นักวิทยาศาสตร์พบว่าการเชื่อมต่อกันเพื่อเกิดโครงสร้างที่เป็น domain นี้มีความสำคัญต่อ binding site ของ VWF มาก อย่างไรก็ตามการสร้าง recombinant protein ใน host cell อาจเกิดการเชื่อมต่อยุ่ระหว่างสาย polypeptide สองสายหรือหลายสายได้โดยการเกิด interchain disulfide bond จาก cysteine ที่เหลืออีก 3 ตัว อันจะทำให้โปรตีนเกิดการเกาะตัวกัน (aggregation) และไม่ละลายน้ำ โครงการนำร่องนี้จึงมีวัตถุประสงค์ 2 ประการ คือ

1. เพื่อหา condition, forward primer และ reverse primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน A1 domain gene จาก genomic DNA ของคน

2. เพื่อทดสอบผลของการเปลี่ยนแปลง cysteine ที่ตำแหน่ง 1227, 1234 และ 1237 ต่อการละลายของ recombinant A1 domain เปรียบเทียบกับ wild type

#### ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF ของคนในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาพุ่งเป้าไปที่ A1 domain โดยเฉพาะ A1 domain จัดว่าเป็น domain ที่สำคัญที่สุดอันหนึ่งในบรรดาโครงสร้างทั้งหมดของ VWF เนื่องจากภายใน A1 domain เป็นที่ตำแหน่งที่ตั้งของ binding site ของ GP Ib ซึ่งปฏิกิริยาการจับระหว่าง VWF กับ GP Ib เป็นปฏิกิริยาเริ่มต้นในการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด

#### ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยชี้แนวทางที่เหมาะสมในการผลิต recombinant A1 domain เพื่อใช้ในการวิจัยระยะยาว อันจะเป็นการศึกษาหาหลักฐานทางตรงเพื่อการสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า ristocetin ไปเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF และเป็นผลให้เกิดการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### การทดลองและสารเคมี

##### 1. การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ COS-7 ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับจาก ผศ. ดร. ชาญวิทย์ ถิลาญวัฒน์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาเลี้ยงใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ร่วมกับ 4 mM glutamine (Gibco BRL), 5% fetal calf serum (Gibco BRL) และ penicillin (50 IU/ml)/streptomycin (50 µg/ml) (Gibco BRL) ที่ 37° C ในบรรยากาศที่มีความชื้นและ 5% CO<sub>2</sub>

##### 2. การผลิต wild type recombinant A1 domain protein ของ VWF

2.1. การเพิ่มปริมาณของยีนที่ควบคุมการสร้าง recombinant A1 domain protein จาก genomic DNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

2.1.1 Genomic DNA ที่ใช้ในการทดลองนี้สกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดที่ได้รับบริจาคจากอาสาสมัครในห้องปฏิบัติการของ Professor Dr. John C. Kermode forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ 5'-acggatCCACTGTGATGTTGTCAA-3' และ 5'-aatctaGACCAAGAAGC TGTGGTCA-3' ตามลำดับ primer ทั้งสองนี้ตรงกับ nucleotide ลำดับที่ 3985-4002 และ 5086-5068 ใน VWF coding sequence (nucleotide บริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็น restriction site สำหรับ *BamH* I และ *Xba* I ใน forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ซึ่งจะมีประโยชน์ในการทำ subcloning)

ปฏิกิริยาในการทำ PCR (50 µl) ประกอบด้วย

10 x reaction buffer	5	µl
d NTP mix (10 mM each)	1	µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1	µl
Forward primer (50 µM)	1	µl
Reverse primer (50 µM)	1	µl
Genomic DNA (10 ng/ml)	5	µl
Pfu DNA polymerase	1	µl (1 unit)
Nuclease-free water	35	µl

## Cycle time and temperature

Step 1	95 ° C	1	นาที
Step 2	95 ° C	1	นาที
Step 3	65 ° C	0:45	นาที
Step 4	74 ° C	1:30	นาที
Step 5	ซ้ำ step 2-4	30	รอบ
Step 6	4 ° C	∞	

นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธี electrophoresis เทียบกับ DNA standard โดยใช้ 2% agarose gel ความต่างศักย์ 80 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง UV

2.1.2 หลังจากทำ PCR แล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยใช้ PCR-Script™ Amp Cloning Kit (Stratagene: USA) ดังต่อไปนี้

**Polishing the purified PCR product** โดยปฏิกิริยา ประกอบด้วย

PCR product	10	µl
d NTP mix (10 mM each)	1	µl
10 x polishing buffer	1.3	µl
Pfu DNA polymerase	1	µl

บ่มปฏิกิริยาในอ่างน้ำ ที่ 72 ° C นาน 30 นาที ได้ผลผลิต คือ Blunt-ended PCR product

**Ligation** โดยมีปฏิกิริยา ประกอบด้วย

pPCR-Script Amp SK(+) vector	1	µl
10 x reaction buffer	1	µl
10 mM rATP	0.5	µl
Blunt-ended PCR product	4	µl
Srf I restriction enzyme	1	µl
T4 DNA ligase	1	µl
Nuclease-free water	1.5	µl

บ่มปฏิกริยา ที่ 25 ° C นาน 1 ชั่วโมง แล้วทำให้ร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 65 ° C นาน 10 นาที เก็บไว้ที่ 4° C เพื่อนำไปทำ transformation

**Transformation** ทำโดยใช้ XL10-Gold Kan ultracompetent cell มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. Thaw เซลล์จำนวน 40  $\mu$ l บนน้ำแข็ง แล้วเขย่าให้เข้ากันเบา ๆ ใช้ pipet ถ่ายไปไว้ใน tube ก้นป้านขนาด 14 ml ที่แช่เย็นไว้
2. เติม  $\beta$ -mercaptoethanol เขย่าวนให้เข้ากันทุก 2 นาที โดยเข้บนน้ำแข็งนาน 10 นาที
3. เติม ligating insert plasmid 2  $\mu$ l เขย่าเบา ๆ บ่มปฏิกริยาบนน้ำแข็งนาน 30 นาที
4. แช่ปฏิกริยาในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 42° C นาน 30 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 2 นาที
5. เติม NZY<sup>+</sup> broth (ภาคผนวก ก) จำนวน 450  $\mu$ l (42° C) เขย่าอย่างต่อเนื่องที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง
6. เติมสารต่อไปนี้
 

5% X-gal	40	$\mu$ l
10 mM IPTG	100	$\mu$ l
NZY <sup>+</sup> broth	100	$\mu$ l
7. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป spread บน LB-ampicillin agar plate จำนวน 150  $\mu$ l
8. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C ประมาณ 16 ชั่วโมง
9. สุ่มเลือกโคโลนีสีขาว (blue-white selection) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเหลว LB ปริมาตร 10 ml ที่มี 100  $\mu$ g/ml ampicillin ประมาณ 16 ชั่วโมง
10. เก็บส่วนหนึ่งของแบคทีเรียไว้ใน glycerol ส่วนที่เหลือนำไปสกัดแยก plasmid ด้วย Wizard minipreps DNA purification (Promega: USA) นำไปตรวจสอบขนาดด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ความต่างศักย์ 80 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง UV
11. เลือกเฉพาะ plasmid ขนาดที่ถูกต้อง (ประมาณ 4 kb) ส่งตรวจหา sequence (Macrogen: Korea) เพื่อตรวจสอบยืนยันว่าไม่มีความผิดพลาดเกิดขึ้นระหว่างขบวนการ PCR

## 2.2. การทำ transient expression ของ recombinant A1 domain โดยใช้เซลล์ COS-7

2.2.1 นำ plasmid จากการทำ transformation ซึ่งตรวจสอบแล้วว่ามียีนที่ต้องการมาตัดด้วย เอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba* I โดยปฏิกริยา ประกอบด้วย

10 x Reaction buffer	2	$\mu$ l
BSA	0.2	$\mu$ l
Script Amp SK(+) vector with insert	8	$\mu$ l

<i>Bam</i> H I	0.5	μl (5 unit)
<i>Xba</i> I	0.5	μl (5 unit)
Nuclease-free water	8.3	μl

2.2.2 นำ pcDNA3.1/His vector มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*H I และ *Xba* I โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย

10 x Reaction buffer	2	μl
BSA	0.2	μl
pcDNA3.1/His vector (Invitrogen)	0.5	μl
<i>Bam</i> H I	0.5	μl (5 unit)
<i>Xba</i> I	0.5	μl (5 unit)
Nuclease-free water	8.3	μl

นำ vector และ plasmid with insert ที่ตัดแล้วไปแยกด้วย 1% gel electrophoresis ย้อม DNA ด้วย ethidium bromide เลือกกัด gel และสกัด DNA ที่มีขนาด 1 kb สำหรับ A1 domain และ 4 kb สำหรับ pcDNA3.1/His vector จากนั้น นำ DNA ที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา ligation โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย

5 x Ligation Reaction buffer	4	μl
Vector DNA	30	fmol
Insert DNA	90	fmol
Ligase	1	μl (1unit)
Nuclease-free water to	20	μl

นำปฏิกิริยาที่ได้ไปทำ Transformation โดยวิธีเดียวกับในหัวข้อ 2.1.2 ซึ่งแบคทีเรียที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงจะเป็น โคลิฟอร์มที่ขาวเท่านั้น

2.2.3 นำ pcDNA3.1/His vector ที่มี A1 domain gene ที่ถูกต้องไปกระตุ้นให้เซลล์ COS-7 รับ vector เข้าสู่เซลล์ ด้วย DAEA-Dextran เซลล์ที่รับเอา vector เข้าไปจะทำการสร้าง recombinant A1 domain protein โดยขั้นตอนต่อไปนี้

- เลี้ยงเซลล์ประมาณ  $2 \times 10^6$  เซลล์ ใน flask ขนาด  $75 \text{ cm}^2$  ประมาณ 16 ชั่วโมง
- เปลี่ยน medium เป็น DMEM ที่ไม่มี fetal calf serum บ่มที่  $37^\circ \text{C}$  นาน 1 ชั่วโมง  
เปลี่ยน medium เป็น transfection reaction ซึ่งมีส่วนประกอบต่อ 1 flask ดังต่อไปนี้

DEAE-Dextran 500,000 MW	(10 mg/ml)	250	µl
Chloroquine (10 mM)		400	µl
DMEM		10	ml
Plasmid DNA		5	µg

บ่มที่ 37° C นาน 1 ชั่วโมง แล้วดูดสารละลายทิ้ง

3. shock ด้วย 10% DMSO ใน PBS (2 ml) นาน 2 นาที แล้วล้างด้วย DMEM ที่มี 10% fetal calf serum จำนวน 3 ml บ่มที่ 37° C ข้ามคืน
4. เปลี่ยน medium เป็น Optimem (Invitrogen)
5. บ่มนาน 48 ชั่วโมง

หลังจากบ่มครบตามกำหนดเวลาข้างต้นเซลล์ COS-7 จะถูกเก็บรวบรวมแล้วนำไปบดให้เซลล์แตกเป็นเนื้อเดียวกันใน phosphate buffer, pH 7.4 ด้วย Glass-Teflon homogenizer บนน้ำแข็ง นานครั้งละ 15 วินาที รวม 3 ครั้ง ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง A1 domain ด้วยวิธี SDS-PAGE ด้วย anti-Xpress antibody (Invitrogen; 1:2500 dilution) และ anti-VWF antibody (Dago Denmark; 1:200 dilution)

### 3. การผลิต Cys/Ser mutant recombinant A1 domain โดยวิธี site-directed mutagenesis

เริ่มต้นด้วยการผลิต Cys/Ser mutant recombinant A1 domain ที่ตำแหน่ง 1227 ก่อนโดยวิธีที่ใช้เป็นวิธีเดียวกับการผลิต wild type A1 domain gene ในข้อ 2 ยกเว้นการใช้ 5'-acgggatCCACAGTGATGTTGTCAA-3' เป็น forward primer หลังจากสกัดแยก plasmid ที่มี mutant gene แทรกอยู่ให้บริสุทธิ์แล้ว นำไปทำ site-directed mutagenesis ที่ตำแหน่ง 1234 แล้วต่อด้วยที่ตำแหน่ง 1237 ตามลำดับ forward primer และ reverse primer สำหรับการทำให้ mutagenesis ที่ตำแหน่ง 1234 คือ GTTGTCAACCTCACCAGTGAAGCCTGCCAGG และ CCTGGCAGGCTTCAC TGGTGAGGTTGACAAC ตามลำดับ ส่วน forward primer และ reverse primer สำหรับการทำให้ mutagenesis ที่ตำแหน่ง 1237 คือ CTCACCAGTGAAGCCAGCCAGAGCCGGGAG และ CTCCCGCTCCTGGCTGGCTTCACTGGTGAG ตามลำดับ (nucleotide ที่พิมพ์ด้วยตัวหนา คือ ตำแหน่งที่มี mutate จาก cysteine เป็น serine)

ปฏิกิริยาในการทำ PCR มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับการทำ PCR ในข้อ 2.1.1 แต่มี Cycle time and temperature ดังต่อไปนี้

Step 1	94 ° C	1	นาที
Step 2	94 ° C	0:10	นาที
Step 3	65 ° C	0:45	นาที
Step 4	68 ° C	10	นาที
Step 5	ซ้ำ step 2-4	15	รอบ
Step 6	68 ° C	25	นาที
Step 7	4 ° C	∞	

นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธี electrophoresis เทียบกับ DNA standard โดยใช้ 1% agarose gel ความต่างศักย์ 80 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง UV แล้วนำปฏิกิริยาจาก PCR ที่ได้มาตัดด้วย restriction enzyme *Dpn* I ซึ่งจะทำหน้าที่ตัด methylation DNA ของแบคทีเรีย เหลือไว้แต่ plasmid ที่สร้างขึ้นใหม่โดย ปฏิกิริยาประกอบด้วย

10 x Reaction buffer	2	μl
Acetylated BSA	0.2	μl
pcDNA3.1/His vector (Invitrogen)	1	μmol
<i>Dpn</i> I	0.5	μl
Nuclease-free water to	20	μl

#### 4. การเปรียบเทียบความสามารถในการละลายระหว่าง wild type recombinant A1 domain และ Cys/Ser mutant A1 domain

4.1 หลังจากทำ transient expression ของ recombinant A1 domain เป็นเวลา 2 วัน เซลล์ COS-7 จะถูกเก็บรวบรวมแล้วนำไปบดให้เซลล์แตกเป็นเนื้อเดียวกันเช่นเดียวกับที่กล่าวไปแล้วในหัวข้อ 2.2.3 จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 7,500 x g แยก supernatant และ pellet ออกจากกัน นำไปตรวจสอบว่า wild type และ mutant recombinant A1 domain ที่เซลล์สร้างขึ้นอยู่ใน fraction ใด โดยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting ด้วย anti-VWF antibody

4.2 ในบางครั้งเซลล์อาจสร้าง recombinant protein ในรูปของ membrane bound protein ซึ่งทำให้ไม่ละลายน้ำ เพื่อตรวจสอบว่า A1 domain ที่เซลล์ COS-7 สร้างขึ้นในการทดลองนี้อยู่ในรูปของ membrane bound protein หรือไม่ ทำโดยการเติม Triton X-100 (ความเข้มข้นสุดท้าย 1%) ลงใน phosphate buffer ผสมให้เข้ากันก่อนนำไป centrifuge แล้วแยก supernatant ออกจาก pellet ก่อนนำไปตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ immunoblotting

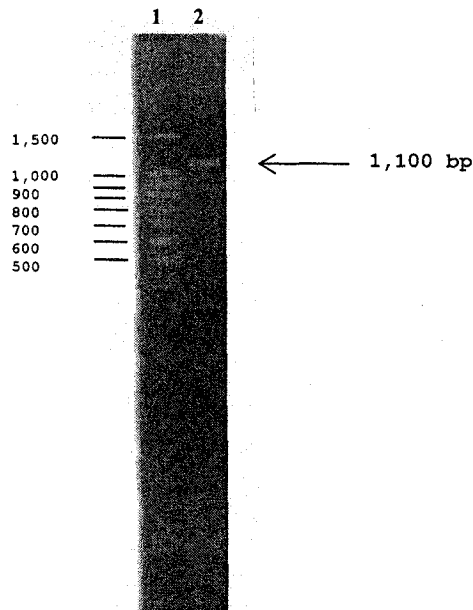


### บทที่ 3

#### ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

##### 1. Recombinant A1 domain gene ของ VWF ที่ได้จากการทำ PCR

ยีนที่ควบคุมการสร้าง A1 domain protein จาก genomic DNA ซึ่งถูกทำให้เพิ่มจำนวนด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยมี 5'-acggatCCACTGTGATGTTGTCAA-3' เป็น forward primer และ 5'-aatctaGACCAAGAAGCTGTGGTCA-3' เป็น reverse primer นั้น ตามทฤษฎีควรจะมียีนขนาด 1112 base pair หลังจากนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบโดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis พบว่าได้ขนาดของ gene ตามที่คาดการณ์ไว้ดังปรากฏในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การตรวจสอบ recombinant A1 domain gene ของ VWF ที่ได้จากการทำ PCR Lane 1: standard DNA marker, Lane 2: ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 1100 bp

หลังจากทำ PCR แล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น โดยใช้ PCR-Script™ Amp Cloning Kit (Stratagene) แล้วสกัดแยก plasmid DNA จากนั้นจึงนำ plasmid ที่มียีนควบคุมการสร้าง A1 domain ของ VWF ไปตรวจสอบลำดับการเรียงตัวของ nucleotide โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่าไม่มีความผิดพลาดเกิดขึ้นระหว่างขบวนการ PCR ดังปรากฏในรูปที่ 3a และ 3b

Human VWF: 3985 ccactgtgatggttgtcaacctcacctgtgaagcctgccaggagccgggaggcctggtggt 4044  
 |||  
 PCR: 129 ccactgtgatggttgtcaacctcacctgtgaagcctgccaggagccgggaggcctggtggt 188

Human VWF: 4045 gcctcccacagatgccccggtgagccccaccactctgtatgtggaggacatctcggaacc 4104  
 |||  
 PCR: 189 gcctcccacagatgccccggtgagccccaccactctgtatgtggaggacatctcggaacc 248

Human VWF: 4105 gccgttgcaagatttctactgcagcaggctactggacctggtcttctctgctggatggctc 4164  
 |||  
 PCR: 249 gccgttgcaagatttctactgcagcaggctactggacctggtcttctctgctggatggctc 308

Human VWF: 4165 ctccaggctgtccgaggctgagtttgaagtgctgaaggcctttgtggtggacatgatgga 4224  
 |||  
 PCR: 309 ctccaggctgtccgaggctgagtttgaagtgctgaaggcctttgtggtggacatgatgga 368

Human VWF: 4225 gcggctgcgcatctcccagaagtgggtccgcgtggccgtggtggagtaccacgacggctc 4284  
 |||  
 PCR: 369 gcggctgcgcatctcccagaagtgggtccgcgtggccgtggtggagtaccacgacggctc 428

Human VWF: 4285 ccacgcctacatcgggctcaaggaccggaagcgcaccgtcagagctgcccgcattgccag 4344  
 |||  
 PCR: 429 ccacgcctacatcgggctcaaggaccggaagcgcaccgtcagagctgcccgcattgccag 488

Human VWF: 4345 ccaggtgaagtatgcgggcagccagggtggcctccaccagcaggtcttgaatacacact 4404  
 |||  
 PCR: 489 ccaggtgaagtatgcgggcagccagggtggcctccaccagcaggtcttgaatacacact 548

Human VWF: 4405 gttccaaatcttcagcaagatcgaccgccctgaagcctcccgcacgcctctctctgat 4464  
 |||  
 PCR: 549 gttccaaatcttcagcaagatcgaccgccctgaagcctcccgcacgcctctctctgat 608

Human VWF: 4465 ggccagccaggagccccaacggatgtcccgaactttgtccgctacgtccagggcctgaa 4524  
 |||  
 PCR: 609 ggccagccaggagccccaacggatgtcccgaactttgtccgctacgtccagggcctgaa 668

Human VWF: 4525 gaagaagaaggtcattgtgatcccgggtggcattgggccccatgccaacctcaagcagat 4584  
 |||  
 PCR: 669 gaagaagaaggtcattgtgatcccgggtggcattgggccccatgccaacctcaagcagat 728

Human VWF: 4585 ccgcctcatcgagaagcaggcccctgagaacaaggccttcgtgctgagcagtggtgatga 4644  
 |||  
 PCR: 729 ccgcctcatcgagaagcaggcccctgagaacaaggccttcgtgctgagcagtggtgatga 788

Human VWF: 4645 gctggagcagcaaagggacgagatcggttagctacctctgtgaccttgcccctgaagcccc 4704  
 |||  
 PCR: 789 gctggagcagcaaagggacgagatcggttagctacctctgtgaccttgcccctgaagcccc 848

Human VWF: 4705 tctcctactctgnnnnnnacatggcacaagtcactgtgggcccggggctcttgggggt 4764  
 |||  
 PCR: 849 tctcctactctgccccccacatggcacaagtcactgtgggcccggggctcttgggggt 908

Human VWF: 4765 ttcgaccctggggcccaagagga 4787  
 |||  
 PCR: 909 ttcgaccctggggcccaagagga 931

**รูปที่ 3a** การเปรียบเทียบการจัดลำดับ nucleotide ระหว่าง VWF ของคนและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดย  
 ใช้ฐานข้อมูลจาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) ข้อมูลจากการใช้ forward primer.

Human VWF: 4231 gcgcatctcccagaagtgggtccgcgtggccgtggtggagtaccacgacggctcccacgc 4290  
 |||  
 PCR: 877 gcgcatctcccagaagtgggtccgcgtggccgtggtggagtaccacgacggctcccacgc 818

Human VWF: 4291 ctacatcgggctcaaggaccggaagcgcaccgtcagagctgcggcgcatcgccagccaggt 4350  
 |||  
 PCR: 817 ctacatcgggctcaaggaccggaagcgcaccgtcagagctgcggcgcatcgccagccaggt 758

Human VWF: 4351 gaagtatgcgggcagccaggtggcctccaccagcaggtcttgaatacacactgttcca 4410  
 |||  
 PCR: 757 gaagtatgcgggcagccaggtggcctccaccagcaggtcttgaatacacactgttcca 698

Human VWF: 4411 aatcttcagcaagatcgaccgccctgaagcctcccgcacgcctgctcctgatggccag 4470  
 |||  
 PCR: 697 aatcttcagcaagatcgaccgccctgaagcctcccgcacgcctgctcctgatggccag 638

Human VWF: 4471 ccaggagccccaacggatgtcccggaactttgtccgctacgtccagggcctgaagaagaa 4530  
 |||  
 PCR: 637 ccaggagccccaacggatgtcccggaactttgtccgctacgtccagggcctgaagaagaa 578

Human VWF: 4531 gaaggtcattgtgatcccgtgggcatgggccccatgccaacctcaagcagatccgcct 4590  
 |||  
 PCR: 577 gaaggtcattgtgatcccgtgggcatgggccccatgccaacctcaagcagatccgcct 518

Human VWF: 4591 catcgagaagcaggcccctgagaacaaggccttcgtgctgagcagtgatgatgagctgga 4650  
 |||  
 PCR: 517 catcgagaagcaggcccctgagaacaaggccttcgtgctgagcagtgatgatgagctgga 458

Human VWF: 4651 gcagcaaagggacgagatcgtagctacctctgtgaccttgcccctgaagcccctcctcc 4710  
 |||  
 PCR: 457 gcagcaaagggacgagatcgtagctacctctgtgaccttgcccctgaagcccctcctcc 398

Human VWF: 4711 tactctgnnnnnnacatggcacaagtcaactgtgggcccggggctcttgggggtttcgac 4770  
 |||  
 PCR: 397 tactctgccccccacatggcacaagtcaactgtgggcccggggctcttgggggtttcgac 338

Human VWF: 4771 cctggggcccaagaggaactccatggttctggatgtggcgcttcgtcctggaaggatcgga 4830  
 |||  
 PCR: 337 cctggggcccaagaggaactccatggttctggatgtggcgcttcgtcctggaaggatcgga 278

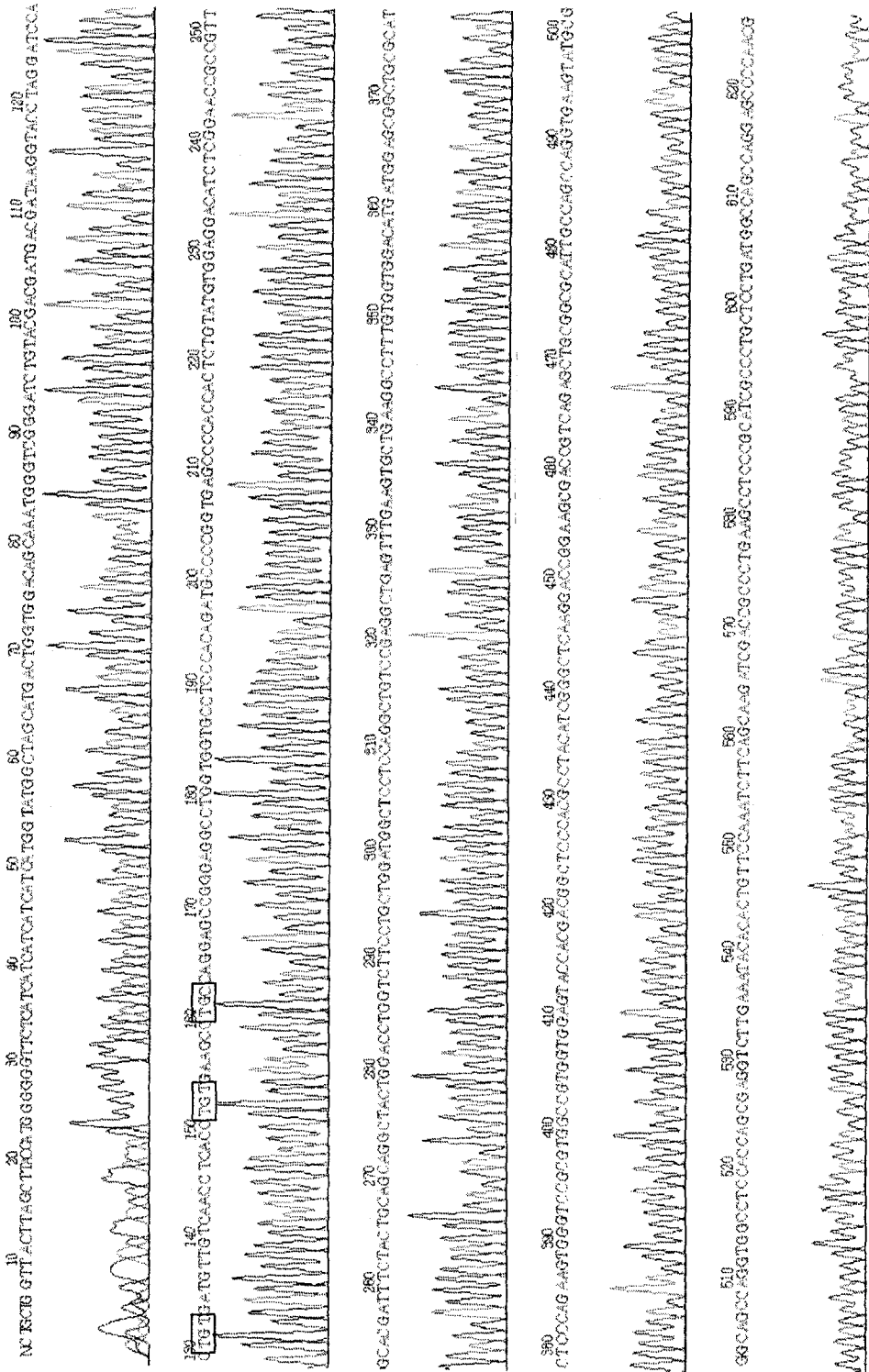
Human VWF: 4831 caaaattggtgaagccgacttcaacaggagcaaggagttcatggaggaggtgattcagcg 4890  
 |||  
 PCR: 277 caaaattggtgaagccgacttcaacaggagcaaggagttcatggaggaggtgattcagcg 218

Human VWF: 4891 gatggatgtgggcccaggacagcatccacgtcacgggtgctgcagtactcctacatggtgac 4950  
 |||  
 PCR: 217 gatggatgtgggcccaggacagcatccacgtcacgggtgctgcagtactcctacatggtgac 158

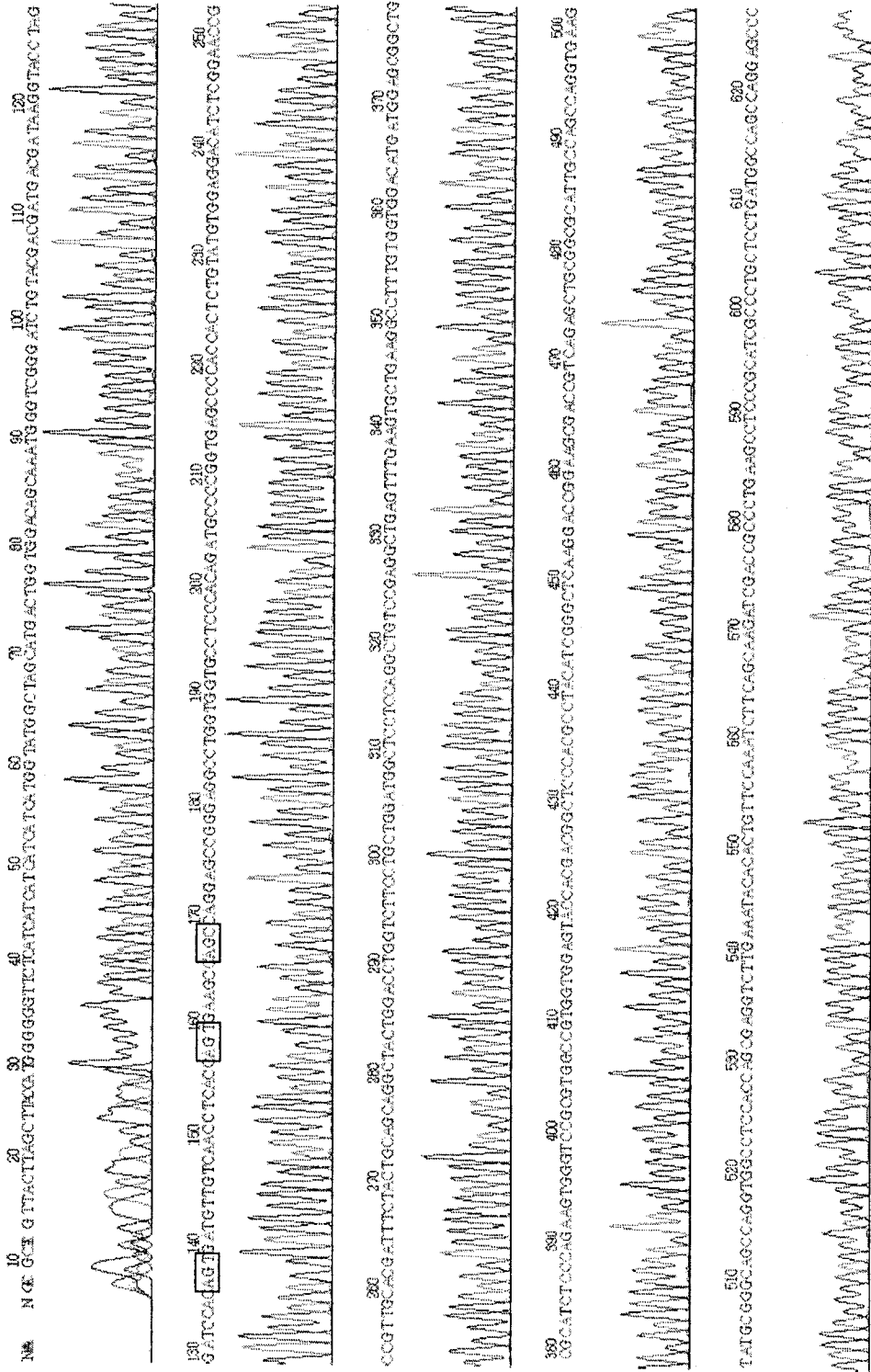
Human VWF: 4951 cgtggagtacccttcagcggagcacagtccaaaggggacatcctgcagcgggtgcgaga 5010  
 |||  
 PCR: 157 cgtggagtacccttcagcggagcacagtccaaaggggacatcctgcagcgggtgcgaga 98

Human VWF: 5011 gatccgctaccagggcggcaacaggaccaaacactgggctggccctgcgggtacctctctga 5070  
 |||  
 PCR: 97 gatccgctaccagggcggcaacaggaccaaacactgggctggccctgcgggtacctctctga 38

รูปที่ 3b การเปรียบเทียบการจัดลำดับ nucleotide ระหว่าง VWF ของคนและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) ข้อมูลจากการใช้ reverse primer



รูปที่ 4a Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Wild type A1 domain gene ในช่องสี่เหลี่ยมคือนิวคลีโอไทด์ที่เป็น codon สำหรับการสร้าง cysteine



รูปที่ 4b Chromatogram ที่ได้จากวิธีการหาคะห์การจลรียลำดับ nucleotide ของ Cys/Ser mutant A1 domain gene ในข้อ  
 สี่เหลี่ยมคือ nucleotide ที่ทำ site-directed mutagenesis เพื่อสร้าง serine แทน cysteine

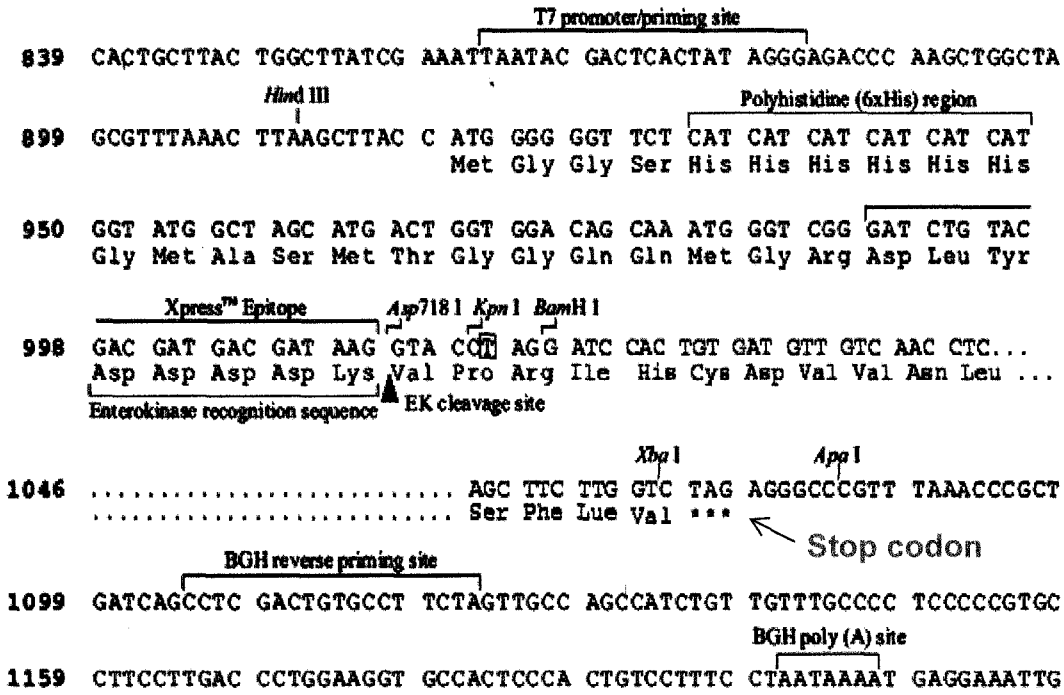
การเพิ่มจำนวนยีนที่ควบคุมการสร้าง VWF A1 domain จากการใส่ DNA เป็นต้นแบบ มีข้อได้เปรียบเหนือการใช้ cDNA เป็นต้นแบบซึ่งมีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ [21, 22] คือ ทำให้สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ตรวจสอบ gene ที่ควบคุมการสร้าง VWF ของคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรค VWD แบบที่ 2 ซึ่งมี mutation ของ A1 domain มีรายงานว่าพบตำแหน่งที่เกิด mutation อย่างน้อยที่สุด 10 ตำแหน่งบน A1 domain gene ในผู้ป่วยโรคนี้ มีทั้งที่เป็น single nucleotide, insert/deletion และ single amino acid polymorphism [23] ดังนั้น condition, forward primer และ reverse primer ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้จึงมีประโยชน์มากในการช่วยวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวกับ A1 domain ได้ นอกจากนี้การทำ PCR จาก DNA โดยตรงยังมีประโยชน์ต่อการศึกษา polymorphism ที่ต่างกัน ในคนปกติได้ เช่น การสำรวจการกระจายของ polymorphism ของ A1 domain ในคนไทย ซึ่งยังไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อน

รูป 4a และ 4b เป็น chromatogram จากการตรวจสอบลำดับ nucleotide แสดงให้เห็นว่า mutant plasmid มี insert ที่เป็น A1 domain gene ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลง nucleotide 3 ตำแหน่ง อันจะทำให้เกิดการสร้าง serine แทน cysteine ทำให้กรดอะมิโนในโครงสร้างของ A1 domain มี cysteine เพียงแค่ 2 ตัวเท่านั้น cysteine ที่เหลือ 2 ตัวนี้มีความจำเป็นในการสร้าง disulfide bond เพื่อการสร้างเป็น domain

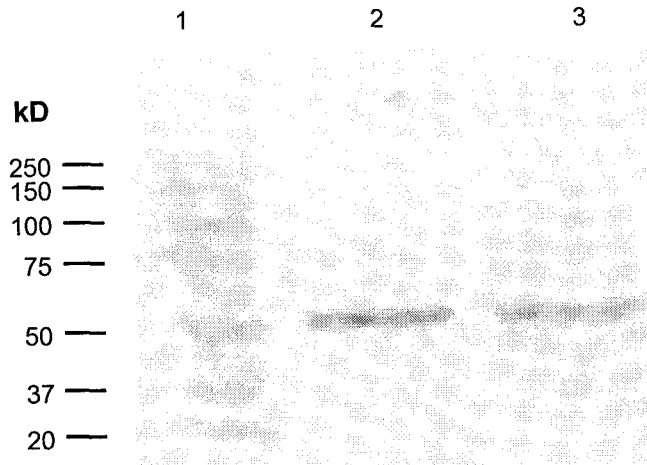
จากผลการตรวจสอบการเรียงลำดับ nucleotide พบว่า A1 domain gene สอดเข้าสู่ pcDNA3.1/His vector อย่างถูกต้อง (in frame) ดังแสดงให้เห็นง่ายขึ้นในรูปที่ 5 ทำให้มั่นใจได้ว่า เซลล์จะสามารถสร้าง VWF A1 domain ที่มีกรดอะมิโนในสาย polypeptide ของ A1 domain อย่างถูกต้อง นอกเหนือจากส่วนที่เป็น A1 domain แล้ว pcDNA3.1/His vector ยังประกอบด้วย gene ส่วนที่ควบคุมการสร้างสิ่งต่อไปนี้

- 1) Xpress epitope เพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน
- 2) Hexahistidine tag เพื่อประโยชน์ในการสกัดแยก A1 domain protein โดยใช้ Ni-NTA resin
- 3) Enterokinase cleavage site เพื่อประโยชน์ในการตัดสายของอะมิโนส่วนที่ไม่ใช่ A1 domain protein ออกไปก่อนที่จะนำ A1 domain protein ไปศึกษาโครงสร้างต่อไป ส่วนที่จำเป็นต้องตัดออก ได้แก่ Xpress epitope และ hexahistidine tag เป็นต้น โครงสร้างของ A1 domain หลังการตัดด้วยเอนไซม์ enterokinase จะมี amino acid sequence เหมือน native A1 domain

ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้เซลล์ COS-7 ซึ่งเป็นเซลล์ของสัตว์ในการผลิต A1 domain แทนการผลิตในแบคทีเรีย เนื่องจากมีวัตถุประสงค์เพื่อให้โปรตีนที่สร้างขึ้นมีส่วนของ glycosylation



รูปที่ 5 การจัดเรียงตัวของ nucleotide ใน pcDNA3.1/His vector ที่มี recombinant VWF A1 domain gene แทรกอยู่ ภายใน vector ซึ่งพิมพ์ด้วยอักษรสีดำ ประกอบด้วย Xpress epitope, hexahistidine tag และ enterokinase cleavage site ส่วนที่เป็นตัวอักษรสีแดง คือ recombinant VWF A1 domain gene ซึ่งถูกแทรกเข้า vector ในบริเวณที่เป็น BamH I และ Xba I restriction sites

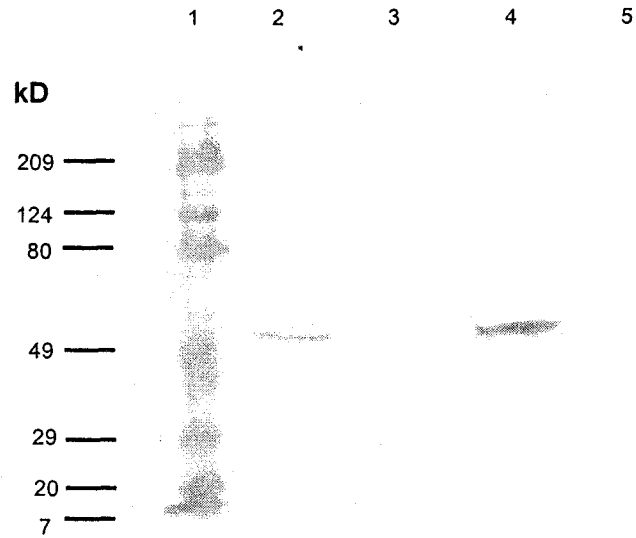


รูปที่ 6 การแสดงออกของ wild type recombinant VWF A1 domain gene โดยเซลล์ COS-7 โปรตีนที่ได้จาก homogenate ของ transfected cell ถูกแยกโดย SDS-PAGE (7.5 %) จากนั้นจึงทำการตรวจด้วยวิธี Western blot โดย Lane ที่ 1 = molecular weight marker; lane 2 = cell homogenate ตรวจด้วย anti-Xpress antibody; lane 3 = cell homogenate ตรวจด้วย anti-VWF antibody ตัวเลขทางซ้ายมือคือขนาดโมเลกุลของ standard หน่วย เป็น kD

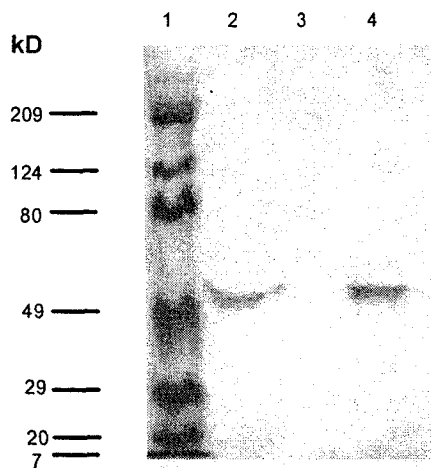
Amino Acid Sequence ของ recombinant A1 domain				
<p>MGGSHHHHHHGMASMTGGRDLTDDDDLVP LIHCDVVNLT            CEACOEPPGGLVVPPTDAPVSPPTLYVEDISEPPLHDFYCSRL            LDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISOKWVRV            AVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASOVKYAGSOVASTS            EVLKYTLFOIFSKIDRPEASRIALLMASOEPORMSRNFVRY            VOGLKKKKVVIVIPVGIGPHANLKOIRLIEK OAPENKAFVLSL            VDELEOORDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPHMAOQVTVGPGLL            GVSTLGPKRNSMVL DVAFVLE GSDKIGEADFNRSKEFMEEY            IQRMDVGGODSIHVTVL OYSYMTVEYPPFSEAOSKGDILQRV            REIRYQGGNRTNTGLALRYLS DHSFLV</p>				
		Average Mass: 44524.1212		Sequence Length: 398
Symbols		Name		Count
Ala A	Alanine	Mono Mass	Average Mass	23
Arg R	Arginine	71.03711	71.07880	25
Asn N	Asparagine	156.10111	156.1876	8
Asp D	Aspartic Acid	114.04293	114.1039	25
Cys C	Cysteine	115.02694	115.0886	5
Glu E	Glutamic Acid	103.00919	103.1448	27
Gln Q	Glutamine	129.04259	129.1155	19
Gly G	Glycine	128.05858	128.1308	25
His H	Histidine	57.02146	57.0520	14
Ile I	Isoleucine	137.05891	137.1412	19
Leu L	Leucine	113.08406	113.1595	41
Lys K	Lysine	113.08406	113.1595	18
Met M	Methionine	128.09496	128.1742	12
Phe F	Phenylalanine	131.04049	131.1986	13
Pro P	Proline	147.06841	147.1766	23
Ser S	Serine	97.05276	97.1167	32
Thr T	Threonine	87.03203	87.0782	15
Trp W	Tryptophan	101.04768	101.1051	1
Tyr Y	Tyrosine	186.07931	186.2133	13
Val V	Valine	163.06333	163.1760	40

รูปที่ 7 การคำนวณหาขนาดของ recombinant A1 domain สาย polypeptide ของ recombinant A1 domain ที่ผลิตได้ประกอบด้วย amino acid 398 ตัว ดังที่แสดงอยู่ในแถบบนสุดของตาราง หลังจากคำนวณขนาดของ recombinant A1 domain โดย software จาก website <http://proteome.gs.washington.edu> พบว่า predicted molecular weight ของ recombinant A1 domain ควรจะมีขนาดประมาณ 44.5 kD โดยขนาดดังกล่าวยังไม่รวมน้ำหนักของส่วนที่เป็น glycosylation





**รูปที่ 8** การเปรียบเทียบความสามารถในการละลายใน PBS ระหว่าง wild type และ mutant VWF A1 domain protein Lane ที่ 1= molecular weight marker; lane 2 = pellet ของ wild type; lane 3 = supernatant ของ wild type; lane 4 = pellet ของ mutant; lane 5 = supernatant ของ mutant ตรวจด้วย anti-VWF antibody ตัวเลขทางซ้ายมือคือขนาดโมเลกุลของ standard หน่วย เป็น kD



**รูปที่ 9** การตรวจสอบการละลายของ mutant VWF A1 domain ใน 1% Triton X-100 Lane ที่ 1= molecular weight marker; lane 2 = cell homogenate; lane 3 = supernatant; lane 4 = pellet ตรวจด้วย anti-VWF antibody ตัวเลขทางซ้ายมือคือขนาดโมเลกุลของ standard หน่วย เป็น kD

เช่นเดียวกับโปรตีนของคน รูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ COS-7 มีการแสดงออกของ A1 domain gene เนื่องจากทั้ง anti-VWF antibody ซึ่งจับกับ natural VWF และ anti-Xpress antibody ซึ่งจับกับ epitope ที่ไม่พบในธรรมชาติ สามารถทำให้เกิด band ได้โดยวิธี immunoblotting ขนาดของโปรตีนที่ตรวจวัดได้เป็นไปตามที่คำนวณได้ดังแสดงไว้ในรูปที่ 7 โดยน้ำหนักที่เกินมาประมาณ 5 kD น่าจะเป็นน้ำหนักของส่วนที่เป็น glycosylation part เนื่องจาก host cell ที่ใช้ผลิตโปรตีนเป็นเซลล์ของสัตว์ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

ในการศึกษาโครงสร้างของ recombinant protein จำเป็นจะต้องทำการสกัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ในการวิจัยระยะยาวต่อจากงานวิจัยนี้ได้วางแผนในการสกัดโปรตีนด้วย Ni-NTA resin โดยได้เลือก vector ที่มี hexahistidine tag แต่คุณสมบัติที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของโปรตีนที่จะทำให้สามารถใช้วิธีนี้ในการสกัดแยกคือ ความสามารถในการละลายของโปรตีนในสารละลาย จากผลการทดลองที่แสดงไว้ในรูปที่ 8 และ 9 พบว่า recombinant A1 domain ที่ผลิตได้จากเซลล์ COS-7 นั้นไม่ละลายทั้งในน้ำและใน 1% Triton X-100 ซึ่งให้เห็นว่า recombinant A1 domain ไม่ใช่ทั้ง soluble protein หรือ membrane bound protein และมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดขบวนการพับของโปรตีนต่างไปจาก native A1 domain ในคน หรือที่เรียกว่า misfold ทำให้โปรตีนเกิดการเกาะตัวกัน (aggregation) และตกตะกอน อันจะทำให้ส่วนที่เป็น hexahistidine tag ไม่เปิดออกจับกับ Ni<sup>+</sup> resin และน่าจะเกิดปัญหาในการสกัดแยก วิธีการแก้ไขที่เป็นไปได้มีอย่างน้อย 2 ทาง คือ

- 1) การใช้วิธีการสกัดแยกโดยวิธี denaturing method คือการ unfold โปรตีนด้วย guanidine เพื่อให้ hexahistidine tag เปิดออกและจับกับ resin ได้ หลังจากนั้นจึงทำการ refold โปรตีนโดยการ dialyze ด้วย glutathione ทำนองเดียวกับการศึกษาที่ได้มีผู้รายงานมาก่อนหน้านี้ถึงการตกตะกอนของ recombinant A1 domain ซึ่งเซลล์ผลิตออกมาในรูปของ inclusion body [21, 22]
- 2) การออกแบบให้ recombinant A1 domain มีส่วนที่เป็น release signal peptide ซึ่งจะช่วยให้เซลล์ขับโปรตีนที่สร้างขึ้นออกมาใน medium ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างมาก เมื่อเทียบกับปริมาณของสารน้ำภายในเซลล์ โอกาสที่โปรตีนจะตกตะกอนจะมีน้อยลง อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีขั้นตอนที่ยู้งยากกว่าวิธีที่ 1 มาก จึงควรทดลองใช้วิธีที่ 1 ก่อน

## บทที่ 4

### บทสรุป

ในงานวิจัยชิ้นนี้ผู้วิจัยได้ทำการผลิต recombinant VWF A1 domain ได้จากเซลล์ COS-7 ซึ่งเป็นเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้สำเร็จ อันจะทำให้โปรตีนที่สร้างขึ้นมีส่วนที่เป็น glycosylation เช่นเดียวกับ native A1 domain ของคน A1 domain ที่เซลล์ผลิตขึ้นมีขนาดประมาณ 50 kD ซึ่งเกิดจากการโคลนโดยใช้ genomic DNA เป็นต้นแบบ ซึ่ง condition ต่าง ๆ ในการทำ PCR ที่ออกแบบขึ้นจะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม VWD ชนิดที่ 2 นอกจากนี้การทำ PCR จาก genomic DNA โดยตรงยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษา polymorphism ที่ต่างกันของคนได้ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาการกระจายของ polymorphism ของ A1 domain ในคนไทย อย่างไรก็ตาม พบว่า recombinant VWF A1 domain protein ที่ผลิตได้ทั้ง wild type และ mutant ซึ่งเปลี่ยน cysteine ที่ไม่จำเป็นต่อการสร้าง domain ทั้ง 3 ตัวไปเป็น serine แล้วนั้น ไม่สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและใน 1% Triton X-100 ดังนั้นในการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างของ VWF A1 domain ในการวิจัยขั้นต่อไปจึงควรใช้วิธี denaturing purification method หลังจากสกัดแยกให้บริสุทธิ์แล้วจึงทำการ refold ให้ได้โครงสร้างเดิม

**บรรณานุกรม**

1. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco L and Hellums JD. (1988). Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. Blood. 71:1366-1374.
2. Sugimoto M and Miyata S. (2002). Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. Int. J. Hematol. 75:19-24.
3. van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, Heijnen HFG, Connolly T M, de Groot PG and Sixma JJ. (1994). Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. J. Clin. Invest. 93:615-632.
4. Ruggeri ZM. (1999). Structure and function of von Willebrand factor. Throm. Haemost. 82: 576-584.
5. Hoyer LM and Shainoff JR. (1980). FactorVIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. Blood. 55:1056-1059.
6. Ruggeri ZM and Zimmerman TS. (1981). The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. Blood. 57:1140-1143.
7. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, Roberts JR, Kostel P, Ruggeri ZM, and Zimmerman TS. (1987). A heparin-binding domain of human von Willebrand factor: characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. J. Biol. Chem. 262:1734-1739.
8. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, Russell SR, Roberts JR, Elder JH, Ruggeri ZM, and Zimmerman TS. (1986). von Willebrand factor: a reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. J. Biol. Chem. 261:381-385.
9. Ginsburg D and Sadler JE. (1993). von Willebrand disease: a data base of point mutations, insertions and deletions. Thromb. Haemost. 69:177-184.
10. Sadler JE, Matsushita T, Dong Z, Tuley EA, and Westfield LA. (1995). Molecular mechanism and classification of von Willebrand disease. Thromb. Haemost. 74:161-166.

11. Berndt MC, Du X, and Booth WJ. (1988). Ristocetin-dependent reconstitution of binding of von Willebrand factor to purified human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. Biochemistry. 27:633-640.
12. Andrews RK, Booth WJ, Gorman JJ, Castaldi PA, and Berndt MC. (1989). Purification of botrocetin from Bothrops jararaca venom: analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. Biochemistry. 28:8317-8326.
13. Berndt MC, Ward CM, Booth WJ, Castaldi PA, Mazurov AV, and Andrews RK. (1992). Identification of aspartic acid 514 through glutamic acid 542 as a glycoprotein Ib-IX complex receptor recognition sequence in von Willebrand factor: mechanism of modulation of von Willebrand factor by ristocetin and botrocetin. Biochemistry. 31:11144-11151.
14. Matsui T and Hamako J. (2005). Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. Toxicon. 45:1075-1087.
15. Dong J-F, Berndt MC, Schade A, McIntire LV, Andrews RK, and López JA. (2001). Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions. Blood 97:162-168.
16. Celikel R, Ruggeri ZM, and Varughese KI. (2000). von Willebrand factor conformation and adhesive function is modulated by an internalized water molecule. Nature Struct. Biol. 7:881-884.
17. Emsley J, Cruz MA, Handin RI, and Liddington R. (1998). Crystal structure of the von Willebrand factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. J. Biol. Chem. 273:10396-10401.
18. Jenkins PV, Pasi KJ, and Perkins SJ. (1998). Molecular modeling of ligand and mutation sites of the type A domains of human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease. Blood. 91:2032-2044.
19. Kang M and Kermode JC. (2001). Correlation between changes in conformation and function of von Willebrand factor. FASEB J. 15:A592 (abstract).
20. Kang M and Kermode JC. (2002). Ristocetin promotes parallel changes in the susceptibility of von Willebrand factor to elastase digestion and in its binding to the platelet. FASEB J. 16:A204 (abstract).

21. Zhu H, Wang Y, Jiang M, Ji S, Bai X and Ruan C. (2005). Generation and characterization of a recombinant single chain Fv antibody to von Willebrand factor A1 domain from phage display library. Thromb. Res. 116: 385-391.
22. Cruz MA, Handin RI and Wise RJ. (1993). The interaction of the von Willebrand factor-A1 domain with platelet glycoprotein Ib/IX. The role of glycosylation and disulfide bonding in a monomeric recombinant A1 domain protein. J. Biol. Chem. 268: 21238-21245.
23. Goodeve A and Peake I. (2001). A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. Best Practice & Research Clinical Haematology. 14: 235-240.

## ภาคผนวก ก

**NZY<sup>+</sup> broth (1 Litter)**

NZ amine (casein hydrolysate)	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g
Deionized H <sub>2</sub> O to	1000	ml

ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 โดยใช้ 5 N NaOH แล้วนำไป autoclave ก่อนนำไปใช้ให้เต็มสารที่ปราศจากเชื้อ ดังต่อไปนี้

1 M MgCl <sub>2</sub>	12.5	ml
1 M MgSO <sub>4</sub>	12.5	ml
20% (w/v) glucose	20	ml

**LB broth (1 Litter)**

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g
Deionized H <sub>2</sub> O to	1000	ml

ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 โดยใช้ 5 N NaOH แล้วนำไป autoclave เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

**LB agar (1 Litter)**

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g
Agar	20	g
Deionized H <sub>2</sub> O to	1000	ml

ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 โดยใช้ 5 N NaOH แล้วนำไป autoclave ทิ้งให้เย็นลงประมาณ 55°C ก่อนนำไปเทใน Petri dish (ประมาณ 25 ml/100-mm plate)

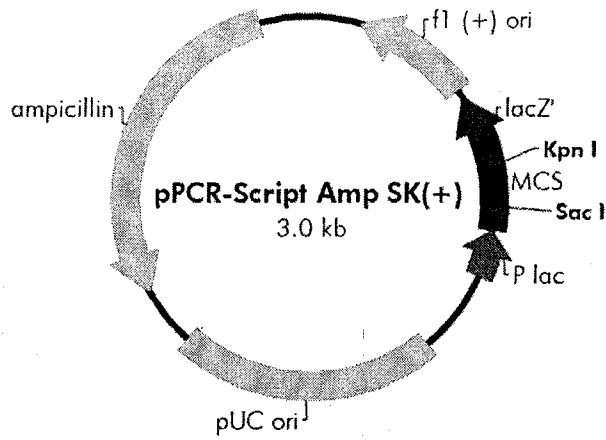
**LB-ampicillin Agar (1 Litter)**

นำ LB agar ที่ autoclave แล้ว ึ่งให้เย็นลงประมาณ 55°C เติม สารละลาย ampicillin ที่ปราศจากเชื้อ ความเข้มข้น 10 mg/ml จำนวน 10 ml ก่อนนำไปเทใน Petri dish (ประมาณ 25 ml/100 mm plate)

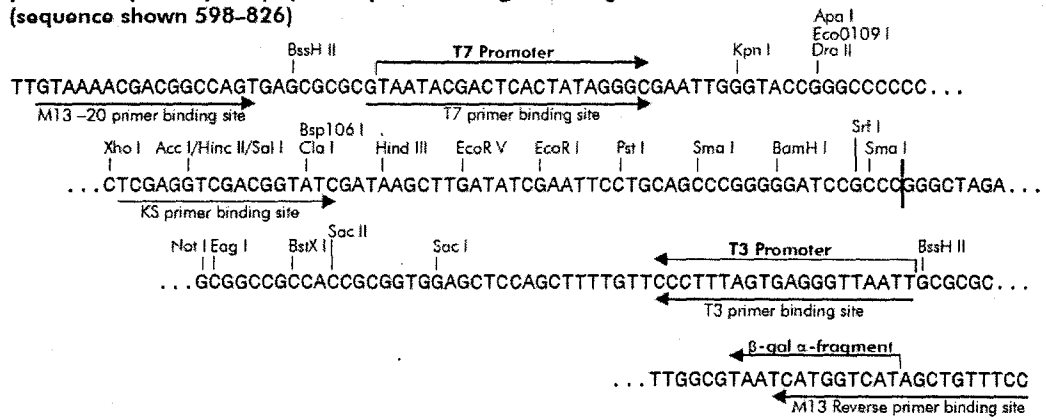


ภาคผนวก ข

pPCR-Script Amp SK(+) Vector Map



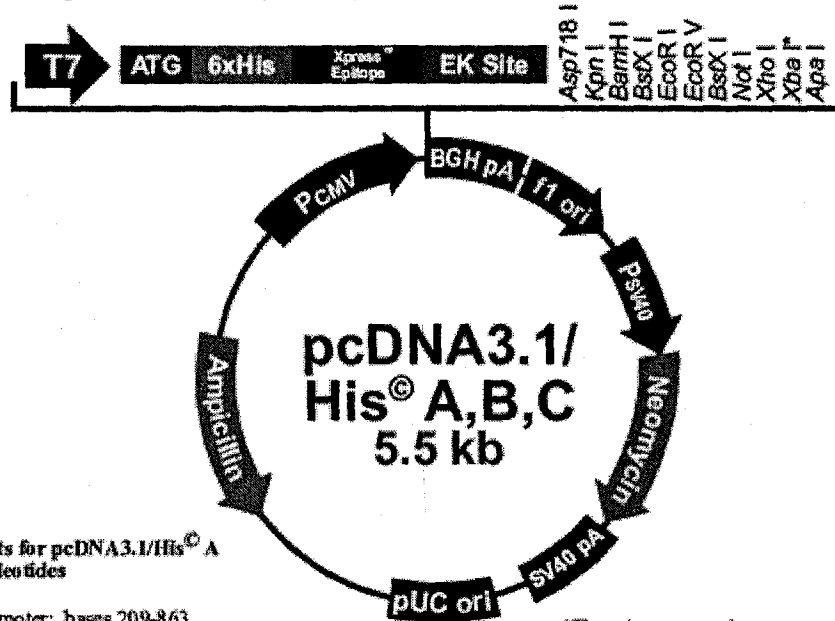
pPCR-Script Amp SK(+) Multiple Cloning Site Region  
(sequence shown 598-826)



## pcDNA3.1 His Vector Map

Map of  
pcDNA3.1/His<sup>®</sup>

The figure below summarizes the features of the pcDNA3.1/His vectors. The sequences for pcDNA3.1/His A, B, and C are available for downloading from our Web site ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) or by contacting Technical Service (see page 10). Details of the multiple cloning sites are shown on page 2 for pcDNA3.1/His A, page 3 for pcDNA3.1/His B, and page 4 for pcDNA3.1/His C.



Comments for pcDNA3.1/His<sup>®</sup> A  
5514 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863  
 T7 promoter/priming site: bases 863-882  
 ATG initiation codon: bases 920-922  
 Polyhistidine region: bases 932-949  
 Xpress<sup>™</sup> epitope: bases 989-1012  
 Enterokinase recognition site: bases 998-1012  
 Multiple cloning site: bases 1012-1085  
 BGH reverse priming site: bases 1105-1122  
 BGH polyadenylation signal: bases 1104-1318  
 f1 origin: bases 1381-1794  
 SV40 early promoter and origin: bases 1859-2183  
 Neomycin resistance gene: bases 2219-3013  
 SV40 polyadenylation signal: bases 3029-3268  
 pUC origin: bases 3700-4373 (Complementary strand)  
 Ampicillin resistance gene: bases 4518-5379 (Complementary strand)

\*There is a stop codon following the Xba I site in version A.



### ประวัติผู้วิจัย

นวลน้อย จุฑะพงษ์จบการศึกษาปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิตจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2528 ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยาจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2536 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาวิชา Pharmacology and Toxicology จาก University of Mississippi Medical Center ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี พ.ศ. 2546 ปัจจุบันทำงานเป็นอาจารย์ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา