

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

พลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะ

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

- 5 เทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องพลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะ

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- ในปัจจุบัน ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic resistance) ได้ทวีความรุนแรงจนกลายเป็นวิกฤตในระดับโลก (global crisis) ทำให้เกิดความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการพัฒนายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ (novel antibiotics) โดยเฉพาะยาที่ได้จากสารธรรมชาติ (natural products) เช่น ไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง (high bioactivity) โดยมีความสามารถในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibition) ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) อย่างมีจำเพาะเจาะจง

- ไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) เป็นสารปฏิชีวนะจากธรรมชาติที่มีโครงสร้างวงใหญ่ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไทอะโซล (thiazole rings) และไพเพอริดีน (piperidine ring) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของไรโบโซมแบคทีเรีย (bacterial ribosome) โดยเฉพาะในตำแหน่งโปรตีนแอล11 (L11) หรือโปรตีนอีเอฟ-ทู (EF-Tu) แล้วแต่ชนิดของสาร ซึ่งไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) แสดงศักยภาพในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา (multidrug-resistant bacteria) เช่น เชื้อสแตฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) เชื้อคลอสทริเดียม ดิฟฟิซิล (*Clostridium difficile*) เชื้อสแตฟิโลคอคคัส ออเรียส ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน หรือ เอ็มอาร์เอส (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) และเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ที่ดื้อต่อยาวานโคมัยซิน หรือ วีโออาร์อี (*vancomycin-resistant Enterococcus*; VRE)

- อย่างไรก็ตาม การพัฒนาสารกลุ่มนี้ในระดับอุตสาหกรรมยังคงประสบข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ โครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน (complex chemical structure) ทำให้การสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) ของไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) มีต้นทุนสูงและไม่คุ้มค่าเชิงพาณิชย์ ผลผลิตจากธรรมชาติที่ต่ำ (low natural yield) จุลินทรีย์ที่ผลิตไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) โดยธรรมชาติมักให้ผลผลิตต่ำ ไม่เหมาะสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ความเข้าใจต่อเส้นทางชีวสังเคราะห์ (biosynthetic pathway) ที่ยังจำกัด การควบคุมและดัดแปลงชุดยีนการสร้างสาร (biosynthetic gene cluster) ยังมีข้อจำกัดด้านประสิทธิภาพ และการคัดเลือกโคลนที่ดัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified clones) ยังคงพึ่งพายีนต้านยาทั่วไป (common antibiotic resistance genes) เช่น ยีนบีแอลเอ (*bla*), ยีนเคเอเอ็น (*kan*) ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety concern) และการแพร่กระจายยีนต้านยา (gene dissemination)

จากการสืบค้นข้อมูลพบบงานวิจัย/คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้อง พบข้อมูลดังนี้

- สิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา เลขที่ US 7,910,130 B2 เป็นการผลิตไทโอสเตรปตอน (thiostrepton) ในแบคทีเรียสกุลสเตรปโตไมซีส (*Streptomyces* spp.) ที่ดัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้ตัวควบคุมการแสดงออกแบบ
- 35 ชนิดปรับตัวได้ (inducible)

คำขอรับสิทธิบัตรระหว่างประเทศ เลขที่ประกาศโฆษณา WO2017034567A1 ได้ทำการประดิษฐ์ชุดยีนสังเคราะห์สำหรับการผลิตไทโอเปปไทด์ชนิดจีอี 2270 (GE2270) และระบบพลาสมิดชัตเทิล โดยออกแบบและสร้างชุดยีนสังเคราะห์ (synthetic biosynthetic gene cluster) สำหรับการผลิตไทโอเปปไทด์ (thiopeptide) โดยเฉพาะจีอี 2270 (GE2270) ซึ่งเป็นไทโอเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพสูง โดยเฉพาะต่อ

5 แบคทีเรียแกรมบวก เช่น เชื้อสแตฟีโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) และเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีเซียม (*Enterococcus faecium*) ซึ่งรวมถึงสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเอ็มอาร์เอสเอ และวีอาร์อี (MRSA และ VRE) ซึ่งเวกเตอร์แบบชัตเทิล (Shuttle Vector) ที่ใช้ในสิทธิบัตรนี้เป็นพลาสมิดที่สามารถจำลองตัวเองได้ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น เชื้อเอสเชอริเชีย โคลิ (*Escherichia coli*) และเชื้อสเตรปโตไมซิส (*Streptomyces* spp.) ซึ่งช่วยให้สามารถสร้างและปรับแต่งพลาสมิดใน *Escherichia coli* ได้ง่าย ก่อนที่จะ

10 นำไปใช้ใน *Streptomyces* spp. เพื่อการผลิตจีอี 2270 (GE2270)

คำขอรับสิทธิบัตรจีน เลขที่คำขอ CN108238711A เป็นการพัฒนายาปฏิชีวนะใหม่ (novel antibiotics): ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างไทโอเปปไทด์ (thiopeptide) และปรับปรุงโฮสต์ผลิต โดยการประยุกต์ใช้ยีนที่ดื้อต่อไทโอเปปไทด์ (thiopeptide) คือ ยีนทีเอสอาร์ (*tsr*) และยีนทีพีอาร์ (*tpeR*) ซึ่งเป็นยีนคัดเลือกในเวกเตอร์ตัดต่อยีน (gene editing vectors)

15 แต่ระบบที่มีอยู่ยังใช้ยีนต้านยาปฏิชีวนะทั่วไป ซึ่งมีความเสี่ยงในการนำไปใช้กับโฮสต์อื่นหรือการใช้ในเชิงอาหารหรือยา และการผลิตยังคงขึ้นกับสายพันธุ์ธรรมชาติที่มีผลผลิตต่ำ อีกทั้งการแสดงออกของชุดยีนสังเคราะห์ต่างสายพันธุ์ (heterologous expression) ยังประสบปัญหาเรื่องความเข้ากันได้ของโฮสต์และโปรโมเตอร์ (promoter)

ดังนั้น ผู้ประดิษฐ์จึงได้ดัดแปลงโครงสร้างของไทโอเปปไทด์ (thiopeptide) โดยออกแบบพาหะพ

20 ลาสมิดใหม่ (engineered plasmid vectors) ที่สามารถบรรจุชุดยีนสังเคราะห์ของไทโอเปปไทด์ (thiopeptide) ได้ครบถ้วน และมีโปรโมเตอร์ (promoter) ที่ควบคุมได้ (regulatable expression systems) ซึ่งใช้ยีนต้านยาเฉพาะกลุ่มไทโอเปปไทด์ (thiopeptide-specific resistance genes) คือ *tsr*, *tpeR* ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายคัดเลือก (selection markers) ที่ปลอดภัยและจำเพาะ และมีโฮสต์ซึ่งเลือกได้จากเชื้อสเตรปโตไมซิส (*Streptomyces* spp.) หรือเชื้อบาซิลลัส ซับไทลิส (*Bacillus subtilis*) หรือเชื้อเอส

25 เชอริเชีย โคลิ (*Escherichia coli*) ที่ได้รับการดัดแปลงโรโบโซมให้สามารถทนต่อสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เพื่อใช้ในการแสดงออกของยีนที่ต้องการและลดการใช้ยาปฏิชีวนะ

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

พลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไทโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะ เป็นการดัดแปลงลำดับเบสของพลาสมิดพาหะให้มีการแสดงออกของยีนไทโอเปปไทด์ (thiopeptide) ดัดแปลงทดแทนยีนต้านยา

30 ปฏิชีวนะ เพื่อใช้ในการคัดเลือกโคลนร่วมกับเซลล์ต้นแบบพร่องยีนไทโอเปปไทด์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกของโปรตีน โดยพลาสมิดพาหะที่ประดิษฐ์ขึ้นนี้จะทำให้เกิดความสะดวกมากขึ้นในการคัดเลือกเซลล์ต้นแบบที่มีพลาสมิดที่มีโปรตีนที่ต้องการโดยไม่ใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิด และลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อโปรตีนที่ต้องการใช้ยาปฏิชีวนะในการคัดเลือกโคลน รวมถึงการสร้างเซลล์ต้นแบบที่มีพลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไทโอเปปไทด์อย่างจำเพาะ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการศึกษาโปรตีนในด้านต่างๆ เพื่อ

35 ก่อให้เกิดองค์ความรู้ที่จะสามารถพัฒนาต่อยอดไม่ว่าจะในแง่ของการพัฒนายาต่อเชื้อโรคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นโรคจากพืช หรือสัตว์ หรือใช้ในการศึกษาคุณสมบัติโปรตีนชนิดใหม่ที่มีความสำคัญต่อการเป็นเป้าหมายของยา

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการสร้างโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นภายในเซลล์ต้นแบบแบคทีเรียพร่องยีนไฮโอเปปไทด์ (thiopeptide) หรือ เซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอเปปไทด์ โดยใช้พลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไฮโอเปปไทด์อย่างจำเพาะในการคัดเลือกโคลนทดแทนการใช้ยีนดื้อยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันผลกระทบของยาปฏิชีวนะต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เราสนใจ และทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกเชื้อที่มียีนที่เราต้องการเนื่องจากเซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอ หรือ เซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอเปปไทด์นั้นจะเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีการเติมโรมิซิน แต่หากในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีโรมิซินเซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอเปปไทด์จะเจริญเติบโตได้ต่อเมื่อได้รับพลาสมิดพาหะที่มียีนไฮโอเปปไทด์อยู่ ส่วนเซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอเปปไทด์จะเจริญเติบโตได้เมื่อได้รับพลาสมิดพาหะที่มียีนไฮโอเปปไทด์อยู่ ทำให้เซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอเปปไทด์ หรือ เซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอเปปไทด์นั้นสามารถผลิตโรมิซินได้เอง เมื่อได้พลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไฮโอเปปไทด์อย่างจำเพาะแล้ว จะนำพลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไฮโออย่างจำเพาะดังกล่าวทรานส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอเปปไทด์ หรือ เซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอเปปไทด์ เพื่อสร้างเซลล์ต้นแบบพร่องยีนไฮโอเปปไทด์ที่มีพลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไฮโอเปปไทด์อย่างจำเพาะตามการประดิษฐ์นี้

พลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไฮโอเปปไทด์อย่างจำเพาะดังรูปที่ 1 มีองค์ประกอบตามลำดับในทิศทางจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ดังนี้

- (ก) ลำดับเบสของเทอร์มินเตอร์ที่ 2 (T2 terminator)
- (ข) ตำแหน่งการโคลนยีนแบบกลุ่ม (multiple cloning site)
- (ค) ลำดับเบสของโปรโมเตอร์ที่ 2 (T2 promoter)
- (ง) ลำดับเบสที่ควบคุมจำนวนพลาสมิด (repressor of primer, ROP)
- (จ) ลำดับเบสเริ่มต้นการสร้างพลาสมิด (pBR223 Ori)
- (ฉ) ยีนไฮโอเปปไทด์ที่ผ่านการดัดแปลงลำดับเบส
- (ช) ลำดับเบสของโปรโมเตอร์ยีนไฮโอเปปไทด์ (thiopeptide promoter)

ที่มีลักษณะเฉพาะคือ ยีนไฮโอเปปไทด์ที่ผ่านการดัดแปลงลำดับเบสดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพื่อไม่ให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะกับตำแหน่งการโคลนยีนแบบกลุ่มโดยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพื่อไม่ให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะเอ็นดีอีวันในชั้นยีน

ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งการโคลนยีนแบบกลุ่ม คือ กลุ่มของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่เลือกได้จาก *XhoI*, *NotI*, *BstXI*, *ECORV*, *EcoRI*, *SpeI*, *BamHI*, *BanI*, *SacI*, *KonI*, *HindIII*, *NheI*, *NdeI*, *XbaI*, *BglII* อย่างหนึ่งหรือหลายอย่างรวมกัน

พลาสมิดพาหะ *pBS* ที่มีองค์ประกอบตามลำดับในทิศทางจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ตามการประดิษฐ์นี้

พลาสมิดพาหะ *pRJ* ที่มีองค์ประกอบตามลำดับในทิศทางจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ตามการประดิษฐ์นี้ ที่มีลักษณะเฉพาะคือ ไม่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*

พลาสมิดพาหะ *pKN* ที่มีองค์ประกอบตามลำดับในทิศทางจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ตามการประดิษฐ์นี้ ที่มีลักษณะเฉพาะคือ ไม่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*, *NheI*, *HindIII* และ *KpnI*

เซลล์ต้นแบบที่มีพลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนโฮโอเปปไทด์อย่างจำเพาะตามการประดิษฐ์นี้ โดยเซลล์ต้นแบบดังกล่าว เลือกได้จาก เซลล์ต้นแบบพร่องยีนโฮโอเปปไทด์ หรือ เซลล์ต้นแบบพร่องยีนโฮโอเปปไทด์ อย่างใดอย่างหนึ่งหรือสองอย่างรวมกัน โดยเซลล์ต้นแบบดังกล่าว คือ *E.coli*

รายละเอียดการประดิษฐ์พลาสมิดพาหะที่มีการดัดแปลงยีนโฮโอเปปไทด์อย่างจำเพาะ มีดังต่อไปนี้

5 1. การสร้างพลาสมิดพาหะที่มียีนโฮโอเปปไทด์เป็นองค์ประกอบทดแทนการใช้น้ำมันด้านยาปฏิชีวนะในการ คัดเลือกโคลนตามการประดิษฐ์นี้

กรรมวิธีการสร้างพลาสมิดที่มียีนโฮโอเปปไทด์เป็นองค์ประกอบทดแทนการใช้น้ำมันด้านยาปฏิชีวนะในการคัดเลือกโคลน ทำได้โดย

ก) เพิ่มจำนวนยีนโฮโอเปปไทด์ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- เซลล์ *E.coli* สำหรับการทำให้พีซีอาร์ของยีนโฮโอเปปไทด์ (โฮโอเปปไทด์ 5' และโฮโอเปปไทด์ 3') จำนวน 3 ไมโครลิตร

- พีซีอาร์บัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียม (10% PCR Buffer plus Mg) จำนวน 5 ไมโครลิตร

- ดีเอ็นทีพี (dNTPs mixture) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร

- พอร์เวิร์สไพรมเมอร์และรีเวิร์สไพรมเมอร์ จำนวนอย่างละ 3 ไมโครลิตร

- บีเอสเอ (BSA) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร

- น้ำนาโนบริสุทธิ์ จำนวน 30 ไมโครลิตร

- เอนไซม์ทีเอฟยูดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (pfu DNA polymerase) จำนวน 0.5 ไมโครลิตร

โดยคู่ไพรมเมอร์ที่ 1 ที่ใช้ในการสร้างยีนโฮโอเปปไทด์ มีลำดับเบสดังนี้

พอร์เวิร์สไพรมเมอร์ (5'-3') : GCGATTGAGGAACCATGAAACAGTAT

รีเวิร์สไพรมเมอร์ (5'-3') : GCGGAAGGGCGGCAGGATGTTTCGTAAT

สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีนโฮโอเปปไทด์ด้วยวิธีพีซีอาร์ คือ

ขั้นที่ 1 ดีเนเจอเรชัน (Denaturation) 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที

ขั้นที่ 2 พีซีอาร์ แอมพลิฟิเคชัน (PCR amplification) 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที

(จำนวน 29 รอบ) 50 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

75 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที

ขั้นที่ 3 ไลน์อล เอ็กซ์เทนชัน (Final extension) 75 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที

ข) ตรวจสอบและแปลผลข้อมูลยีนที่ได้จากการทำให้พีซีอาร์ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) โดยพบว่า มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามต้องการดังที่ได้แสดงผลในรูปที่ 2

ค) โคลนยีนโฮโอเปปไทด์ที่ได้จากการทำให้พีซีอาร์เข้าสู่พลาสมิดพาหะ *PEP33c* โดยการนำยีนโฮโอเปปไทด์ที่ได้และพลาสมิดพาหะ *PEP33c* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในที่นี้คือ *SspI* โดยในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- ยีนโฮโอเปปไทด์หรือพลาสมิดพาหะ *pEP33c* จำนวน 15 ไมโครลิตร

- บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับการตัดดีเอ็นเอ (10% restriction buffer) จำนวน 2 ไมโครลิตร

- เอนไซม์ตัดจำเพาะ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร

- บีเอสเอ (BSA) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.2 ไมโครลิตร

- น้ำนาโนบริสุทธิ์ จำนวน 5 ไมโครลิตร

บ่มปฏิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์และพลาสมิดพาหะ *pEP33c* มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอีกครั้งหนึ่งในที่นี้คือ *BglI* หลังจากนั้นพลาสมิดพาหะที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SspI* และ *BglI* แล้วจะถูกแยกชิ้นส่วนระหว่างชิ้นยีนดื้อยาปฏิชีวนะและพลาสมิดพาหะ

5 ชิ้นหลักด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis) โดยเลือกตัดเฉพาะส่วนพลาสมิดพาหะชิ้นหลักออกมา จากนั้นนำชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SspI* และ *BglI* แล้ว และพลาสมิดพาหะชิ้นหลักมาเชื่อมต่อกันโดยใช้เอนไซม์ที่ใช้สำหรับเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (T4 DNA ligase) โดยใช้อัตราส่วนพลาสมิดพาหะ *PEP33c* ชิ้นหลักต่อชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์เป็น 1 ต่อ 5 โดยใน

ปฏิริยาการเชื่อมต่อระหว่างพลาสมิดพาหะชิ้นหลักและชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10 - พลาสมิดพาหะ *PEP33c* ชิ้นหลัก จำนวน 1 ไมโครลิตร
 - ชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SspI* และ *BglI* จำนวน 5 ไมโครลิตร
 - บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (10x ligase buffer) จำนวน 1 ไมโครลิตร
 - เอนไซม์ที่ใช้สำหรับการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ (T4 DNA Ligase) จำนวน 1 ไมโครลิตร
 - น้ำนาโนบริสุทธิ์ จำนวน 2 ไมโครลิตร

15 บ่มปฏิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำพลาสมิดพาหะที่มีชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์แล้วทรานส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *E.coli* ที่พร่องยีนโฮโอเปปไทด์ โดยการใช้ความร้อน (heat shock) คัดเลือกเซลล์ *E.coli* ที่พร่องยีนโฮโอเปปไทด์ และได้รับพลาสมิดพาหะที่มีชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่ไม่มีโรมิติดิน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

เมื่อได้เซลล์ *E.coli* ที่พร่องยีนโฮโอเปปไทด์และมีพลาสมิดพาหะที่มีชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์แล้ว ทำการ

20 ทดสอบการแสดงออกของโปรตีนยีนโฮโอเปปไทด์โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุต่ำที่มีการเติมโรมิติดิน และไม่เติมโรมิติดิน โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ต้นแบบพร่องยีนโฮโอเปปไทด์ เซลล์ต้นแบบพร่องยีนโฮโอเปปไทด์ที่ได้รับพลาสมิดพาหะ *pEP33c* และเซลล์ต้นแบบพร่องยีนโฮโอเปปไทด์ที่ได้รับพลาสมิดพาหะ *pBS* พบว่า พลาสมิดพาหะที่สามารถสร้างโปรตีนยีนโฮโอเปปไทด์ได้จะเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุต่ำที่ไม่มีการเติมโรมิติดิน ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่ง ก) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุต่ำที่ไม่มีการเติมโรมิติดิน และ ข)

25 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุต่ำที่มีการเติมโรมิติดิน โดย แถว I คือ เซลล์ต้นแบบพร่องโฮโอเปปไทด์ แถว II คือ เซลล์ต้นแบบพร่องยีนโฮโอเปปไทด์ที่ได้รับพลาสมิดพาหะ *pEP33c* และแถว III คือ เซลล์ต้นแบบพร่องยีนโฮโอเปปไทด์ที่ได้รับพลาสมิดพาหะ *pBS*

2. การเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่ง (Site direct mutagenesis) ของยีนโฮโอเปปไทด์ในพลาสมิดพาหะที่มีชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์ เพื่อไม่ให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* ในชิ้นยีน

30 เนื่องจากลำดับเบสในยีนของยีนโฮโอเปปไทด์นั้นจะมีลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* ดังนั้น จึงต้องทำการเปลี่ยนลำดับเบสในตำแหน่งดังกล่าวเพื่อไม่ให้เกิดตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* ขึ้นในชิ้นยีนโฮโอเปปไทด์ โดยในการเปลี่ยนลำดับเบสนั้นจะต้องไม่ทำให้กรดอะมิโนที่ได้จากการถอดรหัสของตำแหน่งนั้นเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาว่าลำดับเบสใดที่ให้การอะมิโนที่เหมือนกัน

35 จากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งในตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* จะได้คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเปลี่ยนลำดับเบส ดังต่อไปนี้

คู่ไพรเมอร์ที่ 2 ที่ใช้ในการเปลี่ยนลำดับเบสในตำแหน่งที่ 1 มีลำดับเบส ดังนี้

ฟอร์เวิร์สไพรเมอร์ (5'-3') : CGTTATTGGTGCACATGATGGCGCAGC

รีเวิร์สไพรเมอร์ (5'-3') : GCTGCGCCATCATGTGCACCAATAACG

คู่ไพรเมอร์ที่ 3 ที่ใช้ในการเปลี่ยนลำดับเบสในตำแหน่งที่ 2 มีลำดับเบส ดังนี้

5 ฟอร์เวิร์สไพรเมอร์ (5'-3') : CATCTGTACAGCAACCACATGGATCAAACATCATC

รีเวิร์สไพรเมอร์ (5'-3') : GATGAGTITGATCCATGTGGTTGCTGTACAGATG

ขั้นตอนการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนไฮโอเปปไทด์ในพลาสมิดพาหะที่มีชั้นยีนไฮโอเปปไทด์ทำได้โดย

10 ก) เปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่ง (Site direct mutagenesis) ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยในปฏิกิริยาการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่ง 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- พลาสมิดพาหะที่มียีนไฮโอเปปไทด์ จำนวน 2 ไมโครลิตร

- พีซีอาร์บัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียม (10x PCR Buffer plus Mg) จำนวน 5 ไมโครลิตร

- ดีเอ็นทีพี (dNTPs mixture) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร

- ฟอร์เวิร์สไพรเมอร์ และรีเวิร์สไพรเมอร์ จำนวนอย่างละ 1.25 ไมโครลิตร

15 - น้ำนาโนบริสุทธิ์ จำนวน 35 ไมโครลิตร

- เอนไซม์ทีเอฟยูดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (pfu DNA polymerase) จำนวน 1 ไมโครลิตร

โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่ง คือ

ขั้นที่ 1 ดีเนเจอร์ชัน (Denaturation) 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที

ขั้นที่ 2 พีซีอาร์ แอมพลิฟิเคชัน (PCR amplification) 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที

20 (จำนวน 12 รอบ) 50 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

68 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที

ขั้นที่ 3 ไฟนอล เอ็กซ์เทนชัน (Final extension) 68 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที

ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DpnI* บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

25 ข) นำพลาสมิดพาหะที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนไฮโอเปปไทด์ได้จากข้อ ก) ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *E. coli* พร่องยีนไฮโอเปปไทด์โดยวิธีการใช้ความร้อน

ค) คัดเลือกเชื้อ *E. coli* พร่องยีนไฮโอเปปไทด์ที่มีพลาสมิดพาหะที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนไฮโอเปปไทด์ ซึ่งทำให้ไม่ปรากฏตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* บนยีนไฮโอเปปไทด์ โดยการสกัดพลาสมิดพาหะที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนไฮโอเปปไทด์ดังกล่าวจากเชื้อ *E. coli* พร่องยีนไฮโอเปปไทด์และนำพลาสมิดพาหะขึ้นดังกล่าวไปหาลำดับเบสด้วยการทำซีควนซิง (sequencing) หลังจากนี้จะเรียกพลาสมิดพาหะที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนไฮโอเปปไทด์ว่า พลาสมิดพาหะ *pBS* ขนาด 3,452 คู่เบส แสดงดังรูปที่ 4

3. การสร้างพลาสมิดพาหะที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนไฮโอเปปไทด์ให้มีตำแหน่งการโคลนยีนที่เปลี่ยนแปลง

35 สำหรับการสร้างพลาสมิดพาหะที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนไฮโอเปปไทด์ให้มีตำแหน่งการโคลนยีนที่เปลี่ยนแปลงเพื่อไม่ให้มีส่วนของโปรตีนที่จะสร้างมีลำดับกรดอะมิโนเกินกว่าโปรตีนที่

เป็นธรรมชาติในบริเวณด้านปลายอะมิโน เนื่องจากสำหรับแบคทีเรียทั่วไป ตำแหน่งลำดับเบสที่ไรโบโซมจะเข้าจับเพื่อพร้อมเริ่มการแปลรหัสจากอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีนที่เรียกว่า ลำดับ Shine-Dalgarno sequence) หรือตำแหน่งจับของไรโบโซม หรืออาร์บีเอส (Ribosome binding site; RBS) สำหรับในพลาสมิดพาหะตั้งต้น คือ PEP33c ลำดับเบสนี้คือ AAGGAG ซึ่งโดยทั่วไปลำดับเบสนี้จะอยู่ก่อนตำแหน่งเริ่มการแปลรหัสเอทีจี (ATG) เป็นเมไทโอนีน (Met) จำนวน 8 เบส

ดังนั้น จึงได้มีการกำหนดและเปลี่ยนลำดับเบสบริเวณตำแหน่งการโคลนยีนให้มีความเหมาะสม โดยการลบลำดับเบสระหว่างบริเวณที่มีตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *HindIII* ออก เพื่อไม่ให้มีตำแหน่งตัดด้วย *NdeI* ในพลาสมิดพาหะ เพื่อใช้สำหรับการโคลนยีนที่สนใจ ซึ่งมีตำแหน่งตัดด้วย *NdeI* โดยพลาสมิดพาหะที่ไม่มีตำแหน่งตัดด้วย *NdeI* จะเรียกว่า พลาสมิดพาหะ *pRJ* และการลบลำดับเบสระหว่างบริเวณที่มีตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *SacI* ออกเพื่อไม่ให้มีตำแหน่งตัดด้วย *NdeI*, *NheI*, *HindIII* และ *KpnI* ในพลาสมิด เพื่อใช้สำหรับการโคลนยีนที่สนใจซึ่งมีตำแหน่งตัดด้วย *NdeI*, *NheI*, *HindIII* และ *KpnI* ในชั้นยีน โดยพลาสมิดพาหะที่ไม่มีตำแหน่งตัดด้วย *NdeI*, *NheI*, *HindIII* และ *KpnI* จะเรียกว่า พลาสมิดพาหะ *pKN* โดยพลาสมิดพาหะที่ได้จะเริ่มการแปลรหัสเอทีจี (ATG) เป็นเมไทโอนีนได้เลย

การสร้างพลาสมิดพาหะที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนโฮโอเปปไทด์ให้มีความเหมาะสมการโคลนยีนที่เปลี่ยนแปลง ทำได้โดย

1. เลือกบริเวณตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ต้องการเปลี่ยนลำดับเบส ในที่นี้คือ บริเวณลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *HindIII* สำหรับสร้างพลาสมิดพาหะ *pRJ* และบริเวณลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *SacI* สำหรับสร้างพลาสมิดพาหะ *pKN*

2. ตัดพลาสมิดพลาสมิดพาหะที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนโฮโอเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *HindIII* สำหรับสร้างพลาสมิดพาหะ *pRJ* และ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *SacI* สำหรับสร้างพลาสมิดพาหะ *pKN* บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำพลาสมิดพาหะที่ตัดให้บริสุทธิ์

3. นำพลาสมิดพาหะที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (T4 DNA Polymerase) ซึ่งจะทำลายลำดับเบสที่ยื่นออกด้านปลาย 3' (3' overhangs) และเติมลำดับเบสคู่สมส่วนปลายยื่นด้าน 5' (5' overhangs) เพื่อทำปลายยื่นทั้งสองเป็นปลายหุ้ (Blunt ends) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำพลาสมิดพาหะที่ได้ให้บริสุทธิ์

4. เชื่อมต่อปลายหุ้ทั้งสองด้วยเอนไซม์ที่ใช้สำหรับเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (T4 DNA Ligase) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

5. นำพลาสมิดพาหะที่ผ่านการตัดแปลงลำดับเบสบริเวณตำแหน่งการโคลนยีนทรานส์ฟอร์มเข้าเซลล์ *E.coli* ที่พร้อมยีนโฮโอเปปไทด์ด้วยวิธีการใช้ความร้อน

6. คัดเลือกเซลล์ *E.coli* พร้อมยีนโฮโอเปปไทด์ที่มีพลาสมิดพาหะที่มีการเปลี่ยนลำดับเบสเฉพาะตำแหน่งของยีนโฮโอเปปไทด์ให้มีความเหมาะสมการโคลนยีนที่เปลี่ยนแปลงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่ไม่มีโหมติดิน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

7. ตรวจสอบและยืนยันลำดับเบสบริเวณที่คัดแปลงของพลาสมิดพาหะโดยวิธีการซีควนซิง (sequencing) โดยเรียกพลาสมิดพาหะที่ได้เปลี่ยนแปลงบริเวณลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ

HindIII ว่า พลาสมิดพาหะ *pRJ* และ เรียกพลาสมิดพาหะที่ได้เปลี่ยนแปลงบริเวณลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *SacI* ว่า พลาสมิดพาหะ *pKN*

โดยลำดับเบสของพลาสมิดพาหะ *pRJ* มีขนาด 3,412 แสดงดังรูปที่ 5 และลำดับเบสของพลาสมิดพาหะ *pKN* มีขนาด 3,393 คู่เบส แสดงดังรูปที่ 6

5 คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างพลาสมิดที่มีการดัดแปลงยีนโธโอเปปไทด์อย่างจำเพาะ

รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

รูปที่ 3 แสดงผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนยีนโธโอเปปไทด์โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยง

10 เชื้อที่มีแร่ธาตุต่ำที่มีการเติมไนโตรเจน (ก) และไม่เติมไนโตรเจน (ข)

รูปที่ 4 ลำดับเบสของพลาสมิดพาหะ *pBS*

รูปที่ 5 ลำดับเบสของพลาสมิดพาหะ *pJV*

รูปที่ 6 ลำดับเบสของพลาสมิดพาหะ *pKN*

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

15 เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อก๊อสิทริ

1. พลาสมิทพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะ มีองค์ประกอบตามลำดับในทิศทางจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ดังนี้

(ก) ลำดับเบสของเทอร์มินเตอร์ที2 (T2 terminator)

(ข) ตำแหน่งการโคลนยีนแบบกลุ่ม (multiple cloning site)

(ค) ลำดับเบสของโปรโมเตอร์ที2 (T2 promoter)

(ง) ลำดับเบสที่ควบคุมจำนวนพลาสมิท (repressor of primer, ROP)

(จ) ลำดับเบสเริ่มต้นการสร้างพลาสมิท (pBR223 Ori)

(ฉ) ยีนไธโอเปปไทด์ที่ผ่านการดัดแปลงลำดับเบส

(ช) ลำดับเบสของโปรโมเตอร์ยีนไธโอเปปไทด์ (thiopeptide promoter)

ที่มีลักษณะเฉพาะคือ ยีนไธโอเปปไทด์ที่ผ่านการดัดแปลงลำดับเบสดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพื่อไม่ให้ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะกับตำแหน่งการโคลนยีนแบบกลุ่ม

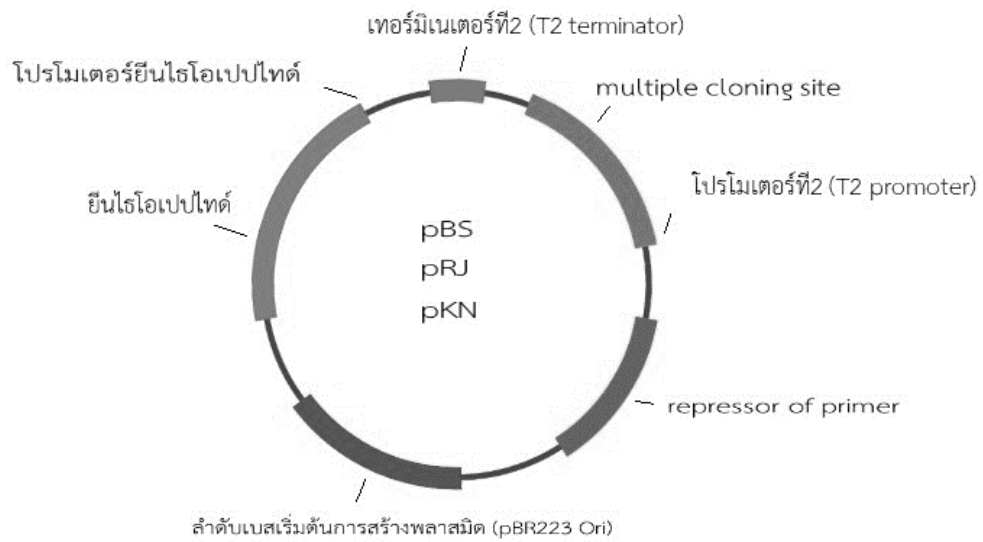
2. พลาสมิทพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะ ตามข้อก๊อสิทริที่ 1 ที่ซึ่ง ยีนไธโอเปปไทด์ที่ผ่านการดัดแปลงลำดับเบส คือ ไม่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*

3. พลาสมิทพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะ ตามข้อก๊อสิทริที่ 1 ที่ซึ่ง ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งการโคลนยีนแบบกลุ่ม คือ กลุ่มของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

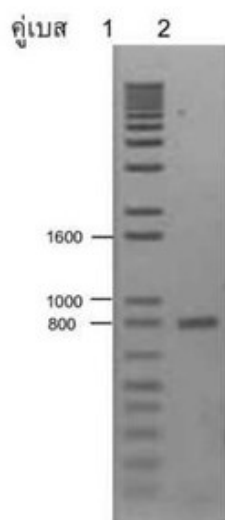
4. พลาสมิทพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะ ตามข้อก๊อสิทริที่ 3 ที่ซึ่ง กลุ่มของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เลือกได้จาก *XhoI*, *NotI*, *BstXI*, *ECORV*, *EcoRI*, *SpeI*, *BamHI*, *BanI*, *SacI*, *KpnI*, *HindIII*, *NheI*, *NdeI*, *XbaI*, *BglII* อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือหลายอย่างรวมกัน

5. พลาสมิทพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะ ตามข้อก๊อสิทริที่ 1 ที่ซึ่ง เซลล์ต้นแบบที่มีพลาสมิทพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไธโอเปปไทด์อย่างจำเพาะ คือ *E.coli*

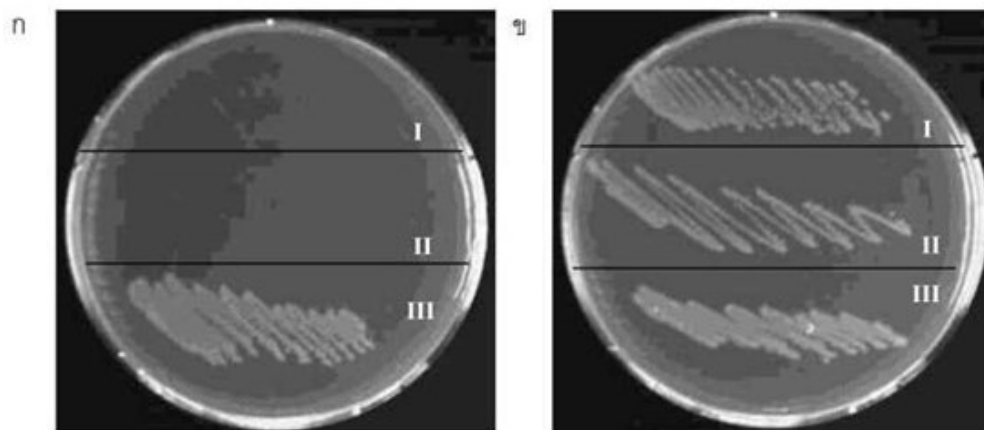
6. พลาสมิทพาหะที่มีการดัดแปลงยีนไธโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะ ตามข้อก๊อสิทริที่ 5 ที่ซึ่ง เซลล์ต้นแบบ เลือกได้จาก เซลล์ต้นแบบพร่องยีนไธโอเปปไทด์ หรือ เซลล์ต้นแบบพร่องยีนไธโอเปปไทด์อย่างใดอย่างหนึ่งหรือสองอย่างรวมกัน



รูปที่ 1



รูปที่ 2



รูปที่ 3

1 ttatccggatatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaagaccggttagaggcccc 60
61 aaaggggttatgctagttattgctcagcgggtggcagcagccaactcagcttcccttcgggc 120
121 tttggttagcagccggatctgctcagcggcccgccagtgatggatatctgcagaattcc 180
181 agcacactggcggccgttactagtggatccgagctcggtagccaagcttgaatcccgaccc 240
241 atttgctgtccaccagtcagtcagccatatgtatatctccttcttaaagttaaacaata 300
301 ttatttctagaggaaaccgttgggtctccctatagtgcgtatgaatttcgcggga 360
361 tcgagatctcgggcagcgttgggtcctggccacgggtgcgcagtcgctgctcctgctgt 420
421 tgaggacccgggtcaggctggcgggggttgcccttactgggttagcagaatgaatcacccgatac 480
481 gcgagcgaacgtgaagcagactgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaa 540
541 tgggtctcgggttccgtgttccgtgtaaagtctggaacgcgggaagtcagcgccctgcacca 600
601 ttatgttccggatctgcatcgcaggtatgctgctggctaccctgtggaacacctacatctg 660
661 tattaacgaagcgtggcattgacccctgagtgatttttctctggtcccgccgcatccata 720
721 ccgccagtggtttaccctcacacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaaccc 780
781 gtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatcattaccccatgaacagaaatcccc 840
841 cttacacggaggtcagtgaccaaaccggaacccgccccttaacatggcccgcttta 900
901 tcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggagcggatgaacagg 960
961 cagacatctgtgaatcgcttccagcagcgtgatgagctttaccgagctgctcgcgcg 1020
1021 gtttcggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagagcggtcacagctt 1080
1081 gtctgtaagcggatgcccgggagcagacaagcccgctcagggcgctcagcgggtgttggcg 1140
1141 ggtgtcggggcgagccatgacccagtcacgtagcagtagcggagtgatactggcttaa 1200
1201 ctatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgacacatatatgcggtgtgaaataccg 1260
1261 cacagatgcgtaaggagaaaaatccgcatcagggcgtcttccgcttccctcgtcactgac 1320
1321 tcgctgcgctcggctcgttcgggtcgcggcagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaata 1380
1382 cgggtatccacagaatcaggggataaacgcaggaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaa 1440
1441 aaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgctggcgtttttccataggctccgccccct 1500
1501 gacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaacccgacaggactataa 1560
1561 agataccagggcgtttcccccgtggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgccc 1620
1621 cttaaccggatacctgtccgcttcttcccttcgggaagcgtggcgcttctcatagctca 1680
1681 cgctgtaggatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaa 1740
1741 cccccgttcagcccagccgctgcgcttaccggtaactatcgtcttgagtccaaccg 1800
1801 gtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggttaacaggattagcagagcagg 1860
1861 tatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagg 1920
1921 acagtatttgggtatctgcgctcgtctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagc 1980
1981 tcttgatccggcaaaacaaaccacgctgggtagcgggtgtttttgtttgcaagcagcag 2040
2041 attacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttctgatctttctacggggtctgcac 2100
2101 gctcagtggaacgaaaaactcagcttaagggttttgggtcatgagattatcaaaaaggatc 2160
2161 ttcacctagatccttttaaataaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgag 2220
2221 taaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcaccctatctcagcagctgt 2280
2281 ctatttcggttcatccatagttgcctgactccccgctcgtgtagataactacgatacgggag 2340
2341 ggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcacgggtcca 2400
2401 gatttatcagcaataaaaccagccagccggaaggcgccgaggtgttctgtaattagatag 2460
2461 ccaccggcgctttaatgcccgatgcggatcgtagccttcaatctcaaagcttctcgaac 2520
2521 tgtagtcgaagatggattcgggtttacgtttgataatcaacttcggcagagagcgcggtt 2580
2581 cgcggcttaattgcagatgagtttgatccatgtgggtgctgtacaggtgctgtatcgccac 2640
2641 cgggtccagacaaaatcacccacttccagatcgcactgctgcgccatcatgtgcaccaata 2700
2701 acgcgtagcgtgcaatgttgaacggcaggccgaggaagcgtcacaggagcgtgataaaa 2760
2761 gctggcaagagagtttgcgctgcccacatagaactggaagaatgcatggcacgggtgcca 2820
2821 gcgccattttatccagttcgcctacgttccacgctgaaacaataatgcggcgccgaatccg 2880
2881 ggtcgtttttcagctggttcagtagcgtgtagtctggtcaatatgacgacctctggcg 2940
2941 ttggccaggcgccgactgtttaccatacactggcccgaggtcgcgcttttcatcggccc 3000
3001 attcgtcccagatgggtgacattgtttcgtgtagataagcaatgttagtgctgcctgca 3060
3061 ggaaccacagcagttcgtggatgatggaacgcaggtggcaacgttttagttgtcaccagcg 3120
3121 ggaatccatcctgcaggttaaaacgcacatctgatgacaaaaaatggaagcgttccggttc 3180
3181 cggtagcgtgctttttctgtgtgccttcgctcagcactttttgcatcagttctaaatact 3240
3241 gtttcatgggttccctcaatcgcatatttgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcg 3300
3301 gatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaataagggttccgcgcacatttcccc 3360
3361 gaaaagtgcacactgacgtctaaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaata 3420
3421 ggcgtatcacgaggccctttcgtcttcaagaa 3452

```
1      ttatccggatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaagaccggttagagggccc 60
61     aaggggttatgctagttattgctcagcggtggcagcagccaaactcagcttcctttcgggc 120
121    tttgttagcagccggtatctgctcagcgccgagcagtgatgagatactgcagaattcc 180
181    agcacactggcgccgttactagtgagatccgagctcggtagccaagctttatgtatatctc 240
241    cttcttaaagttaaacaaaattatttctagagggaacccgttggtgctccttatagtga 300
301    gtctgattaatttcgcgggacgagatctcgggcagcggttggtcctggccacgggtgcg 360
361    catgatcgtgctcctgctcgttgaggacccggctagcgtggcggggttgcttactggtta 420
421    gcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaacgtctgc 480
481    gacctgagcaacaacatgaatgggtcttcggtttccggtgttcgtaaaagtctggaacgcg 540
541    gaagtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcacgcaggtgctgctggctacc 600
601    ctgtggaacacctacatctgtatgaagcagcgctggcattgacctgagtgattttct 660
661    ctggtcccgccgcatccataccgccaagtgtttaccctcacaaagcttccagtaaccgggc 720
721    atgttcatcatcagtaaccgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcgggtatcattac 780
781    ccccatgaacagaaaatcccccttacacggagcagtcagtgacaaaacaggaaaaaacgcg 840
841    ccttaacatggcccgctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacga 900
901    gctggcagcggtatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagct 960
961    ttaccgcagctgcctcgcgcgtttcgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagct 1020
1021   cccggagacggtcacagcttgctctgtaagcggtatgcgggagcagacaagcccgtaggg 1080
1081   cgcgtcagcggtgttggtgggtgtcggggcgagccatgacccagtcacgtagcgatag 1140
1141   cggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcacat 1200
1201   atatcggtgtgaaataccgcacagatgcgtgaaggagaaaaataccgcatcaggcgctctt 1260
1261   ccgcttcctcgtcactgactcgtcgtcgtcgttcggtcgtcgcgcgagcggtatcag 1320
1321   ctcaactcaaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcagggggataacgcaggaagaaca 1380
1382   tgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccgcggttgctggcgttt 1440
1441   tccataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggc 1500
1501   gaaacccgacaggactataaaagataccagcggtttccccctggaagctccctcgtcggt 1560
1561   ctccgttccgacccctgcgcgttacccgatacctgtccgcctttctccctcgggaagcg 1620
1621   tggcgctttctcatagctcacgctgtaggatctcagttcgggtgtaggctcgttcgctcca 1680
1681   agctgggctgtgtgcacgaaccccccggttcagcccgaccgctgcgccttatccggttaact 1740
1741   atcgtcttgtagtccaacccggtgaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggta 1800
1801   acaggattagcagagcgagggtatgtaggcggtgtacagagttcttgaagtgggtggccta 1860
1861   actacggctacactagaaggacagtatgttgatctcgtcgtcgtcgtgaagccagttacct 1920
1921   tcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccacgcggtgtagcggtgt 1980
1981   tttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttga 2040
2041   tcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaaactcacgttaagggtttttggtca 2100
2101   tgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaataaaaatgaagttttaaat 2160
2161   caatctaaagtatatatagtagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgagg 2220
2221   cacctatctcagcgtatctgtctatttcgttcacatcatagttgcctgactccccgctcgtgt 2280
2281   agataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgag 2340
2341   acccagctcaccggtccagatttatcagcaataaaaccagccagccggaaggcgcgag 2400
2401   gatgtttcgtaaattagatagccaccggcgctttaatgcccggatgcggatcgtagccttc 2460
2461   aatctcaaaagtcttcgaaacggtagtcgaagatggattcgggtttacgtttgataatcaa 2520
2521   cttcggcagcgagcggttcgcggcttaattgcagatgagtttgatccatgtggttgct 2580
2581   gtacaggtgctatcgccaccggtccagacaaaatcacccacttccagatcgactgctg 2640
2641   cgccatcatgtgcaccaataacgcgtagctggcaatgttgaaacggcagggccgaggaagac 2700
2701   gtcacaggagcgctgataaaagctggcaagagagtttgccgtctgcccacatagaactgaa 2760
2761   gaatcagatggcagcggtgcagcgccattttatccagttcgcctacgttccacgctgaaac 2820
2821   aataatgcgcgcgaaatccgggtcgttttcagctgggttcagtagcgtatgaatcgggtc 2880
2881   aatatgacgacctatcggcgttgccaggcgccgactgtttaccatacactggcccag 2940
2941   gtcgcgcgttttcatcggccattcgtccagatggtgacattgttttcgtgtagataagc 3000
3001   aatgttagtgtcgccctgcaggaaccacagcagttcgtggatgatggaacgcaggtggca 3060
3061   acgttttagttgtcaccagcggttaacatcctgcaggttaaaacgcacatctgatgacaaa 3120
3121   aatggaaaagcggtccgggttcgggtacgggtcggtttttctgtgtgccttcgtcagacattt 3180
3181   ttgcatcagttctaaatactgtttcatggttcctcaatcgcatattgaagcatttatca 3240
3241   ggggtattgtctcatgagcggtacacataattgaatgtatttagaaaaataaacaataagg 3300
3301   ggttccgcgcacattttcccgaaaagtgccacctgacgtctaaagaaaccattattatcat 3360
3361   gacattaacctataaaaataggcggtatcacgaggccctttcgtcttcaagaa 3412
```

```

1      ttatccggatatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaagaccggttagaggcccc 60
61     aaggggttatgctagttattgctcagcggtggcagcagccaactcagcttcctttcgggc 120
121    tttgttagcagccggtatctgctcagcgccgcccagtgatggatatctgcagaattcc 180
181    agcacactggcgccggttactagtggaatccgagctcgtctccttcttaaagttaacaaa 240
241    attatttctagagggaacccgttggtctcctctatagtgagtcgtattaatctcgggg 300
301    atcgagatctcgggcagcggttggtcctggccacgggtgagcatgacgtgctcctgtcg 360
361    ttgaggaccgggtaggctggcggttgcttactgggttagcagaatgaatcacccgata 420
421    cgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaacgtctgcgacctgagcaacaacatga 480
481    atggctcttcgggtttccgtgtttcgttaaagtctggaacgcggaagtcagcgccctgcacc 540
541    attatgttcgggatctgcatcgagatgctgctggctaccctgtggaacacctacatct 600
601    gtattaacgaagcgctggcattgacctgagtgatttttctctggtcccgccgcatccat 660
661    accgccagttgtttaccctcacaacgttcagtaaccgggcatgttcacatcagtaacc 720
721    cgtatcgtagcagcatcctctcgtttcagtggtatcattaccccatgaaacagaaatccc 780
781    ccttacagcgggcatcagtgaccaaacaggaaaaaaccccttaacatgggccgcttt 840
841    atcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaacag 900
901    gcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcg 960
961    cgtttcgggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagagcggtcacagct 1020
1021   tgtctgtaagcggatgcccgggagcagacaagcccgtcagggcgctcagcggtgttggc 1080
1081   ggggtgctggggcgagccatgaccagtcacgtagcgtatagcggagtgtatactggctta 1140
1141   actatgcccgcagagcagattgtactgagagtgacccatataatgcccgtgtgaaatacc 1200
1201   gcacagatgctgaagagagaaataccgcacatcagcgctcttccgcttccctcgctacga 1260
1261   ctcgctgcgctcggtcgttcggtcgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaat 1320
1321   accggttatccacagaatcaggggataaacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagca 1380
1382   aaaggccaggaaaccgtaaaaaggccggttgctggcggtttttccataggtccgcccccc 1440
1441   tgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtgcagaggtggcgaaacccgcagaggactata 1500
1501   aagataaccaggcggtttcccccgtggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgcc 1560
1561   gcttacccgataacctgtccgcttcttcccttcgggaagcggtggcgcttctctatagctc 1620
1621   acgtcgtagtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacga 1680
1681   acccccgttcagcccgacgctgcgccttatccggttaactatcgtcttgagtcacaacc 1740
1741   ggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaaacaggattagcagagcgag 1800
1801   gtatgtaggcggtgctacagagttcttgaaagtgggtggcctaactacggctacactagaag 1860
1861   gacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtag 1920
1921   ctcttgatccggcaaaaaaaccccgctggtagcgggtgtttttgtttgcaagcagca 1980
1981   gattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctga 2040
2041   cgctcgtaggaacgaaaaactcacgttaagggttttgggtcatgagattatcaaaaaggat 2100
2101   cttcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttttaaatcaatctaaagtatatatga 2160
2161   gtaaaccttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctg 2220
2221   tctatttctgtcatccatagttgcctgactccccgctcgtgtagataactacgatacggga 2280
2281   gggcttacatctgccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcacggctcc 2340
2341   agatttatcagcaataaacagccagccggaaggcgccgaggtgtttcgttaattagata 2400
2401   gccaccggcgcttttaatgcccggatgcggatcgtagccttcaatctcaaagtcttcgaaa 2460
2461   cggtagtcgaagatggattcggttttacgtttgataaatcaacttcggcagcggacgggt 2520
2521   tcgcggcttaattgcagatgagttgatccatgtggttgctgtacaggtgcgtatcgcca 2580
2581   ccgggtccagacaaaaatcacccacttccagatcgactgctgcgccatcatgtgcaccaat 2640
2641   aacgcgtagctggcaatgttgaaacggcagccgaggaagacgtcacaggagcgctgataa 2700
2701   agctggcaagagagtttgccgtctgccacatagaactggaagaatgcatggcaggtgcc 2760
2761   agcgccattttatccagttcgcctacgttccacgctgaaacaataatgcggcgcaatcc 2820
2821   gggctggtttttcagctggttcagtagcctagtgatctggtcaatatgacgacctctggc 2880
2881   gttggccagcgcgccactgtttaccatacactggcccagggtcgccgttttcatcggc 2940
2941   cattcgtcccagatgggtgacattgtttctgtgtagataagcaatgttagtgtcgcttgc 3000
3001   aggaaccacagcagttcgtggatgatggaacgcaggtggcaacgttttagttgtcaccagc 3060
3061   gggaaatccatcctgcagggttaaacgcacatctgatgacaaaaatggaaagcggtccgggt 3120
3121   ccggtacggctcgtttttctgtgtccttcgtcgagcactttttgcatcagttctaaatac 3180
3181   tgtttcatggttccctcaatCGCattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagc 3240
3241   ggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaaataggggttccgcgcacatttccc 3300
3301   cgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaat 3360
3361   aggcgtatcacgaggcccttctcgtcttcaagaa 3393

```

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการประดิษฐ์พลาสติกพลาสมาที่มีการดัดแปลงยีนไฮโอเปปไทด์ (thiopeptide) อย่างจำเพาะเพื่อใช้ในการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการและลดการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยมีการดัดแปลงลำดับเบสของพลาสติกพลาสมาให้มีการแสดงออกของยีนไฮโอเปปไทด์ (thiopeptide) ดัดแปลงทดแทนยีนต้านยาปฏิชีวนะ เพื่อใช้ในการคัดเลือกโคลนร่วมกับเซลล์ต้นแบบพรีออแกไนส์ไฮโอเปปไทด์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกโปรตีน โดยพลาสติกพลาสมาที่ประดิษฐ์ขึ้นนี้จะทำให้เกิดความสะดวกมากขึ้นในการคัดเลือกเซลล์ต้นแบบที่มีพลาสมิดที่มีโปรตีนที่ต้องการ โดยไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิด และลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อโปรตีนที่ต้องการในการใช้ยาปฏิชีวนะในการคัดเลือกโคลน รวมถึงการสร้างเซลล์ต้นแบบที่มีพลาสมิดพลาสมาที่มีการดัดแปลงยีนไฮโอเปปไทด์อย่างจำเพาะ