Thai Journal of Genetics 2009, 2(2) : 73–83

การใช้ระบบ yeast one-hybrid และ yeast two-hybrid เพื่อศึกษาการจับกันระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีนและระหว่างโปรตีนกับโปรตีนในยีสต์

ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์[1]* และ สุรีพร เกตุงาม[2]

[1] *ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900*

[2] *ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190*

** Corresponding author: fscicwj@ku.ac.th*

บทนำ

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวจำพวกยูแคริโอตชั้นต่ำ ซึ่งเป็นโมเดลที่ใช้ในการศึกษาสำหรับสิ่งมีชีวิตยูแคริโอตชั้นสูง เช่น คน สัตว์ และพืช กระบวนการทางชีวเคมีหลายอย่างเป็นผลมาจากความรู้ที่ได้จากการศึกษาด้วยยีสต์ ยีสต์ยังเป็นสิ่งมีชีวิตยูแคริโอตชนิดแรกที่มีการหาลำดับเบสของจีโนมจนสมบูรณ์ (Mewes *et al*., 1997) มนุษย์ใช้ประโยชน์จากยีสต์มานานหลายพันปี ตัวอย่างเช่น การผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการทำขนมปัง และการหมักน้ำตาลให้เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์สำหรับเบียร์และไวน์ (Sherman, 1991) ในการศึกษาทางชีววิทยาสมัยใหม่ในปัจจุบัน ได้นำยีสต์มาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการใช้ยีสต์ในการศึกษาการจับกันระหว่าง transcription factor กับดีเอ็นเอ และการศึกษาการจับตัวระหว่างโปรตีนสองชนิด

ระบบการใช้ yeast one-hybrid เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในการศึกษาการจับกันระหว่าง transcription factor กับดีเอ็นเอและ yeast two-hybrid เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีนสองชนิด เพื่อให้สามารถเข้าใจระบบการทำงานของ yeast one-hybrid และ yeast two-hybrid จึงจำเป็นต้องทบทวนความรู้พื้นฐานทางด้านโครงสร้างและการควบคุมการทำงานของยีน และ transcription factor ดังต่อไปนี้

โครงสร้างและการควบคุมการทำงานของยีน

โดยทั่วไปยีนแต่ละยีนประกอบด้วยโครงสร้างส่วนแรกคือ ส่วนของลำดับดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็น mRNA และแปลรหัสโดยไรโบโซมเพื่อให้ได้เป็นโปรตีน โครงสร้างส่วนที่สองคือ ส่วนของบริเวณควบคุม (regulatory region) ซึ่งโดยทั่วไปส่วนนี้หมายถึงโพรโมเตอร์ ซึ่งมักจะอยู่ทางด้านปลาย 5’ หรือด้านหน้าของลำดับดีเอ็นเอที่จะถูกถอดรหัส โพรโมเตอร์มีหน้าที่ที่สำคัญ 2 ประการ หน้าที่แรกคือ ควบคุมให้การถอดรหัสเกิดขึ้นในตำแหน่งที่ถูกต้อง ซึ่งก็คือตำแหน่ง +1 และอีกหน้าที่หนึ่งคือ ควบคุมการแสดงออกของยีนระดับเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (spatially) และการแสดงออกของยีนในช่วงเวลา หรือระยะการพัฒนาระยะใดระยะหนึ่งในช่วงชีวิตของสิ่งมีชีวิต (temporally) เพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก โดยสิ่งเร้าภายนอกสามารถมาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อข้างเคียงภายในสิ่งมีชีวิต เช่น ฮอร์โมนต่างๆ ในพืช หรือจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ความแห้งแล้ง ความหนาวเย็น ความร้อน เป็นต้น ลำดับดีเอ็นเอที่สำคัญของโพรโมเตอร์ เรียกว่า cis-acting element ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ติดกับส่วนของ

ยีนที่จะถูกถอดรหัส cis-acting element ที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ TATA box ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 8 เบส ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ชนิด A และ T เท่านั้น ยีนของสิ่งมีชีวิตยูแคริโอตโดยทั่วไปมี TATA box อยู่ที่ตำแหน่ง 25 เบส ก่อนจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส หรือเรียกว่าตำแหน่ง -25 ในขณะที่สิ่งมีชีวิตโพรแคริโอตจะมีลำดับที่คล้ายกันแต่เรียกว่า Pribnow box อยู่ที่ตำแหน่ง -10 นอกจากนี้ TATA box ยังช่วยกำหนดให้มีการเริ่มต้นการถอดรหัสในตำแหน่งที่ถูกต้องของ mRNA อีกด้วย

ถึงแม้ว่ายีนโดยทั่วไปจะมี TATA box อยู่ก็ตาม แต่ระดับการแสดงออกของแต่ละยีน จะมีความจำเพาะเจาะจงสำหรับยีนนั้นๆ เพื่อที่จะสามารถทราบถึงการแสดงออกของยีนแต่ละยีน จึงมีความจำเป็นต้องทราบลำดับเบสของ cis-acting element ของยีนนั้นๆ ก่อน ในปัจจุบันลำดับเบสของ cis-acting element มีการค้นพบเพิ่มมากขึ้นจากการหาลำดับเบสของจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ด้วยเหตุนี้เองจึงมีการพัฒนาฐานข้อมูลที่สามารถค้นหา cis-acting element ภายในลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบได้ ถ้าลำดับเบสที่ต้องการตรวจสอบมี cis-acting element ประกอบอยู่ก็จะปรากฏอยู่ใน output ตัวอย่างของฐานข้อมูลที่สามารถใช้ในการหา cis-acting element คือ The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (http://www.arabidopsis.org/) ภายใต้หัวข้อ Motif Analysis

ในการควบคุมการทำงานของยีนนั้น cis-acting element จะทำงานร่วมกับ trans-acting factor คำว่า trans ในที่นี้อ้างอิงจากการที่ยีนที่สร้างโปรตีนนี้ อยู่ที่ตำแหน่งต่างกันกับยีนที่จะถูกถอดรหัส นั่นคือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น trans-acting factor ถูกแปลรหัสมาจากตำแหน่งอื่นของจีโนม แล้วเคลื่อนตัวมายังตำแหน่งที่มีการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ตัวอย่างของ trans-acting factor ที่จับกับ TATA box คือ TATA binding protein หรือ TBP โดยยีนที่ประมวลรหัสให้ TBP จะถูกถอดรหัสมาจากนิวเคลียส จากนั้น mRNA เคลื่อนตัวไปยังไซโทพลาซึมและถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน โปรตีน TBP จะถูกนำกลับเข้าสู่นิวเคลียส และหาตำแหน่งจับที่เฉพาะบนดีเอ็นเอ ซึ่งก็คือตำแหน่งของ TATA box นอกจากนี้ trans-acting factor ยังมีหน้าที่ที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ กระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ด้วยเหตุนี้จึงเรียกโปรตีนชนิดนี้ว่า transcriptional activator ดังนั้น ทั้ง cis-acting element และ trans-acting factor จึงร่วมกันควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจง โดยที่ cis-acting element ควบคุมยีนที่มีตำแหน่งนี้ติดอยู่ ส่วน trans-acting factor ควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ซึ่งไม่จำเป็นต้องมีตำแหน่งนี้ติดอยู่ด้วย

TATA box และ TBP สามารถพบได้กับยีนโดยทั่วไป และไม่ทำให้เกิดรูปแบบการแสดงออกที่เฉพาะ แต่มี DNA binding protein ชนิดอื่นๆ ที่มีตำแหน่งเกาะกับดีเอ็นเอที่สามารถควบคุมรูปแบบการแสดงออกของยีนนั้นๆ ได้อย่างจำเพาะ เป้าหมายสำคัญอย่างหนึ่งของการหาลำดับเบสของจีโนมของสิ่งมีชิวิตชนิดต่างๆ ในปัจจุบันคือ การค้นหา cis-acting element ทั้งหมดในบริเวณโพรโมเตอร์ และการค้นหา trans-acting factor ที่จำเพาะต่อกันด้วย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก ความสามารถในการที่จะดัดแปลงควบคุมการทำงานของ trans-acting factor เพียงอย่างเดียว จะส่งผลให้สามารถควบคุมหรือเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนได้ทั้งระบบ เมื่อพิจารณาร่วมกันทั้งโปรตีนควบคุม (regulatory protein) และยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมทั้งหมดแล้ว สามารถเรียกระบบนี้ได้ว่า “regulon” โดย regulon สามารถเปรียบเทียบได้กับห้องที่เต็มไปด้วยหลอดไฟ โดยที่หลอดไฟแต่ละหลอดเปรียบเสมือนยีนแต่ละยีนในระบบ และโปรตีนควบคุมทำหน้าที่เหมือนสวิตช์ไฟ ที่ควบคุมการปิดเปิดของหลอดไฟทั้งหมดในระบบนั้น

ส่วนประกอบของ transcription factor

Trans-acting factor หรือ transcription factor มีองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ส่วนคือ ส่วน DNA binding domain และส่วน activation domain ซึ่งองค์ประกอบทั้ง 2 ส่วนนี้จะอยู่ที่ตำแหน่งต่างกันในโปรตีน ตัวอย่างเช่น โปรตีน GAL4 ในยีสต์ ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีกาแล็กโทสโดย GAL 4 transcription factor จะจับกับ cis-acting element ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 17 เบสที่เรียกว่า GAL4 Upstream Activation Sequence หรือ $GAL4_{UAS}$ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดนี้จะปรากฏอยู่ในบริเวณโพรโมเตอร์ของยีนหลายยีน ที่เกี่ยวข้องกับการใช้กาแล็กโทสในจีโนมของยีสต์ ตัวอย่างเช่น ยีน *Gal1* และ ยีน *Gal10* เป็นต้น GAL4 transcription factor ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งสิ้น 881 หมู่ แต่เฉพาะกรดอะมิโนลำดับที่ 1-147 ของโปรตีน GAL4 เท่านั้นที่จำเป็นสำหรับการจับกับ cis-acting $GAL4_{UAS}$ ในทำนองเดียวกันส่วนปลายของโปรตีน GAL4 ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 768-881 เท่านั้นที่เป็นส่วนของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น activator ของโปรตีน ซึ่งกระตุ้นการทำงานของยีน ดังนั้นสรุปได้ว่าสำหรับ transcription factor GAL4 นั้น NH_3-terminal ของโปรตีนมีความสำคัญต่อการจับกับดีเอ็นเอ ในขณะที่ COOH-terminal ของโปรตีนมีความสำคัญต่อการกระตุ้นการทำงานของยีนเป้าหมาย GAL4 เป็น transcription factor ที่นิยมใช้ทั่วไปทั้งในระบบ yeast one-hybrid และ yeast two-hybrid (Lobo *et al*., 2007; Macfarlane and Uhrig, 2008; Vega-Sanchez *et al*., 2008)

ระบบ Yeast One-Hybrid และ Yeast Two-Hybrid

เมื่อทบทวนความรู้พื้นฐานทางด้านโครงสร้างและการควบคุมการทำงานของยีน และ transcription factor แล้ว ลำดับต่อไปจะกล่าวถึงประโยชน์ของระบบ yeast one-hybrid และ yeast two-hybrid

ระบบ yeast two-hybrid ได้รับการพัฒนาขึ้นก่อน yeast one-hybrid โดย yeast two-hybrid เป็นระบบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อค้นหาโปรตีนชนิดใหม่ๆ ที่อาจทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่กำลังศึกษาอยู่ โดยโปรตีนที่ต้องการศึกษาจะทำหน้าที่เป็นตัวล่อ (bait) ซึ่งเป้าหมายของการค้นหานี้มี 2 ประการคือ (1) เพื่อค้นหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ศึกษา โดยคาดว่าจะได้ข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่ของโปรตีนที่ต้องการศึกษาเพิ่มขึ้น และ (2) การทราบโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ศึกษา จะช่วยให้เข้าใจถึงกระบวนการทางชีววิทยาโดยรวมของทั้งระบบดีขึ้น

ระบบการทำงานของ yeast two-hybrid อาศัยหลักการพื้นฐานของ trans-acting transcriptional factor ที่ สามารถถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่จับกับดีเอ็นเอ (สำหรับ DNA binding domain ของโปรตีน GAL4 คือ กรดอะมิโนลำดับที่ 1-147 = $GAL4_{DBD}$) และส่วนที่กระตุ้นการทำงานของยีน (สำหรับ activation domain ของโปรตีน GAL4 คือ กรดอะมิโนลำดับที่ 768-881 = $GAL4_{AD}$) โดยที่ความสามารถของ transcription factor ในการควบคุมหรือกระตุ้นการแสดงออกของยีนนั้น จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อองค์ประกอบทั้งสองส่วนของ transcription factor ซึ่งได้แก่ DNA binding domain และ activation domain ปรากฏอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน หรือระยะที่ใกล้กันเพียงพอ ในการทำงานด้วยระบบ yeast two-hybrid นั้น สามารถทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ส่วนนี้แยกกันในยีสต์เซลล์เดียวกัน โดยที่แม้ว่าจะมีตำแหน่งจับของดีเอ็นเอสำหรับโปรตีน GAL4 อยู่บนโครโมโซมของยีสต์ก็ตาม แต่ $GAL4_{DBD}$ เพียงอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้ เนื่องจากขาดส่วนของ $GAL4_{AD}$ ทั้งนี้เนื่องมาจาก $GAL4_{AD}$ ไม่ได้ติดอยู่กับส่วนของ $GAL4_{DBD}$ (Fig. 1)

หลักในการทำงานของระบบ yeast two-hybrid คือ การประกอบส่วนของ DNA binding domain เข้ากับส่วนของ trans-activating domain เพื่อให้ได้โปรตีน GAL4 ที่สมบูรณ์ภายในนิวเคลียสของ

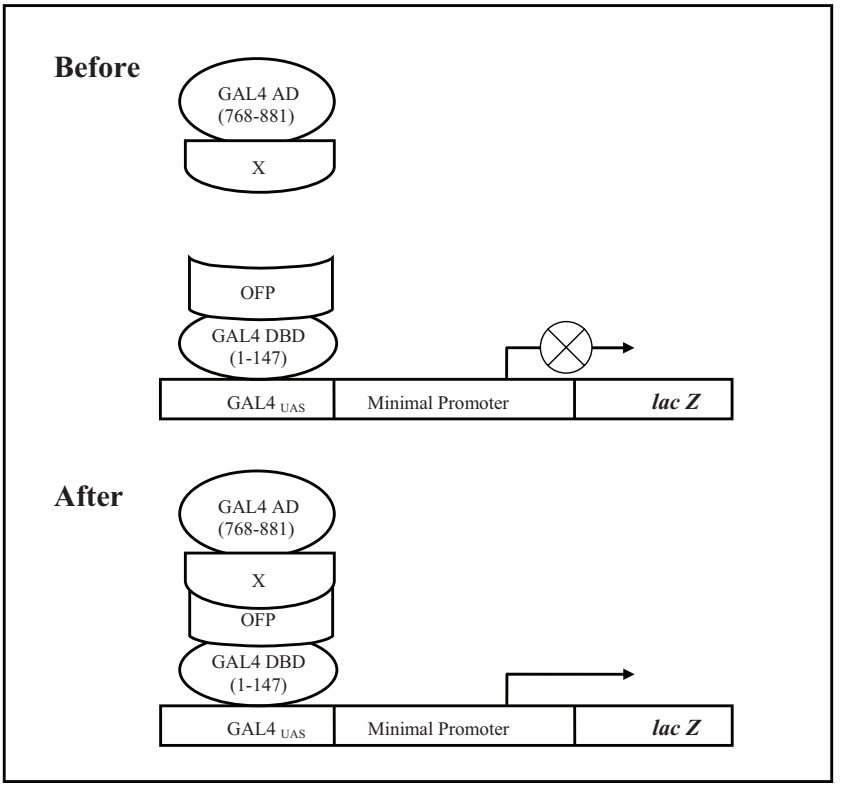

Figure 1 The basic yeast two-hybrid system. The GAL4 DNA binding domain (GAL4 DBD) and GAL4 activation domain (GAL4 AD) are expressed as two separated fusion proteins within single yeast host. If the DNA binding domain and activation domain are brought together as a result of interaction between the two foreign proteins in the bait and prey fusions (OFP and X, respectively), then transcriptional activation (read-through) results, and the reporter gene (*lacZ*) is expressed.

ยีสต์ กระบวนการนี้จะสำเร็จได้ มิได้เกิดจากการทำปฏิกิริยากันโดยตรงระหว่าง $GAL4_{AD}$ กับ $GAL4_{DBD}$ ของโปรตีน GAL4 แต่ต้องอาศัยปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนที่ต้องการศึกษา (Our Favorite Protein หรือ OFP) กับโปรตีนอีกชนิดหนึ่ง ที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนที่ทำงานร่วมกันตามธรรมชาติกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา สรุปคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นผ่านทางการทำงานของโปรตีนไคเมอริก (chimeric protein) โดยโปรตีนไคเมอริกชนิดแรกคือ $GAL4_{DBD}$ ที่ถูกสร้างให้เชื่อมต่อกับ OFP ($GAL4_{DBD}$-OFP) ซึ่งจะถูกใช้เป็นตัวล่อ เพื่อค้นหาโปรตีนที่สามารถทำปฏิกิริยากับ OFP ได้ต่อไป ทั้งนี้โปรตีนที่ต้องการค้นหาหรือเหยื่อ (prey) ของการค้นหานี้ประกอบด้วยประชากรของโปรตีนชนิดต่างๆ (X) ที่ถูกสร้างให้เชื่อมต่อกับ $GAL4_{AD}$ ($GAL4_{AD}$-X) ถ้าในยีสต์เซลล์เดียวกันมีโปรตีนที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ OFP ได้ ก็จะเป็นการนำเอา $GAL4_{DBD}$-OFP เข้ามาอยู่ในระยะที่ใกล้กันกับโปรตีน unknown X ที่เชื่อมติดอยู่กับ $GAL4_{AD}$ ($GAL4_{AD}$-X) ซึ่งผลจากการทำปฏิกิริยากันระหว่าง $GAL4_{DBD}$-OFP กับ $GAL4_{AD}$-X ในยีนที่มีลำดับเบสของ $GAL4_{UAS}$ ในบริเวณโพรโมเตอร์ ก็จะทำให้ยีนดังกล่าวถูกกระตุ้นให้เกิดการแสดงออก ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ยีนรายงานผล (reporter gene) ที่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้อย่างง่าย

(Fig. 1) ซึ่งยีนรายงานผลที่ใช้มี 2 พวก คือ ยีนรายงานผลที่ทำให้เกิดสี เช่น ยีน *lacZ* และยีนรายงานผลที่ทำให้ยีสต์ออกโซโทรฟ (auxotroph) สามารถเจริญได้ เช่น ยีน *LEU2* หรือ *LEU3* เป็นต้น (Chern *et al*., 2007)

ส่วนระบบ yeast one-hybrid ได้รับการพัฒนาขึ้นมาภายหลัง yeast two-hybrid โดยการใช้ลำดับเบสที่เป็น cis-acting element มาเป็นตัวล่อเพื่อหา DNA binding protein ที่สามารถจับได้กับลำดับเบสของ cis-acting element ดังกล่าวโดยตรง โดยการแทนที่ $GAL4_{UAS}$ ซึ่งต่ออยู่กับ minimal promoter-*lacZ* ด้วย cis-acting element จากส่วนโพรโมเตอร์ของยีนที่ต้องการศึกษา (our favorite gene's promoter: $OFGP_{UAS}$) ในกรณีนี้ต้องการเพียงโปรตีนที่สามารถจดจำ และจับกันได้กับลำดับเบสจาก $OFGP_{UAS}$ เท่านั้น ไม่จำเป็นต้องมีการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน โดยสามารถปฏิบัติได้โดยการสร้างประชากรของโปรตีนที่เชื่อมต่ออยู่กับ $GAL4_{AD}$ ถ้าโปรตีนนั้นสามารถจับกับ $OFGP_{UAS}$ ได้ก็จะส่งผลให้ $GAL4_{AD}$ กระตุ้นการแสดงออกของยีนรายงานผล (Li and Herskowitz, 1993)

โดยทั่วไปก่อนที่จะใช้ yeast one-hybrid ในการค้นหา DNA binding protein จำเป็นต้องมีข้อมูลของ cis-acting DNA regulatory element ก่อน ซึ่งข้อมูลต่างๆ นี้จะได้มาจาก (1) การเชื่อมต่อส่วนโพรโมเตอร์เข้ากับยีนรายงานผลและถ่ายเข้าสู่เซลล์ (Van Herpen *et al*., 2008) (2) การแทนที่ของลำดับเบสในบริเวณโพรโมเตอร์ และการหาส่วนของโพรโมเตอร์ที่จำเป็นต่อการแสดงออกของยีน (Digeon *et al*., 1999) (3) การทำ gel electrophoretic mobility shift assays (gel retardation) โดยใช้โปรตีนที่สกัดออกมา ทำปฏิกิริยากับชิ้นดีเอ็นเอที่มีส่วนของ cis-acting element ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตภาพรังสี (Xiao *et al*., 1998) โดยที่ถ้ายิ่งทราบข้อมูลของ cis-acting element มากเท่าใด ก็จะทำให้สามารถทราบและวิเคราะห์ผลได้มากขึ้นเท่านั้น

การตรวจหา cis-acting element

การตรวจหาลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็น cis-acting element นั้นสามารถทำได้โดยการนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบว่าเป็น cis-acting element หรือไม่นั้น มาต่อเข้ากับ minimal promoter และยีนรายงานผล เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนรายงานผล ตัวอย่างเช่น การใช้ยีน *lacZ* เป็นยีนรายงานผล ก็สามารถตรวจสอบได้จากการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase จากนั้นค่อยๆ ลดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจผลการแสดงออกของยีนรายงานผลได้อีก ก็จะสามารถสรุปได้ว่าบริเวณใดของชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเป็นต่อการจับเกาะของโปรตีนควบคุม หรือบริเวณใดของชิ้นดีเอ็นเอที่เป็น cis-acting element (Fig. 2)

การสร้างโครงสร้างของยีนรายงานผลในยีสต์

หลังจากที่ทราบตำแหน่งลำดับของดีเอ็นเอที่จับกับโปรตีนแล้ว ขั้นต่อไปคือ การแทนที่ลำดับดีเอ็นเอ (cis-acting element) นี้กับส่วน UAS ของยีสต์ในบริเวณโพรโมเตอร์พื้นฐาน ซึ่งสามารถใช้ลำดับเบสทั้งหมดของโพรโมเตอร์ หรือลำดับเบสบางส่วนมาเชื่อมต่อกับ minimal promoter ของยีสต์ที่มีเฉพาะ TATA box และตำแหน่ง +1 "hybrid" โพรโมเตอร์ที่ได้นี้ จะสามารถถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกได้ โดยสามารถติดตามได้จากการแสดงออกของยีนรายงานผล *lacZ* โดยยีน *lacZ* จะสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งจะตัดซับสเตรต X-gal ได้ผลเป็นสีฟ้าปนสีน้ำเงิน (Fig. 3A)

การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการถ่ายยีน

ทุกขั้นตอนในกระบวนการเตรียมโครงสร้างของยีนรายงานผลด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ จะดำเนินการอยู่ภายในเซลล์ของ *E. coli* เมื่อ cis-acting element ที่ต้องการศึกษาถูกโคลนเข้าไปที่ด้านหน้าของ yeast minimal promoter ที่อยู่บนพลาสมิดแล้ว พลาสมิด

ดังกล่าวจึงจะถูกถ่ายเข้าสู่เซลล์ยีสต์ เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนรายงานผล การถ่ายฝากพลาสมิดเข้าสู่ยีสต์สามารถทำได้สองวิธีคือ การใช้ electroporation (Suga and Hatakeyama, 2003) และการใช้ LiCl (Hood and Stachow, 1990) เนื่องจากพลาสมิดที่ถ่ายเข้าไปในยีสต์นี้ มียีนสำหรับการสร้างกรดอะมิโนหรือสารชีวโมเลกุลที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ ดังนั้นเฉพาะยีสต์ที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีกรดอะมิโนหรือสารชีวโมเลกุลดังกล่าว ตัวอย่างของยีนที่ใช้ในการคัดเลือกคือ ยีน *URA3* ซึ่งเป็นยีนที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์ไพริมิดีนไรโบนิวคลีโอไทด์ กลไกการทำงานของการคัดเลือกคือ ยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ตัวอย่างเช่น GGY1 จะเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มียีน *URA3* จึงไม่สามารถเจริญได้ ต้องเพาะเลี้ยงในอาหารที่มียูราซิลอยู่เท่านั้นจึงจะสามารถเจริญ

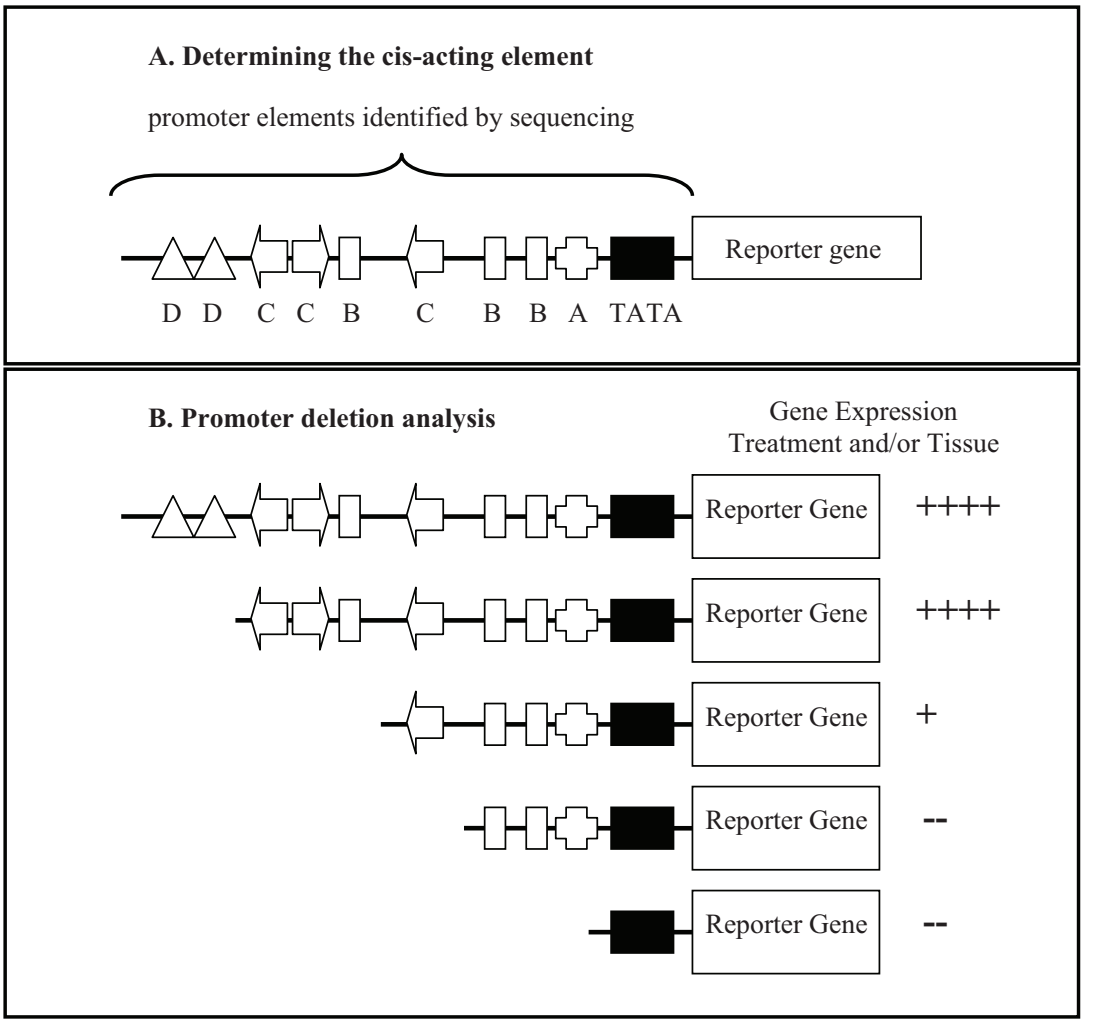

Figure 2 Determining the cis-acting element and promoter deletion analysis. To determine the cis-acting element, the sequence of interested DNA was fused with minimal promoter and reporter gene and examined the expression of the reporter gene (A). The interested DNA was serially deleted to identify the motif which necessary for the activation of reporter gene (B).

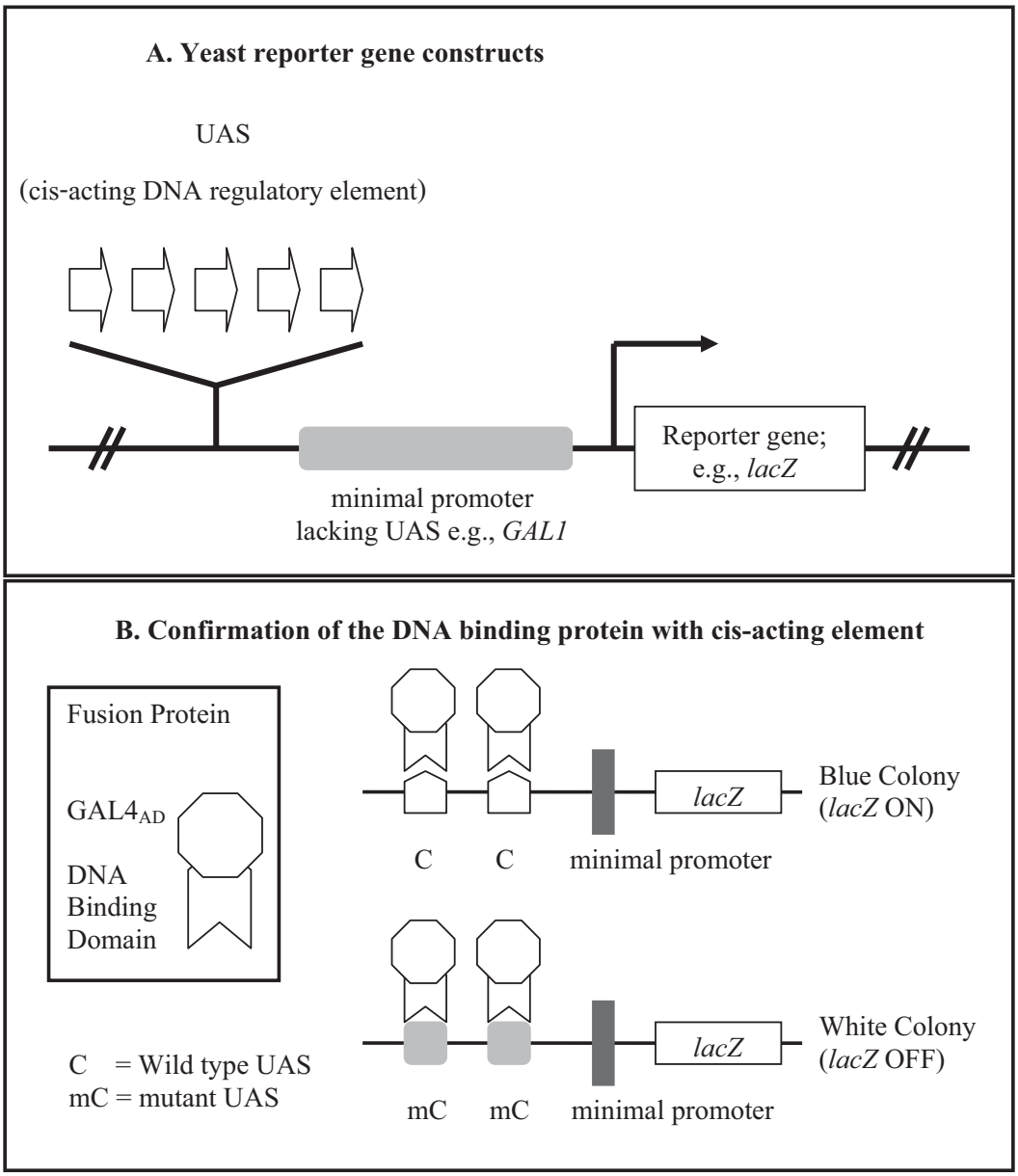

Figure 3 Yeast reporter gene constructs and confirmation of the DNA binding protein with cis-acting element. To create the yeast reporter gene construct, a cis-acting DNA element is fused with yeast minimal promoter that driven the reporter gene (*lacZ*) (A). To confirm the DNA binding protein with cis-acting element, DNA binding protein is fused with GAL4 activating domain and transfered into yeast cell with wild type cis-acting element which will give the blue colony as a true binding occured. On the other hand, transferring the DNA binding protein fused with GAL4 activating domain into yeast cell with mutant cis-acting element will give rise to white colony as the specificity of the binding is absent (B).

ได้ ซึ่งมีสัญลักษณ์ของยีนเป็น *ura3*$^-$ ดังนั้นเมื่อถ่ายพลาสมิดที่มียีน *URA3* เข้าสู่เซลล์ยีสต์นี้ จึงทำให้ยีสต์ที่มีพลาสมิดสามารถเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มียูราซิล

ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของพลาสมิดที่ใช้คือ การที่ยีสต์สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มียูราซิลนั้น จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อยีน *URA3* จากพลาสมิดได้เข้าไปรวมอยู่ในจีโนมของยีสต์เท่านั้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากว่า พลาสมิดที่ใช้นี้ไม่มีจุดกำเนิดการจำลองตัวเองเหมือนกับโครโมโซมของยีสต์ ดังนั้นกรณีเดียวที่ยีสต์จะสามารถเจริญได้ในอาหารนี้คือการที่ยีน *URA3* จากพลาสมิดได้เข้าไปอยู่รวมกับจีโนมของยีสต์เท่านั้น โดยกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นด้วยวิธีที่เรียกว่า “homologous recombination” ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากในยีสต์ โดยการอาศัยนิวคลีโอไทด์ประมาณ 250 เบสที่เหมือนกันระหว่างโครโมโซมของยีสต์กับดีเอ็นเอจากพลาสมิด (Aylon and Kupiec, 2004) ในขณะเดียวกับที่ยีน *URA3* จากพลาสมิดได้เข้าไปอยู่รวมกับจีโนมของยีสต์นั้น ยีนรายงานผลก็ได้เข้าไปอยู่ในจีโนมของยีสต์ด้วยเช่นกัน

เมื่อได้สายพันธุ์ยีสต์ที่มียีนรายงานผล ตัวอย่างเช่น ยีน *lacZ* อยู่ในจีโนมของยีสต์แล้ว ยีสต์สายพันธุ์นี้จะถูกใช้เป็นเจ้าบ้าน (host) สำหรับการถ่ายฝากด้วยประชากรของโปรตีน เพื่อหาโปรตีนที่สามารถจับเกาะกับลำดับของ cis-acting element ที่ต้องการศึกษาได้ ในภาวะปกติยีน *lacZ* จะมีระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างต่ำเนื่องจากถูกควบคุมด้วย minimal promoter โดยที่ยีสต์นี้จะไม่เปลี่ยนสีเป็นสีฟ้าปนน้ำเงินเมื่อใส่ X-gal ลงในการทดสอบ β-galactosidase assay

การสร้างห้องสมุดของยีนที่เชื่อมต่อกับ activation domain

องค์ประกอบหลักอีกอย่างหนึ่งที่จำเป็นสำหรับระบบ yeast one-hybrid และ yeast two-hybrid คือ การสร้างประชากรของโปรตีนที่เชื่อมต่ออยู่กับ activation domain ในการสร้างประชากรโปรตีนนี้จะต้องโคลนชิ้น cDNA ลงในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก (expression vector) เพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีน และเชื่อมต่อกันกับส่วนของ activation domain ซึ่งมักนิยมใช้ activation domain ของโปรตีน GAL4 ($GAL4_{AD}$ = $GAL4_{768-881}$) ประชากรของโปรตีนที่มี DNA binding motif ที่สามารถจับกับ cis-acting element ที่ต้องการศึกษาและโคลนอยู่ในเฟรมเดียวกันกับ $GAL4_{AD}$ จะไปเกาะกับ UAS ด้านหน้าของยีนรายงานผล เช่น *lacZ* แล้วสามารถเปลี่ยนสีโคโลนีของยีสต์เป็นสีน้ำเงินด้วยการทดสอบ β-galactosidase assay

การถ่ายฝากห้องสมุดของยีนที่เชื่อมต่ออยู่กับ activation domain เข้าสู่ยีสต์

หลังจากที่มีองค์ประกอบทั้งสองส่วน ซึ่งได้แก่ เซลล์ยีสต์ที่มียีนรายงานผล และประชากรของโปรตีนที่เชื่อมต่ออยู่กับ activation domain แล้ว กระบวนการต่อไปคือ การถ่ายฝากสายพันธุ์ยีสต์ที่มียีนรายงานผลนี้ ด้วยประชากรของโปรตีนที่เชื่อมต่ออยู่กับ activation domain ยีสต์ที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดแล้ว จะถูกเลี้ยงในอาหารที่ยอมให้เฉพาะเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเท่านั้นสามารถเจริญได้ โดยมีขั้นตอนการถ่ายฝากพลาสมิดโดยย่อดังต่อไปนี้ เริ่มต้นจากการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหาร yeast potato dextrose agar (YPDA) จนกระทั่งเข้าสู่ระยะกลางของ log phase ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 5-10 x 10^6 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร หรือมีค่า OD_{600} ประมาณ 2 จากนั้นจึงเตรียมเซลล์ให้พร้อมเพื่อรับถ่ายฝากชิ้นพลาสมิด ตามวิธีของ Suga and Hatakeyama (2003) แล้วจึงเทลงในอาหารที่จะคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด แล้วนำไปเพาะเลี้ยงประมาณ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นวางแผ่นเมมเบรน nitrocellulose ลงบนอาหารที่มียีสต์เจริญนี้ และบ่มต่ออีกประมาณ 12-24 ชั่วโมง เพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญขึ้นมาบนแผ่นเมมเบรนนี้ จากนั้นยกแผ่นเมมเบรนนี้ออก แล้วจุ่มลงใน

ไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เซลล์ยีสต์ถูกแช่แข็ง แล้วนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เซลล์ยีสต์ละลายกลับ การแช่แข็งและการละลายกลับของเซลล์ยีสต์จะทำให้เซลล์ยีสต์แตก ปลดปล่อยโปรตีนที่อยู่ในเซลล์ออกมาภายนอก และติดอยู่บนเมมเบรน ณ ตำแหน่งนั้น จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาบ่มกับสารละลาย X-gal ซึ่งถ้ายีสต์มียีน *lacZ* ก็จะมี β-galactosidase แสดงออกภายในเซลล์ของยีสต์นั้นๆ และติดอยู่บนเมมเบรน เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ X-gal ก็จะทำให้บริเวณดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีฟ้าปนสีน้ำเงิน

การยืนยันการจับกันระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีนที่ตรวจพบ

โดยทั่วไปผลลัพท์ที่ได้จาก yeast one-hybrid และ two-hybrid จะประกอบไปด้วยผล false positive จำนวนมาก ตัวอย่างสำหรับกรณีของ yeast one-hybrid นั้น เมื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอออกมาจากเซลล์ยีสต์ที่ให้ผลบวกจากขั้นตอนข้างต้น แล้วถ่ายพลาสมิดกลับคืนเข้าไปยังสายพันธุ์ยีสต์ที่มียีนรายงานผล แต่กลับไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *lacZ* ได้ ซึ่งยังไม่มีรายงานว่าเพราะเหตุใด เหตุการณ์เช่นนี้จึงเกิดขึ้นได้ มีแต่ข้อเสนอแนะความเห็นว่าน่าจะเป็นเพราะเหตุใด (Bruckner *et al*., 2009) ดังนั้นการทดสอบโดยการถ่ายพลาสมิด กลับเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ที่มียีนรายงานผล ก่อนที่จะศึกษาในรายละเอียดขั้นต่อๆ ไป จึงมีความจำเป็นและสำคัญมาก ซึ่งมีวิธีการปฏิบัติดังต่อไปนี้ เริ่มต้นด้วยการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่ให้ผลทดสอบเป็นสีฟ้าปนน้ำเงิน ในอาหารสำหรับการคัดเลือก (selective medium) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 10-12 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ยีสต์ ถ่ายฝากพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* แล้วสกัดพลาสมิดออกจาก *E. coli* แล้วจึงถ่ายฝากกลับเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ที่มียีนรายงานผล เพื่อตรวจทดสอบ β-galactosidase assay อีกครั้ง ถ้าผลการทดสอบยืนยันว่าโปรตีนที่ได้จากพลาสมิดนั้นๆ สามารถทำให้เกิดสีฟ้าปนน้ำเงินใน β-galactosidase assay ได้จริง ในลำดับต่อไปควรมีการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของโปรตีนชนิดนี้ว่ามีความเฉพาะเจาะจงต่อ cis-acting element ที่ต้องการศึกษาเพียงใด โดยควรมีการศึกษาการเปลี่ยนลำดับของเบสใน cis-acting element เพื่อยืนยันว่าถ้าลำดับเบสดังกล่าวเปลี่ยนไปแล้ว จะทำให้ cis-acting element นั้นๆ ไม่ทำงานอีกต่อไป นั่นคือเมื่อถ่ายพลาสมิดที่ค้นพบได้จาก yeast one-hybrid เข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ที่มี UAS ไวด์ไทป์ดั้งเดิมแล้ว เซลล์ยีสต์เหล่านั้นก็จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าปนน้ำเงิน แต่ถ้าถ่ายพลาสมิดที่ค้นพบได้จาก yeast one-hybrid เข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ที่มี UAS ที่เปลี่ยนแปลงไป เซลล์ยีสต์เหล่านั้นจะไม่เปลี่ยนเป็นสีฟ้าปนน้ำเงิน แต่จะยังคงเป็นสีขาวเช่นเดิม (Fig. 3B)

สำหรับในกรณีของ yeast two-hybrid นั้น ก็เช่นเดียวกันกับ yeast one-hybrid คือต้องสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ของยีสต์ ถ่ายฝากพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* แล้วถ่ายฝากกลับเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ที่มียีนรายงานผล เพื่อตรวจทดสอบ β-galactosidase assay อีกครั้ง นอกจากนี้ยังต้องตรวจสอบโดยการสลับโปรตีนไคเมอริกระหว่างโปรตีนที่ต้องการศึกษา (OFP) ซึ่งต่ออยู่กับ $GAL4_{DBD}$ ($GAL4_{DBD}$-OFP) และโปรตีนที่ค้นพบ (X) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ OFP ซึ่งต่ออยู่กับ $GAL4_{AD}$ ($GAL4_{AD}$-X) โดยการสร้างโปรตีนไคเมอริกระหว่างโปรตีนที่ต้องการศึกษาที่ต่ออยู่กับ $GAL4_{AD}$ ($GAL4_{AD}$-OFP) และโปรตีนไคเมอริกระหว่างโปรตีนที่ค้นพบที่ต่ออยู่กับ $GAL4_{DBD}$ ($GAL4_{DBD}$-X) แล้วถ่ายฝากกลับเข้าสู่เซลล์ยีสต์ที่มียีนรายงานผล เพื่อตรวจทดสอบ β-galactosidase assay อีกครั้ง โดยผลการทดลองเซลล์ยีสต์เหล่านั้นต้องสามารถเปลี่ยนเป็นสีฟ้าปนน้ำเงินจึงจะมั่นใจได้ และพร้อมที่จะศึกษาในรายละเอียดขั้นต่อๆ ไป

เมื่อยืนยันผลการทดสอบการจับกันของโปรตีนและ cis-acting element จาก yeast one-hybrid และการจับกันระหว่างโปรตีนที่ต้องการศึกษากับโปรตีนที่ค้นพบ จาก yeast two-hybrid แล้ว พลาสมิด

ที่มียีนของโปรตีนดังกล่าว จะถูกสกัดออกมาจากเซลล์ยีสต์ ถ่ายเข้าสู่ *E.coli* และสกัดพลาสมิดออกมาอีกครั้ง เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างโปรตีนดังกล่าว และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ศึกษาต่อไป

ในปัจจุบันนี้มีผลงานวิจัยมากมายที่ใช้เทคนิค yeast one-hybrid และ yeast two-hybrid เข้ามาช่วยในกระบวนการศึกษาค้นคว้า ทั้งงานวิจัยทางด้านชีวภาพ ด้านการเกษตร และด้านการแพทย์ ตัวอย่างเช่น Chern *et al*. (2007) ได้ใช้ระบบ yeast two-hybrid ในการค้นหาโปรตีนที่จับกับโปรตีนจากยีนต้านทานโรคในข้าวได้ ทำให้สามารถทราบถึงองค์ประกอบและกระบวนการในการต้านทานโรคในข้าวสำเร็จ Onate *et al*. (1995) ใช้เทคนิค yeast two-hybrid ในการค้นหา coactivator ของฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน โดยการใช้ฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนของมนุษย์เป็นตัวล่อ โดยผลของการศึกษาทางชีวเคมีในระบบของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบว่า coactivator ดังกล่าวมีส่วนร่วมในการทำงานกับสเตียรอยด์ฮอร์โมนหลายชนิดของมนุษย์ Lopato *et al*. (2006) ได้ดัดแปลงวีธีการ yeast one-hybrid เพื่อใช้ค้นหา transcription factor จากข้าวสาลี โดยสามารถค้นพบ transcription factor จำนวน 6 ชนิด ที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มชนิด เป็นต้น

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าระบบ yeast one-hybrid และ yeast two-hybrid เป็นระบบที่มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ดังนั้นการเข้าใจถึงหลักการและขั้นตอนวิธีในระบบทั้งสองนี้ จะช่วยให้สามารถนำเอาเทคนิคทั้งสองมาประยุกต์ใช้เพื่อตอบคำถามในงานวิจัยในอนาคตได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

Aylon, Y. and Kupiec, M. 2004. New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat Res* 566: 231-248.

Bruckner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. and Schlattner, U. 2009. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci* 18: 2763-2788.

Chern, M., Richter, T. and Ronald, P.C. 2007. Yeast two-hybrid approaches to dissecting the plant defense response. *Methods Mol Biol* 354: 79-83.

Digeon, J.F., Guiderdoni, E., Alart, R., Michaux-Ferriere, N., Joudrier, P. and Gautier, M.F. 1999. Cloning of a wheat puroindoline gene promoter by IPCR and analysis of promoter regions required for tissue-specific expression in transgenic rice seeds. *Plant Mol Biol* 39: 1101-1112.

Hood, M.T. and Stachow, C. 1990. Transformation of *Schizosaccharomycese pombe* by electroporation. *Nucleic Acids Res* 18: 688.

Li, J.J. and Herskowitz, I. 1993. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 262: 1870-1874.

Lobo, D.S., Pereira, I.B., Fragel-Madeira, L.N., Cabral, L.M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R. C., Linde, R. and Kurtenbach, E. 2007. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46: 987-996.

Lopato, S., Bazanova, N., Norran, S., Milligan, A.S., Shieley, N. and Langridge, P. 2006. Use of a modified yeast one-hybrid system for isolation of plant transcription factors. Clontech Laboratory, Inc. October 2006: 1-4

Macfarlane, S.A. and Uhrig J.F. 2008. Yeast two-hybrid assay to identify host-virus interactions. *Methods Mol. Biol*. 451: 649-672.

Mewes, H.W., Albermann, K., Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S.G., Pfeiffer,

F. and Zollner, A. 1997. Overview of the yeast genome. *Nature* 29: 7-65.

Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. 1995. Sequence and characterization of a cofactor for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357.

Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol*. 194: 3-21.

Suga, M. and Hatakeyama T. 2003. High-efficient electroporation by freezing intact yeast cells with addition of calcium. *Curr Genet* 43: 206-211.

Van Herpen, T.W., Rilay, M., Sparks, C., Johns, H. D., Gritsch, C., Dekking, E.H., Hamer, R.J., Bosch, D., Salentijn, E.M., Smulders, M.J., Shewry, P.R. and Gilissen, L.J. 2008. Detailed analysis of the expression of an alpha-gliadin promoter and the deposition of alpha-gliadin protein during wheat grain development. *Ann Bot* 102: 331-342.

Vega-Sanchez, M., Zeng, L., Chen, S., Leung, Hei and Wang, G.L. 2008. SPIN1, a K homology domain protein negatively regulated and ubiquitinated by the E3 ubiquitin ligase SPL1, is involved in flowering time control in rice. *Plant Cell* 20: 1456-1469.

Xiao, H., Shen, S. and Zhu, J. 1998. Binding of activator SyrM to the site of nodD3 P1 region of *Rhizobium melilioti*. *Sci China C Lif Sci* 41: 157-162.