



การโคลน การผลิต และการทำโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อย  
แอลฟาและเบตาจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนให้บริสุทธิ์  
และการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

โดย

นางสาวลิซล ฮวดรักษาสัตย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การโคลน การผลิต และการทำโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อย  
แอลฟาและเบตาจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนให้บริสุทธิ์  
และการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

โดย

นางสาวลิซล ฮวดรักษาสัตย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

MOLECULAR CLONING, PRODUCTION, AND PURIFICATION OF  
C-PHYCOCYANIN ALPHA AND BETA SUBUNITS FROM  
A THERMOPHILIC CYANOBACTERIUM AND INVESTIGATION OF  
THEIR ANTIOXIDANT PROPERTIES

BY

MISS SICHON HUADRAKSASAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
THAMMASAT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2016

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวสิชล ฮวดรักษาสัตย์

เรื่อง

การโคลน การผลิต และการทำโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาและเบตา  
จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนให้บริสุทธิ์ และการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

เมื่อ วันที่ 28 มีนาคม พ.ศ. 2560

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก



(ดร. ชนิตโชต ปิยพิทยานันต์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเปญญา จิตตพันธ์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ดร. จันทนา ไพบูรณ์)

คณบดี

(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลน การผลิต และการทำโปรตีนซี-ไฟโคไซยานิน หน่วยย่อยแอลฟาและเบตาจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน ให้บริสุทธิ์ และการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวสิชล ฮวดรักษาสัตย์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	เทคโนโลยีชีวภาพ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. ชนิดโชต ปิยพิทยานันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุปัญญา จิตตพันธ์
ปีการศึกษา	2559

### บทคัดย่อ

ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycoyanin) คือไฟโคบิลิโปรตีนชนิดหนึ่ง มีสีน้ำเงินและมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย ปัจจุบันมีการนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้เป็นสีผสมในอาหารและเครื่องสำอาง อีกทั้งมีการรายงานว่าซี-ไฟโคไซยานินมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตและทำโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (CpcA) และเบตา (CpcB) จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยผู้วิจัยได้โคลนยีน *cpcA* และ *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เข้าสู่เวกเตอร์ pET28a และผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ใน *E. coli* Rosetta(DE3) จากนั้นทำโปรตีน CpcA และ CpcB ให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีน CpcA และ CpcB มีขนาดประมาณ 19.3 และ 20.6 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าโปรตีน CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ (Native Cpc) และโทรล็อก (Trolox) มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $22.35 \pm 0.19$ ,  $21.50 \pm 0.11$ ,  $18.65 \pm 0.19$  และ  $2.80 \pm 0.02$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในการทดสอบการ

ต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีลิปว่าโปรตีน CpcA, CpcB และซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ มีค่าสมมูลกับสารมาตรฐานโทร็อกเท่ากับ  $1.56 \pm 0.08$ ,  $2.48 \pm 0.02$  และ  $3.31 \pm 0.04$  ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโปรตีน CpcA และ CpcB มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างสูง และหากโปรตีน CpcA และ CpcB นี้มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงด้วยจักเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารและยาที่มีกระบวนการให้ความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้องได้ในอนาคต

**คำสำคัญ:** ซี-ไฟโคไซยานิน, ไฮยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน, โปรตีน CpcA, โปรตีน CpcB, สารต้านอนุมูลอิสระ



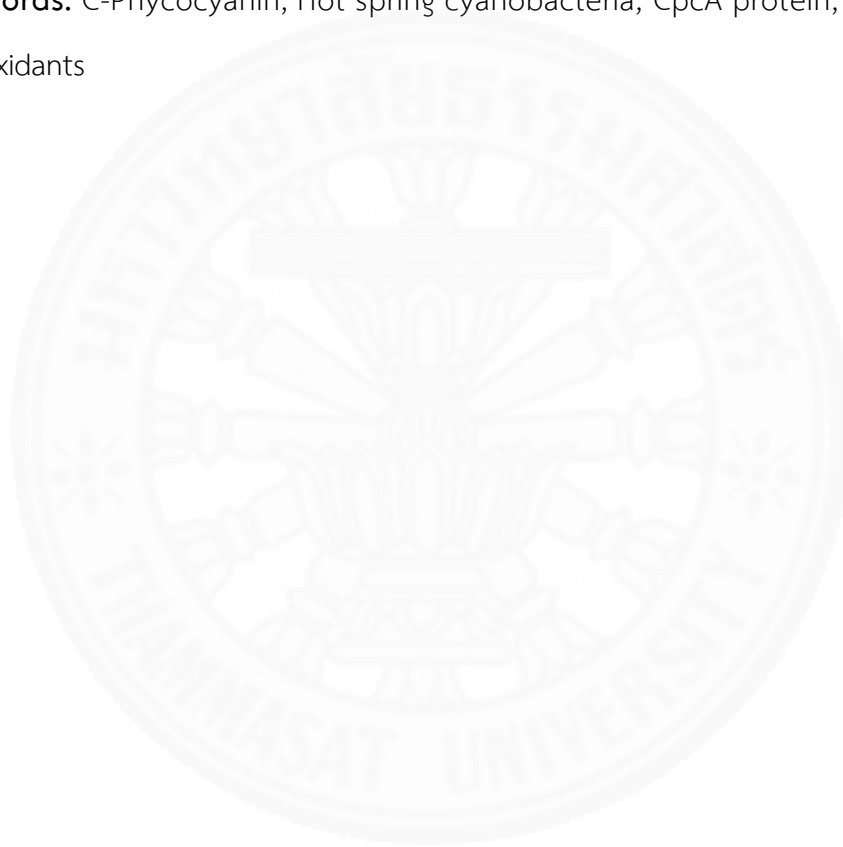
Thesis Title	Molecular Cloning, Production, and Purification of C-Phycocyanin Alpha and Beta Subunits from a Thermophilic Cyanobacterium and Investigation of Their Antioxidant Properties
Author	Miss Sichon Huadraksasat
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department/Faculty/University	Biotechnology Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Chanitchote Piyapittayanun, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Supenya Chittapun, Ph.D.
Academic Years	2016

## ABSTRACT

C-phycoerythrin (C-PE), a blue-colored pigment, is a type of phycobiliproteins that has an important role in light-dependent photosynthetic reactions of cyanobacteria. It is used as a natural pigment in food and cosmetics and has also been shown to possess antioxidant properties. The aims of this study were to express and purify C-phycoerythrin alpha (CpeA) and beta (CpeB) subunits from *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01, a thermophilic cyanobacterium, and investigate their antioxidant properties. The *cpeA* and *cpeB* genes were cloned into pET28a vector, expressed in *E. coli* Rosetta(DE3), and subsequently purified through a nickel metal affinity chromatography. The purified CpeA and CpeB with size of approximately 19.3 and 20.6 kDa respectively were detected in SDS-PAGE. The result of ABTS scavenging assay showed that the IC<sub>50</sub> values of CpeA, CpeB, native C-phycoerythrin, and trolox were 23.46±0.11, 23.17±0.10, 18.67±0.11, and 2.80±0.01 µg/ml respectively. The result of peroxy radical scavenging

assay showed that the trolox equivalent values of CpcA, CpcB and native C-phycoerythrin were  $1.56 \pm 0.08$ ,  $2.48 \pm 0.02$ , and  $3.31 \pm 0.04$   $\mu\text{M}$  respectively indicating that CpcA and CpcB exhibited relatively high antioxidant activity. If these CpcA and CpcB protein are also shown to be thermostable, they will be very attractive for food and pharmaceutical industries where high temperature steps may be involved.

**Keywords:** C-Phycocyanin, Hot spring cyanobacteria, CpcA protein, CpcB Protein, Antioxidants





## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ด้วยได้รับการชี้แนะ และสนับสนุนในการทำวิจัยอย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย ผู้ทำวิจัยกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำในการศึกษาและแนะนำแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจทานและแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างสูง ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเปัญญา จิตตพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างไฮยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน และตัวอย่างซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ อีกทั้งช่วยให้คำแนะนำและติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. จันทนา ไพรบูรณ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นผู้ทรงคุณวุฒิสำหรับวิทยานิพนธ์นี้ และช่วยให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดการศึกษา และขอขอบพระคุณนายเปรมณัฐ ขุนปักษี รวมถึงเจ้าหน้าที่และพี่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและความสนับสนุนตลอดการทำวิจัยอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้มอบทุนเรียนดี ปีการศึกษา 2557 เพื่อศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และทุนสนับสนุนการนำเสนอผลงานทางวิชาการในงาน The 9<sup>th</sup> Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology

ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์วิจัยคั้นคว่ำและพัฒนาฯ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รวมถึงบุคลากรในหน่วยงาน ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือต่าง ๆ และช่วยติดต่อประสานงาน ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณนายธิติวัดน์ คชายังยืน นางสาววิภาวี ศรีทัศนีย์ นางสาวครินภรณ์ ยอดเสนีย์ และผู้ที่มีส่วนร่วมทุกท่านที่มีโอกาสเอ่ยนามได้ทั้งหมด ในการให้กำลังใจ สนับสนุน และเป็นผู้ช่วยในการวิจัย จนเป็นผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ท้ายที่สุด ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณบิดาและมารดา ของผู้วิจัยที่ให้การสนับสนุนกับผู้วิจัยในด้านอื่น ๆ และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้เสมอมา

นางสาวสิชล ฮวดรักษาสัตย์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญรูปภาพ	(11)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 สถานที่ทำการวิจัย	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไซยาโนแบคทีเรีย	3
2.1.1 การสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย	3
2.1.2 จีโนมของไซยาโนแบคทีเรีย	5
2.2 ไฟโคบิลิโปรตีน	6
2.3 ซี-ไฟโคไซยานิน	8
2.3.1 โครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานิน	8
2.3.2 ยีนซี-ไฟโคไซยานิน	10
2.3.3 การสร้างซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาและเบตา	11
2.3.4 งานวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับซี-ไฟโคไซยานิน	12

2.3.5 การศึกษาซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูง	14
2.3.6 การนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้ประโยชน์	17
2.4 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	20
2.4.1 อนุมูลอิสระ	20
2.4.2 การป้องกันความเสียหายจากอนุมูลอิสระ	20
2.4.2.1 เอนไซม์ควบคุมสมดุลอนุมูลอิสระ	21
2.4.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ	21
2.4.2.3 สารกำจัดโลหะ	21
2.4.3 วิธีการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	22
2.4.3.1 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซี	23
2.4.3.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน	23
2.4.3.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี	24
2.4.3.4 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	25
2.4.3.5 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	25
2.4.3.6 การทดสอบความสามารถในการกำจัดกัมกับโลหะ	26
2.5 การผลิตโปรตีนในระบบ <i>E. coli</i> และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์	27
2.5.1 พลาสมิดสำหรับผลิตโปรตีน	27
2.5.2 แบคทีเรีย <i>E. coli</i> สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน	29
2.5.3 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตี-โครมาโทกราฟี	31
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	33
3.1 ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	33
3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	33
3.3 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>cpcA</i> และ <i>cpcB</i> จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน	34
3.4 การเพิ่มปริมาณยีน <i>cpcA</i> และ <i>cpcB</i> จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน	34
3.5 การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกลูโซฟอลิเมอเรส	35
3.5.1 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกลูโซฟอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์	35

3.5.2 การสกัดพลาสมิด pET28a จาก <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	35
3.5.3 การตัดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันและพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	36
3.5.4 การเชื่อมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเข้าสู่พลาสมิด pET28a	37
3.5.5 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	37
3.5.6 การทำโคลนนิ่งพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกในเวกเตอร์	38
3.5.7 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจาก <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	39
3.5.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	39
3.6 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	39
3.7 การผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ใน <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	40
3.8 การทำโปรตีน CpcA และ CpcB ให้บริสุทธิ์	40
3.9 การทำไดอะไลซิส	41
3.10 การเตรียมสารละลายสกัดหยาบ	41
3.11 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry	42
3.12 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน CpcA และ CpcB	42
3.12.1 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	42
3.12.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี	43
3.12.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซี	44
3.12.4 การทดสอบความสามารถในการกำจัดกัมมันตภาพรังสี	45
บทที่ 4 ผลการวิจัย	47
4.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>cpcA</i> และ <i>cpcB</i> จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน	47
4.2 การเพิ่มปริมาณยีน <i>cpcA</i> และ <i>cpcB</i> จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน	48
4.3 การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน	49
4.4 การผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ใน <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	51
4.4.1 การผลิตโปรตีน CpcB	51
4.4.2 การผลิตโปรตีน CpcA	56

	(9)
4.5 การทำโปรตีน CpcA และ CpcB ให้บริสุทธิ์	58
4.6 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน CpcA และ CpcB	62
4.6.1 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	62
4.6.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี	63
4.6.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซี	65
4.6.4 การทดสอบความสามารถในการกำจัดกับโลหะ	68
บทที่ 5 อภิปรายผล	70
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	79
รายการอ้างอิง	80
ภาคผนวก	89
ภาคผนวก ก	90
ภาคผนวก ข	91
ภาคผนวก ค	98
ประวัติผู้เขียน	101

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>cpcA</i> และ <i>cpcB</i>	34
3.2 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีน <i>cpcA</i> และ <i>cpcB</i>	35
3.3 ส่วนประกอบในการตัดยีน <i>cpcA</i> และพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ <i>XhoI</i>	36
3.4 ส่วนประกอบในการตัดยีน <i>cpcA</i> และพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ <i>NdeI</i>	37
3.5 ส่วนประกอบในการตัดยีน <i>cpcB</i> และพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ <i>XhoI</i> และ <i>NcoI</i>	37
3.6 ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	38
3.7 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	39
4.1 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน <i>cpcA</i> และ <i>cpcB</i>	47

## สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย	4
2.2 โครงสร้างของไฟโคบิลิโซม	7
2.3 การส่งผ่านพลังงานแสงภายในไฟโคบิลิโซม	8
2.4 โครงสร้างมอนอเมอร์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก <i>S. vulcanus</i>	9
2.5 โครงสร้างเฮกซะเมอร์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก <i>S. vulcanus</i>	10
2.6 การสังเคราะห์โพลีซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา	11
2.7 การสังเคราะห์โพลีซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา	12
2.8 การสร้างปฏิสัมพันธ์ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างมอนอเมอร์ของซี-ไฟโคไซยานิน จาก <i>S. vulcanus</i>	15
2.9 การสร้างปฏิสัมพันธ์ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างไตรเมอร์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก <i>S. vulcanus</i>	16
2.10 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ	26
2.11 แผนที่พลาสมิด pET28a	28
2.12 กลไกการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระบบ <i>E. coli</i>	30
2.13 พลาสมิด pRare	30
2.14 การจับของโปรตีนที่มีแท็กฮิสทีดินบนคอลัมน์แบบ Ni <sup>2+</sup> -IDA และ Ni <sup>2+</sup> -NTA	32
3.1 ไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน <i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01	33
4.1 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	48
4.2 แผนภาพพลาสมิด pET28a- <i>cpcA</i> และ pET28a- <i>cpcB</i>	49
4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสได้จากยีน <i>cpcA</i> ที่โคลนเข้าสู่ พลาสมิด pET28a	50
4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสได้จากยีน <i>cpcB</i> ที่โคลนเข้าสู่ พลาสมิด pET28a	50
4.5 การตรวจสอบการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการ ชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	52
4.6 การตรวจสอบการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการ	53

- ชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 4.7 การตรวจสอบการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 54
- 4.8 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ในส่วนที่ละลายและไม่ละลายน้ำด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 55
- 4.9 การตรวจสอบการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 56
- 4.10 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA ในส่วนที่ละลายและไม่ละลายน้ำด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 57
- 4.11 การตรวจสอบการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE 59
- 4.12 การตรวจสอบการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE 60
- 4.13 การตรวจสอบสารละลายจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ผ่านคอลัมน์  $Ni^{2+}$ -IDA ด้วยวิธี SDS-PAGE 61
- 4.14 เปรียบเทียบการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีน CpcA และ CpcB ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโพลีเอค 63
- 4.15 การยับยั้งอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโพลีเอค 65
- 4.16 การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโพลีเอค 67
- 4.17 การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA), *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโพลีเอค 68
- 4.18 การกำจัดโลหะเพอร์ริซของสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA), *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และ EDTA 69



## รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
<i>cpcA</i>	ยีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา
<i>cpcB</i>	ยีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา
CpcA	โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา
CpcB	โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา
pET28a- <i>cpcA</i>	พลาสมิด pET28a ที่มียีน <i>cpcA</i> แทรกอยู่
pET28a- <i>cpcB</i>	พลาสมิด pET28a ที่มียีน <i>cpcB</i> แทรกอยู่
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) (pET28a)	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) ที่ได้รับพลาสมิด pET28a
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) (pET28a- <i>cpcA</i> )	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) ที่ได้รับพลาสมิด pET28a- <i>cpcA</i>
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) (pET28a- <i>cpcB</i> )	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) ที่ได้รับพลาสมิด pET28a- <i>cpcB</i>
Native Cpc	ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติที่สกัดจาก <i>Oscillatoria okeni</i>
IC <sub>50</sub>	ปริมาณของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycoyanin) เป็นรงควัตถุที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) โดยซี-ไฟโคไซยานินมีสีน้ำเงินและละลายน้ำได้ สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และปลดปล่อยฟลูออเรสเซนซ์ได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (Minkova et al., 2003) ปัจจุบันมีการนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย อาทิ ใช้เป็นสีผสมในอาหารหรือผสมในเครื่องสำอาง ใช้เป็นสารฟลูออเรสเซนซ์สำหรับงานด้านชีวโมเลกุล อีกทั้งยังมีการรายงานว่ามีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) ต้านมะเร็ง (anti-cancer) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Muthulakshmi et al., 2012; Richa et al., 2011; Romay et al., 2003) เนื่องจากคุณสมบัติของซี-ไฟโคไซยานินดังกล่าวจึงมีการนำซี-ไฟโคไซยานินมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา อย่างไรก็ตามในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปอาจมีบางกระบวนการที่ใช้อุณหภูมิสูงซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน แต่ได้มีการรายงานว่าซี-ไฟโคไซยานินที่แยกมาจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่มีอุณหภูมิสูง เช่น บ่อน้ำพุร้อน ยังคงสภาพและทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง (Leu et al., 2013)

โครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานินประกอบด้วยโปรตีนสองหน่วยย่อย คือหน่วยย่อยแอลฟาและเบตา โดยในธรรมชาติโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินจะอยู่ร่วมกับโครโมฟอร์ ซึ่งทำให้ซี-ไฟโคไซยานินมีสีน้ำเงินและปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินแต่หน่วยย่อยที่ไม่จับกับโครโมฟอร์ก็มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (Cherdkiatikul et al., 2014) ปัจจุบันการโคลนยีนและผลิตโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินใน *Escherichia coli* ส่วนใหญ่เป็นยีนซี-ไฟโคไซยานินที่มาจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง วิธีการนี้สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากและรวดเร็ว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินทั้งหน่วยย่อยแอลฟาและเบตาจากไซยาโนแบคทีเรีน้ำพุร้อนในแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อนำมาทดสอบสมบัติการต้านอนุมูล

อิสระ ซึ่งหากพบว่าโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินชนิดนี้มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีและมีเสถียรภาพ ที่อุณหภูมิสูงด้วย จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์

- (1) เพื่อโคลนยีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (*cpcA*) และเบตา (*cpcB*) จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ในแบคทีเรีย *Escherichia coli*
- (2) เพื่อผลิตและทำโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (*CpcA*) และเบตา (*CpcB*) จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนให้บริสุทธิ์
- (3) เพื่อศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของรีคอมบิแนนท์โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาและเบตา

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รับความรู้เกี่ยวกับโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาและเบตาจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนนี้มากยิ่งขึ้น และคาดว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาและเบตาที่ได้จะมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งอาจนำมาเป็นทางเลือกในการพัฒนาและประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไปได้ในอนาคต

## 1.4 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล B503-1 ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ B403 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก B101 อาคารบรรยายเรียนรวม 5 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์วิจัยคั้นคว่ำและพัฒนาฯ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ไชยาโนแบคทีเรีย

ไชยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรแคริโอต (prokaryote) ซึ่งถือกำเนิดมานานกว่า 2.7 พันล้านปีมาแล้ว และเป็นสิ่งมีชีวิตพวกแรกที่สร้างออกซิเจนในชั้นบรรยากาศของโลกจากการสังเคราะห์ด้วยแสง ไชยาโนแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญต่อวัฏจักรคาร์บอน ไนโตรเจน และออกซิเจน เป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นทั้งผู้ผลิตและผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในระบบนิเวศ อีกทั้งสามารถดำรงชีวิตได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม บ่อน้ำพุร้อน หิมะ และดินที่มีความชื้นก็สามารถพบไชยาโนแบคทีเรียได้ (ยุวดี, 2549; วันเพ็ญ, 2549; Ananya et al., 2014)

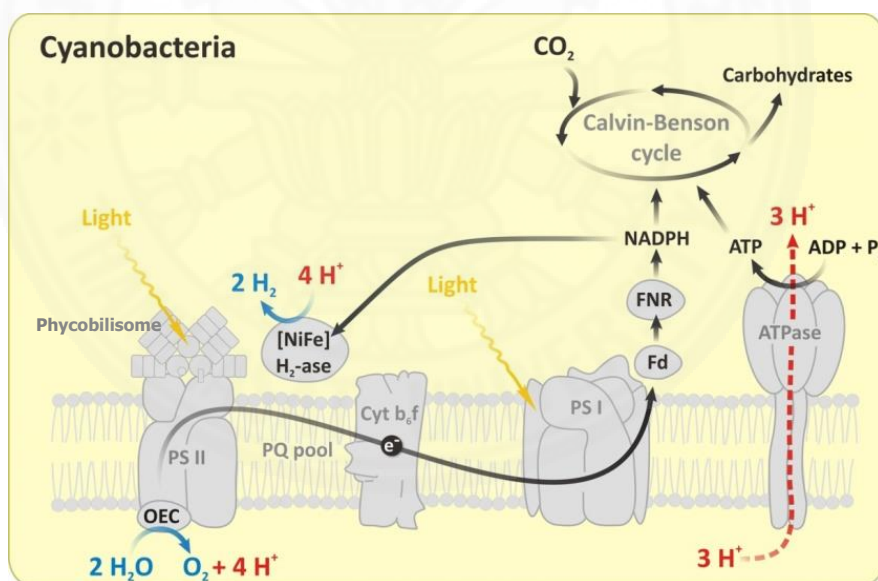
##### 2.1.1 การสังเคราะห์ด้วยแสงของไชยาโนแบคทีเรีย

ไชยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ได้โดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน (photoautotrophs) โดยอาศัยรงควัตถุหลายชนิดที่ช่วยในการดูดกลืนแสงได้แก่

- คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll A) ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ 680 หรือระบบแสง I (photosystem I) และคลอโรฟิลล์เอ 670 หรือระบบแสง II (photosystem II)
- แคโรทีนอยด์ (carotenoid) ได้แก่ เบตา-แคโรทีน ( $\beta$ -carotene) ฟลาวิซิน (flavicin) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll)
- ไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliproteins) ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycoyanin) ซี-อัลโล-ไฟโคไซยานิน (C-allophycoyanin) และซี-ไฟโคอีริทริน (C-phycoerythrin)

ไชยาโนแบคทีเรียจะมีไทลาคอยด์ (thylakoid) เต็ม ๆ กระจายอยู่ทั่วไปภายในเซลล์ โดยคลอโรฟิลล์เอจะอยู่ภายในเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ ส่วนรงควัตถุอื่น ๆ จะเกาะอยู่บนเยื่อหุ้มของไทลาคอยด์ ในการสังเคราะห์ด้วยแสงของไชยาโนแบคทีเรียคลอโรฟิลล์เอจัดเป็นรงควัตถุขั้นต้น (primary pigment) ซึ่งทำหน้าที่ดูดกลืนแสงเพื่อส่งต่อไปยังศูนย์กลางปฏิกิริยาโดยตรง โดยคลอโรฟิลล์เอ 680 จะทำหน้าที่ในการรับแสงคลื่นยาวในระบบแสง I (photosystem I) และ

คลอโรฟิลล์เอ 670 จะทำหน้าที่ในการรับแสงคลื่นสั้นในระบบแสง II (photosystem II) ส่วนรงควัตถุอื่น ๆ เป็นรงควัตถุประกอบ (accessory pigment) ที่ช่วยในการรวบรวมพลังงานแสงและส่งต่อให้คลอโรฟิลล์เอในระบบแสง II ต่อไป โดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียจะคล้ายกับในพืชทั่วไปซึ่งประกอบไปด้วยสองปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง (light-dependent reaction) และปฏิกิริยาที่ไม่ใช้แสง (light-independent reaction) หรือปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon fixation) ในปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสงนั้นจะเกิดขึ้นบนไทลาคอยด์ โดยรงควัตถุจะดูดกลืนพลังงานแสงทำให้โมเลกุลของน้ำเกิดการแยกสลายได้เป็นออกซิเจนและสูญเสียอิเล็กตรอนให้กับตัวรับอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาเพื่อนำมาสร้างสารพลังงานสูง คือ ATP กับ NADPH และสารพลังงานสูงนี้จะถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างคาร์โบไฮเดรตต่อไปในวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) ซึ่งจะเกิดในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ดังภาพที่ 2.1 (ยิวดี, 2549; วันเพ็ญ, 2549; Govindjee & Shevela, 2011)



ภาพที่ 2.1 การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งจะเกิดขึ้นบริเวณเยื่อหุ้มไทลาคอยด์และไซโทพลาสซึม จาก “Adventures with cyanobacteria: a personal perspective,” โดย Govindjee, & Shevela, D., 2011, *Frontiers in Plant Science*, 2, p. 28.

### 2.1.2 จีโนมของไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียมีจีโนมขนาดประมาณ 1.44 ถึง 9.05 ล้านคู่เบส ซึ่งมียีนประมาณ 1,241 ถึง 8,462 ยีน โดยส่วนใหญ่โครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะเป็นดีเอ็นเอวงแหวนเกลียวคู่ (circular chromosome) ซึ่งบางชนิดอาจมีพลาสมิดขนาดหลายร้อยกิโลเบสและดีเอ็นเอเส้นตรงเพิ่มเข้ามาด้วย แต่ในบางชนิดก็ไม่พบพลาสมิด เช่น *Prochlorococcus* sp. และ *Synechococcus* sp. (Sorek & Serrano, 2011)

*Cyanothece* sp. ATCC51142 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ มีจีโนมขนาดประมาณ 5.46 ล้านคู่เบส ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมรูปวงแหวน 1 โมเลกุล ขนาดประมาณ 4.93 ล้านคู่เบส พลาสมิด 4 โมเลกุล ขนาดประมาณ 10-40 กิโลเบส และโครโมโซมเส้นตรง 1 โมเลกุล ขนาดประมาณ 430 กิโลเบส (Welsh et al., 2008)

*Anabaena* sp. PCC7120 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส จีโนมประกอบด้วยโครโมโซมรูปวงแหวนขนาดประมาณ 6.4 ล้านคู่เบส และพลาสมิด 6 โมเลกุล ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมด 5,368 ยีน ยีนที่กำหนดการสังเคราะห์ rRNA 4 ชุด ยีนที่กำหนดการสังเคราะห์ tRNA 48 ยีน สำหรับ tRNA 42 ชนิด โดยมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) และการตรึงไนโตรเจนมากกว่า 60 ยีน (Cheng et al., 2000; Kaneko et al., 2001)

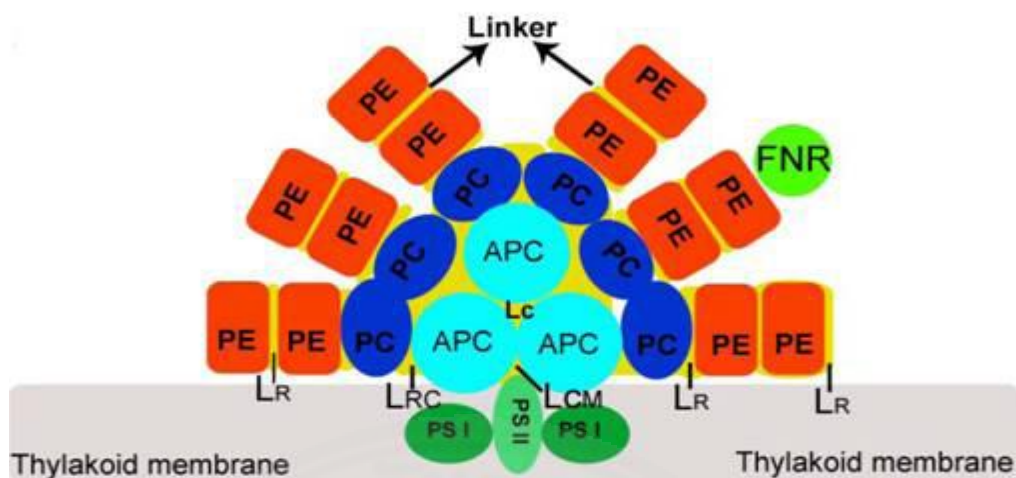
*Thermosynechococcus* sp. NK55a เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 52 ถึง 60 องศาเซลเซียส มีจีโนมเป็นโครโมโซมรูปวงแหวนขนาดประมาณ 2.5 ล้านคู่เบส ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน 2,358 ยีน ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและกระบวนการเมแทบอลิซึมรวมอยู่ด้วย ภายในจีโนมไม่พบยีนที่กำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ นอกจากนี้ยังพบยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนแชพเอร์อน (chaperone protein) เป็นจำนวนมาก (Stolyar et al., 2014)

*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 45-65 องศาเซลเซียส มีจีโนมเป็นโครโมโซมรูปวงแหวนขนาดประมาณ 2.6 ล้านคู่เบส ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน 2,475 ยีน ยีนที่กำหนดการสังเคราะห์ rRNA 1 ชุด และยีนที่กำหนดการสังเคราะห์ tRNA 42 ยีน

สำหรับ tRNA 42 ชนิด ภายในจีโนมพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัว (fatty acid saturase) เป็นจำนวนมาก แต่ไม่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเลย (fatty acid desaturase) ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้มีส่วนช่วยให้ไซยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่ในอุณหภูมิสูงได้ดี นอกจากนี้ยังพบยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนแซฟเฟอโรนเป็นจำนวนมาก ซึ่งยีนเหล่านี้อาจเป็นลักษณะเฉพาะของไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูง โดยจีโนมของ *T. elongatus* BP-1 มีความเหมือนกับจีโนมของ *Thermosynechococcus* sp. NK55 อยู่ 94 เปอร์เซ็นต์ (Nakamura et al., 2002; Prabha et al., 2013)

## 2.2 ไฟโคบิลิโปรตีน

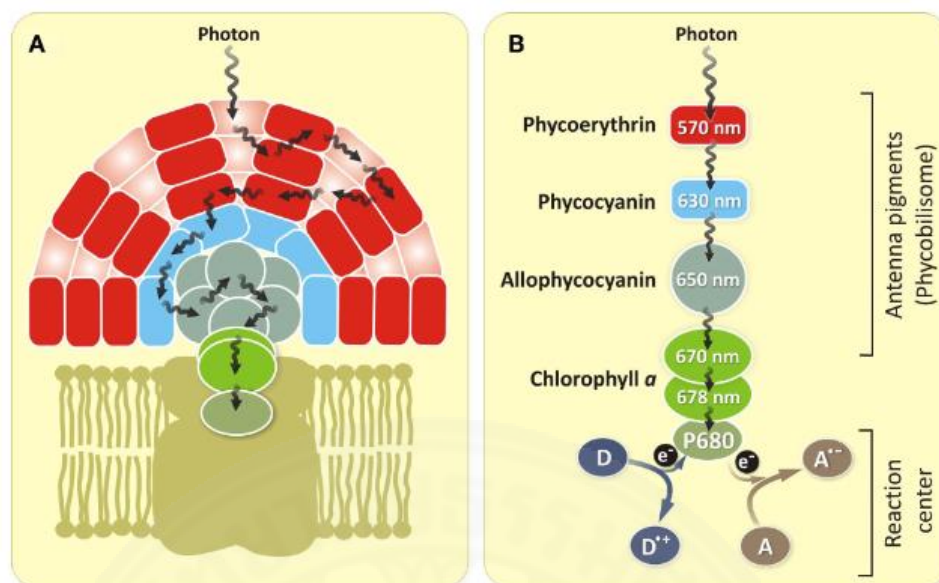
ไฟโคบิลิโปรตีนเป็นรงควัตถุที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย โดยทำหน้าที่ในการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นที่เหมาะสมแล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll A) ที่บริเวณเยื่อหุ้มของไทลาคอยด์เพื่อเข้าสู่ระบบการสังเคราะห์แสงต่อไป โดยไฟโคบิลิโปรตีนในไซยาโนแบคทีเรียมี 3 ชนิด ได้แก่ ไฟโคไซยานิน (phycocyanin: PC) มีสีน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 610-620 นาโนเมตร ไฟโคอีริทริน (phycoerythrin: PE) มีสีแดง สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 540-570 นาโนเมตร และอัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin: APC) มีสีน้ำเงินแกมเขียว สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 650-655 นาโนเมตร ไฟโคบิลิโปรตีนทั้ง 3 ชนิดจะอยู่ร่วมกับโปรตีนเชื่อมต่อ (linker protein) เป็นโครงสร้างเชิงซ้อนเรียกว่าไฟโคบิลิโซม (phycobilisome: PBS) ดังภาพที่ 2.2 (MacColl, 1998; Pandey et al., 2013; Shui et al., 2009)



**ภาพที่ 2.2** โครงสร้างของไฟโคบิลิโซม โดย PC คือ ไฟโคไซยานิน APC คือ อัลโลไฟโคไซยานิน PE คือ ไฟโคอีริทริน  $L_R$  คือ โปรตีนเชื่อมต่อระหว่างแท่งไฟโคบิลิโปรตีน  $L_{RC}$  คือ โปรตีนเชื่อมต่อไฟโคบิลิโซมคอร์กับแท่งไฟโคไซยานิน  $L_C$  คือ โปรตีนที่เชื่อมต่อระหว่างแท่งอัลโลไฟโคไซยานิน และ  $L_{CM}$  คือ โปรตีนเชื่อมต่อไฟโคบิลิโซมคอร์กับเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ จาก “A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant  $\alpha$ -phycocyanin of *Spirulina*,” โดย Guan, X. Y., Zhang, W. J., Zhang, X. W., Li, Y. X., Wang, J. F., Lin, H. Z., Tang, X. X., & Qin, S., 2009, *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), p. 1093-10100.

ภายในโครงสร้างของไฟโคบิลิโซมซึ่งประกอบด้วยไฟโคบิลิโปรตีนทั้ง 3 ชนิด มีการจัดเรียงตัวของไฟโคบิลิโปรตีนแต่ละชนิดโดย แท่งอัลโลไฟโคไซยานินจะยึดจับกันด้วยโปรตีนเชื่อมต่อ  $L_C$  (PBSs core linker) เป็นไฟโคบิลิโซมคอร์ (phycobilisomes core) ซึ่งเป็นศูนย์กลางพลังงานของไฟโคบิลิโซม แท่งไฟโคไซยานินจะยึดจับกับไฟโคบิลิโซมคอร์ด้วยโปรตีนเชื่อมต่อ  $L_{RC}$  (PBSs rod-core linker) และแท่งไฟโคอีริทรินจะยึดจับกับแท่งไฟโคไซยานินด้วยโปรตีนเชื่อมต่อ  $L_R$  (PBSs rod linker) กลายเป็นโครงสร้างของไฟโคบิลิโซมที่สมบูรณ์ ไฟโคบิลิโซมจะถูกเชื่อมต่อเข้ากับเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ด้วยโปรตีนเชื่อมต่อ  $L_{CM}$  (PBSs core-membrane linker) ดังภาพที่ 2.2 โปรตีนเชื่อมต่อระหว่างแท่งไฟโคบิลิโปรตีนมีหน้าที่ในการยึดจับแท่งไฟโคบิลิโปรตีนให้อยู่ในโครงสร้างที่ถูกต้องและเอื้ออำนวยต่อการดูดกลืนแสง อีกทั้งยังมีส่วนสำคัญในการส่งถ่ายพลังงานจากแต่ละแท่งไฟโคบิลิโปรตีนมาที่ไฟโคบิลิโซมคอร์และส่งต่อไปยังเยื่อหุ้มไทลาคอยด์เพื่อเข้าสู่ระบบการสังเคราะห์แสงต่อไป (Guan et al., 2007) โดยลำดับในการดูดกลืนและส่งผ่านพลังงานแสงของรงควัตถุต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 2.3





**ภาพที่ 2.3** การส่งผ่านพลังงานแสงภายในไฟโคบิลิโซม พลังงานแสงจะถูกดูดกลืนผ่านไฟโคอีริทริน แล้วส่งต่อไปยังไฟโคไซยานิน และอัลโลไฟโคไซยานินตามลำดับ จนมาถึงศูนย์กลางปฏิกิริยา คลอโรฟิลล์เอ 670 และ คลอโรฟิลล์เอ 680 ตามลำดับ ซึ่งทำให้เกิดการรับและส่งอิเล็กตรอนต่อไปใน กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จาก “Adventures with cyanobacteria: a personal perspective,” โดย Govindjee, & Shevela, D., 2011, *Frontiers in Plant Science*, 2, p. 28.

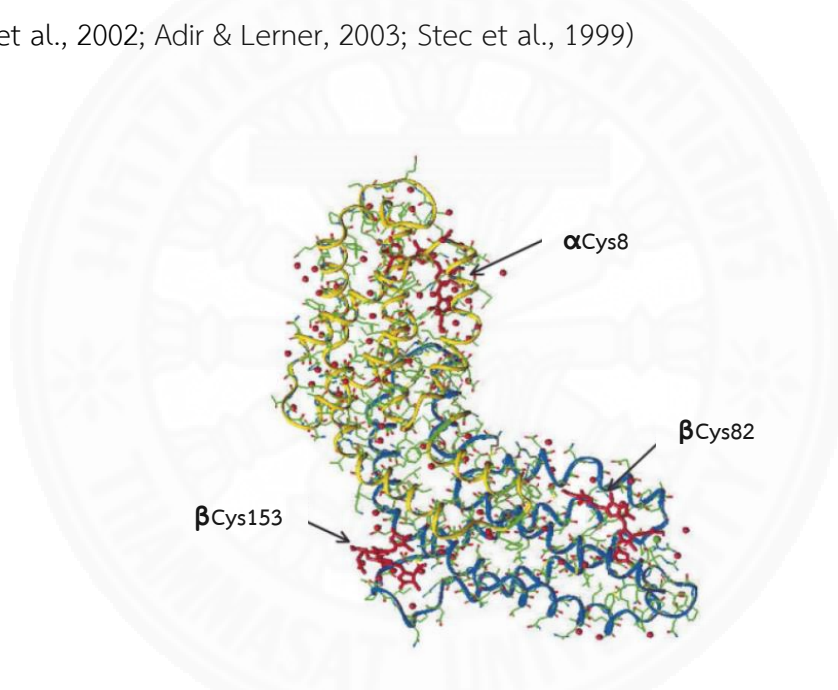
## 2.3 ซี-ไฟโคไซยานิน

ไฟโคไซยานิน คือไฟโคบิลิโปรตีนหนึ่ง ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีน้ำเงิน และสามารถละลายน้ำได้ พบได้ในไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีแดง (red algae) และสาหร่ายสีทอง (cryptomonads) โดยไฟโคไซยานินที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย เรียกว่า ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycoecyanin) ซี-ไฟโคไซยานินสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 610-620 นาโนเมตร และปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (Bermejo et al., 2006; Carr & Whitton, 1982)

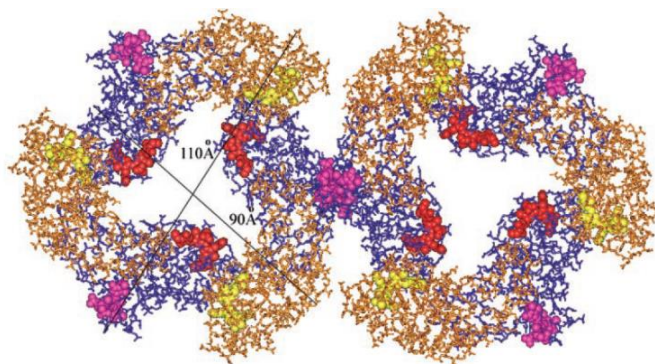
### 2.3.1 โครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานิน

จากการศึกษาทางผลึกศาสตร์ (crystallography) พบว่าโครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานินประกอบด้วย 2 ส่วนคือ อะโปโปรตีน (apoprotein) และไฟโคไซยาโนบิลิน (phycocyanobilin) หรือ โครโมฟอร์ (chromophore) โดยโครงสร้างของอะโปโปรตีนจะเชื่อมต่อกับโครโมฟอร์ด้วยพันธะไทโออีเธอร์ (thioether) ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีนบนอะโปโปรตีนกับวงแหวน A หรือ D ของโครโมฟอร์

โดยอะโปโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินนั้นประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยคือ หน่วยย่อยแอลฟา (alpha subunit) และหน่วยย่อยเบตา (beta subunit) ดังภาพที่ 2.4 จากการศึกษาทางผลึกศาสตร์ของ ซี-ไฟโคไซยานินจาก *Synechococcus vulcanus* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูง พบว่าภายในโครงสร้างซี-ไฟโคไซยานินมีกรดอะมิโนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ซึ่งเป็นตำแหน่งจับกับโครโมฟอร์ ได้แก่ กรดอะมิโนซิสเทอีนตำแหน่งที่ 84 ( $\alpha$ Cys84) ของหน่วยย่อยแอลฟา และตำแหน่งที่ 82 ( $\beta$ Cys82) และ 153 ( $\beta$ Cys153) ของหน่วยย่อยเบตา โดยปกติในธรรมชาติโครงสร้างซี-ไฟโคไซยานิน จะอยู่รวมกันเป็นแท่งภายในไฟโคบิลิโซมซึ่งเกิดจากการจับกันของซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา และเบตากลายเป็นโครงสร้างมอนอเมอร์ ( $\alpha\beta$ ) จากนั้นจะรวมกันเป็นโครงสร้างไตรเมอร์ ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> และเฮกซะเมอร์ ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> ตามลำดับ ดังภาพที่ 2.5 ต่อมาแต่ละเฮกซะเมอร์จะรวมกันเป็นแท่ง (rod) (Adir et al., 2002; Adir & Lerner, 2003; Stec et al., 1999)



**ภาพที่ 2.4** โครงสร้างมอนอเมอร์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. vulcanus* โดยหน่วยย่อยแอลฟา แสดงด้วยสีเหลือง หน่วยย่อยเบตาแสดงด้วยสีน้ำเงิน และโครโมฟอร์แสดงด้วยสีแดง ดัดแปลงจาก “Structure of C-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 angstrom: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly,” โดย Adir, N., Dobrovetsky, Y., & Lerner, N., 2001, *Journal of Molecular Biology*, 313(1), p. 71-81.



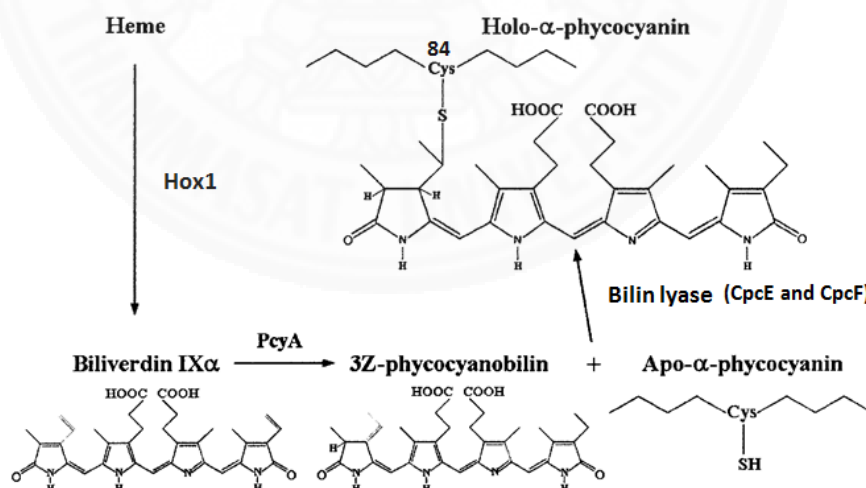
**ภาพที่ 2.5** โครงสร้างเฮกซะเมอร์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. vulcanus* โดยหน่วยย่อยแอลฟา และเบตาแสดงด้วยสีส้มและสีน้ำเงิน ตามลำดับ ส่วนโครโมฟอร์ที่จับกับอะโปโปรตีนในตำแหน่ง  $\alpha$ Cys84,  $\beta$ Cys82 และ  $\beta$ Cys153 แสดงด้วยสีเหลือง สีแดง และสีม่วงแดง ตามลำดับ จาก “The crystal structure of a novel unmethylated form of C-phycoerythrin, a possible connector between cores and rods in pycobilisomes,” โดย Adir, N., & Lerner, N., 2003, *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), p. 25926-25932.

### 2.3.2 ยีนซี-ไฟโคไซยานิน

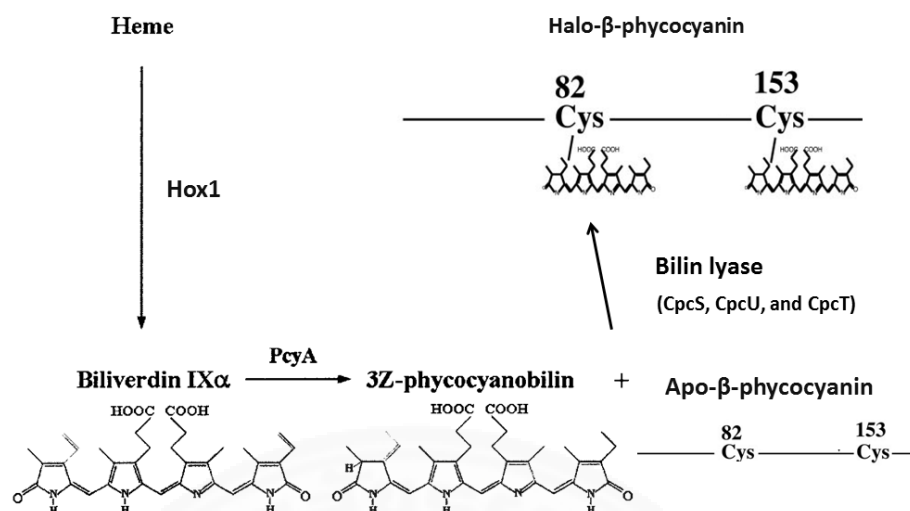
ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ซี-ไฟโคไซยานินในไซยาโนแบคทีเรียได้แก่ ยีน *cpcA* ทำหน้าที่สังเคราะห์อะโปโปรตีนหน่วยย่อยแอลฟา และยีน *cpcB* ทำหน้าที่สังเคราะห์อะโปโปรตีนหน่วยย่อยเบตา ซึ่งทั้งสองยีนนี้จะอยู่ภายในไฟโคไซยานินโอเปอรอน จากฐานข้อมูล GenBank พบว่า *T. elongatus* BP-1 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในบ่อน้ำพุร้อน ภายในไฟโคไซยานินโอเปอรอน ประกอบด้วยยีน *cpcA*, *cpcB*, *cpcC*, *cpcD*, *cpcE*, *cpcF*, *cpcG1*, *cpcG2* และ *cpcG4* โดยยีน *cpcC* และยีน *cpcD* ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนเชื่อมต่อระหว่างแท่งซี-ไฟโคไซยานิน (phycoerythrin-associated rod linker protein) ยีน *cpcE* และ *cpcF* ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ไลเอสซึ่งเชื่อมโครโมฟอร์เข้ากับอะโปโปรตีนหน่วยย่อยแอลฟา (phycoerythrin lyase subunit alpha) และยีน *cpcG* ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนเชื่อมต่อแท่งซี-ไฟโคไซยานินเข้ากับไฟโคบิลิโซมคอร์ (pycobilisome rod-core linker protein) (Nakamura et al., 2002) ในขณะที่ *Anabaena* PCC7120 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง ภายในไฟโคไซยานินโอเปอรอน ประกอบด้วยยีน *cpcA-cpcF* (Belknap & Haselkorn, 1987) นอกจากนี้ยังมียีนอื่น ๆ ที่อยู่นอกไฟโคไซยานินโอเปอรอนที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของซี-ไฟโคไซยานิน โดยมีการศึกษาใน *Synechococcus* sp. PCC7002 พบว่ายีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ไลเอสซึ่งเชื่อมโครโมฟอร์เข้ากับอะโปโปรตีนหน่วยย่อยเบตา (phycoerythrin lyase subunit beta) ได้แก่ยีน *cpcS*, *cpcU*, *cpcV* และ *cpcT* (Shen et al., 2006)

### 2.3.3 การสร้างซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาและเบตา

การสังเคราะห์ซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาในไซยาโนแบคทีเรียเริ่มจากการเปลี่ยนฮีมให้เป็นวงแหวนเปิดที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 โดยใช้เอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส (hemoxygenase: Hox1) และเฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (ferredoxin oxidoreductase: PcyA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 สังเคราะห์ได้จากยีน *hox1* และ *pcyA* ตามลำดับ ทำให้ได้เป็นไฟโคไซยาโนบิลิน (3Z-phycoyanobilin) หรือโครโมฟอร์ จากนั้นไฟโคไซยาโนบิลินจะถูกกระตุ้นให้เชื่อมต่อกับอะโปโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาด้วยเอนไซม์ CpcE และ CpcF บิลินไลเอส (bilin lyase) ซึ่งสังเคราะห์ได้จากยีน *cpcE* และ *cpcF* ทำให้ได้เป็นโฮโลซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา ดังภาพที่ 2.6 ส่วนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาก็มีปฏิกิริยาการสังเคราะห์ที่คล้ายกับซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา แต่จะต่างกันตรงที่ซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตามีตำแหน่งจับของไฟโคไซยาโนบิลิน 2 ตำแหน่ง อีกทั้งเอนไซม์บิลินไลเอสที่ใช้ในการเชื่อมต่อไปไฟโคไซยาโนบิลินกับอะโปโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาก็มีหลายชนิด โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้ใน *Synechococcus* sp. PCC7002 พบว่าเอนไซม์บิลินไลเอสที่สามารถเชื่อมอะโปโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตากับไฟโคไซยาโนบิลินเข้าด้วยกัน สามารถสังเคราะห์ได้จากกลุ่มของยีน *cpcS*, *cpcU* และ *cpcT* ดังภาพที่ 2.7 (Shen et al., 2006; Shen et al, 2008; Tooley et al., 2001; Zhang et al., 2014)



ภาพที่ 2.6 การสังเคราะห์โฮโลซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา จาก “Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo- $\alpha$ -subunit in a heterologous host,” โดย Tooley, A. J., Yuping, A. C., & Glazer A. N., 2001, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), p. 10560-10565.



ภาพที่ 2.7 การสังเคราะห์โพลีไซ-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา ดัดแปลงจาก “Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoerythrin holo- $\alpha$ -subunit in a heterologous host,” โดย Tooley, A. J., Yuping, A. C., & Glazer A. N., 2001, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), p. 10560-10565.

### 2.3.4 งานวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับซี-ไฟโคไซยานิน

Shoja et al. (2015) โคลนยีนและสังเคราะห์อะโพอโรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา (CpcB) จาก *Spirulina platensis* ใน *E. coli* โดยเริ่มจากออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcB* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด pET43.1a แล้วชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนใน *E. coli* BL21 โดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) และเทคนิคดอทบล็อต (dot blot technique) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า *E. coli* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ได้และอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินในปริมาณมากได้ในอนาคต

Pleonsil et al. (2013) ได้โคลนยีนและผลิตอะโพอโรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา (apo-CpcB) จาก *Spirulina platensis* แล้วนำอะโพอโรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาที่ได้มาศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และการป้องกันความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดง ซึ่งพบว่าอะโพอโรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ แต่น้อยกว่าซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ (native C-phycoerythrin) และโทรล็อก (Trolox) ตามลำดับ และพบว่าทั้งซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และอะโพอโรตีนซี-ไฟโคไซยานิน

หน่วยย่อยเบตา มีความสามารถในการปกป้องเม็ดเลือดแดงจากการถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน

Suphap (2009) โคลนยีนและแสดงออกโปรตีน CpcA และ CpcB จาก *Anabaena siamensis* TISTR8012 โดยออกแบบไพรเมอร์จากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น 7 สายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วโคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับผลิตโปรตีน จากนั้นผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ในแบคทีเรีย *E. coli* และทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยโคบอลต์แอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี (cobalt-affinity chromatography) ต่อมานำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA และ CpcB มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS แต่น้อยกว่าโทรลลิก

Cherdkiatikul และ Suwanwong (2014) ได้โคลนยีนและแสดงออกโปรตีน อัลโล-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (ApcA) อัลโล-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา (ApcB) ซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (CpcA) และซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา (CpcB) จาก *Spirulina platensis* ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งมีแท็กฮิสทีดีน (Histidine tag) บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัล แอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี (nickel metal affinity chromatography) แล้วนำมาศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีด้วยวิธีดีออกซีไรโบส (Deoxyribose assay) และทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี (peroxyl radical) ด้วยวิธีโออาร์เอซี-ฟลูออเรสเซน (Oxygen Radical Absorbance Capacity Fluorescein Assay: ORAC-Fluorescein) ซึ่งพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดสามารถต้านทานอนุมูลอิสระไฮดรอกซีและเปอร์ออกซีได้ โดย CpcB สามารถต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีได้ดีกว่า CpcA, ApcB และ ApcA ตามลำดับ ส่วน CpcA สามารถต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีได้ดีกว่า CpcB, ApcA และ ApcB ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอะโพรตีนซี-ไฟโคไซยานินนั้นมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงและอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้ในอนาคต

Guan et al. (2009) ได้สังเคราะห์โฮโลซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาจาก *S. platensis* และศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยผู้วิจัยได้สร้างและทรานสเฟอร์เมกเตอร์สองวงเข้าสู่ *E. coli* BL21 วงแรกเป็นเวกเตอร์ที่มียีน *hox1* และยีน *pcyA* ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ฮีโมออกซีจีเนส (heme oxygenase) และเอนไซม์เฟอร์ริดอกซินออกซิโดรีดักเทส (ferredoxin oxidoreductase) ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนฮีเม (Heme) ให้เป็นไฟโคไซยาโนบิลิน ส่วนเวกเตอร์อีกวงมียีน *cpcA* และ *cpcE-cpcF* ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา และเอนไซม์ CpcE/F บิลินไลเอส (CpcE/F bilin lyase) ตามลำดับ โดยเอนไซม์ CpcE/F บิลินไลเอสทำหน้าที่ในการเชื่อมไฟโคไซยาโนบิลินเข้ากับโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อย

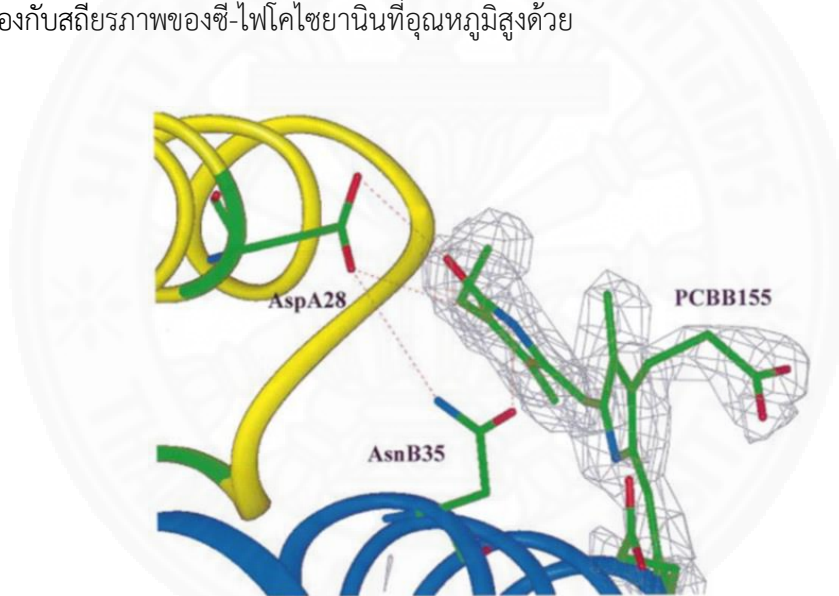
แอลฟา จากนั้นผู้วิจัยได้สังเคราะห์โฮโลซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาใน *E. coli* BL21 และทำให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟิไนตีโครมาโทกราฟี พบว่าโฮโลซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาที่ได้สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 621 นาโนเมตร และปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เมื่อนำมาทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีและเปอร์ออกซีพบว่า มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $27.5 \pm 25.8$  มิลลิกรัม/ไมโครลิตร และ  $20.8 \pm 2.2$  มิลลิกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ

Zhang et al. (2014) ได้โคลนยีน *cpcT* จาก *Arthrospira platensis* และตรวจสอบการทำงานของยีน *cpcT* ต่อตำแหน่งจับของไฟโคไซยาโนบิลินบนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา โดยผู้วิจัยได้สร้างและทรานสฟอร์มเวกเตอร์สองวงเข้าสู่ *E. coli* BL21 วงแรกเป็นเวกเตอร์ที่มียีน *hox1* และยีน *pcyA* ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ฮีโมออกซีจีเนส และเอนไซม์เพอริดอกซิน-ออกซิโดรีดักเทส ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนฮีโมให้เป็นไฟโคไซยาโนบิลิน ส่วนเวกเตอร์อีกวงมียีน *cpcB* และยีน *cpcT* ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา และเอนไซม์ CpcT บิลินไลเอส (CpcT bilin lyase) ตามลำดับ โดยเอนไซม์ CpcT บิลินไลเอสทำหน้าที่ในการเชื่อมไฟโคไซยาโนบิลินเข้ากับโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ที่ได้รับการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด แสดงค่าการปลดปล่อยฟลูออเรสเซนซ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่จำเพาะ และมีค่าความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่ปลดปล่อยสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ได้รับยีน *cpcT* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ CpcT บิลินไลเอสสามารถกระตุ้นการเชื่อมต่อของโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตากับไฟโคไซยาโนบิลินได้ ทำให้เกิดการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบางตำแหน่ง เพื่อตรวจสอบตำแหน่งกรดอะมิโนบนโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาที่สามารถเชื่อมต่อกับไฟโคไซยาโนบิลินได้ด้วยเอนไซม์ CpcT บิลินไลเอส โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนซิสเทอีนของโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาในตำแหน่งที่ 82 (Cys82) และ 153 (Cys153) เป็นกรดอะมิโนอะลานีน ซึ่งบริเวณทั้งสองตำแหน่งนี้เป็นบริเวณที่สามารถเชื่อมต่อกับไฟโคไซยาโนบิลินได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนซิสเทอีนในตำแหน่ง 153 บนโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาอาจเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมในการจับกับไฟโคไซยาโนบิลินซึ่งกระตุ้นโดยเอนไซม์ CpcT บิลินไลเอสใน *A. platensis* FACHB314

### 2.3.5 การศึกษาซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิต่ำ

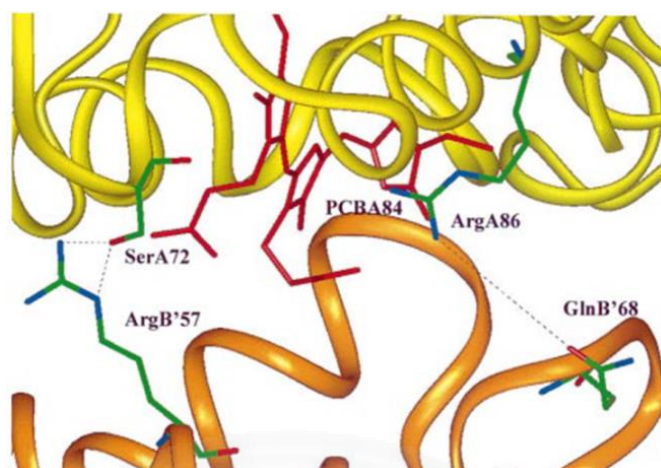
Leu et al. (2013) ได้ศึกษาโครงสร้างทางผลึกศาสตร์และลำดับกรดอะมิโนของซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. vulcanus* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิต่ำ พบว่าซี-ไฟโคไซยานินชนิดนี้มีกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่อาจเกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิต่ำ เช่น กรดอะมิโนแอสพาเตทในตำแหน่งที่ 28 ของหน่วยย่อยแอลฟา ( $\alpha$ Asp28) กรดอะมิโน

เซอร์จีนในตำแหน่งที่ 72 ของหน่วยย่อยแอลฟา ( $\alpha$ Ser72) และกรดอะมิโนกลูตามีนในตำแหน่งที่ 68 ของหน่วยย่อยเบตา ( $\beta$ Gln68) เป็นต้น โดย  $\alpha$ Asp28 สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับโครโมฟอร์ ตำแหน่ง  $\beta$ Cys153 ได้ ส่งผลให้โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินจับกับโครโมฟอร์ได้ดียิ่งขึ้น อีกทั้ง  $\alpha$ Asp28 ยังสามารถจับกับกรดอะมิโนแอสพาราจีนในตำแหน่งที่ 35 ของหน่วยย่อยเบตา ( $\beta$ Asn35) ได้ด้วย ซึ่งช่วยส่งเสริมให้การจับกันของซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาและเบตามีความเสถียรยิ่งขึ้น แสดงดังภาพที่ 2.8 ส่วน  $\alpha$ Ser72 เป็นกรดอะมิโนที่มีขั้วสามารถสร้างปฏิสัมพันธ์ได้กับกรดอะมิโนอาร์จีนินในตำแหน่งที่ 57 ของหน่วยย่อยเบตา ( $\beta$ Arg57) ในอีกมอนอเมอร์หนึ่งได้ และ  $\beta$ Gln68 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีขั้วเช่นกันสามารถสร้างปฏิสัมพันธ์ได้กับกรดอะมิโนอาร์จีนินในตำแหน่งที่ 86 ของหน่วยย่อยแอลฟา ( $\alpha$ Arg86) ในมอนอเมอร์ใกล้เคียงได้ ซึ่งช่วยส่งเสริมความเสถียรของโครงสร้างซี-ไฟโคไซยานินในระดับไตรเมอร์ให้ดียิ่งขึ้น แสดงดังภาพที่ 2.9 ซึ่งสมบัติของกรดอะมิโนเหล่านี้อาจเกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิสูงด้วย



**ภาพที่ 2.8** การสร้างปฏิสัมพันธ์ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างมอนอเมอร์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. vulcanus* ซึ่งเป็นการสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างกรดอะมิโนแอสพาราเตตตำแหน่งที่ 28 กับกรดอะมิโนแอสพาราจีนในตำแหน่งที่ 35 ของหน่วยย่อยเบตาและโครโมฟอร์ ซึ่งช่วยส่งเสริมความเสถียรของโครงสร้างซี-ไฟโคไซยานินในระดับมอนอเมอร์ จาก “Structure of C-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 angstrom: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly,” โดย Adir, N., Dobrovetsky, Y., & Lerner, N., 2001, *Journal of Molecular Biology*, 313(1), p. 71-81.





**ภาพที่ 2.9** การสร้างปฏิสัมพันธ์ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างไตรเมอร์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. vulcanus* ซึ่งเป็นการสร้างปฏิสัมพันธ์ของกรดอะมิโนเซอรีนในตำแหน่งที่ 72 และกรดอะมิโนอาร์จินีนในตำแหน่งที่ 86 ของหน่วยย่อยแอลฟา กับกรดอะมิโนอาร์จินีนในตำแหน่งที่ 57 และกรดอะมิโนกลูตามีนในตำแหน่งที่ 68 ของหน่วยย่อยเบตา ในมอนอเมอร์ถัดไป ตามลำดับ ซึ่งช่วยส่งเสริมความเสถียรของซี-ไฟโคไซยานินในระดับไตรเมอร์ จาก “Structure of C-phycoerythrin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 angstrom: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly,” โดย Adir, N., Dobrovetsky, Y., & Lerner, N., 2001, *Journal of Molecular Biology*, 313(1), p. 71-81.

Leu et al., (2013) ได้ศึกษาเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงของซี-ไฟโคไซยานินจาก *T. elongatus* TA-1 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยจากการศึกษา ยีน *16S rRNA* พบว่า *T. elongatus* TA-1 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *T. elongatus* BP-1 มากที่สุด ในการศึกษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิสูงผู้วิจัยได้วิเคราะห์กิจกรรมหรือการทำงานของซี-ไฟโคไซยานินจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และการปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 642 นาโนเมตร ผลที่ได้พบว่าเมื่อบ่มซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซี-ไฟโคไซยานินชนิดนี้สามารถสภาพการทำงานได้ถึง 80.26 และ 65.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ซี-ไฟโคไซยานินจาก *Spirulina* sp. ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง พบว่าเมื่อบ่มซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 59 และ 64 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7 เป็นเวลา 30 นาที ซี-ไฟโคไซยานินคงสภาพการ

ทำงานไว้ได้เพียง 52 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Chaiklahan et al., 2012) แสดงให้เห็นว่า ซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิต่ำสามารถคงเสถียรภาพการทำงานที่ อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง

คัทติยา (2558) ได้ศึกษาและเปรียบเทียบสมบัติการทนอุณหภูมิของซี-ไฟโคไซยานิน ที่สกัดจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิต่ำ กับ *S. cedrorum* TISTR 8589 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง พบว่าซี-ไฟโคไซยานิน จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีเสถียรภาพสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 5 และเมื่อ บ่มซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าซี-ไฟโคไซยานิน มีความเข้มข้นคงเหลือเท่ากับ 97.45 และ 90.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. cedrorum* TISTR 8589 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง ซี-ไฟโคไซยานินมี เสถียรภาพสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7 และเมื่อบ่มซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าซี-ไฟโคไซยานินมีความเข้มข้นคงเหลือเท่ากับ 74.54 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถหาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นได้ ตามลำดับ อีกทั้งซี-ไฟโคไซยานินจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ยังคงเสถียรภาพได้ดีกว่าซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. cedrorum* TISTR 8589 ในทุกค่า พีเอชและทุกอุณหภูมิที่ผู้วิจัยศึกษา ดังนั้นซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในแหล่งที่มี อุณหภูมิต่ำจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่มีกระบวนการให้ ความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง

### 2.3.6 การนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้ประโยชน์

- ใช้เพื่อเพิ่มสีส้มในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง อาทิ ไอศกรีม เจลลี่ ลูกกวาด และลิปสติก เป็นต้น ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ให้มีความสวยงาม และน่า รับประทานแทนการใช้สารสีสังเคราะห์อื่น ๆ (Muthulakshmi et al., 2012)

- ใช้เป็นสารฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากซี-ไฟโคไซยานิน สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด ได้ที่ความยาวคลื่น 610-620 นาโนเมตร และปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร อีกทั้งสามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง จึงมีการนำซี-ไฟโคไซยานินมาติดฉลาก โพลิบเพื่อเป็นตัวติดตามในงานทางด้านชีวโมเลกุล (Richa et al., 2011)

- ใช้เป็นสารต้านการอักเสบและอาการเจ็บปวด มีการรายงานว่าซี-ไฟโคไซยานิน สามารถยับยั้ง และชะลอการก่อตัวของสาร iNOS (inducible nitric oxide synthase) COX-2 (Cyclooxygenase-2) PGE<sub>2</sub> (prostaglandin E2) และสารที่ชักนำให้เกิดเนื้อร้าย TNF $\alpha$  (tumor

necrosis factor-a) อีกทั้งยังลดการแทรกซึมของนิวโทรฟิล (neutrophil) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยสารคาราจีแนนบริเวณอุ้งเท้าหนูได้ โดยสารดังกล่าวนี้เป็นสาเหตุที่ส่งผลให้เกิดการอักเสบ และความเจ็บปวด (Shih et al., 2009)

- ใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ประสาท มีการศึกษาบทบาทของซี-ไฟโคไซยานินในการปกป้องเซลล์ประสาทหนู โดยชักนำให้เซลล์สมองหนูเกิดการตายโดยการขาดโพแทสเซียมและซีรั้ม (K/S) ส่งผลให้เกิดภาวะออกซิเดชันเกินสมดุล พบว่าซี-ไฟโคไซยานินสามารถป้องกันการตายของเซลล์สมองหนูได้ซึ่งอาจเกิดจากการยับยั้งการก่อตัวของสารอนุมูลอิสระที่ส่งผลทำลายเซลล์ประสาทของหนู (Rimbau et al., 2001)

- ใช้เป็นสารต้านทานอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีการศึกษาพบว่าซี-ไฟโคไซยานินมีคุณสมบัติที่สามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ โดยการสร้างพันธะหรือให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลที่เป็นอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลอิสระแอลคอกซี (alkoxy radical) อนุมูลอิสระไฮดรอกซี (hydroxyl radical) อนุมูลอิสระเปอร์ออกซี (peroxyl radical) อนุมูลอิสระเปอร์ออกซีไนโตรท (peroxinitrite) อนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความเสถียรของอิเล็กตรอนช่วยปกป้องและลดความรุนแรงจากการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้ (Romay et al., 2003; Chu et al., 2010)

Patel et al. (2006) ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Lyngbya sp.*, *Phormidium sp.* และ *Spirulina sp.* พบว่าซี-ไฟโคไซยานินที่ได้สามารถต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี และอนุมูลอิสระไฮดรอกซีได้ โดยซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก *Phormidium sp.* สามารถต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีได้ดีกว่าซี-ไฟโคไซยานินจาก *Lyngbya sp.* และ *Spirulina sp.* ตามลำดับ และพบว่าซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก *Lyngbya sp.* สามารถต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีได้ดีกว่า *Spirulina sp.* และ *Phormidium sp.* ตามลำดับ โดยรูปแบบในการยับยั้งอนุมูลอิสระของซี-ไฟโคไซยานินแสดงดังนี้



Bertolin et al. (2011) ได้ศึกษาผลของซี-ไฟโคไซยานินต่อภาวะออกซิเดชันเกินสมดุลในหนู ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยมอนอโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate) พบว่าซี-ไฟโคไซยานินสามารถลดการเกิดภาวะออกซิเดชันเกินสมดุลในหนูได้

Kamble et al. (2013) ได้สกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. platensis* แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate precipitation) ตามด้วยการทำไดอะไลซิส (dialysis) และนำมาผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography) พบว่าซี-ไฟโคไซยานินที่ได้สามารถต้านอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และสามารถต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulation) ได้ อีกทั้งช่วยป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายด้วย

Deshmukh และ Puranik (2014) ได้สกัดและศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในทะเลสาบที่มีความเป็นด่างสูง พบว่าซี-ไฟโคไซยานินที่แยกได้จาก *S. platensis*, *Synechocystis aquatilis* และ *P. laminosum* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 40.28, 36.32 และ 34.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นผู้วิจัยได้ทดสอบผลของสถานะที่เติมเกลือต่อการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของซี-ไฟโคไซยานิน โดยการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100-1000 มิลลิโมลาร์ พบว่าซี-ไฟโคไซยานินที่แยกได้จาก *S. platensis* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น 22 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *S. aquatilis* และ *P. laminosum* เพิ่มขึ้น 16 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสถานะของเกลือที่เหมาะสมมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระของซี-ไฟโคไซยานินด้วย

Jerley และ Prabu (2015) ได้สกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. platensis* แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate precipitation) ตามด้วยการทำไดอะไลซิส (dialysis) และนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchanger chromatography) จากนั้นนำซี-ไฟโคไซยานินที่ได้มาทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เปรียบเทียบกับวิตามินซีพบว่าซี-ไฟโคไซยานินสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 25.21 เปอร์เซ็นต์

## 2.4 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

### 2.4.1 อนุมูลอิสระ (Free radicals)

อนุมูลอิสระ คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่อยู่ในวงแหวนอิเล็กตรอนวงนอกสุด ทำให้โมเลกุลเกิดความไม่เสถียรและมีความไวในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นค่อนข้างสูง โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับอิเล็กตรอนโมเลกุลอื่นเพื่อให้โมเลกุลตัวเองเสถียร ทำให้โมเลกุลอื่นกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่และจะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยอนุมูลอิสระภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตอาจเกิดได้จากปัจจัยภายนอก เช่น การได้รับรังสียูวี รังสีเอ็กซ์ หรือสารเคมีต่าง ๆ เป็นต้น หรืออาจเกิดจากปัจจัยภายใน เช่น เกิดจากกระบวนการหายใจของสิ่งมีชีวิต และกระบวนการรับส่งสัญญาณของเซลล์ เป็นต้น ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่สำคัญภายในสิ่งมีชีวิต เช่น อนุมูลอิสระไฮดรอกซี ( $\text{OH}\cdot$ ) อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) อนุมูลอิสระอัลคอกซี ( $\text{RO}\cdot$ ) และอนุมูลอิสระเปอร์ไฮดรอกซี ( $\text{HO}_2\cdot$ ) เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวมากในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ โดยกลไกการเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายลักษณะดังนี้ (โสภา, 2550)

1) พันธะโควาเลนต์เกิดการแตกแบบโฮโมไลซิส



2) อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้าได้รับอิเล็กตรอนเพิ่มเข้ามา 1 ตัว



3) อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้าสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว

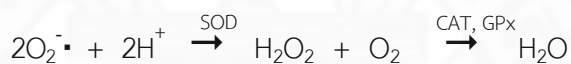


### 2.4.2 การป้องกันความเสียหายจากอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

อนุมูลอิสระในร่างกายและภายในเซลล์มีมากมายหลายชนิด ทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษ โดยอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ เช่น อนุมูลอิสระที่ช่วยในการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ เป็นต้น ซึ่งต้องออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่ำมาก หากมีอนุมูลอิสระต่าง ๆ มากเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ ร่างกายจึงมีกลไกที่สามารถควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสถานะที่ไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์ โดยกลไกที่สำคัญได้แก่

### 2.4.2.1 เอนไซม์ควบคุมสมดุลอนุมูลอิสระ

ในการควบคุมสมดุลอนุมูลอิสระภายในร่างกายอาศัยการทำงานร่วมกันของ 3 เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Superoxide Dismutase: SOD) เอนไซม์คาตาเลส (Catalase: CAT) และเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione Peroxidase: GPx) โดยเอนไซม์ SOD เป็นกลไกอันดับแรกที่ป้องกันร่างกายจากสารอนุมูลอิสระ เอนไซม์ SOD สามารถกำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้ โดยการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นเอนไซม์คาตาเลสหรือเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำ ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถเกิดเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซีในปฏิกิริยาฟenton (Fenton) และเฮเบอร์ไวส์ (Haber-weiss) ได้ ดังสมการ (โอภา, 2550; Lobo, 2010)



### 2.4.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่สามารถป้องกันยับยั้งหรือทำลายอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้เกิดต่อไปได้ โดยอาจมีการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระเพื่อให้อนุมูลอิสระเกิดความเสถียรได้ สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ เช่น กรดยูริก และบิลิรูบิน เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ เช่น วิตามินซี วิตามินอี และกลูตาไทโอน เป็นต้น ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดมีสมบัติที่แตกต่างกันไป เช่น วิตามินอีละลายได้ดีในไขมันจึงสามารถต้านอนุมูลอิสระหรือป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันบริเวณทรานส์เมมเบรนได้ วิตามินซีละลายได้ดีในน้ำจึงสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ และกลูตาไทโอนซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 3 ตัวเป็นองค์ประกอบ คือ กลูตามีน ซิสเทอีน และไกลซีน กลูตาไทโอนสามารถกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซีได้โดยตรง และเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเกินสมดุล เช่น เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถรีดิวซ์อนุพลวิตามินซี และอนุพลวิตามินอีให้อยู่ในรูปดั้งเดิมที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ (โอภา, 2550; Lobo, 2010)

### 2.4.2.3 สารกำจัดโลหะ (Metal chelator)

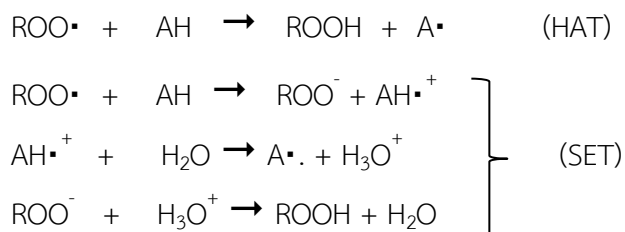
โลหะทรานซิชัน เช่น เหล็ก และทองแดง สามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาฟentonและเฮเบอร์ไวส์ได้ โดยสารที่ทำหน้าที่กำจัดโลหะในร่างกายส่วนใหญ่

เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับโลหะได้และกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เช่น อัลบูมิน (albumin) ทรานเฟอริน (tranferin) และ เฟอริติน (ferritin) เป็นต้น โดยในร่างกายธาตุเหล็กจะถูกเก็บอยู่ในรูปของเฟอริติน และจะถูกเคลื่อนย้ายไปส่วนต่าง ๆ ของร่างกายในรูปของทรานเฟอริน (โอภา, 2550)

ในสภาวะที่ร่างกายเกิดการออกซิเดชันเกินสมดุลอาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมา โดยการเกิดสภาวะออกซิเดชันเกินสมดุลอาจเป็นผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารควบคุมสมดุลอนุมูลอิสระมีปริมาณลดน้อยลง ซึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ผลิตเอนไซม์คาตาเลส เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส ส่งผลให้เอนไซม์เหล่านี้ทำงานผิดปกติ หรืออาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ร่างกายถูกกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระมากเกินไป เช่น การถูกกระตุ้นจากรังสี การสูบบุหรี่ และการเผชิญกับมลภาวะ เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลได้ นำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคข้ออักเสบ โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น การรับประทานยาหรือสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหารต่าง ๆ จึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยควบคุมสภาวะออกซิเดชันเกินสมดุลได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้จาก พืช ผัก และผลไม้ ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เบตา-แคโรทีน ( $\beta$ -carotene) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) เป็นต้น หรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น ไชยานแบคทีเรีย ซึ่งมีรงควัตถุที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและช่วยลดสภาวะออกซิเดชันเกินสมดุล เช่น ซี-ไฟโคไซยานิน และ ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน เป็นต้น (บุหริน, 2556; โอภา, 2550; Cherdkiatikul et al., 2014; Lobo, 2010)

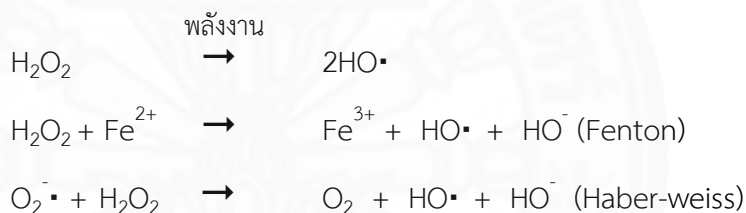
### 2.4.3 วิธีการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ในการวิเคราะห์ความสามารถของสารทดสอบในการต้านอนุมูลอิสระมีหลักการสำคัญ คือ การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer: HAT) และการการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว (sigle electron transfer: SET) ซึ่งสุดท้ายแล้วทั้งสองหลักการจะให้ผลิตภัณฑ์ที่เหมือนกันดังสมการ (โอภา, 2550; Gupta, 2015)



#### 2.4.3.1 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซี (Hydroxyl radical scavenging activity)

อนุมูลอิสระไฮดรอกซี เป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Reactive oxygen species: ROS) ซึ่งพบมากในสิ่งมีชีวิต และมีความว่องไวสูงในการจับอนุมูลอิสระชีวโมเลกุลต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต การเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซีสามารถเกิดได้จากหลายปฏิกิริยาโดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังนี้



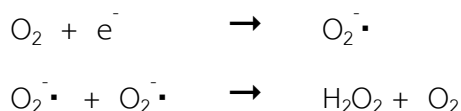
โดยการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีด้วยวิธีดีออกซีไรโบส (deoxyribose assay) มีหลักการ คือการสังเคราะห์อนุมูลอิสระไฮดรอกซีจากการทำปฏิกิริยาของเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) จากนั้นน้ำตาลดีออกซีไรโบสจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระไฮดรอกซี เมื่อเติมกรดไทโอบาร์บิทริก (thiobarbituric acid) จะเกิดสารประกอบสีชมพูของโครโมเจน (chromogen) ในปฏิกิริยาที่มีการเติมสารทดสอบซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีจะทำให้สีชมพูของสารละลายจางลง โดยสามารถตรวจสอบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (โสภา, 2550 และ Halliwell et al., 1987)

#### 2.4.3.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide radical scavenging activity)

อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) เป็นอนุมูลอิสระในกลุ่ม ROS ที่พบมากที่สุดเซลล์สิ่งมีชีวิต แม้ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาไม่สูงมากแต่อนุมูลอิสระซูเปอร์



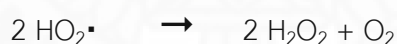
ออกไซด์แอนไอออนเป็นสารตั้งต้นที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซีที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงได้ โดยกลไกการเกิดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนแสดงดังนี้



ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนสามารถทดสอบได้ด้วยวิธีสังเคราะห์อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบ Phenazine Methosulphate (PMS)–NADH จากนั้นอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารไนโตรบลูเตตระโซเลียม (nitroblue tetrazolium) ได้เป็นสารประกอบสีน้ำเงินของไดฟอร์มามาซาน (diformazan) โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ในปฏิกิริยาที่มีการเติมสารทดสอบซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนลงไป จะทำให้สีน้ำเงินของสารละลายจางลง (โสภา, 2550; Gupta, 2015; Nikishimi et al., 1972)

#### 2.4.3.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี (peroxyl radical scavenging activity)

อนุมูลอิสระเปอร์ออกซี ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) เป็นอนุมูลอิสระที่พบได้มากในสิ่งมีชีวิต แต่มีความคงตัวต่ำ เนื่องจากอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนกันเองได้ทำให้ได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับออกซิเจนซึ่งแสดงดังสมการ



ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีสามารถทำได้ด้วยวิธี ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay) วิธีการนี้เป็นการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระในกลไกแบบ HAT โดยจะประเมินความสามารถในการต้านทานอนุมูลอิสระจากการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งได้แก่ ฟลูออเรสซีน (fluorescein) ในปฏิกิริยาจะสังเคราะห์อนุมูลอิสระเปอร์ออกซีจาก AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride) เมื่อเกิดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีจะทำให้การเรืองแสงของสารฟลูออเรสซีนลดลง ในปฏิกิริยาที่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีลงไปจะช่วยชะลอการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนต์ตามประสิทธิภาพของสารทดสอบ ในการวิเคราะห์ผลจะคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟความเข้มของฟลูออเรสเซนต์ที่ลดลงเทียบกับเวลา ระหว่างสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระกับสารทดสอบที่ไม่มีสารต้านอนุมูล

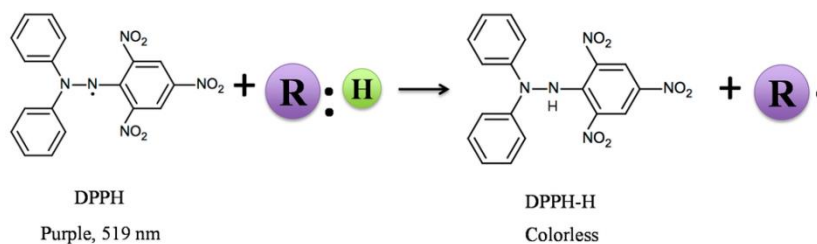
อิสระ (net area under the fluorescence decay curve: net AUC) (โอภา, 2550; Dávalos et al., 2004)


#### 2.4.3.4 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical scavenging activity)

อนุมูลอิสระ ABTS หรือ 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดจากการสังเคราะห์และไม่พบในธรรมชาติ ซึ่งวิธีการนี้เป็นการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระในกลไกแบบ SET โดยในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สามารถทำได้โดยสังเคราะห์อนุมูลอิสระจากการทำปฏิกิริยาของ ABTS กับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ซึ่งอนุมูลอิสระ ABTS จะมีสีเขียว และมีค่าการดูดกลืนแสงค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงต้องมีการเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ก่อนการเติมสารทดสอบ ในปฏิกิริยาที่มีการเติมสารทดสอบซึ่งมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ลงไปจะทำให้สีเขียวของสารละลายจางลง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ข้อดีของวิธีนี้คืออนุมูลอิสระ ABTS ละลายได้ดีในน้ำและสามารถทดสอบได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง (บุหริน, 2556; โอภา, 2550; Re et al., 1999)

#### 2.4.3.5 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity)

อนุมูลอิสระ DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นอนุมูลอิสระไนโตรเจนที่มีความคงตัว ไม่ค่อยว่องไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระชนิดอื่นและมีสีม่วง วิธีการนี้เป็นการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระในกลไกแบบ SET โดยในการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะวัดจากความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งจะส่งผลให้สีม่วงจางลง โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสีจากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (บุหริน, 2556; โอภา, 2550)



 represents antioxidant

**ภาพที่ 2.10** กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะสามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ทำให้อนุมูลอิสระเกิดความเสถียร จาก “Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action,” โดย Liang, N., & Kitts, D. D., 2014, *Molecules*, 19(1), p. 19180-19208.

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ อนุมูลอิสระ DPPH มีอิเล็กตรอนเดี่ยวของไนโตรเจนที่ถูกล้อมรอบด้วยวงแหวนเบนซีน 3 วง ซึ่งอาจส่งผลให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีขนาดใหญ่เข้าทำปฏิกิริยากับอิเล็กตรอนเดี่ยวได้ยาก (โอภา, 2550)

#### 2.4.3.6 การทดสอบความสามารถในการกำจัดกับโลหะ (Metal chelating activity assay)

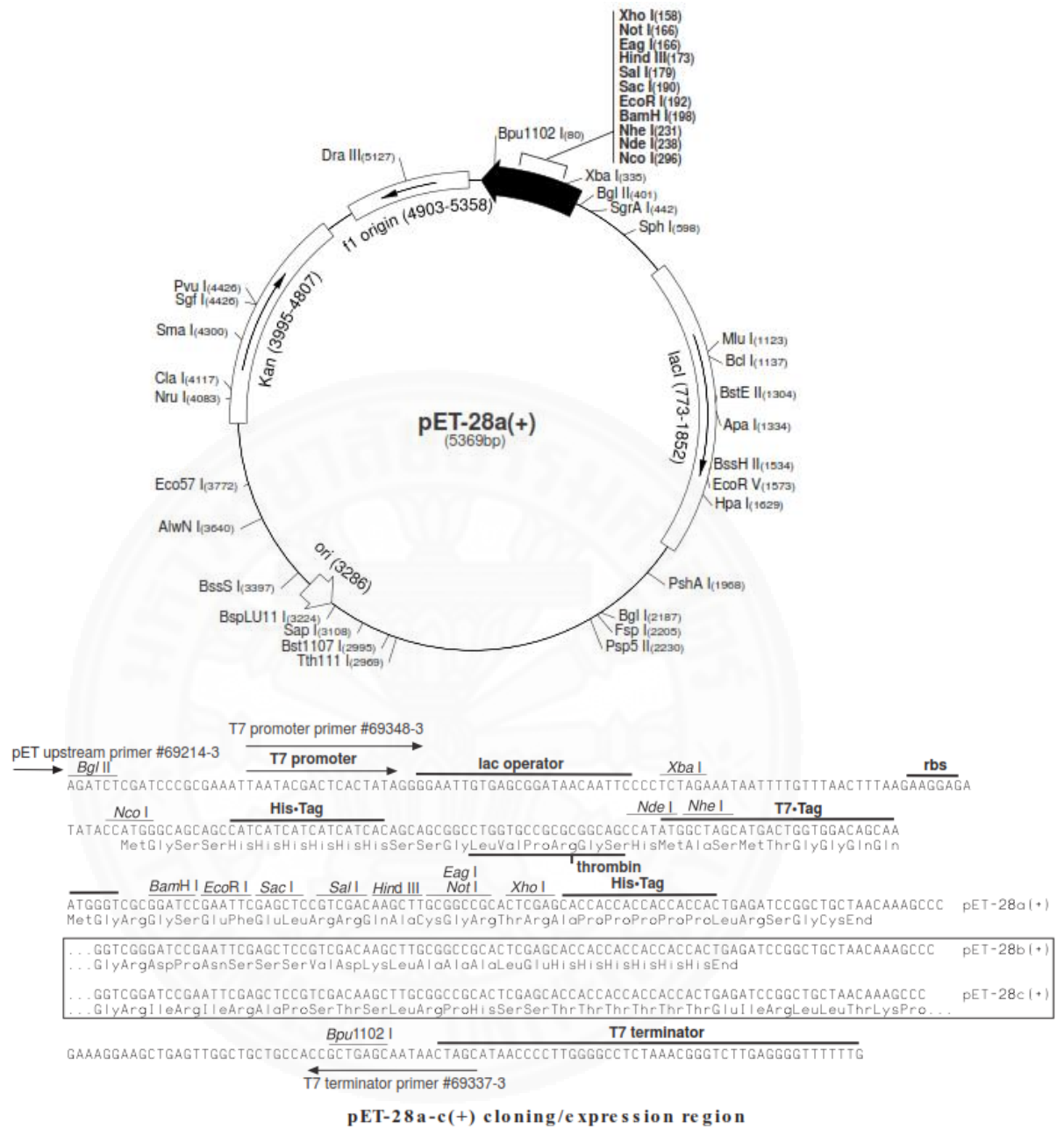
โลหะทรานสิชัน เช่น ธาตุเหล็ก เป็นโลหะที่มีความสำคัญต่อการเกิดอนุมูลอิสระ เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาเฟนทอนและเฮเบอร์ไวส์ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซีซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูง สารที่มีความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กได้ก็จะช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้เช่นกัน โดยในการทดสอบความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กสามารถทำได้โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างธาตุเหล็กในรูปเฟอร์รัสกับเฟอร์โรซีน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ในปฏิกิริยาที่มีการเติมสารทดสอบซึ่งมีความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กลงไปจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายลดลง (โอภา, 2550; Wong et al., 2014)

## 2.5 การผลิตโปรตีนในระบบ *E. coli* และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

การผลิตโปรตีนในระบบ *E. coli* เป็นหนึ่งในวิธีที่สามารถลดกระบวนการและต้นทุนในการสกัดและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เนื่องจากสามารถออกแบบเวกเตอร์ให้มีการผลิตโปรตีนติดกับแท็ก (tags) ต่าง ๆ เพื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ภายในขั้นตอนเดียว เช่น การติดแท็กฮิสทีดีนซึ่งทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้นิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี เป็นต้น อีกทั้งระบบ *E. coli* สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากและรวดเร็ว เนื่องจากแบคทีเรียมีระยะเวลาเจริญเติบโตที่รวดเร็ว และสามารถชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีนได้ตลอดเวลา (Rosano et al., 2014; Bornhorst et al., 2000)

### 2.5.1 พลาสมิดสำหรับผลิตโปรตีน

พลาสมิดที่นิยมใช้สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เช่น พลาสมิดในกลุ่ม pET ซึ่งผลิตโดยบริษัท Novagen พลาสมิดกลุ่มนี้จะมีโปรโมเตอร์ T7 (T7 promoter) ซึ่งสามารถแสดงออกยีนในระดับทรานสคริปชัน (transcription) ได้ในปริมาณมาก โดยปัจจุบันมีพลาสมิด pET หลายชนิดที่ได้รับการดัดแปลงให้เอื้อต่อการโคลนยีน การผลิตและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เช่น พลาสมิด pET28a-c ซึ่งมีจุดเด่นที่ต่างจากพลาสมิด pET ชนิดอื่น คือ พลาสมิด pET28a ออกแบบให้สามารถเลือกติดแท็กฮิสทีดีนได้ทั้งที่ปลาย N-terminus และ C-terminus ของโปรตีน ซึ่งสามารถทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้โดยการใช้นิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี และสามารถตัดแท็กฮิสทีดีนแบบ C-terminus ออกจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ด้วยเอนไซม์ทรอมบิน (thrombin) ในกรณีที่แท็กไปรบกวนการมันพับหรือรบกวนกิจกรรมของโปรตีน นอกจากนี้พลาสมิด pET28a ยังมีแท็ก T7 ให้เลือกใช้ซึ่งสามารถทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้โดยการจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ต่อแท็ก T7 พลาสมิด pET28a มีโปรโมเตอร์ T7 ซึ่งสามารถแสดงออกยีนได้โดยการชักนำด้วยสาร IPTG อีกทั้งมีจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดให้เลือกใช้ในการโคลนยีนตามความต้องการ โดยยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก (selectable marker gene) สำหรับพลาสมิด pET28a คือ ยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin resistant gene) แผนภาพพลาสมิด pET28a แสดงดังภาพที่ 2.11



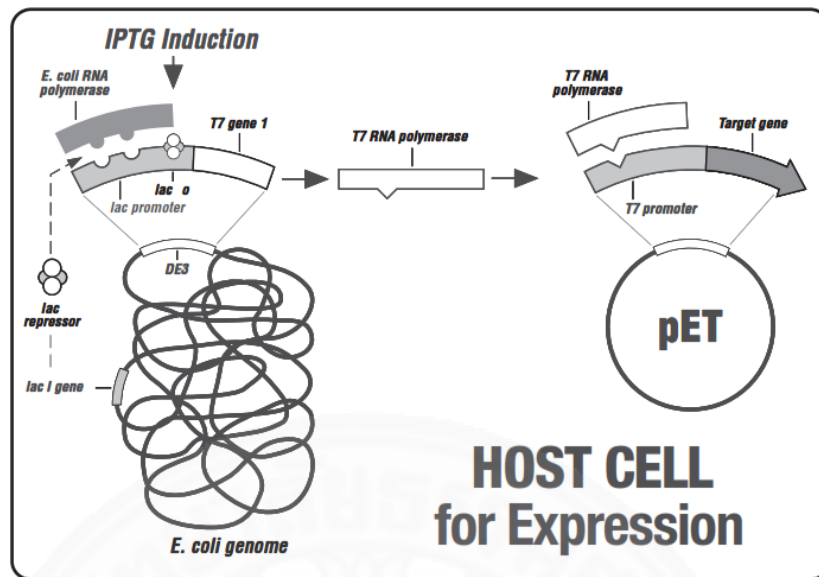
ภาพที่ 2.11 แผนที่พลาสมิด pET28a

จาก [http://www.emdmillipore.com/PR/en/product/pET-28a\(%2B\)-DNA---Novagen,EMD\\_BIO-69864](http://www.emdmillipore.com/PR/en/product/pET-28a(%2B)-DNA---Novagen,EMD_BIO-69864). สืบค้นวันที่ 3 มีนาคม 2560.

### 2.5.2 แบคทีเรีย *E. coli* สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

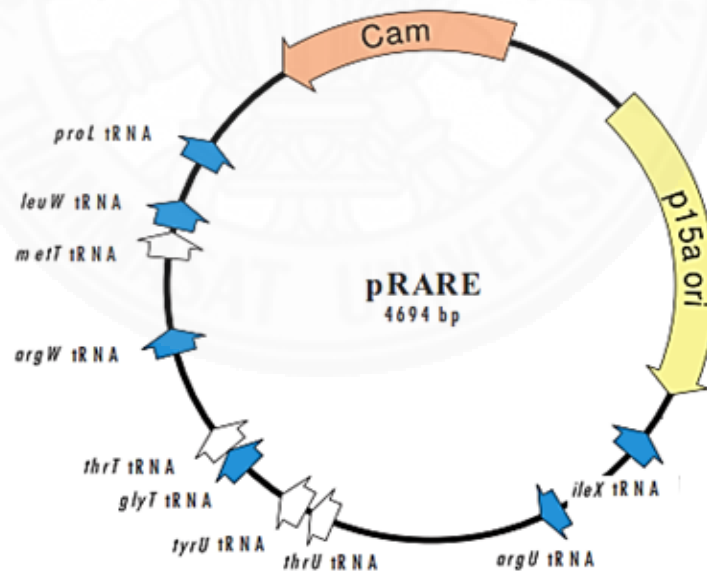
แบคทีเรียที่ใช้สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เช่น *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21trxB(DE3) และ *E. coli* Rosetta(DE3) เป็นต้น ซึ่งพัฒนาโดยบริษัท Novagen โดยเซลล์เจ้าบ้านเหล่านี้จะถูกดัดแปลงจีโนมเพื่อให้เอื้อต่อการสังเคราะห์โปรตีนในระบบ *E. coli* เช่น มีการดัดแปลงให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เอนไซม์ lon protease และ outer membrane protease ทำให้โปรตีนที่ผลิตได้มีอัตราการถูกย่อยสลายน้อยลง โดยกลไกการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านโดยทั่วไปแสดงดังภาพที่ 2.12 ในสภาวะปกติที่ไม่มีการเติมสาร IPTG จีโนมของ *E. coli* จะสังเคราะห์แล็กทีเพรสเซอร์ (lac repressor) ไปจับที่แล็กโอเปอเรเตอร์ (lac operator) ทำให้อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส *E. coli* (*E. coli* RNA polymerase) ไม่สามารถเข้าจับที่แล็กโพรโมเตอร์ (lac promoter) ได้ ส่งผลให้ไม่เกิดการสร้างอาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส T7 (T7 RNA polymerase) ต่อมาเมื่อมีการเติมสาร IPTG ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ IPTG จะไปเหนี่ยวนำให้แล็กทีเพรสเซอร์หลุดออกจากแล็กโอเปอเรเตอร์ ทำให้อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส *E. coli* สามารถเข้าจับที่แล็กโพรโมเตอร์ได้ ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส T7 จากนั้นอาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส T7 จะไปจับบริเวณโพรโมเตอร์ T7 บนพลาสมิด pET ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป้าหมาย

แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่บริษัท Novagen พัฒนาเพื่อให้เหมาะกับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่หลากหลาย เช่น *E. coli* BL21(DE3) เป็นสายพันธุ์ทั่วไปที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน *E. coli* BL21trxB(DE3) เป็นสายพันธุ์ที่มีการพัฒนาให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ได้ที่ไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ ส่วน *E. coli* Rosetta(DE3) เป็นสายพันธุ์ที่มีการพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาในเรื่องของ codon bias โดย *E. coli* Rosetta จะมีการเพิ่มพลาสมิด pRare เข้าภายในเซลล์พลาสมิด pRare ออกแบบให้มีการสังเคราะห์ tRNA ซึ่งมีแอนติโคดอนที่จำเพาะกับโคดอนที่พบน้อยใน *E. coli* ส่งผลให้ยีนที่มีโคดอนดังกล่าวมีประสิทธิภาพการแสดงออกดีขึ้น ดังนั้น *E. coli* Rosetta จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นมาสังเคราะห์โปรตีนใน *E. coli* โดยยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกสำหรับพลาสมิด pRare คือ ยีนต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol resistant gene) (Novy et al., 2001; Rosano, 2014)



ภาพที่ 2.12 กลไกการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระบบ *E. coli*

จาก [http://www.emdmillipore.com/PR/en/product/pET-28a\(%2B\)-DNA---Novagen,EMD\\_BIO-69864](http://www.emdmillipore.com/PR/en/product/pET-28a(%2B)-DNA---Novagen,EMD_BIO-69864). สืบค้นวันที่ 3 มีนาคม 2560.

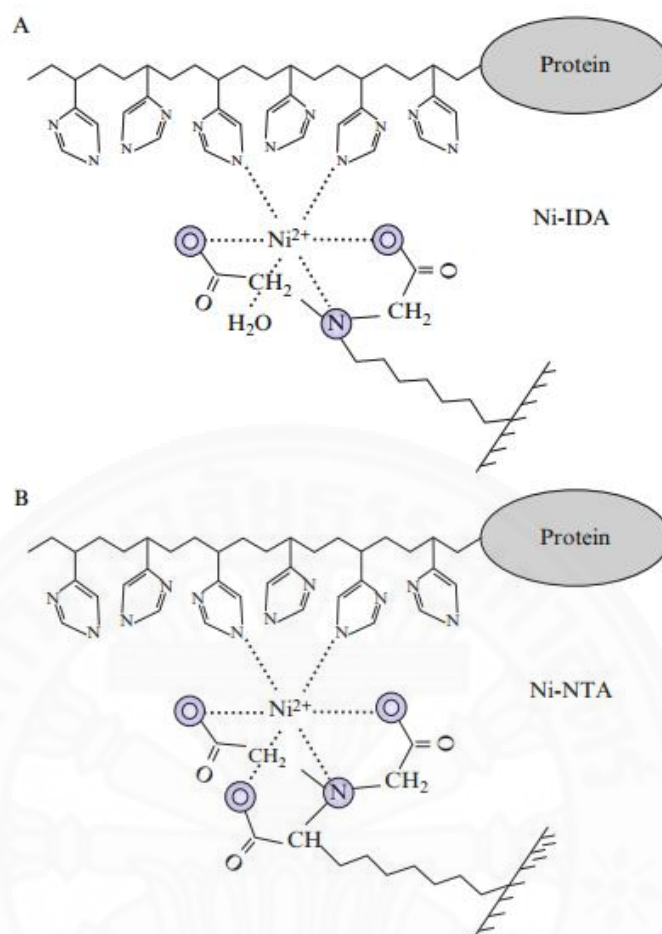


ภาพที่ 2.13 พลาสมิด pRare จาก “Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression,” โดย Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., & Mierendorf, R., 2001, *Innovations*, 12, p. 1-3.

### 2.5.3 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี

โปรตีนซึ่งติดแท็กฮิสทีดีนสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี โดยแท็กฮิสทีดีนสามารถจับกับนิกเกิลไอออนบนเม็ดปิด (beads) ภายในคอลัมน์ได้ เนื่องจากอะตอมไนโตรเจนในวงแหวนอิมิดาโซล (imidazole) ของกรดอะมิโนฮิสทีดีนมีความสามารถในการแชร์อิเล็กตรอนให้กับนิกเกิลไอออน ทำให้โปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ได้จับกับเม็ดปิดหลุดออกจากคอลัมน์ สามารถล้างโปรตีนส่วนเกินออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายเกลือ และชะโปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายอิมิดาโซลที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งอิมิดาโซลจะไปแย่งโปรตีนจับกับเม็ดปิด ทำให้โปรตีนที่ต้องการหลุดออกมากับสารละลาย โดยทั่วไปคอลัมน์ที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (nitrilotriacetic acid) และ  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA (iminodiacetic acid) โดยคอลัมน์แบบ  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA อะตอมของนิกเกิลจะถูกตรึงอยู่บนเม็ดปิด 3 วาเลนซ์ซี ในขณะที่  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA อะตอมของนิกเกิลจะถูกตรึงอยู่บนเม็ดปิด 4 วาเลนซ์ซี ดังภาพที่ 2.14 โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้คอลัมน์แบบ  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA ซึ่งมีข้อดีคือ ทำให้ได้โปรตีนจากการทำให้บริสุทธิ์ในปริมาณมาก และสามารถชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายอิมิดาโซลที่มีความเข้มข้นไม่สูงมากนัก อย่างไรก็ตามคอลัมน์ชนิดนี้อาจมีความจำเพาะในการจับกับโปรตีนที่ต่ำกว่าคอลัมน์แบบ  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA และมีการสูญเสียโลหะนิกเกิลออกมากับสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ในปริมาณมากกว่า (Bornhorst et al., 2000)





**ภาพที่ 2.14** การจับของโปรตีนที่มีแท็กฮิสทีดินบนคอลัมน์แบบ  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA และ  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA จาก “Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review,” โดย Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., & Schäfer, F., 2009, *Methods in enzymology*, 463, p. 439-473.

## บทที่ 3

### วิธีการวิจัย

#### 3.1 ไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างไชยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนแยกได้จากน้ำพุร้อนบ่อกรัง หมู่ 6 ตำบลท่าสะท้อน อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งแยกโดย นางสาวคัทติยา สุวรรณมณี (คัทติยา, 2558) ต่อมาได้มีการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและระบุให้ไชยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนนี้จัดอยู่ในสกุล *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ไชยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

#### 3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

- แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด
- แบคทีเรีย *E. coli* Rosetta(DE3) ใช้สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

### 3.3 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 โดยอ้างอิงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcA* และ *cpcB* จากงานวิจัยโครงการปัญหาพิเศษของ สีชล (2556) โดยเพิ่มจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปลาย 5'-ฟอสเฟตของฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) และรีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) เพื่อประโยชน์ในการโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด pET28a จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบมาคำนวณค่าต่าง ๆ ได้แก่ ค่า Tm (melting temperature), เปอร์เซ็นต์ GC และไพรเมอร์ไดเมอร์ (primer dimer) โดยใช้โปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc) เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมในการนำไพรเมอร์มาเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* ต่อไป

### 3.4 การเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน

เพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* ได้มาจากการวิจัยโครงการปัญหาพิเศษของ สีชล (2556) ซึ่งเป็นพลาสมิด pGEM-T easy ที่มียีน *cpcA* และ *cpcB* แทรกอยู่ ส่วนประกอบและสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงดังตารางที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB*

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาณที่ใช้
10X <i>Ex Taq</i> <sup>TM</sup> buffer	1x	10.0 $\mu$ l
2.5 mM dNTP	200 $\mu$ l	8.0 $\mu$ l
10 $\mu$ M <i>NcoI-cpcA-F</i> หรือ <i>NcoI-cpcB-F</i> *	0.2 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
10 $\mu$ M <i>XhoI-cpcA-R</i> หรือ <i>XhoI-cpcB-R</i> *	0.2 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
5 U/ $\mu$ l <i>TaKaRa Ex Taq</i> <sup>TM</sup> DNA polymerase (TaKaRa Bio, Japan)	2.5 U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
100 ng/ $\mu$ l DNA Template	200 ng/ $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
น้ำปราศจากไอออน	-	76.5 $\mu$ l

\* *NcoI-cpcA-F* และ *NcoI-cpcA-R* เป็นไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน *cpcA*

\* *XhoI-cpcB-F* และ *XhoI-cpcB-R* เป็นไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน *cpcB*

**ตารางที่ 3.2** สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
initial denaturation	94	3 นาที	1
denaturation	94	30 วินาที	5
annealing	45	30 วินาที	
extension	72	1 นาที	
denaturation	94	30 วินาที	30
annealing	66	30 วินาที	
extension	72	1 นาที	
final extension	72	7 นาที	1

### 3.5 การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

#### 3.5.1 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมารันบนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส นำเจลที่ได้ไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 15 นาที และแช่ในน้ำกลั่น 15 นาทีแล้วตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการภายใต้แสงยูวี จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) (ภาคผนวก 5) เก็บผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในน้ำปราศจากไอออน 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.5.2 การสกัดพลาสมิด pET28a จาก *E. coli* DH5 $\alpha$

นำโคลนีเดี่ยว *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pET28a มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยกานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ค) เก็บเซลล์ในน้ำปราศจากไอออน 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบปริมาณของพลาสมิดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงช่วงรังสียูวี (UV spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

### 3.5.3 การตัดผลิตจากภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและพลาสมิด pET28a ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ

สำหรับการตัดยีน *cpcA* นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และพลาสมิด pET28a มาเติมส่วนประกอบในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* (Promega, USA) ดังตารางที่ 3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำผลิตภัณฑ์จากการตัดให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ค) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาเติมส่วนประกอบในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* (Vivantis, Malaysia) ดังตารางที่ 3.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปรันอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) (ภาคผนวก ค)

สำหรับการตัดยีน *cpcB* นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และพลาสมิด pET28a มาเติมส่วนประกอบในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* (Promega, USA) และ *NcoI* (Promega, USA) ดังตารางที่ 3.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปรันอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) (ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการตัดยีน *cpcA* และพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ *XhoI*

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้สำหรับตัดยีน <i>cpcA</i>	ปริมาณที่ใช้สำหรับตัดพลาสมิด pET28a
10X D buffer	4 µl	5 µl
10µg/µl BSA	0.4 µl	0.5 µl
500 ng/µl pET28a	10 µl	-
<i>cpcA</i> DNA fragment	-	30 µl
10 µg/µl <i>XhoI</i>	2.5 µl	3 µl
น้ำปราศจากไอออน	14.6 µl	11.5 µl

**ตารางที่ 3.4** ส่วนประกอบในการตัดยีน *cpcA* และพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ *NdeI*

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้สำหรับตัดยีน <i>cpcA</i>	ปริมาณที่ใช้สำหรับตัดพลาสมิด pET28a
10X V5 buffer (1µg/µl BSA)	4 µl	5 µl
500 ng/µl pET28a	15 µl	-
<i>cpcA</i> DNA fragment	-	30 µl
10 µg/µl <i>NdeI</i>	2.5 µl	3 µl
น้ำปราศจากไอออน	18.5 µl	12 µl

**ตารางที่ 3.5** ส่วนประกอบในการตัดยีน *cpcB* และพลาสมิด pET28a ด้วยเอนไซม์ *XhoI* และ *NcoI*

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้สำหรับตัดยีน <i>cpcB</i>	ปริมาณที่ใช้สำหรับตัดพลาสมิด pET28a
10X A buffer	4 µl	5 µl
10µg/µl BSA	0.4 µl	0.5 µl
835 ng/µl pET28a	6 µl	-
<i>cpcB</i> DNA fragment	-	30 µl
10 µg/µl <i>XhoI</i>	2.5 µl	3 µl
10 µg/µl <i>NcoI</i>	2.5 µl	3 µl
น้ำปราศจากไอออน	8.5 µl	3 µl

### 3.5.4 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาจากลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้าสู่พลาสมิด pET28a

ผสมสารต่าง ๆ ดังนี้บัฟเฟอร์ 5X Rapid ligation 1 ไมโครลิตร ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในขั้นตอน 3.5.3 (14 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร พลาสมิด pET28a (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas, USA) (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

### 3.5.5 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α

เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ 200 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) นำเซลล์คอมพีเทนต์มาใส่กระบอกน้ำแข็ง แล้วเติมผลิตภัณฑ์จากการไลเกชัน 3 ไมโครลิตร และทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 45 นาที เลื่อนกระบอกน้ำแข็งไปมาเบา ๆ ทุก 5-10 นาที ทำ Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 วินาที แล้วนำไปใส่ในกระบอก

น้ำแข็งที่ 30 นาที เติมอาหารเหลว LB 800 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที จากนั้นกระจายเซลล์ด้วยวิธี spread plate ลงบนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วยกานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ต่อมาคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมา streak บนอาหารแข็ง LB เพลทใหม่ที่ประกอบด้วยกานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีหมายเลขกำกับแต่ละโคโลนีไว้ แล้วจึงคัดเลือกโคโลนีที่ได้มาทำโคโลนีพีซีอาร์ (Colony PCR) ต่อไป

### 3.5.6 การทำโคโลนีพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบขั้นต้นเอ็นเอที่แทรกในเวกเตอร์

เติมส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังตารางที่ 3.6 โดยสภาพที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงดังตารางที่ 3.7 แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ประกอบด้วย กานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และนำมาสกัดพลาสมิดต่อไป

**ตารางที่ 3.6** ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาณที่ใช้
10X buffer A	1x	2.5 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2mM	1.0 µl
2.5 mM dNTP	200 µM	1.0 µl
10 µM <i>cpcA</i> -F หรือ <i>cpcB</i> -F *	0.2 µM	0.5 µl
10 µM <i>cpcA</i> -R หรือ <i>cpcB</i> -R *	0.2 µM	0.5 µl
5 U/µl <i>Taq</i> DNA Polymerase (Vivantis, Malaysia)	1.25 U/µl	0.5 µl
น้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	-	19 µl

\**cpcA*-F (5'-ATGAAAACCCCGATTACTGAAGC-3') และ *cpcA*-R (5'-CTAGCTGAGGGCGTTGATGG-3') เป็นไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *cpcA* แทรกอยู่

\**cpcB*-F (5'-ATGCTAGATGCATTTGCCAAAGTTG-3') และ *cpcB*-R (5'-TTAGGCAACAGCGGCA GCGGC-3') เป็นไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *cpcB* แทรกอยู่

**ตารางที่ 3.7** สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
initial denaturation	94	5 นาที	1
denaturation	94	30 วินาที	35
annealing	50	30 วินาที	
extension	72	30 นาที	
final extension	72	7 นาที	1

### 3.5.7 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจาก *E. coli* DH5 $\alpha$

นำเซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ประกอบด้วยกานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ค) ตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบปริมาณของพลาสมิดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงช่วงรังสียูวีที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

### 3.5.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งพลาสมิดที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้คู่ไพรเมอร์โปรโมเตอร์ T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3') และเทอร์มินเตอร์ T7 (5'-GCTAGT TATTGCTCAGCGG-3') ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไพรเมอร์โปรโมเตอร์ T7 และเทอร์มินเตอร์ T7 สามารถจับได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนพลาสมิด pET28a และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ผ่านชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แทรกในพลาสมิด เพื่อตรวจสอบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกในพลาสมิดนี้คือยีน *cpcA* และ *cpcB* ที่ต้องการ

## 3.6 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* Rosetta(DE3)

เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* Rosetta(DE3) 200 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) นำเซลล์คอมพีเทนต์มาใส่กระบอกน้ำแข็ง แล้วเติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-*cpcA* หรือ pET28a-*cpcB* ให้ทั่วเซลล์คอมพีเทนต์ และทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที เลื่อนกระบอกน้ำแข็งไปมาเบา ๆ ทุก 5-10 นาที ทำ Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 1 นาที แล้วนำไปใส่ในกระบอกน้ำแข็ง 30 นาที เติมหาอาหารเหลว LB 800



ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที จากนั้นกระจายเซลล์ด้วยวิธี spread plate ลงบนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วย กานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ต่อมาคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมา streak บนอาหารแข็ง LB ใหม่ที่ประกอบด้วย กานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีหมายเลขกำกับแต่ละโคโลนีไว้ แล้วจึงคัดเลือกโคโลนีที่ได้มาทำการผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ต่อไป

### 3.7 การผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ใน *E. coli* Rosetta(DE3)

นำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* Rosetta(DE3) ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-cpcA หรือ pET28a-cpcB มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ซึ่งประกอบด้วยกานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้น 400 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB 40 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.5-0.6 จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB โดยการเติม IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นมาตรวจสอบโปรตีนที่ได้ด้วย SDS-PAGE เพื่อหาสภาวะที่สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากและเสียสภาวะน้อยที่สุด

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB แล้ว จึงขยายขนาดการผลิตโปรตีนโดยนำเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB 200 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย กานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกและทำให้โปรตีน CpcA และ CpcB บริสุทธิ์ ต่อไป

### 3.8 การทำโปรตีน CpcA และ CpcB ให้บริสุทธิ์

ทำโปรตีน CpcA และ CpcB ให้บริสุทธิ์ด้วย PrepEase™ His-Tagged Proteins Purification Kits (Affymetrix USB, USA) โดยนำเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ 1X LEW (โซเดียมไดไฮโดรเจนพอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 300 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4) 6 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นความถี่สูง (Sonication) บนน้ำแข็ง ด้วยค่า duty cycle 0.5 วินาที เปิด

เครื่อง 2 นาที และปิดเครื่อง 2 นาที จำนวน 10 ครั้ง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บส่วนสารละลายและนำตะกอนเซลล์ออก ต่อมาเตรียมคอลัมน์ใส่บนหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ 1X LEW 2 มิลลิลิตร เพื่อ equilibrate คอลัมน์ จากนั้นเติมส่วนสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงใส่ลงในคอลัมน์ แล้วล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 1X LEW 1.5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ต่อมาชะโปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 1X Elution (อิมิดาโซล 250 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมคลอไรด์ 300 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4) 1.5 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์มาตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

### 3.9 การทำไดอะไลซิส (Dialysis)

ทำไดอะไลซิสด้วย Maxi Pur-A-Lyzer (Sigma-Aldrich, USA) โดยนำโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในสารละลายอิมิดาโซล 250 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 50 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 300 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมนลงในหลอดไดอะไลซิส จากนั้นนำหลอดไดอะไลซิสไปใส่ไว้ในบีกเกอร์ซึ่งบรรจุบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร คนสารละลายภายในบีกเกอร์ด้วยแท่งแม่เหล็กภายในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ใหม่ทุก ๆ 10-15 ชั่วโมง จำนวน 6 ครั้ง

### 3.10 การเตรียมสารละลายสกัดหยาบ (crude extraction)

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* Rosetta (pET28a-cpcA) หรือ *E. coli* Rosetta (pET28a-cpcB) หรือ *E. coli* Rosetta (pET28a) ในอาหารเหลว LB 200 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยกานามัยซิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบ/นาาที จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.6 จากนั้นเติม IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ แล้วนำเชื้อมาเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบ/นาาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้งไปแล้วเติมน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 6 มิลลิลิตร นำมาทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูงบนน้ำแข็ง ด้วยค่า duty cycle 0.5 วินาที ปิดเครื่อง 2 นาที และปิด

เครื่อง 2 นาที จำนวน 10 ครั้ง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนสารละลาย (soluble fraction) มาใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.11 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951)

เตรียมสารละลาย A (คอปเปอร์ซัลเฟต 0.25 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต 0.5 กรัม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร) สารละลาย B (โซเดียมคาร์บอเนต 1 กรัม และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 กรัม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร) สารละลาย C (สารละลาย A 1 มิลลิลิตร และสารละลาย B 50 มิลลิลิตร) โดยการทดสอบเริ่มจากผสมโปรตีนตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร กับสารละลาย C 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายผสมไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการคำนวณปริมาณของโปรตีน ตัวอย่างจะคำนวณโดยแทนค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin) ปริมาณ 10, 20, 30, 40, 50, 60, และ 70 ไมโครกรัม

### 3.12 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน CpcA และ CpcB

#### 3.12.1 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation decolorization assay) (Re et al., 1999)

ผสมส่วนประกอบในปฏิกิริยาทดสอบให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ ABTS 7 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.5 มิลลิโมลาร์ และบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 นำสารละลายผสมมาเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อสังเคราะห์อนุมูลอิสระ ABTS (ภาคผนวก ข) ต่อมานำสารละลาย ABTS มาเจือจางด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ  $0.7 \pm 0.02$  จากนั้นนำสารละลายผสมมา 900 ไมโครลิตร เติมน้ำทดสอบซึ่ง ได้แก่ CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ (Native Cpc) และโทรล็อก (trolox) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1, 3, 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ตั้งสารผสมไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ตั้งค่าการดูดกลืนแสงให้เป็น 0.000 สำหรับสารตัวอย่างบางชนิดอาจสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ได้ ซึ่งในการทดลองนี้ได้แก่

ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ จึงอาจส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีการเติมซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นอาจต้องมีการนำค่าการดูดกลืนแสงของซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติมาลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีการเติมซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติด้วย โดยนำซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1, 3, 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 900 ไมโครลิตร ตั้งสารผสมไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ต่อมานำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารตัวอย่างจากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS} = [A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})] / A_{\text{control}} \times 100$$

โดย  $A_{\text{blank}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง  $A_{\text{sample}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เติมสารตัวอย่าง และ  $A_{\text{control}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่เติมสารตัวอย่าง จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า  $IC_{50}$  (Inhibitory Concentration 50%) หรือปริมาณของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม Sigma Plot 12.0

### 3.12.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี ด้วยวิธีโออาร์เอซี-ฟลูออเรสซิน (ORAC- Fluorescein Assay) (Dávalos et al., 2004)

เตรียมสารละลาย APPH 40 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ( $NaH_2PO_4$ - $NaHPO_4$ ) 75 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 และเตรียมฟลูออเรสซิน 583 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 75 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 จากนั้นเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด ต่อมานำสารละลายฟลูออเรสซินมาเจือจาง 1: 5,000 เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 75 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 จากนั้นนำสารละลายฟลูออเรสซินที่เจือจาง 120 ไมโครลิตร มาผสมกับสารทดสอบ (CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโทรล็อก) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ 20 ไมโครลิตร ใน 96-well plate (Nunclon) ชนิดโพลีสไตรีน (polystyrene) สีดำ นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม APPH 40 มิลลิโมลาร์ 60 ไมโครลิตร จากนั้นนำ 96-well plate เข้าเครื่อง Microplate reader รุ่น Varioskan Flash (Thermo Scientific, USA) ในทันที วัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยกระตุ้นให้เกิดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร และวัดค่าการปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร วัดผลทุก ๆ 1 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับสารตัวอย่างบางชนิดที่สามารถปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ซึ่งในการทดลองนี้ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ อาจทำให้ค่าการปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของปฏิกิริยา

เพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นจึงต้องมีการนำผลการปลดปล่อยฟลูออเรสเซนซ์ของซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ มาลบออกจากปฏิกิริยาที่มีการเติมซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติด้วย โดยนำซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ 20 ไมโครลิตร มาผสมกับบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 75 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 120 ไมโครลิตร นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 75 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายมาวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ทุก ๆ 1 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เช่นกัน ต่อมานำผลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงเทียบกับเวลา แล้วคำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟหรือค่า AUC (area under the fluorescence decay curve) จากสมการ

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{60} \frac{f_i}{f_0}$$

โดย AUC คือพื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงเทียบกับเวลา  $f_1$  คือ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เวลา  $i$  นาที และ  $f_0$  คือ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เวลา 0 นาที ในการวิเคราะห์ผลจะคำนวณจากพื้นที่ใต้เส้นกราฟระหว่างปฏิกิริยาที่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระกับปฏิกิริยาที่ไม่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระหรือค่า net AUC ซึ่งคำนวณจากสมการ

$$\text{net AUC} = (\text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}) - \text{AUC}_{\text{control}}$$

โดย  $\text{AUC}_{\text{blank}}$  คือ ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่าง  $\text{AUC}_{\text{sample}}$  คือ ค่าพื้นที่ใต้กราฟของปฏิกิริยาที่มีการเติมสารตัวอย่าง และ  $\text{AUC}_{\text{control}}$  คือ ค่าพื้นที่ใต้กราฟของปฏิกิริยาที่ไม่มีการเติมสารตัวอย่าง จากนั้นนำค่า net AUC ที่คำนวณได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง net AUC กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม Sigma Plot 12.0 และรายงานผลเป็นค่าสมมูลกับสารมาตรฐาน ไทรล็อก (trolox equivalent values) โดยนำค่าความชันจากสมการ linear regression ของสารตัวอย่างหารด้วยไทรล็อก

### 3.12.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซี ด้วยวิธีดีออกซีไรโบส (Deoxyribose Assay) (Halliwell et al., 1987)

ผสมส่วนประกอบในปฏิกิริยาทดสอบดังนี้ บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$ ) 200 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 50 ไมโครลิตร ดีออกซีไรโบส 28 มิลลิโมลาร์ 50 ไมโครลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 มิลลิโมลาร์ 50 ไมโครลิตร EDTA 10.4 ไมโครโมลาร์ 50 ไมโครลิตร เพอร์ริกคลอไรด์ 10 ไมโครโมลาร์ 50 ไมโครลิตร และเติมสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และไทรล็อก) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25, 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 200 ไมโครลิตร เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติมกรดแอสคอร์บิก 1 มิลลิโมลาร์ 50 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมของสารผสมจะเท่ากับ 500 ไมโครลิตร นำ

สารผสมมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เกิดสีโดยการเติมกรดไทโอบาร์บิทริก (1 เปอร์เซ็นต์ มวล/ปริมาตร ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์) 250 ไมโครลิตร และกรดไตรคลอโรอะซีติก (2.8 เปอร์เซ็นต์ มวล/ปริมาตร ในน้ำปราศจากไอออน) 250 ไมโครลิตร นำมาต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที รอให้สารละลายเย็นแล้วเจือจางด้วยบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยใช้บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ตั้งค่าการดูดกลืนแสงให้เป็น 0.000 สำหรับสารตัวอย่างบางชนิดอาจสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ได้ ซึ่งในการทดลองนี้ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ จึงอาจส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีการเติมซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึงอาจต้องมีการนำค่าการดูดกลืนแสงของซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติมาลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีการเติมซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติด้วย โดยนำซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25, 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 200 ไมโครลิตร มาผสมกับบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 300 ไมโครลิตร นำสารผสมมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 500 ไมโครลิตร นำมาต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที รอให้สารละลายเย็นแล้วเติมบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของสารตัวอย่างจากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซี} = [A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})] / A_{\text{control}} \times 100$$

โดย  $A_{\text{blank}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง  $A_{\text{sample}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เติมสารตัวอย่าง และ  $A_{\text{control}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่เติมสารตัวอย่าง จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพื่อหาค่า  $IC_{50}$  โดยใช้โปรแกรม Sigma Plot 12.0

### 3.12.4 การทดสอบความสามารถในการกำจัดกับโลหะ (Metal chelating activity assay) (Wong et al., 2014)

ผสมส่วนประกอบในปฏิกิริยาทดสอบดังนี้ สารทดสอบ (CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และ EDTA) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 250 ไมโครลิตร และเพอร์ร็อกซาลเฟต 0.1 มิลลิโมลาร์ 250 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมเพอร์โรซิน 0.25 มิลลิโมลาร์ 500 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยใช้บัฟเฟอร์

โซเดียมฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ตั้งค่าการดูดกลืนแสงให้เป็น 0.000 สำหรับสารตัวอย่าง บางชนิดอาจสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ได้ ซึ่งในการทดลองนี้ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ จึงอาจส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึง อาจต้องมีการนำค่าการดูดกลืนแสงของซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติมาลบออกจากค่าการดูดกลืน แสงของปฏิกิริยาที่มีการเติมซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติด้วย โดยนำซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติที่ มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 80, 160 และ 320 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 250 ไมโครลิตร มาผสมกับบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 250 ไมโครลิตร ตั้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 500 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มา คำนวณเปอร์เซ็นต์การแย่งจับกับโลหะของสารตัวอย่างจากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การแย่งจับกับโลหะ} = [A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})] / A_{\text{control}} \times 100$$

โดย  $A_{\text{blank}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง  $A_{\text{sample}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เติม สารตัวอย่าง และ  $A_{\text{control}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่เติมสารตัวอย่าง จากนั้นสร้างกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การแย่งจับกับโลหะกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพื่อหาค่า  $IC_{50}$  โดยใช้โปรแกรม Sigma Plot 12.0

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน

ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ได้มีการเติมจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้าสู่ที่ปลาย 5' ของฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ และรีเวิร์สไพรเมอร์ เพื่อช่วยในการโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด pET28a ดังตารางที่ 4.1 โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ นอกจากนี้ยังมีการเติมลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 3-4 นิวคลีโอไทด์เพิ่มเข้าที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ซึ่งอยู่ถัดจากจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการตัดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

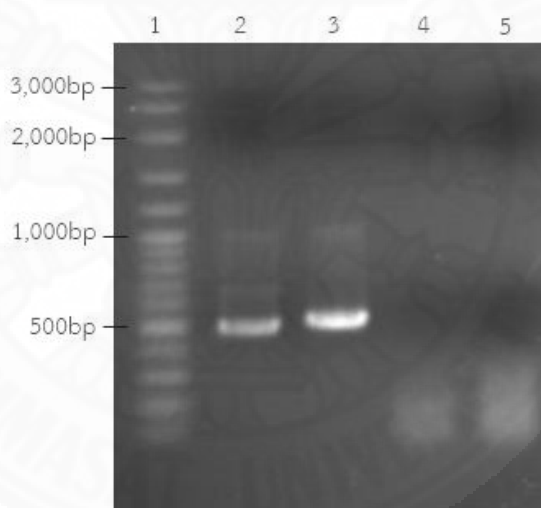
ตารางที่ 4.1 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	Tm	%CG	จุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ
<i>NdeI-cpcA-F</i>	5'-CATG <u>CATATG</u> AAAAACCCCGATTACTGAAGC-3'	57.9	41.4 %	<i>NdeI</i>
<i>XhoI-cpcA-R</i>	5'- CGG <u>CTCGAGG</u> CTGAGGGCGTTGATGG-3'	68.6	69.2 %	<i>XhoI</i>
<i>NcoI-cpcB-F</i>	5'-CATG <u>CCATGG</u> CCCTAGATGCATTTGCC-3'	64.1	55.6 %	<i>NcoI</i>
<i>XhoI-cpcB-R</i>	5'-CGG <u>CTCGAGG</u> GCAACAGCGGCAGCG-3'	71.8	76.0 %	<i>XhoI</i>



## 4.2 การเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน

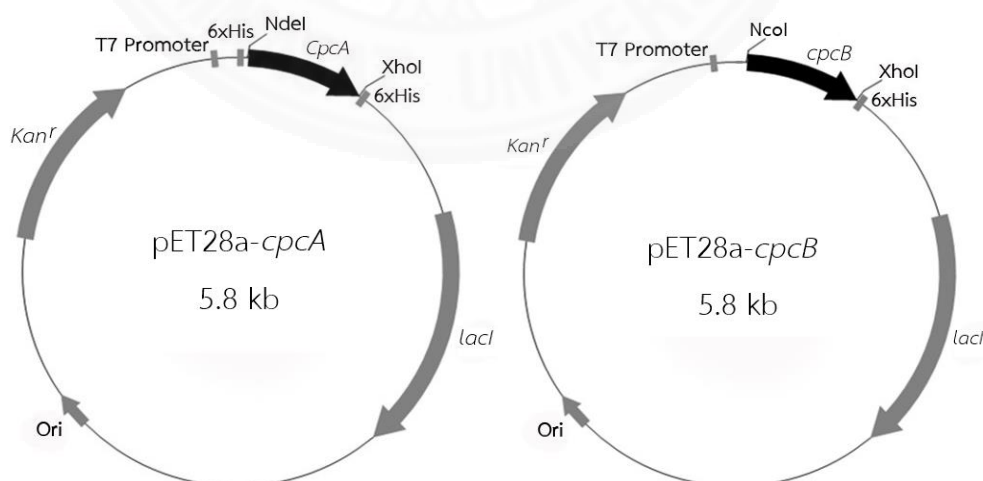
ในการเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มีการใช้ *TaKaRa Ex Taq™* DNA Polymerase (TaKaRa Bio, Japan) ซึ่งมีสมบัติ 3' → 5' exonuclease (proof reading) สามารถตรวจสอบแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดได้ เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส แสดงดังภาพที่ 4.1 ซึ่งตรงกับขนาดของยีน *cpcA* และยีน *cpcB* ที่ได้คาดการณ์ไว้ โดยมีแถบดีเอ็นเอสั้นมาบ้างเล็กน้อยซึ่งสามารถทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ได้โดยการตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ต้องการขนาดประมาณ 500 คู่เบส และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้โคลนเข้าสู่พลาสมิด pET28a ต่อไป



**ภาพที่ 4.1** การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยหมายเลข 1 คือ VC 100bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia) หมายเลข 2 คือ ยีน *cpcA* หมายเลข 3 คือ ยีน *cpcB* หมายเลข 4 คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีไพรเมอร์ *NdeI-cpcA-F* และ *XhoI-cpcA-R* แต่ไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ และหมายเลข 5 คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีไพรเมอร์ *NcoI-cpcB-F* และ *XhoI-cpcB-R* แต่ไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ

### 4.3 การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิด pET28a โดยโคลนยีน *cpcA* เข้าสู่พลาสมิด pET28a ระหว่างตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ *NdeI* และ *XhoI* ซึ่งจะทำให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของแท็กฮิสทีดิน (ฮิสทีดิน 6 โมเลกุล) ติดอยู่ที่ปลาย 5' และ 3' ของยีน ส่วนยีน *cpcB* โคลนเข้าสู่พลาสมิด pET28a ระหว่างจุดตัดเอนไซม์ *NcoI* และ *XhoI* ซึ่งปลาย 3' ของยีนจะติดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแท็กฮิสทีดิน ดังภาพที่ 4.2 เพื่อประโยชน์ในการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA และ CpcB ให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี ต่อมาทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-*cpcA* และ pET28a-*cpcB* เข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  เพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบและยืนยันว่ามียีน *cpcA* หรือ *cpcB* แทรกอยู่ในพลาสมิด pET28a และยืนยันดังกล่าวแทรกอยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcA* และ *cpcB* แล้วแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcA และ CpcB ได้ดังภาพที่ 4.3 และ 4.4 จากการคำนวณค่า pI (Isoelectric Point) และมวลโมเลกุลโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam (Gasteiger et al., 2005) พบว่าโปรตีน CpcA และ CpcB ซึ่งมีแท็กฮิสทีดินมีขนาดมวลโมเลกุล 20.66 และ 19.32 กิโลดาลตันตามลำดับ และมีค่า pI เท่ากับ 6.69 และ 6.04 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 แผนภาพพลาสมิด pET28a-*cpcA* และ pET28a-*cpcB*

```

AGATCTCGATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAA
      T7 promoter          lac operator
TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGTATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCCG
      Rbs          M G S S H H H H H H S S G L V P
CGCGGCAGCCATATGAAAAACCCGATTACTGAAGCCATTGCCGCCGCTGATACCCAAGGTCGTTTCCTCAGCAACAC
R G S H M K T P I T E A I A A A D T Q G R F L S N T
CGAACTGCAAGCGGTTGACGGTCGCTTCAAGCGCGCTGTGGCCAGCATGGAAGCTGCTCGCGCCCTGACCAACAATG
E L Q A V D G R F K R A V A S M E A A R A L T N N
CTCAGAGCCTGATTGACGGCGCAGCCCAAGCGGTGTACAAAAATCCCCTACACCACCACCATGCAAGGCTCTCAG
A Q S L I D G A A Q A V Y Q K F P Y T T T M Q G S Q
TATGCCTCGACCCCGAAGGCAAAGCCAAGTGCGCCGCTGACATCGGCTACTACCTGCGGATGGTGACCTACTGCCT
Y A S T P E G K A K C A R D I G Y Y L R M V T Y C L
CGTGGCGGGTGGCACTGGTCCCATGGATGAGTACCTCATTGCTGGCTTGTCTGAAATCAACAGCAGCTTTGATCTCT
V A G G T G P M D E Y L I A G L S E I N S T F D L
CCCCAAGCTGTATGTGGAAGCTCTGAAATACATCAAAGCCAATCATGGCTTGGCTGGCAAGCTGCGGTGGAAGCC
S P S W Y V E A L K Y I K A N H G L T G Q A A V E A
AACGCCTACATCGACTACGCCATCAACGCCCTCAGCCTCGAGCACCACCACCACCACCTGATGAGATCCGGCTGC
N A Y I D Y A I N A L S L E H H H H H H Stop
TAACAAAGCCCGAAAGGAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTA
      T7 terminator
AACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

```

ภาพที่ 4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสได้จากยีน *cpcA* ที่โคลนเข้าสู่พลาสมิด pET28a โดยบริเวณเส้นใต้ทับคือตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของแท็กฮิสทีดิน

```

AGATCTCGATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAA
      T7 promoter          lac operator
TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGTATACCATGGCCCTAGATGCATTTGCCAAAGTTGTCGCTCAGGCCGATGCCCGG
      Rbs          M A L D A F A K V V A Q A D A R
GGTGAATTCCTCACCAACGCCAGTTCGATGCCCTGTCCAACCTGGTGAAAGAAGGCAACCAAGCGTCTGGATGCCGT
G E F L T N A Q F D A L S N L V K E G N K R L D A V
CAACCGCATCACCAAGCAATGCCTCCACGATCGTTGCCAACGCTGCTCGTGCCTCTTTGCAGAGCAACCCCAACTGA
N R I T S N A S T I V A N A A R A L F A E Q P Q L
TCCAACCCGGTGGGAATGCTTACACCAACCGTGTATGGCTGCTTGCCTGCGCGATATGGAATCATCTTGGCGTAT
I Q P G G N A Y T N R R M A A C L R D M E I I L R Y
GTGACCTATGCCATTTTGGCTGGTGACTCCAGCGTGTCTGATGATCGCTGCTGAACGGTCTGCGGGAACCTACCA
V T Y A I L A G D S S V L D D R C L N G L R E T Y Q
AGCCCTTGGTACCCCGGCTCCTCTGTGGCTGTGGCCATCAAAAAATGAAAGATGCCGCGATCGCGATCGCCAATG
A L G T P G S S V A V A I Q K M K D A A I A I A N
ATCCCAATGGCATCACCCCTGGCGATTGCAGCGCCCTGATGTCCGAAATCGCTGGCTACTTTGATCGTGCCGCTGCC
D P N G I T P G D C S A L M S E I A G Y F D R A A A
GCTGTTGCCCTCGAGCACCACCACCACCACCTGATGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAGCTGAGTT
A V A L E H H H H H H H Stop
GGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACCGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
      T7 terminator

```

ภาพที่ 4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสได้จากยีน *cpcB* ที่โคลนเข้าสู่พลาสมิด pET28a โดยบริเวณเส้นใต้ทับคือตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของแท็กฮิสทีดิน

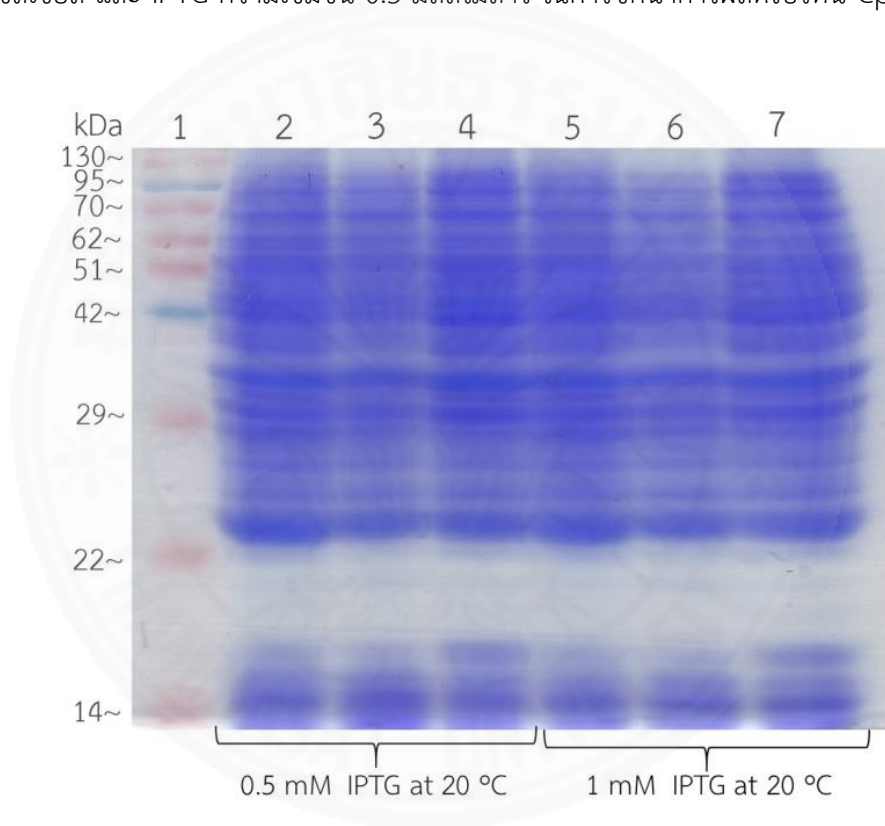
#### 4.4 การผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ใน *E. coli* Rosetta(DE3)

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-*cpcA* และ pET28a-*cpcB* เข้าสู่ *E. coli* Rosetta(DE3) เพื่อผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB โดยโปรตีน CpcA ที่ผลิตได้จะมีแท็กฮิสทีดติดอยู่ที่ปลาย N-terminus และ C-terminus ของโปรตีน ส่วนโปรตีน CpcB จะมีแท็กฮิสทีดติดอยู่ที่ปลาย C-terminus ของโปรตีน ในการชักนำให้เกิดการแสดงออกโปรตีนจะต้องใช้ความเข้มข้นของ IPTG และอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ได้โปรตีนในปริมาณมากและเกิดการเสียดสภาพในปริมาณน้อย โดยในงานวิจัยนี้ได้ทดลองชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

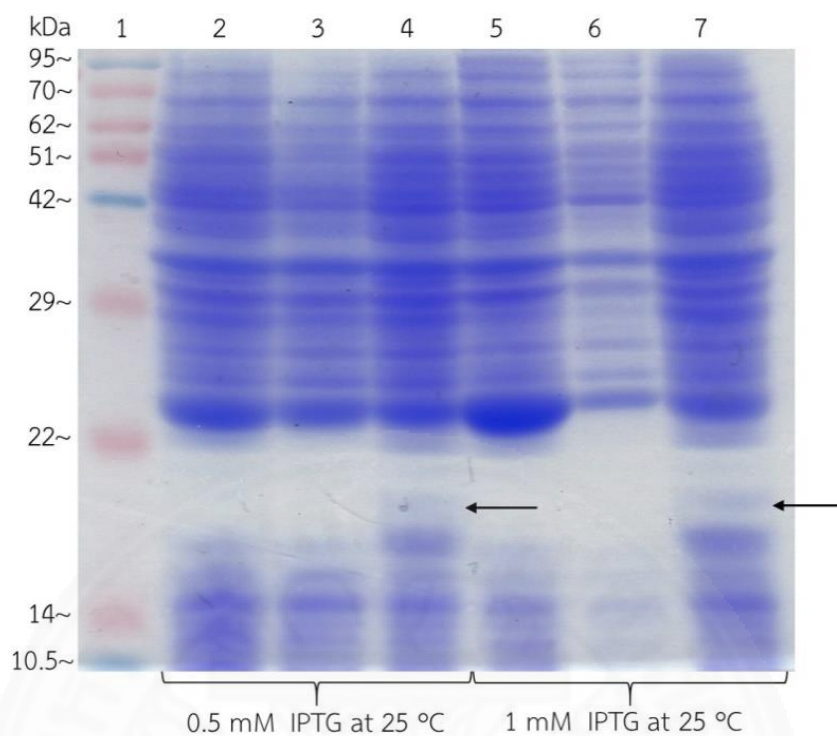
##### 4.4.1 การผลิตโปรตีน CpcB

ในการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ได้ทดลองโดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ เซลล์มีการผลิตโปรตีน CpcB ในปริมาณที่ต่ำมาก ทำให้ไม่พบแถบของโปรตีน CpcB ซึ่งมีขนาดประมาณ 19 กิโลดาลตัน ทั้งใน *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*), *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) และ *E. coli* Rosetta(DE3) ดังภาพที่ 4.5 ต่อมาเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการผลิตโปรตีน CpcB เป็น 25 องศาเซลเซียส พบแถบขนาดประมาณ 19 กิโลดาลตัน ทั้งที่ IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ใน Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) ขณะที่ใน *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) และ *E. coli* Rosetta(DE3) ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าว อย่างไรก็ตามโปรตีนที่ได้มีปริมาณน้อยมาก ดังภาพที่ 4.6 ต่อมาเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการผลิตโปรตีนเป็น 30 และ 37 องศาเซลเซียส IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ พบว่าปรากฏแถบโปรตีนซึ่งมีขนาดตรงกับมวลโมเลกุลของโปรตีน CpcB ปริมาณมากใน *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) ขณะที่ใน *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) และ *E. coli* Rosetta(DE3) ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าว ดังภาพที่ 4.7 ผู้วิจัยจึงได้เลือกสภาวะในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ มาตรวจสอบโปรตีน CpcB ที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble protein) โดยหลังทำให้เซลล์แตกแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว

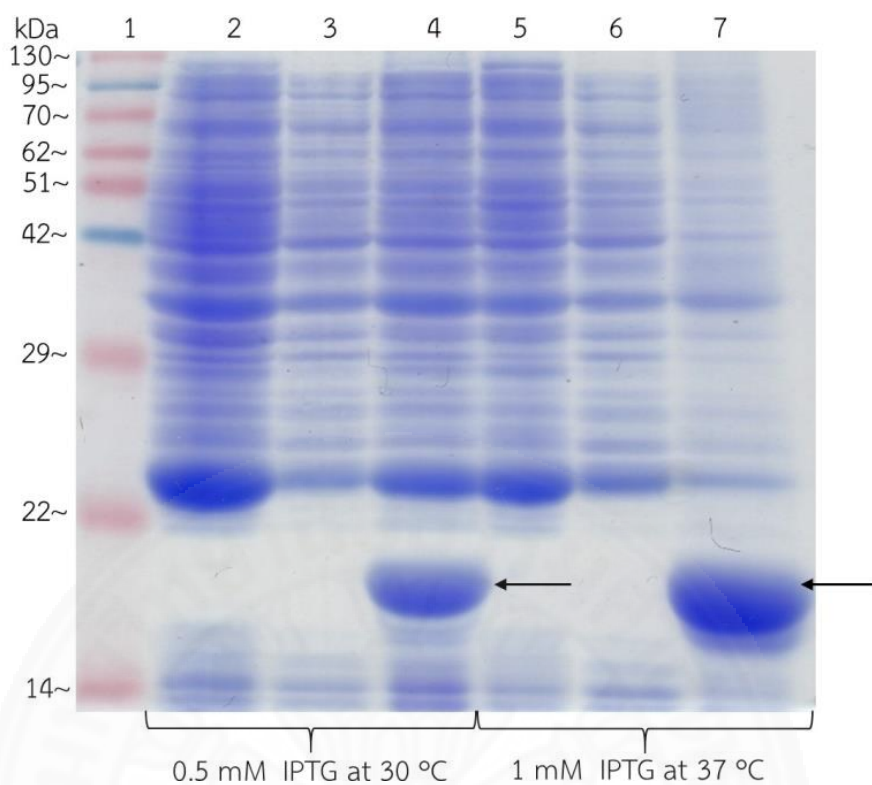
สูง โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้จะอยู่ในส่วนของสารละลาย ส่วนโปรตีนที่ถูกแยกออกมาอยู่ในส่วนของตะกอนเซลล์คาดว่าจะเป็โปรตีนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (insoluble protein) ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ มีโปรตีน CpcB บางส่วนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่ก็ยังพบโปรตีน CpcB ที่ละลายน้ำได้ในปริมาณมาก ในขณะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าโปรตีน CpcB ส่วนใหญ่ไม่สามารถละลายน้ำได้ และพบโปรตีน CpcB ที่ละลายน้ำได้ในปริมาณน้อยมาก ดังภาพที่ 4.8 ดังนั้นจึงได้เลือกสภาวะการผลิตโปรตีน CpcB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในการชักนำการผลิตโปรตีน CpcB ต่อไป



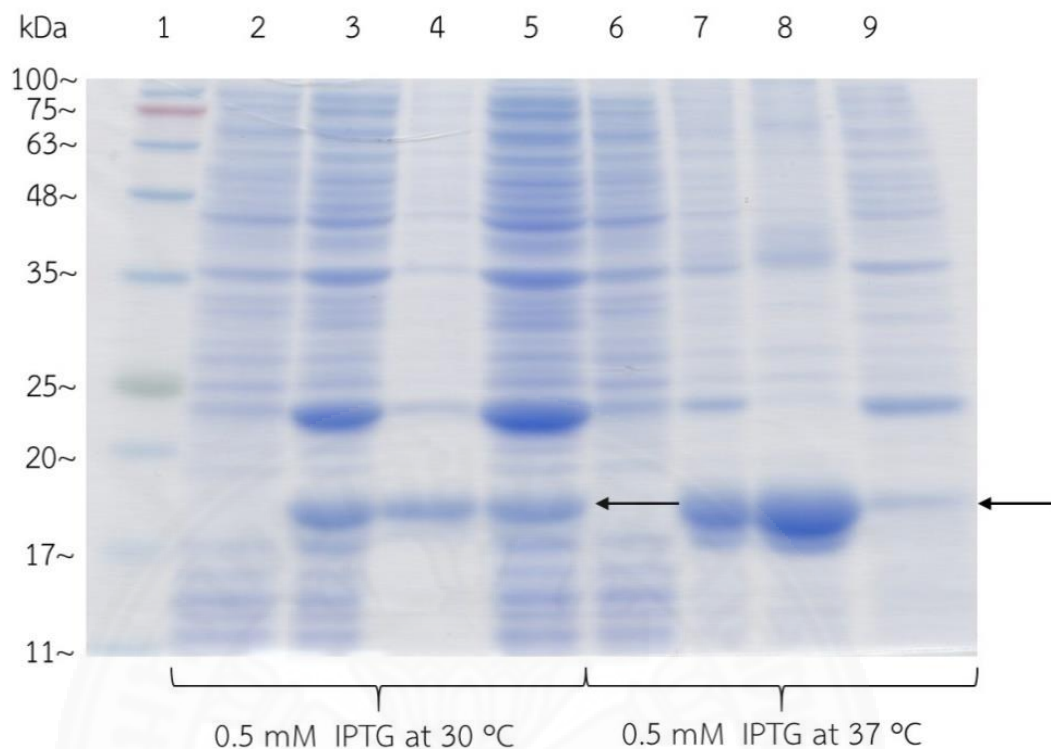
**ภาพที่ 4.5** การตรวจสอบการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหมายเลข 1 คือ Prestained protein ladder (vivantis, Malaysia) หมายเลข 2 และ 5 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) หมายเลข 3 และ 6 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) และหมายเลข 4 และ 7 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB)



**ภาพที่ 4.6** การตรวจสอบการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหมายเลข 1 คือ Prestained protein ladder (vivantis, Malaysia) หมายเลข 2 และ 5 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) หมายเลข 3 และ 6 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) และหมายเลข 4 และ 7 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) และลูกศรแสดงตำแหน่งที่คาดว่าจะจะเป็นโปรตีน CpcB



**ภาพที่ 4.7** การตรวจสอบการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหมายเลข 1 คือ Prestained protein ladder (vivantis, Malaysia) หมายเลข 2 และ 5 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) หมายเลข 3 และ 6 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) และหมายเลข 4 และ 7 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) และลูกศรแสดงตำแหน่งที่คาดว่าจะโปรตีน CpcB

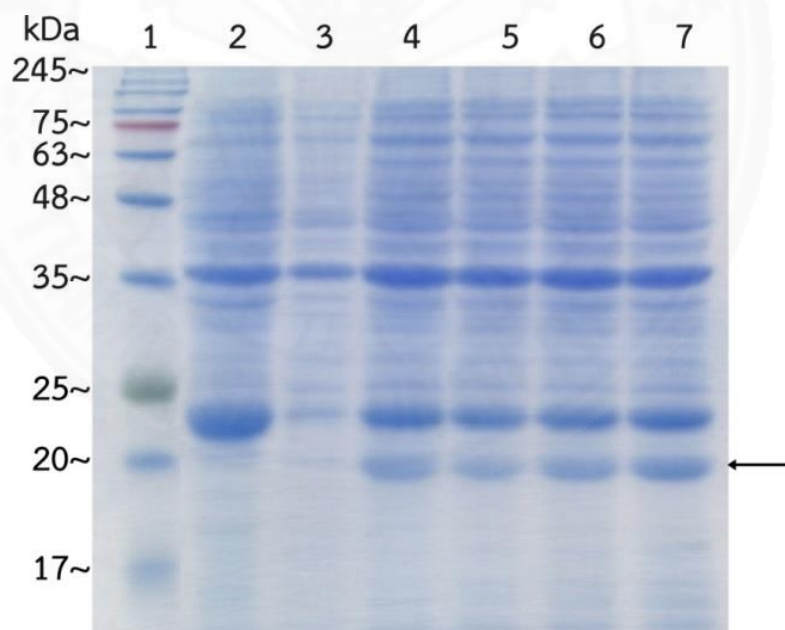


**ภาพที่ 4.8** การตรวจสอบปริมาณโปรตีน CpcB ในส่วนที่ละลายและไม่ละลายน้ำด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหมายเลข 1 คือ Blueye prestained protein ladder (Genedirex , Taiwan) หมายเลข 2 และ 6 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) ที่ไม่มีการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB หมายเลข 3 และ 7 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) ที่มีการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB หมายเลข 4 และ 8 คือ โปรตีนในส่วนตะกอนเซลล์หลังทำให้เซลล์แตก หมายเลข 5 และ 9 คือ โปรตีนในส่วนสารละลายหลังทำให้เซลล์แตก และลูกศรแสดงตำแหน่งที่คาดว่าจะโปรตีน CpcB

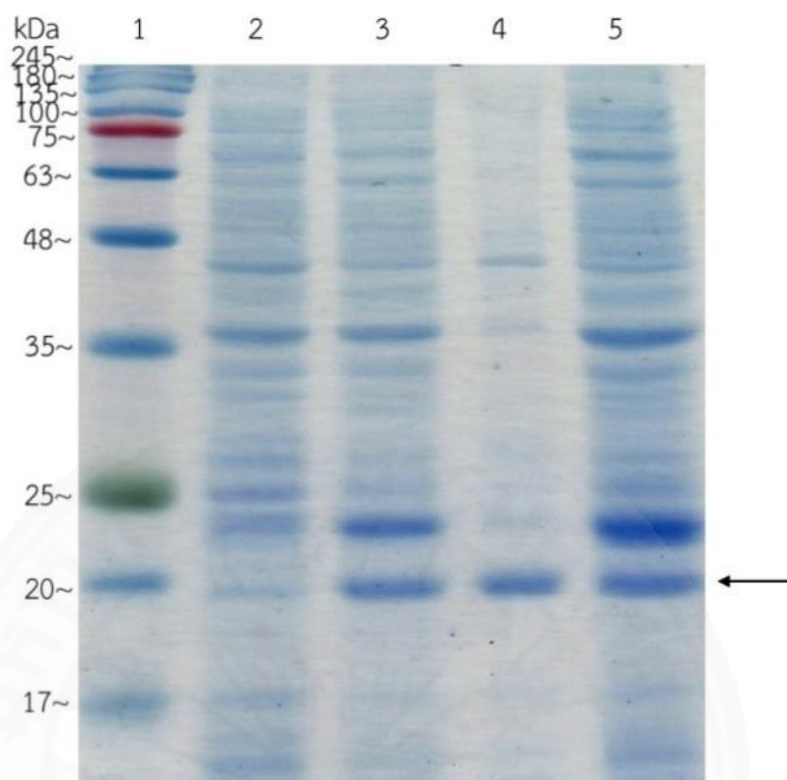


#### 4.4.2 การผลิตโปรตีน CpcA

เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้สภาวะดังกล่าวในการผลิตโปรตีน CpcA เช่นกัน โดยผลจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ภาพที่ 4.9 แสดงให้เห็นแถบโปรตีนขนาดใหญ่ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 20 กิโลดาลตัน ใน *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีน CpcA ที่ได้คำนวณไว้ ในขณะที่ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) และ *E. coli* Rosetta(DE3) ไม่มีแถบโปรตีนดังกล่าว เมื่อตรวจสอบโปรตีน CpcA ที่สามารถละลายน้ำได้ พบว่ามีโปรตีน CpcA ที่ละลายน้ำได้ในปริมาณมาก แต่ก็มีโปรตีน CpcA บางส่วนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้และถูกปั่นเหวี่ยงแยกออกมาอยู่ในส่วนของตะกอนเซลล์ ดังภาพที่ 4.10 ดังนั้นจึงได้เลือกสภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในการชักนำการผลิตโปรตีน CpcA ต่อไปเช่นเดียวกับการผลิตโปรตีน CpcB



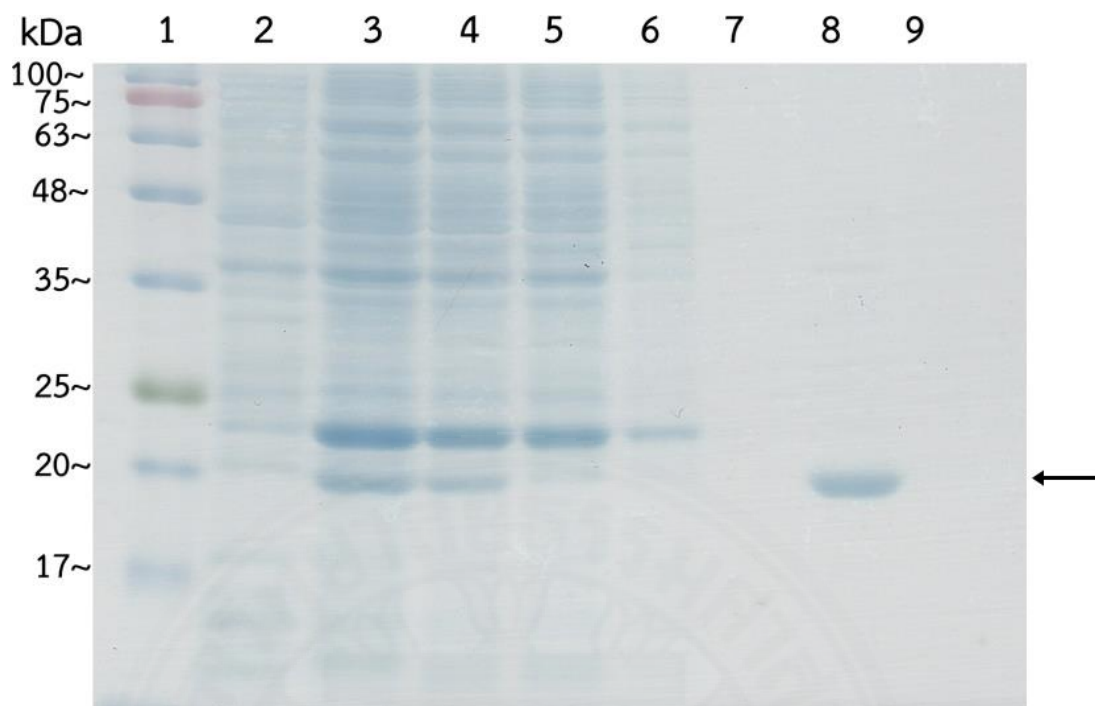
ภาพที่ 4.9 การตรวจสอบการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหมายเลข 1 คือ Blueye prestained protein ladder (Genedirex, Taiwan) หมายเลข 2 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) หมายเลข 3 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) และหมายเลข 4-7 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) และลูกศรแสดงตำแหน่งที่คาดว่าจะจะเป็นโปรตีน CpcA



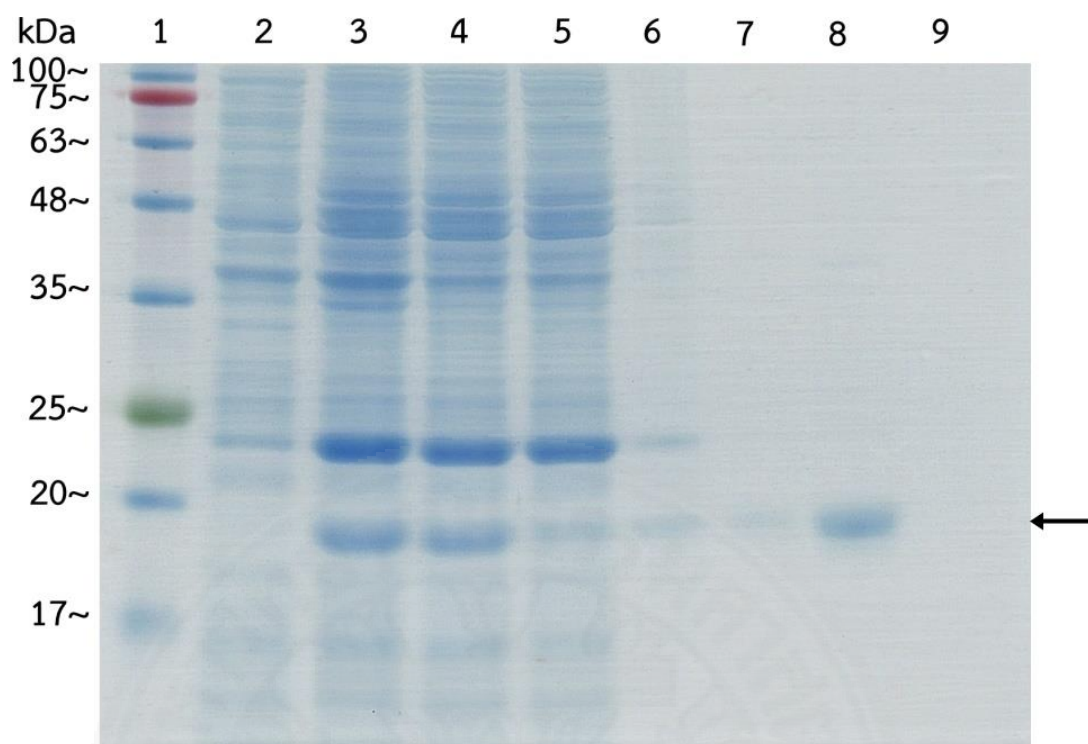
**ภาพที่ 4.10** การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA ในส่วนที่ละลายและไม่ละลายน้ำด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหมายเลข 1 คือ Blueye prestained protein ladder (Genedirex, Taiwan) หมายเลข 2 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) ที่ไม่มีการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA หมายเลข 3 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) ที่มีการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA หมายเลข 4 คือ โปรตีนในส่วนตะกอนเซลล์หลังทำให้เซลล์แตก หมายเลข 5 คือ โปรตีนในส่วนสารละลายหลังทำให้เซลล์แตก และลูกศรแสดงตำแหน่งที่คาดว่าจะโปรตีน CpcA

#### 4.5 การทำโปรตีน CpcA และ CpcB ให้บริสุทธิ์

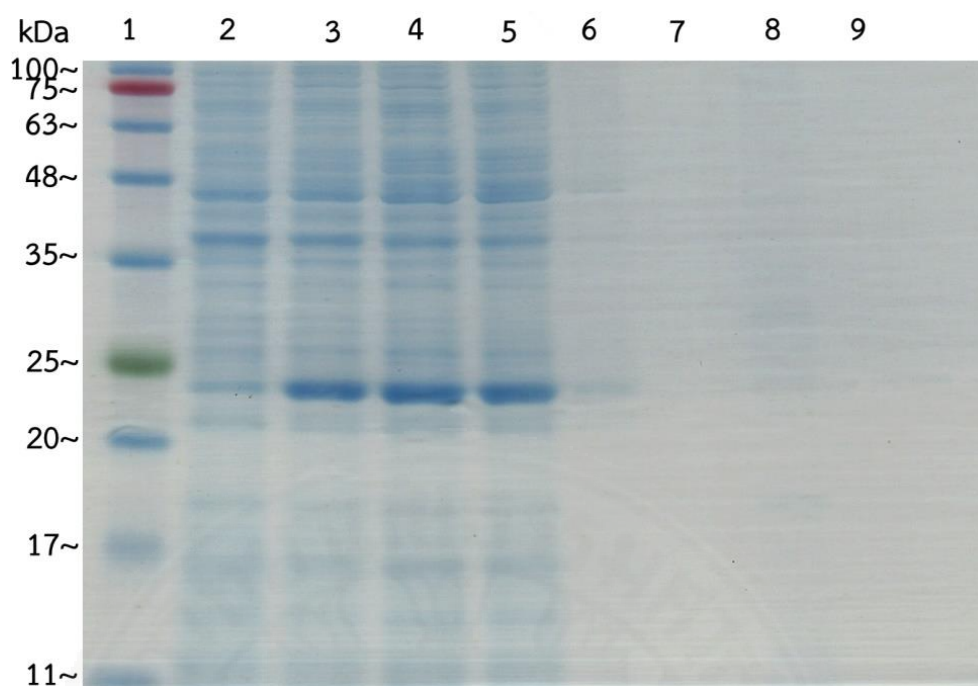
จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) ในอาหาร LB 200 มิลลิลิตร ชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PrepEase™ His-Tagged Proteins Purification Kits (Affymetrix USB, USA) ซึ่งเป็นคอลัมน์แบบ Ni<sup>2+</sup>-IDA โปรตีน CpcA และ CpcB ซึ่งมีแท็กฮิสทีดอินติดอยู่จะสามารถจับกับเม็ดบีตภายในคอลัมน์ได้ เซโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายอิมิดาโซลความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ครั้งละ 1.5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นตรวจสอบโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.11-4.12 พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA ที่ได้มีขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีน CpcA ที่คาดการณ์ไว้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี Lowry พบว่ามีโปรตีน CpcA ประมาณ 6.21 มิลลิกรัม ส่วนโปรตีน CpcB ที่ได้มีขนาดประมาณ 19 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีน CpcB ที่คาดการณ์ไว้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี Lowry พบว่ามีโปรตีน CpcB ประมาณ 6.61 มิลลิกรัม จากนั้นเมื่อนำโปรตีน CpcA และ CpcB ที่ได้มาทำไดอะไลซิสเพื่อเปลี่ยนบัฟเฟอร์ และนำอิมิดาโซลออกจากสารละลายโปรตีน พบว่ามีปริมาณโปรตีน CpcA และ CpcB เท่ากับ 6.01 และ 6.30 มิลลิกรัม ตามลำดับ ต่อไปจะนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA และ CpcB ที่ได้นี้มาทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยในการทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน CpcA และ CpcB จะมีการนำสารละลายในส่วนของการชะคอลัมน์ (eluted fraction) จาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ผ่านการชักนำด้วยสาร IPTG ผ่านคอลัมน์ Ni<sup>2+</sup>-IDA และผ่านการทำไดอะไลซิสเช่นเดียวกับโปรตีน CpcA และ CpcB มาเป็นตัวควบคุม (Control) ในการทดสอบ โดยผลการนำโปรตีนจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) มาผ่านคอลัมน์ Ni<sup>2+</sup>-IDA แสดงดังภาพที่ 4.13 ซึ่งพบแถบโปรตีนบาง ๆ ในส่วนสารละลายที่ชะคอลัมน์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี Lowry พบว่ามีโปรตีนที่ได้จากการชะคอลัมน์ประมาณ 1.33 มิลลิกรัม และหลังจากทำไดอะไลซิสพบว่ามีโปรตีนเหลืออยู่ประมาณ 1.16 มิลลิกรัม



ภาพที่ 4.11 การตรวจสอบการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยหมายเลข 1 คือ Blueye prestained protein ladder (Genedirex, Taiwan) หมายเลข 2 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) ที่ไม่มีการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA หมายเลข 3 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) ที่มีการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA หมายเลข 4 คือ โปรตีนในส่วนสารละลายหลังทำให้เซลล์แตก หมายเลข 5 คือ สารละลายในส่วนของการผ่านคอลัมน์ หมายเลข 6-7 คือ สารละลายในส่วนของการล้างคอลัมน์ครั้งที่ 1-2 ตามลำดับ หมายเลข 8-9 คือ สารละลายในส่วนของการชะคอลัมน์ครั้งที่ 1-2 ตามลำดับ และ ลูกศรแสดงตำแหน่งที่คาดว่าเป็นโปรตีน CpcA



ภาพที่ 4.12 การตรวจสอบการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยหมายเลข 1 คือ Blueeye prestained protein ladder (Genedirex, Taiwan) หมายเลข 2 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) ที่ไม่มีการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB หมายเลข 3 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) ที่มีการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB หมายเลข 4 คือ โปรตีนในส่วนสารละลายหลังทำให้เซลล์แตก หมายเลข 5 คือ สารละลายในส่วนของการผ่านคอลัมน์ หมายเลข 6-7 คือ สารละลายในส่วนของการล้างคอลัมน์ครั้งที่ 1-2 ตามลำดับ หมายเลข 8-9 คือ สารละลายในส่วนของการชะคอลัมน์ครั้งที่ 1-2 ตามลำดับ และลูกศรแสดงตำแหน่งที่คาดว่าเป็นโปรตีน CpcB



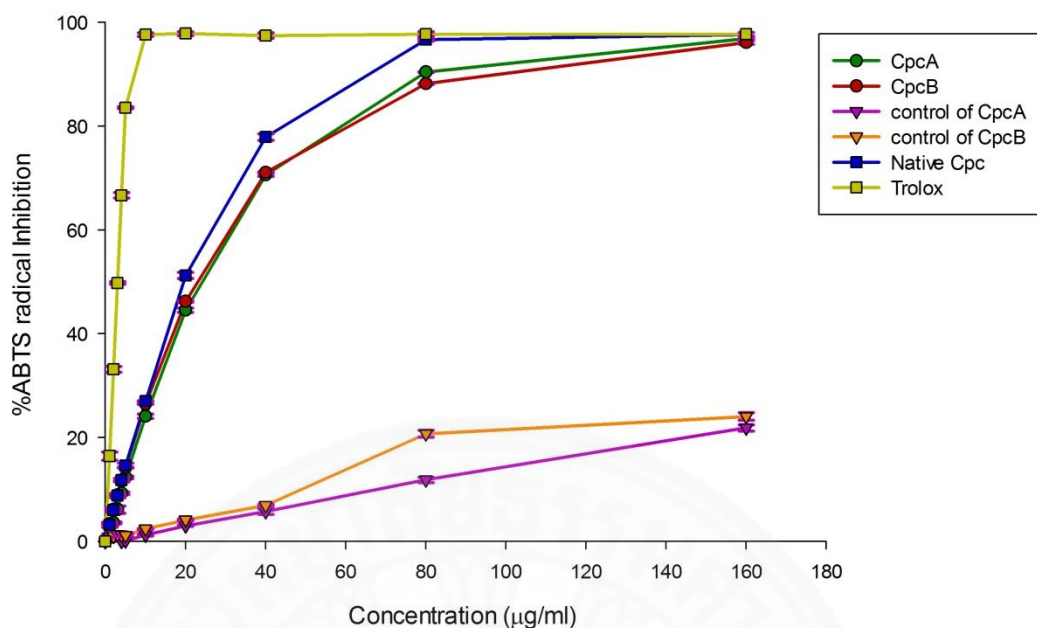
**ภาพที่ 4.13** การตรวจสอบสารละลายจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ผ่านคอลัมน์  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยหมายเลข 1 คือ Blueye prestained protein ladder (Genedirex, Taiwan) หมายเลข 2 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ไม่มีการชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีน หมายเลข 3 คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่มีการชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีน หมายเลข 4 คือ โปรตีนในส่วนสารละลายหลังทำให้เซลล์แตก หมายเลข 5 คือ สารละลายในส่วนของการผ่านคอลัมน์ หมายเลข 6-7 คือ สารละลายในส่วนของการล้างคอลัมน์ครั้งที่ 1-2 ตามลำดับ หมายเลข 8-9 คือ สารละลายในส่วนของการชะคอลัมน์ครั้งที่ 1-2 ตามลำดับ

#### 4.6 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน CpcA และ CpcB

ในการทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน CpcA และโปรตีน CpcB ได้ทดสอบโดยใช้ 4 วิธีการ

##### 4.6.1 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation decolorization assay)

การทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในระบบ SET (Single-Electron Transfer) โดยสารทดสอบที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ได้จะต้องสามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ABTS ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ทำตามวิธีของ Re et al. (1999) โดยเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS จากการทำปฏิกิริยาระหว่างโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต และสาร ABTS โดยในปฏิกิริยาที่มีการเติมสารตัวอย่างที่มีความสามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ABTS ได้จะทำให้สีเขียวของสารละลายจางลง วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สำหรับการศึกษสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีน CpcA และ CpcB ได้มีการนำสารละลายในส่วนของการชะคอลัมน์จาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ผ่านการชักนำด้วยสาร IPTG ผ่านคอลัมน์ Ni<sup>2+</sup>-IDA และผ่านการทำให้ไอโซสเตรนเดียวกับโปรตีน CpcA และ CpcB มาเป็นตัวควบคุมในการวิเคราะห์ผล เพื่อตรวจสอบว่าสารละลายจากเซลล์ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) หรือสารละลายจากการชะคอลัมน์ส่งผลต่อการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีน CpcA และ CpcB หรือไม่ ในการวิเคราะห์ผลได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างซึ่งผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.14 จากนั้นนำกราฟที่ได้มาคำนวณค่า IC<sub>50</sub> ด้วยโปรแกรม Sigma plot 12.0 พบว่าโปรตีน CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโทรลล็อก มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 22.35±0.19, 21.50±0.11, 18.65± 0.19 และ 2.80±0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโทรลล็อกสามารถต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีได้ดีที่สุด รองมาเป็นซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ, CpcB และ CpcA ตามลำดับ ส่วนสารละลายที่ใช้เป็นตัวควบคุมของโปรตีน CpcA และ CpcB ไม่สามารถคำนวณค่า IC<sub>50</sub> ได้ เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ค่อนข้างต่ำ



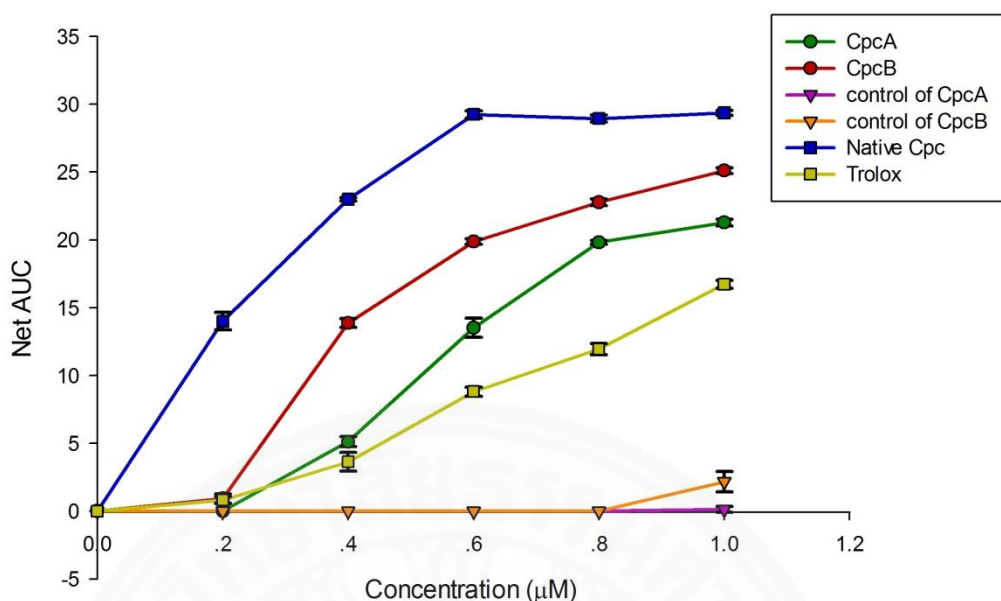
ภาพที่ 4.14 เปรียบเทียบการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีน CpcA และ CpcB ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโพลีเอทิลีนไกลคอล โดยตัวควบคุมของโปรตีน CpcA (control of CpcA) และตัวควบคุมของโปรตีน CpcB (control of CpcB) คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ผ่านการชักนำด้วยสาร IPTG ผ่านคอลัมน์  $Ni^{2+}$ -IDA และผ่านการทำให้ไอโซเลชันเช่นเดียวกับโปรตีน CpcA และ CpcB ตามลำดับ

#### 4.6.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี ด้วยวิธีโออาร์เอซี-ฟลูออเรสซิน (ORAC- Fluorescein Assay)

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีด้วยวิธีโออาร์เอซี-ฟลูออเรสซิน เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในระบบ HAT (Hydrogen-Atom Transfer) โดยสารที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีได้จะต้องสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีได้ทำตามวิธีของ Dávalos et al. (2004) ซึ่งใช้อนุมูลอิสระ AAPH เป็นแบบจำลองในการทดสอบ โดยเมื่อเติมสารละลาย AAPH เข้ากับสารฟลูออเรสซิน อนุมูลอิสระ AAPH จะทำให้การเรืองแสงของสารฟลูออเรสซินลดลง ในปฏิกิริยาที่มีการเติมสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ AAPH ได้จะช่วยบรรเทาการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์ สามารถตรวจวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร และวัดค่าการเรืองแสงของสารฟลูออเรสซินที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วนำ



ผลที่ได้มาคำนวณค่า net AUC สำหรับการศึกษาศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB ได้มีการนำสารละลายในส่วนของการชะคอลัมน์จาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ผ่านการชักนำด้วยสาร IPTG ผ่านคอลัมน์  $Ni^{2+}$ -IDA และผ่านการทำไดอะไลซิส เช่นเดียวกับโปรตีน CpcA และ CpcB มาเป็นตัวควบคุมในการวิเคราะห์ผลด้วย จากนั้นใช้โปรแกรม Sigma plot 12.0 สร้างกราฟระหว่างค่า net AUC กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง กราฟที่ได้แสดง ดังภาพที่ 4.15 ซึ่งพบว่าโปรตีน CpcA และ CpcB สามารถต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีได้ดีกว่า โทรลือก แต่ยังมีน้อยกว่าซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ จากนั้นนำกราฟที่ได้มากำหนดจุดสร้าง cruce fit ด้วยสมการเส้นตรง (linear regression) เพื่อหาค่าความชันของกราฟ โดยจะคำนวณค่าความชัน จากจุดที่ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเท่ากับ 0-0.6 ไมโครโมลาร์ เนื่องจากเมื่อซี-ไฟโคไซยานินจาก ธรรมชาติมีความเข้มข้นมากกว่า 0.6 ไมโครโมลาร์ เริ่มมีค่า net AUC ที่ค่อนข้างคงที่ จึงไม่เหมาะใน การนำมาหาค่าความชันของกราฟ อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีน CpcA และ CpcB ที่ความเข้มข้น 0-0.2 ไมโครโมลาร์ มีค่า net AUC เพิ่มขึ้นช้ากว่าปกติ จึงอาจทำให้ค่าความชันที่คำนวณได้มีความ คลาดเคลื่อนไปบ้าง จากการหาค่าความชันของกราฟพบว่า CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจาก ธรรมชาติ และโทรลือก มีค่าความชันเท่ากับ 22.83, 36.29, 48.37 และ 14.62 จากนั้นคำนวณค่า สมมูลกับสารมาตรฐานโทรลือก โดยนำค่าความชันของสารตัวอย่างมาหารด้วยค่าความชันของ โทรลือก พบว่าค่าสมมูลกับสารมาตรฐานโทรลือกของ CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโทรลือก เท่ากับ  $1.56 \pm 0.08$ ,  $2.48 \pm 0.02$ ,  $3.31 \pm 0.04$  และ 1.00 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แสดง ให้เห็นว่าซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติสามารถต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีได้ดีที่สุด รองมาเป็น CpcB, CpcA และโทรลือก ตามลำดับ ส่วนสารละลายที่ใช้เป็นตัวควบคุมของโปรตีน CpcA และ CpcB ไม่สามารถคำนวณค่าสมมูลกับสารมาตรฐานโทรลือกได้ เนื่องจากมีค่าความชันของกราฟ ในช่วงความเข้มข้น 0-0.6 ไมโครโมลาร์เท่ากับ 0

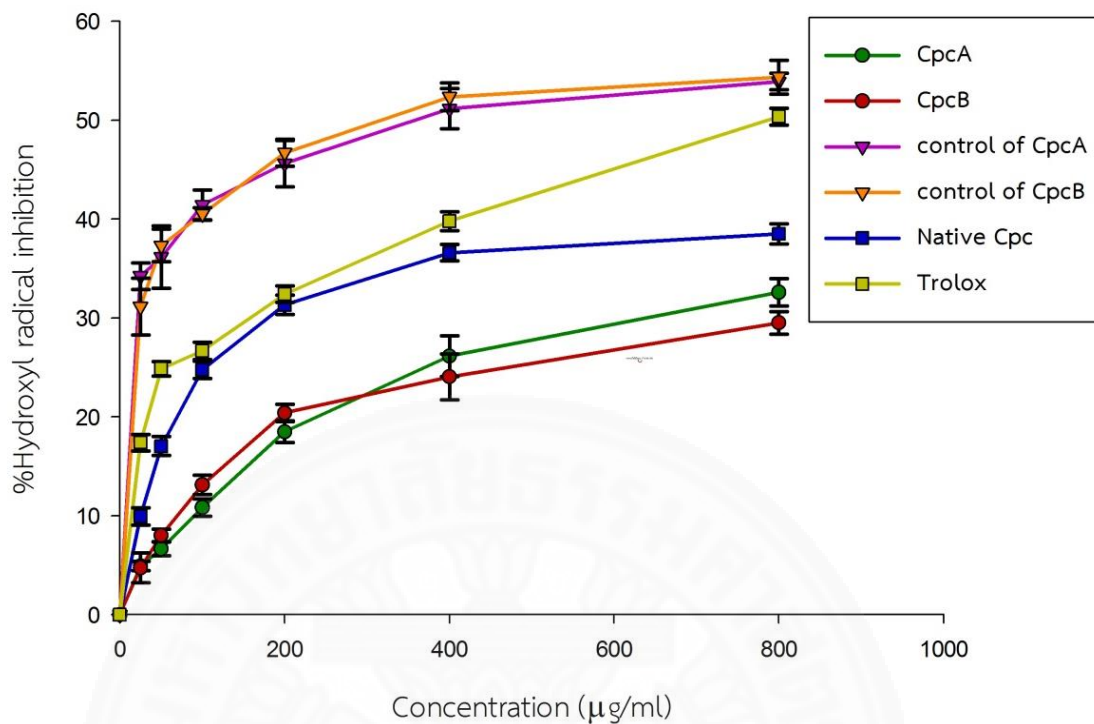


ภาพที่ 4.15 การยับยั้งอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโพลีเอทิลีน ไนโอลีน โดยตัวควบคุมของโปรตีน CpcA (control of CpcA) และตัวควบคุมของโปรตีน CpcB (control of CpcB) คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ผ่านการชักนำด้วยสาร IPTG ผ่านคอลัมน์  $Ni^{2+}$ -IDA และผ่านการทำให้ไดอะไลซิสเช่นเดียวกับโปรตีน CpcA และ CpcB ตามลำดับ

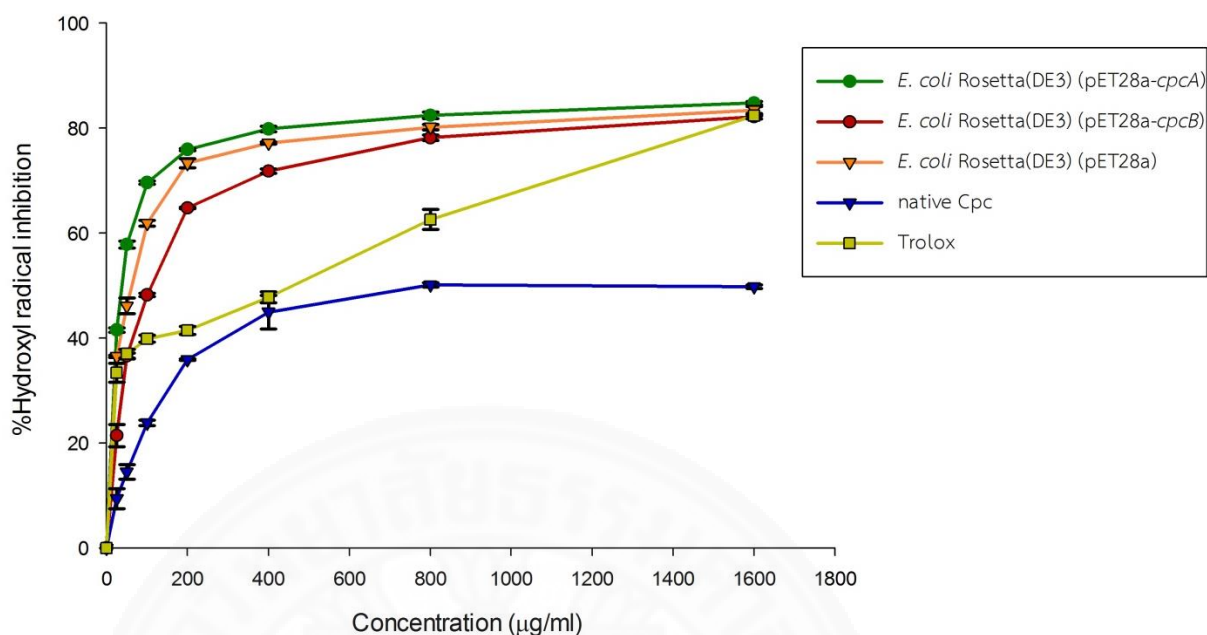
#### 4.6.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซี ด้วยวิธีดีออกซีไรโบส (Deoxyribose Assay)

อนุมูลอิสระไฮดรอกซีเป็นอนุมูลอิสระที่พบได้มากในสิ่งมีชีวิต และมีความว่องไวในการจับอนุมูลอิสระชีวโมเลกุลสูง สารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีได้จึงมีความสำคัญในทางเภสัชกรรม โดยในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีจะทำตามวิธีของ Halliwell et al. (1987) ซึ่งจะสังเคราะห์อนุมูลอิสระไฮดรอกซีจากการทำปฏิกิริยาของเฟอร์ริกคลอไรด์ กรดแอสคอร์บิก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นน้ำตาลดีออกซีไรโบสจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระไฮดรอกซี เมื่อเติมกรดไทโอบาร์บิทูริกร่วมกับกรดไตรคลอโรอะซิติกและให้ความร้อนจะเกิดสารประกอบสีชมพู สำหรับปฏิกิริยาที่มีการเติมสารตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีได้ลงไป จะส่งผลให้เกิดสีชมพูในปฏิกิริยาลดลง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซี สำหรับการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูล

อิสระไฮดรอกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB ได้มีการนำสารละลายในส่วนของการชะคอลัมน์จาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ผ่านการชักนำด้วยสาร IPTG ผ่านคอลัมน์ Ni<sup>2+</sup>-IDA และผ่านการทำไดอะไลซิสเช่นเดียวกับโปรตีน CpcA และ CpcB มาเป็นตัวควบคุมในการวิเคราะห์ผลด้วย ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.16 ซึ่งพบว่าโปรตีน CpcA และ CpcB มีสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซี แต่ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีที่ได้ยังน้อยกว่าโทรล็อกและซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ อย่างไรก็ตามพบว่ากราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของตัวควบคุมของโปรตีน CpcA และ CpcB มีค่าสูงกว่ากราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB ทำให้ไม่สามารถสรุปผลการทดลองของโปรตีน CpcA และ CpcB ในวิธีการนี้ได้ ต่อมาจึงได้ทดลองใช้สารละลายสกัดหยาบ (crude extraction) จาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) มาทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีแทนโปรตีน CpcA และ CpcB และใช้สารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) มาเป็นตัวควบคุม ซึ่งเตรียมตัวอย่างตามวิธีการวิจัยข้อ 3.9 โดยสารละลายสกัดหยาบจะละลายอยู่ในน้ำปราศจากไอออน และเตรียมสารตัวอย่างซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโทรล็อก ในน้ำปราศจากไอออนเช่นกัน กราฟที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.17 พบว่าสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) มีสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีมากกว่าโทรล็อก และซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ เป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามพบว่าสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีที่สูงกว่าสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) ทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถสรุปผลการทดลองของสารละลาย CpcA และ CpcB สกัดหยาบในวิธีการนี้ได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าผลที่ได้จากการทดสอบการยับยั้งการอนุมูลอิสระไฮดรอกซีทั้งจากภาพที่ 4.16 และ 4.17 ทุกตัวอย่างมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กราฟที่ได้ไม่เหมาะสมในการนำมาคำนวณค่า IC<sub>50</sub>



ภาพที่ 4.16 การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโทรล็อก โดยตัวควบคุมของโปรตีน CpcA (control of CpcA) และตัวควบคุมของโปรตีน CpcB (control of CpcB) คือ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ที่ผ่านการชักนำด้วยสาร IPTG ผ่านคอลัมน์ Ni<sup>2+</sup>-IDA และผ่านการทำให้ไดอะไลซิสเช่นเดียวกับโปรตีน CpcA และ CpcB ตามลำดับ

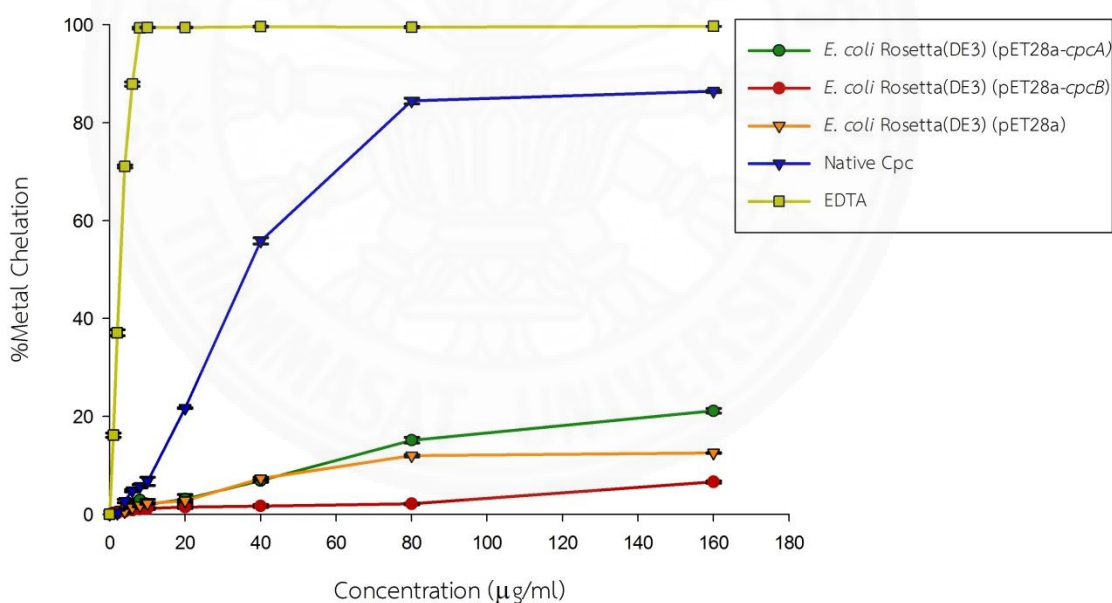


ภาพที่ 4.17 การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของสารละลายสกัดยับยั้งจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA), *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโทรล็อก

#### 4.6.4 การทดสอบความสามารถในการกำจัดกับโลหะ (Metal chelating activity assay)

เฟอร์รัสเป็นโลหะที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซี เนื่องจากเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาเฟนตอน สารที่สามารถจับกับโลหะเฟอร์รัสได้จึงมีความสำคัญในทางเภสัชกรรม โดยในการทดสอบได้ทำตามวิธีของ Wong et al. (2014) ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างเฟอร์รัสกับเฟอร์โรซีนได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีม่วง สำหรับปฏิกิริยาที่มีการเติมสารที่สามารถจับกับโลหะได้ลงไปจะส่งผลให้เกิดสีม่วงในปฏิกิริยาลดลง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะเฟอร์รัส ซึ่งพบว่าโปรตีน CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และ EDTA ซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ไม่สามารถวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธีการนี้ได้ เนื่องจากเมื่อผสมบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตร่วมกับเฟอร์รัสซัลเฟต ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วเมื่อเติมเฟอร์โรซีนสารละลายผสมไม่เกิดสีม่วง จึงไม่สามารถทดสอบสารตัวอย่างที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น

50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ได้ ต่อมาจึงได้ทดลองโดยใช้สารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcA*) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) มาทดสอบการกำจัดโลหะแทนโปรตีน CpcA และ CpcB และใช้สารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) มาเป็นตัวควบคุม ซึ่งเตรียมตัวอย่างตามวิธีการวิจัยข้อ 3.9 โดยสารละลายสกัดหยาบจะละลายอยู่ในน้ำปราศจากไอออน และเตรียมสารตัวอย่างซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และ EDTA ในน้ำปราศจากไอออนเช่นกัน กราฟที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.18 พบว่าสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcA*) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) มีค่าการกำจัดโลหะที่ต่ำกว่าซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และ EDTA เป็นอย่างมาก อีกทั้งพบว่าสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) มีค่าการกำจัดกับโลหะที่สูงกว่าละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) ทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถสรุปผลการทดลองของสารละลาย CpcA และ CpcB สกัดหยาบในวิธีการนี้ได้เช่นกัน



ภาพที่ 4.18 การกำจัดโลหะเฟอรัสของสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcA*), *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และ EDTA

## บทที่ 5

### อภิปรายผล

ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินส่วนใหญ่เป็นการศึกษาจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิต่ำปานกลาง แต่การศึกษาซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงยังมีไม่มากนัก มีการศึกษาพบว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิต่ำปานกลางมีสมบัติที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้หลายชนิด เช่น อนุมูลอิสระเปอร์ออกซี อนุมูลอิสระไฮดรอกซี อนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS เป็นต้น (Patel et al., 2006; Deshmukh et al., 2014; Antonio-Marcos et al., 2015) และมีการศึกษาที่พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงผลิตซี-ไฟโคไซยานินที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงด้วย (Leu et al., 2013) งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาและทำโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (CpcA) และเบตา (CpcB) จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนให้บริสุทธิ์ และนำโปรตีนที่ได้มาทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

จากโครงการปัญหาพิเศษของ สีชล (2556) ได้โคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcA* และ *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 และพบว่ายีน *cpcA* และ *cpcB* นี้มีกรดอะมิโนที่สำคัญหลายตำแหน่งซึ่ง Adir et al. (2001) ได้รายงานว่าการดัดแปลงกรดอะมิโนเหล่านี้อาจเกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิสูง อาทิเช่น กรดอะมิโนแอสพาทเตสตำแหน่งที่ 28 กรดอะมิโนไลซีนตำแหน่งที่ 32 กรดอะมิโนเซอรีนตำแหน่งที่ 72 ของโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา และกรดอะมิโนกลูตามีนตำแหน่งที่ 68 ของโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา เป็นต้น โดยกรดอะมิโนเหล่านี้มีการอนุรักษ์ไว้ในไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูง เช่น *T. elongatus* BP-1 และ *S. vulcanus* เป็นต้น แต่ไม่พบในไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิต่ำปานกลาง เช่น *Tolypothrix* sp. PCC 7601 และ *A. platensis* เป็นต้น ด้วยเหตุนี้กรดอะมิโนดังกล่าวอาจส่งผลให้ซี-ไฟโคไซยานินจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 สามารถคงสภาพและทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยต่อมาคัททิตยา (2558) ได้ศึกษาและเปรียบเทียบสมบัติการทนอุณหภูมิสูงของซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 และจาก *S. cedrorum* TISTR 8589 ซึ่งรายงานว่ซี-ไฟโคไซยานินจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีเสถียรภาพสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 5 และเมื่อต้มซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 50 และ

60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าซี-ไฟโคไซยานินมีความเข้มข้นคงเหลือเท่ากับ 97.45 และ 90.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. cedrorum* TISTR 8589 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิตั้งแต่ 10 ถึง 30 องศาเซลเซียส ซี-ไฟโคไซยานินมีเสถียรภาพสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7 และเมื่อบ่มซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าซี-ไฟโคไซยานินมีความเข้มข้นคงเหลือเท่ากับ 74.54 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถหาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นได้ ตามลำดับ อีกทั้งซี-ไฟโคไซยานินจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ยังสามารถคงเสถียรภาพได้ดีกว่าซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. cedrorum* TISTR 8589 ในทุกค่าพีเอชและทุกอุณหภูมิที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่าซี-ไฟโคไซยานินจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. cedrorum* TISTR 8589 ดังนั้นซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาที่มีกระบวนการให้ความร้อนเข้าเกี่ยวข้องได้ในอนาคต

ในส่วนของการออกแบบโปรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcA* และ *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 และการโคลนยีน *cpcA* และ *cpcB* เข้าสู่พลาสมิด pET28a ผู้วิจัยได้ออกแบบโปรเมอร์โดยอ้างอิงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากงานวิจัยโครงการปัญหาพิเศษของ สิชล (2556) และได้มีการเพิ่มจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้าที่ปลาย 5' และ 3' ของโปรเมอร์เพื่อใช้ในการตัดและโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด pET28a โดยในตอนแรกผู้วิจัยมีความต้องการโคลนยีนให้ติดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแท็กฮิสทีดินที่ปลาย 3' ของยีนเพียงอย่างเดียว ซึ่งต้องโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด pET28a ในตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ *NcoI* และ *XhoI* แต่เนื่องจากยีน *cpcA* มีจุดตัดเอนไซม์ *NcoI* ภายในยีน จึงส่งผลให้จำเป็นต้องโคลนยีน *cpcA* เข้าสู่พลาสมิด pET28a ในตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ *NdeI* และ *XhoI* แทน ทำให้ยีน *cpcA* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของแท็กฮิสทีดินทั้งปลาย 3' และ 5' ของยีน ซึ่งเมื่อผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA ก็จะทำให้โปรตีน CpcA มีแท็กฮิสทีดินติดอยู่ทั้งที่ปลาย N-terminus และ C-terminus ส่วนยีน *cpcB* ได้โคลนเข้าสู่พลาสมิด pET28a ในตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ *NcoI* และ *XhoI* และเมื่อผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcB ก็จะมีแท็กฮิสทีดินติดอยู่ที่ปลาย C-terminus ของโปรตีนเพียงด้านเดียว มีการรายงานว่แท็กฮิสทีดินเป็นแท็กที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ และสามารถติดได้ทั้งที่ปลาย N-terminus และ C-terminus แต่ในกรณีที่โปรตีนมีลำดับกรดอะมิโนซึ่งทำหน้าที่ส่งสัญญาณเพื่อหลังโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์การติดแท็กที่ปลาย N-terminus อาจส่งผลให้



การทำงานของลำดับกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (Terpe, 2003) ต่อมาผู้วิจัยได้เชื่อมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเข้าสู่พลาสมิด pET28a ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-*cpcA* และ pET28a-*cpcB* โดยพลาสมิด pET28a เป็นพลาสมิดหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับผลิตโปรตีนซึ่งออกแบบโดยบริษัท Novagen พลาสมิด pET28a จะมีจุดเด่นที่ต่างจากพลาสมิดสำหรับผลิตโปรตีนชนิดอื่น คือ พลาสมิด pET28a มีทั้งแท็กฮิสทิดินแบบ N-terminus และ C-terminus ให้เลือกใช้ และในกรณีที่แท็กไปรบกวนการม้วนพับของโปรตีนหรือรบกวนกิจกรรมของโปรตีนสามารถตัดแท็กฮิสทิดินแบบ C-terminus ออกจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ด้วยเอนไซม์ทรอมบิน และมีโปรโมเตอร์ T7 ซึ่งสามารถแสดงออกยีนในระดับทรานสคริปชันได้ในปริมาณมาก โดยสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วยสาร IPTG จากนั้นผู้วิจัยได้ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-*cpcA* และ pET28a-*cpcB* เข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  เพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย *E. coli* DH5 $\alpha$  เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้ในการเพิ่มปริมาณพลาสมิดเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพราะ *E. coli* DH5 $\alpha$  มีการดัดแปลงให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่สำคัญ เช่น *hsdR*, *recA1* และ *endA1* เป็นต้น โดยยีน *hsdR* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนย่อยดีเอ็นเอแปลกปลอมที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิล (unmethylation) ยีน *recA1* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำให้เกิดการรวมตัวใหม่ของดีเอ็นเอ (recombination) และยีน *endA1* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส I (endonuclease I) ซึ่งการกลายพันธุ์ที่ยีนเหล่านี้จะช่วยเพิ่มอัตราการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ ทำให้ได้พลาสมิดที่มีคุณภาพดีและมีปริมาณมาก นอกจากนี้ *E. coli* DH5 $\alpha$  ยังมีการตัดต่อยีนให้มีจีโนไทป์ lacZ $\Delta$ M15 เพื่อช่วยในการคัดเลือกโคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยระบบแอลฟาคอมพลีเมนต์ (α-complementation) (Casali, 2003) ต่อมาผู้วิจัยได้ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และพบว่ามียีน *cpcA* หรือ *cpcB* แทรกอยู่ในพลาสมิด pET28a ในตำแหน่งที่ถูกต้อง จากนั้นจึงทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-*cpcA* และ pET28a-*cpcB* เข้าสู่ *E. coli* Rosetta(DE3) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA และ CpcB โดยปัจจุบันมีเซลล์เจ้าบ้านหลายชนิดที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เช่น *E. coli* BL21(DE3) และ *E. coli* Rosetta(DE3) เป็นต้น โดยเซลล์เจ้าบ้านเหล่านี้จะถูกดัดแปลงจีโนมเพื่อให้เอื้อต่อการสังเคราะห์โปรตีนในระบบ *E. coli* เช่น มีการดัดแปลงให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เอนไซม์ lon protease และ outer membrane protease ทำให้โปรตีนที่ผลิตได้มีอัตราการถูกย่อยน้อยลง โดย *E. coli* Rosetta(DE3) จะแตกต่างจากเซลล์เจ้า

บ้านสำหรับผลิตโปรตีนชนิดอื่น ๆ คือ *E. coli* Rosetta(DE3) มีการเพิ่มพลาสมิด pRare เข้าภายใน เซลล์ พลาสมิด pRare ออกแบบให้มีการสังเคราะห์ tRNA ซึ่งมีแอนติโคดอนที่จำเพาะกับโคดอนที่พบ ได้น้อยใน *E. coli* (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC และ GGA) ส่งผลให้ยีนที่มีโคดอนดังกล่าวมี ประสิทธิภาพการแสดงออกดีขึ้น ดังนั้น *E. coli* Rosetta(DE3) จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำ ยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นมาสังเคราะห์โปรตีนใน *E. coli* (Novy et al., 2001)

ปัจจุบันการผลิตโปรตีนในระบบ *E. coli* เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจาก สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก รวดเร็ว และสามารถออกแบบการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้ด้วย วิธีที่ไม่ซับซ้อน ซึ่งเหมาะนำมาพัฒนาใช้ในการผลิตโปรตีนระดับขนาดใหญ่ได้ อย่างไรก็ตามการผลิต โปรตีนในระบบ *E. coli* ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตได้ใน *E. coli* อาจเกิดการจับตัว รวมกลุ่ม (aggregation) เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำได้หากใช้สภาวะในการผลิตที่ไม่เหมาะสม มีการ รายงานว่าการใช้ความเข้มข้นของ IPTG และอุณหภูมิต่ำในการชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีนจะช่วยลด การจับตัวรวมกลุ่มของโปรตีนได้ (Rosano et al., 2014) โดยในการทดลองนี้ได้ทดลองปรับสภาวะ การชักนำการแสดงออกโปรตีนในหลายสภาวะ ซึ่งพบว่าการใช้อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีปริมาณน้อยมาก เมื่อปรับ อุณหภูมิเป็น 30 และ 37 องศาเซลเซียส IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เซลล์มีการผลิต รีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รีคอมบิแนนท์ โปรตีนส่วนใหญ่ถูกปั่นเหวี่ยงไปรวมอยู่กับส่วนตะกอนเซลล์ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถละลาย น้ำได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้สภาวะที่ IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป เนื่องจากมีรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ใน ปริมาณมาก และเพียงพอในการนำมาใช้งานต่อไปได้

ในการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA และ CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี ที่ผ่านมามีหลายงานวิจัยได้ให้ ความสำคัญในการสกัดและการทำซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ โดยมีการปรับปรุง และพัฒนากระบวนการในหลายวิธี ซึ่งให้คุณภาพและปริมาณของซี-ไฟโคไซยานินที่แตกต่างกัน เช่น การทำไดอะไลซิส (dialysis), การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium per sulphate precipitation), การใช้โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) และการใช้โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน (gel filtration chromatography) เป็นต้น (Yan et al.,

2011; Kumar et al., 2014; Patel et al., 2005; Sørensen et al., 2013; Minkova et al., 2003) หรืออาจใช้หลายวิธีร่วมกัน ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายสูงขึ้นตามไปด้วย อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ได้ติดแท็กฮิสทีดินที่โปรตีน CpcA และ CpcB ซึ่งสามารถทำโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนเดียวด้วยการใช้นิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี วิธีการนี้ช่วยลดกระบวนการและระยะเวลาในการทำซี-ไฟโคไซยานินให้บริสุทธิ์ได้เป็นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำให้บริสุทธิ์โดยทั่วไป อีกทั้งแท็กฮิสทีดินมีขนาดเล็กจึงไม่น่าส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีนมากนัก (Bornhorst et al., 2000) หลังจากขั้นตอนการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์โปรตีนจะอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมีอิมิดาโซลเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากอิมิดาโซลเป็นสารที่สามารถจับกับโลหะได้จึงอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีนมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงได้มีการเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อนำอิมิดาโซลออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิสโดยใช้ Maxi Pur-A-Lyzer (Sigma-Aldrich, USA) ซึ่งรูพรุนมีขนาดมอลโมเลกุล Cut off ประมาณ 6 กิโลดาลตัน โดยอิมิดาโซลมีขนาดมอลโมเลกุลประมาณ 68 ดาลตัน ดังนั้นอิมิดาโซลจึงสามารถเกิดการแพร่ผ่านหลอดไดอะไลซิสได้ ส่วนโปรตีน CpcA และ CpcB ซึ่งมีมอลโมเลกุลขนาดประมาณ 20.6 และ 19.3 กิโลดาลตัน จึงไม่สามารถแพร่ผ่านหลอดไดอะไลซิสได้ อย่างไรก็ตามขนาด Cut off ของหลอดไดอะไลซิสมาจากการเฉลี่ยขนาดรูพรุนของทั้งหลอด จึงอาจมีบางรูพรุนที่มีขนาดใหญ่กว่า 6 กิโลดาลตันได้ ซึ่งอาจส่งผลให้โปรตีนบางส่วนแพร่ออกไปนอกหลอดไดอะไลซิสได้ ทำให้ปริมาณของโปรตีน CpcA และ CpcB อาจลดลงเล็กน้อย

ในการทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA และ CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ผู้วิจัยได้สนใจสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของซี-ไฟโคไซยานิน เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด มีการศึกษาพบว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียมีสมบัติที่ช่วยลดสภาวะออกซิเดชันเกินสมดุล (oxidative stress) (Rimbau et al., 2001; Lobo et al., 2010; Bertolin et al., 2011) และต้านอนุมูลอิสระได้หลายชนิด เช่น อนุมูลอิสระเปอร์ออกซี อนุมูลอิสระไฮดรอกซี อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS เป็นต้น (Patel et al., 2006 Kamble et al., 2013, Deshmukh et al., 2014; Thangam et al., 2013; Antonio-Marcos et al., 2015) โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 4 วิธีการ คือ 1. การทดสอบการ

ต้านอนุมูลอิสระ ABTS 2. การทดสอบอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี 3. การทดสอบอนุมูลอิสระไฮดรอกซี และ 4. การทดสอบการจับกับโลหะเฟอร์รัส

สำหรับการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เป็นหนึ่งในวิธีที่สามารถตรวจสอบการต้านอนุมูลอิสระในกลไกแบบ SET ได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะมีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยวให้กับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระเกิดความเสถียรของอิเล็กตรอน จากผลการทดลองพบว่าโปรตีน CpcA และ CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ค่อนข้างดี ซึ่งมีค่าต่ำกว่าซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติไม่มากนัก แต่ต่ำกว่าโทรลล็อกที่เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีเป็นอย่างมาก โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับวิตามินของ Suphap (2009) ซึ่งพบว่าโปรตีน CpcA และ CpcB จาก *Anabaena siamensis* TISTR8012 มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ค่อนข้างดี แต่มีค่าน้อยกว่าโทรลล็อกเป็นอย่างมาก สำหรับการทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีด้วยวิธีโออาร์เอซี-ฟลูออเรสซิน ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบการต้านอนุมูลอิสระในกลไกแบบ HAT ได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะมีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของไฮโดรเจนให้กับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระเกิดความเสถียรของอิเล็กตรอน ผลการทดลองที่ได้พบว่าโปรตีน CpcA และ CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 สามารถต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีได้ดีกว่าโทรลล็อก แม้จะยังมีค่าต่ำกว่าซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติก็ตาม โดยจากงานวิจัยของ Cherdkiatikul และ Suwanwong (2014) ได้รายงานว่าโปรตีน CpcB จาก *S. platensis* สามารถต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีได้ดีกว่าโทรลล็อก ในขณะที่โปรตีน CpcA จาก *S. platensis* มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีที่ต่ำกว่าโทรลล็อก อย่างไรก็ตามค่าที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 การศึกษาอาจไม่เหมาะในการนำมาเปรียบเทียบกัน เนื่องจากอาจมีการใช้สภาวะในการทดลองและการคำนวณผลที่แตกต่างกันไปบ้าง ซึ่งอาจทำให้ผลการทดลองจากทั้ง 2 การศึกษามีความคลาดเคลื่อนกัน ส่วนการที่โปรตีน CpcA และ CpcB มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีต่ำกว่าซี-ไฟโคไซยานิน จากธรรมชาติอาจเนื่องมาจากซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติประกอบด้วยโปรตีน CpcA และ CpcB ซึ่งจับอยู่กับโครโมฟอร์ จากการศึกษาของ Guan et al. (2009) พบว่าโปรตีน CpcA ที่จับอยู่กับโครโมฟอร์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีได้ดีกว่าโปรตีน CpcA เพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าโครโมฟอร์ก็มีส่วนสำคัญที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของซี-ไฟโคไซยานิน ด้วยเหตุนี้จึงอาจส่งผลให้ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติมีผลการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีที่ดีกว่าโปรตีน CpcA และ CpcB เพียงอย่างเดียว

สำหรับการทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซี ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่พบได้มากในสิ่งมีชีวิตและมีความว่องไวในการจับอนุมูลอิสระโมเลกุล จากผลการทดลองพบว่าสารละลายในส่วนของการชะคอลัมน์จาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมของโปรตีน CpcA และ CpcB มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีที่สูงกว่าโปรตีน CpcA และ CpcB เป็นอย่างมาก ทำให้ไม่สามารถสรุปผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB ได้ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟีจำเป็นต้องชะคอลัมน์ด้วยสารละลายอิมิดาโซลซึ่งอิมิดาโซลมีความสามารถในการจับกับโลหะ เช่น เหล็ก และ ทองแดง เป็นต้น ได้ดี ซึ่งในปฏิกิริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีก็มีการเติมโลหะเฟอร์ริก ซึ่งจะถูกละลายเป็นเฟอร์รัสในปฏิกิริยา จึงอาจทำให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของโปรตีนดังกล่าวสูงกว่าปกติ แม้ว่าสารละลายโปรตีนดังกล่าวจะผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ด้วยวิธีไดอะไลซิสแล้ว แต่อาจเป็นไปได้ว่าจะกำจัดอิมิดาโซลออกจากสารละลายโปรตีนไม่หมด โดยเหตุที่ทำให้ตัวควบคุมของโปรตีน CpcA และ CpcB มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีที่สูงกว่าโปรตีน CpcA และ CpcB อาจเป็นเพราะสารละลายที่ใช้เป็นตัวควบคุมของโปรตีน CpcA และ CpcB มีความหนาแน่นของอิมิดาโซลที่สูงกว่าในสารละลายโปรตีน CpcA และ CpcB ก็เป็นไปได้ โดยแนวทางแก้ไขต่อไปอาจต้องเพิ่มปริมาณและจำนวนครั้งในการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำไดอะไลซิสเพื่อกำจัดอิมิดาโซลออกจากสารละลายโปรตีนให้มากที่สุด และหลังจากการทำไดอะไลซิสอาจต้องแยกโปรตีนออกจากอิมิดาโซลอีกครั้งด้วยการทำ HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) โดยใช้หลักการเจลฟิวเตรชัน (gel filtration) ซึ่งเป็นการแยกโมเลกุลของโปรตีนตามขนาด เพื่อกำจัดอิมิดาโซลออกจากสารละลายโปรตีนให้หมดก่อนนำมาใช้ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีต่อไป อย่างไรก็ตามต่อมาผู้วิจัยได้ทดลองใช้สารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcA) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) ซึ่งละลายอยู่ในน้ำปราศจากไอออนมาทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีแทนโปรตีน CpcA และ CpcB โดยใช้สารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) มาเป็นตัวควบคุม และเตรียมตัวอย่างซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติและโทรลล็อกในน้ำปราศจากไอออนเช่นกัน จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซีที่สูงกว่าสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-cpcB) ทำให้ไม่สามารถสรุปผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB สกัดหยาบได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามค่าการยับยั้ง

อนุมูลอิสระไฮดรอกซีของสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcA*) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) ที่ได้มีค่าที่สูงกว่าซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติและโพลีเอ็กเป็นอย่างมาก ดังนั้นหากทำโปรตีน CpcA และ CpcB ให้มีความบริสุทธิ์สูงโดยปราศจากอิมิดาโซลและโปรตีนอื่น ๆ เจือปนก็อาจสามารถนำมาวิเคราะห์ค่าการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีของโปรตีน CpcA และ CpcB ได้ สำหรับการทดสอบการกำจัดโลหะเพอร์รัสซึ่งเป็นโลหะที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซีในปฏิกิริยาเพนตอนและเฮเบอร์ไวส์ สารที่สามารถกำจัดโลหะเพอร์รัสได้จะช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซีได้เช่นกัน จากการทดลองพบว่าสารละลายตัวอย่างซึ่งเตรียมอยู่ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธีการนี้ได้ เนื่องจากเมื่อผสมบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตกับส่วนประกอบในปฏิกิริยาแล้วทำให้สารละลายไม่เกิดสีม่วงจึงไม่สามารถตรวจวัดผลการทดลองได้ ต่อมาผู้วิจัยได้ทดลองใช้สารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcA*) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) ซึ่งละลายอยู่ในน้ำปราศจากไอออนมาทดสอบสมบัติการกำจัดโลหะแทนโปรตีน CpcA และ CpcB โดยใช้สารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) มาเป็นตัวควบคุมและเตรียมสารตัวอย่างซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติและ EDTA ในน้ำปราศจากไอออนเช่นกัน พบว่าสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a) มีค่าการกำจัดโลหะที่สูงกว่าสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) ทำให้ไม่สามารถสรุปผลการทดสอบการกำจัดโลหะของโปรตีน CpcA และ CpcB สกัดหยาบได้ อีกทั้งค่าการกำจัดโลหะของสารละลายสกัดหยาบจาก *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcA*) และ *E. coli* Rosetta(DE3) (pET28a-*cpcB*) มีค่าที่ต่ำกว่าซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติและโพลีเอ็กเป็นอย่างมาก แสดงให้เห็นว่าโปรตีน CpcA และ CpcB สกัดหยาบมีความสามารถในการจับกับโลหะที่ต่ำมากซึ่งอาจไม่เหมาะในการนำมาศึกษาด้วยวิธีการนี้ต่อไป

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน CpcA และ CpcB มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน CpcA และ CpcB อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของโปรตีนและคุณสมบัติของกรดอะมิโนบางชนิด Atmaca (2004) รายงานว่ากรดอะมิโนเมทไทโอนีน และกรดอะมิโนซิสเทอีนซึ่งมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบมีความสำคัญต่อการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสามารถส่งอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนที่บริเวณสายข้าง (side chain) ให้กับอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ากรดอะมิโนในกลุ่มที่มีวงแหวนอะโรมาติก ได้แก่ ไทโรซีน และทริปโตเฟน มีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ

เช่นกัน (Meucci & Mele, 1997; Nimalaratne et al., 2011) ดังนั้นหากโปรตีนมีกรดอะมิโนซิสเทอีน กรดอะมิโนเมทไทโอนีน กรดอะมิโนไทโรซีน และกรดอะมิโนทริปโตเฟนอยู่บริเวณผิวหน้าของโปรตีนก็จะช่วยให้โปรตีนนั้นสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ โดยโปรตีน CpcA มีกรดอะมิโนซิสเทอีน 2 ตำแหน่ง กรดอะมิโนเมทไทโอนีน 4 ตำแหน่ง กรดอะมิโนไทโรซีน 11 ตำแหน่ง และกรดอะมิโนทริปโตเฟน 1 ตำแหน่ง ส่วนโปรตีน CpcB กรดอะมิโนซิสเทอีน 3 ตำแหน่ง กรดอะมิโนเมทไทโอนีน 5 ตำแหน่ง และกรดอะมิโนไทโรซีน 5 ตำแหน่ง

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโปรตีน CpcA และ CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ค่อนข้างสูงทั้งกลไกแบบ SET และ HAT อีกทั้ง คัทติยา (2558) ยังรายงานว่าซี-ไฟโคไซยานินที่จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 สามารถคงเสถียรภาพได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเท่ากับ 5 ดังนั้นแนวทางในการพัฒนางานวิจัยต่อไป อาจเป็นการทดสอบเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงของโปรตีน CpcA และ CpcB และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA และ CpcB ให้มีสีน้ำเงิน ซึ่งนอกจากโปรตีน CpcA และ CpcB จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี หากมีสีน้ำเงินและมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงด้วยจักเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารและทางเภสัชกรรมที่ต้องมีกระบวนการให้ความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้องได้ในอนาคต

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้โคลนยีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (*cpcA*) และเบตา (*cpcB*) จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เข้าสู่พลาสมิด pET28a ได้สำเร็จ โดยยีน *cpcA* มีแท็กฮิสทีดอินติคอยู่ทั้งที่ปลาย 5' และ 3' ของยีน ส่วนยีน *cpcB* มีแท็กฮิสทีดอินติคอยู่ทั้งที่ปลาย 3' ของยีน ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA และ CpcB ในแบคทีเรีย *E. coli* Rosetta(DE3) พบว่า *E. coli* Rosetta(DE3) ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-*cpcA* และ pET28a-*cpcB* สามารถผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ได้ดีเมื่อชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถทำโปรตีน CpcA และ CpcB ให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลเมทัลแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์ Ni<sup>2+</sup>-IDA เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีน CpcA มีขนาดประมาณ 20.6 กิโลดาลตัน และโปรตีน CpcB มีขนาดประมาณ 19.3 กิโลดาลตัน โดยจากการเลี้ยงเซลล์ 200 มิลลิลิตร สามารถผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB ได้ 6.21 และ 6.61 มิลลิกรัม ตามลำดับ ในการทดสอบสมบัตินอกเซลล์ด้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าโปรตีน CpcA, CpcB, ซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ และโพลีเอทิลีน มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC<sub>50</sub>) เท่ากับ 22.35±0.19, 21.50±0.11, 18.65± 0.19 และ 2.80±0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในการทดสอบสมบัตินอกเซลล์ด้านอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิ พบว่าโปรตีน CpcA, CpcB และซี-ไฟโคไซยานินจากธรรมชาติ มีค่าสมมูลกับสารมาตรฐานโพลีเอทิลีน เท่ากับ 1.56±0.08, 2.48±0.02 และ 3.31±0.04 ไมโครโมลาร์ สำหรับการทดสอบสมบัตินอกเซลล์ด้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีและสมบัตินอกเซลล์กำจัดโลหะยังไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้และอาจต้องมีการปรับปรุงวิธีการทดสอบต่อไป จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน CpcA และ CpcB มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างสูงทั้งในกลไกแบบ SET และ HAT ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและยาที่มีกระบวนการให้ความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้องได้ในอนาคต



## รายการอ้างอิง

### หนังสือและบทความในหนังสือ

- ยวดี พิรพรพิศาล. (2549). *สาหร่ายวิทยา*. เชียงใหม่: ห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วันเพ็ญ ภูติจันทร์. (2549). *วิทยาศาสตร์สาหร่าย*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- โอภา วัชรคุปต์. (2550). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. กรุงเทพฯ: นิเวศมิตรการพิมพ์.
- Carr, N. G., & Whitton, B. A. (1982). *The biology of cyanobacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Pub.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In J.M. Walker. (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. (pp. 571-607). Humana Press.

### บทความวารสาร

- บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3), 275-286.
- Adir, N., Dobrovetsky, Y., & Lerner, N. (2001). Structure of C-phycoyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 angstrom: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. *Journal of Molecular Biology*, 313(1), 71-81.
- Adir, N., Vainer, R., & Lerner, N. (2002). Refined structure of C-phycoyanin from the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 1.6 Å: insights into the role of solvent molecules in thermal stability and co-factor structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1556(2-3), 2-3.
- Adir, N., & Lerner, N. (2003). The crystal structure of a novel unmethylated form of C-phycoyanin, a possible connector between cores and rods in pycobilisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25926-25932.

- Ananya, Kamal, A., & Ahmad, I. Z. (2014). Cyanobacteria “the blue green algae” and its novel applications: a brief review. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 7(1), 251-261.
- Antonio-Marcos, E., Hernández-Vázquez, L., Olguín, E. J., Monroy, O., & Navarro-Ocaña, A. (2015). C-Phycocyanin from *Arthrospira maxima* LJGR1: production, extraction and protection. *Journal of Advances in Biotechnology*, 5(2), 659-666.
- Atmaca, G. (2004). Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Medical Journal*, 45(5), 776–788.
- Belknap, W. R., & Haselkorn, R. (1987). Cloning and light regulation of expression of the phycocyanin operon of the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO Journal*, 6(4), 871-884.
- Bermejo, R., Felipe, M. A., Talavera, E. M., & JAlvarez-Pez, J. M. (2006). Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia*, 63(1), 59-66.
- Bertolin, T. E., Farias, D., Guarienti C., Petry, F. T. S., Colla, L. M., & Costa, J. A. V. (2011). Antioxidant effect of phycocyanin on oxidative stress induced with monosodium glutamate in rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 733-738.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., & Schäfer, F. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in enzymology*, 463, 439-473.
- Bornhorst, J. A., & Falke J. J. (2000). [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254.
- Casali, N. (2003). *Escherichia coli* host strains. *Methods in molecular biology*, 235, 27-48.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47(4), 659-664.
- Cheng J., Zheng, S., & Guo, Y. (2000). Effects of environmental factors on growth of recombinant *Anabaena* sp. PCC7120. *Journal of South China University of Technology*, 28(10), 5-7.

- Cherdkiatikul, T., & Suwanwong, Y. (2014). Production of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of *Spirulina* allophycocyanin and C-phycocyanin in *Escherichia coli*: a comparative study of their antioxidant activities. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(6), 959-965.
- Chu, W. L., Lim, Y. W., Radhakrishnan, A. K., & Lim, P. E. (2010). Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 53.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48–54
- Deshmukh, D. V., & Puranik, P. R. (2014). Study of antioxidant potentials of alkaliphilic cyanobacteria isolated from Lonar lank, India. *International Journal of Pharmacognosy*, 1(2), 113-118.
- Govindjee, & Shevela, D. (2011). Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. *Frontiers in Plant Science*, 2, 28.
- Guan, X., Qin, S., Zhao, F., Zhang, X., & Tang, X. (2007). Phycobilisomes linker family in cyanobacterial genomes: divergence and evolution. *International Journal of Biological Sciences*, 3(7), 434-445.
- Guan, X. Y., Zhang, W. J., Zhang, X. W., Li, Y. X., Wang, J. F., Lin, H. Z., Tang, X. X., & Qin, S. (2009). A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant  $\alpha$ -phycocyanin of *Spirulina*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1093-10100.
- Gupta, D. (2015). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546-566.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165(1), 215-219.
- Jerley, A. A., & Prabu, D. M. (2015). Purification, characterization and antioxidant properties of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Scrutiny International Research Journal of Agriculture, Plant Biotechnology and Bio Products*, 2(1), 7-15.

- Kamble, S. P., Gaikar, R. B., Padalia, R. B., & Shinde, K. D. (2013). Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(8), 149-153.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M., & Tabata, S. (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research*, 8(5), 205-213
- Kumar, D., Dhar, D. W., Pabbi, S., Kumar, N., & Walia, S. (2014). Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(2), 184-188.
- Leu, J. Y., Lin, T. H., Selvamani, M. J. P., Chen, H. C., Liang, J. Z., & Pan, K. M. (2013). Characterization of a novel thermophilic cyanobacterial strain from Taian hot springs in Taiwan for high CO<sub>2</sub> mitigation and C-phycocyanin extraction. *Process Biochemistry*, 48(1), 41-48.
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(1), 19180-19208.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacological Reviews*, 4(8), 118-126.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-175.
- MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, 124(2-3), 311-334.
- Meucci, E. & Mele, M. C. (1997). Amino acids and plasma antioxidant capacity. *Amino Acids*, 12(3-4), 373-377.

- Minkova, K. M., Tchernov, A. A., Tchorbadjieva, M. I., Fournadjieva, S. T., Antova, R. E., & Busheva, M. C. (2003). Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, 102(1), 55–59.
- Muthulakshmi, M., Saranya, A., Sudha, M., & Selvakumar, G. (2012). Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycoyanin from *Spirulina* isolated from fresh water body against various human pathogens. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(3), 7-11.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kiyokawa C., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., & Tabata, S. (2002). Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Research*, 9(4), 123-130.
- Nikishimi, M., Rao, N., & Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849–854.
- Nimalaratne, C., Lopes-Lutz, D., Schieber, A., & Wu, J. (2011). Free aromatic amino acids in egg yolk show antioxidant properties. *Food Chemistry*, 129(1), 155-161.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., & Mierendorf, R. (2001). Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations*, 12, 1–3.
- Pandey, V. D., Pandey, A., & Sharma, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(4), 89-97.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., & Ghosh, P. K. (2005). Purification and characterization of C-phycoyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, 40(2), 248–255.
- Patel, A., Mishra, S., & Ghosh, P. K. (2006). Antioxidant potential of C-phycoyanin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 43(1), 25-31.

- Pleonsil, P., Soogarun, S., & Suwanwong, Y. (2013). Anti-oxidant activity of holo- and apo-C-phycoyanin and their protective effects on human erythrocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, *60*, 393-398.
- Prabha, R., Singh, D. P., Gupta, S. K., de Farias, S. T., & Rai, A. (2013). Comparative analysis to identify determinants of changing life style in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, a thermophilic cyanobacterium. *Bioinformation*, *9*(6), 299-308.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.
- Richa, Kannaujiya, V. K., Kesheri, M., Sihgh, G., & Sinha, R. P. (2011). Biotechnological potentials of phycobiliproteins. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *2*(4), 446-454.
- Rimbau, V., Camins, A., Pubill, D., Sureda, F. X., Romay, C., Gonzalez, R., Jiménez, A., Escubedo, E., Camarasa, J., & Pallàs, M. (2001). C-Phycocyanin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *364*(2), 96-104.
- Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D., & Rimbau, V. (2003). C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*, *4*(3), 207-216.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 172.
- Shen, G., Saunée, N. A., Williams, S. R., Gallo, E. F., Schluchter, W. M., & Bryant, D. A. (2006). Identification and characterization of a new class of bilin lyase: the *cpcT* gene encodes a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the beta-subunit of phycocyanin in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(26), 17768-177678.
- Shen, G., Schluchter, W. M., & Bryant, D. A. (2008). Biogenesis of phycobiliproteins I. *cpcS-I* and *cpcU* mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for  $\beta$ -phycocyanin and allophycocyanin subunits. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(12), 7503-7512.

- Shih, C. M., Cheng, S. N., Wong, C. S., Kuo, Y. L., & Chou, T. C. (2009). Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycoyanin. *Anesthesia and Analgesia*, *108*(4), 1303-1310.
- Shoja, Z., Rajabi Memari, H., & Roayaei Ardakani, M. (2015). Cloning and expression of beta subunit gene of phycoyanin from *Spirulina platensis* in *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *8*(8), e17809.
- Shui, J., Saunders, E., Needleman, R., Nappi, M., Cooper, J., Hall, L., Kehoe, D., & Stowe-Evans, E. (2009). Light-dependent and light-independent protochlorophyllide oxidoreductases in the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* UTEX 481. *Plant and Cell Physiology*, *50*(8), 1507-1521.
- Sorek, R., & Serrano, L. (2011). Bacterial genomes: from regulatory complexity to engineering. *Current Opinion in Microbiology*, *14*(5), 577-578.
- Sørensen, L., Hantke, A., & Eriksen, N. T. (2013). Purification of the photosynthetic pigment C-phycoyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(12), 2933-2938.
- Stec, B., Troxler, R. F., & Teeter, M. M. (1999). Crystal structure of C-phycoyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on pycobilisome assembly. *Biophysical Journal*, *76*(6), 2912-2921.
- Stolyar, S., Liu, Z., Thiel, V., Tomsho, L. P., Pinel, N., Nelson, W. C., Lindemann, S. R., Romine, M. F., Haruta, S., Schuster, S. C., Bryant, D. A., & Fredrickson, J. K. (2014). Genome sequence of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus* sp. strain NK55a. *Genome Announcements*, *2*(1), e01060-01013.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(5), 523-533.
- Thangam, R., Suresh, V., Asenath Princy, W., Rajkumar, M., Senthilkumar, N., Gunasekaran, P., Rengasamy, R., Anbazhagan, C., Kaveri, K., & Kannan, S. (2013). C-Phycoyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest. *Food Chemistry*, *140*(1-2), 262-272.

- Tooley, A. J., Yuping, A. C., & Glazer A. N. (2001). Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo- $\alpha$ -subunit in a heterologous host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10560-10565.
- Welsh, E. A., Liberton, M., Stoïckel, J., Loh, T., Elvitigala, T., Wang, C., Wollam, A., Fulton, R. S., Clifton, S. W., Jacobs, J. M., Aurora, R., Ghosh, B. K., Sherman, L. A., Smith, R. D., Wilson, R. K., & Pakrasi, H. B. (2008). The genome of *Cyanothece* 51142, a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15094-15099.
- Wong, F. C., Yong, A. L., Ting, E. P., Khoo, S. C., Ong, H. C., & Chaia, T. T. (2014). Antioxidant, metal chelating, anti-glucosidase activities and phytochemical analysis of selected tropical medicinal plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4), 1409–1415.
- Yan, S., Zhu, L., Su, H., Zhang, X., Chen, X., Zhou, B., & Zhang, Y. (2011). Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoyanin and allophycoyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 1–6.
- Zhang, R., Feng, X. T., Wu, F., Ding, Y., Zang, X. N., Zhang, X. C., Yuan, D. Y., & Zhao, B. R. (2014). Molecular cloning and expression analysis of a new bilin lyase: the *cpcT* gene encoding a bilin lyase responsible for attachment of phycoyanobilin to Cys-153 on the  $\beta$ -subunit of phycoyanin in *Arthrospira platensis* FACHB314. *Gene*, 544(2), 191-197.

### วิทยานิพนธ์และโครงการปัญหาพิเศษ

- คัทติยา สุวรรณมณี. (2558). การผลิตและการศึกษาสมบัติทนอุณหภูมิของซี-ไฟโคไซยานิน จากไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากบ่อน้ำพุร้อน. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ.



- ลีชล ฮวดรักษาสัตย์. (2556). *การหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนซี-ไฟโคไซยานิน จากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในแหล่งน้ำพุร้อน*. (โครงการปัญหาพิเศษปริญญาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ.
- Suphap, W. (2009). *Cloning and expression of phycocyanin encoding gene from cyanobacteria*. (Master's thesis). Suranaree University, Faculty of Science, Department of Biotechnology.

### สื่ออิเล็กทรอนิกส์

- Novagen. (3 มีนาคม 2560). pET system manual 11<sup>th</sup> edition. สืบค้นจาก [http://www.emdmillipore.com/PR/en/product/pET-28a\(%2B\)-DNA---Novagen,EMD\\_BIO-69864](http://www.emdmillipore.com/PR/en/product/pET-28a(%2B)-DNA---Novagen,EMD_BIO-69864)
- Novagen. (3 มีนาคม 2560). pET-28a-c(+) Vectors. สืบค้นจาก [http://www.emdmillipore.com/PR/en/product/pET-28a\(%2B\)-DNA---Novagen,EMD\\_BIO-69864](http://www.emdmillipore.com/PR/en/product/pET-28a(%2B)-DNA---Novagen,EMD_BIO-69864)



ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**อาหารเลี้ยงเชื้อ**

**1. อาหารเหลว LB (Luria-Bertani Medium) ปริมาตร 1 ลิตร**

อาหารผง LB 20 กรัม

ละลายอาหารผง LB ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปบ่มนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**2. อาหารแข็ง LB (Luria-Bertani agar) ผสมยาปฏิชีวนะ ปริมาตร 1 ลิตร**

อาหารเหลว LB 1 ลิตร

ผงวุ้น 15 กรัม

กานามัยซิน 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 30 ไมโครลิตร

คลอแรมเฟนิคอล 34 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 34 ไมโครลิตร

ผสมอาหารเหลว LB กับผงวุ้นให้เข้ากัน นำไปบ่มนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมกานามัยซินและคลอแรมเฟนิคอล ผสมสารให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานเพาะเชื้อ

**ภาคผนวก ข**  
**การเตรียมสารเคมี**

**1. EDTA 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร**

EDTA 37.22 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับพีเอช เป็น 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

**2. บัฟเฟอร์ TAE 50X ปริมาตร 500 มิลลิลิตร**

Tris 121 กรัม

EDTA 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 50 มิลลิลิตร

กรดอะซีติกเข้มข้น 28.55 มิลลิลิตร

ละลาย Tris ในน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเติมกรดอะซีติกเข้มข้น และ EDTA ผสมสารให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

**3. แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) 10.1655 กรัม

ละลายแมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรตในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมากรองผ่านแผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อ (filter sterilization) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน

**4. แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2$ ) 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) 7.3507 กรัม

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมากรองผ่านแผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน

**5. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์-แคลเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ - $CaCl_2$  solution) 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร**

แมกนีเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ 16 มิลลิลิตร

แคลเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้น นำสารละลายมากรองผ่านแผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน

**6. แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ในกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**

แคลเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร

กลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 50 มิลลิลิตร

นำสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ผ่านการกรองปราศจากเชื้อมาเติมกลีเซอรอลที่ผ่านการนิ่งมาเชื้อแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร

**7. IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร**

IPTG 2.38 กรัม

ละลาย IPTG ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**8. กานามัยซิน (Kanamycin) 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร**

กานามัยซิน 0.30 กรัม

ละลายกานามัยซินในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**9. คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) 34 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร**

คลอแรมเฟนิคอล 0.34 กรัม

ละลายคลอแรมเฟนิคอลในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**10. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร**

เอธิเดียมโบรไมด์ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 25 ไมโครลิตร

บัฟเฟอร์ TAE 1X 500 มิลลิลิตร

**11. Tris-HCl 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

Tris 9.0855 กรัม

ละลาย Tris ในน้ำปราศจากไอออน 30 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

**12. Tris-HCl 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

Tris 3.0285 กรัม

ละลาย Tris ในน้ำปราศจากไอออน 30 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

**13. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร)**

**ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10.0 กรัม

ละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

**14. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium Per Sulfate: APS) 10 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร)**

**ปริมาตร 5 มิลลิลิตร**

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**15. บัฟเฟอร์สำหรับรันโปรตีนในการทำ SDS-PAGE 10X (protein running buffer) ปริมาตร**

**500 มิลลิลิตร**

Tris 15.1 กรัม

ไกลซีน (Glycine) 72.0 กรัม

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 5.0 กรัม

ละลายและผสมสารให้เข้ากันในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

**16. บัฟเฟอร์สำหรับโหลดโปรตีนในการทำ SDS-PAGE 2X (SDS-PAGE sample loading**

**buffer) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร**

Tris-HCl 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 2 มิลลิลิตร

กลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 4 มิลลิลิตร

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) 4 มิลลิลิตร

โบรมอฟีนอลบลู (Bromophenol blue) 0.001 กรัม

น้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากันแล้วเติมเบตา-เมอแคปโตเอทานอล ( $\beta$ -mercaptoethanol) 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้

**17. สารละลายคูแมสซีบลู (coomassie staining solution) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร**

คูแมสซีบลู อาร์-250 (Coomassie blue R-250)	1.25 กรัม
เมทานอล (Methanol)	250 มิลลิลิตร
กรดอะซิติก (Acetic acid)	50 มิลลิลิตร
ผสมสารให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น	

**18. สารละลายสำหรับล้างสีคูแมสซีบลู (coomassie destaining solution) ปริมาตร 1 ลิตร**

เมทานอล	400 มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100 มิลลิลิตร
ผสมสารให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น	

**19. บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) 1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร**

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	109.8980 กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	27.1022 กรัม
ผสมสารให้เข้ากันในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร	

**20. บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) 75 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร**

บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 1 โมลาร์ พีเอช 7.4	50 มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	950 มิลลิลิตร

**21. บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร**

บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 1 โมลาร์ พีเอช 7.4	75 มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	925 มิลลิลิตร

**22. สารละลาย ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร**

ABTS (Sigma-Aldrich, USA)	0.0384 กรัม
โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 49 มิลลิโมลาร์	500 ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4	2 มิลลิลิตร

ผสมสารแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บสารละลายใน  
ความมืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

**23. โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ( $K_2S_2O_8$ ) 49 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.6623 กรัม

ละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 50  
มิลลิลิตร

**24. AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride) 40 มิลลิโมลาร์  
ปริมาตร 5 มิลลิลิตร**

AAPH (Merck, Germany ) 0.0542 กรัม

ละลาย AAPH และปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 75  
มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 เตรียมสารขณะจะใช้เท่านั้น

**25. กลีออฟลูออเรสซินโซเดียม (fluorescein sodium salt) 583 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100  
มิลลิลิตร**

กลีออฟลูออเรสซินโซเดียม (Merck, Germany) 0.0219 กรัม

ละลายกลีออฟลูออเรสซินโซเดียม และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์  
โซเดียมฟอสเฟต 75 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด

**26. เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4$ ) 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร**

เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.0695 กรัม

ละลายเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 5  
มิลลิลิตร

**27. เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4$ ) 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**

เฟอร์รัสซัลเฟต 50 มิลลิโมลาร์ 200 ไมโครลิตร

เจือจางเฟอร์รัสซัลเฟตในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

**28. เฟอร์โรซีน (ferrozine) 0.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร**

เฟอร์โรซีน (Fluka , Germany) 0.0246 กรัม

ละลายเฟอร์โรซีนในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร



**29. ดีออกซีไรโบส (deoxyribose) 28 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร**

ดีออกซีไรโบส (Sigma-Aldrich, USA)	0.0375 กรัม
-----------------------------------	-------------

ละลายดีออกซีไรโบสในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**30. เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl<sub>3</sub>) 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

เฟอร์ริกคลอไรด์	0.8110 กรัม
-----------------	-------------

กรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอล	2.5 มิลลิลิตร
--------------------------	---------------

ละลายและผสมสารในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

**31. เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl<sub>3</sub>) 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

เฟอร์ริกคลอไรด์ 0.1 โมลาร์	500 ไมโครลิตร
----------------------------	---------------

เจือจางเฟอร์ริกคลอไรด์ในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เตรียมสารขณะจะใช้เท่านั้น

**32. EDTA 1.04 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร**

EDTA	0.0774 กรัม
------	-------------

ละลาย EDTA ในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

**33. กรดแอสคอร์บิก (L-ascobic acid) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

กรดแอสคอร์บิก	0.0088 กรัม
---------------	-------------

ละลายกรดแอสคอร์บิกในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

**34. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร**

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร)	22.7 ไมโครลิตร
---	----------------

เจือจางไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร เตรียมสารขณะจะใช้เท่านั้น

**35. บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH) 200 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร**

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	13.6084 กรัม
---	--------------

ละลายสารโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) จากนั้นปรับ ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

**36. บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH) 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร**

บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 50 มิลลิลิตร

น้ำปราศจากไอออน 450 มิลลิลิตร

**37. กรดไทโอบาร์บิทูริก (thiobarbituric acid) 1 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

กรดไทโอบาร์บิทูริก (Sigma-Aldrich, USA) 0.5 กรัม

ละลายกรดไทโอบาร์บิทูริกในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ คนสาร ด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เตรียมสารขณะจะใช้เท่านั้น

**38. กรดไตรคลอโรอะซีติก (trichloroacetic acid) 2.8 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร**

กรดไตรคลอโรอะซีติก 1.4 กรัม

ละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เตรียมสารขณะจะใช้เท่านั้น

## ภาคผนวก ค

### 1. การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ จาก *E. coli* DH5 $\alpha$ และ *E. coli* Rosetta(DE3)

นำ *E. coli* DH5 $\alpha$  หรือ *E. coli* Rosetta(DE3) มา streak บนอาหารแข็ง LB แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5 $\alpha$  หรือ *E. coli* Rosetta(DE3) มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นในการเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ ใช้เซลล์เริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว LB 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบ/นาที จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.4-0.6 จากนั้นเทเซลล์ลงหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วแช่น้ำแข็งไว้ 30 นาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้งไป แล้วเติมสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์-แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่แช่เย็นประมาณ 20-30 มิลลิลิตร เคาะหลอดในน้ำแข็งเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัวสารละลาย แล้วแช่น้ำแข็งไว้ 45 นาที ต่อมานำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้งไป แล้วเติมแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ที่แช่เย็น 2 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร นำมาทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ในทันที หรือเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 2. การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ge/PCR Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience)

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมารันด้วยวิธีอิเล็กโตรฟีรีซิสบนเจลอะกาโรส นำเจลที่ได้ไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 15 นาที และแช่ในน้ำกลั่น 15 นาที แล้วตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการภายใต้แสงยูวี นำเจลที่ตัดได้ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละประมาณ 0.3 กรัม เติมบัฟเฟอร์ DF 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที พลิกหลอดทุก 2-3 นาที จนเจลละลายดี ต่อมานำดูดสารละลายทั้งหมดใส่คอลัมน์ DF ครั้งละ 800 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/

นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้งแล้วเติมบัฟเฟอร์สำหรับล้างคอลัมน์ 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ DF จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงให้คอลัมน์แห้งที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายคอลัมน์ DF ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 20-50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

### 3. การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันหรือจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาเติมบัฟเฟอร์ PB ในปริมาณ 1: 5 เท่า ผสมสารให้เข้ากันแล้วนำมาใส่ลงในคอลัมน์ QIAquick spin ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลาที่ 30 วินาที เทสารละลายทิ้งแล้วเติมบัฟเฟอร์ PE สำหรับล้างคอลัมน์ 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ QIAquick จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงให้คอลัมน์แห้งที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 30-50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

### 4. การสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

นำเซลล์โคลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนสารละลายทิ้งแล้วละลายเซลล์ในบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาอย่างช้า ๆ 3-4 ครั้ง เพื่อผสมสารให้เข้ากัน ต่อมาเติมบัฟเฟอร์ N3 350 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาอย่างช้า ๆ 4-6 ครั้ง จนกระทั่งเกิดตะกอนสีขาวขุ่น จากนั้นปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ตูดสารละลายใส่ที่ได้ใส่ในคอลัมน์ QIAprep Spin Miniprep ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเทสารละลายในหลอดทิ้งไป แล้วเติมบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดทิ้งไป แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดทิ้งไป แล้วปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง

ต่อมาย้ายคอลัมน์มาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิเมตร หลอดใหม่ เติมน้ำปราศจากไอออน 30-50 ไมโครลิตร ตรงกลางคอลัมน์ ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวลิซล ฮวดรักษาสัตย์
วันเดือนปีเกิด	18 กรกฎาคม พ.ศ.2535
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2557: วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ทุนการศึกษา	ปีงบประมาณ 2557: ทุนเรียนดีคณะวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

### ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ

อริศรา อรรถเวทยวรรุฒิ, สุขานนท์ เสมแก้ว, ลิซล ฮวดรักษาสัตย์, ฐาปน จงรักษ์, สุดาทิพย์ จันทร์, จิรวรรณ อภิรักษากร, และ ชนิดโชต ปิยพิทยานันต์. (2559). การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนสจากแบคทีเรียน้ำพุร้อน. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*, 8(2), 166-179.

### การนำเสนองานในที่ประชุมวิชาการ

ลิซล ฮวดรักษาสัตย์, สุเปญญา จิตตพันธ์, เทพปัญญา เจริญรัตน์, พลายนพล เดชวิศิษฐ์สกุล และชนิดโชต ปิยพิทยานันต์. (มีนาคม 2558). *การหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนซี-ไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อาศัยในแหล่งน้ำพุร้อน*. การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 (NCAP 2015). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

Sichon Huadraksat, Supenya Chittapun, Theppanya Charoenrat, and Chanitchote Piyapittayanun. (November 2016). *Expression and Purification of C-Phycocyanin Alpha Subunit from Thermophilic Cyanobacterium and Study of Its Antioxidant Properties*. The 9<sup>th</sup> Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology (APCAB 2016). King Mongkut's University of Technology Thonburi. Bangkok.

ประสบการณ์ทำงาน

พ.ศ.2556: ฝึกงานในตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย ห้องปฏิบัติการ  
อณูพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ ณ สำนัก  
งานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

พ.ศ.2560: อาจารย์พิเศษวิชา วท.162 ปฏิบัติการชีววิทยา  
2 ประจำภาคเรียนที่ 2/1559

