บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การออกแบบไพรเมอร์ (primer design)

ข้อมูลลำดับเบสของยีนไฟโคไซยานิน และ ลำดับโปรตีนจาก *Anabaena* sp. PCC 7120 ตาม Accession number X05239 ใน GenBank (NCBI) ถูกใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ลำดับโปรตีนต้นแบบ จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับโปรตีนในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอีก 7 สายพันธุ์ (*Ana. variabilis* ATCC 29413, *Arthrospira platensis*, *Spirulina maxima*, *Ana. kisseleviana*, *Ana. lemmermannii*, *Ana. flos-aquae* and *Ana. planktonica*) เพื่อนำไปทำการออกแบบไพรเมอร์และใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งส่วนที่เป็นสายแอลฟา และสายบีตา

2.2 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA extraction)

ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ถูกเลือกมาใช้ในการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ โดยทำการเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ดังกล่าวตามขั้นตอนของ Golden และคณะ (1988)

2.3 การโคลนยีนไฟโคไซยานิน (Cloning phycocyanin gene)

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนไฟโคไซยานินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้จีโนมิค ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ส่วนไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อยีนไฟโคไซยานิน (ตารางที่ 1) จากนั้นทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นส่วนของยีนไฟโคไซยานินเข้ากับเวคเตอร์ (pENTR directional TOPO Cloning Vector) แล้วถ่ายโอนพลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อการเพิ่มปริมาณพลาสมิด

จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดนี้โดยคัดเลือกจากการต้านยาปฏิชีวนะตามที่เหมาะสม จากนั้นเป็นขั้นตอนการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันว่ามีชิ้นยีนไฟโคไซยานินแทรกอยู่ภายในพลาสมิดจริง โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

ตารางที่ 1 ไพเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนไฟโคไซยานินแอลฟา และบีตา

Primer name	**Sequence**	**Tm (°C)**
Phyco_beta_F	CAC CAT GAC ATT AGA CGT ATT TAC	48
Phyco_beta_R	TTA ACC AAC AGC AGC AGC GC	62
Phyco_alpha_F	CAC CAT GGT TAA AACCCC CAT TAC	57
Phyco_alpha_R	CAT GCT GAG AGG GTT GAT AGC G	56

2.4 การแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน (Expression phycocyanin gene)

เมื่อได้ยีนไฟโคไซยานินที่ถูกต้องซึ่งบรรจุอยู่ในโคลนนิ่งพลาสมิดแล้ว ทำการย้ายชิ้นส่วนยีนไฟโคไซยานินไปยังเวคเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก (expression vector) ด้วย LR clonase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย้ายชิ้นยีนไฟโคไซยานินไปยัง pET32a DEST เพื่อใช้ในการแสดงออก แล้วทำการถ่ายโอนพลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ซึ่งพลาสมิด ดังกล่าวนี้จะมีพอลิฮิสทิดีน (His tag) เชื่อมอยู่ที่ปลายคาร์บอกซิลิกของโปรตีนที่ผลิตได้ ทั้งนี้เพื่อให้ง่ายต่อการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (chromatography column) และใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) ระหว่างสารตัวอย่างกับลิแกนด์ (ligand) เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดจะสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) โคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจะถูกนำมา

ตรวจสอบความถูกต้องด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ (colony PCR) เพื่อหาโคโลนีที่ให้ผลเป็นบวกจากนั้นนำมาทดสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน แล้วทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิตที่ไม่มียีนไฟโคไซยานินแทรกอยู่เป็นชุดควบคุม ในการศึกษาการแสดงออกของยีนเริ่มด้วยการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ในอาหารเหลว (LB broth) ที่เติมแอมพิซิลิน จากนั้นเลี้ยงให้ได้ค่าความขุ่น (optical density) ประมาณ 0.5-0.6 แล้วทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินด้วยตัวเหนี่ยวนำ (isopropylthiogalactoside; IPTG) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม และใช้เวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระต่อไป

2.5 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์

แยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการโครมาโตกราฟฟีสัมพรรคภาพชนิดไอแมค (immobilized metal affinity chromatography; IMAC)

2.6 การทดสอบคุณสมบัติไฟโคไซยานิน (Phycocyanin property test)

ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2'-azinobis(3-ethlbenzothaiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Davi และคณะ (2008) ซึ่งวิธีการ DPPH จะทำการผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และนำมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox (10-50 mg/l) ส่วนวิธี ABTS ทำโดยผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS

3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 6 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox (10-50 mg/L)