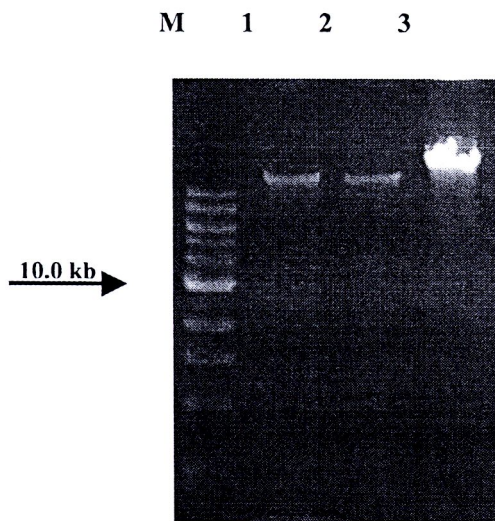


บทที่ 3

ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (DNA extraction)

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาตรวจสอบด้วยการไหลคบน 1 เปอร์เซ็นต์ เจลอะกาโรส (agarose gel) พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดที่ใหญ่กว่า 10 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยจีโนมิกดีเอ็นเอนี้จะถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับเทคนิคพีซีอาร์ในการทดลองลำดับต่อไป



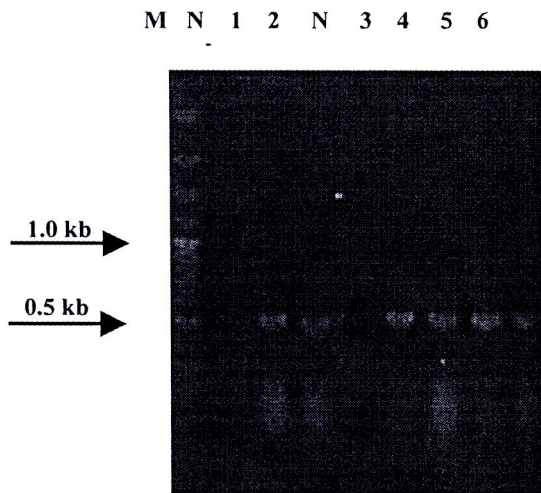
รูปที่ 1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (M: 1 kb marker; 1-3: จีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ 1-3 ตามลำดับ)

3.2 การโคลนยีนไฟโคไซยานิน (Cloning phycocyanin gene)

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนไฟโคไซยานินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 1 และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการข้างต้นเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และเมื่อทำการ

ตรวจสอบบนเจลอะกาโรสพบว่าชิ้นยีนบีต้าและแอลฟามีขนาด 500 และ 480 คู่เบส (base pair: bp) ตามลำดับ จากนั้นแยกดีเอ็นเอที่พบบนเจลอะกาโรสถูกตัดเพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทดสอบ (DNA extraction kit; Invitrogen) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้มาทำการเคลื่อนย้ายเข้าสู่เวกเตอร์ pENTR/D-TOPO แล้วทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α แล้วทำการตรวจสอบเบื้องต้น โคลนีนีที่คาดว่าน่าจะมีชิ้นยีนไฟโคไซยานินอยู่ด้วยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบแข็งที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin (50 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร) ผสมอยู่ด้วย

โคลนที่พบเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกนำมาทดสอบในขั้นต่อมาด้วยเทคนิคโคลนนิ่งพีซีอาร์ ซึ่งผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 2 จากนั้นเมื่อได้โคลนที่ต้องการโดยการตรวจสอบด้วยวิธีการเบื้องต้นดังกล่าวแล้ว จำนวนโคลนที่มีชิ้นยีนแอลฟาไฟโคไซยานิน 2 โคลน และยีนเบต้าไฟโคไซยานิน 4 โคลน ถูกส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท แมคโครเจน ประเทศเกาหลี (Macrogen Inc., Korea) ซึ่งจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวพบว่าทั้ง 2 โคลน ที่มียีนแอลฟาไฟโคไซยานินมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Ana. variabilis* ATCC 29431 (CP000177) *Anabaena* sp. PCC7120 (AF18757) และ *Anabaena* sp. 7120 biliprotein (X05239) เป็น 87 85 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนโคลนทั้ง 4 ที่มียีนเบต้าไฟโคไซยานินมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Ana. variabilis* ATCC 29431 (CP000177) *Anabaena* sp. 7120 biliprotein (X05239) และ *Anabaena* sp. PCC7120 (AF18757) เป็น 90 88 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลของการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ที่ได้กล่าวมาทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งยีนแอลฟาไฟโคไซยานินและเบต้าไฟโคไซยานินได้ส่งไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลที่ NCBI และได้รับรหัส (accession number) เป็น EU815327 และ EU815328 ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)



รูปที่ 2 ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิค โคลนนิ่งพีซีอาร์ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 2
เปอร์เซ็นต์ (M: 100bp marker; 1-2: ดีเอ็นเอของยีนแอลฟาไฟโคไซยานิน (*cpcA* gene) ขนาด 480bp
โคลนนิ่งที่ 1-2 ตามลำดับ; 3-6: ดีเอ็นเอของยีนเบต้าไฟโคไซยานิน (*cpcB* gene) ขนาด 500bp โคลนนิ่ง
ที่ 3-6 ตามลำดับ; N: negative control)

3.3 การแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน (Expression phycocyanin gene)

การแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในเซลล์ BL21 (DE3) pLysS ผลที่ได้พบว่าโปรตีนที่แสดง
ออกมาโดยส่วนมากจะอยู่รวมกันในรูปแบบที่ไม่ละลาย (insoluble aggregation form) ซึ่งได้ทำการเพิ่ม
ความสามารถในการละลายของโปรตีนนี้ด้วยการลดอุณหภูมิในการกระตุ้นการผลิตโปรตีนโดยในการ
ทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณโปรตีนที่อยู่ในรูปแบบไม่ละลาย
(insoluble form) ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ระยะเวลา และปริมาณ
ตัวกระตุ้น (IPTG) ที่ใช้ในการกระตุ้นการผลิตโปรตีน ยังถูกนำมาพิจารณาด้วยเช่นกัน โดยพบว่าโปรตีนจะ
ถูกผลิตขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และตัวกระตุ้น IPTG ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ จะ
สามารถกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวกระตุ้นที่ความเข้มข้นอื่นที่ใช้ในการ
ทดลองนี้ ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งโปรตีนที่ผลิตได้ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยจากรูปที่ 3 จะเห็นว่า

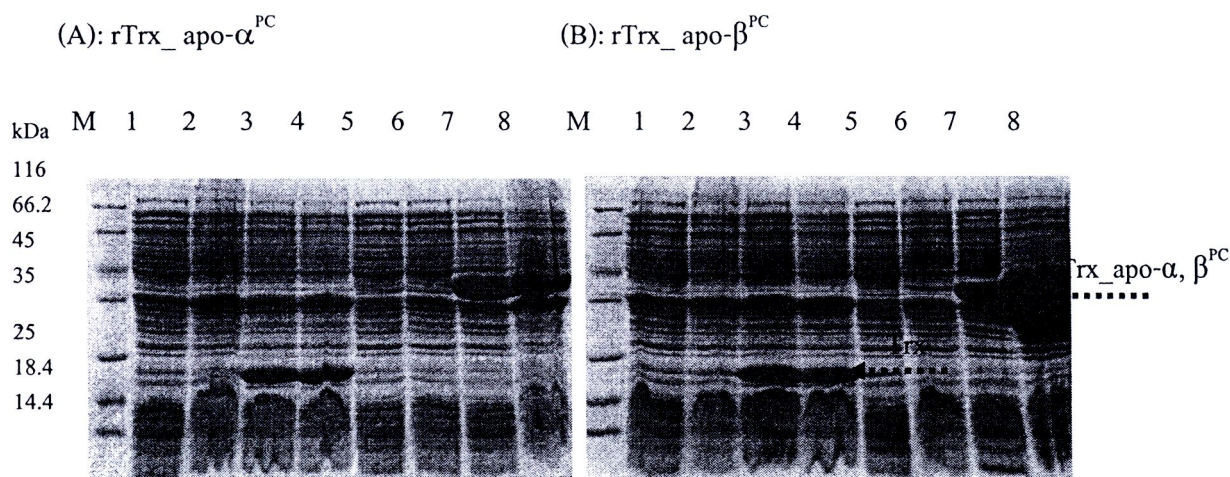


โปรตีนเป้าหมาย (target protein) มีขนาดที่แสดงบนเจล SDS-PAGE คือ 39 kDa และ 40 kDa ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rTrx_apo- α^{PC} และ rTrx_apo- β^{PC} ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการบ่งชี้ยีนไฟโคไซยานิน (*cpcA* และ *cpcB*) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เปรียบเทียบกับ

ข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI

Accession	Description	Max Identity
<i>cpcA</i> gene		
CP000117	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29431	87%
AF178757	<i>Anabaena</i> PCC7120 phycobilisome rod structure	85%
X05239	<i>Anabaena</i> 7120 biliprotein phycocyanin operon	85%
CP002059.1	' <i>Nostoc azollae</i> ' 0708, complete genome	83%
M75599.1	<i>Fischerella</i> sp. Cohn	77%
AF333175.1	<i>Synechococcus vulcanus</i> C-phycocyanin alpha subunit gene	77%
JF798344.1	<i>Dolichospermum flos-aquae</i> FACHB 245	77%
<i>cpcB</i> gene		
CP000117	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29431	90%
X05239	<i>Anabaena</i> 7120 biliprotein phycocyanin operon	88%
AF178757	<i>Anabaena</i> PCC7120 phycobilisome rod structure	88%
BA000019	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 DNA, complete genome	88%
AF068771	<i>Synechocystis</i> PCC9413 beta-phycocyanin (<i>cpcB</i>)	83%
DQ848352	<i>Fremyella diplosiphon</i> Fd33 phycobilisome linker-core	82%
X07012	<i>Tolypothrix</i> sp. PCC7602 inducible <i>cpcB2</i> and <i>cpcA1</i>	77%



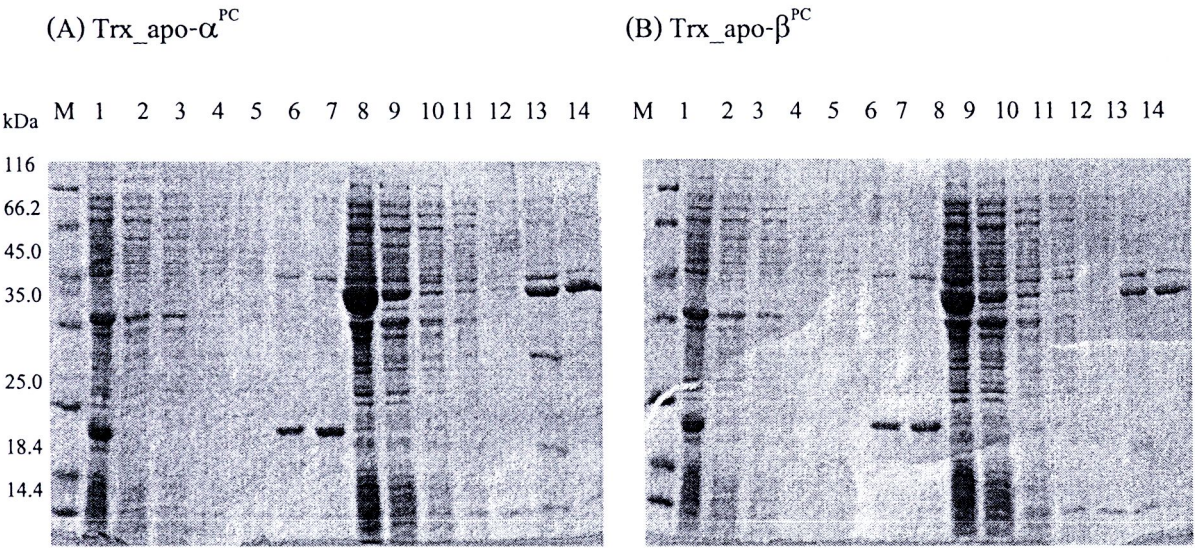
รูปที่ 3 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน (A): rTrx_ apo- α^{PC} และ (B): rTrx_ apo- β^{PC} ในเซลล์

แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ด้วยวิธี SDS-PAGE M: Protein standard (Fermentas); 1-2: ส่วนที่ละลาย (soluble fraction) และส่วนที่ไม่ละลาย (insoluble fraction) ของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์เปล่า (ไม่มีชิ้นยีน) และไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG; 3-4 ตามลำดับ: ส่วนที่ละลายและส่วนที่ไม่ละลายของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์เปล่า (ไม่มีชิ้นยีน) และถูกกระตุ้นด้วย IPTG ตามลำดับ; 5-6: ส่วนที่ละลายและส่วนที่ไม่ละลายของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีน และไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ตามลำดับ; 7-8: ส่วนที่ละลาย และส่วนที่ไม่ละลายของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีน และถูกกระตุ้นด้วย IPTG ตามลำดับ.

3.4 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์

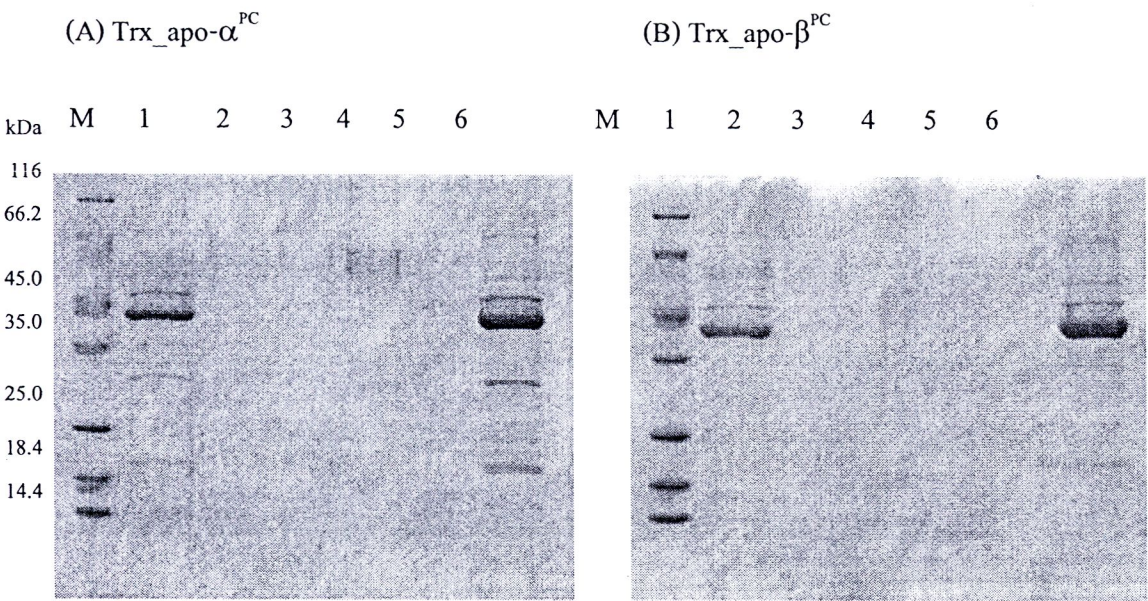
จากการออกแบบให้โปรตีนเป้าหมายมีส่วนเชื่อมต่อที่แตกต่างกัน คือ โปรตีน rTrx_ apo- α^{PC} จะมีส่วนเชื่อมต่อ 6XHis-tag ทั้งฝั่ง N และ C กับโปรตีน ขณะที่โปรตีน rTrx_ apo- β^{PC} จะมีส่วนเชื่อมต่อ 6XHis-tag แล่ฝั่ง N ของโปรตีนเท่านั้น ซึ่งจากผลการออกแบบนี้อาจทำให้ส่งผลต่อการจับกับไอออนโคบอลต์บนตัวกลางดูดซับแบบสัมพรรคภาพในกระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยโปรตีน rTxn_ apo- α^{PC} จะจับกับ

ไอออนโคบอลต์บนตัวกลางดูดซับแบบสัมพรรคภาพได้ดีกว่าโปรตีน rTxn_apo-β^{PC} จึงทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่มากกว่าดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4A และ 4B (ช่องที่ 14)



รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE การแสดงออกของโปรตีน (A): rTxn_apo-α^{PC} และ (B): rTxn_apo-β^{PC} ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพชนิดไอออนโคบอลต์ที่มีการตรึงไอออนโคบอลต์ (M: Protein standard (Fermentas); 1-7: ตัวอย่างที่มีเวกเตอร์เปล่า (ไม่มีชิ้นยีน); 8-14: ตัวอย่างที่มีเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีน; 1, 8: ส่วนที่ละลาย (soluble fraction); 2, 9: ส่วนที่ไหลผ่าน (flow-through); 3-5: ส่วนที่ถูกล้าง (wash fraction) ด้วยอิมิดาโซล (imidazole) ความเข้มข้น 0, 5, และ 10 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ; 6: ส่วนที่ถูกชะ (elution fraction) ด้วยอิมิดาโซลความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์; 7: ส่วนชะที่ไม่ได้จับกับเม็ดโคบอลต์ด้วยอิมิดาโซลความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์; 10-13: ส่วนที่ถูกล้าง (wash fraction) ด้วยอิมิดาโซล (imidazole) ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ; 14: ส่วนที่ถูกชะ (elution fraction) ด้วยอิมิดาโซลความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์).

จากรูปที่ 4 ชี้ให้เห็นว่าที่ค่าอิมิดาโซลความเข้มข้นต่ำๆ (5, 10 และ 150 มิลลิโมลาร์) นั้น ไม่สามารถ
ชะเอารีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ออกจากตัวดูดซับแบบสัมพรรคภาพที่มีไอออนโคบอลต์
ได้ (แถวที่ 4-6 และ แถวที่ 11-13) สำหรับค่าอิมิดาโซลที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ จะถูกใช้ในการชะไร
โอรีดอกซิน (thioredoxin; Trx) ขณะที่รีคอมบิแนนท์โปรตีนจะต้องใช้อิมิดาโซลความเข้มข้นถึง 500 มิลลิ
โมลาร์ ดังแสดงในช่องที่ 14 ซึ่งหลังจากผ่านกระบวนการการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์แล้ว โปรตีนจะถูกนำมา
ทำให้เข้มข้นขึ้นและละลายอยู่ใน 50 mM Tris-Cl, pH8.0 โดยจากรูปที่ 5 จะเห็นว่าโปรตีนมีความเข้มข้นมาก
ขึ้น



รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE ของโปรตีน (A) rTrx_apo- α^{PC} และ (B) rTrx_apo- β^{PC} ที่ทำให้เข้มข้น
ขึ้น และ เปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็น 50 mM Tris-Cl, pH 8.0 โดย 10 kDa cutoff (M: Protein standard
(Fermentas); 1: ส่วนที่ถูกชะด้วยอิมิดาโซลความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์; 2-5: ส่วนที่ผ่านการกรอง
(Filtrated fraction) เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาทีตามลำดับ; 6: รีคอม-บิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการ
ทำให้เข้มข้นแล้วที่ละลายอยู่ใน 50 mM Tris-Cl pH 8.0).

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ ถึงแม้ว่าโปรตีน
นั้นจะไม่เรืองแสงก็ตาม แต่จากหลายๆ รายงานเมื่อไม่นานมานี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกร่วม (co-

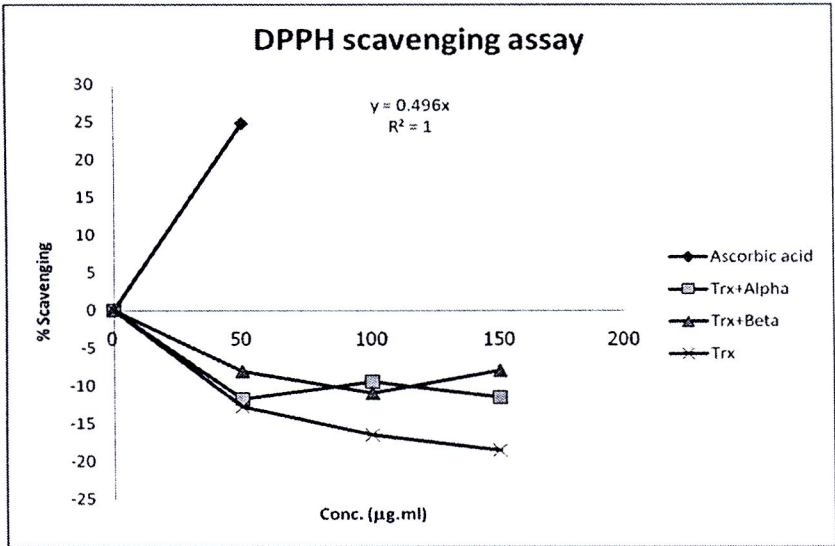
expression) ของหลายๆ ทรานซีน (transgene) ที่เป็นไฟโคไซยานินส่วน holo- α -subunit ของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกในเซลล์ *E. coli* นั้นสามารถเรืองแสงได้ (Tooley และคณะ 2001, Guan และคณะ 2007, Guan และคณะ 2009)

3.5 การทดสอบคุณสมบัติไฟโคไซยานิน (Phycocyanin property test)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการวัด DPPH scavenging activity ด้วยการประมาณค่าของ IC_{50} ได้ค่าประมาณ 0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังรูปที่ 6 ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากความสามารถในการละลายในบัฟเฟอร์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในกระบวนการทดลองเกิดการตกตะกอน และเป็นสีขาวขุ่น หลังจากเวลาผ่านไป 30 นาที ซึ่งจะไปรบกวนการดูดกลืนแสง แสดงดังรูปที่ 7 การทดลองนี้จึงไม่สามารถใช้เทคนิคการวัด DPPH scavenging activity ของรีคอมบิแนนท์แอลฟา และ บีตาโปรตีนได้

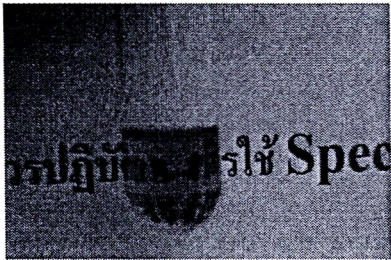
จึงเปลี่ยนมาวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค ABTS radical scavenging assay จากผลทดลองของ ABTS radical scavenging assay แสดงให้เห็นว่าโทรลอกซ์ (trolox) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมแสดงค่า IC_{50} เป็น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 8A) และโปรตีนทดสอบ rTrx_apo- α^{PC} , rTrx_apo- β^{PC} และ Trx แสดงค่า IC_{50} เป็น 13.8, 18.6 และ 23.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 8B)

ซึ่งจากงานวิจัยของ Madhyastha และคณะ (2009) ชี้ให้เห็นว่า ซี-ไฟโคไซยานิน ตามธรรมชาติจากเซลล์ *Spirulina platensis* มีค่า scavenging DPPH radical เป็น 12 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถ scavenging ABTS radical ได้ อย่างไรก็ตาม ซี-ไฟโคไซยานิน ตามธรรมชาติสามารถเกิดความผิดพลาดต่อ scavenging ABTS radical อย่างมีนัยสำคัญได้เช่นกัน ในความแตกต่างระหว่างวิธีการทดสอบของ ABTS และ DPPH scavenging อาจเกิดจากความแตกต่างที่เกิดขึ้นในแต่ละปฏิกิริยา โดย ABTS เกิดในขั้นตอนที่เป็นของเหลว (aqueous phase) ส่วน DPPH เกิดในขั้นตอนที่เป็นสารอินทรีย์ (organic phase)

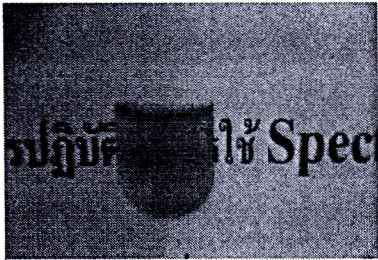


รูปที่ 6 การทำ DPPH scavenging assay ที่ใช้ซึบสเตรทกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 50 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการทดสอบไซโอรีดอกซิน (Trx), โปรตีน rTrx_apo- α ^{PC} และโปรตีน rTrx_apo- β ^{PC} ด้วยการวัดค่า IC₅₀ of scavenging activity.

(A)

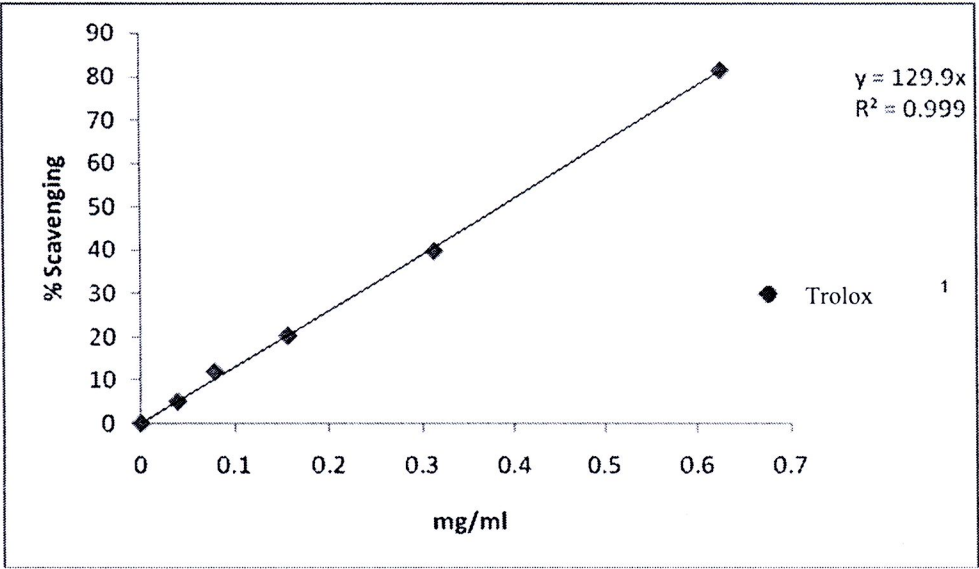


(B)

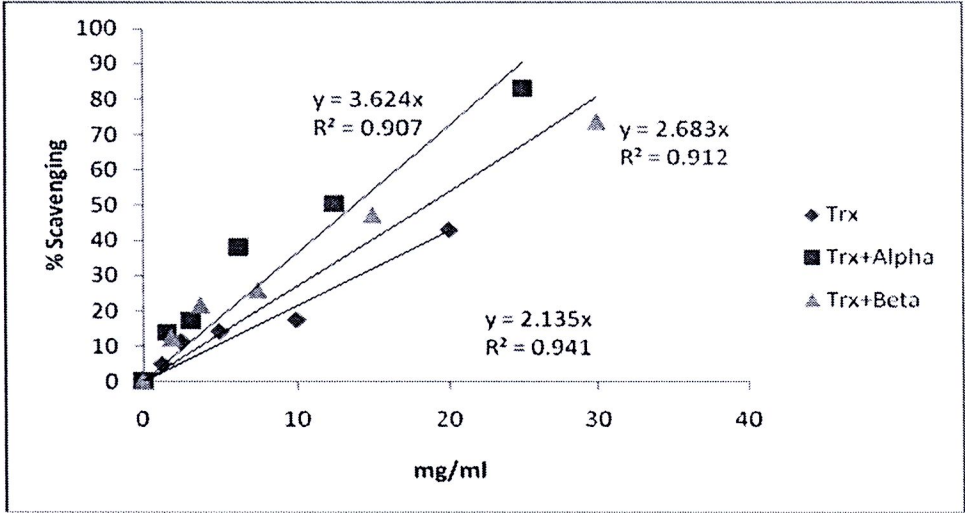


รูปที่ 7 ผลการทำปฏิกิริยา DPPH หลังจากเวลาผ่านไป 30 นาที เปรียบเทียบระหว่างตัวควบคุม (A) กรดแอสคอร์บิก และ (B) รีคอมบิแนนท์โปรตีน

(A)



(B)



รูปที่ 8 แสดงวิธีการทดสอบแบบ ABTS scavenging; (A): โทรลอกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ; (B): โปรตีน

rTrx_apo- α^{PC} , rTrx_apo- β^{PC} และ Trx ที่ถูกทดสอบโดยวิธี ABTS และทำการวัดค่าของ IC_{50}

จากวิธีการทดสอบข้างต้นชี้ให้เห็นว่าโปรตีน rTrx_apo- α^{PC} และ rTrx_apo- β^{PC} พบคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อทดสอบด้วยวิธีการของ ABTS radical scavenging

ซึ่งสิ่งที่สำคัญของการทดสอบคุณสมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต้องเป็นขั้นตอนที่ง่าย ราคาไม่แพง ทดสอบได้อย่างรวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง (Thaipong และคณะ 2006) และเนื่องจากยังไม่มีวิธีการที่เป็นมาตรฐาน สำหรับการประเมินผลถึงปริมาณสูงสุดของสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น นักวิจัยหลายๆ กลุ่มจึงอาศัยการวิเคราะห์ในหลายๆ วิธี ซึ่งวิธีการต่างๆ ก็จะมีหลักการที่แตกต่าง และสภาวะการทดลองที่แตกต่างกันไป เพราะฉะนั้นคุณภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้ก็จะแตกต่างกันไปตามแต่วิธีการนั้นๆ (Samec และคณะ 2009) ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้สนับสนุนความเป็นไปได้ที่ว่าไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliproteins) ที่เป็นไฟโคไซยานินอาจจะมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้ และรีคอมบิแนนท์ ซี-ไฟโคไซยานิน อาจจะมีศักยภาพในการนำไปทำเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในอนาคตได้