ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249980

รหัสโครงการ SUT3-304-52-24-17

รายงานการวิจัย

การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย

(Cloning and Expression of Phycocyanin from Cyanobacteria)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

b0018552?9
249980
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249980

รหัสโครงการ SUT3-304-52-24-17

ห้องสมุดงานวิจัย

รายงานการวิจัย

การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย

(Cloning and Expression of Phycocyanin from Cyanobacteria)

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2552-2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัย ขอขอบคุณ สภาวิจัยแห่งชาติ (วช) และ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้จัดสรรงบประมาณสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ กรุณาตรวจสอบ ให้ข้อเสนอแนะ ปรับปรุงแก้ไขรายงานวิจัยนี้ ทำให้รายงานวิจัยนี้ถูกต้องและครบถ้วนสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ได้ทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจและเริ่มทำงานกับสาหร่าย และ ไฟโคไซยานิน

ขอขอบคุณ นายสุเมธ อิ่มสุนทรรักษา นางสาววันวิสาข์ สุภาพ ผู้ช่วยวิจัยที่ได้ช่วยเตรียมตัวอย่าง ร่วมมือในการดำเนินการวิจัยและช่วยสรุปผลการวิจัย ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของผู้วิจัยดำเนินการไปได้อย่างดีและสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณนางสาว ดาราวรรณ ร่วมกุศล ที่ได้ช่วยจัดพิมพ์ต้นฉบับร่างรายงานการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

หัวหน้าโครงการ

มิถุนายน 2555

บทคัดย่อ

249980

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะของยีนไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในระดับโมเลกุล โดยการโคลนยีนไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena siamensis* TISTR8012 ซึ่งเริ่มจากการสร้างนิวคลีโอไทด์สายสั้นจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ana. variabilis* ATCC 29413, *Arthrospira platensis, Spirulina maxima*, *Ana. kisseleviana*, *Ana. lemmermannii*, *Ana. flosaquae* และ *Ana. planktonica* จากนั้นทำการโคลนแอลฟา และบีตา-ไฟโคไซยานินยีนโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วถ่ายโอนเข้าสู่โคลนนิ่งเวคเตอร์ แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เวคเตอร์เพื่อการแสดงออกของโปรตีน เมื่อได้โปรตีนแอลฟา- และบีตา- ไฟโคไซยานิน จึงทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยการใช้โคบอลต์แอฟฟินิตีโครมาโตรกราฟี แล้วนำโปรตีนที่บริสุทธิ์แล้ว มาทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS scavenging ผลการทดลองที่ได้นำเสนอโดยค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับวิตามินอีสังเคราะห์ โดยวิตามินอีสังเคราะห์ โปรตีนแอลฟา- และโปรตีนบีตา- ไฟโคไซยานิน ที่ทำบริสุทธิ์มีค่า IC_{50} 0.4, 13.8 และ18.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Abstract

249980

The objectives of this research are to clone, expressed, purified and study phycoyanin properties. Genomic DNA of *Anabaena siamensis* TISTR8012 was used as a template for apo-α^{PC} and apo-β^{PC} amplification. The primers for apo-α^{PC} and apo-β^{PC} amplification were designed from the alignment of apo-α^{PC} and apo-β^{PC} of *Ana. variabilis* ATCC 29413, *Arthrospira platensis*, *Spirulina maxima*, *Ana. kisseleviana*, *Ana. lemmermannii*, *Ana. flosaquae* and *Ana. planktonica*. The apo-α^{PC} and apo-β^{PC} genes were amplifies and cloned into pGEM_T easy cloning vector and sequenced. Then, subcloned into pET32a expression vector. The recombinant proteins were expressed in BL21 (DE3) *Escherichia coli* host cells. The recombinant apo-α^{PC} and apo-β^{PC} fusion proteins were purified using cobalt affinity chromatography. The recombinant proteins were analyzed for antioxidant scavenging property using ABTS scavenging assay compare with synthetic vitamin E, trolox. The results showed that trolox, rTrx_apo-α^{PC} and rTrx_apo-β^{PC} proteins have the IC_{50} value of 0.4, 13.8 and 18.6 mg/ml, respectively.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
การทบทวนวรรณกรรม	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การออกแบบไพรเมอร์	7
การสกัดจีโนมิคดีเอนเอ	7
การโคลนยีนไฟโคไซยานิน	7
การแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน	8
การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์	9
การทดสอบคุณสมบัติไฟโคไซยานิน	9
บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	11
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. ค่ามาตรฐานโปรตีน	26
ภาคผนวก ข. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	27
ภาคผนวก ค ลำดับ DNA ที่ส่งไปยังฐานข้อมูล NCBI	29
ประวัติผู้วิจัย	31

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ไพเมอร์ ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนไฟโคไซยานิน	8
ตารางที่ 2	ผลการบ่งชี้ยีนไฟโคไซยานิน (*cpcA* และ *cpcB*) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI	14
ตารางที่ 3	ส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11	28
ตารางที่ 4	ส่วนผสมของ A5 trace metal	28

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	จีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	11
รูปที่ 2	ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์	13
รูปที่ 3	ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน (A): rTrx_ apo-α^{PC} และ (B): rTrx_ apo-β^{PC}	15
รูปที่ 4	ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE การแสดงออกของโปรตีน (A): rTrx_ apo-α^{PC} และ (B): rTrx_ apo-β^{PC} ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเม็ดโคบอลต์	16
รูปที่ 5	ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE ของโปรตีน (A) rTrx_apo-α^{PC} และ (B) rTrx_apo-β^{PC} ที่ทำให้เข้มข้นขึ้น และ exchanged ด้วย 50 mM Tris-Cl, pH8.0 ใน 10 kDa cutoff	17
รูปที่ 6	การทำ DPPH scavenging assay	19
รูปที่ 7	ผลการทำปฏิกิริยา DPPH หลังจากเวลาผ่านไป 30 นาที	19
รูปที่ 8	วิธีการทดสอบแบบ ABTS scavenging	20
รูปที่ 9	แสดงค่ามาตรฐานโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	26