



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอินซูลินไลก์โกรทแฟคเตอร์วัน  
ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*)  
[Construction of the recombinant Insulin-like growth factor-I protein  
of the false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*)]

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตตา บุญภักดี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล  
(งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการวิจัย 158906  
สัญญาเลขที่ 83/2557

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอินซูลินไลก์โกรทแฟคเตอร์วัน  
ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*)  
Construction of the recombinant Insulin-like growth factor-I protein  
of the false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตานันท์ บุษปภักดิ์  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กรกฎาคม 2558

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงาน คณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 83/2557

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณนฤตม พิสิษฐเกษม จากเพอคูล่าฟาร์ม ตำบลเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาการ์ตูนสำหรับการวิจัย และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนสถานที่ทำการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประเสริฐกุล

## บทคัดย่อ

รายงานฉบับนี้เป็นงานที่ทำในปีที่ 1 ของโครงการวิจัยที่ดำเนินการ 2 ปี ที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ของอินซูลินไลก์โกรทแฟคเตอร์วัน (Insulin-like growth factor-I; IGF-I) ซึ่งเป็นฮอร์โมนประเภทเปปไทด์ที่ส่วนใหญ่ผลิตออกมาจากตับเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโกรทฮอร์โมน โดยทำการโคลนยีน IGF-I จาก complementary DNA (cDNA) ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) ที่สามารถแปรรหัสได้เป็นโปรตีนสมบูรณ์โดยใช้ pETSUMO เป็นดีเอ็นเอพาหะ รีคอมบิแนนท์โปรตีน IGF-I (rIGF-I) ที่ผลิตได้อยู่ในสภาพละลายง่ายและแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 เมื่อเหนี่ยวนำด้วย isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside ความเข้มข้น 1 mM สามารถผลิต rIGF-I ได้ประมาณ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของ rIGF-I ภายหลังจากโปรตีนให้บริสุทธิ์แล้วนั้น จะดำเนินการวิจัยในปีที่ 2

## ABSTRACT

This is the first year report of a two-year project producing recombinant protein, Insulin-like growth factor-I (IGF-I), a polypeptide hormone mainly produced by the liver in response to the endocrine growth hormone stimulus. In this study, the clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) IGF-I complementary DNA (cDNA) encoding the mature protein was cloned in a pETSUMO expression vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 cells as a soluble protein upon induction with 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside. The yield of the recombinant IGF-I (rIGF-I) after key steps in the overall purification process is approximately 50  $\mu$ g/ml. The additional purified rIGF-I biological activity will be assessed in a second-year project.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ.....	1
2 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	3
3 ผลการทดลอง.....	9
4 ข้อวิจารณ์.....	13
5 สรุปผลการทดลอง.....	15
เอกสารอ้างอิง.....	16

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ผลผลิต PCR ของยีน IGF-1.....	9
2 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส IGF-I ของปลาการ์ตูนส้มขาวกับข้อมูล ของสิ่งมีชีวิตที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank.....	9
3 SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนของ rIGF-I ที่ผลิตจากเซลล์แบคทีเรีย.....	10
4 SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีน rIGF-I สกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ นาน 1 เดือน .....	11
5 SDS-PAGE ของ rIGF-I ภายหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จ Protino® Ni-TED.....	12