บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ความจำเป็นในการศึกษาและวิจัยเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาในกลุ่มปลาการ์ตูนให้ดีขึ้น เป็นประเด็นสำคัญต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทะเลสวยงามของไทยในปัจจุบัน เนื่องจากปลาในกลุ่มปลาการ์ตูนที่มีการเพาะและเลี้ยงกันในปัจจุบันนั้นมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้าโดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาการ์ตูนส้มขาว (false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*) ดังนั้นกระบวนการผลิต คัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ หรือสร้างสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีสีและรูปแบบของสีหรือลวดลายบนลำตัวที่หลากหลายย่อมดำเนินไปได้ช้า ดังนั้นการบูรณาการความรู้และเทคโนโลยีด้านยีน จะสามารถช่วยเสริมการเจริญเติบโตของปลาการ์ตูนได้ดียิ่งขึ้น จากความรู้ในปัจจุบันที่ทราบว่าเพศและพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ของปลาในกลุ่มปลาการ์ตูนนั้นจะถูกกำหนดหรือปรับเปลี่ยนได้ (sex reversal) ขึ้นอยู่กับขนาดลำตัวของปลาที่อาศัยร่วมอยู่ในฝูงเดียวกัน โดยในธรรมชาติปลาการ์ตูนที่มีขนาดตัวใหญ่ที่สุดในฝูงจะเป็นเพศเมีย ส่วนปลาการ์ตูนที่มีขนาดใหญ่รองลงมาเป็นเพศผู้ และเมื่อไม่มีปลาตัวเมียเดิมปรากฏอยู่ในสังคม ปลาตัวผู้จะสามารถพัฒนาตัวเองให้มีขนาดลำตัวใหญ่ขึ้นและกลายเป็นเพศเมียแทน เข้าคู่ใหม่และวางไข่ได้ ซึ่งพฤติกรรมดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์และแปรผันโดยตรงกับปริมาณโกรทฮอร์โมน (growth hormone; GH) และฮอร์โมนอินซูลินไลท์โกรทแฟคเตอร์วัน (insulin-like growth factor-I, IGF-I) ที่ปลาสร้างขึ้นในช่วงที่มีการเจริญเติบโต (Donalson et al., 1979; Duan et al., 1993; Fruchtman et al., 2000; Moriyama et al., 2000) ด้วยเหตุนี้การใช้ฮอร์โมน IGF-I เสริมในอาหารเพื่อเร่งให้ปลาเจริญเติบโตจึงเป็นแนวทางที่ผู้วิจัยต้องการนำมาใช้แก้ปัญหาในระยะยาว แต่เนื่องจากกลไกการทำงานของฮอร์โมน IGF-I จะมีความจำเพาะต่อ receptor ของฮอร์โมน IGF-I ของปลาแต่ละชนิดนั้นๆ และฮอร์โมน IGF-I ของปลาการ์ตูนยังไม่มีการผลิตขึ้นมาใช้แต่อย่างใด ดังนั้นการสร้าง recombinant protein ของยีน IGF-I (rIGF-I) จึงถูกพัฒนาขึ้นมาจากผลผลิตของยีนที่ปลาการ์ตูนสร้างขึ้นร่วมกับเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมสร้างขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรีย การเพิ่มปริมาณและสกัดแยกให้โปรตีนให้บริสุทธิ์แล้วนำมาใช้เป็นอาหารเสริมเร่งการเจริญเติบโต ก็จะเกิดประโยชน์สูงสุดต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทะเลสวยงามกลุ่มนี้ได้ในอนาคตอันใกล้ ซึ่งนอกจากการนำ rIGF-I มาใช้เร่งการเจริญเติบโตแล้วยังเอื้อประโยชน์ต่อการปรับเปลี่ยนเพศของปลาในกลุ่มนี้ได้เช่นกัน โดยจะมีผลต่อการเพิ่มขนาด ซึ่งจะทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถกำหนดและปรับพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ หรือผสมข้ามสายพันธุ์ทำได้ง่ายมากขึ้น นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้จากการวิจัยยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์น้ำสวยงามหรือสัตว์น้ำเศรษฐกิจสำคัญชนิดอื่นๆ ได้ต่อไป

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการศึกษาเป็นระยะเวลา 2 ปี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอินซูลินไลท์โกรทแฟคเตอร์วัน (rIGF-I) ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) (ทำการศึกษาในปีแรก) โดย rIGF-I ที่ผลิตได้จะถูกนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ (ดำเนินการศึกษาในปีที่ 2) โดยนำมาผสมกับอาหารให้ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนช่วงอายุประมาณ 2-4 เดือน กินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลานานประมาณ 4 สัปดาห์ และวัดประสิทธิภาพของ rIGF-I จากอัตราการเจริญเติบโตของปลาการ์ตูน และวัดระดับการแสดงออกของยีน IGF-I ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และยีน vitellogenin (VTG) ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการการเจริญพันธุ์ของเพศเมีย (Mikawa et al., 2006; Picha et al., 2008) ด้วยเทคนิค real-time PCR (Pfaffl, 2006) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาจักเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสวยงามในกลุ่มปลาการ์ตูนและคาดว่าจะสามารถขยายผลการทดสอบนำไปใช้ได้กับปลาทะเลสวยงามชนิดอื่นๆ รวมทั้งปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ใช้เพื่อการบริโภคได้ โดยเฉพาะนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในด้านการผสมพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ซึ่งกระบวนการสามารถเกิดขึ้นได้รวดเร็วขึ้นในอนาคตอันใกล้ ดังมีตัวอย่างความสำเร็จของการใช้เทคโนโลยีดังกล่าวแล้วนี้กับสัตว์น้ำเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น หอยเป๋าฮื้อ ปลาดุก ปลานิล ปลาเทราซ์ และปลาไซมอล (Fukuda et al., 2004 and references cited therein) เป็นต้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) ทำการผลิต rIGF-I ของปลาการ์ตูนส้มขาว ที่สามารถขยายการผลิตได้ในเซลล์แบคทีเรียและได้โปรตีนบริสุทธิ์ที่สามารถนำมาใช้เร่งการเจริญเติบโตของปลาการ์ตูนส้มขาวได้

2) ทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ rIGF-I ที่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของปลาการ์ตูนส้มขาวได้

1.3 ประโยชน์ที่จะได้รับจากงานวิจัย

1) จดบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank และได้จดอนุสิทธิบัตรกระบวนการผลิต rIGF-I ของปลาการ์ตูนส้มขาว

2) ได้ผลผลิต rIGF-I ที่สามารถใช้เร่งการเจริญเติบโตในกลุ่มปลาการ์ตูน หรือขยายผลกับปลาสวยงามชนิดอื่นๆ ได้

3) เกิดการพัฒนาสายพันธุ์ คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์กับกลุ่มสัตว์ทะเลสวยงามของไทยให้มีความก้าวหน้าได้อย่างรวดเร็ว

4) ได้ข้อมูลพื้นฐานเรื่องการเจริญเติบโตและพัฒนาการสืบพันธุ์ ซึ่งหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องสามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น สถาบันการศึกษา กรมประมง กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม และองค์กรเอกชน เช่น ฟาร์มเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 อุปกรณ์

1. T-Personal thermal cycler (Biometra, Germany)
2. Gel documentation and analysis system (Syngene, England)
3. Refrigerate microcentrifuge (J.P. Selacta, Spain)
4. Universal water thermostat BWT-U (Biosan, England)
5. Shaking incubator (Gallenkamp, U.K.)
6. Autoclave (Prestige Medical, England)
7. i-Mupid gel electrophoresis apparatus (Helix Technology, Canada)
8. Vortex REAX 2000 (Heidolph, Germany)
9. The Thermo Scientific Nanodrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
10. Omni Tissue Homogenizer (Omni International, USA)
11. StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)
12. Sonics Vibra cell VCX130 Ultrasonic Cell Disrupter (Sonics & Materials, Inc., USA)
13. Micropipette ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 µl
14. Micropipette tips และ filter tips ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 µl
15. Microcentrifuge tube ขนาด 0.2, 0.5, 1.5 และ 2 ml
16. Isofreeze PCR rack
17. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
18. หลอดแก้วและจานเพาะเชื้อ
19. บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร ปากครีบ กรรไกร ใบมีด และแท่งแก้ว
20. บ่อปูนเลี้ยงปลา ขนาด 70x70x50 cm^3
21. อุปกรณ์ให้ออกซิเจน

เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองด้านชีวเชิงโมเลกุล ทำให้ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส โดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

2.1.2 สารเคมี

1. TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)
2. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA)
3. RNeasy Mini Kit (QIAGEN, USA)
4. Ethyl 3-aminobenzoate (MS-222) (Sigma Aldrich, Germany)
5. RNA*later* solution (Ambion, Germany)
6. Chloroform (APS finechen, Australia)

7. Isopropanol (2-Propanol) (Sigma Aldrich, Germany)
8. Absolute ethanol (VWR Prolabo, France)
9. RNA storage solution (Ambion, Germany)
10. DNase I (AppliChem, Germany)
11. Random primer $p(dN)_6$ (4 µg/µl) (Roche Applied Science, Germany)
12. Nuclease free water (GIBCO™ Invitrogen Corperation, USA)
13. QIA prep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA)
14. RiboLock RNase inhibitor (Fermentas, USA)
15. GoTaq green master mix, 2X (Promega, USA)
16. 100 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas, USA)
17. SeaKem® LE agarose (Cambrex BioScience, USA)
18. 100 bp และ 1 kb DNA ladder Plus (Fermentas, USA)
19. Tris base (Invitrogen™ Life Technologies, USA)
20. Boric acid (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malaysia)
21. EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid) (Amresco, USA)
22. Ethidium bromide 10 mg/ml (Invitrogen™ Life Technologies, USA)
23. Champion™ pETSUMO Protein Expression System (Invitrogen™ Life Technologies, USA)
24. pGEM T-easy vector system (Promega, USA)
25. LB broth (Hardy Diagnostics, USA)
26. Bacto agar (Hardy Diagnostics, USA)
27. S.O.C. medium (Invitrogen™ Life Technologies, USA)
28. Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan)
29. High speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan)
30. PureLnik HQ Mini Plamsmid Purification Kit (Invitrogen™ Life Technologies, USA)
31. Filter Minisart (Sartoriasstedim biotech, Germany)
32. X-gal (Amresco, USA)
33. Lysozyme (Biotech Biobasic Inc., Germany)
34. Isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG) (Amresco, USA)
35. Ampicillin (T.P. Drug Laboratories, Thailand)
36. Kanamycin (Amresco, USA)
37. B-PER 6xHis Fusion Protein Purification Kit (Thermo Scientific, USA)
38. Proteinase inhibitor (Roche, Germany)
39. Protino® Ni-TED Resin (Macherey-Nagel, USA)
40. His GraviTrap Kit (GE Healthcare Life Sciences, USA)
41. UltraPure TEMED (Invitrogen™ Life Technologies, USA)

42. NEXT GEL, 10% Acrylamide solution (premixed) (Amresco, USA)
43. PageRuler prestained protein ladder (Fermentas, USA)
44. PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas, USA)
45. ชุดตรวจวัดคุณภาพน้ำ

2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.2.1 ตัวอย่างปลาการ์ตูนสำหรับการสร้าง rIGF-I

ปลาการ์ตูนที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ใช้ปลาที่มาจากการเพาะเลี้ยงจำนวน 1 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนส้มขาว อายุประมาณ 2 เดือน น้ำหนักประมาณ 0.1-0.2 กรัม จำนวน 3 ตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างทำโดยนำตัวอย่างปลามาสลบด้วยสารละลาย MS222 (Sigma) จากนั้นตัดแยกเนื้อเยื่อส่วนตับเก็บรักษาไว้ในสารละลาย RNA stabilization เพื่อทำการสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วสร้าง cDNA สายสมบูรณ์ที่เป็นของยีน IGF-I ในขั้นตอนต่อไป

2.2.2 การเตรียมอาร์เอ็นเอและสร้าง rIGF-I

นำตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในน้ำยา RNA stabilization มาสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีมาตรฐาน ตรวจสอบความสมบูรณ์และความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และ NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer จากนั้นสร้างสาย cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ตามวิธีมาตรฐาน แล้วนำมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต แล้วถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย จากนั้นแยกสกัด rIGF-I ที่มีการสร้างโปรตีนขึ้นภายในเซลล์ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ (ดัดแปลงตามวิธีที่รายงานโดย Mandi et al. (2009) และ Chen et al. (2000)) จากนั้นนำ rIGF-I ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพต่อไปซึ่งจะดำเนินการทดลองในปีที่ 2

2.2.3 การสร้าง rIGF-I ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*)

1) การทำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pET SUMO-IGF-I

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนที่ยืนยันผลโดยการโคลนและอ่านลำดับเบสแล้วมาเพิ่มปริมาณอีกครั้งด้วยไพรเมอร์ SumoIGF_L และ SumoIGF_R ที่ออกแบบเองในห้องปฏิบัติการจากนั้นเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pETSUMO (SUMO = small ubiquitin-related modifier) ในปฏิกิริยา ligation ที่ทำในหลอดทดลองผนังบางขนาด 0.6 ml จากนั้นนำสารผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง

2) การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pET SUMO-IGF-I เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ปิเปตพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมในข้อ 1) ปริมาตร 2 µl เติมลงในหลอด competent *E. coli* cells (OneShot®Mach1™) บ่มไว้ในอ่างน้ำแข็ง 20 นาที ทำการ heat-shock ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจุ่มลงในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม SOC medium ปริมาตร 250 µl เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง จากนั้นกระจายเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 100 µl โดยวิธี spread ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB-agar ที่มี Kanamycin จำนวน 50 µg/ml บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 °C เลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำการตรวจเช็คแล้วนำมาเจริญในอาหารเหลว (LB-Broth) ที่มี Kanamycin จำนวน 50 µg/ml ปริมาตร 2 ml

โดยนำไปเขย่าข้ามคืนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นจึงแยกสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วยชุดสำเร็จ PureLnik HQ Mini Plasmid Purification Kit

3) การสกัดพลาสมิดด้วยชุด PureLnik HQ Mini Plamsmid Purification Kit

ทำการปั่นเก็บเซลล์จากปริมาตรตั้งต้น 2 ml ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส เติม Re-suspension Buffer (R3) 250 µl กระจายเซลล์ให้ทั่วแล้วเติม Lysis Buffer (L7) 250 µl กลับหลอดทดลองไปมาเบา ๆ 5 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม Precipitation Buffer (N4) 350 µl กลับหลอดทดลองไปมาให้สารละลายเข้ากัน ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสใส่ใน Spin column 800 µl ปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติม Wash Buffer (W10) 500 µl ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่ผ่าน column เติม Wash Buffer (W9) 700 µl ปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่ผ่าน column แล้วนำไป ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำ column มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติม Nuclease-free water ปริมาตร 50 µl วัดปริมาณพลาสมิดด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000 Spectophotometer แล้วเก็บไว้ที่ -20 °C

4) ขั้นตอนการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ E. coli BL21 และทดสอบการแสดงออก

นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากขั้นตอน 2.9.3 จำนวน 5 ng (2 µl) ใส่ลงในหลอด competent cells BL21 (DE3) ปริมาตร 50 µl แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้น heat-shock ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 30 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ต่อ 5 นาที จากนั้นเติม S.O.C. medium ปริมาตร 250 µl เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมลงใน LB-Broth ปริมาตร 10 ml ที่มี Kanamycin จำนวน 50 µg/ml และ 1% glucose เขย่าข้ามคืนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C

a) การทดสอบการแสดงออกของ rIGF-I ในระดับปริมาตรน้อย

ปิเปตเซลล์ข้างต้น ปริมาตร 500 µl ใส่ลงในอาหาร LB ที่บรรจุใน flask จำนวน 10 ml ที่มี kanamycin เข้มข้น 50 µg/ml และ 1% glucose เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C เมื่อเซลล์เจริญถึงระยะ mid-log phase หรือมีค่า A_{600} เท่ากับ 0.6 แบ่งสารแขวนลอยเซลล์ออกเป็น 2 flasks ๆ ละจำนวน 5 ml เก็บไว้สำหรับทดสอบ คือ flask 1 นำมาเหนี่ยวนำด้วย IPTG และ flask 2 เลี้ยงต่อแบบปกติ ทั้งนี้ในแต่ละ flask มีการแบ่งและปั่นเก็บตะกอนเซลล์จากอาหารเหลวที่เลี้ยงครั้งละ 0.5 ml แช่เก็บรักษาไว้ที่ -20 °C เพื่อรอวิเคราะห์โปรตีน (เริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง) เฉพาะในส่วน flask 1 นำมาเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ทั้งนี้แบ่งและปั่นเก็บตะกอนเซลล์แต่ละครั้งๆ ละ 0.5 ml ในแต่ละช่วงเวลาดังกล่าว นำเซลล์ไปแช่เก็บรักษาไว้ที่ -20 °C เพื่อทำการวิเคราะห์หาการแสดงออกของโปรตีน เปรียบเทียบระหว่างการเหนี่ยวนำด้วย IPTG และไม่เหนี่ยวนำในแต่ละช่วงเวลา

b) การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนระดับปริมาตรมาก

ปิเปตเซลล์ที่เลี้ยงข้ามคืนข้างต้น ปริมาตร 5 ml ถ่ายลงในอาหารเหลว LB 100 ml (50 ml/ flask) ที่มี Kanamycin จำนวน 50 µg/ml และ 1% glucose เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อ

นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือเซลล์เจริญวัดค่า OD_{600} ได้เท่ากับ 0.4-0.6 จึงเติม 1M IPTG ปริมาตร 50 µl/ flask (1 mM final concentration) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วปั่นเก็บเซลล์โดยแยกใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 ml ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสวนใสทิ้ง นำเซลล์ที่ได้เก็บรักษาไว้ที่ -30 °C

5) การสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนและทำให้บริสุทธิ์ด้วย B-PER 6xHis Fusion Protein Purification Kit

กระจายเซลล์ด้วยสารละลาย B-PER ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 5 ml ซึ่งมีส่วนผสมของ Lysozyme (2,500 U/ml) จำนวน 10 µl Dnase I (50 mg/ml) จำนวน 10 µl และ Proteinase inhibitor (50 mg/ml) จำนวน 375 µl วางลงในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 ml ที่มี Nickel-Chelated Agarose จำนวน 1 ml เขย่าเบา ๆ ให้ Nickel-Chelated Agarose กระจายทั่วถึงนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ Nickel-Chelated Agarose จากนั้นเติม Wash Buffer (50 mM Tris-Cl, 300 mM NaCl, 25 mM Immidazole, 10% glycerol, pH 6.8) ปริมาตร 1 ml เขย่าเบา ๆ ให้ Nickel-Chelated Agarose กระจายทั่วถึงแล้วปิเปตปริมาตร 750 µl ใส่ลงใน column ขนาด 0.45 µm (รวม 3 column) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติม Wash Buffer 500 µl เขย่านาน 5 นาที แล้วปั่นด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง แล้วชะด้วย Elution Buffer (50 mM Tris-Cl, 300 mM NaCl, 200 mM Immidazole, 10% glycerol, pH 6.8) ปริมาตร 500 µl โดยเขย่าติดต่อกันนาน 5 นาที นำไปปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จะได้สารละลายที่ผ่าน column ทั้งหมด 3 ครั้งตามลำดับ คือ E1, E2 และ E3 แล้วนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE

6) การทำ rIGF-I ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Protino® Ni-TED หรือ His GraviTrap Kit

นำเซลล์ตั้งต้น 50 ml ที่ปั่นตกตะกอนแล้วมาเติมสารละลาย Lysis-Equilibration-Wash Buffer (LEW buffer) (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, pH 8.0) ปริมาตร 6 ml ที่มี Lysozyme (2,500 U/ml) จำนวน 20 µl, Dnase I (50 mg/ml) 20 µl และ Proteinase inhibitor (50 mg/ml) ปริมาตร 750 µl กระจายตะกอนเซลล์ แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียด้วยคลื่นเสียง (sonicator) ที่ amplitude 20 เฮิรตซ์ นาน 2 นาที พักแช่ในอ่างน้ำแข็ง 2 นาที ทำซ้ำสลับทั้งหมด 6 รอบ แล้วตั้งทิ้งไว้ต่ออีก 15 นาที ปั่นเก็บตะกอนที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที ปิเปตส่วนใสมากรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 µm แล้วแช่ไว้ในอ่างน้ำแข็ง

นำ Protino® Ni-TED Resin column หรือ His GraviTrap column มาทำการสมมูล (equilibration) ด้วย LEW Buffer ปริมาตร 2 ml แล้วเติมสารละลายส่วนใส (crude extracted protein) ที่ผ่าน filter ใส่ลงใน column เติม LEW Buffer 2 ml จำนวน 2 ครั้ง แล้วชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย Elution Buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) 1.5 ml จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยวิธี SDS-PAGE

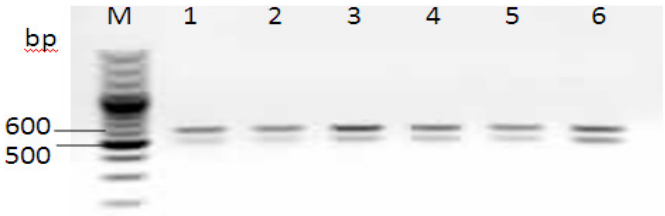
7) การแยกขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

ปิเปต Propure NEXT GEL 10 % ปริมาตร 6 ml ผสมกับ ammonium persulfate (APS; $(NH_4)_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 36 µl และ TEMED (N, N, N', N'-tetramethyl ethylenediamine) ปริมาตร 3.6 µl ผสมให้เข้ากันแล้วเตรียมเจลในชุดอุปกรณ์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง เตรียมสารละลายผสมของโปรตีนปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วยสารละลายโปรตีนจากข้อ 2.9.6 ปริมาตร 19 µl 5x protein loading buffer ปริมาตร 5 µl และ 20x reducing agent จำนวน 1 µl นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จุ่มลงในอ่างน้ำแข็งจากนั้นหยอดลงในช่องเจลที่เตรียมไว้โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน PageRuler prestained protein ladder ทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่กระแสไฟฟ้าคงที่ 40 mA (ประมาณ 100 โวลต์) นาน 1.30 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วย PageBlue Protein Staining Solution 20 ml ข้ามคืน ล้างสีส่วนเกินออกแล้วบันทึกภาพ

บทที่ 3
ผลการทดลอง

1. การเพิ่มปริมาณยีน IGF ของปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR)

ภายหลังจากนำ cDNA ที่สังเคราะห์มาจาก RNA ของตัวอย่างปลาการ์ตูนส้มขาวอายุประมาณ 2 เดือน มาเพิ่มจำนวนบริเวณยีน IGF-I ด้วยเทคนิค PCR โดยวิเคราะห์ผลผลิตด้วย agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1% เปรียบเทียบกับ DNA marker 100 bp ladder plus จำนวน 250 ng ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 µg/ml แล้วบันทึกภาพโดยส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation พบว่าได้ผลผลิต PCR ของยีนดังกล่าวมีขนาดเท่ากับ 558 คู่เบส (เมื่อยืนยันผลด้วยวิธีการอ่านลำดับเบสในภายหลัง) ปรากฏดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ผลผลิต PCR ของยีน IGF-1 ทำซ้ำ 6 ตัวอย่าง (1-6); M = Marker 100 bp

2. การเชื่อมต่อผลผลิต PCR กับพลาสมิด และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

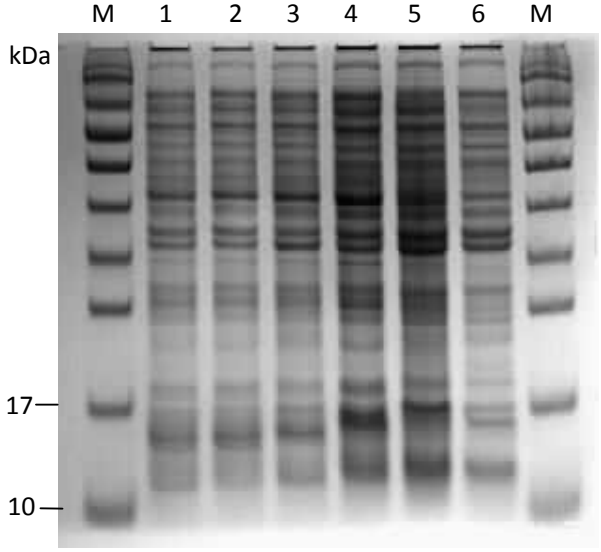
ผู้วิจัยนำผลผลิต PCR ของยีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จ Gel/PCR DNA fragments extraction kit จากนั้นแทรกผลผลิตลงไปในพลาสมิด pGEM T-easy เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีนแทรกไปทำให้บริสุทธิ์ แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัทเอกชน เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับปลาชนิดอื่นๆ ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรมผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เน็ต ยืนยันได้ว่าเป็นยีน IGF-I จริง และมีขนาดความยาวเท่ากับ 558 คู่เบส (มีจำนวน 185 ลำดับกรดอะมิโน) โดยเหมือนกับ IGF-I mRNA ของปลาการ์ตูน *Amphiprion melanopus* เท่ากับ 99% ดังแสดงในภาพที่ 2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Amphiprion melanopus preproinsulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA, complete cds	1002	1002	78%	0.0	99%	JX494724.1
PREDICTED: Stegastes partitus insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (igf1), mRNA	985	985	78%	0.0	99%	XM_008280881.1
Sciaenops ocellatus insulin-like growth factor I Ea-4 mRNA, complete cds	937	937	78%	0.0	97%	GQ443297.1
Pagrus auriga igfl mRNA for preproinsulin-growth factor I, complete cds	935	935	78%	0.0	97%	AB362309.1
Acanthopagrus latus IGF-I mRNA, complete cds	935	935	78%	0.0	97%	AY608674.1
Larimichthys crocea insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA, complete cds	931	931	78%	0.0	97%	JN565945.1

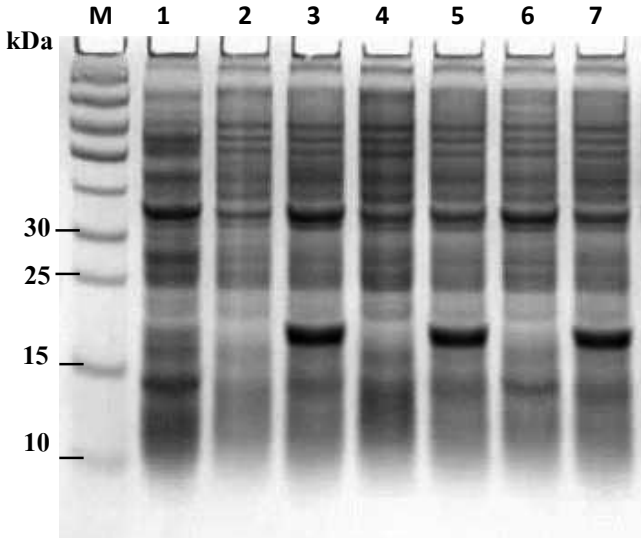
ภาพที่ 2 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส IGF-I ของปลาการ์ตูนส้มขาวกับข้อมูลของสิ่งมีชีวิตที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank

3. **การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน** IGF-I (rIGF-I)

เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีนที่สมบูรณ์ของ IGF-1 ที่ตรวจสอบลำดับเบสได้ทั้งหมดไปเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR แล้วแทรกลงในพลาสมิด pETSUMO เพื่อให้ยีนมีการสร้างโปรตีน จากนั้นคัดเลือกโคลนแล้วส่งอ่านลำดับเบสซ้ำเพื่อยืนยันอีกครั้ง ก่อนนำพลาสมิดลูกผสมดังกล่าวถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย BL21(DE 3) ที่มียาปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยเจริญเซลล์จนกระทั่งวัดค่า OD_{600} เท่ากับ 0.6 จากนั้นจึงชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนที่เวลา 0, 3, และ 6 ชั่วโมง แล้วปั่นเก็บเซลล์ในแต่ละช่วงเวลาเพื่อไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนต่อไป และผลการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 12% SDS PAGE ที่ทำใน NEXT GEL™ Running buffer เปรียบเทียบกับ PageRuler Prestained protein ladder ภายใต้กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และย้อมด้วย PageBlue™ พบว่าได้ผลผลิตโปรตีนที่ดีที่สุดเมื่อเจริญเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปรากฏดังภาพที่ 3 ช่องหมายเลข 4 และเมื่อทำการทดสอบเก็บเซลล์ไว้เป็นระยะเวลานาน 1-2 เดือน ทดสอบแล้วพบว่าสามารถผลิตโปรตีนได้เช่นเดิม (ภาพที่ 4 ช่อง 3, 5, 7)



ภาพที่ 3 SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนของ rIGF-I ที่ผลิตจากเซลล์แบคทีเรีย



M = PageRuler protein ladder
1 = จากเซลล์แบคทีเรียตั้งต้น
2, 4, 6 = ไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 3 ชั่วโมง
3, 5, 7 = เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 3 ชั่วโมง

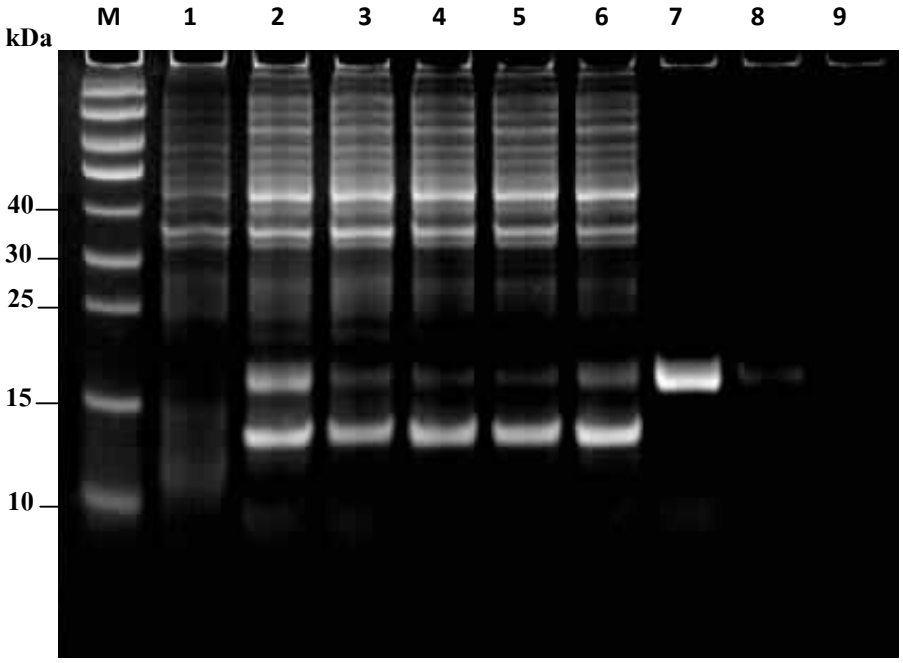
ภาพที่ 4 SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีน rIGF-I สกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้นาน 1 เดือน (แสดงจำนวน 3 โคลนช่องที่ 3, 5 และ 7)

4. การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Protino® Ni-TED

เมื่อนำเซลล์ตั้งต้น 10 ml ที่ปั่นตกตะกอนมาเติมสารละลาย (LEW buffer) (50mM NaH_2PO_4, 300 mM naCl, pH 8.0) ปริมาตร 3 ml ที่มี Lysozyme (2,500 U/ml) จำนวน 10 µl, Dnase I (50 mg/ml) 4.5 µl, Protease Inhibitor Cocktail Tablet แล้วกระจายตะกอนเซลล์แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วทำลายผนังเซลล์ด้วย Sonicator ที่ amplitude 20 เฮิรตซ์ นาน 2 นาที พัก 2 นาที ทำซ้ำสลับทั้งหมด 8 รอบ แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที นำมาปั่น 10,000 รอบต่อนาที 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วปิเปตส่วนใสกรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 µm แช่ไว้ในอ่างน้ำแข็ง

จากนั้นนำ Protino® Ni-TED Resin column มาทำการสมมูล ด้วย LEW buffer ปริมาตร 2 ml แล้วเติมสารละลายส่วนใสที่ผ่าน filter ลงใน column แล้วเติม LEW buffer ปริมาตร 2 ml จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย Elution Buffer (50mM NaH_2PO_4, 300 mM naCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) 1.5 ml จำนวน 3 ครั้ง วิเคราะห์ผลด้วยวิธี SDS-PAGE ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ แสดงดังภาพที่ 5 ช่องที่ 7, 8 และ 9

โดยสรุป เมื่อเจริญเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 ปริมาตรตั้งต้น 10 ml น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 0.5 g จะสามารถผลิต rIGF-I ที่บริสุทธิ์ได้ประมาณ 0.5 mg



ภาพที่ 5 SDS-PAGE ของ rIGF-I ภายหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จ Protino® Ni-TED

M = PageRuler protein ladder
1 = ไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลาเริ่มต้น
2 = เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 3 ชั่วโมง
3 = Flow througt Fraction 1
4 = Flow througt Fraction 2
5 = Flow througt Fraction 3
6 = Wash buffer fraction 1
7 = Elution Fraction 1
8 = Elution Fraction 2
9 = Elution Fraction 3

บทที่ 4
ข้อวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ทำการโคลนยีน IGF-I จาก cDNA ด้วยการถอดรหัสย้อนกลับจาก mRNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาการ์ตูนส้มขาวแล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มามีข้อความของยีน IGF-I ที่สมบูรณ์ (full length) มีขนาด 558 คู่เบส หรือมีจำนวน 185 ลำดับกรดอะมิโน โดยยืนยันผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequencer

ในขั้นตอนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน IGF-I (rIGF-I) จากเซลล์แบคทีเรียนั้นทำโดยการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเข้ากับพลาสมิด pETSUMO (Invitrogen™ Life Technologies; www.invitrogen.com) ด้วยวิธี TA-cloning ได้เป็นพลาสมิดลูกผสม pETSUMO-IGF-I ก่อนถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen™ Life Technologies) การที่เลือก pETSUMO เป็นดีเอ็นเอพาหะ (expression vector) เนื่องจากกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ของปลาโดยทั่วไปที่ใช้ระบบเซลล์แบคทีเรียนั้น มีรายงานว่ามักประสบปัญหาโปรตีนที่สร้างภายในเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในรูป inclusion bodies ซึ่งละลายยาก และเมื่อสกัดโปรตีนออกมาจากเซลล์แล้วโปรตีนมักมีการม้วนพับผิดรูป และอยู่ในสภาพที่ไม่ทำงาน (inactive or non functional) (Chang, et al., 2002; Baranauskaite et al., 2005) แต่พลาสมิด pETSUMO เป็นดีเอ็นเอพาหะที่มีข้อความพันธุกรรมของยีน SUMO (small ubiquitin-related modifier) โดยโปรตีน SUMO ที่สังเคราะห์จะมีคุณสมบัติช่วยให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีนที่เชื่อมต่อด้วยนั้นละลายได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้ในขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้งานทำได้ง่ายไม่ยุ่งยาก และอีกประการหนึ่งพลาสมิดลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อยีนเข้ากับพลาสมิด pETSUMO จะมีความเสถียรมากกว่าการใช้พลาสมิดชนิดอื่นเป็นดีเอ็นเอพาหะ (Butt et al., 2005; Sun et al., 2008; Wang et al., 2010)

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีน IGF-I เข้ากับพลาสมิด pETSUMO นั้นชิ้นดีเอ็นเอของยีน IGF-I อยู่ในตำแหน่งในเฟรม (in-frame) ต่อจากยีน SUMO และ 6x Histidine ซึ่งการสังเคราะห์โปรตีนจะอยู่ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter ดังนั้น rIGF-I ที่ถูกสร้างออกมาจะมี Histidine จำนวน 6 ตัว เชื่อมต่อกับ SUMO ที่ตำแหน่งปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของโปรตีน ซึ่งเป็น rIGF-I ที่มีคุณสมบัติละลายง่ายและสามารถแยกให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไปได้ด้วยวิธี His-Tag purification resin ซึ่งเป็นระบบ Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) ที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้กันในปัจจุบัน

เมื่อถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) จะใช้เซลล์ตั้งต้น 50 ml ผสมยาปฏิชีวนะ Kanamycin 50 µg/ml และ glucose 1% เลี้ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเหนี่ยวนำให้มีการผลิต rIGF-I ด้วยสารละลาย IPTG ความเข้มข้น 1 mM นานตั้งแต่ 1-3 ชั่วโมง เมื่อทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลาย B-PER สามารถตรวจสอบการสังเคราะห์ rIGF-I ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบ SDS-PAGE โดยจะพบแถบโปรตีนเข้มของ rIGF-I ของปลาการ์ตูนส้มขาวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17 kDa (ภาพที่ 3) ดังที่คาดการณ์ไว้ด้วยวิธีการคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (ExPASy, http://expasy.org/) ซึ่งมีค่าประมาณ 5 kDa รวมกับโปรตีน SUMO ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12 kDa (Invitrogen™ Life Technologies) แต่อย่างไรก็ตามค่าน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงควรวิเคราะห์แถบโปรตีนนี้เพื่อยืนยันผลอีกครั้งด้วยวิธี MALDI-TOF mass spectrometry

กระบวนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปทดสอบในขั้นต่อไปนั้น ขั้นตอนการเจริญเซลล์และเหนี่ยวนำทำเช่นเดียวกันกับข้างต้นแต่ทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 mM เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ซึ่งขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกเลือกใช้ 2 วิธีด้วยกัน คือใช้สารละลาย B-PER (PIERCE) และเครื่อง

ultrasonic homogenizer (sonicator) ที่ทำให้เซลล์แตกในบัฟเฟอร์ด้วยคลื่นเสียงซึ่งวิธีหลังมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าวิธีแรก ขั้นตอนต่อไปคือการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยที่บัฟเฟอร์ที่ใช้ต้องเหมาะสมกับบัฟเฟอร์ที่เก็บรักษาโปรตีนหลังทำให้เซลล์แตก ซึ่งในที่นี้ใช้ชุดคอลัมน์และบัฟเฟอร์สำเร็จรูป Nickel-Chelated Agarose และ His GraviTrap Kit (ภายหลังแทนด้วย Protino® Ni-TED ที่มีราคาถูกกว่า) ตามลำดับ และในขั้นตอนสุดท้ายจำเป็นต้องชะ rIGF-I ออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย imidazole ความเข้มข้น 250 mM (ในสารละลาย 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, pH 8.0) ในวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ แต่ด้วยเหตุที่ต่อไปจะต้องทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของ rIGF-I ด้วยการผสมกับอาหารแล้วให้ปลาการ์ตูนส้มขาวัยอ่อนกิน ดังนั้นถ้ามี imidazole อยู่ใน rIGF-I จะก่อความเป็นพิษได้ (LD_{50}ในหนู = 960-970 mg/kg bwt) (www.inchem.org) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการขจัด imidazole ออกด้วยวิธี dialysis (10,000 MWCO) ในตัวกลางที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate ความเข้มข้น 50 mM (pH 7.8) ข้ามคืน และเก็บรักษาไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate เข้มข้น 25 mM ซึ่งผู้วิจัยได้ทดสอบนำ rIGF-I ที่เก็บไว้นาน 1 เดือน นำออกมาละลายน้ำกลั่นปริมาตรเท่าเดิม (0.5 ml) แล้วนำไปแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ยังคงพบว่าแถบโปรตีนเข้มที่ปรากฏมีลักษณะและขนาดเท่าเดิม ไม่เสียสภาพ ส่วนการผลิตซ้ำปริมาณมากและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของ rIGF-I ด้วยวิธีการนำไปผสมกับอาหารให้ปลาการ์ตูนส้มขาวัยอ่อนกินแล้ววัดอัตราการเจริญเติบโตและระดับการแสดงออกของยีน IGF-I และยีน vitellogenin นั้นผู้วิจัยจะดำเนินการทดสอบในปีที่ 2 ของโครงการวิจัยต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนสังเคราะห์อินซูลินไลท์โกรทแฟคเตอร์วัน (rIGF-I) ของปลาการ์ตูนส้มขาว และสามารถเพิ่มจำนวน cDNA สายสมบูรณ์ทั้งหมดได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ยืนยันด้วยวิธีการอ่านลำดับเบสพบว่า มีขนาดเท่ากับ 558 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 185 ตัว โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5 kDa

2. ได้พลาสมิดลูกผสม pETSOMO-IGF-I ที่เกิดจากการเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอพาหะ pETSUMO กับชิ้นดีเอ็นเอที่มีข้อความที่สมบูรณ์ของยีน IGF-I ซึ่งสามารถถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ได้

3. สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน IGF-I (rIGF-I) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17 kDa ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM ซึ่งโปรตีนมีคุณสมบัติละลายง่าย สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธี His-Tag purification rasin ซึ่งเป็นระบบ Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) และผ่านกระบวนการกำจัด imidazole ออกด้วยวิธี dialysis ในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate (pH 7.8) ความเข้มข้น 50 mM ข้ามคืน และเก็บรักษาไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate (pH 8) ความเข้มข้น 25 mM ทั้งนี้เซลล์แบคทีเรียตั้งต้น 10 มิลลิลิตร จะผลิต rIGF-I ได้ประมาณ 0.5 mg

สรุปผลสำเร็จของการวิจัย

ปี พ.ศ.	รายละเอียดผลสำเร็จ	ประเภทผลสำเร็จ
2557	ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน IGF-I ที่สามารถแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย (clude extracted protein)	I
2557	ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน IGF-I บริสุทธิ์ในระดับห้องปฏิบัติการสำหรับทดลอง	G

เอกสารอ้างอิง

Baranauskaite, L., Sereikaite, J., Gedminiene, G., Bumeliene, Z. and Bumelis, V.-A. 2005. Refolding of porcine growth hormone from inclusion bodies of *Escherichia coli. Biocatalysis and Biotransformation* 23, 185-189.

Butt, T.R., Edavettal, S.C., Hall, J.P., Mattern, M.R. 2005. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* 43, 1-9.

Chang, C.-C., Tsai, C.-T. and Chang, C.-Y. 2002. Structural restoration of inactive recombinant fish growth hormones by chemical chaperonin and solvent restraint. *Protein Engineering* 15, 437-441.

Chen, Y.,Wang, Y., He, S., Zhu, Z. 2004. Cloning and sequencing of the growth hormone gene of large yellow croaker and its phylogenetic significance. *Biochem Genet*. 42, 365-375.

Donaldson, E.M., Fagerlund, U.H.M., Higgs, D.A., and McBride, J.R. 1979. Hormonal enhancement of growth. In W.S., Hoar, D.J. Randall, and J.R. Brett (Eds.), *Fish Physiology* Vol. VIII (pp. 456-597). Academic Press, New York.

Duan, C., Duguay, S.J. and Plisetskaya, E.M. 1993. Insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: Tissue distribution and effects of growth hormone/ prolactin family peptides. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 371-379.

Fruchtman, S., Jackson, L. and Borski, R.J. 2000. Insulin-like growth factor-I disparately regulates prolactin and growth hormone synthesis and secretion: studies utilizing the teleost pituitary model. *Endocrineology* 141, 2886-2889.

Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P. and Dickhoff, W. 2004. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *Gen. Comp. Endocrinol*. 139, 61-71.

Mandi, N., Soorapaneni, S., Rewanwar, S., Kotwal, P., Prasad, B., Mandal, G. and Padmanabhan, S. 2009. High yielding recombinant Staphylokinase in bacterial expression system-cloning, expression, purification and activity studies. *Protein Expression and Purification* 64, 69-75.

Mikawa, N, Utoh, T., Horie, N., Okamura, A., Yamada, Y., Akazawa, A., Tanaka, S., Tsukamoto, K., Hirono, I. and Aoki, T. 2006. Cloning and characterization of vitellogenin cDNA from the common Japanese conger (*Conger myriaster*) and vitellogenin gene expression during ovarian development. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 143, 404-414.

Moriyama, S., Ayson, F.G. and Kawauchi, H. 2000. Growth regulation by Insulin-like growth factor-I in fish. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 64, 1553-1562.

Pfaffl, M.W. 2006. Relative quantification, Real Time PCR (BIOS advanced methods). Taylor and Francis, pp. 63-82.

Picha, M.E., Turano, M.J., Beckman, B.R. and Borski, R.J. 2008. Endocrine biomarkers of growth and applications to aquaculture: a minireview of growth hormone, insulin-

like growth factor-I, and IGF-binding proteins as potential growth indicators in fish. North *American Journal of Aquaculture* 70, 196-211.

Sun, Z., Xia, Z., Bi, F. and Liu, J.N. 2008. Expression and purification of human urodilatin by small ubiqutin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 495-502.

Wang, H.., Xiao, Y., Fu, L., Zhao, H., Zhang, Y., Wan, X., Qin, Y., Huang, Y., Gao, H. and Li, X. 2010. High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*. BMC Biotechnology 10: 14.