การคัดกรองเชิงบวกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย

นายวชิรศักดิ์ วังกังวาน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 7 7 2 4 4 7 5 2 3

POSITIVE SCREENING AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF CALCIUM SIGNAL INHIBITOR FROM PLANT EXTRACTS USING *Saccharomyces cerevisiae* MUTANT

Mister Wachirasak Wangkangwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007
Copyright of Chulalongkorn University

502084

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองเชิงบวกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย
โดย	นาย วชิรศักดิ์ วังกังวาน
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

.... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

วชิรศักดิ์ วังกังวาน : การคัดกรองเชิงบวกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย. (POSITIVE SCREENING AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF CALCIUM SIGNAL INHIBITOR FROM PLANT EXTRACTS USING *Saccharomyces cerevisiae* MUTANT) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. ชุลี ยมภักดี, 102 หน้า.

การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ระบบยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นวิธีการคัดกรองแบบใหม่ ซึ่งจะช่วยเพิ่มโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ยังไม่ถูกค้นพบได้จากวิธีการคัดกรองที่มีอยู่เดิม ระบบนี้มีความเกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling pathway) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งเซลล์จากระยะ G2-M ในยีสต์ เมื่อทำการกระตุ้นวิถีนี้ด้วยการเลี้ยงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*zds1* ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง จะทำให้เซลล์ยีสต์ดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้ แต่หากมีสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่อยู่ในส่วนสกัดอย่างหยาบไปยับยั้งที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม จะทำให้เซลล์ยีสต์ดังกล่าวสามารถแบ่งตัวได้ตามปกติ จากการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชในประเทศไทยจำนวน 141 ชนิด พบว่ามีสารสกัดอย่างหยาบที่ให้ผลบวก 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร และกระชาย ในการศึกษานี้ได้เลือกเฉพาะกระชายเพื่อการศึกษาต่อไป จากการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดอย่างหยาบจากกระชายและติดตามฤทธิ์ด้วยระบบยีสต์ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกได้ 3 ชนิด ได้แก่ pinostrobin, alpinetin และ pinocembrin chalcone พบว่า pinostrobin ให้ผลบวกในระบบยีสต์แรงที่สุด และฤทธิ์ในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์นี้ได้ถูกยืนยันโดยพบว่า pinostrobin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งสัญญาณของแคลเซียมที่กระตุ้น การเกิดสัณฐานวิทยาการแตกหน่อที่ผิดปกติ (abnormal bud morphology) รวมทั้งไม่ทำให้เกิดการชะลอการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2-M (G2 phase cell cycle delay) จากการศึกษาเบื้องต้นถึงโมเลกุลเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของ pinostrobin ในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์พบว่า pinostrobin ไม่ได้ออกฤทธิ์โดยการลดระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์และ ไม่ได้ยับยั้งโปรตีน Calcineurin Mpk1 หรือ Mck1

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

4772447523 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORD: YEAST/CALCIUM SIGNAL INHIBITOR/PLANTS/SCREENING

WACHIRASAK WANGKANGWAN: POSITIVE SCREENING AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF CALCIUM SIGNAL INHIBITOR FROM PLANT EXTRACTS USING *Saccharomyces cerevisiae* MUTANT. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. CHULEE YOMPAKDEE, Ph.D., 102 pp.

A positive screening system using a mutant strain of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, to screen for bioactive compounds was used in this study. The principle of the assay based on one of the roles of intracellular Ca^{2+} signal in yeast in controlling of cell-cycle progression at G2-M phase. When growing the mutant yeast cells in medium with high concentration of Ca^{2+}, the high Ca^{2+} signal causes the mutant yeast cells (as indicator cells) to arrest at G2 phase, resulting in no growth phenotype. However, if there is a Ca^{2+} signal inhibitor as a small molecule presence in the crude plant extracts, the yeast cells can be able to grow normally in medium with high Ca^{2+} concentration. Two positive crude ethanol extracts were obtained from the screens of 141 plants in Thailand using the Δ*zds1* yeast mutant growth assay. There were *Andrographis paniculata* (APA) and *Boesenbergia pandurata* (BPA). Only the latter was chosen for further study. Biological activities in fractions from column chromatography of crude extract of *B. pandurata* were monitored by the yeast based assay. After purification of the positive fractions, three pure compounds were obtained: pinostrobin, alpinetin and pinocembrin chalcone. Among them, pinostrobin showed the strongest activity in the assay. Inhibition of the calcium signaling pathway by pinostrobin was confirmed by flow cytometry profile and bud morphology studies. Pinostrobin at 1mM could inhibit the hyperactivation of Ca^{2+} caused abnormal cell morphology and the G2-M cell cycle delay. Regarding to the search for molecule that pinostrobin target at in the Ca^{2+} signaling pathway, it was found that not the intracellular Ca^{2+}, Calcineurin, Mpk1 nor Mck1.

Department ....Microbiology.............Student's Signature...วชิรศักดิ์ วังคะวาน.........

Field of Study Industrial Microbiology......Advisor's Signature..........(signature)............

Academic Year.......2007.........................Coadvisor's signature..............................

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ Prof. Tokichi Miyakawa Department of Molecular Biotchnology, Graduate School for Advanced Science and Matter, Hiroshima University Japan ที่กรุณาให้สายพันธุ์ยีสต์และพลาสมิดต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยนี้รวมทั้งให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีต่างๆ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีต่างๆ

กราบขอบพระศาสตราจารย์ ดร. โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์ และขอขอบคุณนางสาวกษมา สุขาภิรมย์ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง Flow cytometer และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง.. ฌ

สารบัญรูป .... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม.. 4

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.. 13

3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง 13

3.2 เคมีภัณฑ์.. 14

3.3 ยีสต์และแบคทีเรีย.. 15

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ 16

3.5 วิธีการสร้างพลาสมิด pYES2::*GAL1p-MCK1*.................................... 16

3.6 การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยระบบยีสต์จากตัวอย่างพืช...... 22

3.7 ทดสอบระดับแอคติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์.............................. 37

3.8 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของสารออกฤทธิ์ที่คัดกรองจากระบบยีสต์โดยการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*zds1* โดยเครื่อง Flow cytometry และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา............. 38

3.9 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์เซลล์.. 40

3.9.1 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อ MPK1 และ Calcineurin... 40

3.9.2 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในยีสต์เซลล์... 41

3.9.3 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อช่วง downstream ของ Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1.. 44

บทที่ **หน้า**

บทที่ 4 ผลการทดลอง.. 46

4.1 การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยระบบยีสต์................................... 46

4.2 ทดสอบระดับแอคติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์................................... 59

4.3 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของสารออกฤทธิ์ที่คัดกรองได้จากระบบยีสต์โดย Flow cytometry และลักษณะการแตกหน่อของยีสต์.. 61

4.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1* โดยเครื่อง Flow cytometry 62

4.3.2 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของ pinostrobin ที่คัดกรองจากระบบยีสต์โดย Flow cytometry profile และลักษณะการแตกหน่อของยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1*........................... 64

4.4 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของ pinostrobin ในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์.. 69

4.4.1 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์.. 69

4.4.2 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อ Mpk1 และ Calcineurin 70

4.4.3 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในช่วง downstream จาก Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1............. 72

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.. 76

รายการอ้างอิง.. 82

ภาคผนวก.. 88

ภาคผนวก ก 89

ภาคผนวก ข 94

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 102

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

2.1 เวปไซด์ของฐานข้อมูลหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยีสต์.. 5
2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเป้าหมายกับฤทธิ์ทางชีวภาพในระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์สายกลาย Δ*zds1* เป็นเซลล์บ่งชี้.. 12
3.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.. 15
3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้.. 15
3.3 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้.. 16
3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.. 16
3.5 รายชื่อสมุนไพรไทยที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์.. 22
4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย............... 46
4.2 ผลการทดสอบระดับแอคติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์.. 60
4.3 ผลของ pinostrobin ต่อระดับแคลเซียมในเซลล์โดยการวัดระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ ß-Galactosidase.. 70

สารบัญรูป

ภาพประกอบ **หน้า**

2.1 ความสัมพันธ์ของ essential ยีนที่ทำหน้าที่หลักของมนุษย์กับยีสต์................................ 7

2.2 แบบจำลองวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling pathway) ในยีสต์ *S. cerevisiae*.. 10

3.1 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิด pYES2.. 19

3.2 การจัดตั้งอุปกรณ์สำหรับการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ........................ 36

3.3 ส่วนประกอบภายในพลาสมิด pKC190 ซึ่งมี *PMR2A* promoter เชื่อมกับ ORF ของเอนไซม์ ß-galatosidase... 41

4.1 ฟ้าทลายโจร *Andrographis paniculata*... 57

4.2 กระชายเหลือง *Boesenbergia pandurata*... 57

4.3 ลักษณะของจานเพาะเชื้อที่ให้ผลการทดสอบบวกของสารสกัดอย่างหยาบจากกระชายเหลือง (BPA) และฟ้าทลายโจร (APA) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี FK506 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ ethanol เป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ........................... 58

4.4 โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายเหลือง............................ 59

4.5 ผลของการทดสอบด้วยระบบยีสต์ของ pinostrobin, alpinetin, pinocembrin chalone ที่คัดกรองได้จากกระชายเหลืองที่ค่าความเข้มข้นต่างๆในหน่วยมิลลิโมลาร์ โดยใช้ FK506 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์และ ethanol เป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ............................ 61

4.6 Flow cytometry profile ของเซลล์ยีสต์ที่ถูกกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมด้วย $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 3, 4, 5, และ 6 ชั่วโมง โดยแกน x แสดงปริมาณดีเอ็นเอ แกน y แสดงปริมาณเซลล์ 1C คือปริมาณดีเอ็นเอหนึ่งเท่า 2C คือปริมาณดีเอ็นเอเป็นสองเท่า 63

4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของการแตกหน่อของยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*zds1* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้กำลังขยาย 40 เท่า.. 63

4.8 Flow cytometry profile ของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*zds1* เมื่อบ่มด้วย pinostrobin ก่อนที่จะมีการกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมด้วย $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ และมี FK506 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 500 นาโนโมลาร์เป็นตัวควบคุมผลบวก 65

หน้า

ภาพประกอบ

4.9 ผลของ pinostrobin ที่มีต่อการแตกหน่อของยีสต์ภายใต้สภาวะที่วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายถูกกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ด้วยความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า ตัวเลขด้านล่างของภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อที่ผิดปกติ (Elongated bud) 66

4.10 ผลของสารบริสุทธิ์ pinostrobin ที่มีต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ (budding) ภายใต้สภาวะที่วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายถูกกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดีเอ็นเอในนิวเคลียสถูกย้อมด้วยสี Hoechst 33342 โดยรูปทางขวาแสดงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้อง Fluorescence (กำลังขยาย 40 เท่า).. 68

4.11 หลักการของการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน Mpk1 หรือ Calcineurin โดยใช้หลักการเกิด synthetic lethality.. 71

4.12 ผลการทดสอบของ pinostrobin ที่มีต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย........................ 72

4.13 ลักษณะสัณฐานของยีสต์สายพันธุ์ Δ*zds1* ที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนในพลาสมิด ซึ่งอยู่ในเซลล์ด้วย galactose เป็นเวลา 10 ชั่วโมงโดยที่รูปทางขวามีการเติม pinostobin ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ตัวเลขด้านล่างซ้ายของภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อที่ผิดปกติ (Elongated bud) 74

4.14 ลักษณะการแบ่งนิวเคลียสภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ของยีสต์สายพันธุ์ Δ*zds1* ที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนในพลาสมิดซึ่งอยู่ในเซลล์ด้วย galactose เป็นเวลา 10 ชั่วโมง โดยที่รูปทางขวามีการเติม pinostobin ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์.. 75

5.1 วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดย ⊢ แทนเป้าหมายของการยับยั้งวิถีของ pinostrobin ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้.. 79