

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

โครงการวิจัย เรื่อง การใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อผลิตเปปไทด์ต้านอนุมูล
อิสระ และต้านการแบ่งตัวของเซลล์จากเมล็ดผลไม้ไทยใน *Pichia pastoris* GS115

**Application of molecular genetic techniques to produce antioxidative and
antiproliferative peptides from Thai fruit seeds in *Pichia pastoris* GS115**

อาจารย์ ดร.ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2558

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจากรศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวนิช ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ อ.ดร. ศรีนทิพ สุกใส สำหรับเชื้อ *P. pastoris* GS115 และคำปรึกษาเกี่ยวกับ *P. pastoris*

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. อภิชาติ กาญจนทัต ผู้ร่วมวิจัยโครงการสำหรับการคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยโครงการ น.ส.ชนพร วิชัย และนิสิตในควบคุมดูแล น.ส.วรรณพร วรรณ ภู่เล็กที่ช่วยวิจัยโครงการในนี้

นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณบุคคลากรทุกท่านในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือทุกอย่างจนรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้สำเร็จไปได้

และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2558 สำหรับทุนวิจัยในโครงการนี้ด้วย

บทคัดย่อ

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งธรรมชาติได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน เมล็ดผลไม้เป็นแหล่งสะสมอาหารซึ่งมีความเป็นไปได้สูงในการพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดลำไย โดยตั้งชื่อว่า Longan 1 (ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF) ทั้งนี้การสกัดจากธรรมชาติโดยตรงยังพบปัญหา เช่น การควบคุมส่วนผสมของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสต งานวิจัยนี้จึงเลือกเทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมาใช้แก้ปัญหา โดยออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้ประกอบด้วยออกแบบนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสแล้วได้เป็นลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ Longan 1 เรียงต่อกัน 4 ชุด แต่ละชุดคั่นด้วยโคดอนกรดอะมิโนแอสพาร์ติก เพื่อให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอยาวเพียงพอสำหรับการจัดการด้วยเทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล จากนั้นตัดต่อเข้าเวกเตอร์พาหะ pPICZ0A และนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* GS115 เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก พบโปรตีนที่คาดว่าเป็นรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายขนาดประมาณ 10 และ 20 กิโลดาลตัน อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี แล้วพบว่าไม่ใช่รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ต้องการ นอกจากนี้การใช้ *P. pastoris* ในการแสดงออกพบปัญหาหลายประการ จึงได้ทำการแก้ปัญหาโดยเปลี่ยนระบบการแสดงออกเป็น *Escherichia coli* โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอชิ้นเดียวกันใส่เข้าพลาสมิด pQE-30 Xa และนำเข้าสู่ *E. coli* MG1655 โดยเมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตันในส่วนโปรตีนละลายน้ำ ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ต้องการเมื่อทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์และตรวจสอบด้วยวิธี Western Blot นอกจากนี้ยังพบการต้านออกซิเดชันเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีต่างๆ โดยเฉพาะไนตริกออกไซด์เมื่อเทียบกับข้อมูลของโปรตีนไฮโดรไลเสต และยังพบว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งกระเพาะ (KATO-III)

คำสำคัญ: อนุมูลอิสระ, สารต้านอนุมูลอิสระ, รีคอมบิแนนท์เปปไทด์, ลำไย, *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Bioactive peptides from natural sources are currently favorable. Fruit seeds are sources of accumulated food, so there are potential sources for discovering bioactive peptides. In this research, an antioxidative peptides from longan seeds, named as Longan 1 (ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF) was selected. However, direct extraction of the peptides from natural sources encounters some problems such as controlling of peptide composition in protein hydrolysate. To overcome these problems, molecular genetic technique is chosen in this research by designing DNA fragment containing 4 repeats of the Longan 1 peptide linked by the codons of Aspartic acid in order to obtain adequately long peptides for being manipulated by molecular genetic technique. Then, the DNA fragment was inserted into the expression vector, pPICZαA and further integrated onto *P. pastoris* GS115 chromosome. After induction, the expected 10 and 20 kDa protein bands were revealed. However, they were not target peptide after being verified by mass spectrometry. Furthermore, there were several problems when using *P. pastoris* as expression host. Therefore, to solve these problems, the expression system was changed to *Escherichia coli*. The same DNA fragment was inserted into the plasmid pQE-30 Xa, and then transformed into *E. coli* MG1655. After induction, the expected 13 kDa protein band was found as in soluble protein fraction. It was found as recombinant target protein after being purified by affinity column and verified by Western blot. Moreover, the recombinant peptide was able to scavenge free radicals, when characterized by several methods, especially nitric oxide when compared to the data of protein hydrolysate. The recombinant Longan 1 peptide was also revealed antiproliferative activity against stomach cancer, KATO-III.

Keywords: free radical, antioxidant, recombinant peptides, longan, *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
ABSTRACT.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญภาพ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 การทบทวนวรรณกรรม.....	1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	5
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	5
1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	6
1.6 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป.....	7
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
บทที่ 2 อุปกรณ์ วิธีดำเนินงานวิจัย.....	9
2.1 อุปกรณ์.....	9
2.2 จุลินทรีย์ พลาสมีด และไพร์เมอร์.....	11
2.2.1 พลาสมีด.....	11
2.2.2 จุลินทรีย์.....	11
2.2.3 ไพร์เมอร์.....	12
2.3 การสร้าง <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว.....	12
2.4 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายจาก <i>P. pastoris</i>	12
2.5 การสร้าง <i>E. coli</i> สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว.....	13
2.6 การแสดงออก การทำให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมาย	

จาก <i>E. coli</i>	13
2.7 การตรวจสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านอนุมูลอิสระ.....	14
2.7.1 การกำจัดอนุมูล DPPH.....	14
2.7.2 การกำจัดอนุมูล ABTS.....	15
2.7.3 การกำจัดอนุมูลไนตริกออกไซด์.....	15
2.7.4 ความสามารถในการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลไฮดรอกซิล.....	15
2.8 การตรวจสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านการแบ่งตัวของ เซลล์มะเร็ง.....	15
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	18
3.1 การสร้าง <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของ เซลล์มะเร็งเมลิคัลไล.....	18
3.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายจาก <i>P. pastoris</i>	19
3.3 การสร้าง <i>E. coli</i> สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของ เซลล์มะเร็งเมลิคัลไล.....	20
3.4 การแสดงออก การทำให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมาย จาก <i>E. coli</i>	21
3.5 การตรวจสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านอนุมูลอิสระ.....	22
3.6 การตรวจสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านการแบ่งตัวของ เซลล์มะเร็ง.....	
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	35
4.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล	35
4.2 ข้อเสนอแนะ	36
ภาคผนวก	38
บรรณานุกรม.....	41
ประวัติผู้วิจัย	44

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งออกแบบสำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ที่ได้จาก เมล็ดลำไย	17
รูปที่ 3.1 การตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการบนพลาสมิด pPic α A.....	25
รูปที่ 3.2 การตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ <i>P. pastoris</i>	26
รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตของ <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ TWLG1PP ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMH ปริมาตร 100 และ 200 mL.....	27
รูปที่ 3.4 โปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ TWLG1PP ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMH ปริมาตร (ก.) 100 ml (ข.) 200 ml ที่ช่วงเวลาต่างๆ.....	28
รูปที่ 3.5 การสร้างพลาสมิด pLG1 สำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1.....	29
รูปที่ 3.6 การแสดงออกของโปรตีนในส่วนของโปรตีนละลายน้ำ (Soluble protein fraction) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	30
รูปที่ 3.7 การทำรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 และการตรวจสอบ.....	31
รูปที่ 3.8 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระต่างๆของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 เปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสเสต.....	32
รูปที่ 3.9 การทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ในการปกป้องดีเอ็นเอ จากอนุมูลไฮดรอกซิล	33
รูปที่ 3.10 ความสามารถของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 (27 μ g/mL) ในการต้านการแบ่งตัว ของมะเร็ง BT474 (เต้านม), CHAGO (ปอด), HEP-G2 (ตับ), KATO-3 (กระเพาะ), และ SW620 (ลำไส้ใหญ่) และเซลล์ปกติคือ Wi-38 (เซลล์เยื่อหุ้มปอด).....	34

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ TWLG1PP ในอาหารเหลว MMH ที่เวลาต่างๆ.....	23
ตารางที่ 3.2 ค่า IC_{50} ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ในการกำจัดอนุโมลิตีสระต่างๆ	24

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
°C	องศาเซลเซียส
µg/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µl	ไมโครลิตร
µm	ไมโครเมตร
Amp	Ampicilin
Amp ^R	Ampicilin Resistance
AOX	ยีน Alcohol Oxidase
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
L	ลิตร
LB	Luria-Bertani
M	โมลาร์หรือโมลต่อลิตร
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	round per minute (รอบต่อนาที)
v/v	volume by volume (ปริมาตรต่อปริมาตร)
w/v	weight by volume (น้ำหนักต่อปริมาตร)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
YPD	Yeast extract-Peptone-Dextrose
Zeocin ^R	Zeocin Resistance

บทที่ 1

บทนำ

1.1 การทบทวนวรรณกรรม

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด เนื่องจากอนุมูลอิสระประกอบด้วยอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมทำให้มีความไม่คงตัวและว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา อนุมูลอิสระต้องการหาอิเล็กตรอนมาจับคู่เพื่อให้มีความคงตัว จึงสามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ เพื่อดึงอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอม หรือเข้าไปจับคู่กับอิเล็กตรอนของสารชีวโมเลกุลทำให้สมบัติของสารชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมามากมาย เช่น โรคแก่กว่าวัย มะเร็ง อัลไซเมอร์ (Ames *et al.*, 1993a, Ames *et al.*, 1993b, Slater, 1984) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังสามารถทำปฏิกิริยากับ LDL (Low-density lipoprotein) เกิดเป็น oxidized LDL ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว ทำให้เกิดโรคหัวใจ (Sinatra and DeMarco, 1995)

อนุมูลอิสระเป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการเผาผลาญอาหารในร่างกาย เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายมาจากปฏิกิริยาที่ใช้ออกซิเจนจึงมีชื่อเรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (superoxide anion; O_2^-), ไฮโดรเปอร์ออกซิล แรดิคัล (hydroperoxyl radical; HOO^{\cdot}) และไฮดรอกซิล แรดิคัล (hydroxyl radical; OH^{\cdot}) ซึ่งร่างกายเองก็มีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ เช่น กระบวนการ oxidative stress ซึ่งกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) คาตาเลส (catalase; CAT) กลูตาไทโอน-เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GPx) (Barber *et al.*, 2006) แต่เนื่องจากอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและทำปฏิกิริยาอย่างว่องไว ประกอบกับวิถีการดำเนินชีวิตและธรรมชาติที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การรับประทานเนื้อสัตว์ปิ้งย่างที่มีไขมันสูง มลพิษทางอากาศ รังสียูวี คิววี คิววี ดังนั้นการรับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากภายนอกจึงเป็นทางเลือกเพื่อลดการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายหรือลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระคือสารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งสามารถพบได้ในองค์ประกอบของอาหาร เช่น วิตามินเอ ซีและอี ซีลีเนียม แคลโรทีนอยด์ (Diplock, 1991) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเปปไทด์เหล่านี้จะมีกรดอะมิโนวงแหวนอะโรมาติก เช่น ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ไทโรซีน (Thirosine) และทริปโตเฟน (Tryptophane) ที่สามารถให้โปรตอนแก่อนุมูลอิสระได้ ส่งผลให้อนุมูลอิสระนั้นถูกทำลายไป

(Hattori *et al.*, 1998, Wang and De Meija, 2005, Xie *et al.*, 2008) หมู่อิมิดาโซล (imidazole) ในฮิสติดีน (Histidine) กับหมู่ไธออล (thiol) ในซิสเตอีน (Cysteine) ก็สามารถต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน (Qian *et al.*, 2008) นอกจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเปปไทด์แล้ว ตำแหน่งของกรดอะมิโนก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการสลับที่หรือเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างเปปไทด์ จะส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Rajapakse *et al.*, 2005)

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสกัดได้จากธรรมชาติกำลังได้รับความสนใจเพื่อใช้ในการผลิตเป็นยา อาหารเสริมสุขภาพ ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม รวมทั้งการผสมในอาหารสัตว์ เนื่องจากผู้บริโภคตระหนักถึงความปลอดภัย จึงมีงานวิจัยหลากหลายในการหาเปปไทด์เหล่านี้จากธรรมชาติ เช่น เปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 1,000 คาลตันที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันซึ่งสกัดจากถั่วแอลฟาฟา (Xie *et al.*, 2008) ในพืชตระกูลถั่วอีกชนิดคือถั่วลิสง พบเปปไทด์ขนาด 3,000 ถึง 5,000 คาลตันที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและการเข้าจับกับโลหะ ในปีค.ศ. 2010 มีรายงานการสกัดเปปไทด์จากเอนโดสเปิร์มของข้าวซึ่งพบว่าเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุล 959.5 คาลตัน มีลำดับกรดอะมิโนคือ ฟีนิลอะลานิน-อาร์จินิน-กรดแอสพาทิก-กรดกลูตามิก-ฮิสติดีน-ไลซีน-ไลซีน (Phe-Arg-Asp-Glu-His-Lys-Lys) และเปปไทด์ขนาด 1,002.5 คาลตัน มีลำดับกรดอะมิโนคือ ไลซีน-ฮิสติดีน-กรดแอสพาทิก-อาร์จินิน-ไกลซีน-กรดแอสพาทิก-กรดกลูตามิก-ฟีนิลอะลานิน (Lys-His-Asp-Arg-Gly-Asp-Glu-Phe) (Zhang *et al.*, 2010) นอกจากนี้ Cheng และคณะ พบเปปไทด์จากการย่อยมันฝรั่งด้วยเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดมีลำดับกรดอะมิโน คือ เซอรีน-เซอรีน-กลูตามีน-ฟีนิลอะลานิน-ไทโรซีน-ทริปโตเฟน (Ser-Ser-Glu-Phe-Thr-Tyr) ซึ่งตรงกับลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ metalloproteinase inhibitor และไอโซลูซีน-ไทโรซีน-ลิวซีน-ไกลซีน-กรดกลูตามิก (Ile-Tyr-Leu-Gly-Glu) ซึ่งกับลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ Lipoxigenase 1 (Cheng *et al.*, 2010)

สำหรับพืชที่พบในประเทศไทยมีการศึกษาในเช่น การสกัด โปรตีนจากลูกสมอไทยพบว่าโปรตีนพบว่าโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16 กิโลคาลตัน (Srivastava *et al.*, 2012) การสกัด โปรตีนในวุ้นขี้มดลูกพบโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันขนาดประมาณ 18 กิโลคาลตัน หรือในพืชวงศ์จิง ซึ่งพบเปปไทด์ที่สามารถยับยั้ง angiotensin I-converting enzyme ซึ่งเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับโรคความดันโลหิตสูง ทั้งนี้ข้อได้เปรียบของประเทศไทยคือความหลากหลายทางชีวภาพคนไทยมีการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรเหล่านี้มานานดังจะเห็นได้จากตำรายาสมุนไพร หรืออาหารไทยที่อาจเรียกได้ว่าเป็น โภชนาการบำบัด แต่ทั้งนี้การศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชในประเทศไทยยังไม่เป็นที่หลากหลายนัก ผลไม้ไทยก็เป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจในการศึกษา เนื่องจากผลไม้ไทยมีความหลากหลายและมีเอกลักษณ์ทั้งในเรื่องรูปลักษณ์และรสชาติ นอกจากนี้ยังสามารถ

นำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆเพื่อเพิ่มมูลค่าโดยมักมีเมล็ดผลไม้เหลือทิ้งจำนวนมาก เนื่องจากเมล็ดผลไม้เป็นแหล่งสะสมของอาหารเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาแปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง นอกจากนี้ได้มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งพบได้ในผลไม้หลายชนิด เช่น อะโวคาโดว ขนุน ลำไย มะม่วง มะขาม (Soong and Barlow, 2004)

ปัญหาที่พบจากการสกัดสารจากตัวอย่างตามธรรมชาติคือสารที่ต้องการมักมีปริมาณน้อย ต้องใช้ตัวอย่างจำนวนมาก รวมทั้งการเก็บรักษาก็มีความสำคัญ หากตัวอย่างมีการเสียดสภาพ สารที่ต้องการ เช่น โปรตีนก็มีการเสื่อมสภาพเช่นกัน ส่วนการโปรตีนไฮโดรไลเซตก็มีปัญหาการควบคุมส่วนผสมของเปปไทด์ที่ได้จากย่อยในการเตรียมไฮโดรไลเซตแต่ละครั้ง ดังนั้นเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลจึงถูกนำมาใช้เพื่อการผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดผลไม้ให้มีประสิทธิภาพ ซึ่งยีสต์ *P. pastoris* เป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิต recombinant protein เนื่องจากมีความปลอดภัย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ซับซ้อน เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตเซลล์เดียวทำให้มีกระบวนการ post-translational modification ซึ่งทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ใกล้เคียงกับโปรตีนต้นแบบ และรีคอมบิแนนท์โปรตีนถูกแสดงออกภายใต้การควบคุมของ *AOXI* promoter ซึ่งกระตุ้นได้ด้วยเมทานอล ทำให้ง่ายในการควบคุมการแสดงออก (Li *et al.*, 2007) เนื่องจากเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นเปปไทด์สายสั้น การตรวจสอบและตรวจติดตามเมื่อใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเป็นเรื่องที่ยาก การแก้ปัญหาเรื่องนี้สามารถทำได้โดยให้นิวคลีโอไทด์ที่ผลิตเปปไทด์นี้มีจำนวนหลายชุดเรียงต่อกันเพื่อให้สายดีเอ็นเอที่ยาวขึ้น เมื่อนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน รีคอมบิแนนท์เปปไทด์จึงประกอบด้วยเปปไทด์ที่ต้องการหลายสายเรียงต่อกัน ในอนาคตหากทำการตัดบริเวณที่กรดอะมิโนที่เชื่อมสายเปปไทด์เหล่านี้ก็จะได้เปปไทด์ที่ต้องการหลายสายในเวลาเดียวกัน ซึ่งตัวอย่างของการใช้เทคนิคดังกล่าวผลิตเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก เช่น การผลิตเปปไทด์ที่เป็นสารแต่งรสเนื้อ (Wang *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2010) เปปไทด์ Gsp ซึ่งพบในรากโสมและใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน (Yan *et al.*, 2003) เทคนิคที่กล่าวมาจะช่วยให้การผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและ/หรือด้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่พบจากเมล็ดผลไม้ไทยมีประสิทธิภาพ โดยเปปไทด์เหล่านี้สามารถต่อยอดไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เกษษกรรม อาหารเสริมสุขภาพ หรือผลิตภัณฑ์เสริมความงามต่อไปได้

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อนุมูลอิสระ เช่น ไฮดรอกซิล แรดิคัล (hydroxyl radical; OH[•]) ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (superoxide anion; O₂^{•-}) ไฮโดรเปอร์ออกซิล แรดิคัล (hydroperoxyl radical; HOO[•]) และแอลคอกซิล

แรดิคอล (alkoxyl radical; RO[•]) เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการใช้ออกซิเจนเผาผลาญอาหารแบบใช้ออกซิเจน โดยอนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนอิสระที่อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุลทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา รวมทั้งปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลสำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ โดยความเสียหายที่เกิดขึ้นเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ความดันโลหิตสูง มะเร็ง และโรคแก่ก่อนวัย (aging) เป็นต้น โดยปกติแล้วร่างกายมีกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่จะทำอันตรายต่อสารประกอบและเนื้อเยื่อในเซลล์ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ทั้งนี้เนื่องจากอนุมูลอิสระเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วประกอบกับพฤติกรรมในการใช้ชีวิตทำให้ร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจากภายนอกในปริมาณมากขึ้น เช่น การรับประทานอาหารปิ้งย่างที่ประกอบด้วยเนื้อสัตว์ที่มีไขมันสูง การรับประทานอาหารประเภททอดที่ใช้ความร้อนสูง รวมถึงมลพิษและรังสียูวี ทำให้ร่างกายได้รับอนุมูลอิสระมากเกินไปกว่าที่ร่างกายจะกำจัดได้ทัน การรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น จากอาหาร จึงเป็นหนทางในการควบคุมและป้องกันความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ องค์ประกอบที่พบในอาหาร เช่น วิตามินเอ ซี และอี รวมทั้งแคโรทีนอยด์ สามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถชะลอความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระก็ได้รับการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะมีกรดอะมิโนชนิดวงแหวนอะโรมาติกที่สามารถให้โปรตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ โดยช่วงหลายปีที่ผ่านมา เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้ได้พัฒนาเพื่อการผลิตยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมความงามจำนวนมาก นอกจากนี้จะมีประสิทธิภาพสูงในการรักษาแล้ว ยังพบว่ามีผลข้างเคียงน้อย ซึ่งเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้สามารถสกัดได้จากพืช เช่น ถั่ว ดอกทานตะวัน แปะก๊วย เป็นต้น นอกจากนี้พืชสมุนไพรไทยหลายชนิด เช่น ไพลดำ ว่านชักมดลูก ขมิ้นดำ ลูกเนียง ได้รับการวิจัยจากห้องปฏิบัติการวิจัยด้านโปรตีนและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ว่าเป็นแหล่งของโปรตีน โปรตีนไฮโดรไลเสตและเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพมาก ทั้งนี้รวมถึงผลไม้ไทยที่มีความหลากหลายและมีชื่อเสียงไปทั่วโลกถึงรสชาติ และคุณค่าทางโภชนาการ ด้วยความอุดมสมบูรณ์ของผลไม้นานาชนิดที่มีให้รับประทานตลอดปี การแปรรูปผลไม้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์เกษตรเหล่านี้ อุตสาหกรรมการแปรรูปผลไม้ทำให้เกิดทั้งเมล็ดผลไม้อเนกประสงค์จำนวนมาก ซึ่งเมล็ดผลไม้อเนกประสงค์มีความเป็นไปได้ว่าจะมีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการ เนื่องจากเมล็ดเป็นแหล่งสะสมอาหารเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ โดยโครงการวิจัยนี้สนใจหาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต้านอนุมูลอิสระและด้านการแบ่งตัวของเซลล์จำพวกเซลล์มะเร็ง จากเมล็ดผลไม้อเนกประสงค์ที่เหลือทิ้งจาก

อุตสาหกรรมการแปรรูปผลไม้ เช่น มะละกอ ลิ้นจี่ ลำไย ทั้งนี้เพื่อแก้ปัญหาจากการสกัดสารจากธรรมชาติรวมถึงเปปไทด์จากเมล็ดผลไม้ เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลได้ถูกนำมาใช้เพื่อใช้ในการผลิตเปปไทด์ที่ต้องการในปริมาณมาก โดยใช้ยีสต์ *Pichia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่ง *P. pastoris* เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตเซลล์เดียวที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว มีความปลอดภัย หรือ GRAS (Generally Recognized as Safe) มีโปรโมเตอร์ที่แข็งแรงและสามารถกระตุ้นได้ด้วยเมทานอล เพื่อให้ยีนที่สนใจแสดงออก ทั้งนี้รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่สนใจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และผลิตภัณฑ์เสริมความงามต่อไป รวมทั้งกระบวนการผลิตนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสารและเปปไทด์อื่นๆที่ต้องการได้เช่นกัน

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะสมบัติและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเปปไทด์ที่สกัดได้จากเมล็ดผลไม้ไทย เช่น มะละกอ ลิ้นจี่ ลำไย ในการต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง
2. ใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อให้ *P. pastoris* ผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง
3. เปรียบเทียบลักษณะสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากเมล็ดผลไม้กับรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่แสดงออกใน *P. pastoris*

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในปีงบประมาณ 2557 โครงการจะครอบคลุมถึงการคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจากเมล็ดผลไม้ และการสร้างสายพันธุ์ *P. pastoris* สำหรับการสร้างเปปไทด์ดังกล่าว โดยการคัดเลือกเปปไทด์ได้มาจากการนำเมล็ดผลไม้ไทย เช่น มะละกอ ลิ้นจี่ ลำไย ที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ ถูกนำมาเตรียมเป็นโปรตีนไฮโดรไลสโดยการย่อยโปรตีนย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนเครติน (pancreatin) ซึ่งจำลองมาจากระบบการย่อยอาหารในมนุษย์ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการต้านออกซิเดชันด้วยสาร DPPH (Sharma and Bhat, 2009) จากนั้นโปรตีนไฮโดรไลสที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันและเทคนิคโครมาโตกราฟี เช่น โครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หลังจากตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนแล้วโปรตีนไฮโดรไลสนี้ได้ถูกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี และคัดเลือกเปปไทด์ที่คาดว่าจะมีความเป็นไปได้ในการต้านอนุมูลอิสระและ/หรือต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งซึ่งพิจารณาจากลำดับกรดอะมิโน จากนั้นทำการสร้าง *P. pastoris* สำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์

โดยการแปรกลับลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่คาดว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อทำการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์แล้วจะตัดต่อนำเข้าเวกเตอร์พาหะ pPicZQA (Invitrogen Inc., USA) เพื่อนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากเปปไทด์ที่ต้องการเป็นโปรตีนที่ผ่านการย่อยมาแล้วบางส่วนทำให้เป็นเปปไทด์สายสั้น การสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้นมักประสบปัญหา เช่น การตรวจสอบและการตรวจติดตาม การแก้ปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้โดยทำให้สายเปปไทด์ยาวขึ้น ทั้งนี้ นิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของเปปไทด์สนใจ โดยตั้งชื่อว่า Longan 1 (ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF) ใ้ได้ออกแบบให้ต่อกัน 4 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดจะกั้นด้วยรหัสโคดอนของกรดแอสปาทิก (Aspartic acid) เพื่อในอนาคตหากต้องการเปปไทด์สายสั้นเหมือนเปปไทด์ต้นแบบก็สามารถตัดเปปไทด์สายยาวนี้ได้ด้วยเอนไซม์ Endoproteinase AspN ทำให้ 1 สายของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ประกอบด้วยเปปไทด์ Longan 1 จำนวน 4 ชุด การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์อยู่ภายใต้การควบคุมของ *AOXI* promoter ซึ่งกระตุ้นได้ด้วยเมทานอล นอกจากนี้เวกเตอร์พาหะ pPicZQA ยังประกอบด้วย α -factor ของ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งทำให้เปปไทด์ที่ต้องการหลั่งออกนอกเซลล์ ซึ่งโดยหลักการแล้วทำให้การสกัดรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ทำได้ง่าย (Kjeldsen *et al.*, 1999)

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นโครงการต่อเนื่อง ในปีงบประมาณ 2558 ได้ทำการศึกษาการผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ในระดับ Shake flask โดยเปปไทด์ที่สนใจสกัดได้จากเมล็ดลำไยซึ่งตั้งชื่อว่า Logan 1 แต่เนื่องจากการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์จากยีสต์ *P. pastoris* มีปัญหาอย่างมากและไม่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ได้ จึงได้เปลี่ยนแผนการทดลองโดยใช้ *E. coli* เป็นระบบสำหรับแสดงออกแทนและประสบความสำเร็จ โดยรีคอมบิแนนท์เปปไทด์นี้ได้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยการต้านออกซิเดชันด้วยสาร DPPH, ABTS, ไนตริกออกไซด์ และการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลไฮดรอกซิล และเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตรวมทั้งทดสอบฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ไลน์มะเร็งในมนุษย์

1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากเมล็ดพืชเป็นแหล่งสะสมอาหารเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการหาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากการสกัดสารจากธรรมชาติและการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซต เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลจึงถูกนำมาใช้เพื่อสร้างจุลินทรีย์สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ โดยรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์สำหรับแสดงออกจะช่วยแก้ปัญหาให้สามารถผลิตเปปไทด์ได้ในปริมาณมาก และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

1.6 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

ในปีงบประมาณ 2558 โครงการดำเนินงานในด้านผลิตและทดสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์จาก *P. pastoris* แต่เนื่องจากไม่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ต้องการจาก *P. pastoris* ได้ ทำให้ต้องมีการเปลี่ยนแปลงการดำเนินงานโดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* เป็น เซลล์สำหรับการแสดงออกแทนโดยงานวิจัยโดยสรุปได้แก่

1. การสร้างสายพันธุ์ *P. pastoris* สำหรับการสร้างเปปไทด์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้
 - สั่งสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ที่แปรรหัสแล้วได้เป็นลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (IDT, USA) ซึ่งตั้งชื่อว่า Longan 1 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเปปไทด์ Longan 1 เรียงต่อกัน 4 ชุด แต่ละชุดคั่นด้วยโคดอนของกรดแอสปาทิก (Aspartic acid) แล้วตัดต่อเข้าเวกเตอร์พาหะ pPICZQA (Invitrogen, USA) จากนั้นนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* GS115 ด้วยชุด *Pichia EasyComp*TM Transformation Kit (Invitrogen, USA)
 - ตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ด้วยวิธี colony PCR, การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ DNA Sequencing (Macrogen, Korea)
 2. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายจาก *P. pastoris*
 - เลี้ยงเซลล์ *P. pastoris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMH ที่เติมเมทานอลทุก 24 ชั่วโมงเพื่อเหนี่ยวนำการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ต้องการ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง
 - วิเคราะห์ผลโปรตีนที่แสดงออกทั้งหมดด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วนำแถบโปรตีนที่คาดว่าเป็นรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี
 3. การสร้าง *E. coli* สายพันธุ์สำหรับผลิตดีเอ็นเอ/หรือการดำเนินการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมล็ดลำไย
 - นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 (จากข้อ 1) ใส่ลงในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pQE-30 Xa แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ MG1655
 - ตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ด้วยวิธี PCR, การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ DNA Sequencing
- 2.6 การแสดงออก การทำให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายจาก *E. coli*
- ทำการเลี้ยง *E. coli* ในอาหารเหลว LB โดยเหนี่ยวนำการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ต้องการด้วย IPTG เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

- แยกเซลล์เก็บตัวอย่างโปรตีนที่ละลายและไม่ละลาย และวิเคราะห์ผลโปรตีนที่แสดงออกทั้งหมด ด้วยเทคนิค SDS-PAGE
- ทำรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Protino® Ni-IDA (MACHEREY-NAGEL, Germany) และตรวจสอบความถูกต้องโดยใช้การตรวจจับของแอนติบอดี mouse anti- His HRP (USBiological, USA) ซึ่งจำเพาะต่อ 6X-Histidine ด้วยเทคนิค Western blot

2.7 การตรวจสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านอนุมูลอิสระ

- ทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระจากสาร DPPH, ABTS และไนตริกออกไซด์
- ทดสอบความสามารถในการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลไฮดรอกซิล

2.8 การตรวจสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งต่างๆ

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลงานที่ได้สามารถนำไปจดสิทธิบัตรและ/หรือเผยแพร่ในวารสารหรืองานประชุมวิชาการได้
2. ได้รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและกระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพ โดยเปปไทด์เหล่านี้สามารถนำไปต่อยอดในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น เกษษกรรม อาหารเสริม เครื่องสำอาง และเทคนิคการผลิตนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตโปรตีนเปปไทด์และสารอื่นๆด้วย

บทที่ 2

อุปกรณ์ วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์

เครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction Thermocycler)	Applied Biosystems, Singapore
เครื่องเขย่าผสมรุ่น Vortex-Genie2 (Vortex mixer: model Vortex-Genie2)	Scientific Industries, USA
เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubator shaker : model Innova 4330)	New Brunswick Scientific, USA
เครื่องชั่งแบบละเอียดรุ่น FX-180 (Electronic balance : model FX-180)	A&D Co., Ltd., Japan
เครื่องชั่งแบบหยาบ รุ่น FX-3000 (Electronic balance : model FX-3000)	A&D Co., Ltd, Japan
เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงยูวี (Uvitec Platinum Gel Documentation system)	UVItec, UK
เครื่องบดตีอตกิ่งแห้ง (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer)	Bio-Rad, USA
เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated high speed centrifuge)	Kubota cooperating, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอด micro-tube ความเร็วสูงรุ่น MTX-150 (High speed micro refrigerated centrifuge : model MTX-150)	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงจากเพลท	Thermo Scientific, USA

(Multiskan™ Go spectrophotometer)	
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo, USA
(pH meter)	
เครื่องวิ่งเจลอะกาโรส	ADVANCE Co., Ltd., Japan
(Agarose gel electrophoresis equipments)	
เครื่องวิ่งโปรตีน	Bio-Rad, USA
(Protein electrophoresis apparatus)	
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ	Taladlab, Thailand
(Autoclave)	
เครื่องอังน้ำ	Yamato, Japan
(Water bath)	
ชุดคอลัมน์ทำโปรตีนที่มี Histidine tag ให้บริสุทธิ์	MACHEREY-NAGEL, Germany
(Protino® Ni-IDA column for his-tagged protein purification)	
ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล	MACHEREY-NAGEL, Germany
(NucleoSpin® Extract II Kits)	
ชุดสกัดพลาสมิด	MACHEREY-NAGEL, Germany
(NucleoSpin® plasmid)	
ชุดนำดีเอ็นเอเข้าสู่โครโมโซม <i>P. pastoris</i>	Invitrogen, USA
(<i>Pichia</i> EasyComp™ Transformation Kit)	
ตู้แช่แข็ง -20°C	Sanyo, Japan
(Freezer -20°C)	
ตู้แช่แข็ง -70°C	Sanyo, Japan
(Freezer -70°C)	

ตู้ปลอดเชื้อรุ่น HF safe-12006 (Laminar flow: model HF safe-12006)	Heal Force, China
ตู้เพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37°C (Growth cabinet)	Sanyo, Japan
ตู้อบแห้งรุ่น UNB-400 (Oven : model UNB-400)	Memmert Co.,Ltd., Germany
ไมโครปิเปตรุ่น Discovery Comfort (Micro auto pipette: model Discovery Comfort)	Mettler Toledo, USA

2.2 จุลินทรีย์ พลาสมิด และไพรเมอร์

2.2.1 พลาสมิด

pPicZOA	Invitrogen, USA
pLG1OA	พลาสมิด pPicZOA ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1
pQE-30 Xa	Qiagen, Germany
pLG1	พลาสมิด pQE-30 Xa ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1

2.2.2 จุลินทรีย์

<i>E. coli</i> competent cells สายพันธุ์ Super 10 ⁹ HIT-DH5a	RBC Bioscience, Taiwan
<i>P. pastoris</i> GS115	อ.ดร.ศรินทิพ สุกใส, สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
TWLG1PP	<i>P. pastoris</i> GS115 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ MG1655	Coli Stock Center, Yale University, USA
TWLG1	<i>E. coli</i> MG1655 ที่มีพลาสมิด pLG1
CONT	<i>E. coli</i> MG1655 ที่มีพลาสมิด pQE-30 Xa

2.2.3 ไพรมเมอร์

AOX1 forward	GACTGGTTCCAATTGACAAG
AOX1 reverse	GCAAATGGCATTCTGACATCC
L1F	CTCGAGAAAAGAGATATTAG
L1R	CTCGAGCGTACGGTCGAAACC

2.3 การสร้าง *P. pastoris* สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง เมล็ดลำไย

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับใช้ผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 (รูปที่ 2.1) ได้ส่งไปทำการสังเคราะห์และอยู่บนพลาสมิด pIDT-blue (IDT, USA) ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* แล้วนำไปเชื่อมติดกับพลาสมิด pPicZαA ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์เดียวกันด้วยเทคนิค DNA Ligation ซึ่งใช้เอนไซม์ T4 Ligase นำปฏิกิริยา Ligation เข้าสู่เซลล์ *E. coli* competent cells สายพันธุ์ Super 10⁹ HIT-DH5a ด้วยเทคนิค Chemical Transformation แล้วคัดเลือกโคโลนีซึ่งโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Low salt LB ซึ่งมี Zeocin เข้มข้น 25 µg/mL จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบความถูกต้องด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiWI* และ DNA sequencing (Macrogen, Korea) จากนั้นนำพลาสมิดที่ถูกต้องไปตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* ให้เป็นเส้นตรง แล้วนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ด้วยชุด *Pichia* EasyCompTM Transformation Kit (Invitrogen, USA) แล้วคัดเลือกโคโลนีซึ่งโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ซึ่งมี Zeocin เข้มข้น 100 µg/mL ตรวจสอบความถูกต้องด้วยเทคนิค colony PCR ซึ่งเป็นการคัดเลือกโคโลนีมาทำการย่อยผนังเซลล์ของ *P. pastoris* ด้วยเอนไซม์ Lyticase ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g นำส่วนใสซึ่งมีดีเอ็นเอมาเป็นต้นแบบในการทำ PCR ด้วยไพรมเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse จากนั้นตรวจสอบเพิ่มเติมด้วยไพรมเมอร์ L1F กับ L1R โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรมเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse นำมาสกัดออกจากเจลแล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiWI* และ DNA sequencing (Macrogen, Korea)

2.4 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายจาก *P. pastoris*

นำ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 และ TWLG1PP เลี้ยงในอาหารเหลว YPG pH 5.0 ที่ 30°C ความเร็วรอบ 250 rpm จนกระทั่งค่า OD ที่ 600 nm ประมาณ 2-6 (16-18 ชั่วโมง) จากนั้นนำไปปั่นที่ 5000 x g เป็นเวลา 5 นาที เก็บเซลล์แล้วนำเซลล์ละลายในอาหารเหลว MMH pH 5.0 ให้ค่า OD ที่ 600 nm ประมาณ 0.01 โดยทำการทดลองใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 และ 200 ml บ่มที่ 30°C ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลาทั้งสิ้น 96 ชั่วโมง ซึ่งทำการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการด้วยการเติม 0.5% v/v เม

ทานอลทุก 24 ชั่วโมง เมื่อทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกและนำส่วนใสมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford assay และตรวจสอบแถบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ 18% acrylamide separating gel

2.5 การสร้าง *E. coli* สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับใช้ผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 (รูปที่ 2.1) ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้พลาสมิด pLG10A เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ L1F และ L1R ซึ่งจะเหนี่ยวนำส่วนหัวและท้ายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้มีบริเวณตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III ตามลำดับ จากนั้นตัดผลิตภัณฑ์ PCR และพลาสมิด pQE-30 Xa ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วนำไปเชื่อมต่อกันด้วยเทคนิค DNA Ligation ซึ่งใช้เอนไซม์ T4 Ligase แล้วนำปฏิกิริยา Ligation เข้าสู่เซลล์ *E. coli* competent cells สายพันธุ์ MG1655 ด้วยเทคนิค Chemical Transformation คัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มี Ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL และ X-gal เข้มข้น 40 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37 °C ซ้ำคืน นำโคโลนีที่คัดเลือกไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี Ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL อุณหภูมิ 37 °C ซ้ำคืน แล้วสกัดพลาสมิดมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ L1F กับ L1R การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III และ DNA sequencing (Macrogen, Korea)

2.6 การแสดงออก การทำให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายจาก *E. coli*

การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 เหนี่ยวนำโดยการใช้ IPTG โดยเริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อนำโคโลนีจากสายพันธุ์ TWLG1 และ CONT มาเลี้ยงบนอาหารเหลว LB ที่มี Ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL อุณหภูมิ 37 °C ซ้ำคืน จากนั้นนำหัวเชื้อปริมาตร 100 µL ถ่ายลงในอาหารเหลว LB ที่มี Ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL ปริมาตร 50 mL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งค่า OD600 ประมาณ 0.6 (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) แล้วเติม IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1 mM จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วตัวอย่างนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g เป็นเวลา 15 นาทีแล้วเก็บตะกอนเซลล์

การสกัดรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 เริ่มจากการแตกเซลล์โดยนำตะกอนเซลล์น้ำหนักเปียก 1 g มาละลายใน LEW buffer pH 7.8 ปริมาตร 5 mL ทำการแช่แข็งที่ -20 °C แล้วนำมาละลาย 3 ครั้ง จากนั้นเติม 10% w/v Lysozyme ร่วมกับเอนไซม์ Dnase และ Rnase แล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที ทำการแตกเซลล์เพิ่มโดยใช้คลื่นเสียง (sonication) ที่ 10 × 15 s bursts จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 30 นาที เก็บ

ส่วนใสเป็นส่วนโปรตีนละลายน้ำ (soluble protein fraction) สำหรับตะกอนนำไปละลายใน LEW buffer pH 7.8 ปริมาตร 5 mL เพื่อทำการล้างตะกอน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนไปละลายใน denaturation solubilization (DS) buffer pH 7.8 ปริมาตร 3 ml ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 10,000 x g เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสจากส่วนนี้เป็นส่วนโปรตีนไม่ละลายน้ำ (insoluble protein fraction) ตรวจสอบขนาดของแถบโปรตีนที่คาดหมายว่าอยู่ในส่วนโปรตีนละลายหรือไม่ละลายน้ำด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ 18% acrylamide separating gel

เนื่องจากผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 อยู่ในส่วนโปรตีนละลายน้ำ จึงนำโปรตีนส่วนนี้มาผ่านคอลัมน์ Ni-IDA เพื่อสกัดรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ต้องการ โดยเริ่มจากการเตรียมคอลัมน์ด้วยการใส่ LEW buffer pH 7.8 ปริมาตร 6 mL เมื่อสารละลายไหลผ่านคอลัมน์หมดจึงเติมตัวอย่างโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำปริมาตร 4 mL โดยพักในคอลัมน์ที่ 4 °C ชั่วครู่ แล้วเก็บตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์เป็นส่วน Flow through (โปรตีนที่ไม่เกาะคอลัมน์) แล้วล้างคอลัมน์ด้วย LEW buffer pH 7.8 ปริมาตร 6 mL โดยเก็บตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์เป็นส่วน Wash (ส่วนที่ถูกล้างจากคอลัมน์) จากนั้นชะโปรตีนที่คาดว่าโปรตีนที่ต้องการซึ่งเกาะอยู่ในคอลัมน์ด้วย DE buffer pH 7.8 ปริมาตร 5 mL โดยตัวอย่างที่เก็บผ่านคอลัมน์นี้เรียกว่า Elution (ส่วนที่คาดว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ต้องการ) ตรวจสอบแถบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ 18% acrylamide separating gel และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

การตรวจสอบว่าโปรตีนที่สกัดได้ในส่วน Elution คือ รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 หรือไม่ ใช้วิธี Western blot เริ่มจากการนำตัวอย่างในส่วน Elution ให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 15 µg ทำการแยกขนาดด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ 18% acrylamide separating gel แล้วย้ายโปรตีนลง 45 µm nitrocellulose membrane ด้วยเครื่อง Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA) โดยใช้โวลต์คงที่ 10 V เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 5% w/v skim milk ใน TBST buffer บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าเบาๆ จากนั้นล้างด้วย TBS buffer หลายๆ ครั้ง แล้วจึงเติม 1:500 mouse anti-His-tag antibody (6-His) (HRP) (USBiological, Salem, USA) บ่มที่ 4°C ชั่วครู่ ทำการล้างเมมเบรนหลายๆ ครั้ง ก่อนจะเติม 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution แล้วบ่ม 5 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างด้วยน้ำ

2.7 การตรวจสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านอนุมูลอิสระ

2.7.1 การกำจัดอนุมูล DPPH

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจาก Mohsen *et al.* (2009) โดยผสม DPPH เข้มข้น 200 µM ปริมาตร 100 µl กับตัวอย่างที่ทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µl ในเฟลท 96 หลุม แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่อง Multiskan microreader

คำนวณหาค่า IC_{50} ด้วย GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) สำหรับ Windows การทดลองนี้ใช้ ascorbic acid เป็นตัวควบคุม

2.7.2 การกำจัดอนุมูล ABTS

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจาก Cai *et al.* (2004) เริ่มจากการสร้างอนุมูล ABTS โดยผสม ABTS เข้มข้น 7 mM กับ potassium persulphate เข้มข้น 2.45 mM แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำสารละลายที่ผสมมาเจือจางด้วยน้ำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm คือ 0.70 ± 0.02 แล้วจึงนำสารละลาย ABTS ดังกล่าวปริมาตร 990 μ l ผสมกับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 μ l ในเพลท 96 หลุมแล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ด้วยเครื่อง Multiskan microreader คำนวณหาค่า IC_{50} ด้วย GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) สำหรับ Windows การทดลองนี้ใช้ ascorbic acid เป็นตัวควบคุม

2.7.3 การกำจัดอนุมูลไนตริกออกไซด์

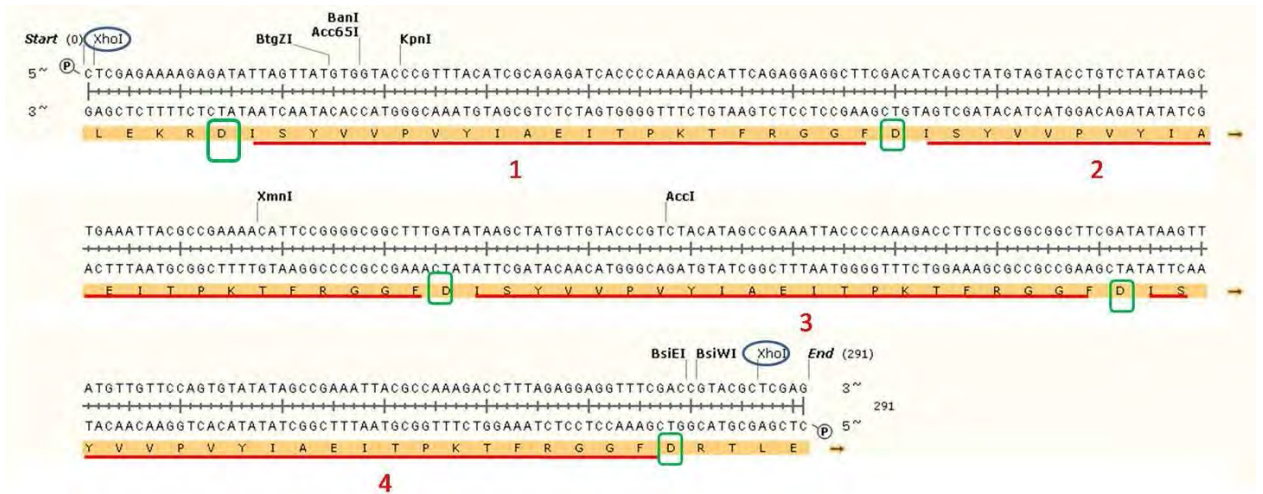
อนุมูลไนตริกออกไซด์เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย sodium nitroprusside (SNP) กับ ออกซิเจนและไนโตรที่ไอออนสามารถวัดได้จากปฏิกิริยาของ Griess Illosvoy (Govindarajan *et al.*, 2003) การทดลองนี้ทำโดยผสมสารละลาย SNP เข้มข้น 10 mM, PBS buffer pH 7.4 และตัวอย่างที่ต้องการทดสอบโดยให้ปฏิกิริยาทั้งหมดมีปริมาตร 3 mL จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที แล้วจึงเติม 0.1% w/v NED ทำการบ่มต่อที่ 25 °C อีก 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่อง Multiskan™ Go spectrophotometer คำนวณหาค่า IC_{50} ด้วย GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) สำหรับ Windows การทดลองนี้ใช้ Curcumin เป็นตัวควบคุม (Hazra *et al.*, 2008)

2.7.4 ความสามารถในการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลไฮดรอกซิล

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจาก Qian *et al.*, 2008 โดยใช้พลาสมิด pBR322 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และอนุมูลไฮดรอกซิลเกิดจากปฏิกิริยา Fenton ในการทดลองใช้พลาสมิด pBR322 ความเข้มข้น 50 -100 ng/mL ปริมาตร 3 μ l ผสมกับ PBS buffer pH 7.4 ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 3 μ l และตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 4 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม $FeSO_4$ ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 3 μ l กับ 30% H_2O_2 แล้วบ่มต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์ลักษณะรูปแบบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

2.8 การตรวจสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

ในการทดลองนี้ได้ใช้เซลล์มะเร็งของมนุษย์ 5 ชนิดได้แก่ BT474 (เต้านม), CHAGO (ปอด), HEP-G2 (ตับ), KATO-3 (กระเพาะ), และ SW620 (ลำไส้ใหญ่) และใช้เซลล์ปกติคือ Wi-38 (เซลล์เยื่อหุ้มปอด) เซลล์ทุกชนิดเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ซึ่งผสม L-glutamine เข้มข้น 2.0 mM และ 10% (v/v) FCS บ่มที่ 37°C ภายใต้ 5% (v/v) CO₂. จากนั้นดูดเซลล์ออกและล้างแล้วนำลงเพลท 96 หลุม โดยให้แต่ละหลุมมีจำนวนเซลล์ 5×10^3 cells/ μ L ใน complete media ปริมาตร 200 μ L แล้วเลี้ยงเซลล์ที่ภาวะเดิม 1 วัน จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่จะทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆเติมลงไปแล้วบ่มต่ออีก 3 วัน แล้วจึงเติม 3-[5,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium] bromide solution (MTT) ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 10 μ L ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง ทำการทิ้งสารละลายทั้งหมดออกแล้วล้างเซลล์ด้วย RPMI-1640 ตามด้วยการเติม DMSO ปริมาตร 150 μ L ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มอีก 30 นาที แล้วจึงดูดสารละลายทั้งหมดออก จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm



รูปที่ 2.1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งออกแบบสำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ที่ได้จากเมล็ดลำไย

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์เปปไทด์ Longan 1 สามารถถอดรหัสได้เป็น ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF เรียงต่อกัน 4 ชุด แต่ละชุดคั่นด้วยกรดแอสปาดิก (Aspartic acid)

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การสร้าง *P. pastoris* สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง เมล็ดลำไย

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ออกแบบขึ้นนี้สำหรับ Logan 1 ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นและใส่อยู่ในพลาสมิด IDT-Blue (IDT, USA) เมื่อได้รับพลาสมิดมาได้ถูกนำเข้า *Escherichia coli* competent HIT-DH5 α (RBC Bioscience, Taiwan) เพื่อเก็บรักษาและเพิ่มจำนวน พลาสมิดดังกล่าวถูกสกัดและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดจำเพาะ *Xho*I แล้วเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pPICZ α A (Invitrogen, USA) ที่ตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน เมื่อทำการเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 Ligase แล้วนำไปปฏิกริยา Ligation ใส่เข้า *E. coli* competent HIT-DH5 α คัดเลือกบนอาหารแข็ง LB low salt ที่มี Zeocin เข้มข้น 25 μ g/mL จากนั้นคัดเลือกโคโลนีแล้วทำการสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือไม่และใส่ในพลาสมิดด้วยทิศทางที่ถูกต้องหรือไม่ พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Logan 1 ในทิศทางที่ถูกต้องเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Bsi*WI ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280 คู่เบส และ 3600 คู่เบส (รูปที่ 3.1) พลาสมิดที่ตัดได้ชิ้นส่วนที่ถูกต้องได้นำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing (Macrogen, Korea) พลาสมิดที่ถูกต้องได้ถูกตั้งชื่อว่า pLG1 α A

พลาสมิด pLG1 α A ถูกนำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I เพื่อนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ด้วยชุด *Pichia* EasyCompTM Transformation Kit (Invitrogen, USA) โดยใช้หลักการนำเข้าสู่โครโมโซมด้วยการเกิด recombination จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับบริเวณ 5' *AOX1* บน pPICZ α A กับโครโมโซมและคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ซึ่งมี Zeocin เข้มข้น 100 μ g/mL เมื่อตรวจสอบความถูกต้องด้วยเทคนิค colony PCR ด้วยไพรเมอร์ *AOX1* forward กับ *AOX1* reverse และตรวจสอบเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ L1F กับ L1R หากมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายบนโครโมโซมจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 760 คู่เบสจากไพรเมอร์ *AOX1* forward กับ *AOX1* reverse และ 290 คู่เบสจากไพรเมอร์ L1F กับ L1R (รูปที่ 3.2 ก) ทำการสกัดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 760 คู่เบสจากไพรเมอร์ *AOX1* forward กับ *AOX1* reverse แล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsi*WI ซึ่งชิ้นส่วนที่ถูกต้องเมื่อถูกเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsi*WI ได้ขนาดประมาณ 520 และ 240 คู่เบส (รูปที่ 3.2 ข) จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 760 คู่เบสจากไพรเมอร์ *AOX1* forward กับ *AOX1* reverse ส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย DNA sequencing (Macrogen, Korea) โดยใช้ไพรเมอร์ *AOX1* forward, *AOX1* reverse, L1F และ

L1R แต่เนื่องจากการอ่านผล DNA sequencing ไม่สามารถอ่านได้หลายครั้งซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนในตัวอย่าง ทำให้คณะผู้วิจัยต้องทำ Re-PCR โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 760 คู่เบสจากไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse มาทำ PCR ใหม่อีกครั้งด้วยไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse แล้วจึงสกัดผลิตภัณฑ์ PCR นี้ไปทำ DNA sequencing ซึ่งในที่สุดก็ได้ *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 1 โดยตั้งชื่อว่า TWLG1PP

3.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายจาก *P. pastoris*

เมื่อนำ *P. pastoris* สายพันธุ์ TWLG1PP มาวัดผลการแสดงออกของในอาหารเหลว MMH pH 5.0 ปริมาตร 50 mL พบโปรตีนน้อยมาก จึงทดลองขยายขนาดโดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 และ 200 ml เป็นเวลาทั้งสิ้น 96 ชั่วโมง ซึ่งทำการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการด้วยการเติม 0.5% v/v เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง พบว่ามีการเจริญเติบโต ดังรูปที่ 3.3 ซึ่งพบการเจริญเติบโตมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 mL อาจเป็นไปได้ว่าหัวเชื้อมีความเจือจางเกินไปเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 200 mL

เนื่องจากเปปไทด์เป้าหมายต่ออยู่กับ α -mating factor ซึ่งอยู่บนพลาสมิด pPicZ α ซึ่งใช้ในการตัดต่อ นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอลงบนโครโมโซมของ *P. pastoris* ทำให้เปปไทด์เป้าหมายถูกหลั่งออกนอกเซลล์ จึงสกัดโปรตีน โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกและนำส่วนใสมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford assay พบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามเวลา (ตารางที่ 3.1) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS PAGE พบแถบโปรตีนตามขนาดที่คาดหมายไว้คือประมาณ 10 กิโลดาลตัน หรืออาจมีความเป็นไปได้ที่รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ยังคงมี α -mating factor ติดอยู่ เพราะอาจไม่เกิดการตัดในกระบวนการส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ซึ่งในกรณีนี้เปปไทด์จะมีขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.4) คณะผู้วิจัยจึงได้ตัดแถบโปรตีนทั้งสองแถบนี้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคสเปกโตรเมตรี อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าโปรตีนทั้งสองแถบนั้นไม่ใช่รีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมาย อีกประเด็นหนึ่งที่น่าจะเกิดขึ้นได้ คือรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ไม่ได้ถูกหลั่งออกนอกเซลล์ ซึ่งในกรณีนี้ เมื่อมีการแตกเซลล์ จะพบโปรตีนจำนวนมาก และเนื่องจากรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ได้ออกแบบไว้ในการทดลองนี้ไม่ได้ติดเครื่องหมายใดๆไว้ จึงยากแก่การตรวจสอบและสกัดรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมาย ทำให้ต้องสร้างระบบการแสดงออกใหม่ คณะผู้วิจัยได้ทบทวนแล้วพบว่า หากยังคงใช้ *P. pastoris* อาจจะทำให้เกิดปัญหาตามมาอีกในภายหลัง เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้นั้นน้อยมาก นอกจากนี้หากต้องการให้โปรตีนหลั่งออกนอกเซลล์ จะมีปริมาตรตัวอย่างที่ต้องเก็บจำนวนมากและหากนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ปริมาตรตัวอย่างจะมากเกินไปกว่าความสามารถของคอลัมน์ที่จะรับตัวอย่างได้ จึงเห็นว่าควรเปลี่ยนระบบการแสดงออกเพื่อให้รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ต้องการในปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป ดังนั้นจึงเปลี่ยนระบบการแสดงออกเป็น *E. coli* แทน

3.3 การสร้าง *E. coli* สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

E. coli เป็นระบบการแสดงออกของโปรตีนที่มีการศึกษาด้านพันธุศาสตร์อย่างลึกซึ้งและเป็นระบบที่มีการแสดงออกได้ผลดีโดยเฉพาะกับเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็กซึ่งไม่ต้องการระบบ post-translational modification เพื่อตัดแปลงโครงสร้างโปรตีน (Li *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2012) ในการทดลองนี้เลือกใช้พลาสมิด pQE-30 Xa เป็นเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกเนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ด้วย IPTG และรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จะมีส่วนของ 6X Histidine บริเวณส่วน N-terminal จากการแสดงออกเมื่อใช้เวกเตอร์ดังกล่าว

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดยใช้พลาสมิด pLG1αA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ L1F และ L1R ซึ่งจะเหนี่ยวนำส่วนหัวและท้ายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III ผลิตรหัส PCR ที่ได้มีขนาด 279 คู่เบส (รูปที่ 3.5 ก) ซึ่งได้ทำการสกัดออกจากเจลและตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III นำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pQE-30 Xa ที่ตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน จากนั้นนำไปใส่เข้า *E. coli* cometent cells สายพันธุ์ MG1655 โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่โตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แข็งที่มี Ampicillin และ X-gal โคโลนีที่คัดเลือกจะตรวจสอบความถูกต้องโดยการสกัดพลาสมิดแล้วทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ L1F และ L1R ซึ่งพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกจะได้ผลิตรหัส PCR ขนาด 279 คู่เบส (รูปที่ 3.5 ข) และตรวจสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III ซึ่งพลาสมิดที่ถูกต้องจะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 270 และ 3500 คู่เบส (รูปที่ 3.5 ค) และทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing ซึ่งพลาสมิดที่ถูกต้องได้ตั้งชื่อว่า pLG1 และ *E. coli* MG1655 ที่มีพลาสมิดดังกล่าวมีชื่อว่า TWLG1 ซึ่งใช้สำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1

3.4 การแสดงออก การทำให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายจาก *E. coli*

เมื่อนำ *E. coli* สายพันธุ์ TWLG1 มาเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG หลังการแตกเซลล์พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดที่คาดหมายอยู่ในส่วนโปรตีนละลายน้ำ (Soluble protein fraction) นอกจากนี้ยังพบว่าแถบโปรตีนดังกล่าวปรากฏอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ CONT ที่มีพลาสมิด pQE-30 Xa เปล่า และสายพันธุ์ TWLG1 ที่ไม่ได้เติม IPTG (รูปที่ 3.6) ดังนั้นแถบโปรตีนดังกล่าวน่าจะเป็นรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ที่ต้องการ

จากนั้นได้นำส่วนโปรตีนละลายน้ำที่ได้จากสายพันธุ์ TWLG1 ซึ่งเหนี่ยวนำด้วย IPTG มาผ่านคอลัมน์ Ni-IDA จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าการใช้พลาสมิด pQE-30 Xa ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตออกมามี

ส่วนของ 6X Histidine tag ติดอยู่ที่ส่วน N-terminal คนผู้วิจัยเลือกใช้คอลัมน์ดังกล่าวเนื่องจากมีความจำเพาะต่อโปรตีนที่มีการติด Histidine tag โดยเมื่อใช้คอลัมน์ดังกล่าวพบว่าในส่วน Elution ซึ่งเป็นการทำโปรตีนที่มีการติด Histidine tag ให้บริสุทธิ์ ยังพบโปรตีนขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตันดังที่คาดหมายแม้ว่าบางส่วนของโปรตีนขนาดดังกล่าวหลุดออกไปบ้างในส่วน Flow through (รูปที่ 3.7 ก) ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากแถบโปรตีนดังกล่าวมีโปรตีนอื่น (ที่ไม่ใช่รีคอมบิแนนท์ Longan 1) ที่มีขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตันเช่นกัน รวมถึงมีรีคอมบิแนนท์ Longan 1 บางส่วนหลุดออกไปเพราะความสามารถในการจับโปรตีนของคอลัมน์ดังกล่าวมีจำกัด หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ คนผู้วิจัยได้นำส่วน Elution ที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay และนำไปตรวจสอบว่าแถบโปรตีนดังกล่าวคือรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 หรือไม่ด้วยเทคนิค Western blot พบว่า แถบโปรตีนดังกล่าวสามารถจับจำเพาะได้กับแอนติบอดีต่อ Histidine tag จึงสามารถสรุปได้ว่า *E. coli* สายพันธุ์ TWLG1 สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 และได้นำรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ที่สกัดได้ไปทดลองในขั้นต่อไป

3.5 การตรวจสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านอนุมูลอิสระ

การทดลองนี้เริ่มจากการตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระต่างๆ ได้แก่ DPPH, ABTS และ ไนตริกออกไซด์ ซึ่งเมื่อนำมาหาค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (50%) พบว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีและดีกว่าตัวควบคุม (ตารางที่ 3.2) โดยพิจารณาได้จากค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่าหรือหมายความว่าสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่งเมื่อใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า เมื่อนำความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระต่างๆ เหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของโปรตีนไฮโดรไลสเสตซึ่งได้ทำมาและเป็นที่มาของเปปไทด์ Logan 1 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสเสตที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 5 กิโลดาลตันด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชัน (Permeate from 5 kDa membrane) ให้ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระประเภท DPPH และ ABTS ได้ดีกว่า เห็นได้จากค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่า (รูป 3.8 ก และข) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในส่วนของไฮโดรไลสเสตส่วนนี้ประกอบด้วยเปปไทด์อื่นผสมอยู่ได้ และมีการทำงานร่วมกันของเปปไทด์เหล่านี้ในการกำจัดอนุมูลอิสระดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ผลการกำจัดอนุมูลไนตริกออกไซด์เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 สามารถกำจัดอนุมูลอิสระประเภทนี้ได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลสเสต ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเปปไทด์ Longan 1 มีความจำเพาะในการกำจัดอนุมูลไนตริกออกไซด์ และรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีจำนวนชุดเปปไทด์ที่เพิ่มขึ้น (เปปไทด์ Longan 1 จำนวน 4 ชุดเรียงต่อกัน) จึงทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลไนตริกออกไซด์ดีขึ้น นอกจากนี้เปปไทด์ดังกล่าวน่าสนใจสำหรับการนำไปศึกษาต่อ เช่น การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการอักเสบเนื่องจากมีรายงานพบว่าการอักเสบมีความเกี่ยวข้องกับไนตริกออกไซด์ (Sharma *et al.*, 2007)

สำหรับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอีกหนึ่งกิจกรรมที่ทำการทดสอบคือการปกป้องดีเอ็นเอจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลไฮดรอกซิล ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากอนุมูลไฮดรอกซิลนั้นเกิดขึ้นจริงในร่างกาย และความเสียหายบนดีเอ็นเอนำไปสู่การกลายพันธุ์หรือสาเหตุของโรค เช่น มะเร็ง ในการทดลองนี้การทดสอบความสามารถดังกล่าวใช้พลาสมิด pBR322 เป็นตัวแทนของดีเอ็นเอ หลักการในการทดสอบคือ พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอแบบวงกลม เมื่อนำไปวิ่งในเจลอะกาโรส (Agarose electrophoresis) จะมีการขดม้วนให้อยู่ในรูป supercoil (SC) ทำให้วิ่งผ่านเจลได้เร็วและทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่ำกว่าขนาดจริงของพลาสมิด ดังนั้น SC จึงเป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่ไม่ถูกทำลาย เมื่อพลาสมิดถูกทำลายโดยสายทั้งสองของดีเอ็นเอแตกหัก (double strand break) จะเกิดเป็นดีเอ็นเอเส้นตรง (Linear) หรือถ้าแตกหักเพียงสายเดียว (single strand break) จะเกิดเป็นรูปแบบ open circular (OC) ซึ่งรูปแบบ Linear และ OC (หรือรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหาย) นี้จะวิ่งในเจลอะกาโรสได้ช้ากว่ารูปแบบ SC ซึ่งจะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดสูงกว่า SC

จากผลการทดลองในรูปที่ 3.9 เมื่อผสมริคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 (0.86 mg/mL) กับพลาสมิด pBR322 แล้วชักนำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิลด้วยปฏิกิริยา Fenton พบว่ามีแถบดีเอ็นเอของ SC หรือรูปแบบดีเอ็นเอที่ไม่ถูกทำลายปรากฏบนเจลอะกาโรส ขณะที่ปฏิกิริยาที่ใส่ น้ำทรินคอมบิแนนท์เปปไทด์ ไม่พบรูปแบบ SC จึงสามารถสรุปได้ว่าริคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีความสามารถในการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลไฮดรอกซิล ซึ่งเป็นที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาต่อไปเพื่อนำเปปไทด์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้

3.6 การตรวจสอบฤทธิ์ของริคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

อนุมูลอิสระนอกจากก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลต่างๆ ความเสียหายบนดีเอ็นเอก็ยังคงเป็นสาเหตุของมะเร็งได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่านอกจากฤทธิ์ในการกำจัดและป้องกันอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคมะเร็ง ริคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายนี้ยังมีความสามารถในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งด้วยหรือไม่

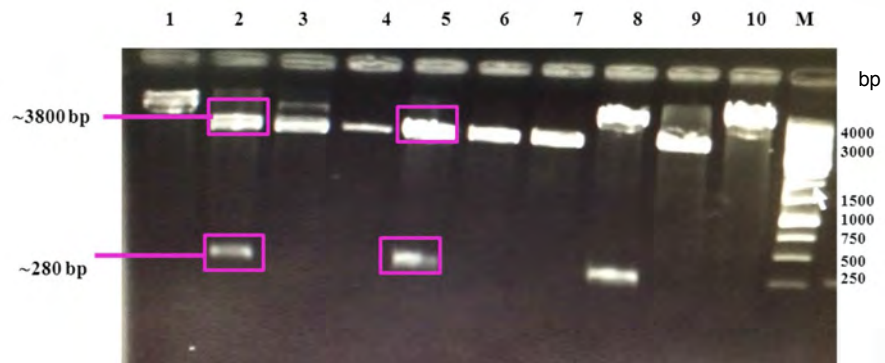
จากการทดสอบการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ BT474 (เต้านม), CHAGO (ปอด), HEP-G2 (ตับ), KATO-3 (กระเพาะ), และ SW620 (ลำไส้ใหญ่) พบว่าถ้าพิจารณาที่ความเข้มข้นของริคอมบิแนนท์เปปไทด์ 27 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งกระเพาะ (KATO-III) ได้ดีที่สุดโดยไม่มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ปกติ (รูปที่ 3.10) อย่างไรก็ตามจากความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ได้ ยกเว้นเซลล์ KATO-III ที่ได้ค่า IC_{50} คือ 425.96 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าริคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีความจำเพาะในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งกระเพาะ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปเพื่อพัฒนาไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *P. pastoris* สายพันธุ์ TWLG1PP ในอาหารเหลว MMH ที่เวลาต่างๆ

ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ (mL)	ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (mg/mL) ที่เวลา				
	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
100	-0.04±0.018	0.12±0.036	0.25±0.052	0.30±0.047	0.33±0.057
200	-0.02±0.003	0.01±0.015	0.04±0.047	0.09±0.088	0.13±0.074

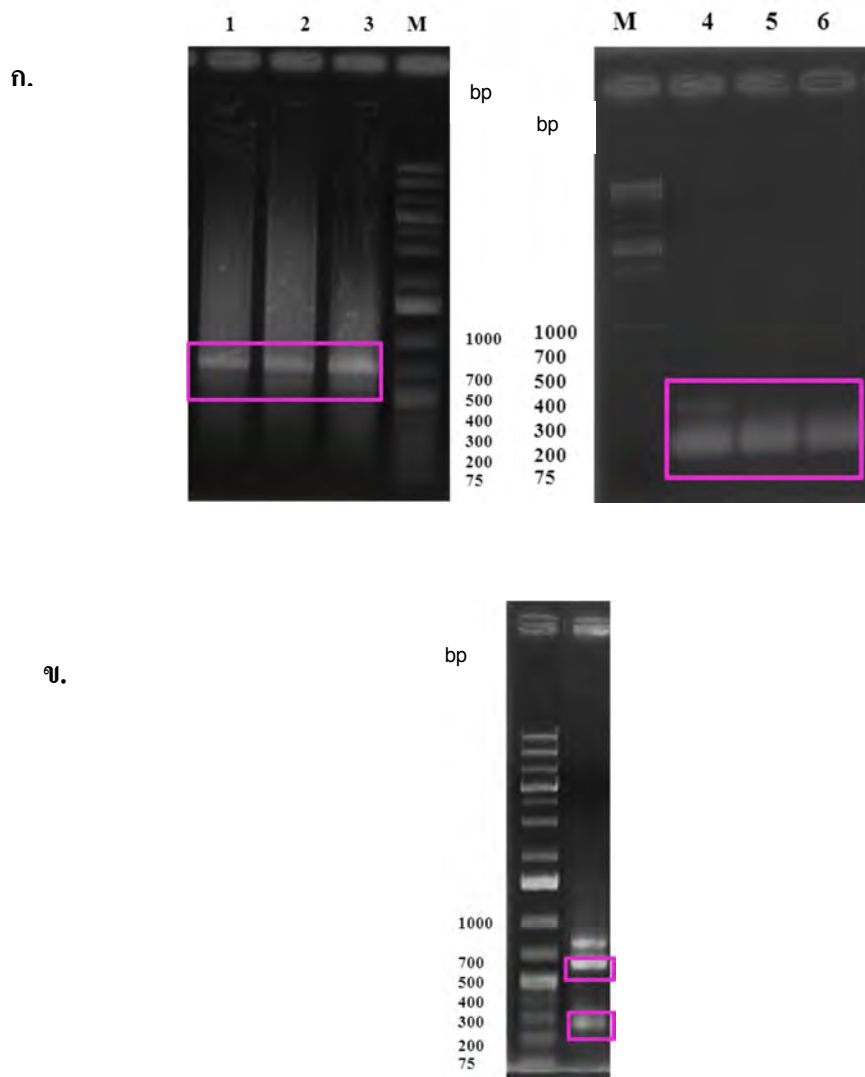
ตารางที่ 3.2 ค่า IC_{50} ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ในการกำจัดอนุมูลอิสระต่างๆ

สารตัวอย่าง	ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ในการกำจัดอนุมูลอิสระ		
	NO	DPPH	ABTS
รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1	20.67 ± 0.24	57.68 ± 1.90	48.18 ± 0.46
ตัวควบคุม	73.17 ± 0.35 (Curcumin)	101.73 ± 1.47 (Ascorbic acid)	89.45 ± 2.11 (Ascorbic acid)



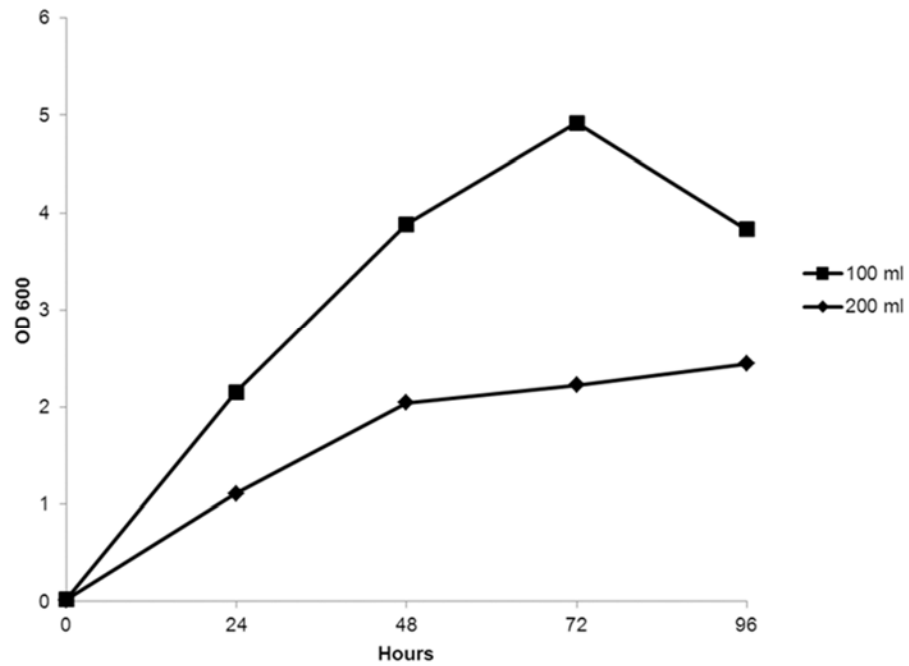
รูปที่ 3.1 การตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการบนพลาสมิด pPicOA

พลาสมิด pPicOA ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Logan 1 ในทิศทางที่ถูกต้อง เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsi*WI ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280 และ 3600 คู่เบส (Lane 2 และ 5) พลาสมิดเหล่านี้ได้นำไปส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA Sequencing ต่อไป โดยรูปเจลที่แสดงในรูปแบบเป็น 1% w/v Agarose Electrophoresis



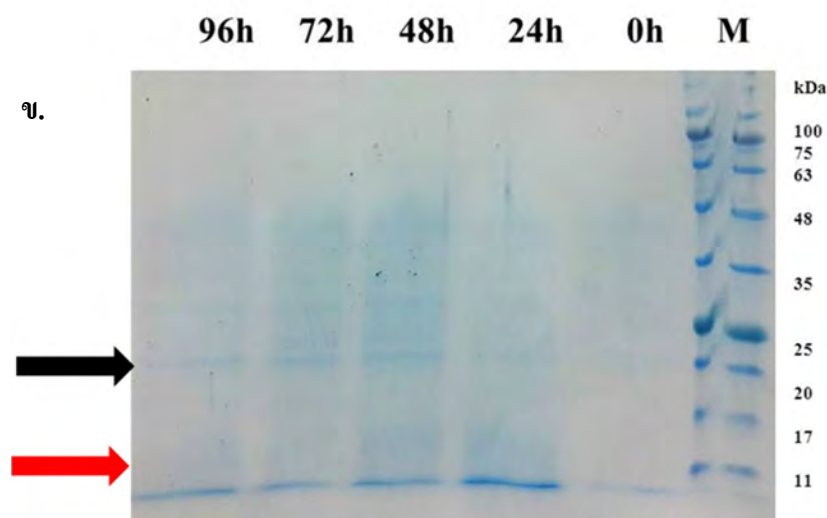
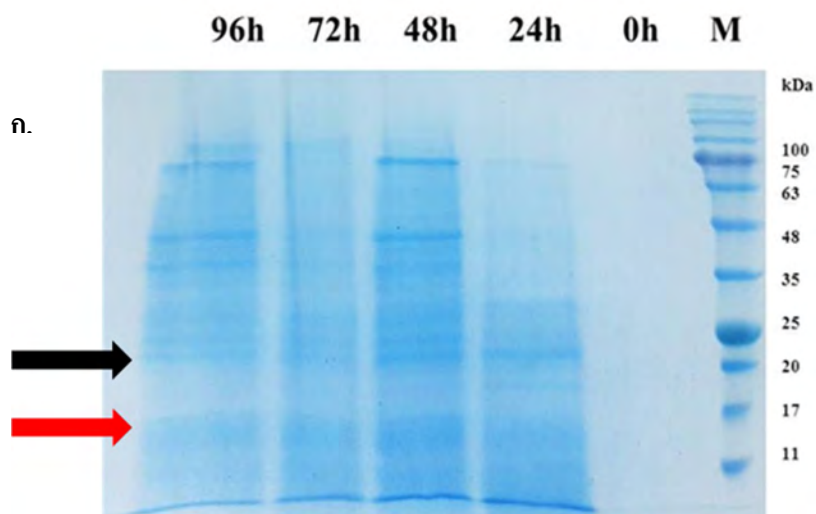
รูปที่ 3.2 การตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *P. pastoris*

(ก.) ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตภัณฑ์คอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ด้วยไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 760 คู่เบส (Lane 1-3) และไพรเมอร์ L1F กับ L1R ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 290 คู่เบส (Lane 4-6) (ข.) การตัดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 760 คู่เบสที่ได้จากไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsi*WI ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 520 และ 240 คู่เบส

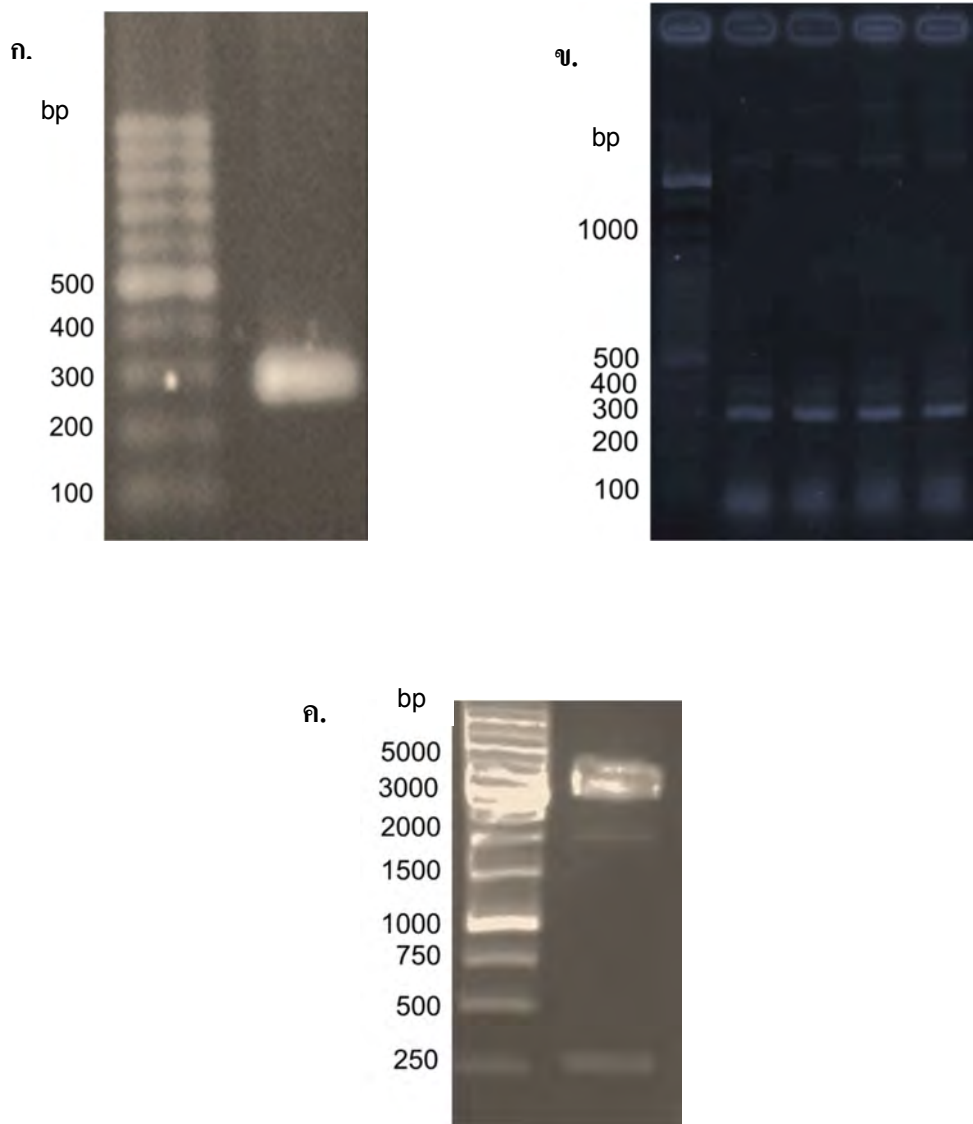


รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตของ *P. pastoris* สายพันธุ์ TWLG1PP ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMH ปริมาตร 100 และ 200 mL

การเจริญเติบโตวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm

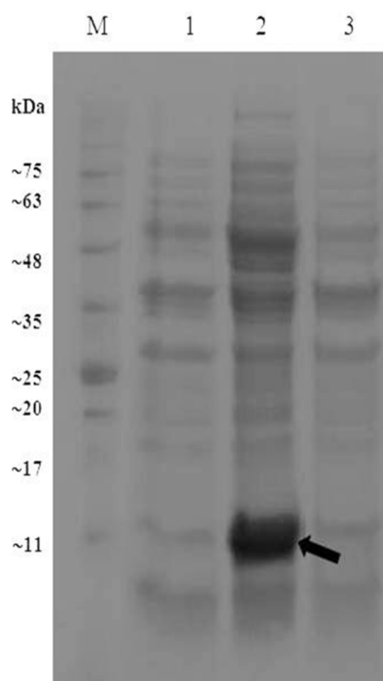


รูปที่ 3.4 โปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *P. pastoris* สายพันธุ์ TWLG1PP ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMH ปริมาตร (ก.) 100 ml (ข.) 200 ml ที่ช่วงเวลาต่างๆ
วิเคราะห์ด้วย 18% SDS PAGE ซึ่งขนาดคาคหมายของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Logan 1 คือประมาณ 10 หรือ 20 กิโลดาลตัน



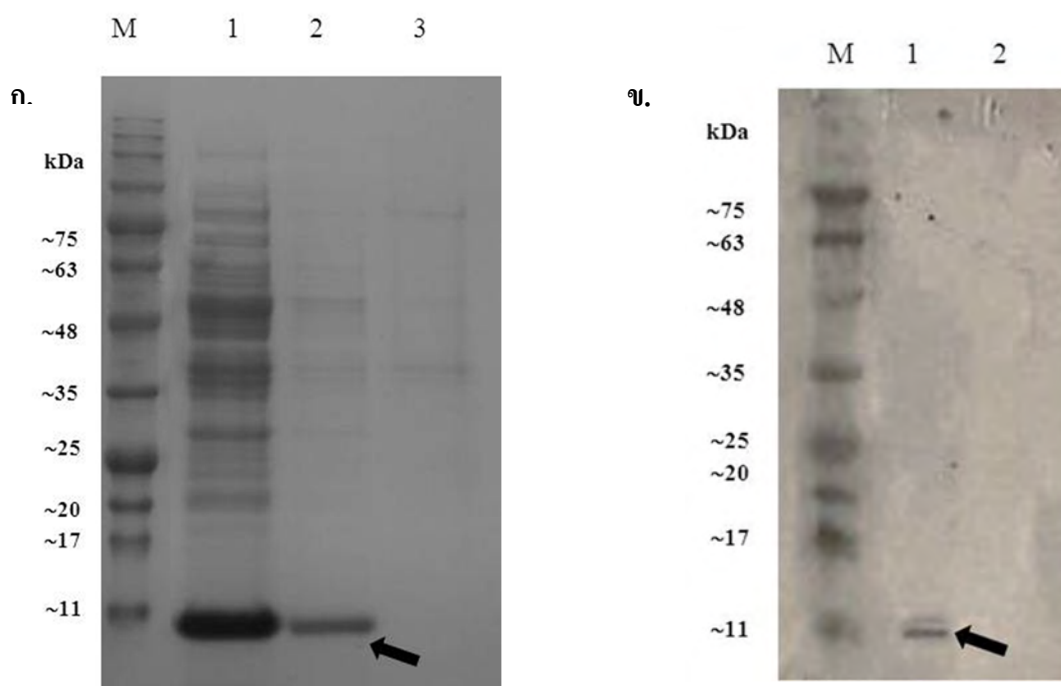
รูปที่ 3.5 การสร้างพลาสมิด pLG1 สำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1

(ก.) การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้พลาสมิด pLG1 α A เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ L1F และ L1R ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 279 คู่เบส (ข.) การตรวจสอบของพลาสมิดหลังจากใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอลงพลาสมิด pQE-30 Xa ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ L1F และ L1R ซึ่งพลาสมิดที่มีการแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการจะได้ ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 279 คู่เบส (ค.) การตรวจสอบของพลาสมิดหลังจากใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอลงพลาสมิด pQE-30 Xa โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III โดยได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3500 และ 270 คู่เบส



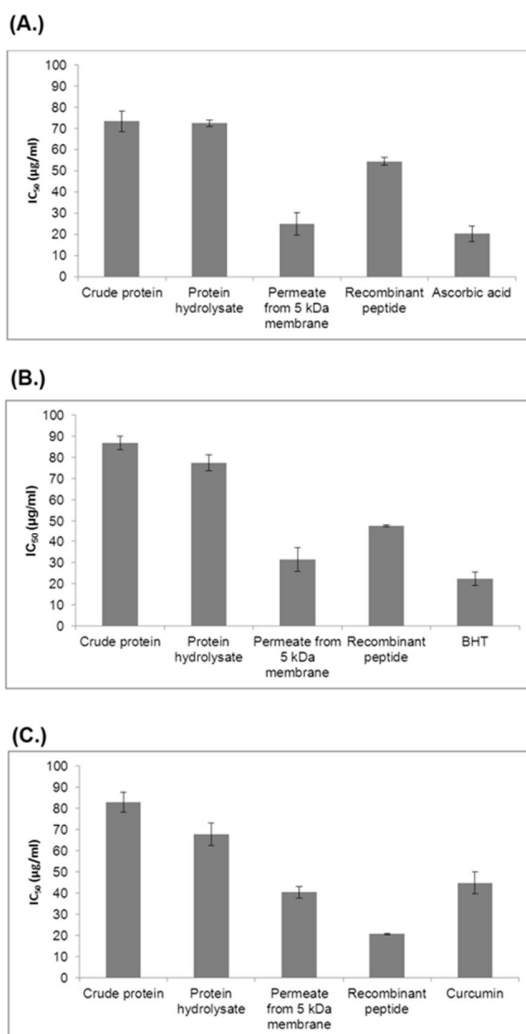
รูปที่ 3.6 การแสดงออกของโปรตีนในส่วนของโปรตีนละลายน้ำ (Soluble protein fraction) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ 18% acrylamide separating gel พบว่ามีแถบโปรตีนขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตันปรากฏอย่างชัดเจนเมื่อ *E. coli* สายพันธุ์ TWLG1 ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG (Lane 2) เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ CONT (Lane 1) และสายพันธุ์ TWLG1 ซึ่งไม่ได้มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG (Lane 3)



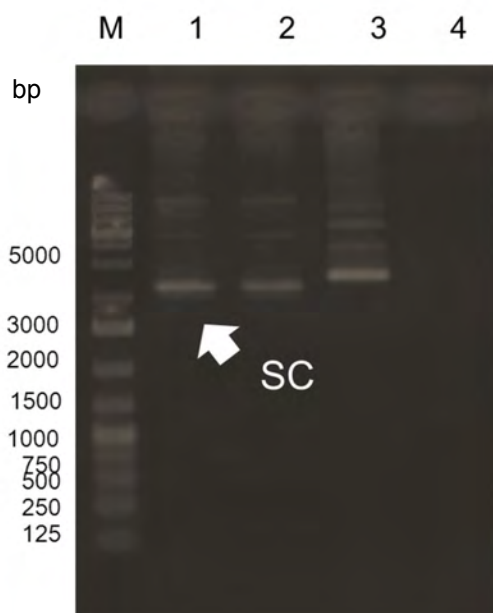
รูปที่ 3.7 การทำรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 และการตรวจสอบ

(ก.) การเปปไทด์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-IDA โดยการนำโปรตีนส่วนละลายน้ำได้ที่ได้จากการเหนี่ยวนำ *E. coli* สายพันธุ์ TWLG1 ด้วย IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ โดยรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีขนาดที่คาดหมายคือ 13 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ 18% acrylamide separating gel พบโปรตีนขนาดดังกล่าวพบในส่วนของ Flow through หรือโปรตีนที่ไม่เกาะคอลัมน์ (Lane 1) แต่ไม่พบในส่วน Wash หรือส่วนที่ถูกล้างจากคอลัมน์ (Lane 3) และพบอีกครั้งในตัวอย่างที่ชะเก็บผ่านคอลัมน์ส่วน Elution (Lane 2) (ข.) การตรวจสอบด้วยวิธี Western blot พบว่าแถบโปรตีนขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตันที่สกัดได้สามารถจับได้กับแอนติบอดีต่อ Histidine tag (Lane 1) แต่โปรตีนอื่น เช่น Bovine Serum Albumin (BSA) ไม่สามารถจับกับแอนติบอดีดังกล่าวได้ (Lane 2)



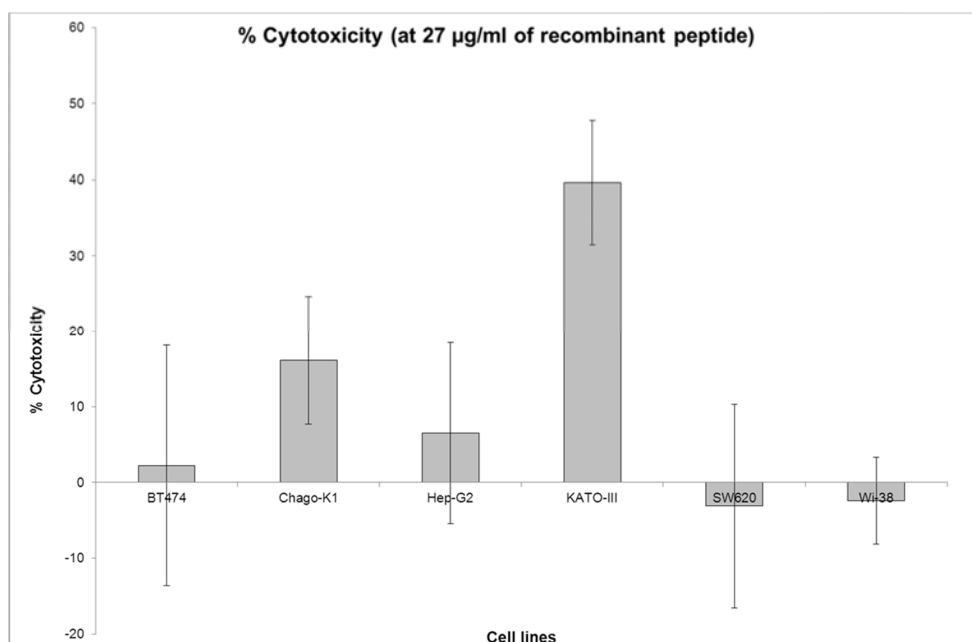
รูปที่ 3.8 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระต่างๆของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 เปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสต

ค่า IC₅₀ ในการกำจัดอนุมูล (A.) DPPH (B.) ABTS (C.) ในตริกออกไซด์ของโปรตีนหยาบจากเมล็ดลำไย (Crude protein) โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เกิดจากการย่อยโปรตีนหยาบด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนกรีติน (Protein hydrolysate) โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 5 กิโลดาลตันโดยเทคนิคอัลตราฟิวเตรชัน (Permeate from 5 kDa membrane) และรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 (Recombinant peptide)



รูปที่ 3.9 การทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ในการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลไฮดรอกซิล

พลาสมิด pRB322 ใช้เป็นตัวแทนดีเอ็นเอ ซึ่งหากไม่ถูกทำลายด้วยอนุมูลไฮดรอกซิล แลบดีเอ็นเอที่วิ่งต่ำสุดและต่ำกว่าขนาดที่ควรจะเป็น (4361 คู่เบส) หรือรูปแบบของ supercoil (SC) ซึ่งเป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่ไม่ถูกทำลายจะปรากฏชัดเจนบน 1% w/v Agarose Electrophoresis (Lane 1: pBR322 ที่ไม่มีอนุมูลไฮดรอกซิล) เมื่อผสมรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 (1 mg/mL) กับพลาสมิด pRB322 แล้วชักนำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล (Lane 2) ซึ่งยังพบแลบดีเอ็นเอของ SC แสดงถึงความสามารถในการปกป้องดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับการใช้น้ำแทนรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ (Lane 3) ซึ่งไม่พบแลบดีเอ็นเอของ SC หรืออาจกล่าวได้ว่าดีเอ็นเอถูกทำลาย



รูปที่ 3.10 ความสามารถของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 (27 µg/mL) ในการต้านการแบ่งตัวของ มะเร็ง BT474 (เต้านม), CHAGO (ปอด), HEP-G2 (ตับ), KATO-3 (กระเพาะ), และ SW620 (ลำไส้ใหญ่) และเซลล์ปกติคือ Wi-38 (เซลล์เยื่อหุ้มปอด)

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

โครงการวิจัยนี้ได้พบเปปไทด์ที่คาดว่ามียุทธศาสตร์ทางชีวภาพจากเมล็ดลำไย ได้แก่ เปปไทด์ Longan 1 (ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF) และคณะผู้วิจัยได้ออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 1 ให้เรียงต่อกัน 4 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดจะค้นด้วยรหัสโคดอนของกรดอะมิโนกรดแอสปาดิก (Aspartic acid) เพื่อให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีความยาวมากพอในการตรวจติดตามเมื่อใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นและได้ตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด pPicZ α ได้เป็นพลาสมิดชื่อ pTWLG1 และได้ทำการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ซึ่งได้สายพันธุ์ TWLG1PP แต่เมื่อเหนี่ยวนำให้สร้างรีคอมบิแนนท์ด้วยเมทานอล และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อหารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ซึ่งควรหลั่งออกนอกเซลล์เพราะมีส่วน α -mating factor ที่มาจากการใช้พลาสมิด pPicZ α โดยพบแถบโปรตีนน่าสนใจจากตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 แถบ คือประมาณ 10 และ 20 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาดของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 คือประมาณ 10 กิโลดาลตัน แต่ถ้าหากกระบวนการส่งออกนอกเซลล์ไม่ได้ตัดส่วน α -mating factor ออก ก็จะมีขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตัน อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบความถูกต้องด้วยเทคนิคสเปกโตรเมตรี พบว่าไม่ใช่รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีความเป็นไปได้ว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ไม่ได้ถูกผลิตขึ้นหรือไม่ได้หลั่งออกนอกเซลล์แต่ทั้งนี้รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ออกแบบเมื่อใช้พลาสมิด pPicZ α ไม่ได้ออกแบบให้มีเครื่องหมายใดๆติดอยู่ ซึ่งทำให้ยากต่อการติดตามและสกัด โดยเฉพาะในการแตกเซลล์ซึ่งพบโปรตีนอื่นๆอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นถ้าต้องการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์จาก *P. pastoris* จะต้องกลับออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอและสร้างสายพันธุ์ *P. pastoris* ใหม่ โดยเมื่อพิจารณาถึงเวลาและปัญหาต่างๆที่เกิดจาก *P. pastoris* เช่น ปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้มีน้อยมาก และหากต้องการสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยคอลัมน์จะเกิดปัญหาเพราะการใช้ตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นต้องใช้ตัวอย่างซึ่งมีปริมาณมาก เกินกว่า

ความสามารถของคอลัมน์ที่จะรับตัวอย่างได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะเปลี่ยนระบบในการแสดงออก

คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านเป็น *E. coli* ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากประสบความสำเร็จในการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยเฉพาะเปปไทด์ที่ไม่ต้องการ post-translation modification ในโครงการนี้ได้นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอคั้งที่ใช้ใน *P. pastoris* ตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด pQE-30 Xa แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ MG1655 ซึ่งประสบความสำเร็จและสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH, ABTS และไนตริกออกไซด์ โดยเฉพาะไนตริกออกไซด์ ซึ่งพบว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์สามารถกำจัดอนุมูลไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลสเสต ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเปปไทด์ดังกล่าวจำเพาะต่อการกำจัดไนตริกออกไซด์และการที่รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ประกอบด้วยเปปไทด์ Longan 1 จำนวน 4 ชุด เรียงต่อกัน อาจทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลดังกล่าวได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีความสามารถในการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลไฮดรอกซิล ในการทดสอบการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง พบว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งกระเพาะ (KATO-III) ได้ดีที่สุดใน และมีความเป็นไปได้ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งดังกล่าวโดยไม่มีฤทธิ์ต่อการแบ่งเซลล์ปกติ ดังนั้นรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 มีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อเป็นอย่างยิ่ง รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่นการต้านการอักเสบ ซึ่งมีหลักฐานว่าการอักเสบเกี่ยวข้องกับไนตริกออกไซด์

2. ข้อเสนอแนะ

หากต้องการสร้างสายพันธุ์ *P. pastoris* ในการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 จำเป็นต้องออกแบบให้มีเครื่องหมายเช่น Histidine tag เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจสอบและสกัด นอกจากนี้การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก *P. pastoris* ยังพบว่ามียีนปริมาณน้อย จึงจำเป็นต้องศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ด้วย

แม้ว่าการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Longan 1 จาก *E. coli* จะประสบความสำเร็จ แต่การผลิตเพื่อการนำไปใช้ต่อจำเป็นต้องให้ได้ผลผลิตปริมาณมาก จึงควรมีการศึกษาภาวะที่เหมาะสม และการศึกษาการผลิตในสเกลที่ใหญ่ขึ้นด้วย

ริคอมบีแนนท์เปปไทด์ Logan 1 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะไนตริกออกไซด์ ซึ่งมีหลักฐานยืนยันว่าไนตริกออกไซด์เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จึงควรมีการทดสอบฤทธิ์ของริคอมบีแนนท์เปปไทด์ดังกล่าวในการต้านการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลไฮดรอกซิลและการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งกระเพาะ จึงควรมีการศึกษาต่อ เช่น ความเข้มข้นและวิธีการนำไปประยุกต์ใช้ที่เหมาะสม รวมถึงการศึกษาว่ากรดอะมิโนตัวใดได้รับผิดชอบต่อฤทธิ์ต่างๆ โดยการทำกรดอะมิโนแต่ละตัวเปลี่ยนเกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว LB (1 L)

10 g Bacto-peptone

5 g Yeast extract

10 g NaCl

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

2 อาหารแข็ง LB

อาหารเหลว LB เติม 2% Bacto-agar แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

3.อาหารเหลว low salt LB (1 L)

10 g Bacto-peptone

5 g Yeast extract

5 g NaCl

4. อาหารแข็ง low salt LB

อาหารเหลว LB เติม 2% Bacto-agar แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

5. อาหารเหลว YPD (1 L)

10 g Yeast Extract

20 g Peptone

20 g Dextrose

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

6. อาหารแข็ง YPD

อาหารเหลว LB เติม 1.5% Bacto-agar แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

7. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPG

10g Yeast extract

20 g Peptone

20 g Dextrose

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

8. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMH

1.34% w/v Yeast nitrogen base

4×10^{-5} % w/v Biotin

0.5% v/v Methanol

0.004% w/v Histidine

ละลายในน้ำ ปรับ pH เป็น 5 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

9. สารละลาย Lysis Equilibrium Wash (LEW) buffer

50 mM Na_2PO_4

300 mM NaCl

ละลายในน้ำ ปรับ pH เป็น 7.8 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

10. สารละลาย Denaturation Solubilization (DS) buffer

50 mM Na_2PO_4

300 mM NaCl

8 M Urea

ละลายในน้ำ ปรับ pH เป็น 7.8 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

11. Elution buffer (DE buffer)

50 mM Na_2PO_4

300 mM NaCl

100 mM Imidazole

ละลายในน้ำ ปรับ pH เป็น 7.8 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

12. TBST buffer

50 mM Tris-Cl, pH 7.6

150 mM NaCl

0.05% Tween 20

ละลายในน้ำ แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

13. DAB solution

0.3 g DAB ละลายใน TBS buffer ปริมาตร 1 L แล้วผสมกับ 30% H_2O_2 ปริมาตร 1 ml และ 1%

CoCl₂ solution ปริมาตร 2.5 ml

14. Phosphate Buffered Saline (PBS)

8g NaCl

0.2g KCl

1.44g Na₂HPO₄

0.24g KH₂PO₄

ละลายในน้ำ ปรับปริมาตรเป็น 1 L และ pH เป็น 7.4 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

บรรณานุกรม

- Ames, BN, Shigenaga MK, Gold LS (1993a). DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: Three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 5: 35-44.
- Ames, BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993b). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7915-7922.
- Barber, SC, Mead RJ, Shaw PJ (2006). Oxidative stress in als: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1762: 1051-1067.
- Cai, Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157–2184.
- Cheng, Y, Xiong YL, Chen J (2010). Fractionation, separation, and identification of antioxidative peptides in potato protein hydrolysate that enhance oxidative stability of soybean oil emulsions. *J Food Sci* 75: C760-765.
- Diplock, AT (1991). Antioxidant nutrients and disease prevention: An overview. *Am J Clin Nutr* 53: 189S-193S.
- Govindarajan, R, Rastogi S, Vijayakumar M, Shirwaikar A, Rawat AKS, Mehrotra S, Palpu P (2003) Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biol. Pharma. Bulletin* 26: 1424–1427.
- Hattori, M, Yamaji-Tsukamoto K, Kumagai H, Feng Y, Takahashi K (1998). Antioxidative activity of soluble elastin peptides. *J Agric Food Chem* 46: 2167-2170.
- Hazra, B, Biswas S, Mandal N (2008) Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complem Alter Med* 8: 1–10.
- Kjeldsen, T, Pettersson AF, Hach M (1999). Secretory expression and characterization of insulin in *pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem* 29 (Pt 1): 79-86.
- Li, C L, Xu TT, Chen RB, Huang XX, Zhao YC, Bao YY, Zhao WD, Zheng ZY (2013) Cloning, expression and characterization of antimicrobial porcine beta defensin 1 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 88: 47-53.

- Li, P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangoan K, Suzara VV, Duzgunes N, Renugopalakrishnan V (2007). Expression of recombinant proteins in *pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* 142: 105-124.
- Mohsen, SM, Ammar ASM (2009) Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem* 112: 595–598.
- Qian, ZJ, Jung WK, Kim SK (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *rana catesbeiana* shaw. *Bioresour Technol* 99: 1690-1698.
- Rajapakse, N, Mendis E, Byun HG, Kim SK (2005). Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J Nutr Biochem* 16: 562-569.
- Sharma, J N, Al-Omran A, Parvathy SS (2007) Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15: 252–259
- Sharma, OP, Bhat TK (2009). Dpph antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113: 1202-1205.
- Sinatra, ST, DeMarco J (1995). Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (ldl), and the heart: Antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Conn Med* 59: 579-588.
- Slater, TF (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222: 1-15.
- Srivastava, P, Raut HN, Wagh RS, Puntambekar HM, Kulkarn MJ (2012). Purification and characterization of an antioxidant protein (~16 kda) from *terminalia chebula* fruit original. *Food Chemistry* 131: 141-148.
- Wang, W, De Mejia EG (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 4: 63-78.
- Wang, Y, Meng Q, Gao W, Hou J, Ahmed Z (2011). Expression and purification of beefy meaty peptide in *pichia pastoris*. *Korean Journal of Chemical Engineering* 28: 848-852.
- Xie, Z, Huang J, Xu X, Jin Z (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry* 11.
- Yan, Y, Chen J, Li J (2003). Overexpression of a small medicinal peptide from ginseng in the yeast *pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 29: 161-166.

- Zhang, J, Zhang H, Wang L, Guo X, Wang X, Yao H (2010). Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and maldi-tof/tof ms/ms. *Food Chemistry* 119: 226-234.
- Zheng, S-R, Wang Y-P, Yang Y-Q, Zhang J (2010). Expression and identification of a small recombinant beefy meaty peptide secreted by the methylotrophic yeast *pichia pastoris*. *African Journal of Microbiology Research* 4: 2754-2762.
- Zhou, HH, Zhang AX, Zhang Y, Zhu DY (2012) Cloning, expression, and purification of a recombinant Tat-HA-NR2B9c peptide. *Protein Expr Purif* 85: 239-245.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

(ภาษาอังกฤษ) Dr. RUETHAIRAT BOONSOMBAT

ตำแหน่งปัจจุบันอาจารย์ A-5

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน3 ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์02-2188078 โทรสาร 02-2533543 E-mail address : Ruethairat.B@Chula.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน 1550/3 ถ.ประชาราษฎร์ 1 แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800

โทรศัพท์ (080) 9991465

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่จบการศึกษา
มหาวิทยาลัยมหิดล	ปริญญาตรี	วทบ. (ชีววิทยา)	2544
University of Massachusetts, Amherst	ปริญญาโทเอก-	Ph.D. (Microbiology)	2551

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ พันธุศาสตร์โมเลกุล

ผลงานทางวิชาการ

Niyomploy, P., **Boonsombat, R.**, Karnchanatat, A., and Sangvanich, P. (2014) A superoxide dismutase purified from the roots from *Stemona tuberosa*. *Prep Biochem Biotechnol* **44**: 663-379

Boonsombat, R. (2013) Production of L-lactic Acid from *Escherichia coli* harboring recombinant plasmid with *Rhizopus oryzae ldhA* gene. *Life Science Journal* **10**: 2217-2221.

Prasirtsak, B., Tanasupawatb, S., **Boonsombat, R.**, Kodama, K. and Thongchul, N. (2013) Characterization of lactic acid producing bacteria from Thai sources. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **3**: 33-38.

Moon-ai, W., Niyomploy, P., **Boonsombat, R.**, Sangvanich, P. and Karnchanatat, A. (2012) A superoxide dismutase purified from the rhizome of *Curcuma aeruginosa* Roxb. as inhibitor of nitric oxide production in the macrophage-like RAW 264.7 cell line. *Appl Biochem Biotechnol* **166**: 2138-2155

Lopper, M., **Boonsombat, R.**, Sandler, S. J. and Keck, J. L. (2007) A hand-off mechanism for primosome assembly in replication restart. *Molecular Cell* **26**: 781-793.

Boonsombat, R., Yeh, S.P., Milne, A., and Sandler, S.J. (2006) A novel *dnaC* mutation that suppresses *priB rep* mutant phenotypes in *Escherichia coli* K-12. *Mol Micro* **60**: 973-983.

Renzette, N., Gumlaw, N., Nordman, J.T., Krieger, M., Yeh S.P., Long, E., Centore, R., **Boonsombat, R.** and Sandler, S.J. (2005) Localization of RecA in *Escherichia coli* K-12 using RecA-GFP. *Mol Micro* **57**:1074-85.

ผู้ร่วมวิจัย

(ภาษาไทย) ผศ. ดร. อภิชาติ กาญจนทัต

(ภาษาอังกฤษ) Asst. Prof. Dr. APHICHART KARNCHANATAT

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ A-4

ตำแหน่งบริหาร รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 0-2218-8078 โทรสาร 0-2253-3543 Email: i_am_top@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญา	ปีที่จบการศึกษา	มหาวิทยาลัย	สาขาวิชา
ปริญญาตรี	2541	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	วท.บ.(เคมี)
ปริญญาโท	2544	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.(ชีวเคมี)
ปริญญาโท-เอก	2549	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

1. พันธุศาสตร์โมเลกุล เทคโนโลยีชีวภาพของเอนไซม์ (enzyme biotechnology)
2. เคมีของโปรตีน: โครงสร้าง และหน้าที่ (protein chemistry: structure and function)
3. เคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (chemical natural products)
4. ชีววิธีการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยเชื้อรา (fungal bioremediation)

ผลงานวิชาการ

- Saisavoey, T., Palaga, T., Malaivijitnond, S., Jaroenporn, S., Thongchul, S., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2014) Anti-osteoclastogenic, estrogenic, and antioxidant activities of cell suspension cultures and tuber root extracts from *Pueraria mirifica*. *Food science and biotechnology* **23**: 1253-1259.
- Saisavoey, T., Thongchul, S., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2014) Effect of methyl jasmonate on isoflavonoid accumulation and antioxidant enzymes in *Pueraria mirifica* cell suspension culture. *Journal of medicinal plant research* **8**: 401-407.
- Niyomploy, P., Boonsombat, R., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2014) A superoxide dismutase purified from the roots from *Stemona tuberosa*. *Prep Biochem Biotechnol* **44**: 663-379
- Niyomploy, P., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Vinayavekhin, N., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2013) Superoxide dismutase isozyme detection using two-dimensional gel electrophoresis zymograms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **90**: 72-77
- Rungsaeng, P., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2013) Zingipain, a Ginger Protease with Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *App biochem biotech* DOI: 10.1007/s12010-013-0243-x
- Charungchitrak, S., Petsom, A., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2013) Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food Chemistry* **126**: 1025-1032
- Tangngamsakul, P., **Karnchanatat, A.**, **Sihanonth, P.**, and **Sangvanich, P.** (2013) An extracellular glucoamylase produced by endophytic fungus EF6. *Applied Biochem Microbiol* **47**: 455-461
- Karnchanatat, A.**, Petsom, A., Sangvanich, P., Piapukiew, J., Whalley A.J.S., Reynolds, C.D., Gadd, G.M., and Sihanonth, P. (2013) A novel thermostable endoglucanase from the wood-

decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *Enzyme and Microbial Technology* **270**: 404-413

Chantaranothai, C., Palaga, T., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2012) Inhibition of nitric oxide production in the Macrophage-like Raw 264.7 cell line by protein from the rhizomes of Zingiberaceae plants. *Prep biochem biotechn***43**: 60-78

Karnchanatat, A., and Sangvanich, P. (2013) A Chitinase-Like Protein with α -Amylase Inhibitory Activity from Kluai Hom Thong Banana Fruit: Musa (AAA group). *Food Biotechnology* **26**: 218-238

Yodjun, M., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2012) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory proteins and peptides from the rhizomes of Zingiberaceae plants. *Applied Biochem and Biotechn***166**: 2037-2050.

Moon-ai, W., Niyomploy, P., Boonsombat, R., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2012) A Superoxide dismutase purified from the rhizome of *Curcuma aeruginosa* Roxb. as inhibitor of nitric oxide production in the Macrophage-like RAW 264.7 cell line. *App Biochem Biotech* **166**: 2138-2155.

Intrama, V., **Karnchanatat, A.**, Bunaprasert, T., and Vadhanasindhu, P. Critical effects of regulation on Thailand's cosmeceutical development process: human placenta extract *International Journal of Management and Business and Studies* **1**: 96-99.

Boonmee, A., Srisomsap, C., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich P. Biologically active proteins from *Curcuma comosa* Roxb. Rhizomes. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**: 5208-5215.

Boonmee, A., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich P. (2011) A proteomic analysis of *Curcuma comosa* Roxb. rhizomes. *Proteome Science* **9**: 43.

Kilaso, M., Kaewmuangmoon, J., **Karnchanatat, A.**, Sangvanich P., and Chanchao, C. (2011) Expression and characterization of *Apis dorsata* α -glucosidase III. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **14**: 479-488.

- Baebprasert, W., **Karnchanatat, A.**, Linblad, P., and Incharoensakdi A. (2011) Na⁺-stimulated nitrate uptake with increased activity under osmotic upshift in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 2467-2473.
- Sawaengsak, W., Saisavoey, T., Chuntaratin, P., and **Karnchanatat, A.** (2011) Micropropagation of the medicinal herb *Glycyrrhiza glabra* L., through shoot tip explant culture and glycyrrhizin detection. *International Research Journal of Plant Science* **2**:129-136.
- Tangngamsakul, P., **Karnchanatat, A.**, Sihanonth, P. and Sangvanich, P. (2011) An extracellular glucoamylase produced by endophytic fungus EF6. *App Biochem Microbiol* **47**: 412-418.
- Karnchanatat, A.***, Tiengburanatam, N., Boonmee, A., Puthong, S., and Sangvanich, P. (2011) Zingipain, A cysteine protease from *Zingiber ottensii* Valetton rhizomes with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines. *Prep biochemis biotech* **41**: 201-217.
- Charungchitrak, S., Petsom, A., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2011) Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Neilson. *Food Chemistry* **126**:1025-1032.
- Boonmee, A., Srisomsap, C., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2011) An antioxidant protein in *Curcuma comosa* Roxb. rhizomes. *Food Chemistry* **124**: 476-480.
- Tiengburanatam, N., Sangvanich, P., Boonmee, A and **Karnchanatat, A.** (2010) A novel α -glucosidase inhibitor protein from the rhizomes of *Zingiber ottensii* Valetton. *AppBiochem Biotech* **162**: 1938-1951.
- Petnual, P., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2010) A lectin from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.) and its antifungal, antibacterial and alpha-glucosidase inhibitory activities. *Food Science and Biotechnology* **19**: 907-916.
- Konkumnerd, W., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2010) A thermostable lectin from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**: 1920-1925.
- Niyomploy, P., Thunyakitpisal, P., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2010) Cell proliferative effect of polyxyloses extracted from the rhizomes of wild tumeric, *Curcuma aromatic* Salisb. *Pharmaceutical Biology* **48**: 932-937.

Kheeree, N., Sangvanich, P., Puthong, S., and **Karnchanatat, A.** (2010) Antifungal and antiproliferative activities of lectin from the rhizomes of *Curcuma amarissima* Roscoe. *App Biochem and Biotech* **162**: 912-925.

Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piapukiew, J., Whalley, A.J.S., Reynolds, C.D., and Sihanonth, P. (2008) A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *Enzyme and Microbial Technology* **42**: 404-413.

Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piaphukiew, J., Whalley, A.J.S., Reynolds, C.D., and Sihanonth, P. (2007) Purification and biochemical characterization of an extracellular α -glucosidase from wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *FEMS Microbio Letters* **270**:162-170.

Incharoensakdi, A. and **Karnchanatat, A.** (2003) Salt stress enhances choline uptake in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1621**: 102-109.

ผลงานแต่งหรือเรียบเรียง คํารานหนังสือ หรือบทความทางวิชาการ

1. **Karnchanatat, A.*** and Tiengburanatham, N. (2010) Antimicrobial peptides. *Thaksin University Journal* 13: 101-108.
2. **Karnchanatat, A.*** (2012) Antimicrobial activity of lectins from plants, *Antibacterial Agents / Book 1*, ISBN 979-953-307-281-3. (in press)

ผู้ช่วยวิจัย

(ภาษาไทย) นางสาวธนพร วิชัย

(ภาษาอังกฤษ) Miss THANAPORN WICHAJ

ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัย(ฝ่ายวิจัยและพัฒนา)

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2188071 โทรสาร 02-2533543 E-mail address : th_aoy@hotmail.co.th

ที่อยู่ปัจจุบัน 103 หมู่ 14 ต.วังทรายพูน อ.วังทรายพูน จ.พิจิตร 66180

โทรศัพท์ 0870090075

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่จบการศึกษา
มหาวิทยาลัยบูรพา	ปริญญาตรี	วท.บ. (ชีวเคมี)	2547
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	ปริญญาโท	วศ.ม. (เคมี)	2555

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ พันธุศาสตร์โมเลกุล

ผลงานวิชาการและการเสนอผลงานวิจัย

ธนพร วิชัย, และ กุทัยรัตน์ บุญสมบัติ (2558) การสร้างสายพันธุ์ *Pichia pastoris* GS115 เพื่อการผลิตเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งพบในเมล็ดลำไย. รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 7 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก. 30-31 มีนาคม 2558. หน้า BI-P-059.

Wichai, T. and Boonsombat, R. Expression of recombinant antioxidative peptide from longan seeds in *Escherichia coli*. The 27th Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology 2015 and International Conference “INNOVATIVE BIOTECHNOLOGY”, November 17-19, 2015, Bangkok, Thailand.

Kanjanapattanakul W., Wichai, T. and Boonsombat, R. Genetic modification of *Escherichia coli* for L-lactic acid production. The 27th Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology 2015 and International Conference “INNOVATIVE BIOTECHNOLOGY”, November 17-19, 2015, Bangkok, Thailand.

Wichai, T. and Boonsombat, R. Construction of *Escherichia coli* strain for producing recombinant antioxidative peptide from longan seeds. The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. July 29-30, 2015, Khon Kaen, Thailand.

Yamoat, T., **Wichai, T.** and Boonsombat, R. Improvement of lactic acid production in *Escherichia coli* harboring plasmid with *Rhizopus oryzae ldhA* gene. Proceeding in the TSB International Forum. August 28-30, 2013, Bangkok, Thailand.