

การโคลนยีนไฟโคไซยานินสีสายเบต้าเพื่อศึกษาบทบาทในการปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มี
ฮีโมโกลบินอีจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ

นางสาวพรทิพย์ เพลินศิลป์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

CLONING OF C-PHYCOCYANIN β -SUBUNIT FOR CHARACTERIZATION OF
ITS PROTECTIVE ROLE AGAINST OXIDATIVE DAMAGE IN
HEMOGLOBIN E-CARRYING RED BLOOD CELLS

Miss Pornthip Pleonsil

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Hematology Sciences

Department of Clinical Microscopy

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนยีนไฟโคไซยานินสีสายเบต้าเพื่อศึกษาบทบาทในการปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอีจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ
โดย	นางสาวพรทิพย์ เพลินศิลป์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ญานีนานา สุวรรณวงศ์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรรณะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. สุพันธ์ิตรา ชาญประเสริฐ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ญานีนานา สุวรรณวงศ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สุพรรณ สุขอรุณ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. ศักดิ์ดา ไยน้อย)

พรทิพย์ เพลินศิลป์ : การโคลนยีนไฟโคไซยานินซีสายเบต้าเพื่อศึกษาบทบาทในการปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอีจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ. (CLONING OF C-PHYCOCYANIN β -SUBUNIT FOR CHARACTERIZATION OF ITS PROTECTIVE ROLE AGAINST OXIDATIVE DAMAGE IN HEMOGLOBIN E-CARRYING RED BLOOD CELLS) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ : อ.ดร.ญาณีนาด สุวรรณวงศ์, 101 หน้า.

ภาวะ oxidative stress เป็นภาวะที่ร่างกายมี reactive oxygen species (ROS) ในปริมาณที่มากเกินไปจนร่างกายไม่สามารถกำจัด ROS ได้หรือมีความสามารถกำจัดได้น้อยลง ก่อให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับสารอนุมูลอิสระ ROS จึงมีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพในโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคเลือดบางชนิด เช่น โรคเม็ดเลือดแดงรูปเคียว, โรคพร่องเอนไซม์ G6PD และ โรคธาลัสซีเมีย ปัจจุบันมีการศึกษาและค้นหาสารต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่สกัดได้จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อนำมาใช้เสริมฤทธิ์การรักษาของโรคที่มีภาวะ oxidative stress ได้ ไฟโคไซยานินซีเป็นไฟโคบิลิโปรตีนที่มีคุณสมบัติเด่นทางด้าน การต่อต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเหตุนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ apo-c-PC(β) เปรียบเทียบกับ native c-PC ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา โดยสามารถโคลนยีนและแสดงออกโปรตีน apo-c-PC(β) ใน *Escherichia coli* วิเคราะห์และประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ apo-c-PC(β) และ native c-PC ด้วยการวัดค่า Trolox equivalent antioxidant capacities และความสามารถในการปกป้องเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย homozygous hemoglobin E จากการทำลายด้วย peroxy radicals และ hydrogen peroxide พบว่า apo-c-PC(β) และ native c-PC สามารถปกป้องเซลล์เม็ดเลือดแดงจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระได้ ดังนั้น การผลิตโปรตีน c-PC ในแบคทีเรียที่ช่วยลดต้นทุนและเวลาในการผลิต และได้ผลผลิตโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง นอกจากนี้สามารถทำการพัฒนาเทคนิคการผลิตด้วยเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นและนำไปใช้ในเสริมฤทธิ์การรักษาผู้ป่วยได้ในอนาคต

ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา 2555.....

5277209237 : MAJOR CLINICAL HEMATOLOGY SCIENCES

KEYWORDS : ANTI-OXIDANT / ERYTHROCYTE / HEMOGLOBIN E / PHYCOCYANIN,
RECOMBINANT PROTEIN / SPIRULINA

PORNTHIP PLEONSIL : CLONING OF C-PHYCOCYANIN β -SUBUNIT FOR
CHARACTERIZATION OF ITS PROTECTIVE ROLE AGAINST OXIDATIVE
DAMAGE IN HEMOGLOBIN E-CARRYING RED BLOOD CELLS. ADVISOR :
YANEENART SUWANWONG, Ph.D., 101 pp.

Excess reactive oxygen species (ROS) or loss of the ability to detoxify them results in oxidative stress. Oxidative damage has been implicated in the pathogenesis of many diseases, especially of certain types blood diseases such as sickle cell disease, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and thalassemia. The present studies have shown many natural antioxidant substances for use synergistic treatment of oxidative damage diseases. Phycocyanin (c-PC) is phycobiliproteins which play a role of antioxidant property. We investigated the antioxidant activity of the recombinant apo-c-PC(β) compared to that of native c-PC purified from *Spirulina* sp. The gene encoding the β -subunit of c-PC was successfully cloned and expressed in *Escherichia coli*. The anti-oxidant capacities of recombinant apo-c-PC(β) and native c-PC were evaluated by measuring their Trolox equivalent antioxidant capacities and examining their protective effects on erythrocytes from normal and homozygous haemoglobin E individuals against peroxy radicals and hydrogen peroxide. The results demonstrated that apo-c-PC(β) can against the both radicals and potentially protect erythrocytes from oxidative damage. Therefore, the expression of c-PC in bacteria reduces the cost and time for more purity protein production, and the recombinant protein could be further developed to obtain a more efficient protein for synergistic therapeutic purposes.

Department : Clinical Microscopy Student's Signature

Field of study : Clinical Hematology Sciences Advisor's Signature.....

Academic year : 2012

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. ญาณินาถ สุวรรณวงศ์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา รวมทั้งการเป็นผู้ให้วิชาความรู้ มุมมอง เทคนิคในการทำวิจัย คำแนะนำและให้กำลังใจในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุพนิตรา ชาญประเสริฐ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ สุพรรณ สุขอรุณ และอาจารย์ ดร. ศักดิ์ดา ไยน้อย ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 17 ครั้งที่ 1/2555 ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษาและทุนอุดหนุนผู้ช่วยสอนตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณศูนย์พัฒนาและวิจัยทางโลหิตวิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก และโครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่กรุณาเอื้อเพื่อให้ใช้เครื่องมือการวิจัย

ขอขอบพระคุณ บุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ และอุปกรณ์บางส่วนในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นกำลังใจในการต่อสู้อุปสรรคและเป็นแรงผลักดันให้บรรลุเป้าหมายในชีวิต

ความดีของการศึกษาและคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศแด่บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
โรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี.....	6
ภาวะ Oxidative stress.....	11
บทบาทของภาวะ Oxidative stress ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	13
ไฟโคบิลิโซม.....	15
ไฟโคบิลิโปรตีน.....	16
ไฟโคไซยานินซี.....	17
โปรตีนลูกลมสมไฟโคไซยานินซีและคุณสมบัติของโปรตีนลูกลมสม.....	25
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	27
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย สำหรับสีเขียวแกมมน้ำเงิน เซลล์แบคทีเรีย และเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	27
การเตรียมและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไฟโคไซยานินซีสายเบต้า.....	32
การโคลนยีนไฟโคไซยานินซีสายเบต้า.....	34
การติดตามการแสดงออกของโปรตีน.....	40
การสกัดโปรตีน.....	41

บทที่	หน้า
การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging assay.....	47
การทดสอบบทบาทการปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอี	
จากการถูกทำลายด้วย AAPH.....	48
การศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในการปกป้องรูปร่าง	
เซลล์เม็ดเลือดแดงจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระโดยใช้	
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	49
4 ผลการทดลอง.....	50
ผลการเตรียมและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไฟโคไซยานินซีสายเบต้า.....	50
ผลการโคลนยีนไฟโคไซยานินซีสายเบต้า.....	51
ผลการติดตามการแสดงออกของโปรตีน.....	56
ผลการสกัดโปรตีน.....	59
การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging assay.....	63
การทดสอบบทบาทการปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอี	
จากการถูกทำลายด้วย AAPH.....	65
การศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในการปกป้องรูปร่าง	
เซลล์เม็ดเลือดแดงจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระโดยใช้	
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	69
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	71
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	89
ภาคผนวก ก.....	90
ภาคผนวก ข.....	97
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....	13
2.2	แสดงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของ c-PC.....	23
3.1	ขั้นตอนการเติมสารของปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส.....	33
3.2	ขั้นตอนการเติมสารของปฏิกิริยาการเติมเบส dATP.....	35
3.3	ขั้นตอนการเติมสารของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ pGEM [®] -T easy vector.....	36
3.4	ขั้นตอนการเติมสารของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ pETDuet [™] -1 vector.....	37
3.5	ขั้นตอนการเติมสารของปฏิกิริยา colony PCR.....	38
4.1	ผลการสกัด apo c-PC(β).....	59
4.2	ผลการสกัด native c-PC.....	60

สารบัญญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 บทบาทของ free iron species กับภาวะ oxidative stress ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย.....	9
2.2 ความไม่สมดุลระหว่างระบบอนุมูลอิสระและระบบต้านอนุมูลอิสระ.....	11
2.3 แผนภาพแสดงถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะ Oxidative stress.....	11
2.4 แผนภาพสรุป Hb oxidative pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเกิด membrane peroxidation	14
2.5 ภาพวาดแสดงโครงสร้างของไฟโคบิลิโซมที่มีรูปร่างแบบ tricylindrical.....	16
2.6 แสดงกลไกการถ่ายเทพลังงานภายในไฟโคบิลิโซม.....	17
2.7 แสดงโครงสร้างของไฟโคไซยานินซี และ ไฟโคไซยานินบี.....	18
2.8 Ribbon representation ของไฟโคไซยานินซีใน <i>Spirulina platensis</i>	19
2.9 การเกาะกลุ่มของไฟโคไซยานินซี hexamer 2 อัน ของ <i>Spirulina platensis</i>	20
2.10 electron density maps ของ chromophores ในไฟโคไซยานินซี.....	20
2.11 แสดงโครงสร้างของไฟโคไซยานินซีในรูปแบบ hexamers 2 อัน.....	21
3.1 แสดงการทำให้เซลล์สาหร่ายสไปรูลินาแตกโดยใช้เอนไซม์ lysozyme.....	42
3.2 แสดงสารละลายใส่ส่วนบนซึ่งมีสีน้ำเงินปนแดงที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง หลังจากทำให้เซลล์สาหร่ายแตกด้วย lysozyme.....	43
3.3 แสดงการทำ dialysis.....	44
4.1 แสดงผลปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ cpcB.....	50
4.2 โครงสร้างพลาสมิด pGEM/cpcB.....	51
4.3 โครงสร้างพลาสมิด pETD/cpcB.....	52
4.4 ผล colony PCR ของ DH5 α /pETD/cpcB.....	53
4.5 ผลการตัดพลาสมิด pETDuet TM -1 และ pETD/cpcB.....	55
4.6 ผลการแสดงออกโปรตีน apo c-PC(β).....	56
4.7 ผลการแสดงออกโปรตีน apo c-PC(β) ในรูป soluble protein.....	58
4.8 แสดงผลการสกัด apo c-PC(β) ด้วยวิธี IMAC ที่ความเข้มข้น imidazole ในระดับต่าง ๆ.....	61
4.9 แสดงผลการสกัด apo c-PC(β) ด้วยวิธี IMAC และ native c-PC.....	62

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
4.10 กราฟแสดงผลการทดสอบวัดประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ของ apo-c-PC(β), native c-PC และ trolox ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay.....	64
4.11 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของ apo-c-PC(β), native c-PC และ Trolox ในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง.....	66
4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง.....	68
4.13 แสดงผลรูปร่างเม็ดเลือดแดง EE หลังจากถูกทำลายโดย H_2O_2	70

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในสภาวะร่างกายที่มี reactive oxygen species (ROS) ในปริมาณที่มากเกินไปจนร่างกายไม่สามารถกำจัด ROS ได้หรือมีความสามารถกำจัดได้น้อยลง ก่อให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับสารอนุมูลอิสระและนำไปสู่ภาวะ oxidative stress ซึ่งทำให้ส่วนประกอบต่างๆภายในเซลล์ถูกทำลาย นั่นคือ ดีเอ็นเอ, ไขมัน, โปรตีน, และ เยื่อหุ้มเซลล์ [1] ROS มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพในโรคต่างๆ เช่น โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease), โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease), โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) และ โรคมะเร็ง (cancer) [1-3] นอกจากนี้ในโรคเลือดบางชนิดที่มีภาวะ oxidative stress มาเกี่ยวข้อง เช่น โรคเม็ดเลือดแดงรูปเคียว (sickle cell disease), โรคพร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD; glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency) และ โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วย β -thalassemia ซึ่งการแตกของเม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่มักเกิดจากภาวะ oxidative stress ที่สูงขึ้นภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยมีสาเหตุมาจากปริมาณ unpaired globin chain หรือ non heme iron ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงรวมถึงในส่วนของ plasma iron มีปริมาณสูงขึ้น เมื่อเหล็กเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย hydrogen peroxide หรือที่เรียกว่าปฏิกิริยา Fenton reaction ได้ผลิตเป็น ROS ไปกระตุ้นการเกิด lipid peroxidation และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในที่สุด [4] เซลล์เม็ดเลือดแดงถูกนำมาใช้เป็นแบบจำลองสำหรับการประเมินประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระหลากหลายชนิด ในทางสรีรวิทยาเม็ดเลือดแดงเป็นเป้าหมายหลักของ ROS เนื่องจากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงมีระดับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (PUFA; Polyunsaturated fatty acids) ในปริมาณสูง ทั้งยังมีปริมาณออกซิเจนและเหล็กภายในเซลล์ในระดับที่สูง ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญของปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขณะที่สัมผัสกับ ROS มากเกินไปทั้งที่มาจากแหล่งภายนอกหรือภายในร่างกาย จึงก่อให้เกิดการแตกทำลายของเซลล์ รวมทั้งการเกิดภาวะ lipid peroxidation ของเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์ผิดปกติรูปร่าง การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเกิดการเชื่อมโยงกันของโปรตีนบางชนิดในเยื่อหุ้มเซลล์ [5-7]

ความผิดปกติของฮีโมโกลบินบางประเภทพบว่าทำให้ภาวะ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดงรุนแรงขึ้น ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นั่นคือ

ฮีโมโกลบินอี (HbE) เป็นฮีโมโกลบินชนิดหนึ่งที่มีความผิดปกติที่ตำแหน่ง 26 ของ β -globin จึงทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจากกลูตามิคแอซิดเป็นไลซีน ($\beta_{26} \text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$) นอกจากนี้ฮีโมโกลบินอีมีความไม่เสถียรและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายเนื่องจากสายโกลบิน $\alpha_1\beta_1$ จับกันด้วยแรงที่อ่อนกว่าปกติ [8] ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย HbE homozygotes และ β -thalassemia/HbE มีฮีโมโกลบินอีและ free α -globin อยู่ภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง free α -globin เกิดปฏิกิริยา autoxidation ทำให้มีปริมาณ ROS สูงขึ้นและปลดปล่อย heme ออกนอกเซลล์ เมื่อ hydroxyl radicals มาทำปฏิกิริยากับ heme เกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า Fenton reaction เป็นผลให้ผู้ผู้ป่วยมีภาวะ oxidative stress เพิ่มขึ้น จึงนำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระที่มากขึ้นทำให้เกิดพยาธิสภาพทางสรีรวิทยาที่รุนแรง [9-11]

ประชากรในปัจจุบันนี้ให้ความสนใจในการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระกันอย่างแพร่หลาย [12] ซึ่งหนึ่งในนั้นก็คือสาหร่ายสไปรูลินา (Spirulina) หรือเรียกกันโดยทั่วไปว่าสาหร่ายเกลียวทอง จัดเป็นแหล่งสารอาหารที่อุดมไปด้วยโปรตีนทั้งกรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็น คาร์โบไฮเดรต และกรดไขมันชนิดต่างๆ เช่น gamma-linolenic (GLA), alpha-linolenic acid (ALA), linoleic acid (LA) นอกจากนี้ยังมีวิตามินอีกหลายชนิดเช่น วิตามินบี 12, วิตามินอี, วิตามินบี 1, วิตามินบี 9 และวิตามิน D เป็นต้น และเกลือแร่ต่างๆ ได้แก่ โพแทสเซียม, แคลเซียมโครเมียม, ทองแดง, เหล็ก, แมกนีเซียม, ซีลีเนียม และสังกะสี [13] McCarty, M.F. [14] กล่าวว่า spirulina เป็นแหล่งโภชนาการที่มีโปรตีนในปริมาณที่สูงถึง 70% ของน้ำหนักแห้ง [15, 16] ปัจจุบันพบว่ามีนักวิจัยจำนวนมากได้ให้ความสนใจในการศึกษาบทบาทของสาหร่ายสไปรูลินาที่มีต่อทางการแพทย์มากขึ้น โดยมีรายงานว่าสาหร่ายสไปรูลินามีฤทธิ์ต้านภาวะไขมันในหลอดเลือดสูง, ฤทธิ์ต่อต้านการเกิดเนื้องอก, ฤทธิ์ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน [16] จึงมีผู้วิจัยให้ความสนใจศึกษาค้นคว้าสารออกฤทธิ์ในสาหร่ายสไปรูลินามากขึ้น โดยพบว่าหนึ่งในสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของสาหร่ายสไปรูลินาคือไฟโคไซยานินซี (c-phycoerythrin; c-PC) จากผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) ประกอบด้วย c-PC 14.8% ของน้ำหนักแห้งหรือคิดเป็น 29.7-86.1% ของโปรตีนทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง [17] c-PC เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการดูดกลืนแสงเพื่อสังเคราะห์พลังงาน จัดอยู่ในกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนเช่นเดียวกับ allophycoerythrin และ phycoerythrin [18] c-PC เป็นรงควัตถุสีน้ำเงินที่สามารถละลายน้ำได้ดี และพบได้ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria และ red algae และเป็นที่ยอมรับในกลุ่มนักวิจัยว่ามีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดี [19-21] ซึ่งเป็นคุณสมบัติเด่นของ c-PC โดยมี

รายงานงานว่า c-PC สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้หลายชนิดเช่น hydroxyl radical, peroxy radical และ peroxy nitrite radical เป็นต้น [22] โดยปกติ c-PC ประกอบด้วย 2 subunits ได้แก่ α -subunit และ β -subunit ในธรรมชาติพบ c-PC อยู่ในรูป monomer, trimer หรือ hexamer โดยแต่ละ subunit จะประกอบด้วย chromophore ที่เรียกว่า phycoerythrin จับกับส่วนของ apo-phycoerythrin ด้วยพันธะโคเวเลนต์ [23] โดยมีรายงานงานว่า phycoerythrin มีค่า oxygen radical absorbance capacity (ORAC) เท่ากับ 20.33 μ mole ของ Trolox เมื่อเปรียบเทียบในหน่วยเดียวกัน ส่วน c-PC มีค่า ORAC เท่ากับ 22.18 μ mole ของ Trolox เมื่อเปรียบเทียบในหน่วยเดียวกัน จึงกล่าวได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ c-PC ส่วนใหญ่มาจาก phycoerythrin [24] ในปัจจุบันพบว่า c-PC มีคุณสมบัติในด้านต่างๆ เช่น ต่อด้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) [25], ปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective) [22], ต่อด้านการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด (anti-platelet aggregation) [26, 27] และลดความไวในการตอบสนองต่อความเจ็บปวด (anti-hyperalgesic) [28]

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสามารถโคลนยีนและกระตุ้นการแสดงออกโปรตีน c-PC จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินใน *Escherichia coli* ได้ โดย recombinant c-PC ที่ได้จากการโคลนนั้นยังคงมีลักษณะการดูดกลืนแสงและการเรืองแสงเช่นเดียวกับ c-PC ที่ได้จากธรรมชาติ และมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ ซึ่ง Gaun *et al.* รายงานว่า holo c-PC สามารถกำจัด hydroxyl radicals และ peroxy radicals ได้ [29] แต่อุปสรรคในการผลิต holo c-PC คือในเซลล์แบคทีเรียที่มีปริมาณ heme ไม่มากพอสำหรับการผลิต bilins และขาดเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับย่อยสลาย heme เพื่อสังเคราะห์เป็น bilins [30] อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาฤทธิ์ในด้านความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ apo-phycoerythrin ไม่มากนัก

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงประโยชน์ของ c-PC ในการลดภาวะ oxidative stress ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ในการศึกษาวิจัยวิจัยจึงได้ทำการโคลนยีนไฟโคไซยานินซีสายเบต้า (*cpcB* gene) เพื่อให้แสดงออกในแบคทีเรียและศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนลูกผสมไฟโคไซยานินซีสายเบต้า (apo-c-PC(β)) เปรียบเทียบกับไฟโคไซยานินซี (native c-PC) ที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirulina platensis* นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบฤทธิ์กับ Trolox ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน และทำการทดสอบประสิทธิภาพของ apo-c-PC(β) และ native c-PC ในการปกป้องเม็ดเลือดแดงปกติและ

เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอีจากผู้ป่วย hemoglobin E homozygote จากการถูกทำลายด้วยสารอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินซีสายเบต้าด้วยวิธีการโคลนยีนจากสาหร่ายสไปรูลินา (*S. platensis*) โดยเชื่อมต่อด้วยกรดอะมิโนฮิสทีดีนจำนวน 6 ตัว (6xHis-tag) ที่ส่วนปลายของสายเพปไทด์เพื่อแสดงออกโปรตีน apo-c-PC(β) ใน *E. coli* ได้ และสามารถสกัดโปรตีนด้วยวิธี Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) ให้มีความบริสุทธิ์สูงได้ภายในขั้นตอนเดียว
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของ apo-c-PC(β) กับ native c-PC จากสาหร่ายสไปรูลินา
3. เพื่อศึกษาบทบาทของ apo-c-PC(β) ในการปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอีจากผู้ป่วย HbE homozygote จากการถูกทำลายด้วยสารอนุมูลอิสระ

ขอบเขตของการวิจัย

คณะผู้วิจัยจะศึกษาบทบาทของไฟโคไซยานินซีสายเบต้า (c-Phycocyanin beta subunit) ที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้เลือกเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ที่เรียกว่า การโคลนยีน (gene cloning) เพื่อผลิตโปรตีน apo-c-PC(β) ใน *E. coli* โดยโปรตีนที่ได้จะเชื่อมต่อด้วยกรดอะมิโนฮิสทีดีนจำนวน 6 ตัวที่ส่วนปลายของสายเพปไทด์ด้าน N-terminus จากนั้นทดสอบบทบาท apo-c-PC(β) ในการปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอีจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ โดยศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระกับ native c-PC ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox

ปัญหาการวิจัย

โปรตีน apo-c-PC(β) มีฤทธิ์ความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้หรือไม่ และสามารถป้องกันเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์จากสารอนุมูลอิสระได้หรือไม่ หากป้องกันได้จะป้องกันด้วยประสิทธิภาพดีเพียงใดเมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับ native c-PC ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา และ Trolox

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตโปรตีน apo-c-PC(β) จากแบคทีเรียได้
2. ทราบถึงประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของโปรตีน apo-c-PC(β) ในการต่อต้านอนุมูลอิสระเพื่อปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอี
3. สามารถนำ apo-c-PC(β) มาพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะ oxidative stress ในอนาคตได้

หน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้

1. หน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องทางด้านสาธารณสุข
2. บุคลากรทางด้านสาธารณสุขและผู้สนใจทั่วไป
3. ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของโรคเกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี (thalassemia and hemoglobin E)

โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีภาวะโลหิตจางตั้งแต่แรกเกิด เนื่องจากความผิดปกติในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ที่เกิดจากการกลายพันธุ์บางลำดับเบสหรือทุกลำดับเบสของยีนที่ถอดรหัสเป็นสายโกลบิน (globin chain) มีผลทำให้สังเคราะห์สายโกลบินไม่ได้หรือมีการสร้างสายโกลบินลดลงโดยที่โครงสร้างของสายโกลบินปกติ เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจึงมีความสามารถในการขนส่ง oxygen น้อยลง โรคธาลัสซีเมียแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ α -thalassemia และ β -thalassemia ซึ่งมีการสร้าง α -globin chain และ β -globin chain น้อยลงตามลำดับ [31]

α -thalassemia ที่พบส่วนใหญ่มักเกิดจากสาเหตุยีนของ α -globin chain หายไป 1 ยีนหรือทั้ง 2 ยีน (gene deletion) นอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจากความผิดปกติที่นิวคลีโอไทด์ของ α -globin chain (nondeletion) จึงทำให้ผู้ป่วยสังเคราะห์ α -globin chain ไม่ได้หรือมีการสังเคราะห์น้อยลง ความผิดปกติที่พบบ่อยในประชากรของกลุ่มโรคนี้คือ HbH disease ผู้ป่วยสามารถดำรงชีวิตได้ปกติโดยไม่ต้องได้รับการรักษา แต่ในบางครั้งอาจต้องได้รับการถ่ายเลือดในกรณีที่ผู้ป่วยมีภาวะฮีโมโกลบินต่ำ, เซลล์เม็ดเลือดต่ำเนื่องมาจากไขกระดูกฝ่อ (aplastic anemia) หรือ ภาวะติดเชื้อไวรัส นอกจากนี้ Hb Bart hydrops fetalis syndrome เป็นโรค α -thalassemia ชนิดหนึ่งที่ยังไม่มีวิธีการรักษาที่ได้ผลในการรักษาชีวิตผู้ป่วยกลุ่มนี้ไว้ได้แม้จะรักษาด้วยการปลูกถ่ายสเต็มเซลล์ (hematopoietic stem cell transplantation) แล้วก็ตาม [32]

β -thalassemia ความผิดปกติที่พบส่วนใหญ่มักมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์แบบ point mutation แต่อาจมีสาเหตุมาจาก gene deletion ได้แต่พบได้น้อยมาก ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เป็นโรคนี้มักเกิดจากการขาดหายเพิ่ม หรือ แทนที่ของเบสเพียง 1-2 เบสของยีน β -globin chain ปัจจุบันพบความผิดปกตินี้ได้มากถึง 200 ตำแหน่ง ความผิดปกติดังกล่าวทำให้การสังเคราะห์ RNA ของ β -globin chain ผิดปกติ ในการจำแนกทางคลินิกสามารถจำแนก β -thalassemia ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ thalassemia trait, thalassemia intermedia, thalassemia major และ hemoglobin e thalassemia [33]

WHO ได้รายงานว่ามีประชากรประมาณ 1.5% ของประชากรโลกที่เป็น β -thalassemia และมีเด็กทารกเกิดใหม่มีอาการของโรครุนแรงเฉลี่ยประมาณ 60,000 คนของทุกปี [34]

ฮีโมโกลบินอี (Hemoglobin E) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติอยู่ที่ codon ตำแหน่งที่ 26 ของ β -globin gene โดย GAG \rightarrow AAG (glutamic acid \rightarrow lysine) ทำให้เกิดเป็น splice site แห่งใหม่ที่ตำแหน่ง codon ที่ 25 ทำให้ RNA บางส่วนที่สร้างมาจาก exon ของ β -globin gene ถูกตัดออกไปพร้อมกับส่วนที่เป็น small intron เกิดเป็น RNA ผิดปกติที่ไม่สามารถสร้าง β -globin chain ได้ ส่วน splice site ปกติยังคงมีการสร้าง β -globin mRNA และ β -globin chain ได้ ถึงแม้ว่า amino acid ตำแหน่งที่ 26 จะผิดปกติเป็น lysine ก็ตาม ทำให้ β^E -gene มีคุณสมบัติเหมือนกับ β^+ -thalassemia ความผิดปกติที่ทำให้เกิดฮีโมโกลบินอีไม่รุนแรงมาก ถ้าภาวะของ homozygote จะไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย แต่เมื่อฮีโมโกลบินอีเกิดร่วมกับ β -thalassemia ผู้ป่วยมักมีอาการผิดปกติมากเพราะมีความไม่สมดุลของการสร้าง α -globin chain และ β -globin chain มากขึ้น [35]

ความผิดปกติของฮีโมโกลบินปัจจุบันมีมากถึง 300 ล้านคนของประชากรโลก และพบส่วนใหญ่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และฮีโมโกลบินอีเป็นหนึ่งในการกลายพันธุ์ของยีนที่พบมากที่สุดในโลก นอกจากนี้ประเทศไทยมีประชากรที่เป็น α -thalassemia อยู่ 25% ของประชากรทั้งหมด และมีประชากรที่มีฮีโมโกลบินอีมากถึง 60% ของประชากรในประเทศไทย ประเทศลาว และ กัมพูชารวมกันทั้งหมด [36, 37] โดยมีการกระจายของประชากรที่มีฮีโมโกลบินอีของแต่ละพื้นที่ประมาณ 8% ถึง 50-70% ของประชากรไทยทั้งหมดขึ้นอยู่กับแต่ละพื้นที่ของประเทศไทย ซึ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นพื้นที่ที่มีฮีโมโกลบินอีมากที่สุดในประเทศ นอกจากนี้ยังพบประชากรที่มีฮีโมโกลบินอีได้ในประเทศศรีลังกา, บริเวณตะวันออกเฉียงเหนือของ อินเดีย, บังคลาเทศ, ปากีสถาน, เนปาล, เวียดนาม, มาเลเซีย, ฟิลิปปินส์, อินโดนีเซีย และ ตุรกี [38]

ฮีโมโกลบินอีในภาวะที่เป็น heterozygous มี genotype เป็น AE หรือเรียกผู้ที่มีภาวะนี้ว่า hemoglobin E trait ส่วนภาวะที่เป็น homozygous จะมี genotype EE หรือเรียกผู้ที่มีภาวะนี้ว่า hemoglobin E disease นอกจากนี้สามารถพบในลักษณะที่เป็น compound heterozygous เช่น hemoglobin E/ β thalassemia (E/ β thalassemia), sickle cell/hemoglobin E disease ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ [38]

a. Hemoglobin E trait (HbE trait)

Genotype; AE

ลักษณะทางคลินิก; ไม่มีอาการทางคลินิก

ผลจากห้องปฏิบัติการทางคลินิก; ส่วนใหญ่จะมีค่า Mean corpuscular volume (MCV) และ Mean cell hemoglobin (MCH) ลดลง อาจจะมีภาวะซีดเล็กน้อยหรือไม่ก็ได้

ผลอิเล็กโทรโฟรีซิส; Hb E heterozygote มีค่า total Hb A 33% หรือน้อยกว่านั้น ถ้าต่ำกว่า 30% อาจถือได้ว่า มีฮีโมโกลบินอีร่วมกับ α -thalassemia

b. Hemoglobin E disease

Genotype; EE

ลักษณะทางคลินิก; ไม่มีอาการทางคลินิกใดๆ ไม่มีอาการซีด และพบภาวะเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้น้อยมาก ม้ามมีขนาดปกติ นอกจากนี้ยังอาจพบร่วมกับ Hb H disease ได้ (α_3 thalassemia)

ผลจากห้องปฏิบัติการทางคลินิก; ความเข้มข้นฮีโมโกลบินมีค่าปกติ ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงมากขึ้น ส่วน MCV และ MCH มีค่าลดลง แต่ MCHC มีค่าปกติ เมื่อแปลผลในแผ่นสเมียร์เลือดพบ hypochromia และ microcytosis ซึ่งพบ target cells, basophilic stippling เป็นต้น

ผลอิเล็กโทรโฟรีซิส; ส่วนใหญ่จะพบฮีโมโกลบินอี ซึ่งมีค่าฮีโมโกลบินอีร่วมกับ Hb A₂ มีค่าเท่ากับ 95-99% ของฮีโมโกลบินทั้งหมด

c. Hemoglobin E/ β thalassemia

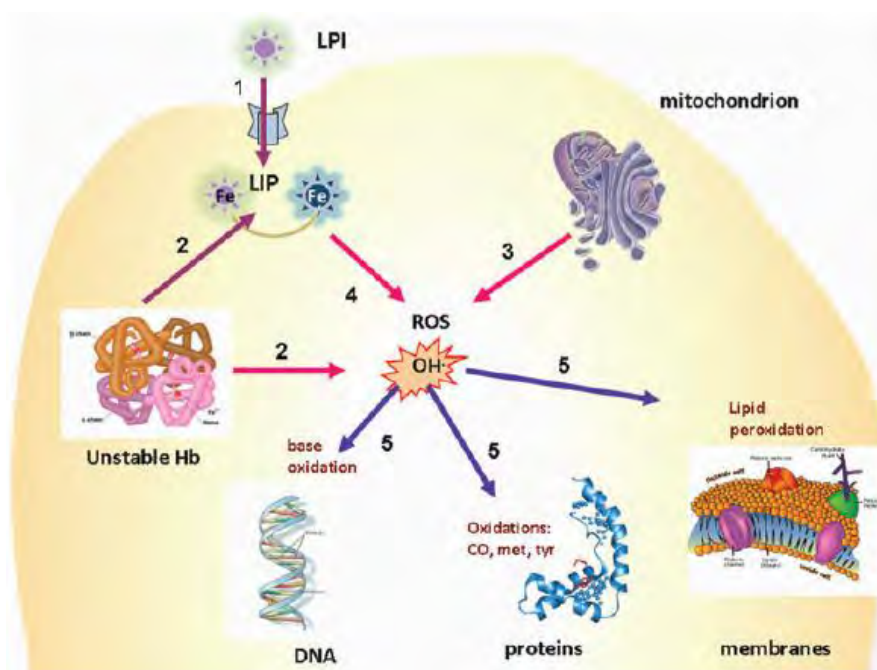
Genotype; Hb E trait ร่วมกับ β^0 หรือ β^+ thalassemia

ลักษณะทางคลินิก; มีอาการทางคลินิกที่หลากหลายตั้งแต่อาการรุนแรงน้อยไปจนถึงมีอาการรุนแรงมาก ซึ่งในรายที่มีอาการรุนแรงจะต้องถ่ายเลือด ดับและม้ามมีขนาดใหญ่ มีอาการดีซ่าน การเจริญเติบโตผิดปกติ โดยพบว่ามี การขยายของช่องว่างในไขกระดูกทำให้โครงหน้าผิดปกติ เมื่อตัดม้ามทำให้ผู้ป่วยไม่ต้องถ่ายเลือดบ่อยเช่นก่อนหน้านั้น

ผลจากห้องปฏิบัติการทางคลินิก; ความเข้มข้นฮีโมโกลบินมีค่าต่ำกว่า Hb E disease แพทย์อาจทำการรักษาโดยใช้ Hydroxyurea อย่างเดียว หรืออาจจะรักษาร่วมกับ recombinant erythropoietin กระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบินให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ก็ทำให้ผู้ป่วยไม่ต้องถ่ายเลือดได้

ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสและ HPLC ; ใน HbE/ β^0 thalassemia พบฮีโมโกลบินอี, Hb A₂ และ Hb F ส่วนในผู้ป่วยที่เป็น Hb E/ β^+ thalassemia จะพบ Hb A ประมาณ 10% ของฮีโมโกลบินทั้งหมด

พยาธิสภาพของโรคธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เน้นมาจากภาวะ oxidative stress โดยเซลล์เม็ดเลือดแดงผู้ป่วย β -thalassemia มักเกิดภาวะ oxidative stress ได้ง่ายกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ ซึ่งเกิดจาก iron species โดยในกระแสเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะมี labile plasma iron; LPI และ labile iron pool; LIP ในปริมาณที่สูง [39] เนื่องมาจากกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่มีประสิทธิภาพและเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนถูกทำลายในพลาสมาและในอวัยวะส่วนอื่นๆ เช่น หัวใจ, ตับ, และ ต่อมไร้ท่อ [40] แล้วก่อให้เกิดภาวะเหล็กเกิน (iron overload) เมื่อ free iron ทำปฏิกิริยากับ ROS ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แสดงบทบาทของ free iron species ที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress นำไปสู่การทำลายของเซลล์ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย [39] ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

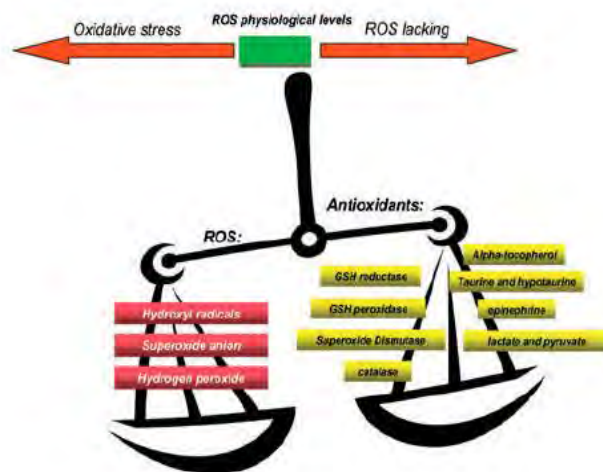
- (1) = labile plasma iron (LPI) พบในกระแสเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดย LPI จะเข้าสู่เซลล์แล้วสะสมเป็น labile iron pool (LIP)
- (2) = ฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียรก่อให้เกิด LIP และ ROS ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง
- (3) = ในภาวะปกติ ROS ถูกสร้างระหว่าง mitochondria สังเคราะห์พลังงานภายในเซลล์
- (4) = ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีปริมาณ LIP สูงขึ้นทำให้เกิด ROS เพิ่มขึ้น
- (5) = ROS และ OH• radicals ทำลายส่วนประกอบของเซลล์เช่น ดีเอ็นเอ, โปรตีน และไขมัน

เนื่องจากผู้ป่วยมี excess α -globin ปริมาณมาก เนื่องจากเป็นฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียรสามารถเกิดปฏิกิริยา autoxidation ได้ง่าย ผลผลิตที่เกิดขึ้นจะไปเกาะเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง และในที่สุดก่อให้เกิด lipid peroxidation จึงมีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคธาลัสซีเมียตามมา [11] ผลปฏิกิริยา oxidation ทำให้มี hemichromes เกิดขึ้น โดย irreversible hemichromes นั้นจะสะสมที่ erythrocyte membrane เมื่อศึกษา erythrocyte ghost cell เหล่านั้น พบว่ามี Heinz bodies อยู่ภายในเซลล์ [41]

วิธีบรรเทาอาการผู้ป่วย thalassemia major มักใช้วิธีการถ่ายเลือดเพื่อรักษาระดับฮีโมโกลบินให้เหมาะสม ปัญหาที่พบบ่อยในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย คือ ภาวะเหล็กเกิน (Iron overload) เมื่อได้รับการถ่ายเลือดหลายครั้งมีผลทำให้หัวใจวายได้ ดังนั้นจึงต้องรับประทาน Iron chelator ควบคู่ไปด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการรักษามีเพียงอย่างเดียวที่ได้ผลดีสำหรับผู้ป่วย คือ การปลูกถ่ายสเต็มเซลล์ (stem cell transplantation) โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายสเต็มเซลล์ก่อนอายุ 10 ปี จะมีประสิทธิภาพการรักษาที่ดีมาก [42]

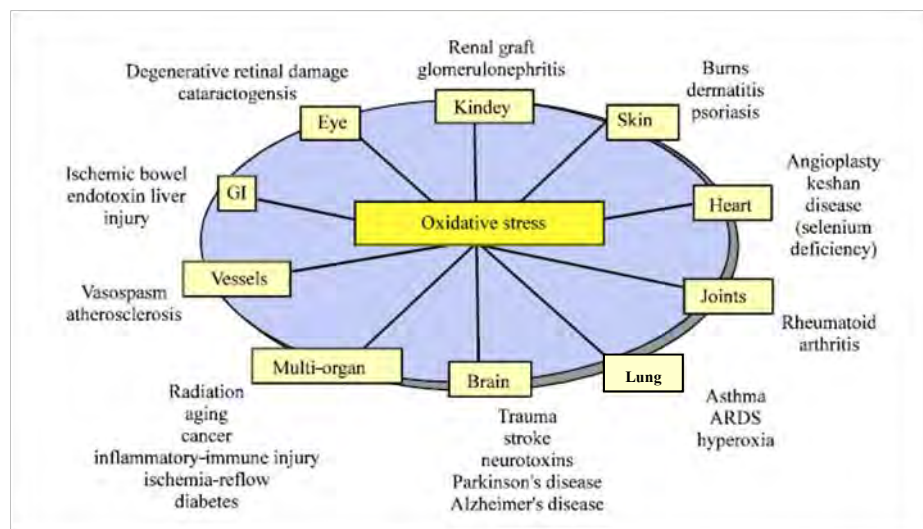
ภาวะ oxidative stress

ภาวะ oxidative stress เป็นภาวะที่ร่างกายมี reactive oxygen species (ROS) ในปริมาณที่สูงมากเกินไปกว่าความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่จะกำจัดได้ [2] ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แผนภาพแสดงความไม่สมดุลระหว่างระบบอนุมูลอิสระและระบบต้านอนุมูลอิสระ [2, 43]

ส่วนใหญ่มักพบว่าภาวะ oxidative stress จะเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ มากมายหลายชนิด ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 แผนภาพแสดงถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะ Oxidative stress [44]

ร่างกายมนุษย์มักจะได้รับอันตรายจากภาวะ oxidative stress อยู่ตลอดเวลา โดยมีแหล่งที่มาของ ROS มาจาก 2 แหล่ง คือ

1. Endogenous sources of ROS: ROS ที่มาจากการหายใจโดยใช้ออกซิเจนของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ ROS ยังได้มาจากกระบวนการ peroxisomal beta-oxidation pathway ของกรดไขมัน, การกระตุ้นการ phagocytosis โดย pathogens หรือ lipopolysaccharides และ arginine metabolism [45]

2. Exogenous sources of ROS: ROS ปริมาณสูงซึ่งมาจากมลภาวะสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่อยู่รอบตัวเรา เช่น การได้รับ toxin เข้าสู่ร่างกายทั้ง exotoxin มาจากยาต้านเซลล์มะเร็ง หรือ โลหะหนักพวกสารปรอท แคดเมียม และ endotoxins มาจากเชื้อโรคชนิดต่างๆ นั้นสร้าง toxin ขึ้นมาต่อต้านร่างกายมนุษย์ แบคทีเรีย ไวรัส ยีสต์ และปรสิต นอกจากนี้ยังมี ROS ที่ได้มาจากร่างกายได้รับรังสี การออกกำลังกายอย่างหนัก การแพ้ยาหรือสารเคมี บุหรี่ และ แอลกอฮอล์ เป็นต้น [46]

Reactive radicals แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Reactive Oxygen Species (ROS) และ Reactive Nitrogen Species (RNS) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. Reactive Oxygen Species (ROS) ได้แก่ hydroxyl ($\text{OH}\bullet$), superoxide ($\text{O}_2\bullet^-$), peroxy ($\text{RO}_2\bullet$), Peroxynitrite (ONOO^-), hypochlorous acid (HOCl), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) และ ozone (O_3) แต่ ozone ไม่ใช่ free radicals แต่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา free radical ในสิ่งมีชีวิตได้ง่าย [1]

2. Reactive Nitrogen Species (RNS) ได้แก่ Nitric oxide ($\text{NO}\bullet$) [47]

ทั้ง ROS และ RNS มีบทบาทร่วมกันในระบบชีววิทยา เมื่อร่างกายมี ROS ในระดับสูงจะเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์และดีเอ็นเอภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิด proteins and lipids modification ได้อีกด้วย [47]

ระบบของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) จึงเป็นระบบที่สำคัญในการปรับสภาพร่างกายให้มีภาวะสมดุลกับอนุมูลอิสระในร่างกายของมนุษย์ ระบบของสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ enzymatic antioxidants และ nonenzymatic antioxidants ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. enzymatic antioxidants ได้แก่ enzyme ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ antioxidant ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ดังนี้

Name of Scavenger	Acronym	Catalyzed Reaction
Superoxide dismutase	SOD	$M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$
Catalase	CAT	$M^{n+}\text{-SOD} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$ $2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$
Glutathione peroxidase	GTPx	$H_2O_2 + Fe(III)\text{-E} \rightarrow H_2O + O = Fe(IV)\text{-E}(.)$ $H_2O_2 + O = Fe(IV)\text{-E}(.) \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-E} + O_2$ $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$
Thioredoxin	TRX	$2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Peroxiredoxin	PRX	Adenosine monophosphate + sulfite + thioredoxin disulfide = 5'-adenylyl sulfate + thioredoxin Adenosine 3',5'-bisphosphate + sulfite + thioredoxin disulfide = 3'-phosphoadenylyl sulfate + thioredoxin
Glutathione transferase	GST	$2 R'\text{-SH} + ROOH = R'\text{-S-S-R}' + H_2O + ROH$ $RX + GSH = HX + R\text{-S-GSH}$

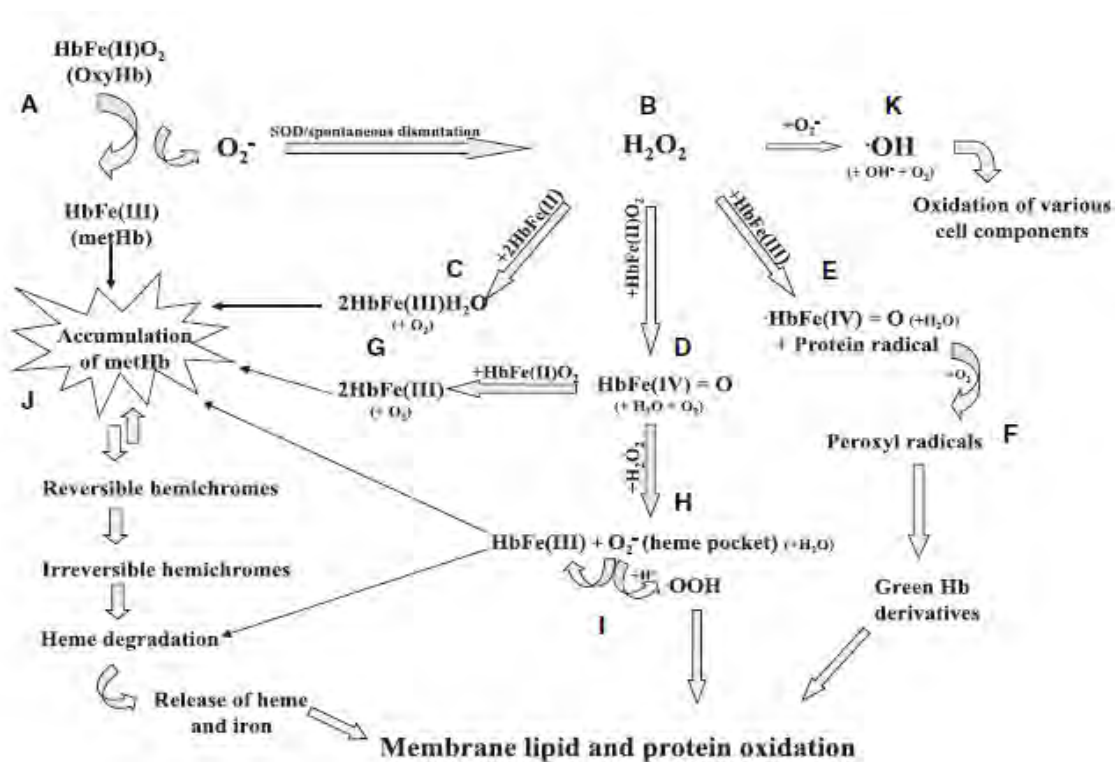
ตารางที่ 2.1 Enzymatic Antioxidants และปฏิกิริยาที่ enzyme ของแต่ละชนิดมาเกี่ยวข้องในการกำจัดและทำลาย oxidants [48]

2. nonenzymatic antioxidants ได้แก่ วิตามิน C (ascorbic acid) และ วิตามิน E (α -tocopherol), β -carotene, uric acid และ glutathione [48]

บทบาทของภาวะ oxidative stress ต่อเม็ดเลือดแดง

เซลล์เม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดเป็นอีกกลุ่มเซลล์ชนิดหนึ่งที่ต้องพบกับภาวะ oxidative stress ด้วยเช่นกัน ROS เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงในผู้ป่วย β -thalassemia, sickle cell anemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency และ hemoglobinopathies อื่นๆ [49, 50] ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งมีฮีโมโกลบินเป็นองค์ประกอบ โดยมีปริมาณมากกว่า 95% ของโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ฮีโมโกลบินแต่ละโมเลกุลสามารถจับกับออกซิเจนได้ถึง 4 โมเลกุล กล่าวได้ว่าเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์สามารถขนส่งออกซิเจนได้ถึง พันล้านโมเลกุล หากเกิดความผิดปกติของฮีโมโกลบินย่อมมีผลอย่างมากในการเกิดพยาธิสภาพต่างๆในร่างกายแน่นอน โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) และ โรคเม็ดเลือดแดงรูปเคียว

(sickle cell disease) อาจมีสาเหตุของความผิดปกติต่างกัน แต่มีลักษณะพยาธิสภาพของโรคที่คล้ายคลึงกันตรงที่ฮีโมโกลบินถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันเหนี่ยวนำให้ไขมันและโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดปฏิกิริยา peroxidation และทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกในที่สุด จากนั้นฮีโมโกลบินอิสระ (free Hb) ไหลเข้าสู่กระแสเลือด กลไก Hb oxidation ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยา peroxidation บริเวณไขมันและโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 2.4 [51]



ภาพที่ 2.4 แผนภาพสรุป Hb oxidative pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์ [51] โดยมีรายละเอียดดังนี้

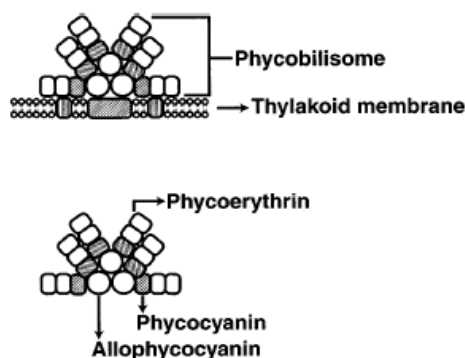
- (A) = ปฏิกิริยา autoxidation ของ oxygenated Hb ก่อให้เกิด methemoglobin และ superoxide anions (O_2^-) และเกิดปฏิกิริยา spontaneous SOD enzymatic dismutation ของ O_2^- ได้ผลิตภัณฑ์เป็น hydrogen peroxide (H_2O_2)
- (B) = เกิดการสะสม H_2O_2 ในปริมาณมากส่งผลให้เกิด Hb oxidative damage นอกจากนี้ H_2O_2 ทำปฏิกิริยากับ deoxygenated Hb, oxyHb และ metHb ได้ผลิตภัณฑ์เป็น metHb (C), ferrylHb (D) และ oxoferrylHb (E) ตามลำดับ

- (F) = H_2O_2 ทำปฏิกิริยากับ metHb เกิดเป็น protein radical แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับ O_2^- ได้ผลิตภัณฑ์เป็น peroxy radicals และในที่สุดได้ผลิตภัณฑ์ lipophilic green Hb derivatives ทำปฏิกิริยากับไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และเกิด oxidative damage ในที่สุด
- (G) = FerrylHb (D) ทำปฏิกิริยากับ oxyHb เกิดเป็น metHb
- (H) = FerrylHb (D) ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 เกิดเป็น metHb และ O_2^- โดยผลผลิต O_2^- ที่เกิดใน heme pocket ก่อให้เกิด heme degradation
- (I) = เกิดจาก O_2^- ให้ proton ได้ผลิตภัณฑ์เป็น perhydroxyl radicals ($\bullet OOH$) เหนี่ยวนำให้เกิด membrane lipid peroxidation ได้
- (J) = การสะสมของ metHb ก่อให้เกิด reversible และ irreversible hemichromes ซึ่ง irreversible นั้นทำให้เกิดการทำลาย heme ได้เป็น heme moiety และ iron atom ผลิตภัณฑ์ทั้งสองจะไปกระตุ้นให้เกิด membrane oxidative damage ต่อไป
- (K) = เมื่อ H_2O_2 ทำปฏิกิริยากับ O_2^- ได้เป็น hydroxyl radicals ($\bullet OH$) และทำลายส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ต่อไป

ไฟโคบิลิโซม (phycobilisomes)

ไฟโคบิลิโซมเป็นส่วนที่สำคัญในการดูดกลืนพลังงานแสงเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงซึ่งอยู่ที่บริเวณผิวชั้นนอกของไทลาคอยด์ (thylakoids) ของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) และคลอโรพลาสต์ (chloroplasts) ของสาหร่ายสีแดง (red algal) ไฟโคบิลิโซมประกอบด้วยกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่เรียกว่าไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliproteins) [52] ซึ่งมีโครโมฟอร์ (chromophores) หรือบิลิน (bilins) ที่มีโครงสร้างเป็น linear tetrapyrrole จับอยู่กับ apo-protein ด้วยพันธะ thioether กับกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ไฟโคบิลิโปรตีนถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆที่สำคัญได้แก่ อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin; APC), ไฟโคไซยานินซี (c-phycocyanin; c-PC), ไฟโคอิริทิน (phycoerythrin; PE) และไฟโคอิริโทไซยานิน (phycoerythrocyanin; PEC) [53] โครงสร้างของไฟโคบิลิโซมจะมีรูปร่างแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยพบว่าไฟโคบิลิโซมในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้นมีโครงสร้างเป็น hemidisoidal ซึ่งประกอบด้วยแกนที่มีรูปร่างปริระมิดทรงสามเหลี่ยม

(tricylindrical core) และมีแท่งของไฟโคบิลิโปรตีนจำนวน 6 แท่ง (rod) อยู่ต่อจากแกนที่บริเวณแกน (core) ของไฟโคบิลิโซมนั้นมี 3 cylinders ซึ่งเป็นไฟโคบิลิโปรตีนชนิด allophycocyanin (APC) โดยที่ 2 cylinders ของ APC เชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มไทลาคอยด์และระบบแสง II (photosystem II) ที่มีคลอโรฟิลล์-เอ (chlorophyll a) เป็นองค์ประกอบ ส่วน rod ของไฟโคบิลิโซมซึ่งประกอบด้วยชั้นไฟโคบิลิโปรตีนชนิด phycoerythrin (PE) หรือ phycoerythrocyanin (PEC) เรียงเป็นชั้นๆ ภายใน rod โดยมีจำนวนชั้นตั้งแต่ 2 ถึง 6 ชั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ อาศัยอยู่ ซึ่งชั้นของ PE หรือ PEC จะอยู่ถัดจากส่วนแกนของไฟโคบิลิโซมโดยมีชั้นของ c-PC คั่นอยู่ระหว่าง PE หรือ PEC กับ APC [54] ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ภาพวาดแสดงโครงสร้างของไฟโคบิลิโซมที่มีรูปร่างแบบ tricylindrical hemidiscoidal [54]

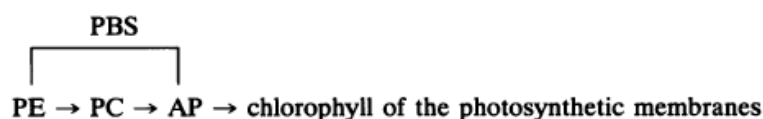
นอกจากไฟโคบิลิโซมจะมีไฟโคบิลิโปรตีนเป็นองค์ประกอบแล้ว ยังประกอบด้วย linker proteins 15% จากมวลทั้งหมดของไฟโคบิลิโซมอีกด้วย ซึ่ง linker proteins เหล่านี้จะเชื่อมระหว่างชั้นของ APC และเชื่อมระหว่าง core และ rod นอกจากนี้ยังเชื่อมระหว่าง c-PC hexamers และ PE hexamers ใน rod อีกด้วย [55]

ไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliproteins)

Phycobiliprotein complex มีหน้าที่ในการดูดกลืนแสงซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะ (visible absorption properties) ของแต่ละชนิด นั่นคือ λ_{max} ของ APC, c-PC, PE และ PEC มีค่าเท่ากับ 650-655 nm, 615-640 nm, 565-575 nm และ 575 nm ตามลำดับ [56] เมื่อเรียงไฟโคบิลิโปรตีน

ตามระดับพลังงานพบว่า PE และ PEC มีระดับพลังงานสูงสุด รองลงมา คือ c-PC มีระดับพลังงานในระดับปานกลาง ส่วน APC มีระดับพลังงานต่ำสุด

การถ่ายทอดพลังงานภายในไฟโคบิลิโซมจะมีการเคลื่อนที่จากรงควัตถุที่มีพลังงานสูงสุดไปยัง รงควัตถุที่มีพลังงานต่ำสุด [54] ซึ่งช่วงการดูดกลืนแสงดังกล่าวเป็นช่วงการดูดกลืนแสงที่คลอโรฟิลล์-เอดูดกลืนได้น้อยมาก จากนั้นไฟโคบิลิโปรตีนจะถ่ายเทพลังงานที่มีประสิทธิภาพสูงไปยังคลอโรฟิลล์-เอในบริเวณเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ [57] ดังแสดงกลไกถ่ายเทพลังงานในภาพที่ 2.6 [58] ไฟโคบิลิโปรตีนทุกชนิดจะประกอบด้วยส่วนย่อยๆ 2 ส่วน คือ แอลฟา (α) และ เบต้า (β) สามารถอยู่รวมกันเป็น $\alpha\beta$ monomer ซึ่งจับอยู่กับโครโมฟอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์ [57] นอกจากนี้ $\alpha\beta$ monomer เกาะกลุ่มกันเป็น disc-shape $(\alpha\beta)_3$ trimers แต่ถ้าเกิดการจับแน่นระหว่าง $(\alpha\beta)_3$ trimers ด้วยกันจะเกิดเป็น $(\alpha\beta)_6$ hexamers [59]



ภาพที่ 2.6 แสดงกลไกการถ่ายเทพลังงานภายในไฟโคบิลิโซม [58]

โดย

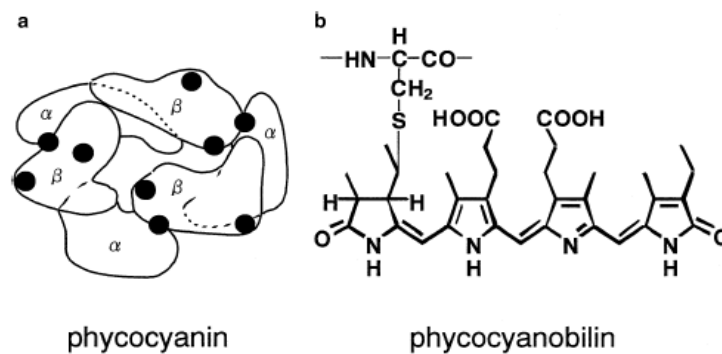
PBS	=	ไฟโคบิลิโซม (phycobilisomes)
PE	=	ไฟโคอีรีทริน (phycoerythrin)
PC	=	ไฟโคไซยานินซี (c-phyococyanin)
AP	=	อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin)

ไฟโคไซยานินซี (c-Phycocyanin; c-PC)

c-PC เป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่ในการดูดกลืนแสง โดยทั่วไปจะมีสีน้ำเงินเข้ม พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae, cyanobacteria) [60] จัดได้ว่าเป็นรงควัตถุสีที่พบเป็นส่วนใหญ่ใน *Spirulina platensis* ซึ่งอยู่บริเวณ antenna rods ส่วน allophycocyanin (APC) เป็นรงควัตถุส่วนน้อยที่พบใน *S. platensis* พบได้ที่บริเวณแกนของไฟโคบิลิโซมเท่านั้น [53] ในประเทศญี่ปุ่นได้นำ c-PC มาใช้เป็นส่วนผสมสีในอุตสาหกรรมอาหารเช่น หมากฝรั่ง ลูกอม ไอศกรีม เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และ ขนมหวาน เป็นต้น [61] และยังเป็นส่วนประกอบในการผลิตเครื่องสำอางและยาอีกด้วย [62]

c-PC Structure

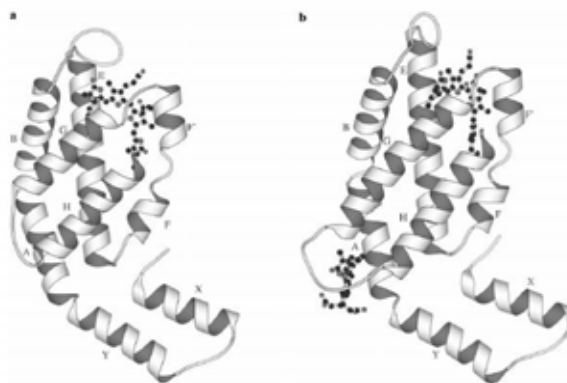
Xin-Quan Wang และคณะได้รวบรวมข้อมูลจากผลงานการวิจัยต่างๆ โดยกล่าวว่า โครงสร้างของ c-PC ในกลุ่ม cyanobacteria ด้วยกัน เช่น *Mastigocladus laminosus*, *Agmenellum quadruplicatum*, *Fremyella diplosiphon* และ *Cyanidium caldarium* มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันมาก [59] c-PC ของ *S. platensis* มีหน่วยย่อยโปรตีน ได้แก่ แอลฟา (α) และเบต้า (β) โดยมีมวลโมเลกุล 20.5 kDa และ 23.5 kDa ตามลำดับ [23, 63] หน่วยย่อยเหล่านี้จะอยู่ในรูป $\alpha_3\beta_3$ และมี chromophore ซึ่งเรียกว่า phycocyanobilin จำนวน 9 อัน โครงสร้างทางเคมีของ c-PC monomer นั้นประกอบด้วย phycocyanobilin (PCB) จำนวน 1 อัน ที่สายแอลฟา (α) และ PCB จำนวน 2 อันที่สายเบต้า (β) [23] ดังแสดงในภาพที่ 2.7 และภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.7 แสดงโครงสร้างของ phycocyanin (a) และ phycocyanobilin (b) [23]

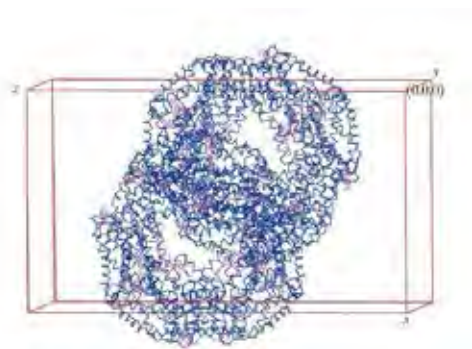
a. โมเลกุลของ phycocyanin ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ แอลฟา (α) และ เบต้า (β)

b. โครงสร้างทางเคมีของ phycocyanobilin (PCB)

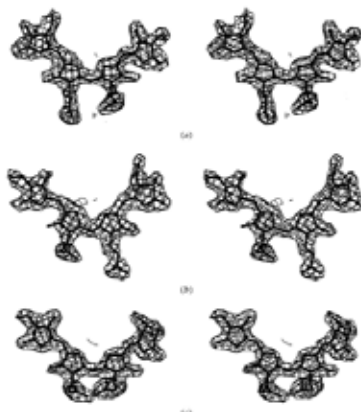


ภาพที่ 2.8 Ribbon representation ของ c-PC ใน *S. platensis* (a) α -subunit (b) β -subunit ซึ่ง PCB คือส่วนที่แสดงด้วย ball และ stick โดยการพับตัวของโปรตีนเป็นแบบ α -helical ซึ่งแต่ละ chain ประกอบด้วย 7 helices (A,B,E,F,F',G and H) N-terminus อยู่ที่ x domain ภาพนี้ถูกสร้างด้วยโปรแกรม MOLSCRIPT [53]

Xin-Quan Wang และคณะได้รายงานพบว่าพบโครงสร้างของ c-PC ใน *S. platensis* เป็น trimers ($\alpha\beta$)₃ จำนวน 4 อัน อยู่เกาะกลุ่มกันในลักษณะหันหน้าเข้าหากันเกิดเป็นรูปร่าง hexamers ($\alpha\beta$)₆ เมื่อศึกษาด้วย crystal structure วัดที่ 2.2 Å resolution ดังภาพที่ 2.9 ซึ่งโครงสร้างลักษณะนี้เป็นโครงสร้างใหม่ที่เพิ่งค้นพบในปี 2001 ดังนั้นในโครงสร้างที่ค้นพบนี้จะพบ phycocyanobilin (PCB) 36 อัน แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ chromophore α 84 นั่นคือ PCB เชื่อมกับ α -subunit ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ที่ 84 , chromophore β 84 นั่นคือ PCB เชื่อมกับ β -subunit ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนซิสเทอีนที่ 82 , chromophore β 155 นั่นคือ PCB เชื่อมกับ β -subunit ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนซิสเทอีนที่ 153 ซึ่งการเชื่อมต่อกันนี้จะเชื่อมด้วยพันธะ thioether ดังภาพที่ 2.10 [59]



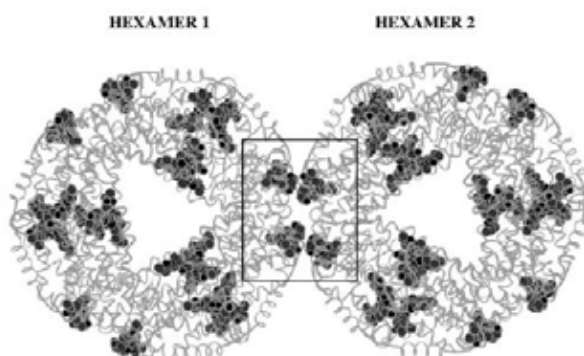
ภาพที่ 2.9 การเกาะกลุ่มของ c-PC hexamer 2 อัน ของ *S. platensis* [59]



ภาพที่ 2.10 Stereo omit $2F_o - F_c$ electron density maps ของ chromophores ใน c-PC ของ *S. platensis*

- (a) PCB α 84
- (b) PCB β 84
- (c) PCB β 155 [59]

จากโครงสร้าง double hexameric ซึ่งบริเวณช่องว่างระหว่าง hexamer ใน crystal asymmetric unit จะมีส่วนของ PCB β 155 ของแต่ละ hexamer อยู่ใกล้กัน อาจเป็นไปได้ว่า chromophore PCB β 155 มีผลต่อการถ่ายเทพลังงานไปยัง c-PC hexameric disks ที่อยู่ข้างๆ ดังแสดงภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 Coil representation ของ hexamers 2 อัน ใน crystal asymmetric unit ในช่องสี่เหลี่ยมเป็นส่วนที่แสดงการชิดกันของ PCB β 155 ระหว่าง hexamers ภาพนี้สร้างโดยใช้โปรแกรม MOLSCRIPT [53]

C-PC Properties

a. Antibacterial

K.G. Sabarinathan และ G. Ganesan รายงานว่าเมื่อสกัด c-PC จาก *Westiellopsis sps* มาทดสอบ antibacterial activity พบว่า c-PC สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sps* และ *Xanthomonas sps* ได้ และ c-PC ไม่ทำให้ร่างกาย silkworm ป่วยหลังจากให้ กิน c-PC โดยวัดจากน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น [64]

b. Antiplatelet

George Hsiao และคณะได้รายงานว่ c-PC เป็นสารต้านเกร็ดเลือดที่อาจจะนำมาใช้ในการรักษา arterial thromboembolism โดยพบว่า c-PC ที่ความเข้มข้นในระดับนาโนโมลาร์ (nanomolar) สามารถออกฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดได้ (antiplatelet aggregation) โดยเกี่ยวข้องกับ 2 กลไกดังต่อไปนี้ (1) เพิ่ม cyclic GMP/VASP Ser¹⁵⁷ phosphorylation และยับยั้งประสิทธิภาพการทำงานของ protein kinase C มีผลยับยั้ง P47 phosphorylation และยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca²⁺ ภายใน cell (intracellular Ca²⁺ mobilization) (2) c-PC อาจยับยั้ง free radical (hydroxyl radicals) ที่ปล่อยออกมาจาก activated platelets ร่วมกับการที่มี Ca²⁺ ภายใน cell ในปริมาณที่ต่ำ จึงมีผลยับยั้งการสร้าง thromboxane A₂ (TxA₂) ซึ่งเกิดการยับยั้ง platelet aggregation ในที่สุด [27] ซึ่งสอดคล้องการรายงานของ Hui-Fen Chiu และคณะ ที่กล่าวว่า c-PC มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดซึ่งกลไกที่ค้นพบคือ c-PC สามารถยับยั้ง

การสร้าง thromboxane A_2 (TxA_2) และ Ca^{2+} ภายใน cells นอกจากนี้ Hui-Fen Chiu และคณะพบว่า c-PC กระตุ้นให้มีการสร้าง cyclic AMP ให้มีปริมาณสูงขึ้นมีผลให้เกิดการแสดงออกของ glycoprotein IIb/IIIa ที่ผิวของเกร็ดเลือด และเพิ่มการเคลื่อนที่ของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเกร็ดเลือดได้อีกด้วย [65] นอกจากนี้ H.K. Madhyastha และคณะพบว่า c-PC ถือเป็น profibrinolytic protein เนื่องจากเมื่อเขาทดสอบด้วยวิธี fibrin zymographic แล้วพบว่า c-PC ที่สกัดได้จาก *S. platensis* สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้าง urokinase-type plasminogen activator แล้วทำให้เกิด fibinolysis ได้ [66]

c. Anti-inflammatory

Yu Ou และคณะได้รายงานว่าการรักษาด้วย c-PC ด้านการอักเสบได้ โดยศึกษาประสิทธิภาพของ c-PC ในการปกป้องการทำลายของเซลล์ตับเมื่อถูกกระตุ้นด้วย carbon tetrachloride (CCl_4) ที่ทดสอบในหนูทดลองและเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ตับ (Human hepatocyte cell line L02) เมื่อวัดระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TGF- β 1 ซึ่งเป็น growth factor ที่ควบคุมให้มีการสร้าง glutathione มีปริมาณลดต่ำลง รวมทั้งการลดลงของ antioxidant enzyme activity และมีการแสดงออกของ mRNA ของ TGF- β 1 และ HGF ที่ลดลง โดย HGF เป็น growth factor ที่ถูกหลั่งออกมาเมื่อมีการทำลายของเซลล์ตับ ไต และ ปอด [12] นอกจากนี้ Chao-Ming Shih และคณะทำการศึกษาในรูปแบบ *in vitro* และ *in vivo* พบว่า c-PC สามารถยับยั้งการสร้าง NO และ prostaglandin E_2 โดย c-PC อาศัยกลไกการลดการทำงานของ iNOS และ COX2 จึงมีผลต่อการสร้าง TNF- α ลดลง ทำให้ neutrophils เคลื่อนที่มายังบริเวณที่เกิดการอักเสบน้อยลงไปด้วย จึงสรุปได้ว่า c-PC มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และการแพ้ได้ (antihyperalgesic activity) [28]

d. Antitumor

Weihong Lu และคณะได้ผลิต recombinant α -subunit ของ c-PC (CpcA) โดยอาศัยแบคทีเรีย *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านแล้วสกัดนำมาทดสอบกับ human colon carcinoma COLO 205 cells พบว่า c-PC กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยผ่านกลไกการสูงขึ้นของอัตราส่วน Bax/Bcl-2 เกิด mitochondrial membrane depolarization ทำให้ปล่อย cytochrome c ออกมาและเกิดการกระตุ้น caspase-9 ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่า CpcA กระตุ้นให้เกิดการตายของ COLO 205 cells ผ่านกลไก intrinsic apoptotic pathway [25]

สอดคล้องกับผลการรายงานของ Bing Li และคณะพบว่า เมื่อทดสอบ c-PC ที่สกัดจาก *S. platensis* มาทดสอบกับก้อนเนื้อ (tumor) ในหนูทดลอง และ MCF-7 cells ในหลอดทดลอง ร่วมกับ photodynamic therapy (PDT) ซึ่งผลการทดลองสรุปได้ว่า c-PC-mediated PDT กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* โดยพบว่า MCF-7 cell เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสโดยผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับ Weihong Lu และคณะ [25] ดังได้กล่าวไว้แล้ว นอกจากนี้ *in vivo* หลังจากทดสอบด้วย c-PC-mediated PDT มีการแสดงออกของ Fas protein เพิ่มขึ้น ในขณะที่ NF-kB และ P53 ซึ่งเป็น anti-apoptotic proteins ลดลง รวมทั้ง CD44 mRNA ของ tumor cells แสดงออกน้อยลงด้วย [67]

e. Antioxidant

c-PC มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยทำลาย radicals ต่างๆ เช่น hydroxyl, alkoxy, และ peroxy นอกจากนี้ยังสามารถทำลาย peroxynitrite และ c-PC สามารถทำปฏิกิริยากับ hypochlorite ทำให้ไม่สามารถออกฤทธิ์ในการทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ได้ [22]

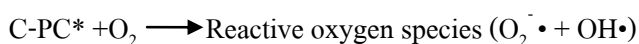
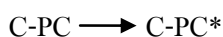
Reaction system	Effect	Author	Year
Superoxide generated from Hypoxanthine-xanthine oxidase	no effect	Romay <i>et al.</i>	1998
Alkoxy radical generated from t-BOOH-ferrous sulphate	scavenge	Romay <i>et al.</i>	1998
Hydroxyl radical generated from Hydrogen peroxide-ferrous sulphate (Fenton Reagent)	scavenge scavenge	Romay <i>et al.</i> Bhat <i>et al.</i>	1998 2000
Peroxy radical generated from AAPH thermolysis	scavenge scavenge	Lissi <i>et al.</i> Bhat <i>et al.</i>	2000 2000
Singlet oxygen	quench	Tapia <i>et al.</i>	1999
Lipid peroxidation induced by Fe ²⁺ -ascorbic acid AAPH thermolysis	Inhibit inhibit	Romay <i>et al.</i> Bhat <i>et al.</i>	1998 2000
Peroxynitrite generated from Nitrite-acidified hydrogen peroxide	scavenge	Bhat <i>et al.</i>	2001
Hypochlorite	removed	Romay <i>et al.</i>	2000
Reactive oxygen production from neutrophils stimulated with opsonized zymosan	inhibit	Romay <i>et al.</i>	1998

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติการต่อต้านอนุมูลอิสระของ c-PC ที่มีผู้รู้ได้ทำการศึกษาซึ่ง Ch. Romay และคณะได้สรุปไว้ [22]

Anamika Patel และคณะได้รายงานไว้ว่า c-PC ของใน cyanobacteria 3 ชนิด คือ *Spirulina*, *Phormidium* และ *Lyngbya* spp. เมื่อทำปฏิกิริยากับ peroxy radical (ROO•) ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ลดลงอย่างรวดเร็ว บ่งชี้ได้ว่า peroxy radical ทำปฏิกิริยากับ c-PC ตรงส่วน chromophore อธิบายปฏิกิริยาตามแผนภาพดังนี้ [21]



นอกจากนี้ Anamika Patel และคณะ ได้กล่าวถึงการศึกษาก่อนหน้านี้ของ He J A และคณะ [68] กับ Zang S และคณะ [69] เมื่อกระตุ้น c-PC ด้วยแสงภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า phycocyanobilin ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แก่ออกซิเจนทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้น ซึ่ง ROS ที่เกิดขึ้นนี้สามารถทำปฏิกิริยากับ free radical เกิดเป็น non radical species ดังแสดงตามสมการดังนี้



ต่อมาได้มีการนำเทคนิคการโคลนยีน (gene cloning) มาใช้ในการผลิต phycocyanin อย่างเช่น X.Y. Guan ได้ผลิต holo α phycocyanin (ส่วนของ PC ทั้งหมดนั่นคือ apo-protein และ chromophore) ของ *S. platensis* ด้วย hexahistidine tag โดยใช้เทคนิคการโคลนยีนซึ่งอาศัยแบคทีเรีย *E. coli* BL21 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นสกัด recombinant holo α -phycocyanin ของ *S. platensis* (holo c-PC(α)) มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการทำลาย hydroxyl radicals และ peroxy radicals [29]

Recombinant c-PC and properties

Recombinant c-PC protein production คือ กระบวนการผลิต c-PC โดยอาศัยการสร้างจากสิ่งมีชีวิตกลุ่ม heterotropic เริ่มมีการโคลนยีนไฟโคบิลิโปรตีนมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1985 [70] และเมื่อ 10 ปีที่ผ่านมาวิธีการโคลนยีนเพื่อศึกษาคุณสมบัติ recombinant phycobiliprotein ได้รับความนิยมนิยมและสนใจในการศึกษาและพัฒนาการผลิตต่อมาจนถึงปัจจุบัน ในปี 2001 Aaron J. Tooley และคณะสามารถผลิตและแสดงออกโปรตีน c-phyocyanin holo α subunit (holo c-PC(α)) ของ cyanobacteria ที่มีชื่อว่า *Synechocystis* sp. PCC6803 ใน *E. coli* ได้สำเร็จด้วยการโคลนยีนทั้งหมด 5 ยีน คือ *cpcA* gene ซึ่งถอดรหัสเป็น c-PC(α), *cpcE* และ *cpcF* gene ซึ่งถอดรหัสเป็น phycocyanobilin lyase ทำหน้าที่ช่วยให้ bilin จับกับสายโปรตีนในตำแหน่งที่ถูกต้อง, *hox1* และ *pcyA* ซึ่งถอดรหัสเป็น heme oxygenase1 และ ferredoxin oxidoreductase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน heme ให้เป็น phycocyanobilin โดยขั้นตอนการผลิตต้องใช้ co-expression plasmids เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกโปรตีนร่วมกับเติม heme เพื่อช่วยในการผลิต bilins พบว่า holo c-PC(α) มีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร เช่นเดียวกับ native c-PC [30] และในปีเดียวกัน Yuping A. Cai และคณะได้ผลิต holo c-PC(α) และ holo c-PC(β) จาก *cpcA* และ *cpcB* genes ของ *Anabaena* sp. ตามลำดับ ใน *E. coli* ด้วยเทคนิคคล้ายคลึงกับ Aaron J. Tooley และคณะ [30] นั่นคือการโคลนยีนทั้งหมด 5 ยีน และการใช้ co-expression plasmids โดยโปรตีนที่สกัดได้นำมาพัฒนาเป็น fluorescent labels [71, 72] ในปี 2007 Xiangyu Guan และคณะได้พัฒนาการโคลนยีนเพื่อผลิต holo c-PC(α) ของ *Synechocystis* sp. PCC6803 ใน *E. coli* ด้วยการโคลนยีนทั้งหมด 5 ยีนแต่ใช้เพียงแค่ 1 plasmid สำหรับการแสดงออกโปรตีนดังกล่าวให้มีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกับ native c-PC ได้สำเร็จ [73] Haizhen Wang และคณะศึกษาฤทธิ์ apo c-PC(β) ที่ได้จากการโคลนยีนของ *Anabaena* PCC 7120 ใน *E. coli* โดยใช้ GST-tag เชื่อมต่อกับโปรตีนดังกล่าวพบว่า apo c-PC(β) สามารถต้านเซลล์มะเร็งได้ โดยกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) มากขึ้น จากการเพิ่มขึ้นของ caspase-3 และ caspase-8 นอกจากนี้ยังยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งด้วยการลดระดับ GAPDH ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเข้าสู่ระยะ S phase ได้ [60] ต่อมา มีการพัฒนาการผลิต recombinant protein ให้มีความเสถียรมากขึ้น โดยในปี 2009 Shaofang Liu และคณะได้ทำการผลิต holo c-PC(α) จาก *Synechocystis* sp. ใน *E. coli* โดยโคลนยีนเชื่อมต่อกับ plasmid ที่มี hexahistidine and maltose-binding protein tag พบว่า holo c-PC(α) มีความเสถียร

และความสามารถในการละลายได้ดีมากขึ้น โดยที่ไม่มีผลต่อคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงหรือคุณสมบัติทางการเรืองแสงใด ๆ ของโปรตีนที่ผลิตได้ [74] และในปี 2012 Guan Xiang Yu และคณะพัฒนาเทคนิคการผลิต holo c-PC(β) จากการโคลนยีน *cpcB* ของ *Spirulina platensis* และโคลนยีน *cpeS* ของ *Synechocystis* sp. PCC6803 แทนการโคลนยีน *cpcE* และ *cpcF* และโคลนยีน *hox1* และ *pcyA* ดังเดิม พบว่า holo c-PC(β) มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงและคุณสมบัติทางการเรืองแสงเช่นเดียวกับ native c-PC ได้สำเร็จ [75]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

37°C Incubator	Memmert, เยอรมนี
Analytical balance	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autoclave	Memmert, เยอรมนี
Autopipette	Biopette, Labnet, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Falcon, สหรัฐอเมริกา
Concentrator protein	Pierce, สหรัฐอเมริกา
Gel electrophoresis Apparatus	Bio-rad, สหรัฐอเมริกา
Gel documentation (gel doc) systems	Syngene, อังกฤษ
Glassware	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Hot air oven, 56°C	Memmert, เยอรมนี
Incubator shaker	Memmert, เยอรมนี
Micro High Speed Refrigerated centrifuge (รุ่น VS-15000 CFNII)	Vision Scientific, เกาหลีใต้
Microcentrifuge tube (0.2 ml)	Labcon, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1.5 ml)	Greenlab, สหรัฐอเมริกา
pH meter	ThermoScientific, สหรัฐอเมริกา
Pipette tips (10, 200, 1000 µl)	Hycon, สหรัฐอเมริกา
Refrigerator centrifuge	Beckman, สหรัฐอเมริกา
SDS-PAGE Electrophoresis apparatus	Cleaverscientific, สหรัฐอเมริกา
High Intensity Ultrasonic Processor	Cole-Parmer, สหรัฐอเมริกา
Thermal cycler	Eppendorf, สหรัฐอเมริกา
UV-Visible Spectrophotometer (รุ่น 3000)	Shimadzu, ญี่ปุ่น
UV-Visible Spectrophotometer (nanodrop รุ่น 1000)	ThermoScientific, Inc, สหรัฐอเมริกา
Water bath	Memmert, เยอรมนี

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

100 bp DNA Ladder (Fermentas)	ThermoScientific, สหรัฐอเมริกา
AAPH	Merck, เยอรมนี
ABTS	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Absolute ethanol	Mallinckrodt, สหรัฐอเมริกา
Acrylamide	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Agarose	Merck, เยอรมนี
Ammonium persulfate	Bio-rad, สหรัฐอเมริกา
Ampicillin	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Bacterial agar	Merck, เยอรมนี
Betamercaptoethanol	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Bio-Rad protein assay reagent	Bio-rad, สหรัฐอเมริกา
Bis-acrylamide	Bio-rad, สหรัฐอเมริกา
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Calcium chloride	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Chloroform	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
DEAE	GE Healthcare, สวีเดน
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Merck, เยอรมนี
EDTA	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Ethidium Bromide	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Nucleospin Gel Extraction	Macherey-nagel, เยอรมนี
Glucose anhydrous	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Glacial acetic acid	Merck, เยอรมนี
Glycine	Organic research, สหรัฐอเมริกา
Glycerol	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
High fidelity phusion DNA polymerase	Intron, เกาหลี
His60 Ni Superflow™ Resin	Clontech, สหรัฐอเมริกา

Hydrochloric acid 37% fuming	Merck, เยอรมนี
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	R&D systems, สหรัฐอเมริกา
Imidazole	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
IPTG	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Isopropanol	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Lamda/HindIII marker	Fermentas, สหรัฐอเมริกา
Lysozyme	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
MES	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Methanol (CH ₃ OH)	Merck, เยอรมนี
N, N, N', N'-Tetramethylenediamine (TEMED)	Bio-rad, สหรัฐอเมริกา
NucleSpin [®] Plasmid	Macherey- nagel, เยอรมนี
pETDuet-1 vector (Novagen)	Merck, เยอรมนี
pGEM [®] -T Easy vector system	Promega, สหรัฐอเมริกา
PMSF	Merck, เยอรมนี
Potassium chloride (KCl)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Protinase K	Merck, เยอรมนี
<i>Bam</i> HI and <i>Sac</i> I Restriction enzyme	ThermoScientific, สหรัฐอเมริกา
Sodium azide	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium chloride (NaCl)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Bio-rad, สหรัฐอเมริกา
Spectra [™] multicolor broad range protein ladder	Fermentas, สหรัฐอเมริกา
T4 DNA ligase	Promega, สหรัฐอเมริกา
Taq DNA polymerase	Intron, เกาหลี
Triz base	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
TRIzol Reagent [®]	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Trolox	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา

Unstain protein molecular weight marker	Fermentas, สหรัฐอเมริกา
x-gal	Merck, เยอรมนี

3. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

- สาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) ซึ่งได้รับการสนับสนุนจาก Suppamaethakorn W. (Taweewattana Farm, Bangkok, THA)

4. เชื้อแบคทีเรีย

- *Escherichia coli* (*E. coli*) ที่ใช้ในงานวิจัยมีทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ดังนี้

2.1 DH5alpha (DH5α) เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคและถูกพัฒนาขึ้นด้วยเทคนิคการกลายพันธุ์ของยีนบางส่วนเพื่อใช้สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการโคลนยีน จึงทำให้เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันสูง ยีนที่มีการกลายพันธุ์ ได้แก่ *dlacZ* *Delta M15*, *Delta(lacZYA-argF)*, *U169*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17(rK-mK+)*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96* และ *relA1* [76] โดยการกลายพันธุ์ของยีนในแต่ละตำแหน่งมีประโยชน์แตกต่างกัน เช่น การกลายพันธุ์ของยีน *lacZDelta M15* มีประโยชน์สำหรับ blue/white colony screening [77], การกลายพันธุ์ของยีน *recA1* มีประโยชน์สำหรับลดกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (homologous recombination) ทำให้ดีเอ็นเอที่แทรกเมื่อนำเข้าสู่เซลล์แล้วมีความเสถียร [78] และการกลายพันธุ์ของยีน *endA1* มีประโยชน์สำหรับลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ endonuclease ทำให้ได้พลาสมิดในปริมาณมาก [79]

2.2 BL21(DE3)pLysS ใช้สำหรับการแสดงออกโปรตีนเนื่องจาก T7 promoter และ ribosome binding site ควบคุมให้มีการแสดงออกโปรตีนในปริมาณมาก และนอกจากนี้ยังมียีน *pLysS* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน โดย *pLysS* จะควบคุมให้มีการสร้างเอนไซม์ T7 lysozyme เพื่อย่อย T7 RNA polymerase ที่มาจากการควบคุมของยีน *lac UV5 promoter* เป็นผลทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีนออกมาได้ แต่เมื่อมี IPTG มากกระตุ้น T7 promoter จะทำให้มีการสร้าง T7 RNA polymerase ขึ้นจึงเกิดกระบวนการ DNA transcription และ Protein translation ตามลำดับ [80]

5. เซลล์เม็ดเลือดแดง

เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนในการป้องกันการถูกทำลายด้วยสารอนุมูลอิสระ โดยเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอย่างที่นำมาทดสอบมี 2 ชนิด คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี และเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอีจากอาสาสมัครที่เป็น Homozygous hemoglobin E หรือที่เรียกว่า EE disease โดยคณะผู้วิจัยได้ผ่านการขอจริยธรรมจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไฟโคไซยานินซีสายเบต้า (*cpcB* sequence) จากสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*)

1.1. การสกัดดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของสาหร่ายสไปรูลินา

ซึ่งสาหร่ายสไปรูลินา 150 มิลลิกรัมในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Tris-EDTA buffer, pH 8.0 หนึ่งเท่าของปริมาตรของสาหร่าย และทำให้ผนังเซลล์ของสาหร่ายแตกโดยเติม 5 µg/ml lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 µg/ml นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเติม 10% SDS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% จากนั้นเติม 20 mg/ml proteinase K ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 µg/ml นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

เมื่อครบเวลาเติมน้ำยา TRI-reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม chloroform 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายจะได้สารละลายแยกชั้นทั้งหมด 3 ชั้น โดยชั้นบนเรียกว่า aqueous phase เป็นชั้นของสารละลายอาร์เอ็นเอ (RNA) ชั้นต่อมาเรียกว่า Interphase เป็นชั้นของสารละลายดีเอ็นเอ และชั้นล่างสุดเรียกว่า phenol-chloroform phase เป็นชั้นของสารละลายโปรตีน ดูดแยกดีเอ็นเอใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม absolute ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมสารละลาย 10% trisodium citrate ใน 0.1 M ethanol 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 75% ethanol 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs) แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย tris-EDTA 50 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop

1.2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไฟโคไซยานินสีสายเบต้าโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
(PCR; Polymerase Chain Reaction)

ออกแบบไพรเมอร์ของยีนไฟโคไซยานินสีสายเบต้าในสายรหัสโปรตีน (S. platensis) โดยอาศัยข้อมูลรหัสพันธุกรรมจาก Genbank ซึ่งมี accession No. คือ Y09074 และจากลำดับเบสของยีนดังกล่าวนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ดังนี้

— Forward primer ประกอบด้วยตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (ขีดเส้นใต้)
ดังนี้: 5'-ACGGATCCACTGGTCCGCGTGGATCTATGTTTGATGCCTTCAC-3'

— Reverse primer ประกอบด้วยตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* (ขีดเส้นใต้)
ดังนี้: 5'-GCGAGCTCTTAGGAAACTGCAGCAC-3'

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไฟโคไซยานินสีสายเบต้าโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเอนไซม์ Phusion High-fidelity DNA polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น proofreading enzyme กล่าวคือสามารถทำงานจาก 3' ไปยังด้าน 5' ของลำดับเบสเพื่อตรวจสอบความถูกต้องได้ โดยเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามสัดส่วนดังแสดงในตารางที่ 3.1. ดังนี้

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	13.5
5x HF buffer	8
1 mM dNTP	8
5 μ M Forward Primer	4
5 μ M Reverse Primer	4
ดีเอ็นเอสายรหัสโปรตีน (100 ng/ μ l)	2
เอนไซม์ Phusion DNA polymerase	0.5
ปริมาตรรวมทั้งหมด	40

ตารางที่ 3.1. แสดงสัดส่วนสารเคมีของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไฟโคไซยานินสีสายเบต้า

ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันเริ่มต้นด้วยขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยขั้นตอน denaturation 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที ขั้นตอน annealing 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที โดยปฏิกิริยาทั้งสามขั้นตอนนี้ถูกดำเนินการซ้ำทั้งหมด 5 รอบ และต่อด้วยขั้นตอน denaturation 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที ขั้นตอน annealing 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที โดยปฏิกิริยาทั้งสามขั้นตอนนี้ถูกดำเนินการซ้ำทั้งหมด 30 รอบ และสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

แยก PCR product บนวุ้น 1.5% agarose ด้วยความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ตัดแถบดีเอ็นเอไฟโคไซยานินสีสายเบต้าซึ่งมีขนาด 554 คู่เบสได้จากการคำนวณลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ สกัดแยกดีเอ็นเอออกจาก agarose ด้วยชุดสกัด Gel Extraction Spin Column และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop

2. การโคลนยีนไฟโคไซยานินสีสายเบต้า

2.1. การเตรียมแบคทีเรีย DH5 α และ BL21 competent cells

นำโคโลนีแบคทีเรีย DH5 α หรือ BL21 จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LB agar) มา 1 โคโลนี ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB Broth) 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงดูเซลล์แบคทีเรียใน LB Broth มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี LB Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 240 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเซลล์แบคทีเรียเจริญถึง exponential phase โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 0.3 – 0.5 แบ่งใส่ conical tube ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่อง refrigerator centrifuge ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติม 0.1 M CaCl₂ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่เย็นลงในตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ดูดขึ้นลงเบาๆ จนกระทั่งกลุ่มเซลล์กระจายตัวในสารละลาย CaCl₂ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเก็บ competent cells ที่ได้ด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 0.1 M CaCl₂ 4 มิลลิลิตร แล้วดูดขึ้นลงเบาๆ

จนไม่มีเซลล์เกาะกลุ่มกัน เก็บ competent cells ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนนำ ligation product หรือ plasmid เข้าสู่ competent cells ต่อไป

2.2. การเตรียมดีเอ็นเอให้พร้อมสำหรับเชื่อมต่อกับ pGEM[®]-T easy vector

pGEM[®]-T easy เป็นพลาสมิดที่อาศัยหลักการ TA cloning โดยเติมเบส dATP (A-attachment) ที่ปลาย 3' ของลำดับเบสของดีเอ็นเอ cpcB ด้วยเอนไซม์ i-tag DNA-polymerase เตรียมสัดส่วนสารเคมีในการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.2 ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ cpcB	7.0
10x i-tag buffer	1.0
2 mM dATP	1.0
เอนไซม์ i-tag DNA polymerase (มีความเข้มข้น 5 unit/ μ l)	1.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

ตารางที่ 3.2. แสดงสัดส่วนสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเติมเบส dATP ที่ปลาย 3' ของลำดับเบส ดีเอ็นเอ cpcB

2.3. การเชื่อมต่อยีนไฟโคไซยานินสีสายเบตากับ pGEM[®]-T easy vector เพื่อนำเข้าสู่ DH5 α และเลือกโคโลนีที่มียีนไฟโคไซยานินสีสายเบตาดำด้วยวิธี Blue-white colony screening

นำดีเอ็นเอ cpcB ที่ผ่านการเติมเบส dATP เชื่อมต่อกับ pGEM[®]-T ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า ligation ส่วนผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยานี้เรียกว่า ligation product โดยเตรียมสารเคมีตามสัดส่วนดังแสดงในตารางที่ 3.3 ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้พลาสมิดเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์

สารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ cpcB ที่เติมเบส dATP แล้ว	3.0
2x ligase buffer	5.0
pGEM [®] -T Easy vector	1.0
เอนไซม์ T4 DNA ligase (มีความเข้มข้น 5 unit/μl)	1.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

ตารางที่ 3.3. แสดงสัดส่วนสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ pGEM[®]-T Easy vector กับดีเอ็นเอ cpcB ที่เติมเบส dATP แล้ว

นำผลผลิตที่ได้จากการเชื่อมต่อกันระหว่าง pGEM[®]-T กับดีเอ็นเอ cpcB (ligation product) เข้าสู่เซลล์ DH5α โดยเติม ligation product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน DH5α competent cells ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่หลอดทดลองในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำหลอดทดลองไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ความร้อนสามารถกระตุ้นให้เซลล์ DH5α competent cells รับ ligation product เข้าสู่เซลล์ จากนั้นแช่หลอดทดลองในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม LB Broth 900 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมา spread ลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LB-Amp/IPTG/x-gal agar; 100 μg/ml ampicillin, 0.1 M IPTG และ 40 mg/ml x-gal) แล้วนำไป incubate ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หลักการ Blue-white colony screening เป็นวิธีการคัดกรองว่ามียีนที่ต้องการได้ถูกแทรกเข้าไปในบริเวณของยีน β-galactocidase ซึ่งควบคุมด้วย lacZ promoter ส่วน IPTG มีหน้าที่กระตุ้น lac operon ในแบคทีเรียเพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีน และเมื่อเอนไซม์ β-galactocidase ย่อย X-gal จะทำให้เห็นโคโลนีมีสีฟ้าซึ่งแสดงว่าโคโลนีนั้นมีพลาสมิดที่ไม่มียีนที่ต้องการแทรกอยู่ แต่ถ้าโคโลนีมีสีขาวแสดงว่ามีดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่ ทำให้เซลล์แบคทีเรียไม่สามารถผลิตเอนไซม์ β-galactocidase ดังนั้นจึงเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าไม่มีพลาสมิด pGem/cpcB (ดีเอ็นเอ cpcB เชื่อมต่ออยู่กับ pGEM[®]-T) มาทดสอบต่อไปด้วยวิธี colony PCR

โดยใช้เอนไซม์ i-taq DNA polymerase และ plasmid digestion โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ซึ่งกล่าวถึงในหัวข้อการตรวจสอบ plasmid ที่เชื่อมต่อยีนไฟโคไซยานินที่สายเบต้าได้

2.4. การเชื่อมต่อยีนไฟโคไซยานินที่สายเบต้ากับ pETDuet™-1 vector และนำเข้าสู่ DH5α

ตัดพลาสมิด pGem/cpcB และ pETDuet™-1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ทำให้ปลายของลำดับเบสผลผลิตสุดท้ายหลังจากการตัดเอนไซม์ทั้งดีเอ็นเอ cpcB และ pETDuet™-1 จะมีลักษณะเป็น sticky end และเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยเตรียมสารเคมีตามสัดส่วนดังแสดงในตารางที่ 3.4 แล้ว incubate ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้พลาสมิดและดีเอ็นเอเชื่อมต่อกันสมบูรณ์

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ cpcB บริสุทธิ์ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์แล้ว	3.0
2x ligase buffer	5.0
pETDuet-1 vector ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์แล้ว	1.0
เอนไซม์ T4 DNA ligase (มีความเข้มข้น 5 unit/μl)	1.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

ตารางที่ 3.4 แสดงสัดส่วนสารเคมีในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ pETDuet™-1 vector กับดีเอ็นเอ cpcB

เติม ligation product 10 ไมโครลิตร ใน DH5α competent 100 ไมโครลิตร แห่หลอดทดลองในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วนำมาแช่เย็นในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที กระตุ้นให้เซลล์ฟื้นตัวโดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ 900 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป incubate ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มียาปฏิชีวนะ 100 μg/ml ampicillin นำไป incubate ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ้ามีโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อคาดหมายว่ามีพลาสมิด pETD/cpcB นำมาทดสอบยืนยันด้วยวิธี colony PCR และ plasmid digestion

2.5. การตรวจสอบพลาสมิดที่เชื่อมต่อยีนไฟโคไซยานินสีสายเบต้า *cpcB* ได้

2.5.1. การตรวจสอบโดยคัดเลือกโคโลนีด้วยเทคนิค PCR

คัดเลือกโคโลนี DH5 α ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 โคโลนี ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *cpcB* ด้วยเทคนิค PCR ด้วยใช้เอนไซม์ i-tag DNA polymerase โดยเตรียมสารเคมีตามสัดส่วนของปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.5 โดยใช้ PCR program เช่นเดียวกับปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ *cpcB* จากนั้นแยก PCR product มาบนวุ้น 1.5% agarose ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที โคโลนีที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 554 คู่เบสแสดงว่ามี *cpcB* ภายในเซลล์

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	4.5
10x i-tag buffer	1.0
1mM dNTP	2.0
5 μ M Forward Primer	1.0
5 μ M Reverse Primer	1.0
โคโลนี	เล็กน้อย
เอนไซม์ i-tag DNA polymerase	0.5
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.0

ตารางที่ 3.5 แสดงสัดส่วนของสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา colony PCR

2.5.2. การตรวจสอบโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ก่อนการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต้องสกัดพลาสมิดจากโคโลนี โดยเลือกโคโลนีที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 554 คู่เบสมาสกัดพลาสมิด เพื่อตรวจสอบยืนยันว่ามีดีเอ็นเอ *cpcB*

การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Nucleospin มีขั้นตอนดังนี้ เลือก 1 โคโลนีใส่ลงใน LB Borth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ 100 μ g/ml ampicillin นำไปเขย่า

ด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง refrigerated microcentrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ทำให้เซลล์แตกโดยเติม A1 buffer 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนตะกอนเซลล์กระจายเป็นเนื้อเดียวกับ buffer จากนั้นเติม A2 buffer 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดทดลองขึ้นลง 6-8 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะใส เติม A3 buffer 300 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง 6-8 ครั้ง นำหลอดทดลองไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โหลดส่วนใสลงคอลัมน์ 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้พลาสติกจับกับ silica membrane แล้วปั่นล้างด้วย AW buffer 500 ไมโครลิตร ด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสใน collection tube ทิ้ง เติม A4 buffer 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสใน collection tube ทิ้ง ปั่นเหวี่ยงคอลัมน์ด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ buffer ออกจาก silica membrane จนหมด นำหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร มารองใต้คอลัมน์ แล้วเติม AE buffer 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาทีเมื่อครบเวลาปั่นเหวี่ยงคอลัมน์ด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสใน collection tube ทิ้ง แล้วเก็บพลาสติกที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในขั้นตอนต่อไป

พลาสติกที่สกัดได้นั้นถ้าดีเอ็นเอ cpcB เชื่อมต่อกับ pGEM®-T ว่า pGEM/cpcB และ เรียกพลาสติกที่ดีเอ็นเอ cpcB เชื่อมต่อกับ pETDuet™-1 ว่า pETD/cpcB

นอกจากนี้การตัดพลาสติก pGEM/cpcB ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นขั้นตอนการเตรียม product สำหรับเชื่อมกับ pETDuet™-1

เริ่มต้นขั้นตอนการตัดพลาสติกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยพลาสติกที่สกัดไว้มาตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* และ incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โหลด digestion product ลงคอลัมน์ของชุดสกัด Gel Extraction Spin Column เพื่อ purified ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ตามคู่มือวิธีทำของชุดสกัด จากนั้นตัดพลาสติกต่อด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

แยกผลผลิตสุดท้ายจากการตัดด้วยเอนไซม์บนวุ้น 1% agarose ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ถ่ายรูปด้วยเครื่อง Gel documentation (gel doc) systems

3. การติดตามการแสดงออกของโปรตีน (kinetic of protein expression) ของโปรตีน ลูกลมสไฟโคไซยานินสีสายเบต้าในเซลล์แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เหมาะสำหรับการแสดงออกของโปรตีน ขั้นตอนการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ BL21 เติมพลาสมิด pETD/cpcB 2 ไมโครลิตร ลงใน BL21 competent cells 100 ไมโครลิตร incubate ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นนำหลอดทดลอง incubate ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม LB Broth ลงไป 900 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมา spread ลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB-Amp agar นำไป incubate ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

ลงเชื้อ BL21 ที่มีพลาสมิด pETD/cpcB 1 โคโลนีใน LB-broth 5 มิลลิลิตร ที่มี 100 µg/ml ampicillin นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และแบ่งเซลล์ 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน LB-broth 100 มิลลิลิตรที่มี 100 µg/ml ampicillin เขย่าด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 0.3-0.5 จึงกระตุ้นการแสดงออกโปรตีนด้วย IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 หรือ 1.0 มิลลิโมลาร์ พร้อมลดอุณหภูมิเป็น 20 องศาเซลเซียส แบ่งเก็บเซลล์ 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 ชั่วโมงดังนี้ ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 โดยปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultra Sonication ใน phosphate buffered saline (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 7.4) ที่มี 1 mM PMSF ด้วยโปรแกรม pulse on 5 วินาที/ pulse off 5 วินาที จนกว่าสารละลายใส ปั่นแยกเศษเซลล์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใสซึ่งเป็น soluble protein ออกจากเศษเซลล์ เก็บโปรตีนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

4. การสกัดโปรตีนลูกผสมไฟโคไซยานินสีสายเบต้าและไฟโคไซยานินสีจากสาหร่ายสไปรูลินา

4.1. การสกัดโปรตีนลูกผสมไฟโคไซยานินสีสายเบต้า

โปรตีนลูกผสมไฟโคไซยานินสีสายเบต้า หรือ apo c-PC (β) ส่วน N-terminal ของโปรตีนเชื่อมต่อกับ hexa-histidine ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการสกัดด้วยวิธี Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) อาศัยหลักการการจับกันระหว่าง hexa-histidine และโลหะ (metal) ด้วยแรงโคเวเลนต์ร่วมกัน โดยโลหะอยู่ในส่วน resin ซึ่งโลหะเป็น nickel ส่วนโปรตีนทั่วไปจะไม่สามารถสร้างแรงดึงดูดกับ metal ions ได้ ดังนั้นโปรตีนทั่วไปจะถูกชะล้างออกมาด้วย phosphate buffer ส่วน apo c-PC (β) ถูกชะล้างออกมาด้วย imidazole ที่เข้มข้นสูง และในการทดลองนี้ใช้ His60 Ni Superflow™ Resin (Clontech Laboratories, Inc .) ซึ่งมีโลหะ nickel เป็นส่วนประกอบ โดยขั้นตอนการสกัดมีดังนี้

เติม His60 Ni Superflow™ Resin 10 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ขนาด 2.5 x 30 cm ล้าง resin ด้วย His60 Ni equilibration buffer (50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4) ปริมาตร 5-10 เท่าของปริมาตร resin เตรียม apo c-PC (β) โดยกรองผ่าน filter membrane ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมครอน และไหลตกลงบน resin กลับคอลัมน์ขึ้นลง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กลับคอลัมน์ขึ้นลงทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังกล่าวตั้งคอลัมน์ทิ้งไว้จนกระทั่ง resin เรียงตัวที่ก้นคอลัมน์จนหมด เก็บ fraction โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเรียก fraction นี้ว่า flow through จากนั้นล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการออกจาก resin ด้วย His60 Ni equilibration buffer ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตร resin และเก็บ fraction ซึ่งเรียกว่า E20 wash fraction ล้าง resin ต่อด้วย His60 Ni 40 mM imidazole wash buffer (50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 7.4) ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตร resin เช่นกัน เก็บ fraction ซึ่งเรียก fraction นี้ว่า E40 wash fraction จากนั้นเติม His60 Ni 100 mM imidazole wash buffer (50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 7.4) ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร resin เก็บ fraction ซึ่งเรียก fraction นี้ว่า E100 wash fraction และสุดท้ายชะล้าง apo c-PC(β) ด้วย His60 Ni elution buffer (50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 7.4) เก็บ fraction ซึ่งเรียก fraction นี้ว่า E400 fraction

ทุก fraction ที่เก็บได้จากการสกัดด้วย IMAC ตรวจวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay และตรวจสอบคุณลักษณะของ apo-c-PC(β) ด้วยวิธี SDS-PAGE ตามลำดับ

4.2. การสกัดโปรตีนไฟโคไซยานินสีจากสาหร่ายสไปรูลินา

ซึ่งสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) 10 กรัม ใส่ลงใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยเติมสารละลาย 1 M phosphate buffer 20 มิลลิลิตร, 0.1 mg/ml lysozyme 200 μ l และ 100 mM EDTA 160 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่า flask ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.1 แสดงการทำให้เซลล์สาหร่ายสไปรูลินาแตกโดยใช้เอนไซม์ lysozyme

เมื่อครบเวลาปั่นตกตะกอนแยกเศษเซลล์ด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกสารละลายใสส่วนบนซึ่งมีสีน้ำเงินปนแดงออกจากตะกอนเศษเซลล์ที่ใส่ปีเกอร์



ภาพที่ 3.2 แสดงสารละลายใสส่วนบนซึ่งมีสีน้ำเงินปนแดงที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงสารละลายหลังจากทำให้เซลล์สหาร่ายแตกด้วยเอนไซม์ lysozyme

ตกตะกอนแยกไฟโคไซยานินซี (native c-PC) จากสารละลายใสสีน้ำเงินปนแดงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วย 35% ammonium sulphate ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใสสีน้ำเงินมาตกตะกอนด้วย 50% ammonium sulphate และปั่นแยกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย 0.025 M sodium phosphate buffer (0.025 M Na₂HPO₄, 0.025 M NaH₂PO₄, pH 7.4) ได้สารละลายสีน้ำเงิน จากนั้นแยกเกลือ ammonium sulphate ออกจากโปรตีน โดย dialysis ใน 0.025 M sodium phosphate buffer ที่เย็นปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ดังแสดงในภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 แสดงการทำ dialysis สารละลายตะกอนสีน้ำเงินเข้มในถุง dialysis membrane

สกัดแยก native c-PC จากสารละลายโปรตีนสีน้ำเงินที่ผ่านการเอาเกลือออกแล้ว ด้วย DEAE-Sepharose Fast Flow บรรจุในคอลัมน์ขนาด 2.5 x 30 เซนติเมตร เตรียมและ degas buffer ที่ใช้สกัดตั้งนี้ solution A; สารละลาย 0.025M Tris-HCl, pH 7.4 และ solution B; สารละลาย 0.025M Tris-HCl, pH 7.4 ซึ่งประกอบด้วย 0.8M NaCl ขั้นตอนการสกัดปฏิบัติตามคู่มือคำแนะนำจากบริษัทตั้งนี้ Equilibrate คอลัมน์ด้วยสารละลาย solution A ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตร DEAE-beads เติมสารละลายโปรตีนสีน้ำเงินและปล่อยสารละลายตะกอนโปรตีนค่อยๆ ซึมลงในชั้น DEAE-beads จนหมด จากนั้นเติม solution A ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตร DEAE-beads บรรจุ solution A และ solution B ใน flask ขนาด 250 ml อย่างละ 100 มิลลิลิตร solution ทั้ง 2 flask นี้ใช้สำหรับทำ gradient โดยหลักการกักน้ำ ปิดจุกที่ flask solution A ดูดอากาศที่ปลายสายยางให้ solution A ไหลลงคอลัมน์ช้าๆ พร้อมเปิดวาล์วด้านล่างให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อ solution A ไหลลงมาจนเหลือปริมาณประมาณ 75 ml จึงปิดจุกที่ flask solution B ให้สารละลายหยดลงใน flask solution A เมื่อมีสารละลายสีฟ้าออกมาจากคอลัมน์จึงเริ่มเก็บ fraction หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร จนกระทั่งไม่มีสารสีฟ้าออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 และ 620 นาโนเมตร ทุกๆ fraction คำนวณความบริสุทธิ์ของ native c-PC แสดงด้วยอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (ratio of Abs_{620} / Abs_{280})

โดย fraction ที่มีค่ามากกว่า 4 แสดงว่า native c-PC ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์มากและเหมาะสมสำหรับมาทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนในขั้นตอนนี้ต่อไป

รวม fraction ที่มีค่า ratio of Abs_{620}/Abs_{280} มากกว่า 4 ขึ้นไป และแยกเกลือออกโดย dialysis native c-PC ใน 0.025 M sodium phosphate buffer วัดโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.3. การตรวจวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bio-Rad Protein Assay

เป็นวิธีอาศัยหลักการของ Bradford ในการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่อยู่ในรูปของสารละลายด้วยสี Coomassie[®] Brilliant Blue G-250 ในสภาวะที่เป็นกรด เมื่อสี Coomassie blue ทำปฏิกิริยากับเบสและส่วนของ aromatic amino acid ของโปรตีนอย่างเช่น arginine, lysine และ histidine จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดจาก 465 นาโนเมตรเลื่อนเป็น 595 นาโนเมตร นั่นคือเมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสี Coomassie blue จะเปลี่ยนจากสารละลายสีน้ำตาลแดงเป็นสารละลายสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เปรียบเทียบความเข้มข้นโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin [81]

ก่อนการทดสอบเตรียมสารละลายดังนี้ Bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml เป็นสารละลายมาตรฐาน (standard) และเจือจางน้ำยาวัดโปรตีน Bio-Rad โดยมีอัตราส่วนน้ำยา 1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่น 4 ส่วน

ในขั้นตอนการทดสอบ เติมน้ำยาวัดโปรตีน Bio-Rad ที่เจือจางแล้วลงในหลอดทดลอง 1.25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด แล้ว vortex ให้สีทำปฏิกิริยากับสารละลายโปรตีนมาตรฐานเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายในหลอดทดลองลงใน cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร การวัดความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างด้วยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการวัดความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยปรับอัตราส่วนการทำปฏิกิริยาของโปรตีนกับน้ำยาวัดโปรตีน Bio-Rad ให้เหมาะสม เปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA)

4.4. ตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวในสถานะที่มี buffer ที่แตกต่างกัน ซึ่งสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักของปฏิกิริยานี้ ได้แก่ β -mercaptoethanol ที่ผสมในส่วนของการ loading sample buffer และ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) โดยหน้าที่การทำงานของ β -mercaptoethanol จะทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ของโปรตีน ส่วน Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) เป็น detergent ที่มีประจุลบและสามารถจับกับโปรตีนได้อย่างหนาแน่น และด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้โปรตีนที่จับกันเป็นทรงกลม (globular protein) ถูกแยกออกมาเป็นสายเดี่ยวๆ อยู่ในสภาพที่เหยียดตรง (linear protein) และทำให้โปรตีนที่ถูกจับนั้นมีสภาพเป็นประจุลบ ดังนั้นโปรตีนทั้งหมดจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่เป็นประจุบวก ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของพอลิเปปไทด์จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับขนาดของ Molecular weight เพียงอย่างเดียวเท่านั้น วิเคราะห์ผลการแยกของโปรตีนได้โดยการย้อมด้วยสี Coomassie blue และเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีนมาตรฐาน (Molecular weight marker)

ในขั้นตอนการทดสอบใส่โปรตีนที่ผสมกับ 10x SDS-loading dye ซึ่งผ่านการต้มเพื่อทำลายโครงสร้างโปรตีนแล้วลงเจล โดยในแต่ละหลุมให้มีโปรตีนเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัม สำหรับกรณีทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสมไฟโคไซยานินซีสายเบต้าและโปรตีนไฟโคไซยานินซีที่สกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาเพื่อดูความบริสุทธิ์ของโปรตีน ใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 40 นาที ตามด้วย 120 โวลต์ นาน 90 นาที เมื่อครบเวลานำเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วย destain 1 (ประกอบด้วย 50% garcial acetic acid และ 40% methanol) จนกระทั่งเจลอิด เปลี่ยนเป็น destain 2 (ประกอบด้วย 5% garcial acetic acid และ 5% methanol) นาน 16 ชั่วโมง เพื่อให้เจลอายตัว แล้วถ่ายภาพวิเคราะห์ผล

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนตัวอย่างด้วยวิธี ABTS scavenging assay

ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] เป็นสารที่ใช้วัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อ ABTS ทำปฏิกิริยากับสารละลาย potassium persulphate จากนั้น ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกเกิดเป็นสารที่มีสีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ถ้าสารที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะสามารถกำจัด ABTS radical ได้ สารละลายหลังเกิดปฏิกิริยาจะมีสีจางลงเมื่อวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ซึ่งปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระจะเทียบกับค่าของ Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี

โดยเตรียมสารละลายก่อนการทดสอบดังนี้ stock solution ABTS ประกอบด้วยสารละลาย 7mM ABTS ในน้ำกลั่น เติม potassium persulphate ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.45 mM ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด นาน 12-16 ชั่วโมง และเตรียมสารละลาย 2.5 mM trolox ใน 5 mM phosphate buffered saline (PBS1: 0.51 mM KH₂PO₄, 3.43 mM K₂HPO₄·3H₂O, 0.15 mM NaCl, pH 7.4)

ก่อนการทดสอบปฏิกิริยานำสารละลาย ABTS stock solution มาเจือจางด้วย PBS1 สำหรับใช้เป็น ABTS working solution โดยให้ค่าการดูดกลืนของแสงที่ 734 นาโนเมตร เมื่อวัดด้วยเครื่อง Shimadzu humalyzer 3000 ตั้งค่า cell temperature เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนของแสงที่วัดได้ควรมีค่าเท่ากับ 0.70 ± 0.02

ในการทดสอบให้เติม ABTS working solution 980 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองซึ่งมีสารตัวอย่าง (native c-PC หรือ apo-c-PC(β)) ที่มีความเข้มข้นในระดับต้องการทดสอบ 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและ incubate ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ 734 นาโนเมตรทันทีเมื่อครบเวลา โดยมี blank เป็น ABTS working solution 980 ไมโครลิตร ผสมกับ PBS1 70 ไมโครลิตร ทุกการทดลองจะทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) คำนวณค่า %inhibition of absorbance จากสมการดังนี้

$$\text{Inhibition of absorbance (\%)} = [(A (\text{blank}) - A (\text{sample})) / A (\text{blank})] \times 100$$

โดย;

A (blank) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรของการทำปฏิกิริยาระหว่าง ABTS working solution และ PBS1

A (sample) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรของการทำปฏิกิริยาระหว่าง ABTS working solution และสารตัวอย่าง (apo-c-PC(β), native c-PC หรือ trolox)

เปรียบเทียบค่า % Inhibition of absorbance ของสารตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง ABTS working solution และ trolox โดยรายงานผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างเทียบเท่ากับ trolox (TEAC; Trolox equivalent anti-oxidant capacity)

6. การทดสอบบทบาทการปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอีจากการถูกทำลายด้วย 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) radical

เจาะเก็บเลือดตัวอย่างจากผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ที่เป็น homozygous haemoglobin E (EE) ใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง heparin ปริมาตร 6 ml นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยก plasma และ buffy coat ที่ปั่นล้างเม็ดเลือดแดง 3 ครั้ง ด้วย phosphate buffered saline (PBS2: 27 mM Na₂HPO₄, 123 mM NaH₂PO₄ and 123 mM NaCl, pH 7.4) ที่มีปริมาตรเป็น 10 เท่าของปริมาตรของเม็ดเลือดแดง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ PBS2 ให้สารละลายเม็ดเลือดแดงมีความเข้มข้นเท่ากับ 10% hematocrit

การวัดประสิทธิภาพของ native c-PC และ apo-c-PC(β) ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระจากสารตั้งต้น AAPH ที่ก่อให้เกิด peroxy radicals เมื่อกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, และ 1 μ M กับสารละลายเม็ดเลือดแดงที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% hematocrit แล้วทำปฏิกิริยากับสารละลาย AAPH ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 mM จากนั้นนำไป incubate ใน incubator ที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วที่เหมาะสมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในหลอดปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเม็ดเลือดแดงผสมกับ PBS2 แทนสารละลาย AAPH จัดเป็น negative control เมื่อครบเวลาจึงปั่นแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสมาเจือจางใน PBS2 ที่มีปริมาตรเป็น 10 เท่าของปริมาตรของส่วนใส แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร รายงานผลเป็นค่าเป็น % hemolysis โดยคำนวณเปรียบเทียบจากสารละลายเม็ดเลือดแดงเจือจางในน้ำกลั่นในปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรสารละลายเม็ดเลือดแดงจัดเป็น 100% hemolysis

ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์สารโปรตีนตัวอย่างกับ Trolox ซึ่งเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน โดยทดสอบปฏิกิริยาของสารตัวอย่างทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) แล้วรายงานค่าเป็น mean±SE และเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยสถิติ paired t-tests

7. การศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในการปกป้องรูปร่างเซลล์เม็ดเลือดแดงจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)

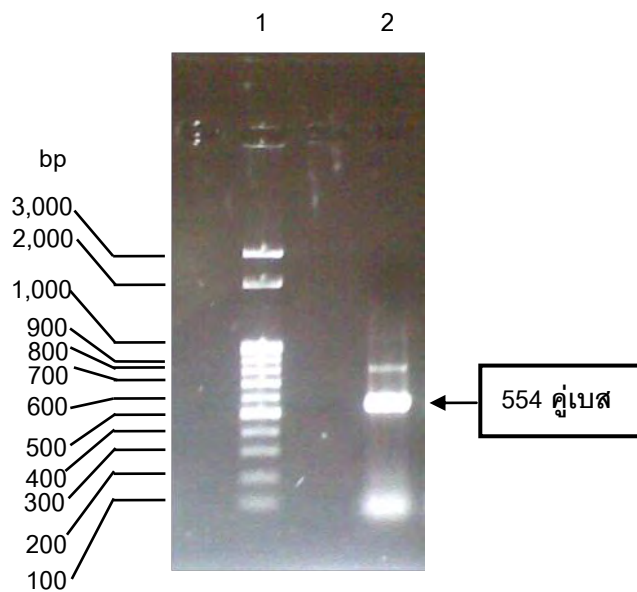
เติมสารตัวอย่าง (apo-c-PC(β), native C-PC, or Trolox) ในหลอดทดลองที่มี 60% EE erythrocyte suspension 25 μ l ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 μ M จากนั้นเติม H₂O₂ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 300 mM นำไป incubate ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ปั่นแยกเม็ดเลือดแดงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนใสทิ้ง เติม PBS2 ลงไป 125 μ l ผสมเม็ดเลือดแดงกับ buffer ให้เข้ากันและหยดลงบนแผ่น cover slip นำไป fix cells ด้วย 2.5% glutaraldehyde/0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย phosphate buffer จำนวน 2 รอบ ตามด้วยน้ำกลั่น 1 รอบ ต่อด้วยขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้ ethanol เรียงระดับตามความเข้มข้น ดังนี้ 30%, 50%, 70% และ 95% อย่างละ 1 รอบ รอบละ 3 นาที และ 100% ethanol จำนวน 3 รอบ รอบละ 3 นาที จากนั้นในขั้นตอนสุดท้ายทำให้เซลล์แห้งด้วยเครื่องทำแห้งตัวอย่างแบบวิกฤต (critical point dryer) ยี่ห้อ Balzers รุ่น CPD 020 และเคลือบทองโดยระบบ ion sputtering ด้วยเครื่องยี่ห้อ Balzers รุ่น CPD 040 นำผลิตภัณฑ์สุดท้ายมาส่องด้วยกล้อง SEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5410LV

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ผลการวิจัย

1. ผลการเตรียมและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไฟโคไซยานินสีสายเบต้า (*cpcB* sequence) จากสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR; Polymerase Chain Reaction)

ผลปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *cpcB* gene จากดีเอ็นเอแม่แบบของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. platensis* แยกบนวุ้น agarose พบ major band ของดีเอ็นเอมีขนาด 554 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องจากการคำนวณจำนวนเบสของ DNA sequence ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1. แสดงผลปฏิกิริยา PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ *cpcB* กำหนดให้

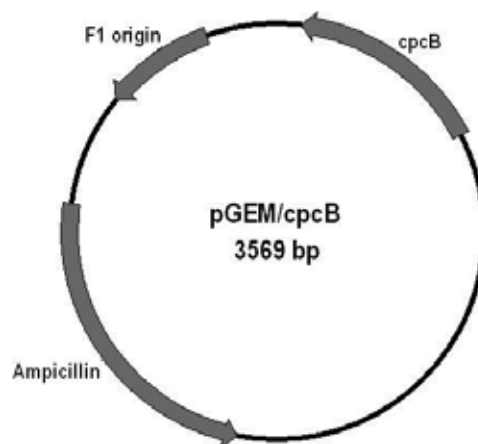
Lane 1 = 100 bp DNA ladder

Lane 2 = ดีเอ็นเอ *cpcB*

2. ผลการโคลนยีนไฟโคไซยานินสีสายเบต้า

2.1. การเชื่อมต่อยีนไฟโคไซยานินสีสายเบต้ากับ pGEM[®]-T easy vector เพื่อนำเข้าสู่ DH5 α และเลือกโคโลนีที่มียีนไฟโคไซยานินสีสายเบต้าด้วยวิธี Blue-white colony screening

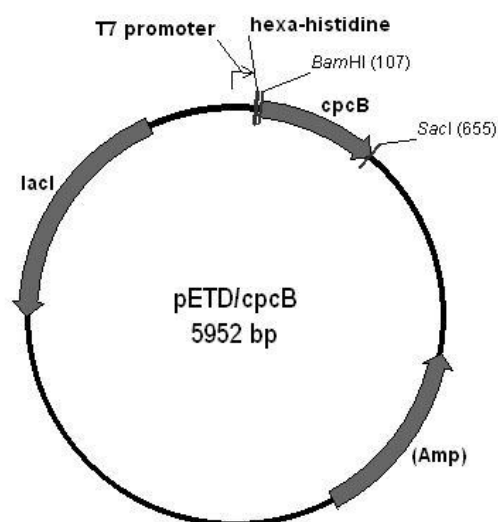
เมื่อโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *cpcB* เชื่อมต่อกับ pGEM[®]-T Easy vector โดยโครงสร้างพลาสมิด (pGEM/*cpcB*) ดังแสดงในภาพที่ 4.2 นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ DH5 α เพื่อทดสอบ Blue/white colony screening พบว่ามีทั้งโคโลนีสีขาวและโคโลนีสีฟ้าเกิดขึ้น ซึ่งโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้นนี้คาดว่าเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิด pGEM/*cpcB* จึงนำโคโลนีที่เลือกไว้มาตรวจสอบในขั้นต่อนต่อไปด้วยเทคนิค colony PCR และ plasmid digestion



ภาพที่ 4.2. โครงสร้างพลาสมิด pGEM/*cpcB* ที่ประกอบด้วย *cpcB* gene ภายใต้การควบคุมของ T7 และ SP6 RNA polymerase promoter เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด

2.2. การเชื่อมต่อยีนไฟโคไซยานินสีสายเบตากับ pETDuet™-1 vector และนำเข้าสู่ DH5α

เมื่อโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *cpcB* เชื่อมต่อกับ pETDuet™-1 vector โดยโครงสร้างพลาสมิด (pETD/*cpcB*) ดังแสดงในภาพที่ 4.3 นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ DH5α เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB/Amp เลือกโคโลนีที่เกิดขึ้นซึ่งคาดว่าเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิด pETD/*cpcB* จึงนำมาตรวจสอบในขั้นตอนนี้ต่อไปด้วยเทคนิค colony PCR และ plasmid digestion

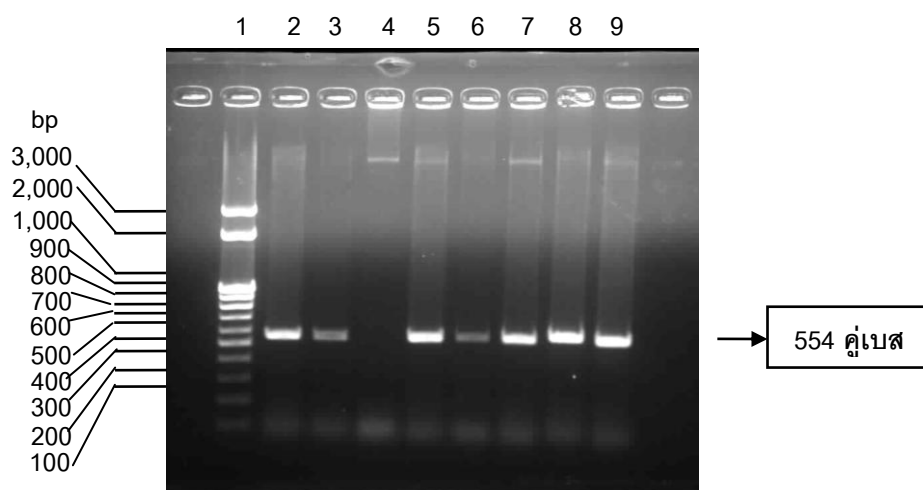


ภาพที่ 4.3. โครงสร้างพลาสมิด pETD/*cpcB* ที่ประกอบด้วย *cpcB* gene ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter

2.3. การตรวจสอบพลาสมิดที่เชื่อมต่อยีนไฟโคไซยานินสีสายเบต้า *cpcB* ได้

2.3.1. การตรวจสอบโดยคัดเลือกโคโลนีด้วยเทคนิค PCR

เมื่อตรวจสอบโคโลนี DH5 α ที่คาดว่ามีการพลาสมิด pETD/*cpcB* ด้วยเทคนิค colony PCR โดยแยก PCR product บนวุ้น agarose พบว่าโคโลนีที่ผ่านการทดสอบซึ่งมีพลาสมิด pETD/*cpcB* จะมี major band ที่มีขนาด 554 คู่เบสของดีเอ็นเอ *cpcB* ปรากฏดังแสดงในภาพที่ 4.4 และทดสอบยืนยันด้วยเทคนิค plasmid digestion



ภาพที่ 4.4 ผล colony PCR ของ DH5 α /pETD/*cpcB* ซึ่งประกอบด้วย *cpcB* gene ปรากฏ band ที่มีขนาด 554 คู่เบส

กำหนดให้

Lane ที่ 1 = 100 bp DNA ladder

Lane ที่ 2-8 = PCR product จากการสุ่มเลือกโคโลนี DH5 α colony ที่ 1-7 ซึ่งประกอบด้วย พลาสมิด pETD/*cpcB*

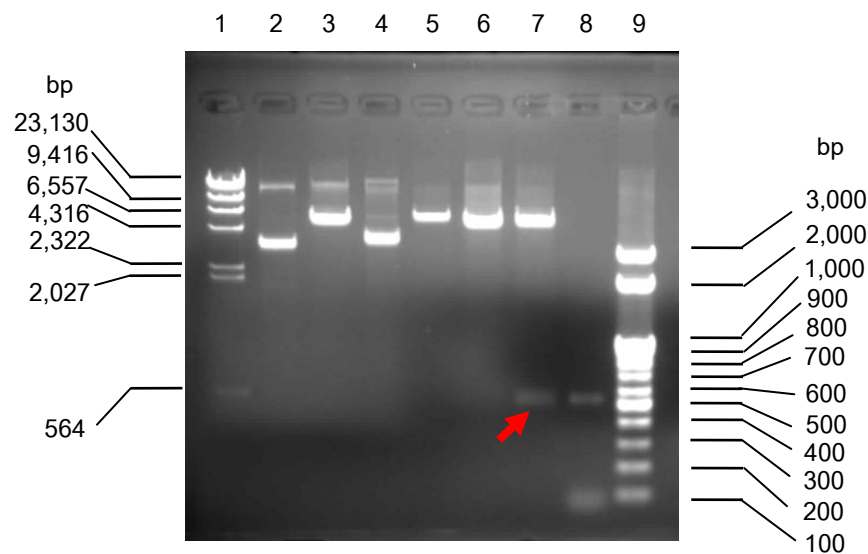
Lane ที่ 9 = PCR product จาก *S. platensis* genomic ที่ประกอบด้วย *cpcB* gene

2.3.2. การตรวจสอบพลาสมิดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

โคโลนีที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค colony PCR แล้วพบว่ามีพลาสมิดที่ต้องการเชื่อมอยู่กับดีเอ็นเอ *cpcB* นำโคโลนีดังกล่าวมาสกัด Miniprep ด้วย NucleSpin[®] Plasmid DNA isolation kit และตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I จากนั้นแยก product ที่ได้บนวุ้น agarose

ส่วนผลการทดสอบยืนยัน *cpcB* gene ในพลาสมิด pETDuetTM-1 ด้วยเทคนิค plasmid digestion ดังแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่าถ้าพลาสมิด pETDuetTM-1 เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ *cpcB* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I เพียงอย่างเดียวจะปรากฏ band ขนาด 5,952 คู่เบส โดยเปรียบเทียบกับพลาสมิด pETDuetTM-1 ที่ไม่ทำการเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *cpcB* เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI เพียงอย่างเดียวจะปรากฏ band ขนาด 5,420 คู่เบส

นอกจากนี้เมื่อตัดพลาสมิด pETDuetTM-1 ซึ่งเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ *cpcB* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด (*Bam*HI และ *Sac*I) จะปรากฏ band ที่มีขนาด 5,404 และ 548 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของพลาสมิด pETDuetTM-1 ที่เหลือและดีเอ็นเอ *cpcB* ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ การตัดพลาสมิด pETDuetTM-1 ที่ไม่ทำการเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *cpcB* เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิดจะไม่ปรากฏ band ขนาด 548 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับดีเอ็นเอ *cpcB* ซึ่งมีขนาด 554 คู่เบสที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ *S. platensis* genome เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ



ภาพที่ 4.5 ผลการตัดพลาสมิด pETDuet™-1 และ pETD/cpcB ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I

โดย ตำแหน่งลูกศรสีแดง = ดีเอ็นเอ *cpcB* ซึ่งมีขนาด 548 bp เมื่อถูกตัดด้วยถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I

กำหนดให้

Lane ที่ 1 = Lambda DNA/HindIII marker

Lane ที่ 2 = พลาสมิด pETDuet™-1 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Lane ที่ 3 = พลาสมิด pETDuet™-1 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

Lane ที่ 4 = พลาสมิด pETD/cpcB ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Lane ที่ 5 = พลาสมิด pETD/cpcB ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

Lane ที่ 6 = พลาสมิด pETDuet™-1 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I

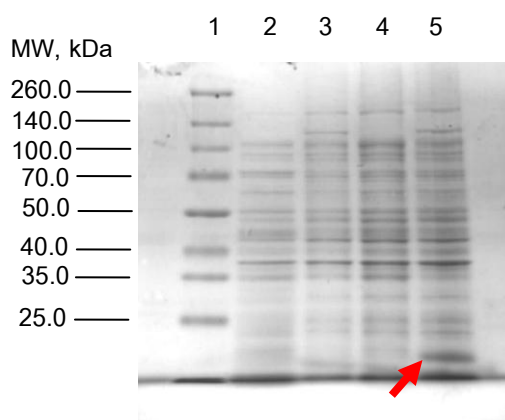
Lane ที่ 7 = พลาสมิด pETD/cpcB ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I

Lane ที่ 8 = PCR product จาก *S. platensis* genome ที่ประกอบด้วย *cpcB* gene

Lane ที่ 9 = 100 bp DNA ladder

3. ผลการติดตามการแสดงออก soluble form (kinetic of protein expression) ของโปรตีน ลูกลสมไฟโคไซยานินซีสายเบต้าในเซลล์แบคทีเรีย

นำพลาสมิด pETD/cpcB ที่ผ่านการตรวจสอบเข้าสู่เซลล์ BL21(DE3)pLysS และกระตุ้นเซลล์ให้แสดงออกโปรตีนด้วย 1 mM IPTG เมื่อนำ lysate cells มาวิเคราะห์ 12% SDS-PAGE ดังแสดงในภาพที่ 4.6 พบว่าเซลล์ BL21 ที่ประกอบด้วยพลาสมิด pETD/cpcB (BL21/pETD/cpcB) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IPTG จะมีการแสดงออกของโปรตีน apo-c-PC(β) มีขนาด 20.3 kDa สอดคล้องกับการคำนวณมวลโมเลกุลของโปรตีนดังกล่าวจาก DNA sequence ซึ่ง ส่วนเซลล์ BL21/pETD/cpcB ที่ไม่ถูกกระตุ้น IPTG จะไม่ปรากฏ band ขนาด 20.3 kDa เช่นเดียวกับเซลล์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด pETD/cpcB (BL21/pETDuet™-1) เมื่อกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้น IPTG จะไม่ปรากฏ band ขนาด 20.3 kDa



ภาพที่ 4.6 ผลการแสดงออกโปรตีน apo c-PC(β) จากการกระตุ้นเซลล์ BL21(DE3)pLysS ซึ่งแสดงผลด้วย 12% SDS - PAGE

โดย ตำแหน่งลูกศรสีแดง = โปรตีน apo c-PC(β) ซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุล 20.3 kDa กำหนดให้

Lane ที่ 1 = protein molecular weight marker

Lane ที่ 2 = BL21/pETDuet™-1 cell lysate เมื่อไม่ถูกกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG

Lane ที่ 3 = BL21/pETDuet™-1 cell lysate เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG

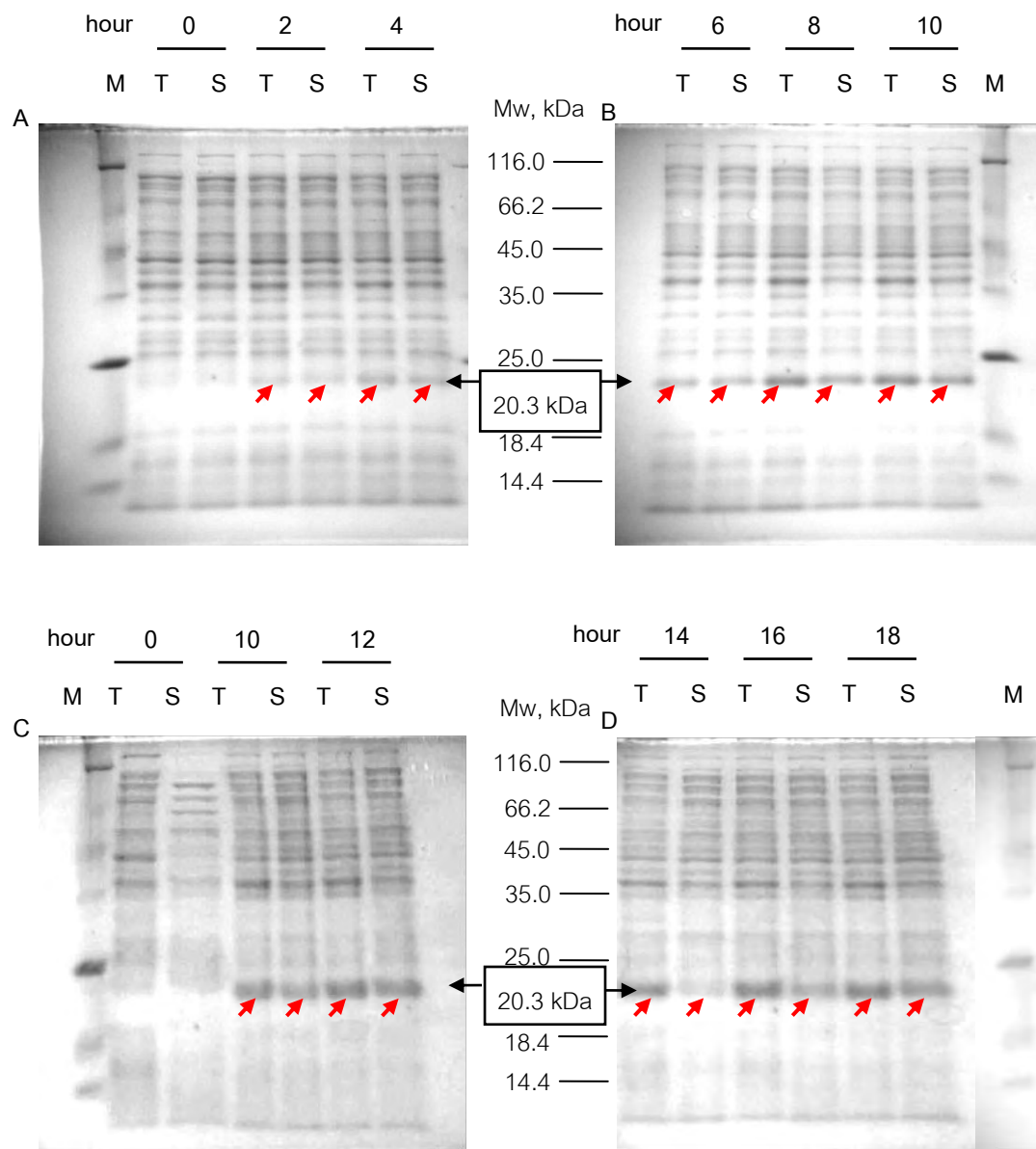
Lane ที่ 4 = BL21/pETD/cpcB cell lysate เมื่อไม่ถูกกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG

Lane ที่ 5 = BL21/pETD/cpcB cell lysate เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG

ในการกระตุ้น BL21/pETD/cpcB เพื่อแสดงออกโปรตีน apo c-PC(β) ด้วย 1mM IPTG และ incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เป็นผลทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของโปรตีนเนื่องจากผลิตโปรตีนออกมาเร็วเกินไปอาจทำให้เกิดการ folding ผิดพลาด ดังนั้นวิธีแก้ปัญหานี้เบื้องต้นทำ kinetic of protein expression โดยเลือกใช้ IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 mM พร้อมกับลดอุณหภูมิเป็น 20 องศาเซลเซียส และทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เมื่อวิเคราะห์ผลด้วย 12% SDS-PAGE ดังแสดงในภาพที่ 4.7 พบว่าในชั่วโมงที่ 2 หลังจากเซลล์ BL21/pETD/cpcB ถูกกระตุ้นด้วย IPTG เซลล์เริ่มแสดงออกโปรตีน apo c-PC(β) จะเห็นได้จากการเริ่มปรากฏ band ขนาด 20.3 kDa (ลูกศรสีแดง) ทั้งใน total protein (T) และ soluble protein (S) และเซลล์จะแสดงออกโปรตีนมากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่นานขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลามากกว่า 12 ชั่วโมงขึ้นไปพบว่า apo c-PC(β) ในรูป soluble มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับความเข้มของ 20.3 kDa band ของ soluble protein (S) น้อยกว่า total protein (T)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเซลล์ BL21/pETD/cpcB เพื่อแสดงออกโปรตีน apo c-PC(β) ในรูป soluble protein คือ 12 ชั่วโมงในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หลังจากกระตุ้นด้วย IPTG ระดับความเข้มข้น 0.5 mM



ภาพที่ 4.7 ผลการแสดงออกแบบแผนโปรตีน apo-c-PC(β) ในรูป soluble protein จากการกระตุ้นเซลล์ BL21(DE3)pLysS ด้วย 0.5 mM IPTG แบ่งเก็บเซลล์ทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลาทั้งสิ้น 18 ชั่วโมงดังแสดงในภาพ A-D แสดงผลด้วย 12%SDS- PAGE โดย ตำแหน่งลูกศรสีแดง = โปรตีน apo-c-PC(β) ซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุล 20.3 kDa
M = Protein molecular weight marker
T = total protein
S = soluble protein

4. การสกัดโปรตีนลูกผสมไฟโคไซยานินสีสายเบต้าและไฟโคไซยานินสีจากสาหร่ายสไปรูลินา

4.1. การสกัดโปรตีนลูกผสมไฟโคไซยานินสีสายเบต้า

Purification step	Total soluble protein (mg)	Yield (%)	Purity (%) (SDS-gel)
Crude extract	302.6	100	4
IMAC	44.66	14.76	80.5

ตารางที่ 4.1. แสดงผลการสกัด apo-c-PC(β) จากเซลล์ BL21/pETD/cpcB หนัก 4 กรัมของน้ำหนักเปียกของเซลล์ ด้วยวิธี IMAC

กำหนดให้

yield (%) = จากการคำนวณอัตราส่วนของ total soluble protein ของแต่ละชั้นของการสกัดหารด้วย total soluble protein ของ crude extract

Purity (%) = จากการคำนวณอัตราส่วนของความเข้มของ major band ใน SDS gel หารด้วยความเข้มของ band ทั้งหมดในแต่ละ lane

4.2. การสกัดโปรตีนไฟโคไซยานินซีจากสาหร่ายสไปรูลินา

Purification step	Total protein (mg)	Yield (%)	Purity (%)	
			Abs (620/280)	SDS-gel
Crude extract	299.6	100	0.86	-
30% (NH ₄) ₂ SO ₄ supernatant	181.6	60.6	0.88	-
50% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	138.1	46.1	1.81	-
Ion exchange chromatography (DEAE Sepharose fast flow)	61.3	20.5	4.00	-

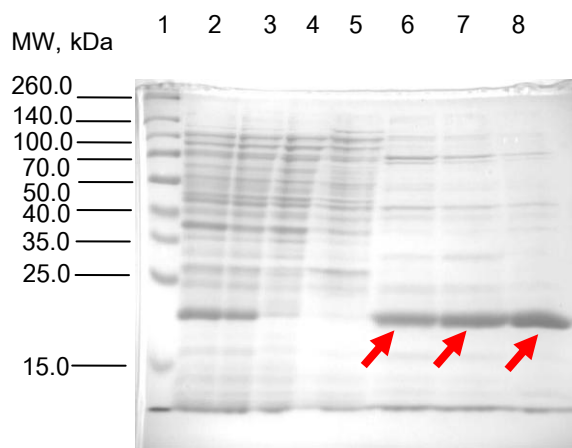
ตารางที่ 4.2. แสดงผลการสกัด native c-PC ด้วยวิธี Ion exchange chromatography (DEAE Sepharose fast flow)

กำหนดให้

yield (%) = จากการคำนวณอัตราส่วนของ total protein ของแต่ละขั้นของการสกัดหารด้วย total protein ของ crude extract

Purity (%) = จากการคำนวณอัตราส่วนของความเข้มของ major band ใน SDS gel หารด้วยความเข้มของ band ทั้งหมดในแต่ละ lane

4.3. ตรวจสอบคุณลักษณะโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

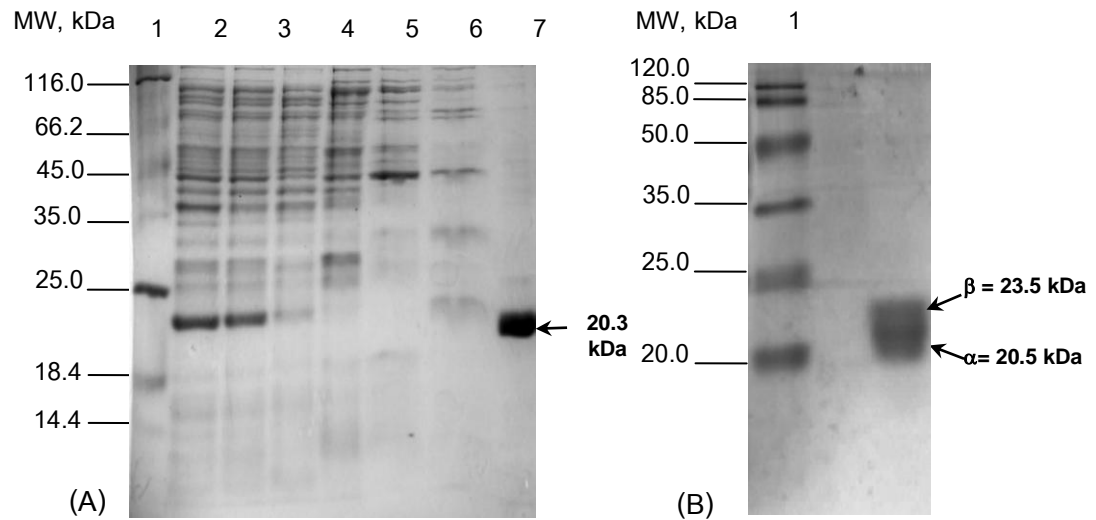


ภาพที่ 4.8 แสดงผลการสกัด apo c-PC(β) ด้วยวิธี IMAC ที่ความเข้มข้น imidazole ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งแสดงผลด้วย 12% SDS - PAGE

โดย ตำแหน่งลูกศรสีแดง = โปรตีน apo c-PC(β) ซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุล 20.3 kDa กำหนดให้

- Lane ที่ 1 = protein molecular weight marker
- Lane ที่ 2 = total protein ของ BL21/pETD/cpcB
- Lane ที่ 3 = soluble protein ของ BL21/ pETD/cpcB
- Lane ที่ 4 = flow-through fractions
- Lane ที่ 5 = 100 mM imidazole wash fractions
- Lane ที่ 6 = 200 mM imidazole wash fractions
- Lane ที่ 7 = 300 mM imidazole wash fractions
- Lane ที่ 8 = 400 mM imidazole elution fractions ซึ่งมี purified apo-c-PC(β)

จากภาพที่ 4.8 แสดงผลการสกัด apo-c-PC(β) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 mM imidazole buffer ไม่สามารถ elute โปรตีน apo-c-PC(β) ได้ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น imidazole ที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 300 mM สามารถ elute โปรตีน apo-c-PC(β) ได้ในปริมาณที่น้อย และมีโปรตีนชนิดอื่นเจือปน และความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการ elute โปรตีน apo-c-PC(β) คือ 400 mM imidazole buffer ซึ่งได้โปรตีน apo-c-PC(β) ที่บริสุทธิ์สูง



ภาพที่ 4.9 แสดงผลการสกัด apo-c-PC(β) ด้วยวิธี IMAC และ native c-PC ด้วยวิธี ammonium sulfate precipitation และ ion-exchange chromatography ซึ่งแสดงด้วย 12% SDS-PAGE ภาพที่ (A) และ (B) ตามลำดับ

กำหนดให้ในภาพ (A)

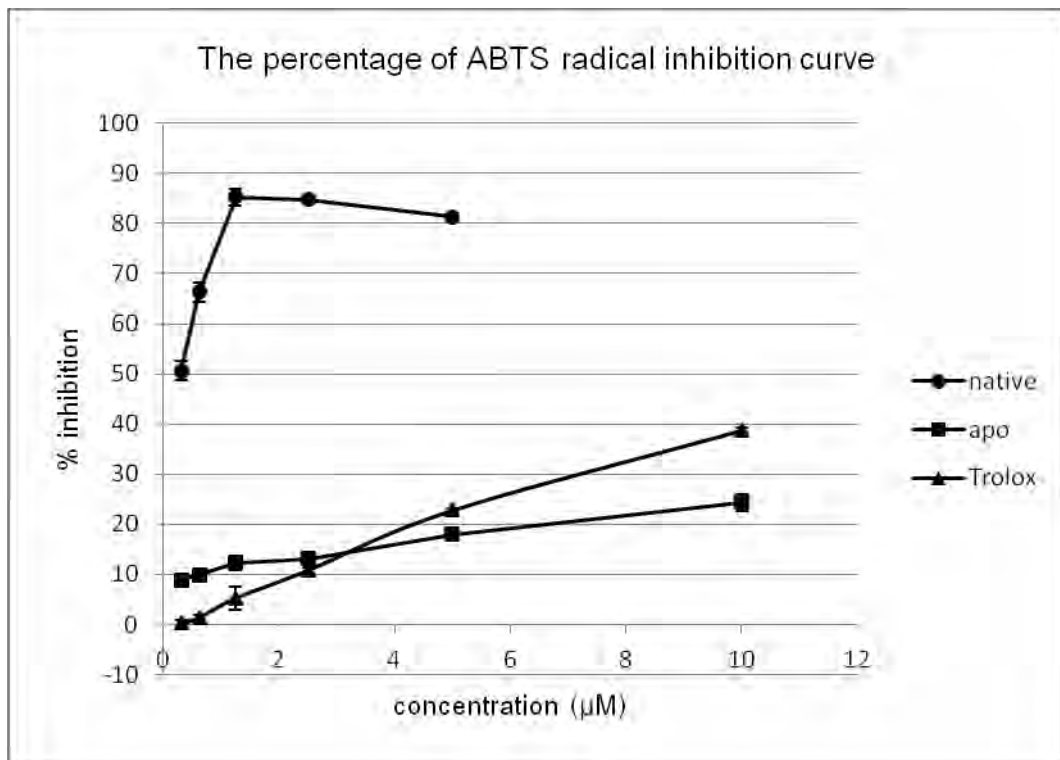
- Lane ที่ 1 = protein molecular weight marker
- Lane ที่ 2 = total protein ของ BL21/pETD/cpcB
- Lane ที่ 3 = soluble protein ของ BL21/ pETD/cpcB
- Lane ที่ 4 = flow-through fractions
- Lane ที่ 5 = 20 mM imidazole wash fractions
- Lane ที่ 6 = 40 mM imidazole wash fractions
- Lane ที่ 7 = 100 mM imidazole wash fractions
- Lane ที่ 8 = 400 mM imidazole elution fractions ซึ่งมี purified apo-c-PC(β)

กำหนดให้ในภาพ (B)

- Lane ที่ 1 = protein molecular weight marker
- Lane ที่ 2 = native c-PC ที่สกัดได้จาก *S. platensis*

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนตัวอย่างด้วยวิธี ABTS scavenging assay

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนทั้งสองชนิดด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay โดยมี trolox เป็น positive control ดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบว่าสารที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะสามารถฟอกสีของ ABTS radical ได้ดีกว่า โดยพบว่า apo-c-PC(β) และ native c-PC มีค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) เท่ากับ 0.66 และ 31.62 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า apo-c-PC(β) มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ยังมีฤทธิ์น้อยกว่า native c-PC ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินาเนื่องจากเป็นไฟโคบิลิโปรตีนที่ประกอบด้วย chromophores และมีทั้งสายแอลฟาและสายเบต้า

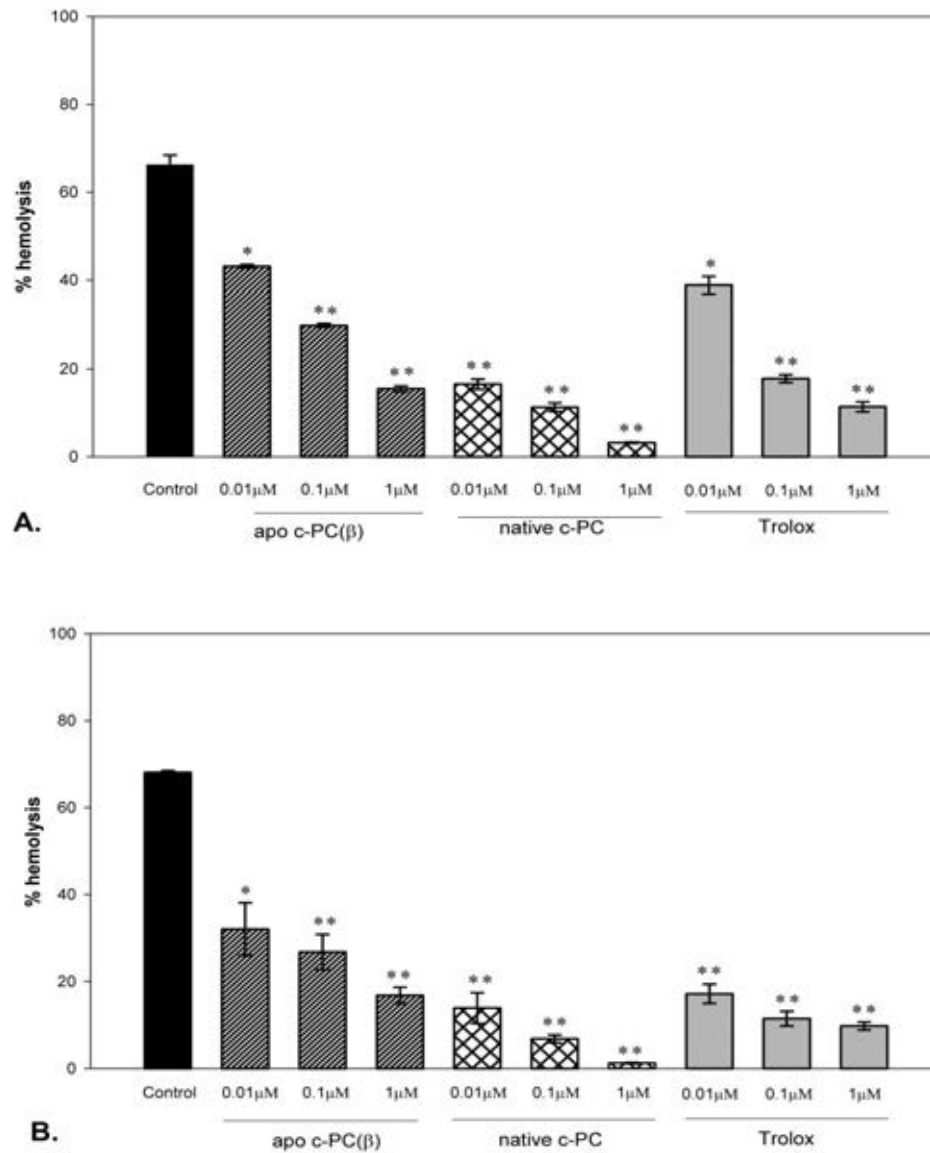


ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงผลการทดสอบวัดประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ c-PC และ trolox ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay กำหนดให้

- = native ที่ระดับความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5 µM
- = apo-c-PC(β) ที่ระดับความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 µM
- ▲ = trolox ที่ระดับความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 µM

6. ผลการทดสอบบทบาทการปกป้องเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอีจากการถูกทำลายด้วย 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) radical

เมื่อทดสอบเม็ดเลือดแดงกับ 100 mM AAPH เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยไม่ได้รับสารใดๆ ในการปกป้องเซลล์ (positive control) จากนั้นวัด % hemolysis โดยเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงที่แตกในน้ำกลั่นซึ่งจัดเป็น 100% hemolysis โดยผลการทดสอบพบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนปกติและผู้ป่วย Homozygous E thalassemia มี % hemolysis เท่ากับ $66.19 \pm 2.28\%$ และ $68.10 \pm 0.41\%$ ตามลำดับ และเมื่อทดสอบเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งสองชนิดในภาวะ oxidative stress ดังกล่าวโดยได้รับสารทดสอบ apo-c-PC(β), native c-PC หรือ Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 μM โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารทดสอบที่เพิ่มมากขึ้น จะมีฤทธิ์การยับยั้งการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงคนปกติและผู้ป่วย Homozygous E thalassemia มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ และ $p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 100% hemolysis ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ในภาคผนวก ก และกราฟแผนภูมิแท่งดังแสดงในภาพที่ 4.11

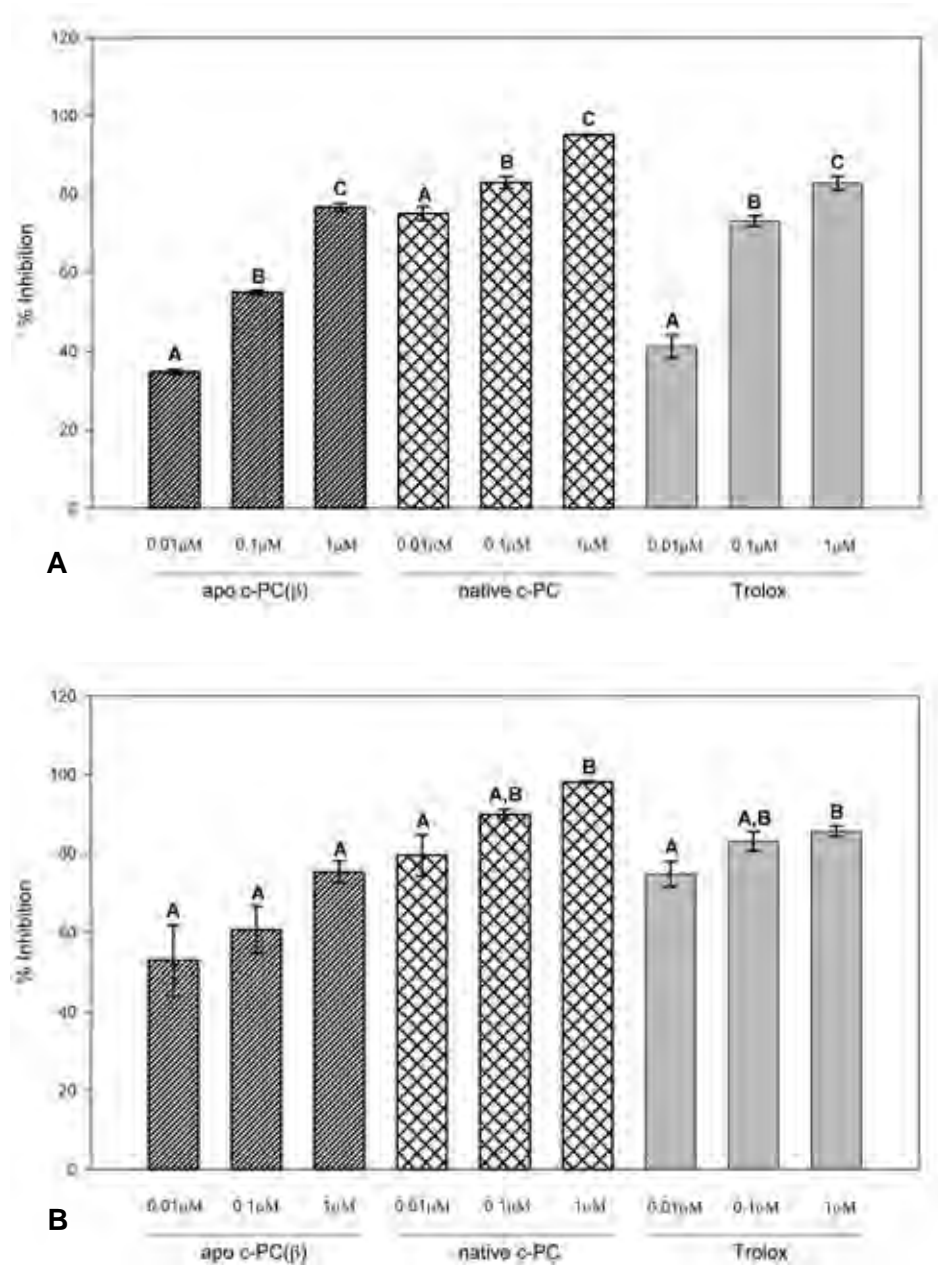


ภาพที่ 4.11 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของ apo-c-PC(β), native c-PC และ Trolox ในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงของคนปกติ (A) และใน Homozygous E thalassaemia (B) ในภาวะ oxidative stress จากการกระตุ้นด้วย AAPH รายงานผล means \pm SEM และทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (n=3) วิเคราะห์ผลด้วย ค่าสถิติ pair t-tests เปรียบเทียบการทดสอบ test กับ control โดยบ่งชี้ค่า นัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ($p < 0.05$) และ 0.01 ($p < 0.01$) ด้วย * และ ** ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงกับ positive control ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันของสารชนิดเดียวกันดังตารางที่ 5 และ 6 ในภาคผนวก ก และกราฟแผนภูมิแท่งดังแสดงในภาพที่ 4.12 โดย apo-c-PC(β) ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 μ M เมื่อทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติพบว่าจะมี % inhibition of hemolysis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ $34.83 \pm 0.60\%$, $54.84 \pm 0.63\%$ และ $76.63 \pm 0.99\%$ ตามลำดับ แต่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง EE เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ apo-c-PC(β) พบว่า % inhibition of hemolysis แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญเท่ากับ $52.92 \pm 8.89\%$, $60.67 \pm 5.93\%$ และ $75.32 \pm 2.76\%$ ตามลำดับ

ประสิทธิภาพของ native c-PC ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 μ M เมื่อทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติพบว่าจะมี % inhibition of hemolysis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ $75.05 \pm 1.77\%$, $82.95 \pm 1.47\%$ และ $95.13 \pm 0.17\%$ ตามลำดับ แต่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง EE เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ native c-PC พบว่า % inhibition of hemolysis แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญระหว่างความเข้มข้นใกล้เคียงกันเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นเดิม แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 100 เท่าของความเข้มข้นเดิมเท่ากับ $79.57 \pm 5.20\%$, $89.98 \pm 1.30\%$ และ $98.18 \pm 0.23\%$ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 μ M ตามลำดับ

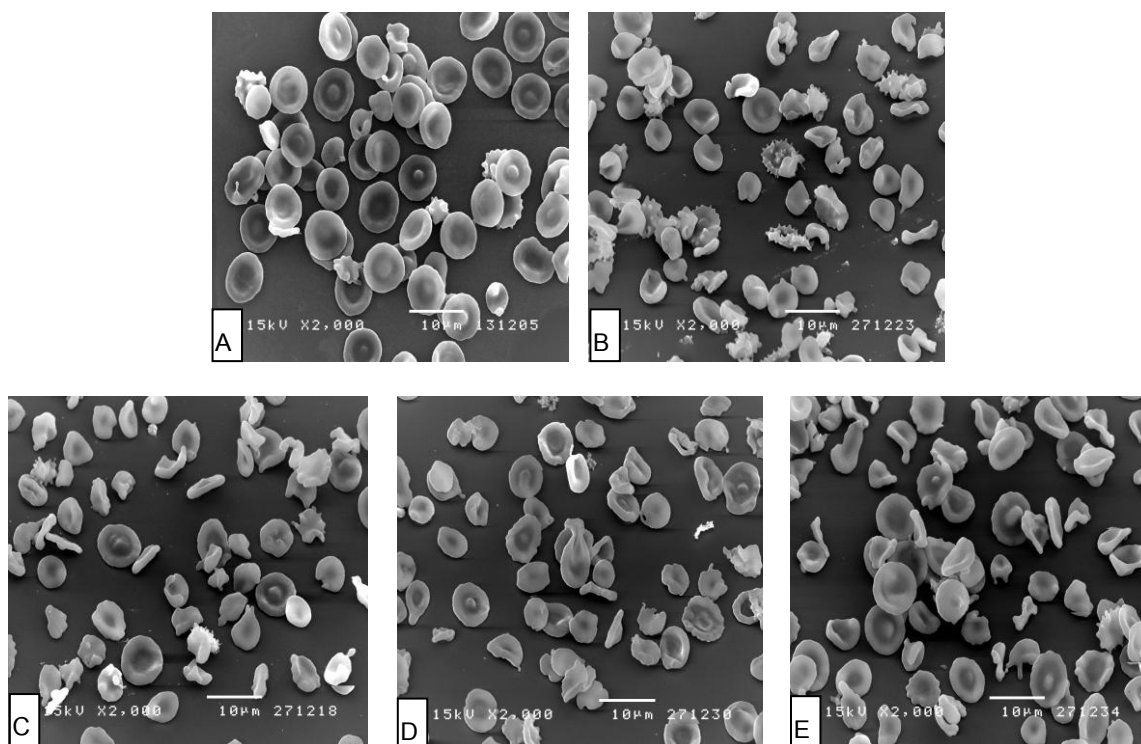
ในการทดสอบฤทธิ์ของ Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 μ M เมื่อทดสอบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติพบว่าจะมี % inhibition of hemolysis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ $41.21 \pm 2.91\%$, $73.14 \pm 1.36\%$ และ $82.82 \pm 1.70\%$ ตามลำดับ แต่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง EE เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ native c-PC พบว่า % inhibition of hemolysis แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญระหว่างความเข้มข้นใกล้เคียงกันเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นเดิม แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 100 เท่าของความเข้มข้นเดิมเท่ากับ $74.79 \pm 3.23\%$, $83.14 \pm 2.47\%$ และ $85.65 \pm 1.37\%$ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 μ M ตามลำดับ



ภาพที่ 4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงของสารชนิดเดียวกันที่ระดับความเข้มข้นต่างกับกับ positive control ในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงปกติ (A) และใน Homozygous E thalassemia (B) จากการกระตุ้นด้วย AAPH และใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one way ANOVA) ของข้อมูลด้วยค่าสถิติ Tukey 's honest significance test กำหนดให้ ตัวอักษร A, B, C ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

7. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในการปกป้องรูปร่างเซลล์เม็ดเลือดแดงจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ apo-c-PC(β) และ native c-PC ในการปกป้องรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดง EE จากการทำลายด้วย H_2O_2 และวิเคราะห์รูปร่างเซลล์เม็ดเลือดแดง EE ด้วยกล้อง SEM พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่เป็น target cells แม้ว่าไม่ได้กระตุ้นด้วย H_2O_2 พบทั่วไปในกลุ่ม hemoglobin E syndrome และนอกจากนี้พบเซลล์เม็ดเลือดแดงรูปร่าง echinocytes เท่ากับ 7% ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง EE ทั้งหมด ดังแสดงในภาพที่ 4.13A เซลล์เม็ดเลือดแดง EE เมื่อถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 โดยไม่ได้รับสารใดๆปกป้องเซลล์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง 80% ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมดมีรูปร่างบูดเบี้ยวและเป็น crenate cells ดังแสดงในภาพที่ 4.13B ในกรณีเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อได้รับสาร apo-c-PC(β), native c-PC หรือ Trolox พบว่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างผิดปกติมีปริมาณลดลงเท่ากับ 33%, 22% และ 37% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.13C - 4.13E



ภาพที่ 4.13 แสดงผลรูปร่างเม็ดเลือดแดง EE หลังจากถูกทำลายโดย H_2O_2 เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)

กำหนดให้

ภาพที่ 4.13A = RBC + PBS;

ภาพที่ 4.13B = RBC + 300 mM H_2O_2

ภาพที่ 4.13C = RBC + 300 mM H_2O_2 + 10 μ M Trolox

ภาพที่ 4.13D = RBC + 300 mM H_2O_2 + 10 μ M native c-PC

ภาพที่ 4.13E = RBC + 300 mM H_2O_2 + 10 μ M recombinant apo-c-PC(β)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติในการสร้างฮีโมโกลบิน กล่าวคือ ผู้ป่วยมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สายโกลบินลดลงหรือไม่สามารถสังเคราะห์สายโกลบินได้ ซึ่งความผิดปกตินี้เกิดได้ทั้งในโกลบินสาย α หรือ β ทำให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างปริมาณโกลบินทั้งสองสาย เกิดการตกตะกอนของสายโกลบินที่เหลือนำไปเม็ดเลือดแดงแตกหรือถูกทำลายในไขกระดูกหรือม้ามในขณะที่เป็นเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน [40] ในที่สุดผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะมีภาวะโลหิตจาง (anemia) ในกลุ่มที่มีอาการรุนแรงอาจมีภาวะแทรกซ้อนเช่น bone expansion และ extramedullary hematopoiesis ในตับ หรือ ม้าม เป็นต้น ในแง่ของการรักษานั้นขึ้นอยู่กับอาการและภาวะโรคแทรกซ้อน การรักษาที่ได้ผลดีนั้นคือการปลูกถ่ายสเต็มเซลล์ (hematopoietic stem-cell transpantation) และในปัจจุบันได้มีทางเลือกใหม่ของการรักษาที่ช่วยทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการซีดดีขึ้นด้วย fetal hemoglobin modifiers และ antioxidants โดยมีการศึกษาและค้นคว้าสารต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่สกัดได้จากธรรมชาติหรือสมุนไพรชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อนำมาใช้เสริมฤทธิ์ในการรักษาและบรรเทาอาการรุนแรงของโรคได้ เนื่องจาก ROS มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย [33] c-PC เป็นไฟโคบิลิโปรตีนที่สำคัญที่มีคุณลักษณะเด่นทางด้านการต่อต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีผู้ศึกษาและค้นคว้าวิจัยเป็นจำนวนมากเนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย [22]

ในการผลิตไฟโคไซยานินซึ่งจาก cyanobacteria โดยทั่วไปจะต้องเพาะเลี้ยง cyanobacteria ให้ได้ในปริมาณมากซึ่งต้องใช้เวลาและมีความคุ้มค่าต้นทุนการเพาะเลี้ยงที่ค่อนข้างสูง อาจเนื่องมาจากสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง เช่น บ่อเพาะเลี้ยงและโรงเรือนที่ต้องควบคุมสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต เช่น อุณหภูมิ แสงแดด และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ยังต้องการสารอาหารเสริมชนิดต่างๆ ในปริมาณมากด้วย ดังนั้นจึงพัฒนาการสังเคราะห์ไฟโคบิลิโปรตีนในแบคทีเรียแทนการเพาะเลี้ยง cyanobacteria เพื่อลดปัญหาดังกล่าวและลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลงด้วย แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีอุปสรรคในการผลิตอยู่บ้าง เนื่องจากไฟโคบิลิโปรตีนนั้นมีส่วนของ bilins หรือ chromophores เป็นองค์ประกอบ [82]

ในกระบวนการผลิต bilins ของ cyanobacteria สังเคราะห์ได้จากสารตั้งต้นที่เรียกว่า heme แต่ในเซลล์แบคทีเรียนั้นมีปริมาณ heme ไม่มากพอสำหรับการผลิต ทั้งยังขาดเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับย่อยสลาย heme ให้ได้ bilins เป็นผลผลิตสุดท้ายของปฏิกิริยาเคมี [30] จากข้อจำกัดเหล่านี้คณะผู้วิจัยได้ทำการผลิต apo-c-PC(β) ซึ่งไม่มี bilins ในโครงสร้างของสายโปรตีน ดังนั้นจึงไม่ต้องการ heme ในขั้นตอนการสังเคราะห์ เพราะฉะนั้น recombinant proteins ที่สังเคราะห์ได้จะไม่มีสีน้ำเงินและไม่มีคุณสมบัติการเรืองแสงที่ 620 นาโนเมตร ดังเช่น native c-PC เนื่องจากคุณสมบัติเหล่านี้เป็นคุณลักษณะจำเพาะของ bilins เนื่องด้วยวัตถุประสงค์สำหรับการสังเคราะห์ apo-c-PC(β) นั้นคือเพื่อเป็นทางเลือกใหม่ของการรักษาโรคในกลุ่มที่มีภาวะ oxidative stress มาเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรค โดยนำโปรตีนที่สังเคราะห์ได้มาพัฒนาเพื่อสามารถนำมาใช้เสริมฤทธิ์การรักษาแผนปัจจุบัน จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยา (biological activities) ของโปรตีนดังกล่าวต่อไป

จากผลการศึกษาการโคลนยีน *cpcB* ในพลาสมิด pETDuetTM-1 โดยโครงสร้างพลาสมิดประกอบด้วย hexahistidine tag จากผลการกระตุ้น *E. coli* ที่มีพลาสมิด pETD/*cpcB* พบว่าสามารถแสดงออกโปรตีน apo-c-PC(β) ได้สำเร็จ แต่ในการผลิต apo-c-PC(β) ใน *E. coli* ยังคงมีอุปสรรคอยู่บ้าง เนื่องจากซึ่ง apo-c-PC(β) เป็นโปรตีนแปลกปลอม (heterogenous proteins) ในเซลล์แบคทีเรีย เมื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตโปรตีนในปริมาณมาก พบว่ายิ่งทำให้ได้โปรตีน apo-c-PC(β) ในรูป soluble fractions ปริมาณน้อย ผู้วิจัยจึงปรับลดความเข้มข้นของ IPTG ลงพร้อมกับปรับลดอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียหลังการกระตุ้น โดยพบว่าปริมาณของ soluble protein ของ apo-c-PC(β) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่าการผลิตโปรตีนในกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนใน *E. coli* มักเกิดการจับกลุ่มของโปรตีนกลายเป็น inclusion bodies ภายในเซลล์แบคทีเรีย และแก้ปัญหาดังกล่าวโดยลดอุณหภูมิเพาะเลี้ยงเซลล์หลังจากกระตุ้นด้วย IPTG หรือปรับลดความเข้มข้น IPTG หรือลดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ [72, 75, 83, 84] Gnoth และคณะกล่าวว่าส่วนใหญ่การเกิด inclusion bodies ในเซลล์แบคทีเรียมาจากอุณหภูมิและสภาวะแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรียไม่เหมาะสมสำหรับการพับตัวของโปรตีน [85] Berwal และคณะรายงานว่าอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการผลิตโปรตีนแปลกปลอมใน *E. coli* มีความสำคัญต่อ soluble fractions ของโปรตีน หากเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสจะทำให้เกิด inclusion bodies ได้ง่าย และเมื่อลดอุณหภูมิหลังจากกระตุ้นเซลล์แบคทีเรียลงพบว่าปริมาณ soluble fractions เพิ่มขึ้น [86] นอกจากนี้มีรายงานว่า การลดความเข้มข้นของตัวกระตุ้นสามารถทำให้ได้ผลผลิต soluble fractions เพิ่มขึ้นเช่นกัน [87, 88]

และสอดคล้องกับงานวิจัยหลายๆ แห่งที่เลือกใช้การลดอุณหภูมิและความเข้มข้นของ IPTG ในการแก้ปัญหาการจับกลุ่มของโปรตีนลูกผสม (recombinant proteins) และช่วยเพิ่มผลผลิตโปรตีนมากขึ้นด้วย [89-92]

ผลการสกัดโปรตีน apo-c-PC(β) ซึ่งสามารถสกัดได้จากวิธี IMAC เพียงแค่ขั้นตอนเดียว พบว่าผลผลิตโปรตีน apo-c-PC(β) ที่ได้มีความบริสุทธิ์มาก แต่การสกัด native c-PC จาก *S. platensis* จะต้องสกัดด้วยสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกสกัดด้วยวิธี ammonium sulphate precipitation และขั้นตอนที่สองสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ion-exchange chromatography พบว่าผลผลิตโปรตีน native c-PC ที่ได้จากการสกัดนั้นมีความบริสุทธิ์ แต่ขั้นตอนการสกัดค่อนข้างยุ่งยากและต้องใช้ความละเอียดพิถีพิถันในการสกัดทุกขั้นตอน เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มากและใกล้เคียงกันทุกครั้งที่สกัด ส่วนการสกัดโปรตีน apo-c-PC(β) ซึ่งมี hexahistidine tag โดยนิยมมาใช้สำหรับเป็น affinity tag เนื่องจากเป็นสายเพปไทด์มีขนาดเล็กจึงไม่รบกวนการพับตัวและประสิทธิภาพของโปรตีน และที่สำคัญ hexahistidine tag ซึ่งเชื่อมติดอยู่กับตำแหน่ง N-terminus ของสายเพปไทด์ apo-c-PC(β) นั้นมีความจำเพาะสูงกับ Nickel resin [93] จึงทำให้สกัด apo-c-PC(β) ด้วยวิธี IMAC เพียงขั้นตอนเดียวได้ผลผลิตโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากสูญเสียโปรตีนระหว่างการสกัดน้อย นอกจากนี้ขั้นตอนการสกัดไม่ยุ่งยาก สะดวก รวดเร็ว จึงลดความเสี่ยงต่อการเกิดโปรตีนเสียสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Liu และคณะพบว่า hexahistidine tag ช่วยให้การสกัด recombinant proteins ง่ายและสะดวก และไม่รบกวนคุณสมบัติการเรืองแสงของโปรตีน [74] งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการผลิต holo-c-PC(α) โดยใช้ hexahistidine tag ร่วมกับ maltose-binding protein tag (MBP) ซึ่ง MBP เป็นเพปไทด์ที่มีขนาด 1,200 bp หรือ 400 amino acids หรือมีมวลโมเลกุลประมาณ 42.5 kDa จัดเป็นเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ขั้นตอนสกัดจึงยุ่งยากหลายขั้นตอน [74] นอกจากนี้มีรายงานการผลิต apo-c-PC(β) โดยเชื่อมต่อกับ GST fusion protein ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่มีขนาด 660 bp หรือประมาณ 220 amino acids หรือมีมวลโมเลกุลประมาณ 26 kDa พบว่าต้องสกัด recombinant proteins ด้วยสองขั้นตอน คือ glutathione agarose column และ Sephadex 200 gel filtration column ตามลำดับ ขั้นตอนการสกัดจึงซับซ้อนยุ่งยากจึงทำให้ใช้เวลานานในการสกัดให้ได้โปรตีนที่ต้องการในปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูง [60]

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ apo-c-PC(β) และ native c-PC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay โดยพบว่า apo-c-PC(β)

สามารถฟอกสี ABTS solution ได้ ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง กล่าวคือ apo-c-PC(β) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจากผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าไม่เพียงแต่ bilins เท่านั้นที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ apo-c-PC(β) ก็มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระได้เช่นกัน แต่มีประสิทธิภพนั้นน้อยกว่า native c-PC ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า bilins เป็นส่วนประกอบหลักในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ [94] และมีรายงานว่าส่วนของ apo-biliproteins ก็มีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน [29, 95] นอกจากนี้ Atmaca รายงานว่ากรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ [96] โดยผลงานวิจัยก่อนหน้านี้แนะนำเสนอว่ากรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) และกรดอะมิโนเมทไทโอนีน (methionine) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออยู่ที่ตำแหน่งผิวของโปรตีน (protein surface) มีบทบาทสำคัญในการป้องกัน oxidative damage [97, 98] ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ apo-c-PC(β) อาจมาจากกรดอะมิโนทั้งสอง นั่นคือ กรดอะมิโนซิสเทอีน และ กรดอะมิโนเมทไทโอนีน โดยในลำดับเบสมีจำนวน 6 และ 4 ตัว ตามลำดับ

ส่วนผลการศึกษาประสิทธิภาพการปกป้องเม็ดเลือดแดงของ apo-c-PC(β) และ native c-PC ในสภาวะ oxidative stress จาก peroxy radicals ที่ได้จาก AAPH ซึ่งอัตราการเกิด radicals จะคงที่หรือไม่ขึ้นขึ้นกับอุณหภูมิและความเข้มข้นของ AAPH ในระหว่างการทำปฏิกิริยา [99] โดยกลไกการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วย AAPH นั้นเกิดจาก 2 กลไกด้วยกันคือ lipid peroxidation และ band 3 protein oxidation [100] ผลการศึกษาระดับเม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดง EE เมื่ออยู่ในสภาวะที่มี apo-c-PC(β), native c-PC หรือ Trolox นั้น สรุปได้ว่า apo-c-PC(β) สามารถช่วยเม็ดเลือดแดงต่อต้าน oxidative damage ได้ แต่ฤทธิ์ในการต่อต้านยังคงน้อยกว่า native c-PC จากผลการทดสอบพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสามชนิดสามารถปกป้องเซลล์เม็ดเลือดแดง EE ได้มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินสามารถชดเชยระดับของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ ถึงแม้ว่าฮีโมโกลบินจะเกิด oxidative damage ได้ง่ายและเซลล์เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chakraborty และคณะได้ทำการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย β E-thalassemia กล่าวว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมีปริมาณเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูงกว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนปกติ [101]

จากผลการศึกษา apo-c-PC(β) และ native c-PC สามารถช่วยรักษารูปร่างเม็ดเลือดแดง EE จากการถูกทำลายด้วย H_2O_2 พบว่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง EE ที่มีรูปร่างผิดปกติลดลง

ชัดเจนเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโปรตีน apo-c-PC(β) หรือ native c-PC ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบด้วย Trolox ซึ่งเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่สามารถช่วยรักษารูปร่างเม็ดเลือดแดงได้เช่นกัน ดังนั้นจากผลการศึกษาเมื่อจัดอันดับความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระพบว่า native c-PC >> Trolox > apo-c-PC(β)

โดยปกติเม็ดเลือดแดงมีระบบการกำจัด ROS ด้วยตัวเอง แต่อย่างไรก็ตามในเงื่อนไขบางอย่างเช่น thalassemia และ haemoglobinopathies เมื่อระบบสมดุลถูกรบกวนเป็นผลทำให้เกิด oxidative stress และมีรายงานว่าฮีโมโกลบินอีเป็นฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียรและไวต่ออนุมูลอิสระมาก [102, 103] Lachant *et al.* ได้กล่าวว่า เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินอีมีประสิทธิภาพของ pentose phosphate shunt ลดลง จึงนำไปสู่การเกิดภาวะ oxidative stress และการเกิด lipid peroxidation ได้ง่าย [103] นอกจากนี้ Datta *et al.* ได้รายงานว่าปริมาณขอบเขตของความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อถูกทำลายด้วย H_2O_2 มีความสัมพันธ์กับระดับฮีโมโกลบินอีในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยในกลุ่ม β / E-thalassemia [104] นอกจากนี้มีงานวิจัยจากหลายๆแห่งรายงานว่าในการรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมียด้วยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยลดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [105] เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระสามารถ neutralize อนุมูลอิสระซึ่งเป็นอันตรายกับเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ ทั้งยังช่วยปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์และต่อเวลาวงจรชีวิตของเซลล์เม็ดเลือดแดงให้ยาวนานขึ้น และสามารถช่วยให้ผู้ป่วยธาลัสซีเมียกลุ่มที่มีอาการไม่รุนแรงมากมีภาวะโลหิตจางน้อยลงได้อีกด้วย [41]

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการผลิต apo-c-PC(β) ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ทำได้ด้วยขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากและใช้ต้นทุนในการผลิตน้อย และได้ผลผลิตโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยโปรตีนที่ผลิตได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ peroxy และ hydroxyl radicals ได้ โดยที่ hexahistidine tag ในสายเพปไทด์ไม่รบกวนการพับตัวของโปรตีนและไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนดังกล่าว จึงทำให้ apo-c-PC(β) สามารถปกป้องเซลล์เม็ดเลือดแดงจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ แต่ยังคงมีฤทธิ์น้อยกว่า native c-PC เนื่องจาก apo-c-PC(β) ไม่มี bilins เป็นองค์ประกอบ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยคาดว่าสามารถพัฒนาต่อยอด apo-c-PC(β) ให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่มากขึ้นด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมได้ต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของ apo-c-PC(β) ผลการทดสอบได้แสดงให้เห็นชัดเจนว่าถึงแม้ apo-c-PC(β) นั้นจะไม่มี bilins เป็นองค์ประกอบ แต่ apo-c-PC(β) นั้นมีประสิทธิภาพในการปกป้องเม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบิน E เมื่ออยู่ในสภาวะ oxidative stress ได้ แต่ประสิทธิภาพในการป้องกันของ apo-c-PC(β) นั้นยังไม่มากพอเมื่อเทียบกับ native c-PC แต่อย่างไรก็ตาม apo-c-PC(β) ยังสามารถศึกษาและพัฒนาต่อยอดโดยใช้เทคนิคดัดแปลงพันธุกรรมจากการทำ gene mutation เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนดังกล่าว และสามารถนำมาใช้เสริมฤทธิ์การรักษาผู้ป่วยในกลุ่มโรคที่มีพยาธิสภาพเกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative damage เนื่องจาก apo-c-PC(β) เป็นสายเพปไทด์ที่มีขนาดเล็ก หากนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อเสริมฤทธิ์การรักษาภาวะ oxidative stress โดยการรับประทานอาจสามารถทำได้ เนื่องจากสายเพปไทด์เมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารจะถูกย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร จึงทำให้โปรตีนไม่สามารถออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ได้ แต่สามารถนำเข้าสู่ร่างกายได้โดยการฉีดเข้าสู่ร่างกาย แต่ยังคงมีผลข้างเคียงจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย คนต่อโปรตีนของแบคทีเรียโดยอาจพัฒนาเทคนิคการเคลือบ epitope ของโปรตีนดังกล่าวด้วยสารบางชนิดเพื่อป้องกันการเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ apo-c-PC(β) ที่ผ่านการพัฒนาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจนำมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เสริมความงามชนิดต่าง ๆ ได้โดยพัฒนาด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมให้โปรตีนมีความจำเพาะกับเซลล์ สามารถดูดซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ เพื่อทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระและชะลอการแก่ก่อนวัยได้ และที่สำคัญต้องทำการศึกษาโปรตีนดังกล่าวในสัตว์ทดลองก่อนนำมาทดสอบในคนต่อไป

รายการอ้างอิง

- [1]Aruoma, O.I., Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75, 2 (1998) : 199-212.
- [2]Adly, A.A.M., Oxidative stress and disease: An updated review. Research Journal of Immunology. 3, 2 (2010) : 129-45.
- [3]Galli, F., et al., Oxidative stress and reactive oxygen species. Contributions to Nephrology. 149 (2005) : 240-260.
- [4]Meral, A., et al., Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. Pediatr Hematol Oncol. 17, 8 (2000) : 687-93.
- [5]Niki, E., et al., Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. Journal of Biological Chemistry. 263, 36 (1988) : 19809-19814.
- [6]Banerjee, A., et al., Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. Chemico-Biological Interactions. 174, 2 (2008) : 134-139.
- [7]Kunwar, A., et al., 3, 3'-diselenodipropionic acid, an efficient peroxy radical scavenger and a GPx mimic, protects erythrocytes (RBCs) from AAPH-induced hemolysis. Chemical Research in Toxicology. 20, 10 (2007) : 1482-1487.
- [8]Fucharoen, S. and P. Winichagoon, Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin. 11, 1(1987) : 65-88.
- [9]Pearson, H.A., R.T. O'Brien, and S. McIntosh, Screening for thalassemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume. New England Journal of Medicine. 288, 7 (1973) : 351-353.
- [10]Schrier, S.L., Pathophysiology of thalassemia. Current Opinion in Hematology. 9, 2 (2002) : 123-126.

- [11]Scott, M., et al., Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. Journal of Clinical Investigation. 91, 4 (1993) : 1706.
- [12]Riss, J., et al., Phycobiliprotein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. J Agric Food Chem. 55, 19 (2007) : 7962-7967.
- [13]Ravi, M., et al., The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. Nutrition and Dietary Supplements. 2 (2010) : 73-83.
- [14]McCarty, M.F., Clinical potential of *Spirulina* as a source of phycocyanobilin. J Med Food. 10, 4 (2007) : 566-570.
- [15]Niu, J.F., et al., Large-scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 850, 1-2 (2007) : 267-276.
- [16]Belay, A., et al., Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. Journal of Applied Phycology. 5, 2 (1993) : 235-241.
- [17]Huang, Z., et al., Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. Food Chemistry. 100, 3 (2007) : 1137-1143.
- [18]Glazer, A.N., Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics. 768, 1 (1984) : 29-51.
- [19]Benedetti, S., et al., Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. Life Sci. 75, 19 (2004) : 2353-2362.

- [20]Bhat, V.B. and K.M. Madyastha, C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. Biochemical and Biophysical Research Communications. 275, 1 (2000) : 20-25.
- [21]Patel, A., S. Mishra, and P.K. Ghosh, Antioxidant potential of C-phycoyanin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. Indian J Biochem Biophys. 43, 1 (2006) : 25-31.
- [22]Romay, C., et al., C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. Curr Protein Pept Sci. 4, 3 (2003) : 207-216.
- [23]Fukui, K., et al., Relationship between color development and protein conformation in the phycoyanin molecule. Dyes and Pigments. 63, 1 (2004) : 89-94.
- [24]Benedetti, S., et al., Oxygen radical absorbance capacity of phycoyanin and phycoyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. J Med Food. 13,1 (2010) : 223-227.
- [25]Lu, W., P. Yu, and J. Li, Induction of apoptosis in human colon carcinoma COLO 205 cells by the recombinant alpha subunit of C-phycoyanin. Biotechnol Lett. 33, 3 (2010) : 637-644.
- [26]Gonzalez, R., et al., Anti-inflammatory activity of phycoyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. Pharmacological research. 39, 1 (1999) : 55-59.
- [27]Hsiao, G., et al., C-phycoyanin, a very potent and novel platelet aggregation inhibitor from *Spirulina platensis*. J Agric Food Chem. 53, 20 (2005) : 7734-7740.
- [28]Shih, C.M., et al., Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycoyanin. Anesth Analg. 108, 4 (2009) : 1303-1310.

- [29]Guan, X., et al., A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant alpha-phycoerythrin of *Spirulina*. Journal of Applied Microbiology. 106, 4 (2009) : 1093-1100.
- [30]Tooley, A.J., Y.A. Cai, and A.N. Glazer, Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoerythrin holo-alpha subunit in a heterologous host. Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 19 (2001) : 10560-10565.
- [31]Desouky, O., et al., Biophysical Characterization of beta -Thalassemic Red Blood Cells. Cell Biochemistry and Biophysics. 55, 1 (2009) : 45-53.
- [32]Galanello, R. and A. Cao, Alpha-thalassemia. Genetics in Medicine. 13, 2 (2011) : 83-88.
- [33]Rund, D. and E. Rachmilewitz, beta-Thalassemia. New England Journal of Medicine. 353, 11 (2005) : 1135-1146.
- [34]Higgs, D.R., J.D. Engel, and G. Stamatoyannopoulos, Thalassemia. The Lancet. 379, 9813 (2012) : 373-383.
- [35]Fucharoen, S. and D.J. Weatherall, The hemoglobin E thalassemias. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2, 8 (2012).
- [36]Cohen, A.R., et al., Thalassemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. (2004) : 14-34.
- [37]Vichinsky, E., Hemoglobin e syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. (2007) : 79-83.
- [38]Bachir, D. and F. Galacteros, Hemoglobin E. Orphanet Encyclopedia. (2004)
- [39]Fibach, E. and E.A. Rachmilewitz, The role of antioxidants and iron chelators in the treatment of oxidative stress in thalassemia. Annals of the New York Academy of Sciences. 1202, 1 (2010) : 10-16.

- [40]Rachmilewitz, E.A., et al., Role of Iron in Inducing Oxidative Stress in Thalassemia: Can It Be Prevented by Inhibition of Absorption and by Antioxidants?. Blackwell Publishing Ltd. (2005) : 118-123.
- [41]Rund, D. and E. Rachmilewitz. Pathophysiology of alpha-and beta-thalassemia: Therapeutic implications. in Seminars in hematology. (2001).
- [42]Fucharoen, S. and P. Winichagoon, Haemoglobinopathies in southeast Asia. The Indian Journal of Medical Researc., 134, 4 (2011) : 498.
- [43]Garrido, N., et al., Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. Asian journal of andrology. 6, 1 (2004) : 59-66.
- [44]Galli, F., et al., Oxidative stress and reactive oxygen species. Contrib Nephrol. 149 (2005) : 240-260.
- [45]Nicholls, D.G. and S.L. Budd, Mitochondria and neuronal survival. Physiological Reviews. 80, 1 (2000) : 315-360.
- [46]Cadenas, E. and K. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free radical biology & medicine. 29, 3-4 (2000) : 222.
- [47]Valko, M., et al., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions. 160, 1 (2006) : 1-40.
- [48]Birben, E., et al., Oxidative stress and antioxidant defense. The World Allergy Organization journal. 5, 1 (2012) : 9.
- [49]Hseu, Y.-C., et al., Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. Life Sciences. 71, 4 (2002) : 469-482.

- [50]Marouf, B.H., et al., Free radical scavenging activity of silibinin in nitrite-induced hemoglobin oxidation and membrane fragility models. Saudi Pharmaceutical Journal. 19, 3 (2011) : 177-183.
- [51]Kanias, T. and J.P. Acker, Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation. FEBS Journal. 277, 2 (2009) : 343-356.
- [52]Glazer, A.N., Phycobilisomes: structure and dynamics. Annu Rev Microbiol. 36 (1982) : 173-198.
- [53]Padyana, A.K., et al., Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. Biochem Biophys Res Commun. 282, 4 (2001) : 893-898.
- [54]MacColl, R., Cyanobacterial phycobilisomes. J Struct Biol. 124, 2-3 (1998) : 311-334.
- [55]Troxler, R.F., et al., Nucleotide Sequence and Expression of the Genes for the [alpha] and [beta] Subunits of Phycocyanin in *Cyanidium caldarium*. Plant physiology. 107, 3 (1995) : 985.
- [56]Ge, B., et al., Scale-up of fermentation and purification of recombinant allophycoyanin over-expressed in *Escherichia coli*. Process Biochemistry. 40, 10 (2005) : 3190-3195.
- [57]Sun, L., S. Wang, and Z. Qiao, Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. J Biotechnol, 121, 4 (2006) : 563-569.
- [58]Grossman, A.R., et al., The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. Microbiol Rev. 57, 3 (1993) : 725-749.

- [59]Wang, X.Q., et al., Structure of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* at 2.2 Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 57, Pt 6 (2001) : 784-792.
- [60]Wang, H., et al., The recombinant beta subunit of C-phycoyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. Cancer Lett. 247, 1 (2007) : 150-158.
- [61]Silveira, S.T., et al., Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. Bioprocess Biosyst Eng. 31, 5 (2008) : 477-482.
- [62]Zhu, Y., et al., A simple method for extracting C-phycoyanin from *Spirulina platensis* using *Klebsiella pneumoniae*. Appl Microbiol Biotechnol. 74, 1 (2007) : 244-248.
- [63]Boussiba, S. and A.E. Richmond, Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. Archives of Microbiology. 120, 2 (1979) : 155-159.
- [64]Sabarinathan, K.G. and G. Ganesan, Antibacterial and toxicity evaluation of C-phycoyanin and cell extract of filamentous freshwater cyanobacterium-*Westiellopsis* sps. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 12, 2 (2008) : 79-82.
- [65]Chiu, H.F., et al., Mechanisms involved in the antiplatelet effect of C-phycoyanin. Br J Nutr. 95, 2 (2006) : 435-40.
- [66]Madhyastha, H.K., et al., Purification of c-phycoyanin from *Spirulina fusiformis* and its effect on the induction of urokinase-type plasminogen activator from calf pulmonary endothelial cells. Phytomedicine. 13, 8 (2006) : 564-569.
- [67]Li, B., et al., Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoyanin. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 42, 1 (2010) : 80-89.

- [68]He, J.A., Y.Z. Hu, and L.J. Jiang, Photochemistry of phycobiliproteins: first observation of reactive oxygen species generated from phycobiliproteins on photosensitization. Journal of the American Chemical Society. 118, 37 (1996) : 8957-8958.
- [69]Zhang, S., et al., Electron spin resonance studies on photosensitized formation of hydroxyl radical by C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1426, 1 (1999) : 205-211.
- [70]Lind, L.K., et al., Cloning of the β -phycocyanin gene from *Anacystis nidulans*. FEBS letters. 188, 1 (1985) : 27-32.
- [71]Eriksen, N.T., Production of phycocyanin--a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. Appl Microbiol Biotechnol. 80, 1 (2008) : 1-14.
- [72]Cai, Y.A., et al., Recombinant Phycobiliproteins I : Recombinant C-Phycocyanins Equipped with Affinity Tags, Oligomerization, and Biospecific Recognition Domains. Analytical Biochemistry. 290, 2 (2001) : 186-204.
- [73]Guan, X., et al., Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo-alpha-phycocyanin in *Escherichia coli* by using one expression vector. Applied Biochemistry and Biotechnology. 142, 1 (2007) : 52-59.
- [74]Liu, S., et al., Highly soluble and stable recombinant holo-phycocyanin alpha subunit expressed in *Escherichia coli*. Biochemical Engineering Journal. 48, 1 (2009) : 58-64.
- [75]Guan, X., et al., Combinational biosynthesis and characterization of a fluorescent 82 β -phycocyanin of *Spirulina platensis*. Chinese Science Bulletin. 57, 25 (2012) : 3294-3299.

- [76] Taylor, R.G., D.C. Walker, and R. McInnes, E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. Nucleic acids research. 21, 7 (1993) : 1677.
- [77] De Togni, P., et al., Plasmids in bacteria exposed to activated neutrophils mediate mutagenesis when transferred to new hosts. Blood. 71, 2 (1988) : 463-466.
- [78] Kawashima, H., et al., Functional domains of Escherichia coli recA protein deduced from the mutational sites in the gene. Mol Gen Genet. 193, 2 (1984) : 288-292.
- [79] Durfee, T., et al., The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. J Bacteriol. 190, 7 (2008) : 2597-2606.
- [80] Studier, F.W. and B.A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. Journal of molecular biology. 189, 1 (1986) : 113-130.
- [81] Zor, T. and Z. Selinger, Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Analytical biochemistry. 236, 2 (1996) : 302-308.
- [82] Gambetta, G.A. and J.C. Lagarias, Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98, 19 (2001) : 10566-10571.
- [83] Yang, Y., et al., Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo-alpha-allophycocyanin in Escherichia coli. Biotechnol Lett. 30, 6 (2008) : 1001-1004.
- [84] Zhao, K.H., et al., Chromophore Attachment to Phycobiliprotein beta-Subunits. Journal of Biological Chemistry. 281, 13 (2006) : 8573-8581.

- [85]Gnoth, S., R. Simutis, and A. Lübbert, Selective expression of the soluble product fraction in *Escherichia coli* cultures employed in recombinant protein production processes. Applied microbiology and biotechnology. 87, 6 (2010) : 2047-2058.
- [86]Berwal, R., et al., *Plasmodium falciparum*: Enhanced soluble expression, purification and biochemical characterization of lactate dehydrogenase. *Experimental parasitology*, 120, 2 (2008) : 135-141.
- [87]Weickert, M.J., et al., Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. Current opinion in biotechnology. 7, 5 (1996) : 494.
- [88]Heo, M., et al., Functional expression of single-chain variable fragment antibody against c-Met in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Protein expression and purification. 47, 1 (2006) : 203-209.
- [89]Schein, C.H. and M.H. Notetborn, Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. Nature Biotechnology. 6, 3 (1988) : 291-294.
- [90]Schein, C.H., Production of soluble recombinant proteins in bacteria. Nature Biotechnolog. 7, 11 (1989) : 1141-1149.
- [91]Weickert, M.J., et al., Stabilization of apoglobin by low temperature increases yield of soluble recombinant hemoglobin in *Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology. 63, 11 (1997) : 4313-4320.
- [92]Gauci, C., C. Jayashi, and M.W. Lightowlers, Vaccine development against the *Taenia solium* parasite: The role of recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Bioengineered. 4, 3 (2012) : 16-17.
- [93]Lindner, P., et al., Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* using IMAC and histidine tails: A comparison of proteins and protocols. Methods. 4, 1 (1992) : 41-56.

- [94]Bhat, V.B. and K. Madyastha, Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA. Biochemical and Biophysical Research Communications. 285, 2 (2001) : 262-266.
- [95]Ge, B., et al., Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in *Escherichia coli*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 84, 3 (2006) : 175-180.
- [96]Atmaca, G., Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. Yonsei Medical Journal. 45, 5 (2004) : 776-788.
- [97]Levine, R.L., et al., Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. Mechanisms of Ageing and Development. 107, 3 (1999) : 323-332.
- [98]Requejo, R., et al., Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. FEBS Journal. 277, 6 (2010) : 1465-1480.
- [99]Miki, M., et al., Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by alpha-tocopherol. Archives of Biochemistry and Biophysics. 258, 2 (1987) : 373-380.
- [100]Sato, Y., et al., Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-soluble radical initiator. Biochemistry. 34, 28 (1995) : 8940-8949.
- [101]Chakraborty, D. and M. Bhattacharyya, Antioxidant defense status of red blood cells of patients with β -thalassemia and E β -thalassemia. Clinica chimica acta. 305, 1 (2001) : 123-129.

- [102]Lachant, N.A. and K.R. Tanaka, Impaired antioxidant defense in hemoglobin E-containing erythrocytes: A mechanism protective against malaria? American Journal of Hematology. 26, 3 (1987) : 211-219.
- [103]Rees, D., et al., The hemoglobin E syndromes. Annals of the New York Academy of Sciences. 850, 1 (2006) : 334-343.
- [104]Datta, P., et al., Enhanced oxidative cross-linking of hemoglobin E with spectrin and loss of erythrocyte membrane asymmetry in hemoglobin E/ β -thalassemia. Blood Cells Molecules and Diseases. 37, 2 (2006) : 77-81.
- [105]Attia, A., et al., Effects of antioxidant vitamins on some hemoglobin properties and erythrocytes in homozygous betathalassemia. Romanian Journal of Biophysics. 21 (2011) : 1-16.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ 1 : แสดงปริมาณโปรตีน fractions ต่างๆที่สกัดได้จากเซลล์ BL21/pETD/cpcB เมื่อสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี IMAC และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay

Steps	Protein (mg/ml)	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total yield (%)
Total protein	1.3608	40	54.432	100
Soluble protein	1.2620	40	50.48	92.74
Flow through	0.9180	35	32.13	59.03
20 mM imidazole elution	0.6476	10	6.476	11.90
40 mM imidazole elution	0.2209	10	2.209	4.06
100 mM imidazole elution	0.0897	5	0.4485	0.82
400 mM imidazole elution	0.6817	6	4.0902	7.51
rH6CpcB dialysis	0.1847	6	1.1082	2.04
rH6CpcB concentration	1.0334	0.3	0.31002	0.57

ตารางที่ 2 : แสดงปริมาณโปรตีน fractions ต่างๆที่สกัดได้จากสหาย *S. platensis* เมื่อสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ammonium sulphate precipitation และ ion-exchange chromatography และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay

Steps	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein	Purity (A620/A280)	CPC (mg)	Total yield (%)
Lysate	200	1.498	299.6	0.86	289.6	100
30% (NH ₄) ₂ SO ₄ supernatant	200	0.908	181.6	0.88	136.0	47
50% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitant	10	13.813	138.1	1.81	83.7	29
Ion exchange chromatography	17.5	3.500	61.3	4.00	44.3	15

ตารางที่ 3 : แสดง % hemolysis (ค่าการแตกของเม็ดเลือดแดง) ของเม็ดเลือดแดงปกติเมื่อทดสอบกับ AAPH ที่ถูกยับยั้งด้วย apo-c-PC(β), native c-PC หรือ Trolox ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

Normal erythrocytes treatment	% hemolysis (mean \pm SEM) เมื่อได้รับสารยับยั้งที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ		
	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M
apo-c-PC(β)	43.14 \pm 0.40*	29.89 \pm 0.42**	15.47 \pm 0.66**
native c-PC	16.51 \pm 1.17**	11.29 \pm 0.97**	3.22 \pm 0.12**
Trolox	38.91 \pm 1.93*	17.78 \pm 0.90**	11.37 \pm 1.13**
ตัวกระตุ้น AAPH	66.19 \pm 2.28		

ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ได้รับสารกระตุ้น AAPH เพียงอย่างเดียว (positive control)

ตารางที่ 4 : แสดง % hemolysis (ค่าการแตกของเม็ดเลือดแดง) ของเม็ดเลือดแดง EE เมื่อทดสอบกับ AAPH ที่ถูกยับยั้งด้วย apo-c-PC(β), native c-PC หรือ Trolox ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

EE Erythrocytes treatment	% hemolysis (mean \pm SEM) เมื่อได้รับสารยับยั้งที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ		
	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M
apo-c-PC(β)	32.06 \pm 6.05*	26.78 \pm 4.04**	16.80 \pm 1.88**
native c-PC	13.91 \pm 3.54**	6.83 \pm 0.88**	1.24 \pm 0.15**
Trolox	17.17 \pm 2.20**	11.48 \pm 1.68**	9.77 \pm 0.94**
ตัวกระตุ้น AAPH	68.10 \pm 0.41		

ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ได้รับสารกระตุ้น AAPH เพียงอย่างเดียว (positive control)

ตารางที่ 5 : แสดง % inhibition (ค่าการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง) ของเม็ดเลือดแดงปกติ เมื่อทดสอบกับ AAPH ที่ถูกยับยั้งด้วย apo-c-PC(β), native c-PC หรือ Trolox ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

Normal erythrocytes treatment	% inhibition (mean \pm SEM) เมื่อได้รับสารยับยั้งที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ		
	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M
apo-c-PC(β)	34.83 \pm 0.60 a	54.84 \pm 0.63 b	76.63 \pm 0.99 c
native c-PC	75.05 \pm 1.77 a	82.95 \pm 1.47 b	95.13 \pm 0.17 c
Trolox	41.21 \pm 2.91 a	73.14 \pm 1.36 b	82.82 \pm 1.70 c

ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

a, b, หรือ c = ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ได้รับสารกระตุ้น AAPH เพียงอย่างเดียว (positive control)

ตารางที่ 6 : แสดง % inhibition (ค่าการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง) ของเม็ดเลือดแดง EE เมื่อทดสอบกับ AAPH ที่ถูกยับยั้งด้วย apo-c-PC(β), native c-PC หรือ Trolox ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

EE erythrocytes treatment	% inhibition (mean \pm SEM) เมื่อได้รับสารยับยั้งที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ		
	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M
apo-c-PC(β)	52.92 \pm 8.89 a	60.67 \pm 5.93 a	75.32 \pm 2.76 a
native c-PC	79.57 \pm 5.20 a	89.98 \pm 1.30 ab	98.18 \pm 0.23 c
Trolox	74.79 \pm 3.23 a	83.14 \pm 2.47 ab	85.65 \pm 1.37 c

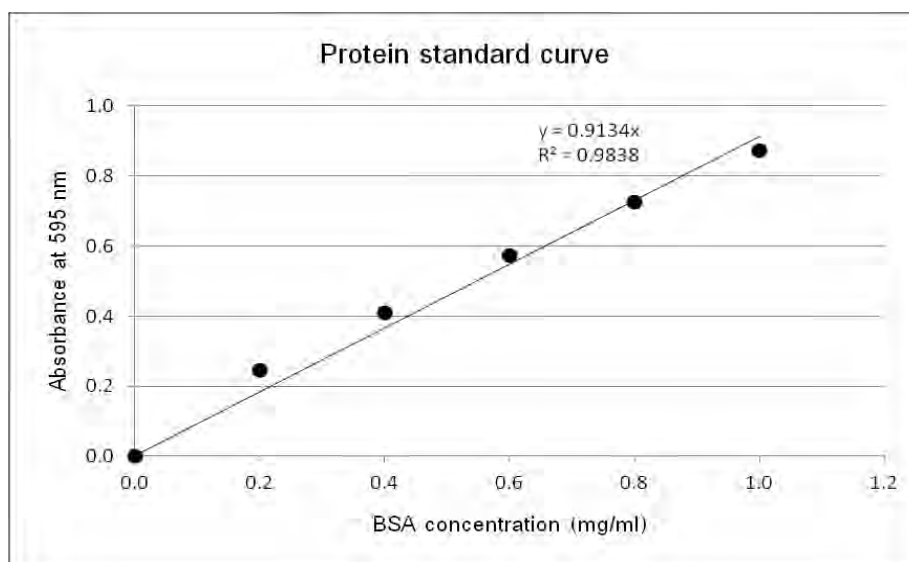
ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

a, b, หรือ c = ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ได้รับสารกระตุ้น AAPH เพียงอย่างเดียว (positive control)

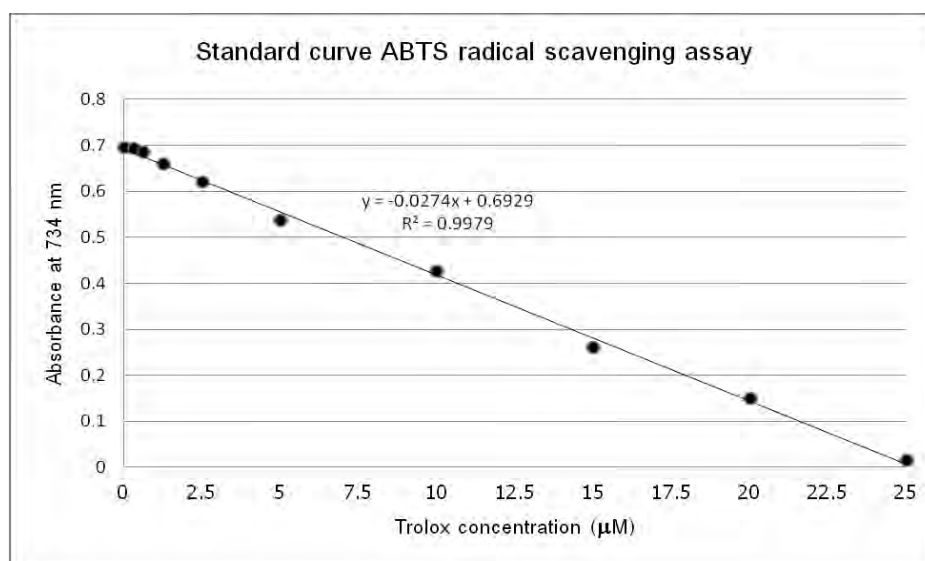
กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณ

1. กราฟมาตรฐานของโปรตีนจากการทดสอบ ด้วยวิธี Bradford protein assay (BSA) ของสารมาตรฐาน bovine serum albumin



ทำการทดสอบสารมาตรฐานทุกครั้งควบคู่ไปกับการตรวจวัดโปรตีนในสารตัวอย่าง

2. กราฟมาตรฐานจากการทดสอบด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay ของสารมาตรฐาน Trolox



ทำการทดสอบสารมาตรฐานทุกครั้งควบคู่ไปกับการตรวจวัดค่าสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง

ภาคผนวก ข
น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. อาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย

1.1 LB-Amp broth 1,000 ml

- | | | |
|--------------------|----|---|
| - LB miller powder | 25 | g |
|--------------------|----|---|

ละลายในน้ำกลั่นและปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml แบ่งใส่หลอดทดลองหรือ flask นำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำภายใต้แรงดันด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่แรงดัน 200 kPa เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 LB-Amp agar 1,000 ml

- | | | |
|-------------------------|----|---|
| - LB miller powder | 25 | g |
| - Bacterial agar powder | 15 | g |

ละลายในน้ำกลั่นและปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำภายใต้แรงดันด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่แรงดัน 200 kPa เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสแล้วเติม 100 mg/ml Ampicillin 1,000 μ l เกลลงใน petri dish ทิ้งให้ agar แข็งตัว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Buffer solution

2.1 50X TAE buffer 1,000 ml; สำหรับ agarose gel electrophoresis

- | | | |
|-----------------------|------|----|
| - Tris base | 242 | g |
| - Glacial acetic acid | 57.1 | ml |
| - 0.5 M EDTA pH 8.8 | 100 | ml |

เติม Milli-Q water แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 8.8 และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml

2.2 1 M Phosphate buffer, pH 7.4; สำหรับขั้นตอนการสกัด native c-PC

- 1 M Na_2HPO_4	77.4	ml
- 1 M NaH_2PO_4	22.6	ml

นำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำภายใต้แรงดันด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่แรงดัน 200 kPa เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.3 0.5 M Tris-HCl buffer 1,000 ml; สำหรับการสกัด native c-PC

- Tris-HCl	78.78	g
------------	-------	---

เติม Milli-Q water ปรับ pH 7.4 แล้วเติมน้ำจนครบ 1,000 ml

2.4 10X Phosphate buffered saline สูตร(1) 1,000 ml

- Na_2HPO_4	70.98	g
- NaCl	175.32	g

เติม Milli-Q water แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.4 และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml
นำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำภายใต้แรงดันด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่แรงดัน 200 kPa เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.5 50 mM PMSF 2 ml

- PMSF	0.0174	g
- Isopropanal	2	ml

เตรียมสารละลายแล้วใช้ทันที

2.6 Phosphate buffered saline สูตร(2) 1,000 ml; สำหรับการทดสอบ ABTS radical scavenging radical assay

- KH_2PO_4	69.4	mg
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	783.57	mg
- NaCl	8.78	mg

เติม Milli-Q water แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.4 และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml

2.7 Phosphate buffered saline สูตร(3) 1,000 ml; สำหรับการทดสอบ AAPH hemolysis test

- Na_2HPO_4 3.83 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16.97 g
- NaCl 7.19 g

เติม Milli-Q water แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.4 และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml

2.8 10X SDS electrophoresis buffer; สำหรับ SDS-PAGE

- Tris-base 30.25 g
- Glycine 144.1 g
- SDS 10 g

เติม Milli-Q water แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 8.8 และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml

2.9 10X Leammli loading buffer; สำหรับ SDS-PAGE

- 2 M Tris-HCl pH 6.8 0.3 ml
- Glycerol 2.5 ml
- 20% SDS 10 ml
- β -mercaptoethanol 0.5 ml
- Bromophenol blue 0.01 g
- Milli-Q water 0.7 ml

3. gel

3.1 1.0% agarose gel 100 ml; สำหรับ agarose gel electrophoresis

- Agarose powder 1.0 g
- 1X TAE buffer 100 ml

ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้า microwave เป็นเวลา 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเทในแบบพิมพ์

ถัดเจด

3.2 12% Separating gel ; สำหรับ SDS-PAGE

- Milli-Q water	2.24	ml
- 30% Acrylamide mix	2.80	ml
- 1.5 M Tris pH 8.8	1.82	ml
- 10% SDS	0.07	ml
- 10% APS (ammonium persulfate)*	0.07	ml
- TEMED*	0.0028	ml

* เติมสารละลายพร้อมกันเนื่องจากมีผลทำให้เจลแข็งตัว

3.3 5% Stacking gel; สำหรับ SDS-PAGE

- Milli-Q water	2.1	ml
- 30% Acrylamide mix	0.5	ml
- 0.5 M Tris pH 6.8	0.38	ml
- 10% SDS	0.03	ml
- 10% APS (ammonium persulfate)*	0.03	ml
- TEMED*	0.003	ml

* เติมสารละลายพร้อมกันเนื่องจากมีผลทำให้เจลแข็งตัว

4. 30% acrylamide mix 100 ml

- Acrylamide	29	g
- Bis-acrylamide	1	g

เติม Milli-Q water ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรทิพย์ เพลินศิลป์ เกิดเมื่อวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดสุพรรณบุรี และเข้ารับการศึกษาระดับประถมศึกษาและมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนพระแม่มาลีสาทร จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนยานนาเวศวิทยาคมในปีการศึกษา 2546 และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2551 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรโหลิตวิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 ได้รับทุนค่าลงทะเบียนเรียน และทุนอุดหนุนผู้ช่วยสอนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 17 ครั้งที่ 1/2555