

การเหนี่ยวนำการสะสมไมโครสปอริน-2-ไกลซีน ใน *Escherichia coli* DH5 α และฤทธิ์ต้าน
ออกซิเดชัน

นางสาววิภาพร ชีวินธำรงโรจน์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

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 University Graduate School.

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INDUCTION OF MYCOSPORINE-2-
GLYCINE ACCUMULATION IN *Escherichia coli* DH5 α AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

Miss Vipaporn Cheewinthamrongrod



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเหนี่ยวนำการสะสมไมโครสปอริน-2-ไกลซีน ใน
Escherichia coli DH5 α และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

โดย

นางสาววิภาพร ชีวินธำรงโรจน์

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดีถิ สิริศรัทธา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดีถิ สิริศรัทธา)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกาล ศิริสมบุญ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. โสภณ สิริศรัทธา)

วิทยานิพนธ์ : การเหนี่ยวนำการสะสมไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน ใน *Escherichia coli* DH5 α และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (INDUCTION OF MYCOSPORINE-2-GLYCINE ACCUMULATION IN *Escherichia coli* DH5 α AND ANTIOXIDANT ACTIVITY) อ.ที่
 ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา, 94 หน้า.

ไมโคสปอรีน-ไลค์ อะมิโน แอซิด (mycosporine-like amino acids, MAAs) เป็นสารกรองรังสียูวีโมเลกุลขนาดเล็ก โดย MAAs ถูกสร้างขึ้นภายใต้การปรับตัวจากผลกระทบที่ทำให้เกิดความเสียหายเนื่องมาจากรังสียูวีและความเครียดภายนอก ในงานวิจัยครั้งนี้ใช้ *Escherichia coli* DH5 α เป็นเจ้าบ้านเพื่อแสดงออกกลุ่มยีนชีวสังเคราะห์ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน (Ap3858 ถึง Ap3855) ในการศึกษาอัตราการรอดชีวิต พบว่าไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนสะสมและแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะความเครียดต่างๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์แสดงออกรอดชีวิตมากกว่าเซลล์ควบคุมภายใต้ภาวะความเครียดทั้งหมดที่ศึกษา ชีวสังเคราะห์ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนเกิดขึ้นเฉพาะภายใต้ความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีกึ่งหาปริมาณอาร์ที-พีซีอาร์ พบว่ายีน Ap3858 ถึง Ap3855 มีการแสดงที่เพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะความเครียดดังกล่าว นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์การป้องกันของไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยเทคนิค DPPH (*in vitro*) โดยไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนมีการยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า SC₅₀ เท่ากับ 22 ± 1.4 ไมโครโมลาร์ การวิเคราะห์ด้วย *in vivo* โดยใช้เซลล์ไลน์เมลานโนซัยต์ของมนุษย์ A-375 พบว่าไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนที่ความเข้มข้นต่ำสามารถปกป้องเซลล์จากภาวะความเครียดจากออกซิเดชันซึ่งเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบความเสียหายดีเอ็นเอทั้งหมด (DNA strand breaks) ในเซลล์ A-375 ด้วยการวิเคราะห์โคเมท พบว่าไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนไม่ได้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่สารพันธุกรรม ส่วนความเสียหายดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้ในเซลล์ที่มีการเติมความเข้มข้นต่ำของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อใส่ร่วมกัน แสดงให้เห็นว่าไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แรง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5672232023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: ABIOTIC STRESS / MAAS / MYCOSPORINE-2-GLYCINE / ANTIOXIDANT ACTIVITY

VIPAPORN CHEEWINTHAMRONGROD: INDUCTION OF MYCOSPORINE-2-GLYCINE ACCUMULATION IN *Escherichia coli* DH5 α AND ANTIOXIDANT ACTIVITY.
ADVISOR: ASST. PROF. RUNGAROON WADITEE-SIRISATTHA, Ph.D., 94 pp.

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are ultraviolet (UV)-absorbing small molecules. MAAs are synthesized upon the adaptation from detrimental effect of solar UV-radiation and abiotic stresses. In this study, *Escherichia coli* DH5 α expressing a cluster of genes for mycosporine-2-glycine biosynthesis (*Ap3858* to *Ap3855*) was used to assess the survival rate, mycosporine-2-glycine accumulation and gene expression under various stress conditions. It was clearly shown that expressing cells could survive much better than control cells under all condition tested. Mycosporine-2-glycine was specifically biosynthesized under NaCl and KCl stresses. Semiquantitative RT-PCR revealed that *Ap3858-3855* genes were up-regulated under these stresses. We further analyzed protective effect of mycosporine-2-glycine both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* antioxidant activity of mycosporine-2-glycine was performed by DPPH assay. Mycosporine-2-glycine exhibited a significant inhibition with SC_{50} value was 22 ± 1.4 μ M. *In vivo* assay using human melanoma A-375 cell lines showed mycosporine-2-glycine at low concentration protected the cells from oxidative stress induced by H₂O₂. Moreover, total DNA strand breaks in the A-375 cells were analyzed using a Comet assay. It was evident that mycosporine-2-glycine was not genotoxic, while obvious DNA strand breaks could be observed in the cells treated with very low concentrations of H₂O₂. Taken together, suggest that mycosporine-2-glycine has a strong antioxidant property.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2015

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรีทธา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ แก่ข้าพเจ้า รวมทั้งให้การอบรมสั่งสอน เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาช่วยแก้ไขและตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาติดา จันทร์ประทีป นภากาศ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เตชอุปกการ ศิริสมบุญ และ ดร. โสภณ สิริศรีทธา เป็นอย่างสูงที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ การอบรมสั่งสอน ซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งใน การดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย สำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่สาขาเทคโนโลยีชีวภาพและภาคจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับการอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณพี่และน้องๆในห้องวิจัย 1904/17 ทุกท่าน รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ระดับปริญญาเอกและปริญญาโท ภาคจุลชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และให้กำลังใจ ในการทำวิจัยตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ น้อง และครอบครัวของข้าพเจ้า สำหรับความรัก ความห่วงใย คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

| | |
|---------------------------------------------------------|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฅ |
| สารบัญรูปภาพ..... | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... | 3 |
| บทที่ 2 ปรัชญาบรรณกรรม | 4 |
| 2.1 ผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ตต่อสิ่งมีชีวิต | 4 |
| 2.2 กลไกการตอบสนองต่อรังสีของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก..... | 5 |
| 2.3 สารคัดกรองรังสีวิทยุชนิด MAA..... | 11 |
| 2.3.1 โครงสร้างทางเคมีและลักษณะสมบัติของ MAA..... | 11 |
| 2.3.2 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ MAA..... | 14 |
| 2.3.3 วิถีชีวสังเคราะห์ MAA | 15 |
| 2.3.4 บทบาทหน้าที่อื่นของ MAA..... | 17 |
| บทที่ 3 วิธีการทดลอง | 20 |
| 3.1 อุปกรณ์..... | 20 |
| 3.2 เคมีภัณฑ์..... | 21 |
| 3.3 เมมเบรน | 24 |
| 3.4 ชุดทดสอบสำเร็จ..... | 24 |
| 3.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะ | 24 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6 สายพันธุ์จุลินทรีย์และพลาสมิด..... | 25 |
| 3.7 วิธีดำเนินการทดลอง..... | 26 |
| 3.7.1 การเลี้ยงเซลล์และเตรียมหัวเชื้อ <i>E. coli</i> DH5 α | 26 |
| 3.7.2 การเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะ ความเครียด | 26 |
| 3.7.2.1 การเตรียมเซลล์สำหรับภาวะความเครียดจากเกลือ | 26 |
| 3.7.2.1.1 โซเดียมคลอไรด์ | 26 |
| 3.7.2.1.2 โปแตสเซียมคลอไรด์..... | 27 |
| 3.7.2.1.3 ลิเทียมคลอไรด์ | 27 |
| 3.7.2.1.4 แคลเซียมคลอไรด์..... | 27 |
| 3.7.2.2 ภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง | 27 |
| 3.7.2.3 ภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติก..... | 28 |
| 3.7.2.4 ภาวะความเครียดจากออกซิเดชัน..... | 28 |
| 3.7.3 การติดตามการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์แสดงออก | 28 |
| 3.7.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์น บลอต (Western Blot) (Sambrook และคณะ, 1989)..... | 29 |
| 3.7.4.1 การสกัดแยกโปรตีนจากตัวอย่าง | 29 |
| 3.7.4.2 การทำโซเดียมซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS- PAGE) (Laemmli, 1970) และเวสเทิร์น บลอต..... | 30 |
| 3.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณไมโครสปอริน-2-ไกลซีน..... | 31 |
| 3.7.5.1 การสกัดไมโครสปอริน-2-ไกลซีน | 31 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) | 31 |
| 3.7.6 การศึกษาระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนที่กำหนดรหัสชีวสังเคราะห์ไมโคสปอริน- 2-ไกลซีน ในเซลล์แสดงออก..... | 31 |
| 3.7.6.1 สกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนเป็นซีดีเอ็นเอของเซลล์แสดงออก..... | 31 |
| 3.7.6.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ | 32 |
| 3.7.6.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)..... | 33 |
| 3.7.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอริน-2-ไกลซีน โดยการวิเคราะห์ใน ระดับ <i>in vitro</i> และ <i>in vivo</i> | 33 |
| 3.7.7.1 การเตรียมไมโคสปอริน-2-ไกลซีน จากเซลล์แสดงออก..... | 33 |
| 3.7.7.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ในระดับ <i>in</i> <i>vitro</i> ด้วยการวิเคราะห์ดีพีพีเอช (DPPH assay) | 33 |
| 3.7.7.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอริน-2-ไกลซีน โดย <i>in</i> <i>vivo</i> | 34 |
| 3.7.7.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ A-375 | 34 |
| 3.7.7.3.2 การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ A-375 ด้วยการวิเคราะห์เอ็มที ที (MTT assay)..... | 34 |
| 3.7.7.3.3 การตรวจสอบสัญญาณวิทยาของเซลล์ A-375..... | 35 |
| 3.7.7.3.4 การประเมินความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์โคเมท (Comet assay)..... | 36 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง..... | 37 |
| 4.1 การติดตามการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์แสดงออก | 37 |
| 4.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์น บลอต | 46 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไมโครสปอริน-2-ไกลซีน ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง..... | 50 |
| 4.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ประมวลรหัสชีวสังเคราะห์ไมโครสปอริน-2-ไกลซีน ในเซลล์แสดงออก..... | 52 |
| 4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโครสปอริน-2-ไกลซีน โดยการวิเคราะห์ในระดับ <i>in vitro</i> และ <i>in vivo</i> | 55 |
| 4.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโครสปอริน-2-ไกลซีน โดยการวิเคราะห์ในระดับ <i>in vitro</i> ด้วยการวิเคราะห์ DPPH..... | 55 |
| 4.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโครสปอริน-2-ไกลซีน โดยการวิเคราะห์ในระดับ <i>in vitro</i> ด้วยการวิเคราะห์ MTT..... | 56 |
| 4.5.3 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ A-375..... | 61 |
| 4.5.4 การประเมินความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์โคเมท (Comet assay).66 | |
| บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... | 69 |
| รายการอ้างอิง | 74 |
| ภาคผนวก..... | 82 |
| ภาคผนวก ก | 83 |
| ภาคผนวก ข | 85 |
| ภาคผนวก ค | 89 |
| ภาคผนวก ง..... | 90 |
| ภาคผนวก จ | 92 |
| ภาคผนวก ฉ | 93 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ | 94 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์และพลาสติกที่ใช้ในงานวิจัย..... | 25 |
| ตารางที่ 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนสี่ยีน | 32 |
| ตารางที่ 4.1 ปริมาณการสะสมไมโครสปอริน-2-ไกลซีน การแสดงออกของโปรตีน Ap3858 และ การแสดงออกของกลุ่มยีนที่กำหนดรหัสชีวสังเคราะห์ไมโครสปอริน-2-ไกลซีน ภายใต้ภาวะ ความเครียดต่างๆ | 54 |
| ตารางที่ 4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของดีเอ็นเอจากเซลล์ A-375 ในกลุ่มควบคุม กรดแอล- แอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ กรดแอล-แอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ไมโครสปอริน-2-ไกลซีนความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และไมโครสปอริน-2-ไกลซีนความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายภาพแบบส้อมจำนวน 30 ภาพ จากการทดลองอิสระจำนวน 3 ซ้ำ (independent samples)..... | 68 |

สารบัญรูปภาพ

หน้า

| | | |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| รูปภาพที่ 2.1 | มาตรฐานสเปกตรัมพลังงานจากรังสีดวงอาทิตย์ สเปกตรัมที่มีผลต่อการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอและประสิทธิภาพของสเปกตรัมที่ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (แหล่งที่มา: Gao และ Garcia-Pichel, 2011) | 5 |
| รูปภาพที่ 2.2 | ลักษณะโคโลนีของ <i>B. subtilis</i> เมื่อได้รับรังสียูวีเที่เวลา 0 ชั่วโมง (a) 25 ชั่วโมง (b) และ 45 ชั่วโมง (c) หลังจากโคโลนีโตเป็นเวลา 50 ชั่วโมง รังสียูวีที่ให้มีความเข้มข้นของพลังงานเท่ากับ 30 วัตต์ต่อตารางเมตร พบว่าประชากรของแบคทีเรียย้ายไปยังขอบของโคโลนี (edge of the colony) โดยบริเวณใสแสดงถึงศูนย์กลางของโคโลนี (ตำแหน่ง inoculation) การฟื้นคืน (recovery) ของประชากรแบคทีเรีย (หลังจากได้รับรังสียูวีเป็นเวลา 30 ชั่วโมง (d), 40 ชั่วโมง (e) และ 55 ชั่วโมง (f) พบว่าโคโลนีเจริญทั้งด้านนอกและด้านใน (แหล่งที่มา: Delprato และคณะ, 2001)..... | 6 |
| รูปภาพที่ 2.3 | รังสียูวีเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอ โดยไปเหนี่ยวนำให้เบส ชนิดไพริมิดีนสองตัวที่อยู่ติดกันเชื่อมกันด้วยพันธะโคเวเลนต์เกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ จำนวน 2 ชนิด คือ ไซโคลบิวเทน-ไพริมิดีน ไดเมอร์ (cyclobutane-pyrimidine dimers, CPDs) (a) และ 6-4 โฟโตโปรดักส์ (6-4 photoproducts, 6-4PPs) รวมถึงดีวาร์เวเลนที่ไอโซเมอร์ (Dewar valence isomers) ของ 6-4 โฟโตโปรดักส์ (b) (แหล่งที่มา: Sinha และ Häder, 2002) | 8 |
| รูปภาพที่ 2.4 | การตอบสนองต่ออันตรายจากรังสียูวีของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในน้ำ | 10 |
| รูปภาพที่ 2.5 | MAA ที่ถูกไกลโคซิเลทในไซยาโนแบคทีเรียชนิด <i>Nostoc commune</i> ซึ่งทำให้ได้ MAA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น ได้แก่ ไกลโคซิเลท-โพลีฟลาร์-334 (ขนาด 508 ดาลตัน) (a) ไกลโคซิเลท-พาลีทีน-ทรีโอนีน (ขนาด 612 ดาลตัน) (b) และโครโมฟอร์สองชนิด คือ 3-อะมิโนไซโคลเฮกซีน-1-โอน และ 1,3-ไดอะมิโนไซโคลเฮกซีน (ขนาด 1,050 ดาลตัน) (c) (แหล่งที่มา: Matsui และคณะ, 2011; Nazifi และคณะ, 2013)..... | 12 |
| รูปภาพที่ 2.6 | โครงสร้างและค่าการดูดซับรังสียูวีสูงสุดของ MAA บางชนิด | 13 |
| รูปภาพที่ 2.7 | การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์ MAA | 14 |
| รูปภาพที่ 2.8 | วิถีชีวสังเคราะห์ MAA ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสาย <i>A. variabilis</i> ATCC 29413 และ <i>N. punctiforme</i> ATCC 29133 (แหล่งที่มา: Gao และ Garcia-Pichel, 2011).. | 16 |

รูปภาพที่ 4.1 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (นำพายีน *Ap3858-3855*) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และ LB สูตรที่เพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.3 โมลาร์ และ 0.5 โมลาร์ โดยเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a); เซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่เพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (b) และเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่เพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (c).....38

รูปภาพที่ 4.2 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (นำพายีน *Ap3858-3855*) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ โดยเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a); LB สูตรที่ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (b) และเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (c)39

รูปภาพที่ 4.3 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (นำพายีน *Ap3858-3855*) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้ลิเทียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a) และเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (b).....40

รูปภาพที่ 4.4 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (นำพายีน *Ap3858-3855*) ในภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง (เปลี่ยนจาก 37°C เป็น 42°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a); ในภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้ซอร์บิทอลแทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (b) และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้ซอร์บิทอลแทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (c)41

- รูปภาพที่ 4.5** ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (ยีน *Ap3858-3855*) ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (a); ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ (b) ภาวะความเครียดจากเกลือลิเทียมคลอไรด์ (c) และภาวะความเครียดจากเกลือแคลเซียมคลอไรด์ (d).....44
- รูปภาพที่ 4.6** ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (ยีน *Ap3858-3855*) ภายใต้ภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง (a); ภาวะความเครียดจากเกลือแรงดันออสโมติก (b) และเปอร์เซ็นต์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ภายใต้ภาวะความเครียดจากออกซิเดชัน (c) ...45
- รูปภาพที่ 4.7** การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน *Ap3858* โดยวิธีเวสเทิร์น บลอท ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (a); ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (b); ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือลิเทียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ (c) และภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (d) ทำการแยกโปรตีนบน 12.5% SDS-PAGE และตรวจสอบสัญญาณการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอท ถูกพัฒนาโดยสีอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส48
- รูปภาพที่ 4.8** การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน *Ap3858* โดยวิธีเวสเทิร์น บลอท ภายใต้ภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง (a); ภายใต้ภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติกที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (b) และภายใต้ภาวะความเครียดจากออกซิเดชันที่ความเข้มข้น 0, 0.4 และ 4 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (c) ทำการแยกโปรตีนบน 12.5% SDS-PAGE และตรวจสอบสัญญาณการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอท ถูกพัฒนาโดยสีอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส49
- รูปภาพที่ 4.9** โครมาโตแกรมของโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสารไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน ที่ได้จากการสกัดเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยการฉีดสารตัวอย่างจำนวน 30 ไมโครลิตร ไปยังคอลัมน์ Shim-pack FC-ODS reverse phase (3 ไมโครเมตร; 150 × 4.6 มิลลิเมตร) ที่มีอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1% ฟลูออโรอะซีติก แอซิดในน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง และ 0.1 โมลาร์ pH 6.5 แอมโมเนียมอะซิเตท (วิเคราะห์ผลที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร).....50

รูปภาพที่ 4.10 ปริมาณการสะสมไมโครสปอร์ริน-2-ไกลซีนในเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือ ความเครียดจากอุณหภูมิสูง ความเครียดจากแรงดันออสโมติก และ ความเครียดจากออกซิเดชัน51

รูปภาพที่ 4.11 Semi-quantitative RT-PCR ของยีน *Ap3858* ถึง *Ap3855* จากเซลล์แสดงออก *E. coli* ที่นำพายีน *Ap3858-Ap3855* ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (a, ขวา) และภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (b, ขวา) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกรับบน 1.2% (โดยมวลต่อปริมาตร) อะกาโรสเจลและพรีแคส (precast) ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) และวัดความเข้มของแถบพีซีอาร์ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (a, ซ้าย) และภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ (b, ซ้าย) โดยใช้โปรแกรม GelQuant.NET53

รูปภาพที่ 4.12 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของไมโครสปอร์ริน-2-ไกลซีนบริสุทธิ์ ทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระ โดยค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ55

รูปภาพที่ 4.13 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของกรดแอล-แอสคอร์บิก และไมโครสปอร์ริน-2-ไกลซีน บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งจากเซลล์เมลาโนซัยต์ของมนุษย์ A-375 ด้วยเทคนิค MTT โดยเซลล์ควบคุม (ไม่เติมสารใดๆ) มีค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100%.....58

รูปภาพที่ 4.14 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของกรดแอล-แอสคอร์บิกในภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 หรือ 25 ไมโครโมลาร์ บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งจากเซลล์เมลาโนซัยต์ของมนุษย์ A-375 ด้วยเทคนิค MTT โดยเซลล์ควบคุม (ไม่เติมสารใดๆ) มีค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100%59

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| รูปภาพที่ 4.15 เพอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของไมโคสปอริน-2-ไกลซินในภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 หรือ 25 ไมโครโมลาร์ บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งจากเซลล์เมลาโนซัยต์ของมนุษย์ A-375 ด้วยเทคนิค MTT โดยเซลล์ควบคุม (ไม่เติมสารใดๆ) มีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% | 60 |
| รูปภาพที่ 4.16 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเมลาโนซัยต์ A-375 หลังจากได้รับไมโคสปอริน-2-ไกลซินที่ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง | 62 |
| รูปภาพที่ 4.17 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเมลาโนซัยต์ A-375 หลังจากได้รับไมโคสปอริน-2-ไกลซินที่ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... | 63 |
| รูปภาพที่ 4.18 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเมลาโนซัยต์ A-375 หลังจากได้รับกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... | 64 |
| รูปภาพที่ 4.19 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเมลาโนซัยต์ A-375 หลังจากได้รับกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... | 65 |
| รูปภาพที่ 4.20 ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีโคเมทาจากเซลล์มะเร็งผิวหนัง A-375 ในกลุ่มควบคุม (a) ในกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (b) กรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (c) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (d) ไมโคสปอริน-2-ไกลซินความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (e) และไมโคสปอริน-2-ไกลซินความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (f) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายภาพแบบสุ่มจำนวน 30 ภาพ จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ (three independent samples)..... | 67 |

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการเจริญเติบโตของประชากรมนุษย์เพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการขยายตัวทางอุตสาหกรรมต่างๆ มากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อมลพิษทางชั้นบรรยากาศ เนื่องจากการปล่อยควันพิษจากอุตสาหกรรม การใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและชั้นบรรยากาศ เช่น สารพวกคลอโรฟลูโอคาร์บอน (chlorofluorocarbon, CFC) คลอโรคาร์บอน (chlorocarbon, CC) ออร์แกโนโบรไมด์ (organobromide, OBM) ไนตรัสออกไซด์ (nitrous oxide, N₂O) มีเทน (methane, CH₄) และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารพวกนี้จะไปทำลายชั้นโอโซนทำให้ชั้นโอโซนเกิดช่องโหว่ และรังสียูวีก็สามารถแผ่มายังผิวโลกได้ (Crutzen, 1992; Lubin และ Jensen, 1995; Portmann และคณะ, 2012)

สิ่งมีชีวิตหลายชนิดได้วิวัฒนาการทั้งทางด้านกายภาพและทางด้านชีวภาพเพื่อรับมือกับอันตรายที่เกิดจากรังสียูวี ทางด้านกายภาพ เช่น การหลีกเลี่ยงในการสัมผัสกับรังสียูวี การอพยพไปยังแหล่งที่อยู่อาศัยใหม่ที่มีโอกาสสัมผัสกับรังสียูวีได้น้อยลง และการผลิตไบโอฟิล์มล้อมรอบตัวเซลล์ เป็นต้น (Wu และคณะ, 2011) ส่วนทางด้านชีวภาพ เช่น มีระบบในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ การผลิตสารบางชนิดเพื่อป้องกันตนเองจากอันตรายของรังสียูวี ได้แก่ เมลานิน (melanin) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) ไซโตนิมิน (scytonemin) และไมโคสปอริน-ไลค์ อะมิโน แอซิด (mycosporine-like amino acids, MAAs) เป็นต้น (Rosic, 2012)

การสร้างสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิเพื่อคัดกรองรังสียูวีนั้น สารประกอบ MAA เป็นหนึ่งในสารที่มีความสำคัญ เพราะมีคุณสมบัติในการคัดกรองทั้งรังสียูวีบีและ/หรือรังสียูวีเอ โครงสร้างของ MAA เป็นไซโคลเฮกเซนนิมิน (cyclohexenimine) ส่วนใหญ่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก (น้อยกว่า 400 ดาลตัน) นอกจากนี้ยังพบ MAA ชนิดที่เกิดไกลโคซิเลชัน (glycosylation) ซึ่งมีมวลโมเลกุลขนาดมากกว่า 1,000 ดาลตัน (Matsui และคณะ, 2011) ลักษณะทั่วไปของ MAA คือ เป็นสารไม่มีสีและละลายน้ำได้ โดยสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสังเคราะห์ MAA โดยใช้สารตั้งต้นจากวิถีซิคลิกเมทและวิถีเพนโทสฟอสเฟต เช่น ไฮยาโนแบคทีเรีย แบคทีเรีย ฟังไจ ไดโนแฟลกเจลเลต สาหร่ายขนาดเล็ก และสาหร่าย

ขนาดใหญ่ เป็นต้น ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบ MAA มากกว่า 20 ชนิด (Gao และ Garcia-Pichel, 2011)

กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ MAA ได้รับการศึกษาจากการวิเคราะห์ข้อมูลในจีโนมสมบูรณ์และการหาลำดับเบสของยีนทั้งหมดด้วยวิธีช็อตกัน (shotgun genome sequencing) ในไซยาโนแบคทีเรียรวมถึงแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (Balskus และ Walsh, 2010) *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Gao และ Garcia-Pichel, 2011) *Aphanothece halophytica* (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) *Actinosynnema mirum* DSM 43827 *Pseudonocardia* sp. P1 (Miyamoto และคณะ, 2014) และ *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Hu และคณะ, 2015) พบว่ากลุ่มยีนที่กำหนดรหัสการชีวสังเคราะห์ MAA ประกอบด้วยสี่ยีน คือ ยีนที่หนึ่งถึงยีนที่สามกำหนดรหัสให้เอนไซม์ชนิดเดียวกันในสิ่งมีชีวิตทั้งหกชนิด ส่วนยีนที่สี่กำหนดรหัสเอนไซม์ต่างชนิดกัน โดยใน *N. punctiforme* ATCC 29133 *A. halophytica* *A. mirum* DSM 43827 *Pseudonocardia* sp. P1 และ *M. aeruginosa* PCC 7806 ยีนที่สี่ทำหน้าที่กำหนดรหัสเอนไซม์ดีอะลา-ดีอะลา ไลเกส (D-Ala-D-Ala ligase) ขณะที่ใน *A. variabilis* ATCC 29413 ยีนที่สี่ทำหน้าที่กำหนดรหัสเอนไซม์นอนโรโบโซมอล เปปไทด์ซินเทส (non-ribosomal peptide synthase-like ligase, NRPS)

วิถีชีวสังเคราะห์ MAA เริ่มต้นจากสารตั้งต้นซีโดเฮปทูลอส-7-ฟอสเฟต (sedoheptulose-7-phosphate, SHP) เปลี่ยนไปเป็น 2-ดีเมทิล-4-ดีออกซีกาตุซอล (2-demethyl-4-deoxygadusol, DDG) ด้วยยีนที่หนึ่งกำหนดรหัสให้ดีเมทิล-4-ดีออกซีกาตุซอล ซินเทส (dimethyl-4-deoxygadusol synthase, DDG) จากนั้น 2-ดีเมทิล-4-ดีออกซีกาตุซอลจะเปลี่ยนไปเป็น 4-ดีออกซีกาตุซอล (4-deoxygadusol, 4-DG) จากยีนที่สองกำหนดรหัสให้ โอเมทิลทรานเฟอร์เรส (O-methyltransferase, O-MT) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของ MAA และยีนที่สามกำหนดรหัสซี-เอ็น ไลเกส (C-N ligase) ซึ่งทำหน้าที่ในการเติมกรดอะมิโนไกลซีนให้แก่ 4-ดีออกซีกาตุซอล ได้เป็นไมโคสปอริน-ไกลซีน (mycosporine-glycine) จากนั้นยีนที่สี่กำหนดรหัสให้เอนไซม์นอนโรโบโซมอล เปปไทด์ซินเทส หรือ ดีอะลา-ดีอะลา ไลเกส ทำหน้าที่เติมกรดอะมิโนต่างชนิดกัน ถ้าใน *A. variabilis* ATCC 29413 *N. punctiforme* ATCC 29133 *A. mirum* DSM 43827 *Pseudonocardia* sp. P1 และ *M. aeruginosa* PCC 7806 เกิดการเติมกรดอะมิโนเซอร์อินเพื่อเปลี่ยนไมโคสปอริน-ไกลซีนเป็นซิโนริน

(shinorine) ส่วนใน *A. halophytica* เกิดการเติมกรดอะมิโนไกลซีนเปลี่ยนไมโคสปอริน-ไกลซีน เป็น ไมโคสปอริน-2-ไกลซีน (mycosporine-2-glycine)

นอกจากนี้ MAA ยังมีคุณสมบัติอื่นๆ นอกเหนือจากการเป็นสารกรองรังสียูวี ได้แก่ การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) การทนต่อภาวะความเครียดต่างๆ และยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสืบพันธุ์ของราอีกด้วย (Singh และคณะ, 2008) จากการศึกษาของ Oyamada และคณะ (2008) รายงานว่าชนิดของ MAA ที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ ไมโคสปอริน-ไกลซีน โฟไฟลาร์-334 (porphyra-334) และชิโนริน และ MAA สองชนิดที่ถูกไกลโคซิเลท คือ ไกลโคซิเลท-โฟไฟลาร์-334 และไกลโคซิเลท-พาลีไทน์-ธรีโอนีน (palythine-threonine) (Nazifi และคณะ, 2013)

งานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Waditee-Sirisattha และคณะ (2014) ตรวจสอบพบว่า *A. halophytica* มีชีวสังเคราะห์ MAA ชนิดที่แตกต่างจาก *A. variabilis* กับ *N. punctiforme* โดยสามารถสังเคราะห์และสะสม MAA ชนิดไมโคสปอริน-2-ไกลซีน นอกจากนี้ยังได้ทำการแยกกลุ่มยีนกำหนดรหัสและแสดงออกกลุ่มยีนดังกล่าวใน *Escherichia coli* DH5 α และ *Synechococcus* sp. PCC 7942 ซึ่งพบว่าในเซลล์แสดงออก *E. coli* ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ เหนี่ยวนำให้มีการสะสมไมโคสปอริน-2-ไกลซีนได้ปริมาณมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาภาวะจากความเครียดอื่นๆ ในการเหนี่ยวนำการสร้างและสะสม MAA ในเซลล์แสดงออก *E. coli* และตรวจสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ MAA ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo*

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบและหาภาวะความเครียดที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แสดงออก *E. coli* สร้างไมโคสปอริน-2-ไกลซีนในปริมาณเพิ่มขึ้น
2. เพื่อวิเคราะห์ลักษณะสมบัติและเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอริน-2-ไกลซีนทั้งใน *in vitro* และ *in vivo*

บทที่ 2

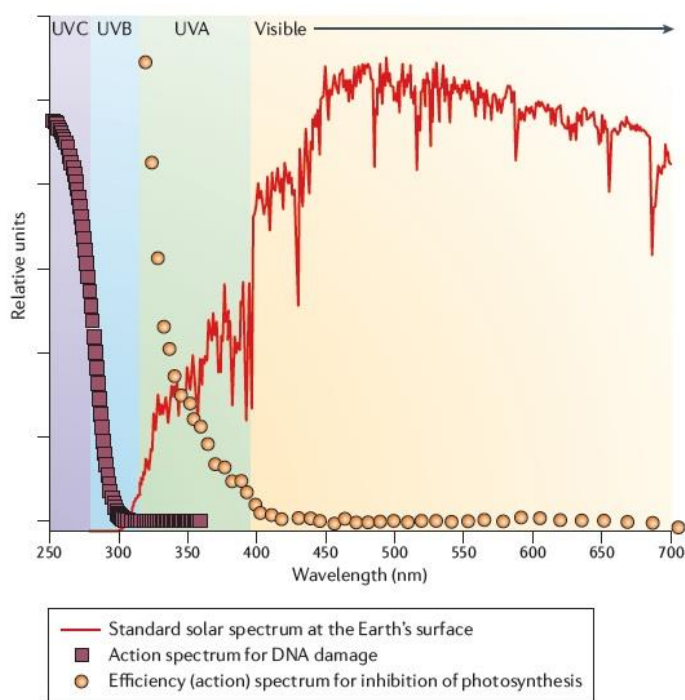
ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 ผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ตต่อสิ่งมีชีวิต

ปัจจุบันประชากรมนุษย์มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดความต้องการบริโภคพลังงานเชื้อเพลิงทั้งในภาคครัวเรือน ภาคอุตสาหกรรม และภาคเกษตรกรรมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อตรงต่อมลพิษทางชั้นบรรยากาศ เนื่องจากมีการปล่อยควันพิษจากอุตสาหกรรม การใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและชั้นบรรยากาศ อาทิเช่น สารพวกคลอโรฟลูโอคาร์บอน คลอโรคาร์บอน ออร์แกโนโบรไมด์ ไนโตรสออกไซด์ มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารพวกนี้จะไปทำลายชั้นโอโซนทำให้ชั้นโอโซนเกิดช่องโหว่ ส่งผลให้รังสีอัลตราไวโอเล็ตสามารถแพร่ผ่านมายังผิวโลกได้มากขึ้น (Lubin และ Jensen, 1995; Manning และ Tiedemann, 1995; Portmann และคณะ, 2012) รังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือรังสียูวีเป็นช่วงหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่า 400 นาโนเมตร แบ่งออกเป็น 3 ช่วง ตามความยาวคลื่น คือ ยูวีเอ (315-400 นาโนเมตร) เป็นรังสีที่ถูกกรองโดยชั้นโอโซนเพียงเล็กน้อยและส่องถึงผิวโลกได้เกือบทั้งหมด ยูวีบี (280-315 นาโนเมตร) ถูกกรองไว้เป็นส่วนใหญ่และส่องถึงผิวโลกน้อยกว่า 2% (<http://www.spacewx.com/ISO.html> เข้าถึงฐานข้อมูลวันที่ 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558) และยูวีซี (280-100 นาโนเมตร) โดยรังสียูวีซีมีความยาวคลื่นน้อยสุดจึงมีพลังงานมากที่สุด แต่ถูกชั้นโอโซนกรองไว้ได้ทั้งหมด จึงไม่สามารถทะลุมาสู่ผิวโลกได้ (Vasilkov และคณะ, 2001; Gao และ Garcia-Pichel, 2011) (รูปภาพที่ 2.1) ดังนั้นรังสียูวีที่เป็นอันตรายและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตบนโลกนั้นจึงประกอบด้วยยูวีเอและยูวีบี ซึ่งอยู่ในช่วง 280-400 นาโนเมตร นอกจากนี้รังสียูวียังมีความสามารถในการดูดซับสารชีวโมเลกุล ได้แก่ กรดนิวคลีอิก โปรตีน และไขมัน รังสียูวีเอมีผลกระทบทางอ้อมจากการสร้างสารอนุมูลอิสระในกลุ่ม Reactive Oxygen Species (ROS) ไปทำลายเซลล์เป้าหมาย ขณะที่รังสียูวีบีส่งผลกระทบโดยตรงจากการไปทำลายดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน ตลอดจนยับยั้งกระบวนการของการถอดรหัส (transcription) การแปลรหัส (translation) ทำให้ให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ สุดท้ายอาจส่งผลให้เซลล์ตาย (Jeffrey และคณะ, 1996; Han และคณะ, 2004; Sinha และ Häder, 2008)

สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำมีโอกาสได้รับอันตรายจากรังสียูวีได้มากกว่าสิ่งมีชีวิตที่อาศัยบนบก โดยเฉพาะอย่างยิ่งรังสียูวีบี เนื่องจากรังสีความยาวคลื่นช่วงนี้สามารถทะลุน้ำได้ลึกถึง 20 เมตร

(Singh และคณะ, 2008) จึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวภาพของสิ่งมีชีวิต เช่น อัตราการรอดชีวิตลดลง อัตราการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell differentiation) การเปลี่ยนแปลงของเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst differentiation) การสร้างเม็ดสี (pigmentation) การสังเคราะห์ด้วยแสง การเคลื่อนไหว (motility) องค์ประกอบของไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein composition) การตรึงไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น (Rastogi และคณะ, 2010)



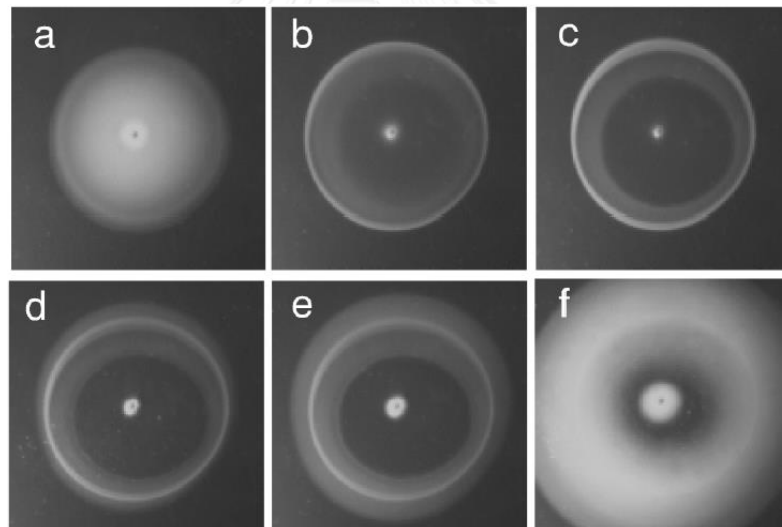
รูปภาพที่ 2.1 มาตรฐานสเปกตรัมพลังงานจากรังสีดวงอาทิตย์ สเปกตรัมที่มีผลต่อการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอและประสิทธิภาพของสเปกตรัมที่ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (แหล่งที่มา: Gao และ Garcia-Pichel, 2011)

2.2 กลไกการตอบสนองต่อรังสียูวีของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก

สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหลายชนิดรวมถึงไซยาโนแบคทีเรียมีการตอบสนองต่ออันตรายจากรังสีที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetically Active Radiation, PAR) อยู่ในช่วง 400-700 นาโนเมตร และรังสียูวี สิ่งมีชีวิตเหล่านี้จึงได้มีการพัฒนากระบวนการที่หลากหลาย ด้วยการ

ตอบสนองทางด้านกายภาพและการตอบสนองทางด้านชีวภาพสำหรับการป้องกันผลกระทบที่เป็นอันตรายที่ได้รับจากรังสียูวี (Singh และคณะ, 2010)

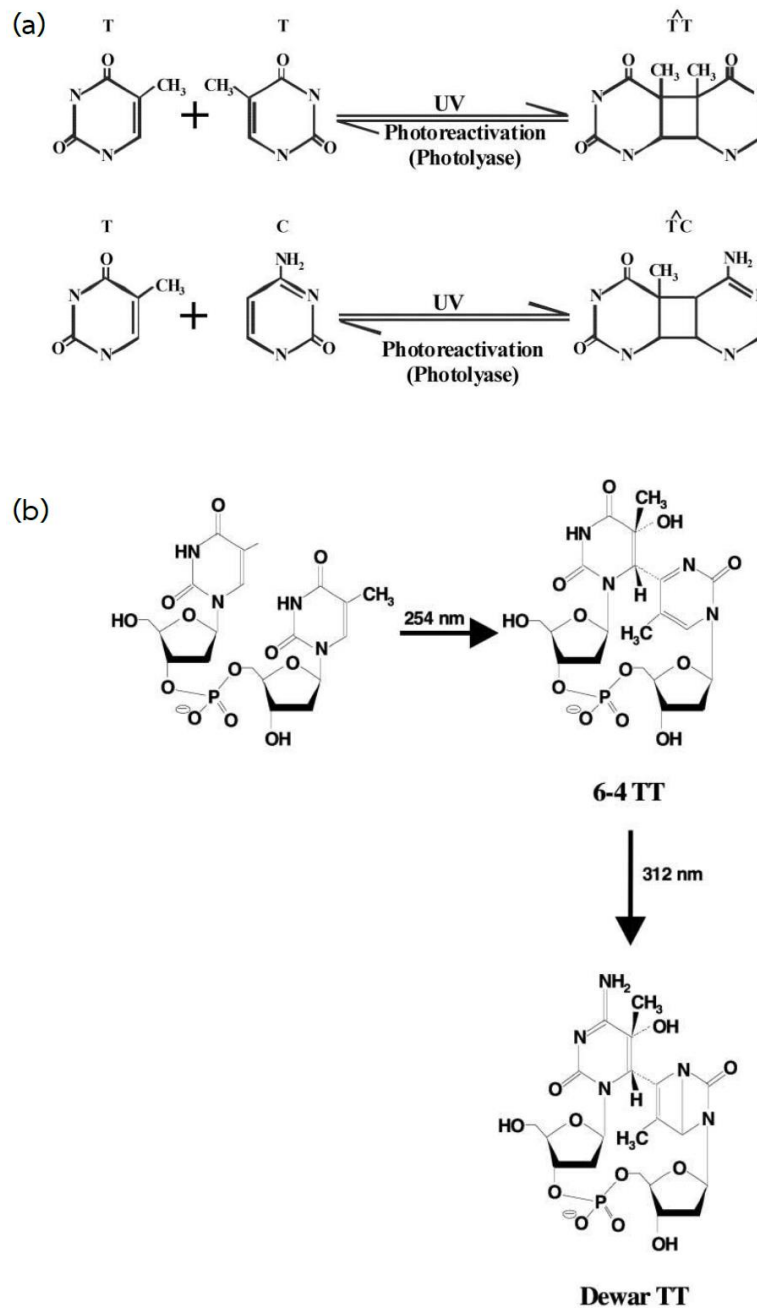
การตอบสนองทางกายภาพด้วยการปรับตัวด้านพฤติกรรม อาจแบ่งได้เป็น 4 ประเภท คือ การเจริญเติบโตในรูปของโคโลนีหรือสร้างไบโอฟิล์มล้อมรอบตัวเซลล์ไว้ กรณีการรวมกลุ่มหรือการสร้างไบโอฟิล์มรอบเซลล์พบได้ใน *Bacillus subtilis* (รูปภาพที่ 2.2) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ป้องกันได้ทั้งรังสียูวีเอ ยูวีบี และยูวีซี) (Elasri และ Miller, 1999; Delprato และคณะ, 2001; Gao และ Garcia-Pichel, 2011) การอพยพไปยังแหล่งที่อยู่อาศัยใหม่ที่มีโอกาสสัมผัสกับรังสียูวีได้น้อยลง (Bebout และ Garcia-Pichel, 1995) การหลีกเลี่ยงในการสัมผัสกับรังสียูวี (Kruschel และ Castenholz, 1998) และการสร้างสปอร์ของสาหร่ายสีเขียว *Ulva pertusa* ทำให้ทนต่ออันตรายจากรังสียูวีได้ เพราะสปอร์มีโครงสร้างที่แข็งแรง (Han และคณะ, 2004)



รูปภาพที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของ *B. subtilis* เมื่อได้รับรังสียูวีเอที่เวลา 0 ชั่วโมง (a) 25 ชั่วโมง (b) และ 45 ชั่วโมง (c) หลังจากโคโลนีโตเป็นเวลา 50 ชั่วโมง รังสียูวีที่ให้มีความเข้มของพลังงานเท่ากับ 30 วัตต์ต่อตารางเมตร พบว่าประชากรของแบคทีเรียย้ายไปยังขอบของโคโลนี (edge of the colony) โดยบริเวณไฮสแสดงถึงศูนย์กลางของโคโลนี (ตำแหน่ง inoculation) การฟื้นคืน (recovery) ของประชากรแบคทีเรีย (หลังจากได้รับรังสียูวีเป็นเวลา 30 ชั่วโมง (d), 40 ชั่วโมง (e) และ 55 ชั่วโมง (f)) พบว่าโคโลนีเจริญทั้งด้านนอกและด้านใน (แหล่งที่มา: Delprato และคณะ, 2001)

สำหรับการตอบสนองทางชีวภาพมีกลไกที่หลากหลายตั้งแต่การสร้างสารประกอบจำเพาะเพื่อคัดกรองรังสียูวี การมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการสัมผัสรังสียูวี การซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหาย เป็นต้น ซึ่งมีกระบวนการโดยสังเขปดังต่อไปนี้

1. ดีเอ็นเอเป็นหนึ่งในเป้าหมายสำคัญที่ถูกทำลายเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของรังสียูวีที่แผ่มายังพื้นผิวโลก ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวางตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำอย่างแบคทีเรียไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงอย่างเช่นมนุษย์ โดยรังสียูวีเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ และสร้างความเสียหายต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอ ซึ่งไปเหนี่ยวนำให้เบสชนิดไพริมิดีน (pyrimidine) สองตัวที่อยู่ติดกันเชื่อมกันด้วยพันธะโคเวเลนต์เกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) จำนวน 2 ชนิด คือ ไซโคลบิวเทน-ไพริมิดีน ไดเมอร์ (cyclobutane-pyrimidine dimers, CPDs) (รูปภาพที่ 2.3(a)) และ 6-4 โฟโตโปรดักต์ (6-4 photoproducts, 6-4PPs) รวมถึงดีวาร์เวเลนซ์ไอโซเมอร์ (Dewar valence isomers) ของ 6-4 โฟโตโปรดักต์ (รูปภาพที่ 2.3(b)) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตได้พัฒนากระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เกิดจากอันตรายของรังสียูวีด้วยกระบวนการใช้แสงซึ่งเรียกว่าโฟโตรีเอกตีเวชัน (photoreactivation) กับวิธีการซ่อมแซมดีเอ็นเอในที่มีดเรียกว่าเอ็กซ์ซิชั่นรีแพร์ (excision repair) (Lindahl และ Wood, 1999; Sinha และ Häder, 2002)



รูปภาพที่ 2.3 รังสียูวีเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอ โดยไปเหนี่ยวนำให้เบสชนิดไพริมิดีนสองตัวที่อยู่ติดกันเชื่อมกันด้วยพันธะโคเวเลนต์เกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ จำนวน 2 ชนิด คือไซโคลบิวเทน-ไพริมิดีน ไดเมอร์ (cyclobutane-pyrimidine dimers, CPDs) (a) และ 6-4 โฟโตโปรดักต์ (6-4 photoproducts, 6-4PPs) รวมถึงดีวาร์เวเลนซ์ไอโซเมอร์ (Dewar valence isomers) ของ 6-4 โฟโตโปรดักต์ (b) (แหล่งที่มา: Sinha และ Häder, 2002)

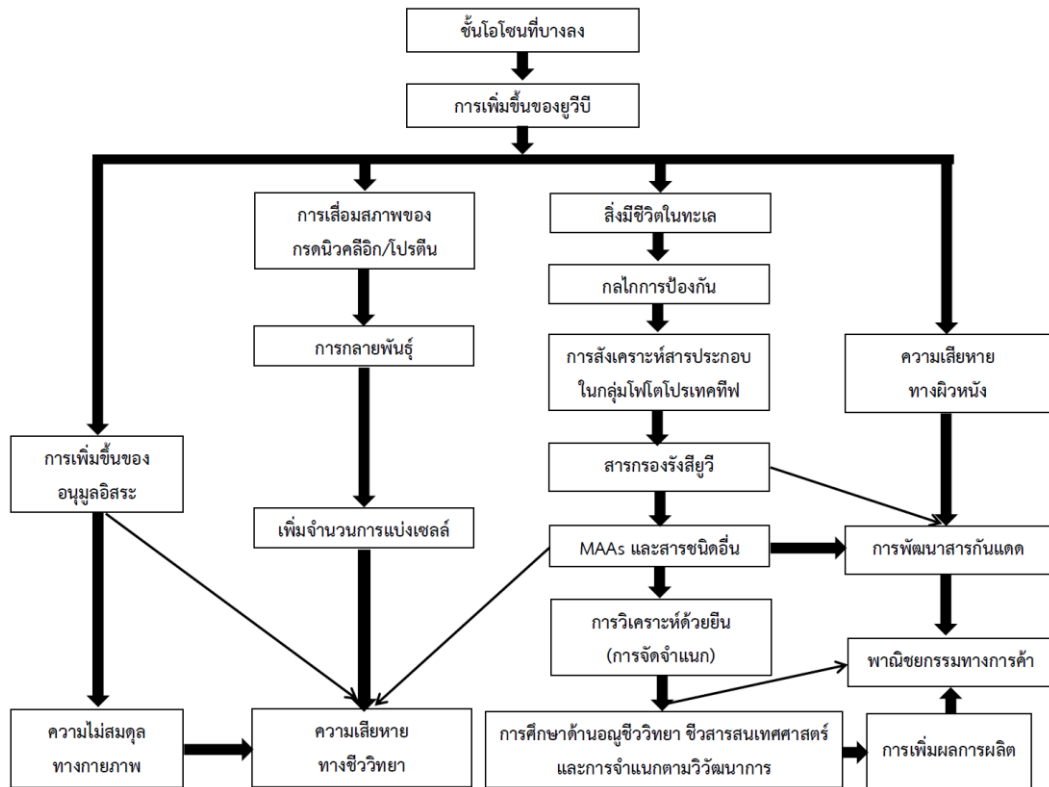
2. การสังเคราะห์สารประกอบอนินทรีย์ (inorganic compound) เช่น เฟอร์ริกไอออน (ferric ion) มีประสิทธิภาพในการดูดซับรังสียูวีในช่วงความยาวคลื่น 220-270 นาโนเมตร เฟอร์รัสไอออน (ferrous iron) ดูดซับรังสียูวีในช่วงความยาวคลื่นเดียวกับเฟอร์ริกไอออนแต่ประสิทธิภาพการดูดซับต่ำกว่า ส่วนซิงค์ออกไซด์ (zinc oxide) กับไททาเนียมไดออกไซด์ (titanium dioxide) พบว่าถูกทำให้อยู่รูปของอนุภาคไมโครฟิน (microfine particles) ผสมอยู่ในเครื่องสำอางและได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลาย ซึ่งซิงค์ออกไซด์กับไททาเนียมไดออกไซด์มีคุณสมบัติในการดูดซับรังสียูวี (Pierson และคณะ, 1993; Rosen, 2003)

3. การสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระทั้งชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic antioxidants) เช่น แคโรทีนอยด์ กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี กลูตาไทโอน (glutathione) และชนิดที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase, SOD) แคตาเลส (catalase) หรือกลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) (He และ Häder, 2002; Wang และคณะ, 2007)

4. การสะสมสารกรองรังสียูวีไว้ในเซลล์ที่ผลิตจากชั้นเมแทบอลิท์หูดิพทึมมิ ได้แก่ ไฮโดนินิน และ MAAs (Levine และ Thiel, 1987; Rastogi และคณะ, 2010)

จากกลไกการตอบสนองต่ออันตรายจากรังสียูวีดังที่กล่าวข้างต้น การสร้างสารเมแทบอลิท์หูดิพทึมมิถือว่าเป็นหนึ่งในกลไกที่สำคัญ เพราะว่ามีคุณสมบัติในการคัดกรองรังสียูวีบีและ/หรือรังสียูวีเอ สารเมแทบอลิท์หูดิพทึมมิหลายชนิด ได้แก่ เมลานิน มีคุณสมบัติในการดูดซับรังสียูวีไกล (far-UV คือ แสงยูวีที่มีความยาวคลื่นแตกต่างจากความยาวคลื่นของแสงที่ตามองเห็นมาก) และรังสีอินฟราเรด (infrared) ไฮโดนินิน มีคุณสมบัติในการดูดซับรังสียูวีใกล้ (near-UV คือ แสงยูวีที่มีความยาวคลื่นใกล้เคียงกับความยาวคลื่นของแสงที่ตามองเห็น) และรังสีสีน้ำเงิน (blue radiation คือแสงที่ตามองเห็นและมีพลังงานสูง ครอบคลุมช่วงความยาวคลื่น 380-500 นาโนเมตร) (<http://www.essilor.co.th/about-vision/uv-protection/high-energy-visible-light/> เข้าถึงฐานข้อมูลวันที่ 5 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558) แคโรทีนอยด์ มีคุณสมบัติในการดูดซับรังสียูวีบี มีการรายงานว่ายานโนแบคทีเรียและ *E. coli* ที่มียีนกำหนดรหัสชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ทำหน้าที่ในการดูดซับรังสีช่วงที่ตามองเห็นเป็นหลัก ขณะที่ MAA ดูดซับได้ทั้งรังสียูวีเอและยูวีบี (Sandmann และคณะ, 1998; Gao และ Garcia-Pichel, 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง MAA ได้รับความสนใจมาก

เนื่องจากมีสเปกตรัมเพียงค่าเดียวและสาร MAA แต่ละชนิดมีค่าการดูดซับรังสียูวีที่ความยาวคลื่นไม่ซ้ำกัน โดยมีค่าดูดซับสูงสุดอยู่ระหว่าง 310 และ 365 นาโนเมตร

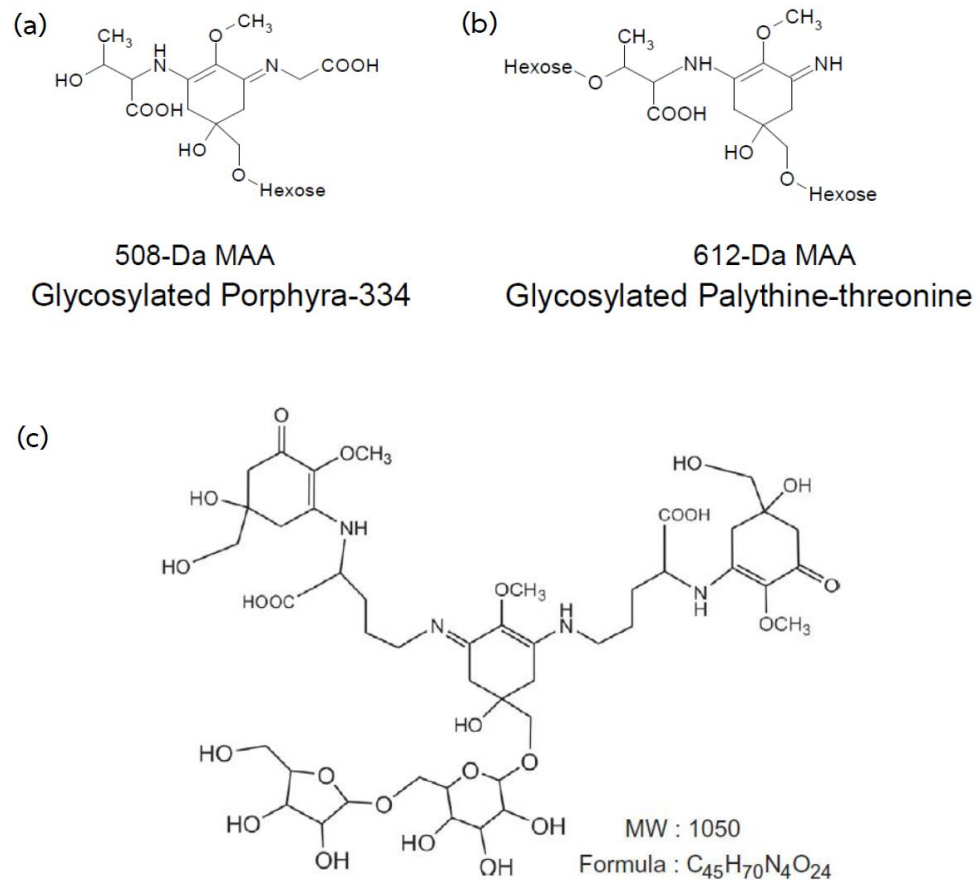


รูปภาพที่ 2.4 การตอบสนองต่ออันตรายจากรังสียูวีของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในน้ำ
(ดัดแปลงจากแหล่งที่มา: Bhatia และคณะ, 2011)

2.3 สารคัดกรองรังสียูวีชนิด MAA

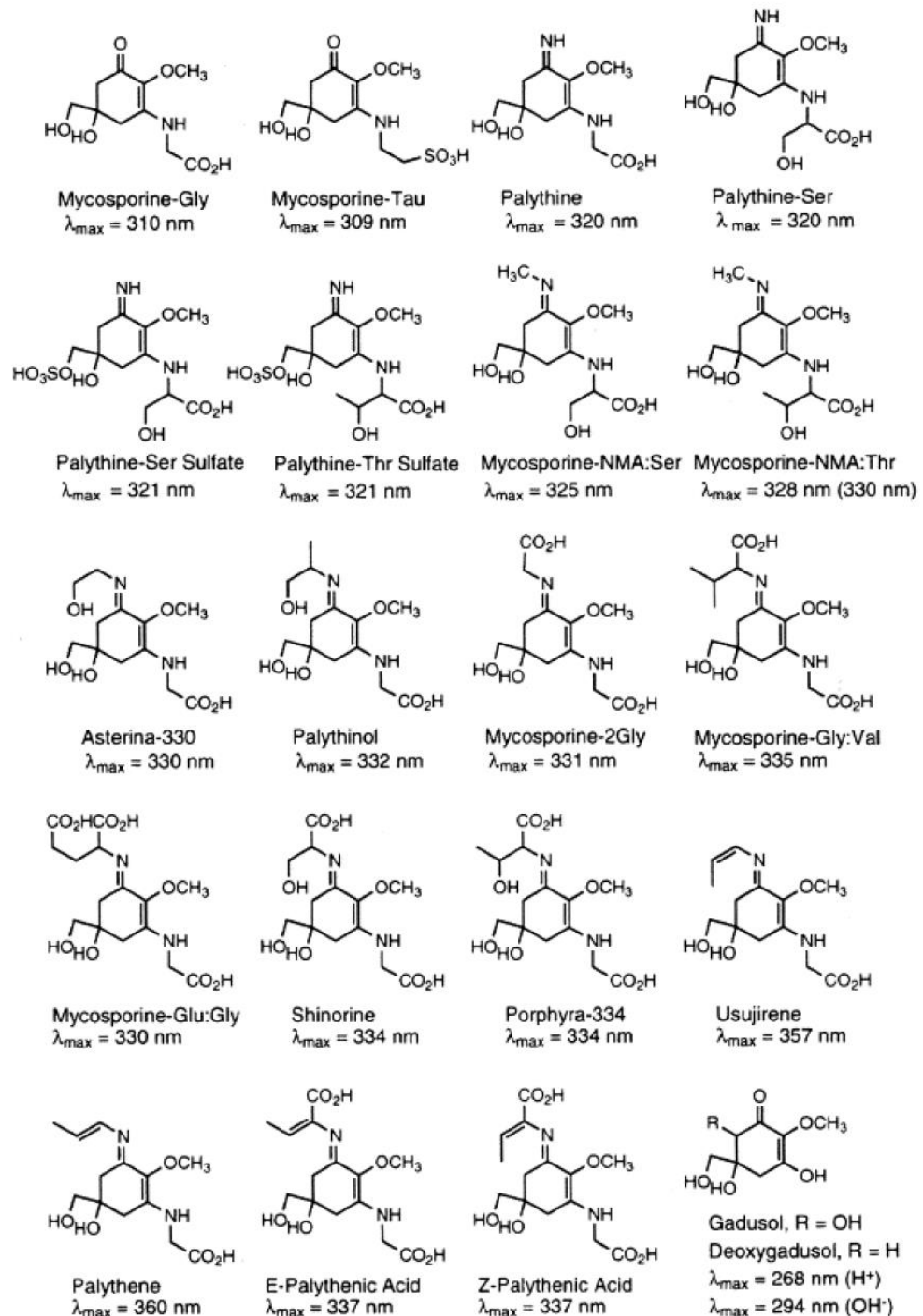
2.3.1 โครงสร้างทางเคมีและลักษณะสมบัติของ MAA

สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ MAA แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักขึ้นอยู่กับโครงสร้างแกนและการเชื่อมต่อของกรดอะมิโนกลุ่มแรก กลุ่มแรกแกนหลักประกอบด้วยวงแหวนไซโคลเฮกเซน (cyclohexenone) ต่อกับหมู่คีโตน (ketone) หมู่เมทอกซี (methoxy) และกรดอะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เรียกว่าไมโคสปอริน (mycosporine) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าออกโซไมโคสปอริน (oxo-mycosporine) ยกตัวอย่างเช่น ไมโคสปอริน-ไกลซีน และไมโคสปอริน-ทิวรีน (mycosporine-aurine) เป็นต้น กลุ่มที่สองเรียกว่าไมโคสปอริน-ไลค์ อะมิโน แอซิด หรือ อิมิโนไมโคสปอริน (iminomycosporine) กลุ่มนี้มีแกนหลักประกอบด้วยวงแหวนไซโคลเฮกเซนต่อกับหมู่เมทอกซี ณ คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 แล้วคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับ 3 ต่อกับกรดอะมิโน ยกตัวอย่างเช่น ไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ซิโนริน พาไลทีน (palythine) และโฟไฟลาร์-334 เป็นต้น ลักษณะสมบัติทั่วไปของ MAA คือมีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก (น้อยกว่า 400 ดาลตัน) และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยอยู่ที่ 300 ดาลตัน (Sinha และคณะ, 1998) อย่างไรก็ตาม เร็วๆ นี้มีรายงานการพบ MAA ที่ถูกไกลโคซิเลทในไซยาโนแบคทีเรียชนิด *Nostoc commune* ซึ่งทำให้ได้ MAA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น ได้แก่ ไกลโคซิเลท-โฟไฟลาร์-334 และไกลโคซิเลท-พาไลทีน-ทรีโอนิน ซึ่งพบว่ามีมวลโมเลกุล 508 และ 612 ดาลตัน ตามลำดับ (Nazifi และคณะ, 2013) นอกจากนี้ยังพบ MAA ที่ถูกไกลโคซิเลทมีขนาดโมเลกุลสูงสุดถึง 1,050 ดาลตัน ที่ประกอบด้วยโครโมฟอร์สองชนิด คือ 3-อะมิโนไซโคลเฮกซีน-1-โอน (3-aminocyclohexen-1-one) และ 1,3-ไดอะมิโนไซโคลเฮกซีน (1,3-diaminocyclohexen) (Matsui และคณะ, 2011) (รูปภาพที่ 2.5) MAA เป็นสารไม่มีสีและละลายน้ำได้ ค่าการดูดซับสูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่น 310 ถึง 365 นาโนเมตร (Shick และ Dunlap, 2002; Carreto และ Carignan, 2011) ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสง (molar extinction coefficients, ϵ) สูงสุด อยู่ระหว่าง 28,100-50,000 $M^{-1}cm^{-1}$ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสงนั้น แสดงถึงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ และระยะทางที่แสงส่องผ่านสารละลายเป็น 1 เซนติเมตร



รูปภาพที่ 2.5 MAA ที่ถูกไกลโคซิเลทในไซยาโนแบคทีเรียชนิด *Nostoc commune* ซึ่งทำให้ได้ MAA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น ได้แก่ ไกลโคซิเลท-โพไฟลาร์-334 (ขนาด 508 ดาลตัน) (a) ไกลโคซิเลท-พาลีทิน-ทรีโอนีน (ขนาด 612 ดาลตัน) (b) และโครโมฟอร์สองชนิด คือ 3-อะมิโนไซโคลเฮกซีน-1-โอน และ 1,3-ไดอะมิโนไซโคลเฮกซีน (ขนาด 1,050 ดาลตัน) (c) (แหล่งที่มา: Matsui และคณะ, 2011; Nazifi และคณะ, 2013)

ปัจจุบันพบว่าสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสังเคราะห์ MAA โดยใช้สารตั้งต้นจากวิถีซีคิเมทหรือวิถีเพนโทส ฟอสเฟต เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย แบคทีเรีย รา ไดโนแฟลกเจลเลต สาหร่ายขนาดเล็ก และสาหร่ายขนาดใหญ่ เป็นต้น ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบ MAA มากกว่า 20 ชนิด (Rozema และคณะ, 2002; Singh และคณะ, 2008) (รูปภาพที่ 2.6) MAA ส่วนใหญ่ที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย คือ ซิโนรีน โพไฟลาร์-334 ไมโคสปอริน-ไกลซีน ยูฮาโลทีซ-362 (eualothece-362) แอสเทอรินา-330 (asterina-330) พาลีทินอล (palythinol) และไมโคสปอริน-2-ไกลซีน (Carreto และ Carignan, 2011; Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014)

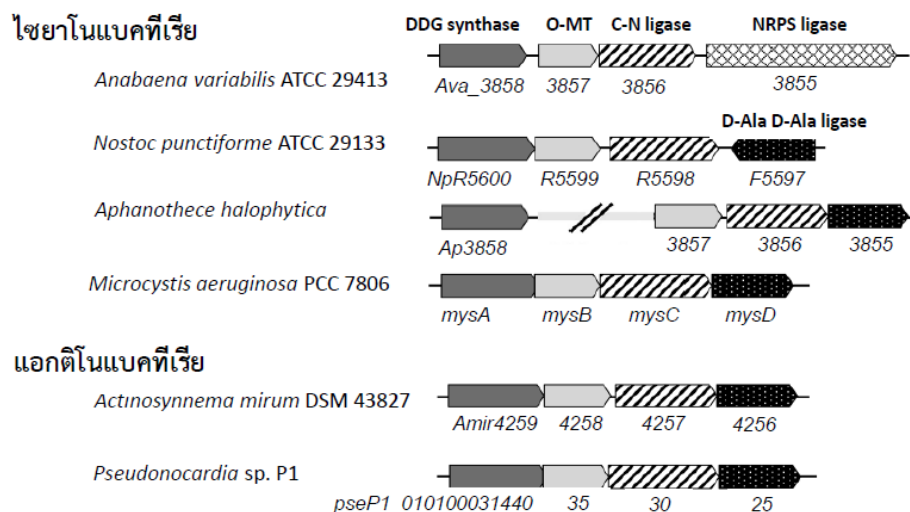


รูปภาพที่ 2.6 โครงสร้างและค่าการดูดซับรังสีสูงสุดของ MAA บางชนิด

(แหล่งที่มา: Rozema และคณะ, 2002)

2.3.2 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ MAA

จนถึงปัจจุบันมีการศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ MAA จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่พบในจีโนมสมบูรณ์และการหาลำดับเบสของยีนทั้งหมดด้วยวิธีช็อตกัน (shotgun genome sequencing) ของไซยาโนแบคทีเรียกับแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ *A. variabilis* ATCC 29413 (Balskus และ Walsh, 2010) *N. punctiforme* ATCC 29133 (Gao และ Garcia-Pichel, 2011) *A. halophytica* (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) *A. mirum* DSM 43827 *Pseudonocardia* sp. P1 (Miyamoto และคณะ, 2014) และ *M. aeruginosa* PCC 7806 (Hu และคณะ, 2015) พบกลุ่มยีนที่กำหนดรหัสการชีวสังเคราะห์ MAA ประกอบด้วยสี่ยีน คือ ยีนที่หนึ่งถึงยีนที่สามกำหนดรหัสให้เอนไซม์ชนิดเดียวกันในสิ่งมีชีวิตทั้งหกชนิด โดยยีนที่หนึ่ง ยีนที่สอง และยีนที่สาม ทำหน้าที่ในการกำหนดรหัสเอนไซม์ดีเมทิล-4-ดีออกซีกาตุซอล ซินเทส เอนไซม์โอเมทิลทรานเฟอเรส และเอนไซม์ซี-เอ็น ไลเกส ตามลำดับ ส่วนยีนที่สี่กำหนดรหัสเอนไซม์ต่างชนิดกัน โดยใน *N. punctiforme* ATCC 29133 *A. halophytica* *A. mirum* DSM 43827 *Pseudonocardia* sp. P1 และ *M. aeruginosa* PCC 7806 ยีนที่สี่ทำหน้าที่กำหนดรหัสเอนไซม์ดีอะลา-ดีอะลา ไลเกส ขณะที่ใน *A. variabilis* ATCC 29413 ยีนที่สี่ทำหน้าที่กำหนดรหัสเอนไซม์นอนโรโบโซมอล เปปไทด์ซินเทส (รูปภาพที่ 2.7)

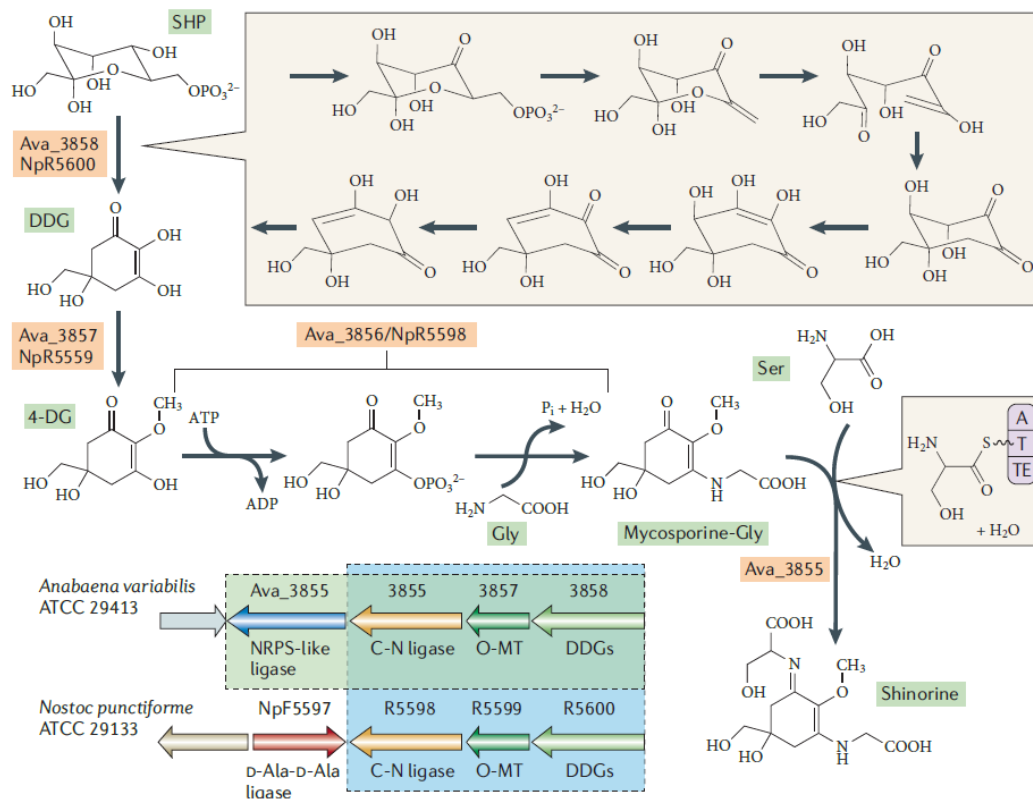


รูปภาพที่ 2.7 การจัดเรียงตัวของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์ MAA

(ดัดแปลงจากแหล่งที่มา: Miyamoto และคณะ, 2014; Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014)

2.3.3 วิธีชีวสังเคราะห์ MAA

วิธีชีวสังเคราะห์ MAA มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถี 4 เอนไซม์ โดยสารตั้งต้น คือ ซีโดเฮปทูลอส-7-ฟอสเฟต (รูปภาพที่ 2.8) เปลี่ยนไปเป็น 2-ดีเมทิล-4-ดีออกซีกาตุซอล ด้วยยีนที่หนึ่ง ซึ่งกำหนดรหัสให้ 2-ดีเมทิล-4-ดีออกซีกาตุซอล ซินเทส จากนั้น 2-ดีเมทิล-4-ดีออกซีกาตุซอล เปลี่ยนไปเป็น 4-ดีออกซีกาตุซอล จากยีนที่สอง ซึ่งกำหนดรหัสให้โอเมทิลทรานเฟอร์ส ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของ MAA และยีนที่สามที่กำหนดรหัส ซี-เอ็น ไกลเอส ซึ่งทำหน้าที่ในการเติมกรดอะมิโนไกลซีนให้แก่ 4-ดีออกซีกาตุซอล ได้เป็นไมโคสปอริน-ไกลซีน จากนั้น ยีนที่สี่ทำหน้าที่กำหนดรหัสให้แอนโรโบโซมอล เปปไทด์ซินเทส หรือ ดีอะลา ดีอะลา ไกลเอส ทำหน้าที่เติมกรดอะมิโนต่างชนิดกัน ถ้าใน *A. variabilis* ATCC 29413 *N. punctiforme* ATCC 29133 *A. mirum* DSM 43827 *Pseudocardia* sp. P1 และ *M. aeruginosa* PCC 7806 มีการเติมกรดอะมิโนเซอร์ริน เปลี่ยนไมโคสปอริน-ไกลซีน เป็นซีโนรีน ส่วนใน *A. halophytica* มีการเติมกรดอะมิโนไกลซีน เปลี่ยนไมโคสปอริน-ไกลซีน เป็นไมโคสปอริน-2-ไกลซีน



รูปภาพที่ 2.8 วิธีชีวสังเคราะห์ MAA ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสาย *A. variabilis* ATCC 29413 และ *N. punctiforme* ATCC 29133 (แหล่งที่มา: Gao และ Garcia-Pichel, 2011)

2.3.4 บทบาทหน้าที่อื่นของ MAA

นอกเหนือจากการทำหน้าที่หลักเป็นสารกรองรังสียูวี พบว่า MAA อาจมีบทบาทหน้าที่อื่นอีกด้วย การค้นพบครั้งแรกของสารกรองรังสียูวี MAA โดย Shibata และคณะ (1969) ในไซยาโนแบคทีเรีย พบว่าปริมาณรังสียูวีสัมพันธ์กับการสังเคราะห์และสะสม MAA ไว้ภายในเซลล์ ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหลายประเภท ได้แก่ ไดโนแฟลกเจลเลต *Phaeocystis pouchetii* และไดอะตอม *Guinardia striata* (Llewellyn และ Harbour, 2003) การเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมซีโนรีนในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. และ *Scytonema* sp. (Sinha และคณะ, 2001) และการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมซีโนรีนและไฟไฟลาร์-334 ในไดอะตอมที่ทวีปแอนตาร์กติก เป็นต้น (Helbling และคณะ, 1996) ดังนั้นจึงเป็นหลักฐานที่ชี้ชัดว่าการสังเคราะห์ MAA เกี่ยวข้องกับการป้องกันหรือคุ้มครองสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติจากรังสียูวี (Bracher และ Wiencke, 2000) นอกเหนือจากคุณสมบัติในการเป็นสารกรองรังสียูวีแล้ว MAA ยังมีหน้าที่หรือเกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่นๆ ดังนี้

MAA มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ของเรา ทั้งนี้เนื่องจากว่า MAA จัดว่าเป็นเครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical marker) ซึ่งใช้สำหรับศึกษาขั้นตอนการสืบพันธุ์และการสร้างสปอร์ของเราได้ เพราะว่าจะมีการสังเคราะห์ MAA ไว้รอบๆ โคลโลนี เพื่อป้องกันตัวเองจากรังสียูวี ขณะที่อัตราการผลิต MAA ได้มากหรือน้อยนั้นจะขึ้นอยู่กับความยาวคลื่น ความเข้มแสง และความเข้มข้นอาหารที่ได้รับ (Oren และ Gunde-Cimerman, 2007)

การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดย MAA บางชนิดสามารถดูดซับโฟตอนที่มีพลังงานสูงจากรังสียูวี แล้วปลดปล่อยพลังงานนั้นออกไปพร้อมกับทำลายสารอนุมูลอิสระ (scavenging of reactive oxygen species) ที่เกิดขึ้น เช่น โมเลกุลออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวไม่เข้าคู่ (singlet oxygen) อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide anions) ไฮโดรเปอร์ออกซิล (hydroperoxyl radicals) ไฮดรอกซิล (hydroxyl radicals) (Oren และ Gunde-Cimerman, 2007) จากการศึกษาพบการรายงานชนิดของ MAA ที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ ไมโคสปอริน-ไกลซีน โฟไฟลาร์-334 และซีโนรีน (Oyamada และคณะ, 2008)

การเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ (osmoprotectants) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำ และการเกิดพลาสโมไลซิส (plasmolysis) ของเซลล์ได้ เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะความเครียดจากเกลือ (Srivastava และคณะ, 2013) ยกตัวอย่างเช่น ไฮยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Euhalothece* sp. ที่แยกมาจากแร่ยิปซัมในทะเลสาบที่มีเกลือจำนวนมากในประเทศอิสราเอล (Oren, 1997; Oren และ Gunde-Cimerman, 2007) และไฮยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* ที่แยกมาจากทะเลสาบเดดซี (Dead Sea) (Waditee และคณะ, 2001) พบว่าไฮยาโนแบคทีเรียทนเค็มทั้งสองชนิดต่างก็มีการสะสมสาร MAA ไว้ภายในเซลล์

สาร MAA ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อความเครียดเนื่องมาจากความแห้งแล้ง (desiccation stress) ไฮยาโนแบคทีเรีย *N. commune* มีกลไกปกป้องเซลล์ในภาวะความเครียดจากความแห้งแล้ง ด้วยการสร้างเมทริกซ์หรือเปลือกหุ้มล้อมรอบตัวเซลล์ไว้ โดยโครงสร้างสามมิติของเมทริกซ์กับโปรตีน water stress protein (WspA) ขนาดโมเลกุล 33.6 กิโลดาลตัน จะไปรวมตัวกับ MAA หรือไฮโดรนิมิน และสารกรองรังสียูวีอื่นๆ ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Wright และคณะ, 2005)

การทนต่อภาวะความเครียดเนื่องมาจากความร้อน (thermal stress) มีหลักฐานน้อยมากที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการสะสม MAA กับภาวะความเครียดเนื่องมาจากความร้อน จนถึงปัจจุบันมีรายงานเพียงในปะการัง พบว่าปะการังสองชนิด คือ *Lobophytum compactum* กับ *Sinularia flexibilis* มีการสะสมปริมาณของ MAA เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นจาก 20 องศาเซลเซียส เป็น 32 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณที่เพิ่มขึ้นของ MAA ยังน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวี (Michalek-Wagner, 2001; Shick และ Dunlap, 2002) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Portwich กับ Garcia-Pichel (1999) พบว่าภาวะเนื่องมาจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นหรือ อุณหภูมิที่ต่ำลง (cold shock) ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ MAA ขึ้นในไฮยาโนแบคทีเรีย *Chlorogloeopsis* PCC 6912 ในทางตรงกันข้ามกัน กลับพบว่าภาวะความเครียดจากรังสียูวีและความเครียดจากเกลือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสม MAA ภายในเซลล์

การเป็นรงควัตถุในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เนื่องจาก MAA มีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสง (แต่เรืองแสงได้น้อย) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงให้ดีขึ้น โดย MAA ซึ่งเป็นสารเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้น (excitation) ด้วยรังสียูวีจะถูกดูดซับจากคลอโรฟิลล์ ดังนั้นจึงตั้งข้อสังเกตว่าอาจมีการถ่ายโอนพลังงานจาก MAA ไปยังคลอโรฟิลล์ได้ (Sivalingam และคณะ, 1976)

แหล่งเก็บสะสมไนโตรเจน เพราะว่า MAA จัดว่าเป็นสารประกอบไนโตรเจนชนิดหนึ่ง เนื่องจากโครงสร้างของ MAA นั้นประกอบด้วยอะตอมของไนโตรเจน 2 อะตอม ต่อโมเลกุล ดังนั้นจึงอาจสามารถจัดได้ว่า MAA ทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสะสมไนโตรเจนไว้ภายในเซลล์ (Peinado และคณะ, 2004; Korbee และคณะ, 2006)

งานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Waditee-Sirisattha และคณะ (2014) ตรวจสอบพบว่า *A. halophytica* มีชีวสังเคราะห์ MAA ชนิดที่แตกต่างจาก *A. variabilis* กับ *N. punctiforme* โดยสามารถสังเคราะห์และสะสม MAA ชนิดไมโคสปอริน-2-ไกลซีน นอกจากนี้ยังได้ทำการแยกกลุ่มยีนกำหนดรหัสและแสดงออกกลุ่มยีนดังกล่าวใน *E. coli* DH5 α และ *Synechococcus* sp. PCC 7942 ซึ่งพบว่าในเซลล์แสดงออก *E. coli* ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์เหนี่ยวนำให้มีการสะสมไมโคสปอริน-2-ไกลซีนได้ปริมาณมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาภาวะจากความเครียดอื่นๆ ในการเหนี่ยวนำการสร้างและสะสม MAA ในเซลล์แสดงออก *E. coli* และตรวจสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ MAA ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo*

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบและหาภาวะความเครียดที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แสดงออก *E. coli* สร้างไมโคสปอริน-2-ไกลซีนในปริมาณเพิ่มขึ้น
2. เพื่อวิเคราะห์ลักษณะสมบัติและเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอริน-2-ไกลซีนทั้งใน *in vitro* และ *in vivo*

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. กระดาษกรองขนาดรุกรุ่น 0.22 ไมครอน ของบริษัท Sartorius Stedim, USA
2. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) รุ่น X151/X171 ของบริษัท Olympus, Japan
3. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
4. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Sonicator) รุ่น SONOREX RX 100 ของบริษัท Bandelin Electronic, Germany
5. เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex, USA
6. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
7. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) รุ่น Hewlett Packard 1050
8. เครื่องนาโนดรอป 2000 (Nanodrop 2000 spectrophotometer) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
9. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R ของบริษัท Beckman, Germany
12. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries, USA
13. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น PHM-83 ของบริษัท Radiometer, Denmark

14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-240 ของบริษัท Shimadzu, Japan
15. เครื่องกลั่นระเหยสาร (vacuum dry) ของบริษัท Taitech, Japan
16. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) รุ่น Elx 800 ของบริษัท Bio-Tek Instrument, Canada
17. ชุดอุปกรณ์ทำ Electrophoresis รุ่น MJ-105 ของบริษัท Major Science, USA และเครื่องจ่ายไฟ รุ่น PowerPac™ HC ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
18. ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) รุ่น MiniPROTEAN II®Tetra Cell และเครื่องจ่ายไฟ รุ่น PowerPac™ HC ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
19. ตู้เขี่ยเชื้อ laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, Thailand และรุ่น H1 ของบริษัท Lab Service LTD part, Thailand
20. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
21. ตู้บ่มเชื้อ 5% CO₂ incubator รุ่น 311 ของบริษัท Thermo Electron Corporation, USA
22. ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น UE600 ของบริษัท Memmert, Germany
23. ถังเก็บไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) รุ่น 34HC ของบริษัท Taylor Wharton, USA
24. ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) รุ่น Pipetteman ของบริษัท Gilson, France
25. หลอดคิวเวตต์ (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA
26. อุปกรณ์นับเซลล์ (haemocytometer) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
27. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert, Germany
28. Power supply ของบริษัท Pharmacia, England

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, Germany

2. กรดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของบริษัท Merck, Germany
3. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
4. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Sigma, USA
5. คลอโรฟอร์ม (chloroform) ของบริษัท Katayama Chem, Japan
6. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของบริษัท Merck, Germany
7. ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล ของบริษัท Biolabs, England
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Sigma, USA
9. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS) ของบริษัท Amresco, USA
10. โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) ของบริษัท Sigma, USA
11. โซเดียมไนเตรท (sodium nitrate) ของบริษัท Sigma, USA
12. โซเดียมแอสซิเตท (sodium acetate) ของบริษัท Sigma, USA
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
14. ซอร์บิทอล (sobital) ของบริษัท Sigma, USA
15. แบคโตทริปโทน (Bacto tryptone) ของบริษัท Merck, Germany
16. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
17. ไดโปแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate, K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
18. ไดเมทิลซัลออกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ของบริษัท Sigma Aldrich, USA
19. ทวีน 20 (Tween20) ของบริษัท Amresco, USA
20. นมขาดมันเนย (skim milk) ของบริษัท HiMedia, India
21. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
22. ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Merck, Germany
23. ซีรั่มฟอสโฟโบวีน (Fetal bovine serum, FBS) ของบริษัท HyClone, England

24. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ของบริษัท Biolabs, England
25. โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
26. เมทานอล (methanol) ของบริษัท Merck, Germany
27. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ของบริษัท Merck, Germany
28. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ของบริษัท Merck, Germany
29. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA
30. โมโนโปแตสเซียมฟอสเฟต (monopotassium phosphate, KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
31. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Katayama Chem, Japan
32. ลิเทียมคลอไรด์ (LiCl) ของบริษัท Merck, Germany
33. วิตามินบี1 (thiamine) ของบริษัท Sigma, USA
34. สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ของบริษัท Sigma, USA
35. สีคูเมสซีบิลเลียนท์บลูจี-250 (coomassie brilliant blue G-250) ของบริษัท Sigma, USA
36. สีคูเมสซีบิลเลียนท์บลูอาร์-250 (coomassie brilliant blue R-250) ของบริษัท Sigma, USA
37. อะคริลาไมด์ (acrylamide) ของบริษัท Merck, USA
38. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท Katayama Chem, Japan
39. เอทิลเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ของบริษัท Sigma Aldrich, USA
40. เอทาลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) ของบริษัท Merck, Germany
41. แอซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) ของบริษัท Katayama Chem, Japan
42. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของบริษัท Katayama Chem, Japan
43. An antibody raised against 6-histidine ของบริษัท R&D systems, USA

44. An antibody raised against mouse ของบริษัท Biolabs, England
45. HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) ของบริษัท HyClone, England
46. Triton X-100 ของบริษัท Amersham Bioscience, England

3.3 เมมเบรน

1. PVDF/Nitrocellulose membrane ของบริษัท Millipore Cooperation, USA
2. YM-3 membrane, NMWCO 3 kDa ของบริษัท Sigma, USA

3.4 ชุดทดสอบสำเร็จ

1. ชุดทดสอบสำเร็จสำหรับเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอ (SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis kit) ของบริษัท Invitrogen, USA
2. ชุดทดสอบสำเร็จสำหรับสกัดเจล (Gel extraction kit) ของบริษัท Invitrogen, USA
3. ชุดทดสอบสำเร็จสำหรับสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction kit) ของบริษัท Invitrogen, USA
4. ชุดทดสอบสำเร็จสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ (easy-RED™ Total RNA extraction kit) ของบริษัท iNtRON Biotechnoligy, Korea

3.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะ

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ของบริษัท Biolabs, USA
2. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I ของบริษัท Biolabs, USA

3.6 สายพันธุ์จุลินทรีย์และพลาสมิด

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

| สายพันธุ์จุลินทรีย์และพลาสมิด | รายละเอียด | แหล่งที่มา/อ้างอิง |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>A. halophytica</i> | Halotolerant cyanobacterium | Waditee-Sirisattha และคณะ, 2001 |
| <i>E. coli</i> DH5 α | (ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>recA1endA1</i> <i>gyrA96 thi-l hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169) | Invitrogen, USA |
| <i>Ap3858-3855/pUC303</i> | 2.76 kb <i>Ap3858</i> (native promoter และ coding region of <i>Ap3858</i>) และ 3.63 kb <i>Ap3857-3855</i> (native promoter และ coding region of <i>Ap3857-3855</i>) cloned into pUC303 vector | Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014 |
| <i>Ap3857-3855/pUC303</i> | 3.63 kb <i>Ap3857-3855</i> (native promoter และ coding region of <i>Ap3857-3855</i>) cloned into pUC303 vector | Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014 |

3.7 วิธีดำเนินการทดลอง

3.7.1 การเลี้ยงเซลล์และเตรียมหัวเชื้อ *E. coli* DH5 α

นำเซลล์ควบคุม (เวกเตอร์ pUC303) และเซลล์แสดงออก หรือ เซลล์ *E. coli* DH5 α ที่มีเวกเตอร์ลูกผสมระหว่างเวกเตอร์ pUC303 กับกลุ่มยีนที่กำหนดรหัสชีวสังเคราะห์ไมโคสโพริน-2-ไกลซีน ประกอบด้วย 4 ยีน คือ ยีน Ap3858-Ap3855 (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) ไปกระจาย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลูเรียเบอร์ตานี (Luria-Bertani: LB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่มีสเตربتโตมัยซิน (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นแตะเชื้อและไปลาก (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีสเตربتโตมัยซิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นแตะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีสเตربتโตมัยซิน บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อเก็บไว้เป็นหัวเชื้อ (stock culture) สำหรับการศึกษาต่อไป

3.7.2 การเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียด

3.7.2.1 การเตรียมเซลล์สำหรับภาวะความเครียดจากเกลือ

3.7.2.1.1 โซเดียมคลอไรด์

เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยใส่หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่เตรียมจากข้อ 3.7.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และ LB สูตรที่เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.3 โมลาร์ และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ ที่มีสเตربتโตมัยซิน (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.2.1.2 โปแตสเซียมคลอไรด์

เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ โดยใส่หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่เตรียมจากข้อ 3.7.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ ที่มีสเตรปโตมัยซิน (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.2.1.3 ลิเทียมคลอไรด์

เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือลิเทียมคลอไรด์ โดยใส่หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่เตรียมจากข้อ 3.7.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้ลิเทียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ที่มีสเตรปโตมัยซิน (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.2.1.4 แคลเซียมคลอไรด์

เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือแคลเซียมคลอไรด์ โดยใส่หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่เตรียมจากข้อ 1.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่มีสเตรปโตมัยซิน (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.2.2 ภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง

เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง โดยใส่หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่เตรียมจากข้อ 3.7.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสเตรปโตมัยซิน

(ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสจนครบ 24 ชั่วโมง

3.7.2.3 ภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติก

เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติก โดยใส่หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่เตรียมจากข้อ 3.7.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสเตربتโตมัยซิน (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยใช้สูตรซอร์บิทอลแทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.2.4 ภาวะความเครียดจากออกซิเดชัน

เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากออกซิเดชัน เริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อโดยใส่หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่เตรียมจากข้อ 3.7.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Minimal Medium A (MMA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่มีสเตربتโตมัยซิน (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าความทึบแสง (optical density, OD) ที่ 620 นาโนเมตร ของเชื้อเท่ากับ 1 จากนั้นนำหัวเชื้อไปเจือจาง 10 เท่า อัตราส่วนปริมาตรหัวเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMA เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 4.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร โดยศึกษา 3 ภาวะ คือ ภาวะที่ไม่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ภาวะที่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.4 และ 4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.7.3 การติดตามการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์แสดงออก

การเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมกับเซลล์แสดงออกติดตามโดยการเปลี่ยนแปลงของค่าความทึบแสงที่ 620 นาโนเมตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยง โดยใช้เครื่องสเปก

โทรโฟโตมิเตอร์ แล้วพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทึบแสงที่ 620 นาโนเมตร (แกน y) กับ เวลา (แกน x) ส่วนปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ควบคุมกับเซลล์แสดงออก ทำการถูกศึกษาด้วยวิธี drop plate โดยทำการเจือจางเชื้อที่ผ่านความเครียดแบบต่างๆ ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยทำการปรับค่าความทึบแสงที่ 620 นาโนเมตรเท่ากับ 1.8 ของทุกตัวอย่าง ก่อนนำตัวอย่างไปเจือจางลงเป็นลำดับส่วน โดยจะหยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง (dilution level) ที่ 10^4 , 10^5 และ 10^6 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (สูตร LB ขึ้นอยู่กับภาวะความเครียดที่ศึกษา) จำนวน 5 จุด ต่อแต่ละระดับการเจือจาง โดยแต่ละจุดใช้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เมื่อนับจำนวนโคโลนีทั้ง 5 จุดรวมกันในแต่ละระดับการเจือจาง สามารถคำนวณปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์จากจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (Colony Forming Unit, CFU) ต่อมิลลิลิตร สำหรับในภาวะความเครียดจากออกซิเดชันจะคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต} = \left[\frac{\text{CFU ต่อมิลลิลิตร}_{\text{หลัง}}}{\text{CFU ต่อมิลลิลิตร}_{\text{ก่อน}}} \right] \times 100$$

3.7.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์น บลอต (Western Blot) (Sambrook และคณะ, 1989)

3.7.4.1 การสกัดแยกโปรตีนจากตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกจากการเลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดต่างๆ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ล้างด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ และทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) กำหนดค่าแอมพลิจูด (amplitude) 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที พัลส์ (pulse) 15/5 วินาที เก็บน้ำส่วนใสที่ได้จากการแตกเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีเบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน ตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 2-14 ไมโครกรัมโปรตีนต่อไมโครลิตร

3.7.4.2 การทำโซเดียมซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) และเวสเทิร์น บลอต

เตรียมเจลสำหรับทำโซเดียมซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส SDS-PAGE โดยเจลสำหรับการทำ SDS-PAGE นั้นจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือสารละลายเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ที่มีความเข้มข้น 12.5% (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) และสารละลายสแต็กกิงเจล (stacking gel) ที่มีความเข้มข้น 5% (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) ลำดับต่อมานำเจลที่เตรียมได้มา ประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโทรฟอเรซิส และเติมรันนิ่งบัฟเฟอร์ (running buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 12) ลงในชุดทำอิเล็กโทรฟอเรซิสจนเต็ม แล้วนำโปรตีนตัวอย่างที่ทำบริสุทธิ์แล้วจากข้อ 3.7.4.1 มาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 30 ไมโครกรัม และหยดโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นทำอิเล็กโทรฟอเรซิสที่ 250 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที

การวิเคราะห์เวสเทิร์น บลอตใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมจากยีน *Ap3858-55* ที่ติดฉลากด้วย 6x histidine tag ซึ่งหลังจากทำการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้ว จะย้ายโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF และทำการบลอตที่ 100 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาที ป้องกันการเกิด non-specific โปรตีนอื่นๆ เข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายskim milk (skim milk) 5% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมานำแผ่นเมมเบรนไปบ่มกับ แอนติบอดีปฐุมภูมิ (an antibody raised against 6-histidine, 6X-His tag) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีหุติยภูมิ (an antibody raised against mouse) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 รอบ ตรวจสอบผลโดยแช่แผ่นเมมเบรนลงในสารละลายที่จำเพาะต่อ เอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase, AP) หรือฮอสมเรดิชเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase, HRP) เป็นเวลา 10 นาที

3.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณไมโคสปอริน-2-ไกลซีน

3.7.5.1 การสกัดไมโคสปอริน-2-ไกลซีน

เก็บเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกจากการเลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากข้อ 3.7.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดน้ำส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 จำนวน 2 ครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วย 99% เมทานอล ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บน้ำส่วนใสที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำน้ำส่วนใสระเหยด้วยเครื่องระเหยที่อุณหภูมิห้องเพื่อกำจัดเมทานอล แล้วนำสารที่เหลือจากการระเหยมาละลายน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บน้ำส่วนใสที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้กรองผ่านเมมเบรน YM-3 (Millipore, USA) ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บน้ำส่วนใสที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.7.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ด้วยเครื่อง HPLC โดยการฉีดสารตัวอย่างจำนวน 30 ไมโครลิตร ไปยังคอลัมน์ Shim-pack FC-ODS reverse phase (3 ไมโครเมตร; 150 × 4.6 มิลลิเมตร) ที่มีอัตราการไหล 0.4 มิลลิตรต่อนาที โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1% ฟลูออโรอะซีติกแอซิดในน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง และ 0.1 โมลาร์ pH 6.5 แอมโมเนียมอะซิเตท (วิเคราะห์ผลที่ความยาวคลื่น 330 และ 280 นาโนเมตร)

3.7.6 การศึกษาระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนที่กำหนดรหัสชีวสังเคราะห์ไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ในเซลล์แสดงออก

3.7.6.1 สกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนเป็นซีดีเอ็นเอของเซลล์แสดงออก

สกัดอาร์เอ็นเอของเซลล์แสดงออก *E. coli* DH5 α ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดที่ต้องการศึกษา โดยใช้ปริมาณเซลล์ประมาณ 20 มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์เปียก ทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วคูดน้ำส่วนใสทิ้ง แล้วทำการสกัดอาร์เอ็นเอของเซลล์ที่ได้ด้วยชุดทดสอบสำเร็จ easy-RED™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea) ตามวิธีการของผู้ผลิต เก็บรักษาอาร์เอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอโดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอตั้งต้น 1,000 นาโนกรัม เป็นซีดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบสำเร็จ SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต เก็บรักษาซีดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและวิเคราะห์กลุ่มยีนที่กำหนดรหัสชีวสังเคราะห์สารโมโคสปอรีนในเซลล์แสดงออก

3.7.6.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนสี่ยีนคือ *Ap3858* ถึง ยีน *Ap3855* (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) จะถูกใช้ในการตรวจสอบระดับการแสดงออก และยีน 16s rRNA ของ *E. coli* จะถูกใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ดังแสดงในตาราง 3.2

ตารางที่ 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนสี่ยีน

| โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ | 5' - 3' | คู่เบส |
|----------------------------|--------------------------------|----------|
| PCR <i>Ap3858</i> F | GGATCCAATGACGAAAACAACCTCTGC | 27 เมอร์ |
| PCR <i>Ap3858</i> R | TGAGGATCGGTTTCCACAAG | 20 เมอร์ |
| PCR <i>Ap3857</i> F | GGATCCAATGACGATCACTAACGATAAAC | 29 เมอร์ |
| PCR <i>Ap3857</i> R | ATGCAGAATAGCCCCTAAAC | 20 เมอร์ |
| PCR <i>Ap3856</i> F | GGATCCAATGCTTCTATTTGTCCGAGG | 27 เมอร์ |
| PCR <i>Ap3856</i> R | ATAGTAACTAGAAACGGGAC | 20 เมอร์ |
| PCR <i>Ap3855</i> F | GGATCCA ATGTCTTTATTACGAGTTTTAC | 29 เมอร์ |
| PCR <i>Ap3855</i> R | AAGCCTGTCTGTAACGCTGC | 20 เมอร์ |
| PCR 16srRNA F | AGCCACACTGGAACGAGAC | 20 เมอร์ |
| PCR 16srRNA R | CATCTGACTTAACAAACCGCCTG | 23 เมอร์ |

3.7.6.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่สนใจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะจากข้อ 3.7.6.2 แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 1.2% อะกาโรสเจลที่ถูกย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์หรือสีไซโตเบอร์เซฟ (SYBR safe) (Invitrogen, USA) เพื่อวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายจากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยโปรแกรม GelQuant.NET

3.7.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสפורิน-2-ไกลซีน โดยการวิเคราะห์ในระดับ *in vitro* และ *in vivo*

3.7.7.1 การเตรียมไมโคสפורิน-2-ไกลซีน จากเซลล์แสดงออก

เตรียมไมโคสפורิน-2-ไกลซีนความบริสุทธิ์สูง ปริมาณ 100 ไมโครกรัม จากเซลล์แสดงออกที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่เพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.5 โมลาร์ ทำการแยกไมโคสפורิน-2-ไกลซีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ HPLC ตามขั้นตอน 3.7.5.2 วิเคราะห์และยืนยันความบริสุทธิ์โดย HPLC และ time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS)

3.7.7.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสפורิน-2-ไกลซีน ในระดับ *in vitro* ด้วยการวิเคราะห์ดีพีพีเอช (DPPH assay)

สารมาตรฐาน MAA 5 ชนิด ได้แก่ ไมโคสפורิน-2-ไกลซีนที่ได้จาก 3.7.7.1 ซิโนริน พาไลทีน โฟไฟลาร์-334 และไมโคสפורิน-ไกลซีน และกรดแอล-แอสคอร์บิก หรือ วิตามินซี เป็นตัวควบคุมบวก ใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร่วมกับ เดิมสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพควิไฮดราซิล (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) ในตัวทำละลายเอทานอลกับน้ำปอดประจุ (อัตราส่วน 1:1) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เดิมสารละลายที่ใช้ทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มภายใต้ความมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (% scavenging activity, SC₅₀) (Ou และคณะ, 2014) ตามสมการดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

กำหนดให้ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร
 ควบคุม (control) = ปฏิกริยาควบคุมที่ไม่มีการเติมตัวอย่างทดสอบ
 ตัวอย่าง (sample) = ปฏิกริยาทดสอบที่มีการเติมตัวอย่าง

3.7.7.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสפורิน-2-ไกลซีน โดย in vivo

3.7.7.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ A-375

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งจากเซลล์เมลาโนซัยต์ของมนุษย์ A-375 (ATCC® CRL-1619™) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่เติมฟีทาลโบไวน์ซีรัม (Fetal bovine serum, FBS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร HEPES ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสเตโรบิโตมายซิน/เพนนิซิลิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนเซลล์เกาะเต็มพื้นผิวภาชนะ จากนั้นเก็บเซลล์ด้วยการเติมทริปซิน-อีดีทีเอ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที สุกทำยาล้างและกระจาย (disperse) เซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (complete medium)

3.7.7.3.2 การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ A-375 ด้วยการวิเคราะห์เอ็มทีที (MTT assay)

การวิเคราะห์ MTT เป็นหลักการวัดปฏิกิริยารีดักชันของเอนไซม์ไมโทคอนเดรียดีไฮโดรจีเนสในเซลล์ที่มีชีวิต โดย MTT จะถูกรีดิวซ์ให้สีของ MTT เปลี่ยนเป็นสีม่วงของฟอร์มาซัน (formazan) (Mosmann, 1983) เซลล์ A-375 ถูกปีเปตต์ลงในหลุมไมโครเพลทชนิด 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 25,000 เซลล์ต่อหลุม) บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืนเพื่อให้เซลล์เกาะที่พื้นผิว จากนั้นเติมสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คือ ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน (ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ความเข้มข้น 10 และ 25 ไมโครโมลาร์) และกรดแอล-แอสคอร์บิก (ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์) เป็นตัวควบคุมบวก บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย MTT ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ละลายผลึกฟอร์มาซันด้วยสารละลาย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) ตามสมการดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต} = \left[\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

| | | |
|----------|-------------------|---------------------------------------------|
| กำหนดให้ | A | = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร |
| | ควบคุม (control) | = ปฏิบัติควบคุมที่ไม่มีการเติมตัวอย่างทดสอบ |
| | ตัวอย่าง (sample) | = ปฏิบัติทดสอบที่มีการเติมตัวอย่าง |

3.7.7.3.3 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ A-375

นำเซลล์ A-375 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะเติมสารละลาย MTT ไปตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบไบรท์ฟิลด์ (bright field)

3.7.7.3.4 การประเมินความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์โคเมท

(Comet assay)

การตรวจหาความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยวิธี Single Cell Gel Electrophoresis หรือ Comet assay (Tice และคณะ, 2000; Collins, 2004) ทำโดยนำเซลล์ A-375 ทดสอบด้วยไมโครสปอริน-2-ไกลซีน ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ กรดแอล-แอสคอร์บิก ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการมีไมโครสปอริน-2-ไกลซีนหรือที่กรดแอล-แอสคอร์บิก จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาทำการขูดเซลล์ออกจากจานเลี้ยงเซลล์อย่างเบา ๆ (scrape) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วละลายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำเซลล์ที่มีความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรไปผสมกับอะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ (low-melting temperature agarose) 0.8% แล้วฝังเซลล์ลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยอะกาโรสเจล 1% ทำการปิดทับด้วยอะกาโรสเจล 1% เป็นชั้นสุดท้าย จากนั้นนำสไลด์ไปแช่ในสารละลายไลซิส (NaCl 2.5 โมลาร์, EDTA 0.1 โมลาร์ และ Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสไลด์ที่ผ่านกระบวนการไลซิส แล้วแช่ลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์อัลคาไลน์ (NaOH 300 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ pH 13) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เกิดการแยกของสายดีเอ็นเอ นำสไลด์ไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 35 โวลต์ 300 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 20 นาที และย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และวัดทางที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม cell A เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

บทที่ 4

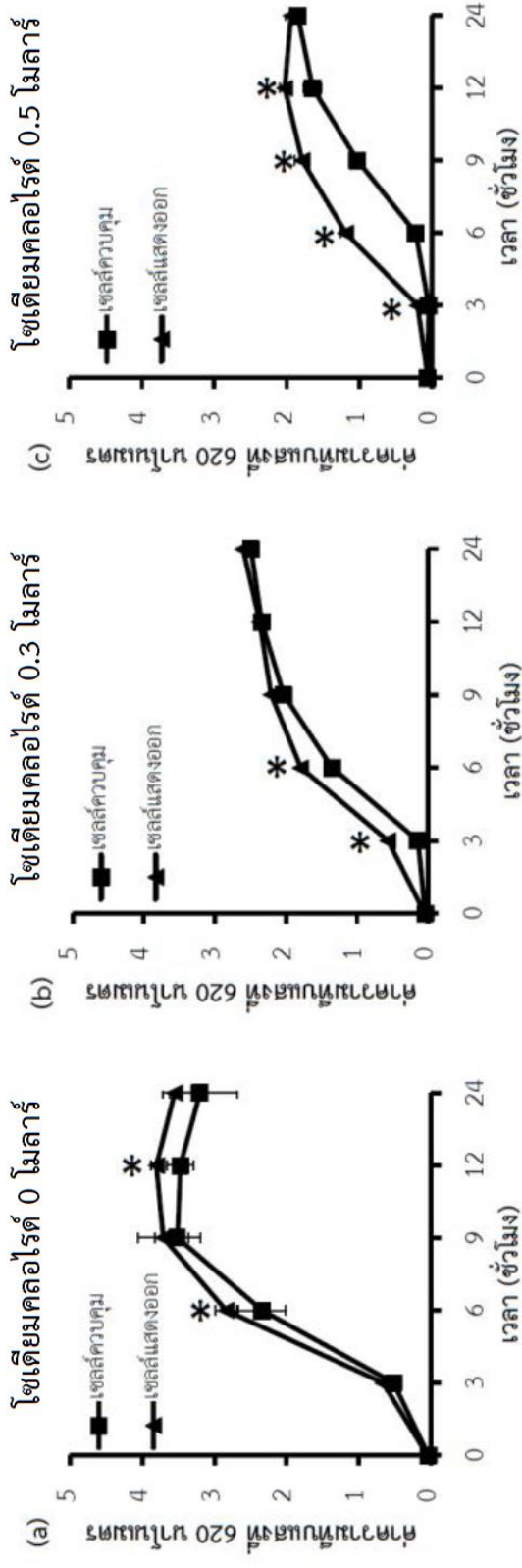
ผลการทดลอง

4.1 การติดตามการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์แสดงออก

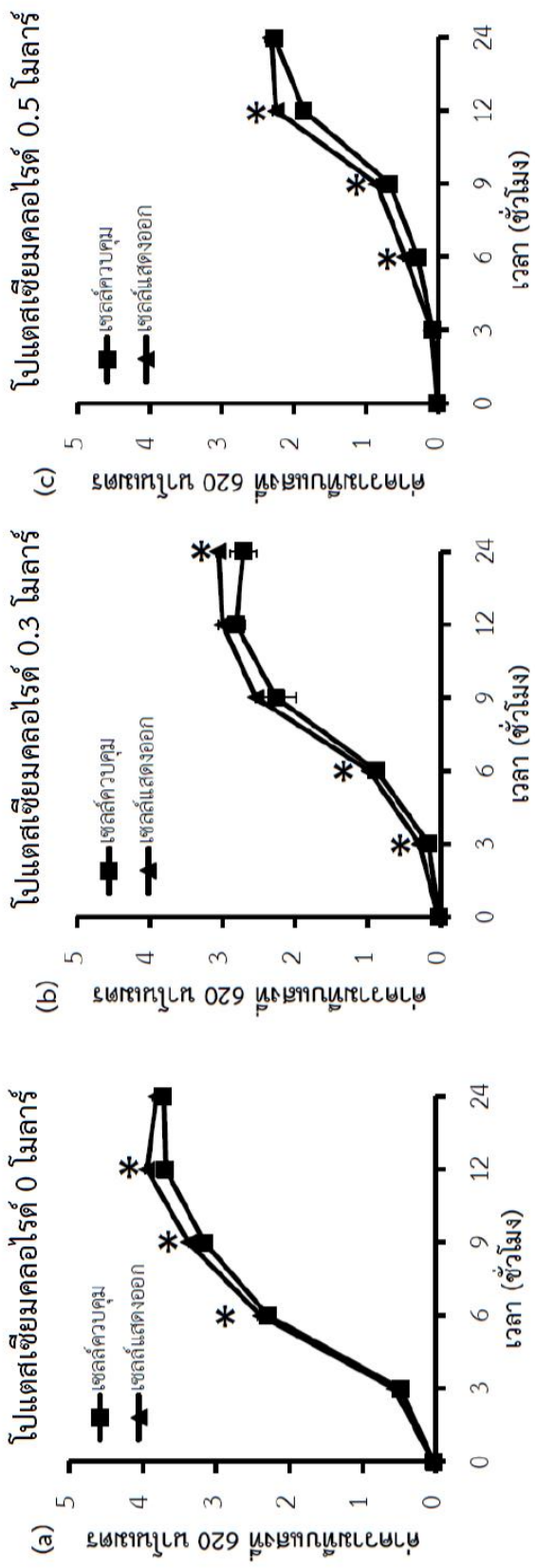
การเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกถูกติดตามในภาวะความเครียด 3 ภาวะ คือ ภาวะความเครียดจากเกลือ ภาวะความเครียดจากอนุมูลสูง และภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติก (รูปภาพที่ 4.1-4.4) ซึ่งทำการติดตามการเจริญเติบโตจากการเปลี่ยนแปลงของค่าความทึบแสงที่ 620 นาโนเมตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-24 ชั่วโมงของการเลี้ยง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทึบแสงที่ 620 นาโนเมตร (แกน y) กับเวลา (แกน x)

ผลของความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (รูปภาพที่ 4.1, (a)-(c)) แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำ (อาหารเลี้ยงเชื้อ LB) เซลล์ทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตเมื่อติดตามด้วยความชุ่มใกล้เคียงกันมาก ความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 2 ชุด เห็นได้ชัดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.5 โมลาร์ (รูปภาพที่ 4.1(c)) กล่าวคือ เซลล์แสดงออกสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วกว่าเซลล์ควบคุม ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะพักตัว (stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9) การทดลองทางสถิติด้วย Student T-test แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

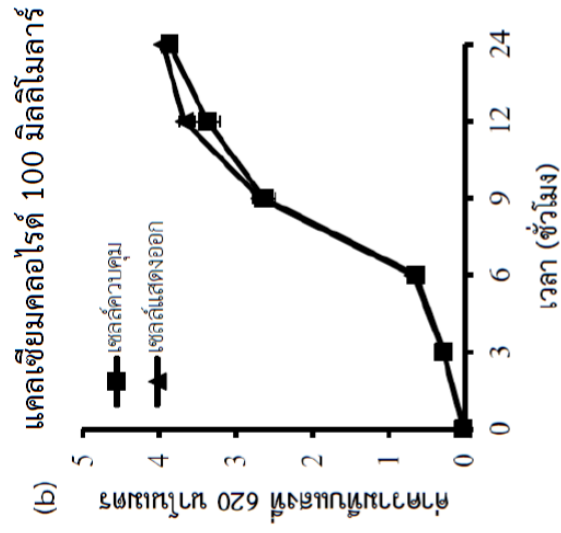
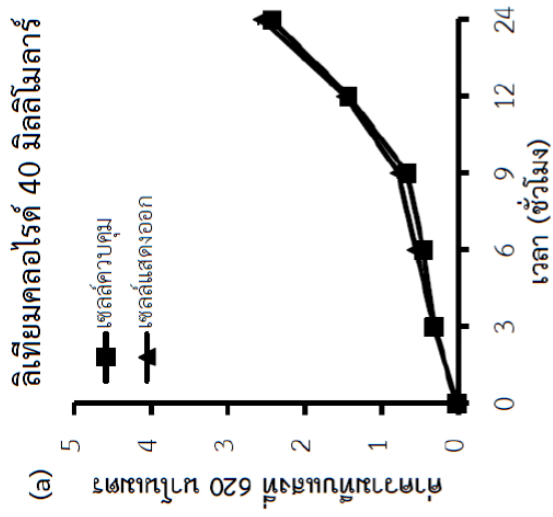
ผลของความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ (รูปภาพที่ 4.2, (a)-(c)) พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำและเกลือสูง เซลล์แสดงออกมีความชุ่มมากกว่าเซลล์ควบคุมเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อทดสอบด้วย T-test แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับความเครียดจากแรงดันออสโมติก (รูปภาพที่ 4.4, (b)-(c)) เซลล์แสดงออกมีความชุ่มมากกว่าเซลล์ควบคุมเพียงเล็กน้อย เมื่อทดสอบด้วย T-test แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนความเครียดจากเกลือลิเทียมคลอไรด์ (รูปภาพที่ 4.3 (a)) ความเครียดจากเกลือแคลเซียมคลอไรด์ (รูปภาพที่ 4.3 (b)) และความเครียดจากอนุมูลสูงที่ทำการเปลี่ยนจากอนุมูล 37 องศาเซลเซียส เป็น 42 องศาเซลเซียส (รูปภาพที่ 4.4(a)) ทั้งสองกลุ่มมีการเจริญเติบโตไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการทดสอบด้วยสถิติ Student T-test ($p < 0.05$)



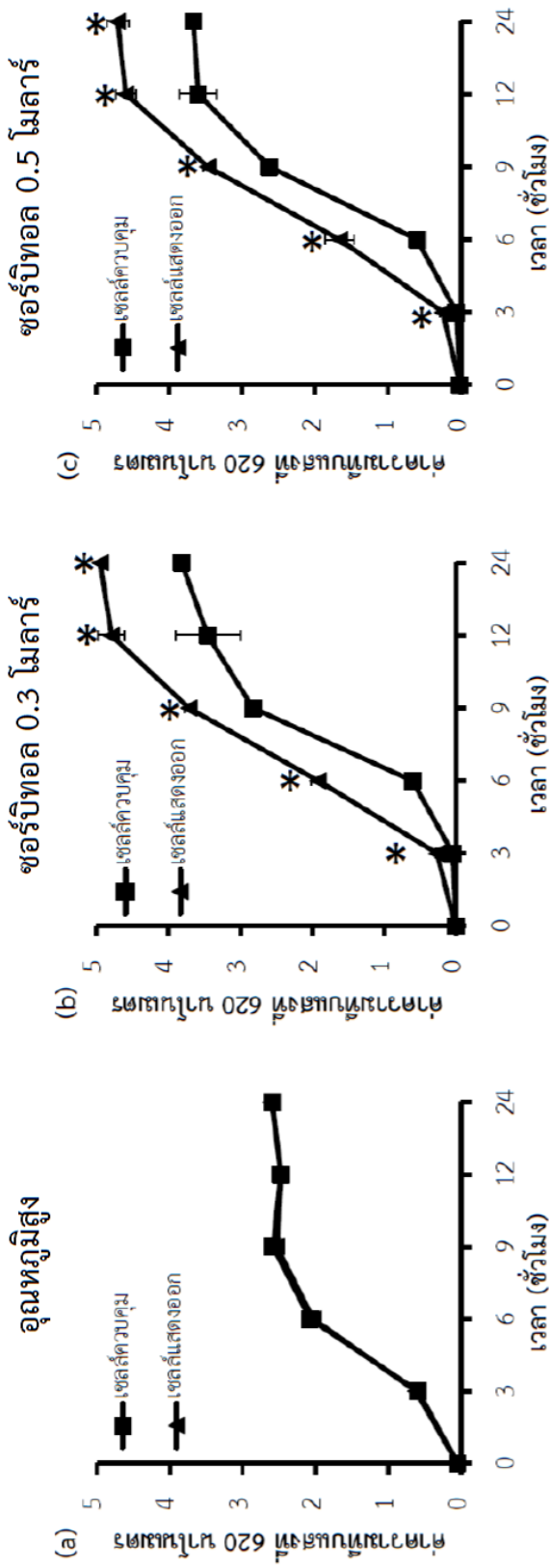
รูปภาพที่ 4.1 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (นำพายีน Ap3858-3855) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และ LB สูตรที่เพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.3 โมลาร์ และ 0.5 โมลาร์ โดยเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a); เซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่เพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (b) และ เซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่เพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (c) ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย T-test ($p < 0.05$)



รูปภาพที่ 4.2 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (นำพายีน Ap3858-3855) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลลาร์ โดยเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 โมลลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a); LB สูตรที่ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (b) และเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (c) ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย T-test ($p < 0.05$)



รูปภาพที่ 4.3 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (นำพายีน Ap3858-3855) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้ ลิเทียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a) และเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (b) ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปภาพที่ 4.4 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (นำพายีน *Ap3858-3855*) ในภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง (เปลี่ยนจาก 37°C เป็น 42°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a); ในภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้ซอร์บิทอลแทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (b) และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB สูตรที่ใช้ซอร์บิทอลแทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (c) ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย T-test ($p < 0.05$)

หลังจากการตรวจสอบรูปแบบการเจริญของเซลล์โดยการติดตามค่าความขุ่น จากนั้นได้ใช้เทคนิค drop plate เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ควบคุมกับเซลล์แสดงออก เนื่องจากการติดตามความขุ่นไม่สามารถแยกความแตกต่างของเซลล์ที่ตายกับเซลล์ที่รอดชีวิต ทำการ drop plate โดยทำการเจือจางเชื้อที่ผ่านความเครียดแบบต่างๆ ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เจือจางตัวอย่างลงเป็นลำดับส่วน โดยทำการหยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่ 10^4 , 10^5 และ 10^6 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (สูตร LB ขึ้นอยู่กับภาวะความเครียดที่ศึกษา) จำนวน 5 จุด ต่อแต่ละระดับการเจือจาง แต่ละจุดใช้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาข้ามคืน

จากนั้นนับจำนวนโคโลนีทั้ง 5 จุดรวมกันในแต่ละระดับการเจือจาง ทำการหาค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ และนำมาคำนวณหาปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์จากค่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (Colony Forming Unit, CFU) ต่อมิลลิลิตร

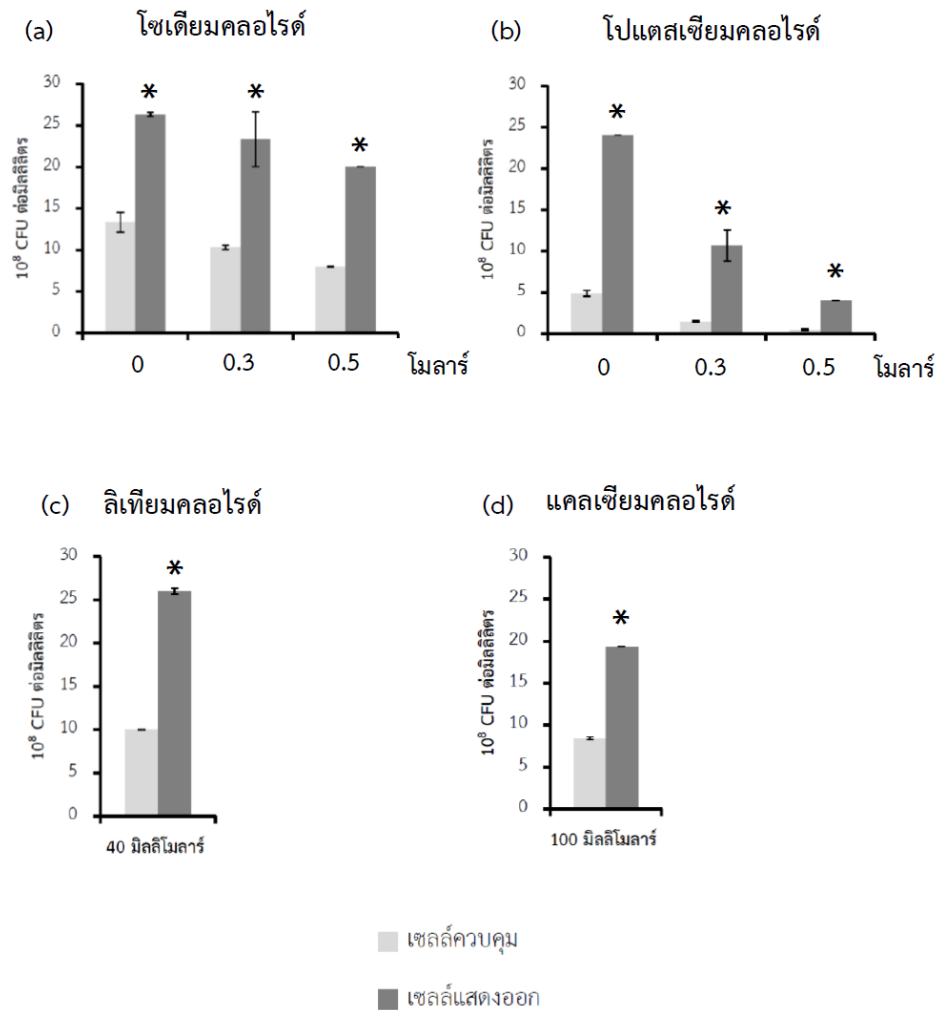
ผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพที่ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญพบว่าปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตระหว่างเซลล์ควบคุมกับเซลล์แสดงออก ในภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ เซลล์แสดงออกมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าเซลล์ควบคุมเท่ากับ 2.0, 2.3 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ (a) ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ เซลล์แสดงออกมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าเซลล์ควบคุมเท่ากับ 4.9, 7.2 และ 8.6 เท่า ตามลำดับ (b) นอกจากนี้ภาวะความเครียดจากเกลือลิเทียมคลอไรด์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 2.6 เท่า (c) และภาวะความเครียดจากเกลือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 2.3 เท่า (d)

ผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพที่ 4.6 กรณีภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูงเซลล์แสดงออกมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าเซลล์ควบคุมเท่ากับ 2.1 เท่า (a) และภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติกที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 โมลาร์ เซลล์แสดงออกมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าเซลล์ควบคุมเท่ากับ 1.3 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ (b) สุดท้ายคือภาวะความเครียดจากออกซิเดชัน โดยนำหัวเชื้อไปเจือจาง 10 เท่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMA ซึ่งทำการศึกษา 3 ภาวะ คือ ภาวะที่ไม่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ภาวะที่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.4 และ 4 มิลลิโมลาร์ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30

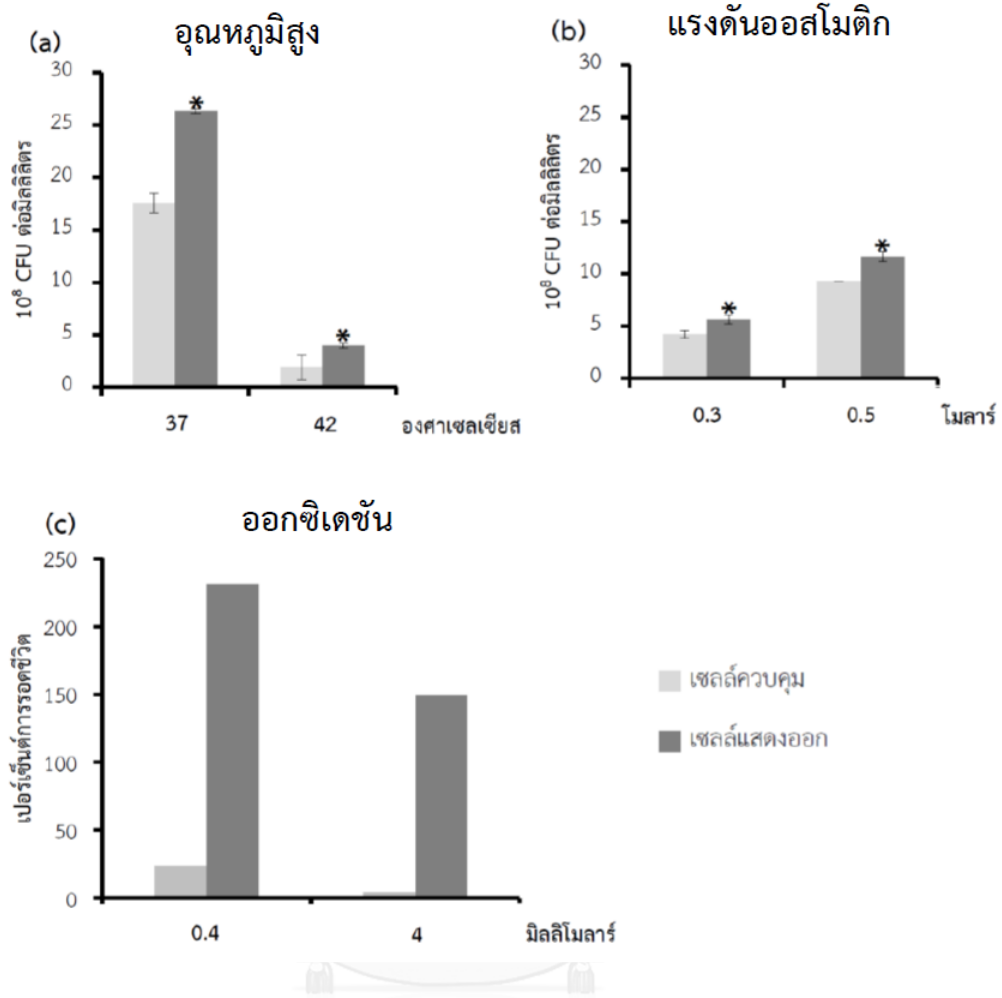
นาที และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตโดยใช้สูตรที่แสดงในวัสดุและวิธีการทดลอง

เมื่อทำการทดสอบทางสถิติด้วย Student T-test พบว่าทุกภาวะที่ทดสอบเซลล์แสดงออกมีเปอร์เซ็นต์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าเซลล์ชุดควบคุม ขณะเดียวกันเมื่อเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นมากลงไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMA ทั้งเซลล์ควบคุมกับเซลล์แสดงออกต่างมีเปอร์เซ็นต์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตต่ำมาก (c)





รูปภาพที่ 4.5 ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (ยีน *Ap3858-3855*) ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (a); ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ (b) ภาวะความเครียดจากเกลือลิเทียมคลอไรด์ (c) และภาวะความเครียดจากเกลือแคลเซียมคลอไรด์ (d) โดยแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย T-test ($p < 0.05$)



รูปภาพที่ 4.6 ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ควบคุมและเซลล์แสดงออก (ยีน *Ap3858-3855*) ภายใต้ภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง (a); ภาวะความเครียดจากเกลือแรงดันออสโมติก (b) และ เปอร์เซ็นต์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ภายใต้ภาวะความเครียดจากออกซิเดชัน (c) โดยแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย T-test ($p < 0.05$)

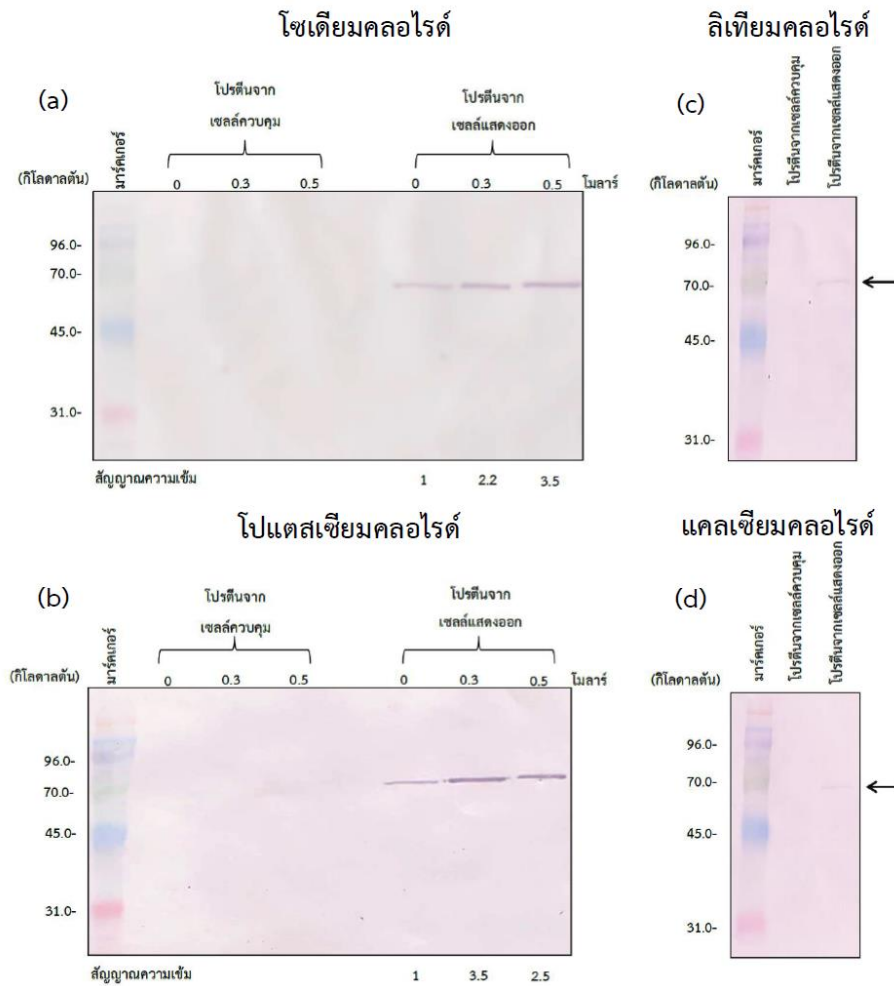
4.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์น บลอท

จากผลการทดลองในส่วน 4.1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์แสดงออก *E. coli* (นำพายีน *Ap3858-Ap3855*) สามารถทนต่อความเครียดจากเกลือ ความเครียดจากอุณหภูมิสูง ความเครียดจากแรงดันออสโมติก และความเครียดจากออกซิเดชันได้มากกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนการทดลองต่อไปนี้จะทำการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกแปลรหัสมาจากยีน *Ap3858-Ap3855* โดยวิธีเวสเทิร์น บลอท เพื่อเปรียบเทียบและยืนยันว่าการทนต่อความเครียดที่มากขึ้นในเซลล์แสดงออกน่าจะเกิดขึ้นเนื่องจากการการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกแปลรหัสมาจากยีน *Ap3858-Ap3855* โดยโปรตีนมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 64.5 กิโลดาลตัน (โปรตีนเชื่อมของ *Ap3858* กับ *His6* ที่ปลายด้าน C) และมีขนาดมวลโมเลกุล 37.3 กิโลดาลตัน (โปรตีนลูกผสมระหว่าง *Ap3857-3855* กับ *His6*) สัญญาณเวสเทิร์น บลอท ที่แสดงในการทดลองนี้คือ โปรตีนเชื่อมของ *Ap3858* กับ *His6* สำหรับสัญญาณโปรตีนลูกผสมระหว่าง *Ap3857-3855* กับ *His6* ปรากฏแถบขนาด 37.3 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นสัญญาณที่อ่อนมาก (จะไม่แสดงในที่นี้) การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนเริ่มจากการนำเซลล์ที่เจริญภายใต้ภาวะความเครียดในส่วนการทดลอง 4.1 มาทำให้แตก และเก็บส่วนใสมาตรวจสอบความเข้มข้นและใช้ปริมาณของทุกตัวอย่างให้เท่ากับ 30 ไมโครกรัม ทำการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE จากนั้นทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของโปรตีน *Ap3858-3855* โดยวิธีเวสเทิร์น บลอท (เนื่องจากโปรตีนเชื่อมของ *Ap3858* กับ *His6* และโปรตีนเชื่อมของ *Ap3857-3855* กับ *His6* ที่ปลายด้าน C) จากการทำเวสเทิร์น บลอทพบว่าภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์และโปแตสเซียมคลอไรด์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

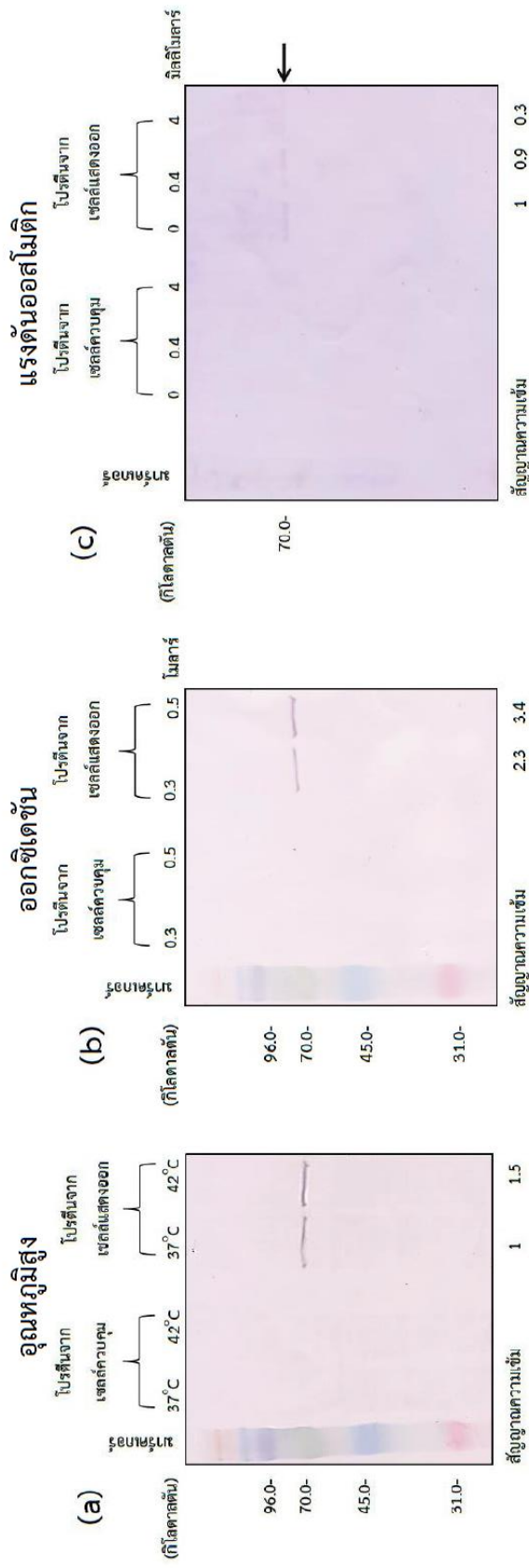
ผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพ 4.7(a) ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 โมลาร์ มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณเป็น 2.2 และ 3.5 เท่า ตามลำดับ และภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 โมลาร์ มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณเป็น 3.5 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ (รูปภาพที่ 4.7(b)) โดยทำการเปรียบเทียบสัญญาณของโปรตีนกับความเข้มข้นเกลือที่ 0 โมลาร์ ซึ่งผลการทดลองของเวสเทิร์น บลอท เซลล์ชุดควบคุมไม่เกิดสัญญาณเมื่อทำเวสเทิร์น บลอท

ผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพ 4.8(a) ภายใต้ภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูงที่ 42 องศาเซลเซียส มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณเป็น 1.5 เท่า โดยทำการเปรียบเทียบสัญญาณของโปรตีนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติกที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 โมลาร์ มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณเป็น 2.3 และ 3.4 เท่า ตามลำดับ โดยทำการเปรียบเทียบสัญญาณของโปรตีนกับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 โมลาร์ (รูปภาพที่ 4.8(b)) และภาวะความเครียดจากออกซิเดชันที่ความเข้มข้น 0.4 และ 4 มิลลิโมลาร์ มีการลดลงของสัญญาณเป็น 0.9 และ 0.3 เท่า ตามลำดับ (รูปภาพที่ 4.8(c)) โดยทำการเปรียบเทียบสัญญาณของโปรตีนกับความเข้มข้นที่ 0 โมลาร์ (ไม่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) ซึ่งผลการทดลองของเวสเทิร์น บลอต เซลล์ชุดควบคุมไม่เกิดสัญญาณเมื่อทำเวสเทิร์น บลอต





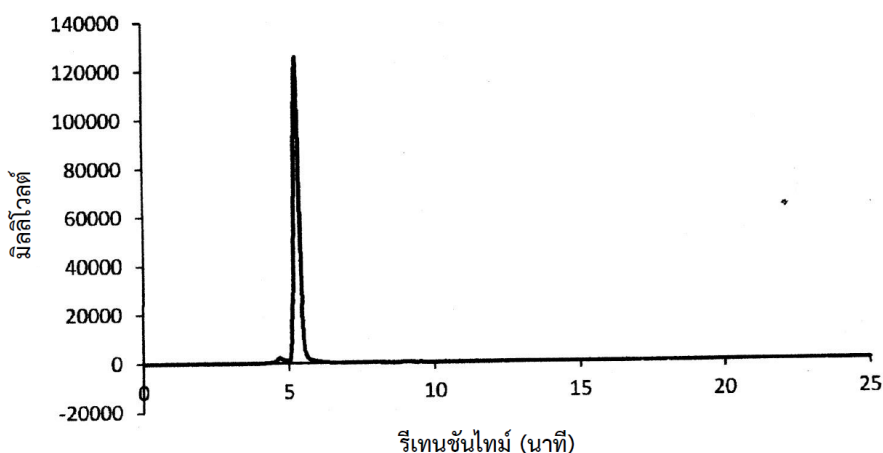
รูปภาพที่ 4.7 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Ap3858 โดยวิธีเวสเทิร์น บลอต ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (a); ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (b); ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือลิเทียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ (c) และภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (d) ทำการแยกโปรตีนบน 12.5% SDS-PAGE และตรวจสอบสัญญาณการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอต ถูกพัฒนาโดยสีอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส



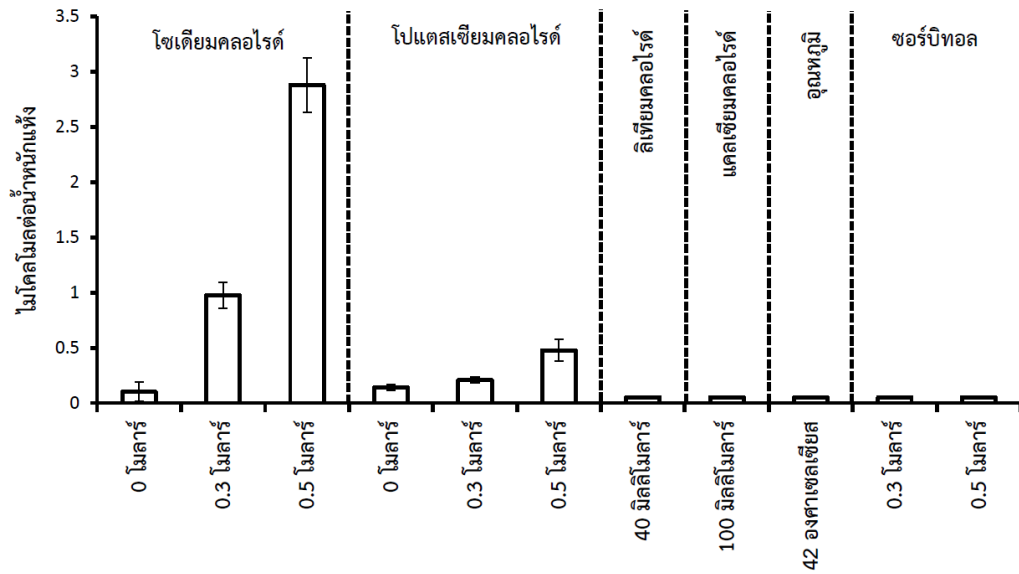
รูปภาพที่ 4.8 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Ap3858 โดยวิธีเวสเทิร์น บลอต ภายใต้ภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง (a); ภายใต้ภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติกที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 ไมคราร์ (b) และภายใต้ภาวะความเครียดจากออกซิเดชันที่ความเข้มข้น 0, 0.4 และ 4 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (c) ทำการแยกโปรตีนบน 12.5% SDS-PAGE และตรวจสอบสัญญาณแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอต ถูกพัฒนาโดยสตีลคาล์เลนน์ ฟอตฟาเทส

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

นอกจากนี้ ยังได้ทำการสกัดสาร MAA จากเซลล์แสดงออก (เฟสน้ำ) โดยทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แสดงผลดังรูปภาพ 4.9 ภาพโครมาโตแกรมของโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบพีกโดดที่ปรากฏที่ค่ารีเทนชันไทม์ (retention time) ที่ 5.2 นาที ซึ่งตรงกับไมโคสปอริน-2-ไกลซีน (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) การเปรียบเทียบระดับไมโคสปอริน-2-ไกลซีนภายใต้ภาวะความเครียด 4 ประเภท ได้แก่ ภาวะความเครียดจากเกลือ (โซเดียมคลอไรด์, โปแตสเซียมคลอไรด์, ลิเทียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์) ภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง ภาวะความเครียดจากแรงดันออสโมติก และภาวะความเครียดจากออกซิเดชัน ผลจากการวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่ามีเพียงภาวะความเครียดจากเกลือสองชนิดเท่านั้น คือ เกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมไมโคสปอริน-2-ไกลซีนไว้ในเซลล์ ซึ่งพบปริมาณการสะสมไมโคสปอริน-2-ไกลซีนสูงสุดเท่ากับ 2.88 ± 0.14 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (รูปภาพที่ 4.10)



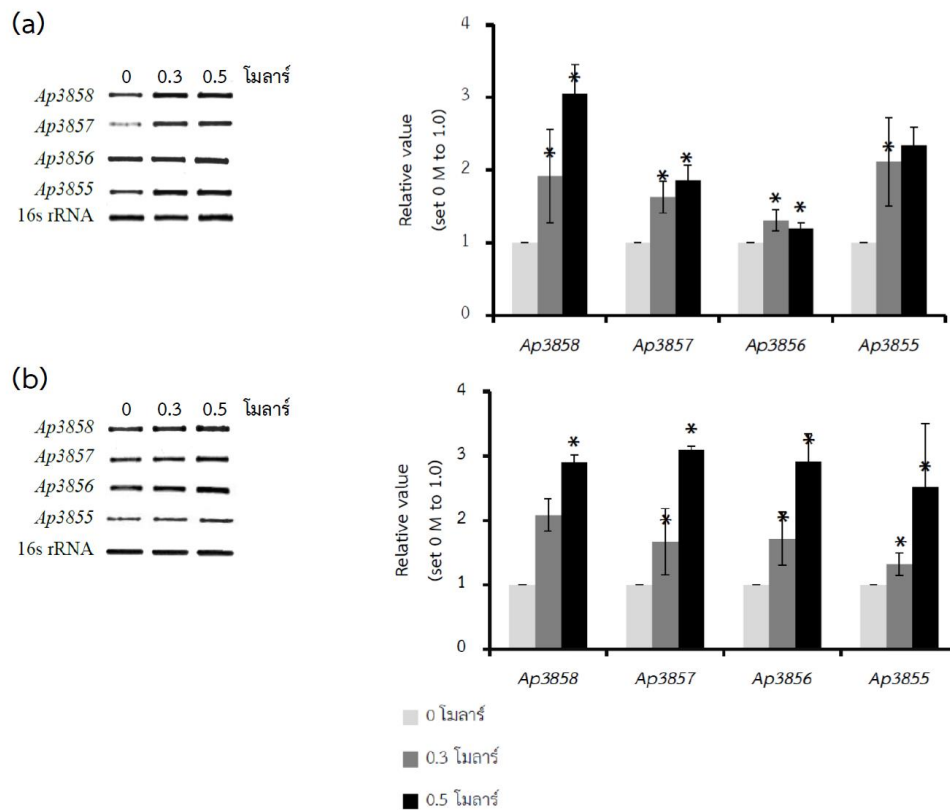
รูปภาพที่ 4.9 โครมาโตแกรมของโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสารไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ที่ได้จากการสกัดเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยการฉีดสารตัวอย่างจำนวน 30 ไมโครลิตร ไปยังคอลัมน์ Shim-pack FC-ODS reverse phase (3 ไมโครเมตร; 150 × 4.6 มิลลิเมตร) ที่มีอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1% ฟลูออโรอะซีติก แอซิดในน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง และ 0.1 โมลาร์ pH 6.5 แอมโมเนียมอะซิเตท (วิเคราะห์ผลที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร)



รูปภาพที่ 4.10 ปริมาณการสะสมไมโทสพอริน-2-ไกลซีนในเซลล์แสดงออกภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือ ความเครียดจากอนุมูลอิสระ ความเครียดจากแรงดันออสโมติก และความเครียดจากออกซิเดชัน โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ประมวลรหัสชีวิตสังเคราะห์ไมโคสปอริน-2-ไกลซีนในเซลล์แสดงออก

จากการศึกษาของ Waditee-Sirisattha และคณะ (2014) ในไซยาโนแบคทีเรียหนเค็ม *A. halophytica* พบว่ามีการแสดงออกของกลุ่มยีนจำนวนสี่ยีน (ยีน *Ap3858*, *Ap3857*, *Ap3856* และ *Ap3855* กำหนดรหัสให้เอนไซม์ดีเมทิล-4-ดีออกซีกาตุซอล ซินเทส เอนไซม์โอเมทิลทรานเฟอร์เรส เอนไซม์ซี-เอ็น ไลเลส และเอนไซม์ดีอะลา-ดีอะลา ไลเลส ตามลำดับ) ในการชีวิตสังเคราะห์ไมโคสปอริน-2-ไกลซีน เพิ่มขึ้นทั้งในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนภายใต้ภาวะความเครียดจากความเข้มข้นเกลือสูง (salt upshock) ที่ทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์จาก 0.5 โมลาร์ เป็น 2.5 โมลาร์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เซลล์แสดงออก *E. coli* ที่มีเวกเตอร์แสดงออก (pUC303 ที่นำพากลุ่มยีนที่กำหนดรหัสชีวิตสังเคราะห์ไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ซึ่งประกอบด้วยสี่ยีนดังกล่าว คือ ยีน *Ap3858*-*Ap3855*) (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) สำหรับศึกษาระดับการแสดงออกของทั้ง 4 ยีน ผลการทดลองของ Semi-quantitative RT-PCR พบว่าเซลล์แสดงออก *E. coli* สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนทั้งสี่ (ยีน *Ap3858*-*3855*) ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือ 2 ชนิด คือ เกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ โดยในภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.11(a) พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *Ap3858*, *Ap3857*, *Ap3856* และ *Ap3855* เพิ่มขึ้น 2.4, 1.8, 1.3 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.11(b) พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *Ap3858*, *Ap3857*, *Ap3856* และ *Ap3855* เพิ่มขึ้น 2.9, 3, 2.9 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ (โดยตั้งให้ค่าระดับการแสดงออกที่ความเข้มข้น 0 โมลาร์ เป็น 1.0)



รูปภาพที่ 4.11 Semi-quantitative RT-PCR ของยีน *Ap3858* ถึง *Ap3855* จากเซลล์แสดงออก *E. coli* ที่นำพายีน *Ap3858*-*Ap3855* ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (a, ขวา) และภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (b, ขวา) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกรับบน 1.2% (โดยมวลต่อปริมาตร) อะกาโรสเจลและพรีแคส (precast) ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และวัดความเข้มของแถบพีซีอาร์ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (a, ซ้าย) และภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ (b, ซ้าย) โดยใช้โปรแกรม GelQuant.NET แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย T-test ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์การสะสมไมโครสปอริน-2-ไกลซีนในเซลล์แสดงออก *E. coli* ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง การศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกแปลรหัสมาจากยีน *Ap3858-Ap3855* โดยวิธีเวสเทิร์น บลอต เพื่อเปรียบเทียบและยืนยันว่าการทนต่อความเครียดที่มากขึ้นในเซลล์แสดงออกน่าจะเกิดขึ้นเนื่องจากการการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกแปลรหัสมาจากยีน *Ap3858-Ap3855* โดยสัญญาณเวสเทิร์น บลอต ที่แสดงในการทดลองนี้คือ โปรตีนเชื่อมของ *Ap3858* กับ His6 มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 64.5 กิโลดาลตัน และทำการศึกษาดูเซลล์แสดงออก *E. coli* ที่มีเวกเตอร์แสดงออก (pUC303 ที่นำพากลุ่มยีนที่กำหนดรหัสชีวสังเคราะห์ไมโครสปอริน-2-ไกลซีน ซึ่งประกอบด้วยสี่ยีนดังกล่าว คือ ยีน *Ap3858-Ap3855*) (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) สำหรับศึกษาระดับการแสดงออกของทั้ง 4 ยีน โดยได้สรุปผลการทดลองทั้ง 3 อย่างในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณการสะสมไมโครสปอริน-2-ไกลซีน การแสดงออกของโปรตีน *Ap3858* และการแสดงออกของกลุ่มยีนที่กำหนดรหัสชีวสังเคราะห์ไมโครสปอริน-2-ไกลซีน ภายใต้ภาวะความเครียดต่างๆ

| ภาวะความเครียด | การสะสม ไมโครสปอริน-2-ไกลซีน | การแสดงออกของ โปรตีน <i>Ap3858</i> | การแสดงออกของ กลุ่มยีน <i>Ap3858-Ap3855</i> |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|
| เกลือโซเดียมคลอไรด์ | √ | √ | √ |
| เกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ | √ | √ | √ |
| เกลือลิเทียมคลอไรด์ | X | √ | N.D. |
| เกลือแคลเซียมคลอไรด์ | X | √ | N.D. |
| อุณหภูมิสูง | X | √ | N.D. |
| แรงดันออสโมติก | X | √ | N.D. |
| ออกซิเดชัน | X | √ | N.D. |

หมายเหตุ: √ แสดงถึง มีการสะสมไมโครสปอริน-2-ไกลซีน หรือ มีการแสดงออกของโปรตีน *Ap3858* หรือ มีการแสดงออกของกลุ่มยีน *Ap3858-Ap3855*

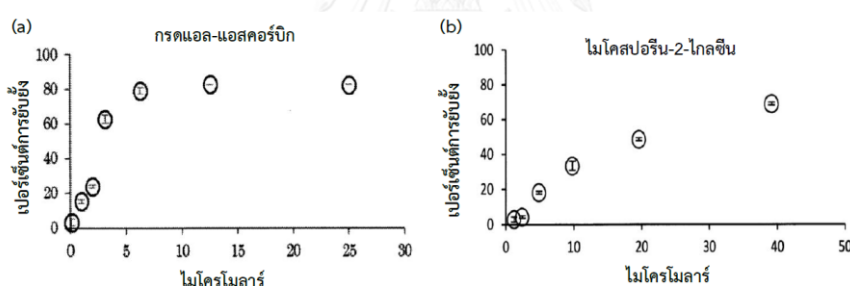
X แสดงถึง ไม่มีการสะสมไมโครสปอริน-2-ไกลซีน หรือ ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน *Ap3858* หรือ ไม่มีการแสดงออกของกลุ่มยีน *Ap3858-Ap3855*

N.D. แสดงถึง not determined

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน โดยการวิเคราะห์ในระดับ *in vitro* และ *in vivo*

4.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน โดยการวิเคราะห์ในระดับ *in vitro* ด้วยการวิเคราะห์ DPPH

ชนิดของ MAA ที่มีการรายงานพบว่ามีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระคือ ไมโคสปอรีน-ไกลซีน โฟไฟลาร์-334 และชิโนริน (Oyamada และคณะ, 2008) ดังนั้นการทดลองครั้งนี้สนใจศึกษาคุณสมบัติในการกำจัดสารอนุมูลอิสระของสารไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (เป็นตัวควบคุมบวก) (รูปภาพที่ 4.12(a)) แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเริ่มมีค่ามากขึ้นจนสมดุลในช่วงความเข้มข้นประมาณ 10-30 ไมโครโมลาร์ ขณะที่ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน (รูปภาพที่ 4.12(b)) พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระมีค่ามากขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เมื่อนำมาคำนวณหาค่า SC_{50} พบว่ากรดแอสคอร์บิกมีค่า SC_{50} เท่ากับ 2.8 ± 0.1 ไมโครโมลาร์ และไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนมีค่าเท่ากับ 22 ± 1.4 ไมโครโมลาร์



รูปภาพที่ 4.12 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนบริสุทธิ์ ทำการปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระ โดยค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน โดยการวิเคราะห์ในระดับ *in vitro* ด้วยการวิเคราะห์ MTT

จากการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน (ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์) ในภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 หรือ 25 ไมโครโมลาร์ และกรดแอสคอร์บิก (ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์) ใช้เป็นตัวควบคุมบวก บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งจากเซลล์เมลาโนซัยต์ของมนุษย์ A-375 ด้วยเทคนิค MTT

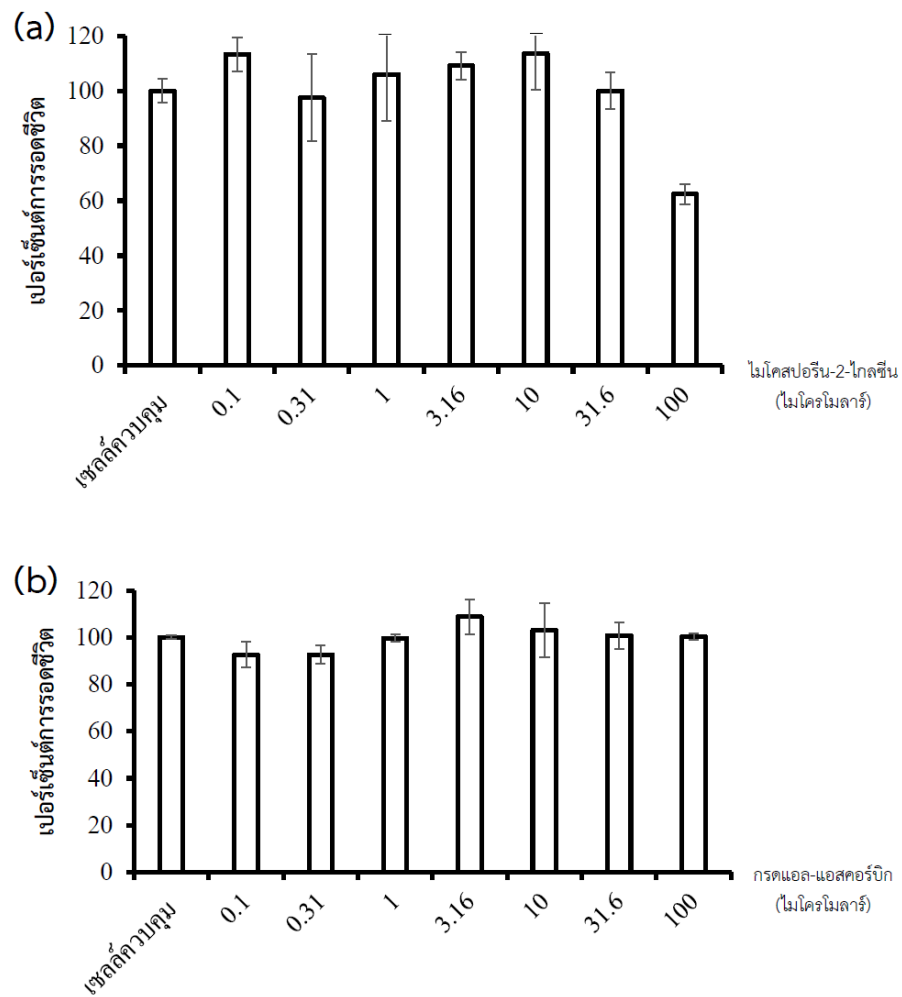
ผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพที่ 4.13 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ชุดควบคุม (untreated) เท่ากับ 100% เมื่อมีการเติมกรดแอสคอร์บิก หรือ ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน ซึ่งทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% แสดงให้เห็นว่ากรดแอสคอร์บิกมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนุมูลอิสระได้สูงมาก โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม

ผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพที่ 4.14 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ชุดควบคุม (untreated) เท่ากับ 100% เมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 57.96% แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่เมื่อมีการเติมกรดแอสคอร์บิกร่วมกับภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นตั้งแต่ที่ความเข้มข้นต่ำคือ 0.1 ไมโครโมลาร์ ไปจนถึงความเข้มข้นสูงคือ 100 ไมโครโมลาร์ ซึ่งทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% แสดงให้เห็นว่ากรดแอสคอร์บิกมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนุมูลอิสระได้สูงมาก โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยกรดแอสคอร์บิกร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 หรือ 25 ไมโครโมลาร์

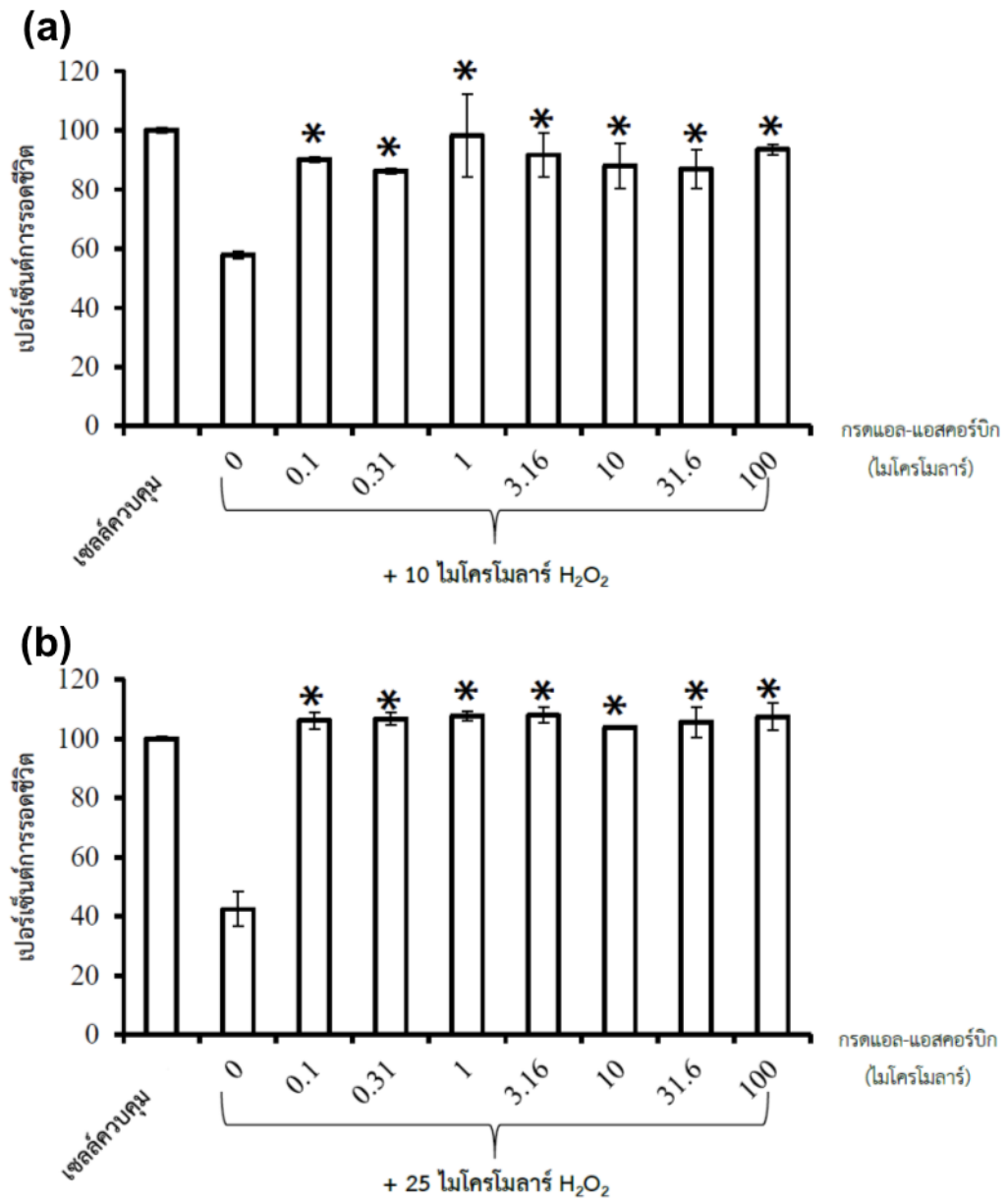
ผลการทดลองดังแสดงในรูปภาพที่ 4.15 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ชุดควบคุม (untreated) เท่ากับ 100% เมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 43.40% แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่เมื่อมีการเติมไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนร่วมกับภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าอัตราการรอด

ชีวิตสูงขึ้น และไมโคสปอริน-2-ไกลซีนที่ความเข้มข้น 0.31 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% ส่วนที่ความเข้มข้นของไมโคสปอริน-2-ไกลซีนสูงเกินไปกลับทำให้เซลล์รอดชีวิตน้อยลง (a) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยไมโคสปอริน-2-ไกลซีนร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 หรือ 25 ไมโครโมลาร์

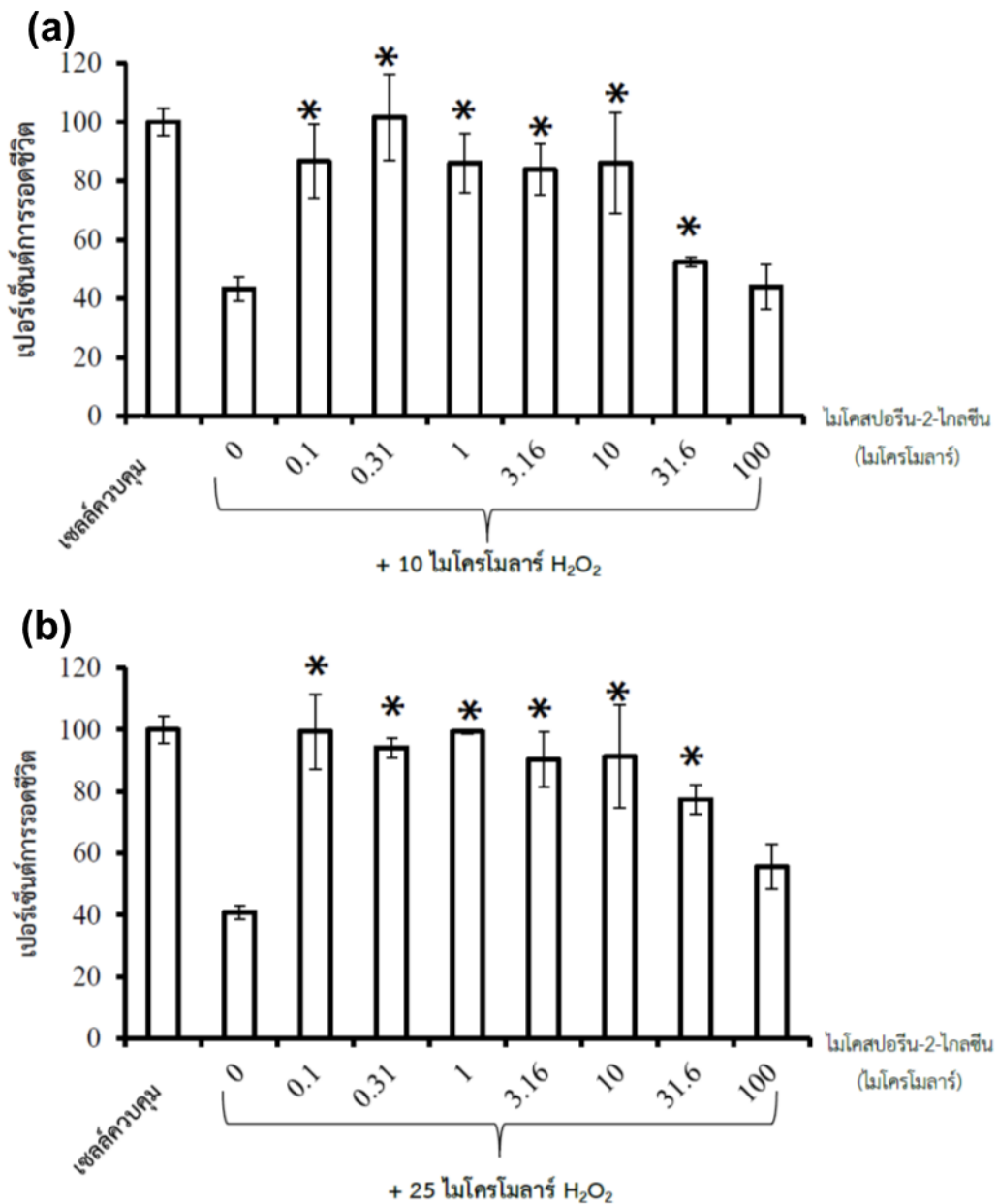




รูปภาพที่ 4.13 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของกรดแอสคอร์บิก และไมโคสพอริน-2-ไกลซีน บ่มในตู้ป่นที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งจากเซลล์เมลาโนซัยต์ของมนุษย์ A-375 ด้วยเทคนิค MTT โดยเซลล์ควบคุม (ไม่เติมสารใดๆ) มีค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย T-test ($p < 0.05$)



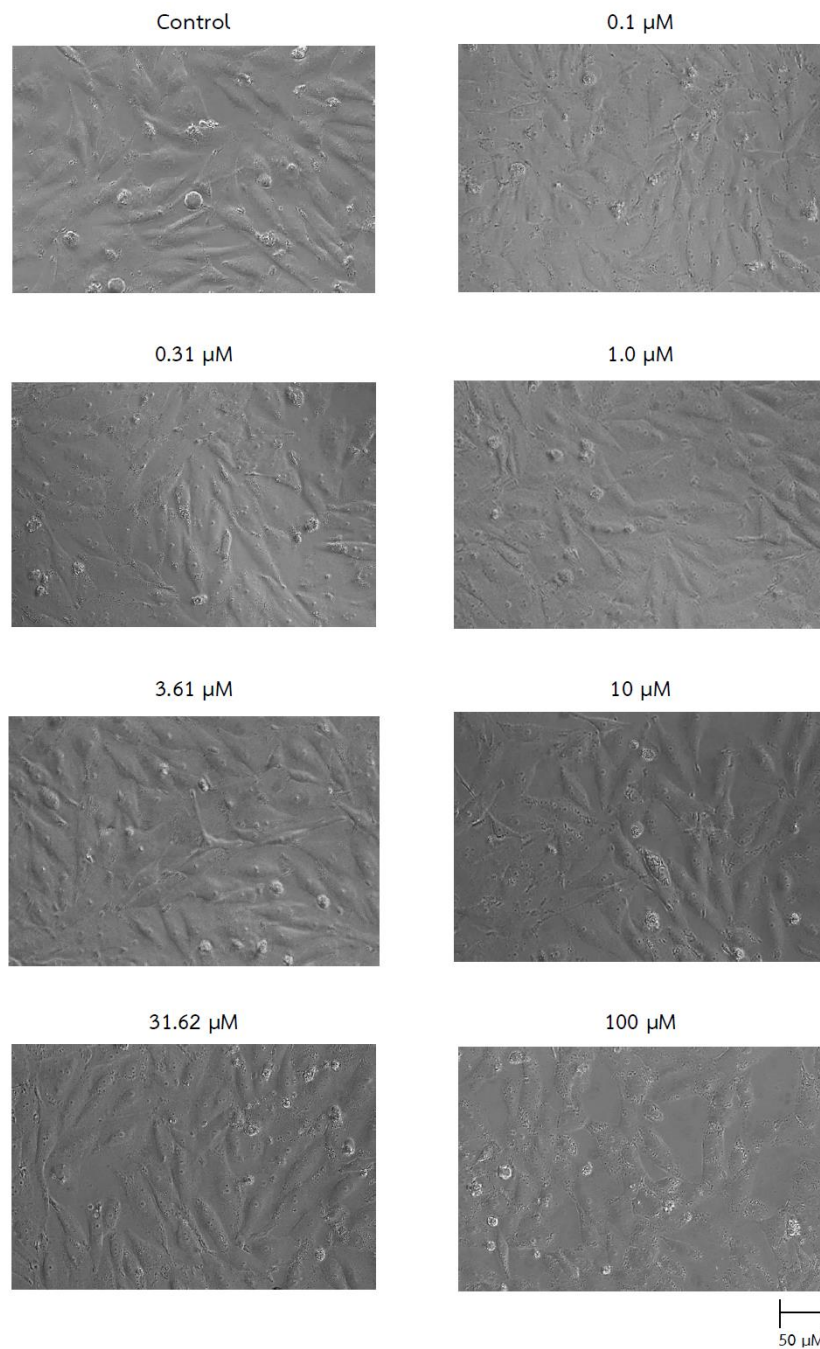
รูปภาพที่ 4.14 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกราดแอล-แอสคอร์บิกในภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 หรือ 25 ไมโครโมลาร์ บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งจากเซลล์เมลานโชนัยต์ของมนุษย์ A-375 ด้วยเทคนิค MTT โดยเซลล์ควบคุม (ไม่เติมสารใดๆ) มีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย T-test ($p < 0.05$)



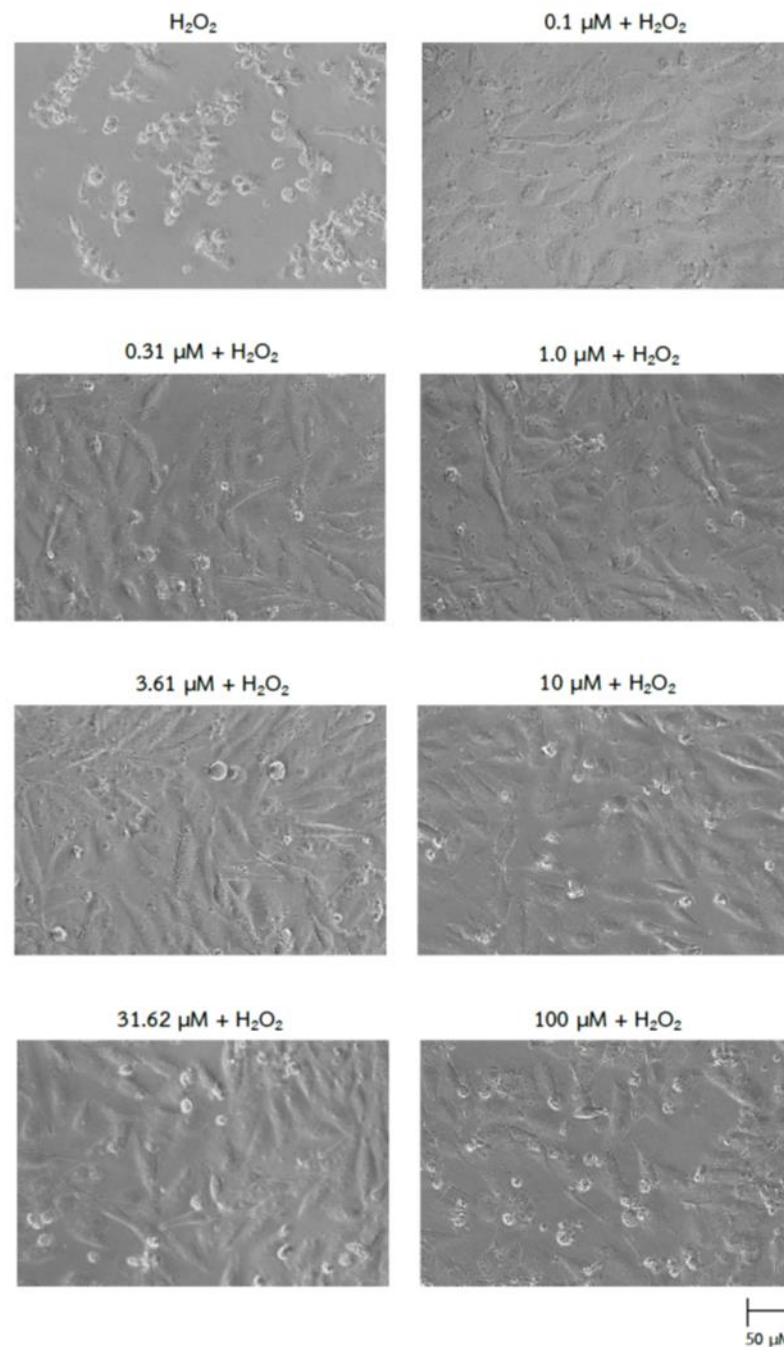
รูปภาพที่ 4.15 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของไมโทซอปรีน-2-ไกลซีนในภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 หรือ 25 ไมโครโมลาร์ บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งจากเซลล์เมลาโนไซต์ของมนุษย์ A-375 ด้วยเทคนิค MTT โดยเซลล์ควบคุม (ไม่เติมสารใดๆ) มีค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วย T-test ($p < 0.05$)

4.5.3 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ A-375

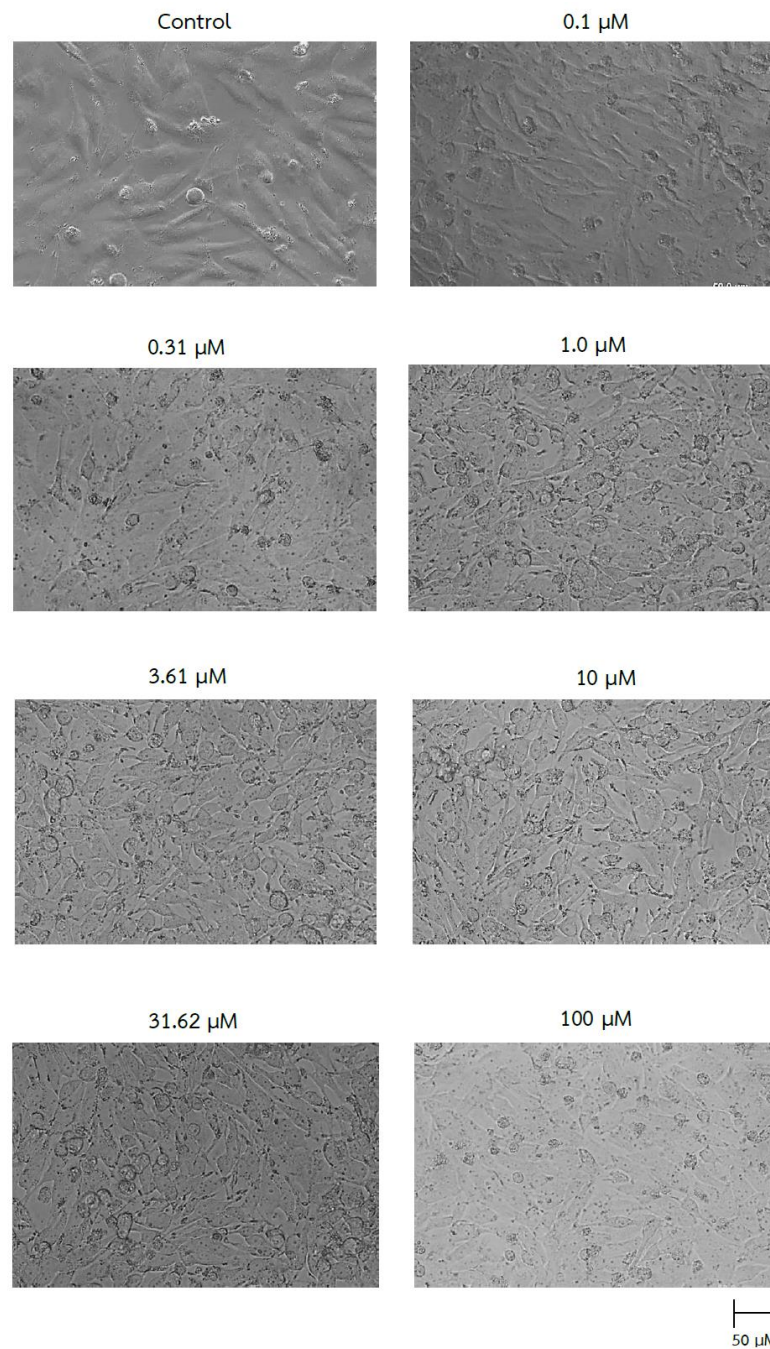
นอกจากการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย MTT สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A-375 ได้ถูกตรวจสอบภายใต้ที่รับสารไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์ เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนจะมีจำนวนของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A-375 ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์น้อยกว่าในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงจากรูปทรงกระสวยเป็นทรงกลม ซึ่งเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงนี้บ่งชี้ถึงว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้น (Okazawa และคณะ, 1998) โดยลักษณะเช่นนี้จะเกิดมากเมื่อความเข้มข้นของสารไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนเพิ่มมากขึ้น และเกิดมากที่สุดเมื่อใช้สารไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ แล้วเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการมีสารไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนร่วมด้วยนั้นจะมีปริมาณเซลล์ของ A-375 เกาะอยู่บนพื้นผิวภาชนะเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปภาพ 4.16-4.19



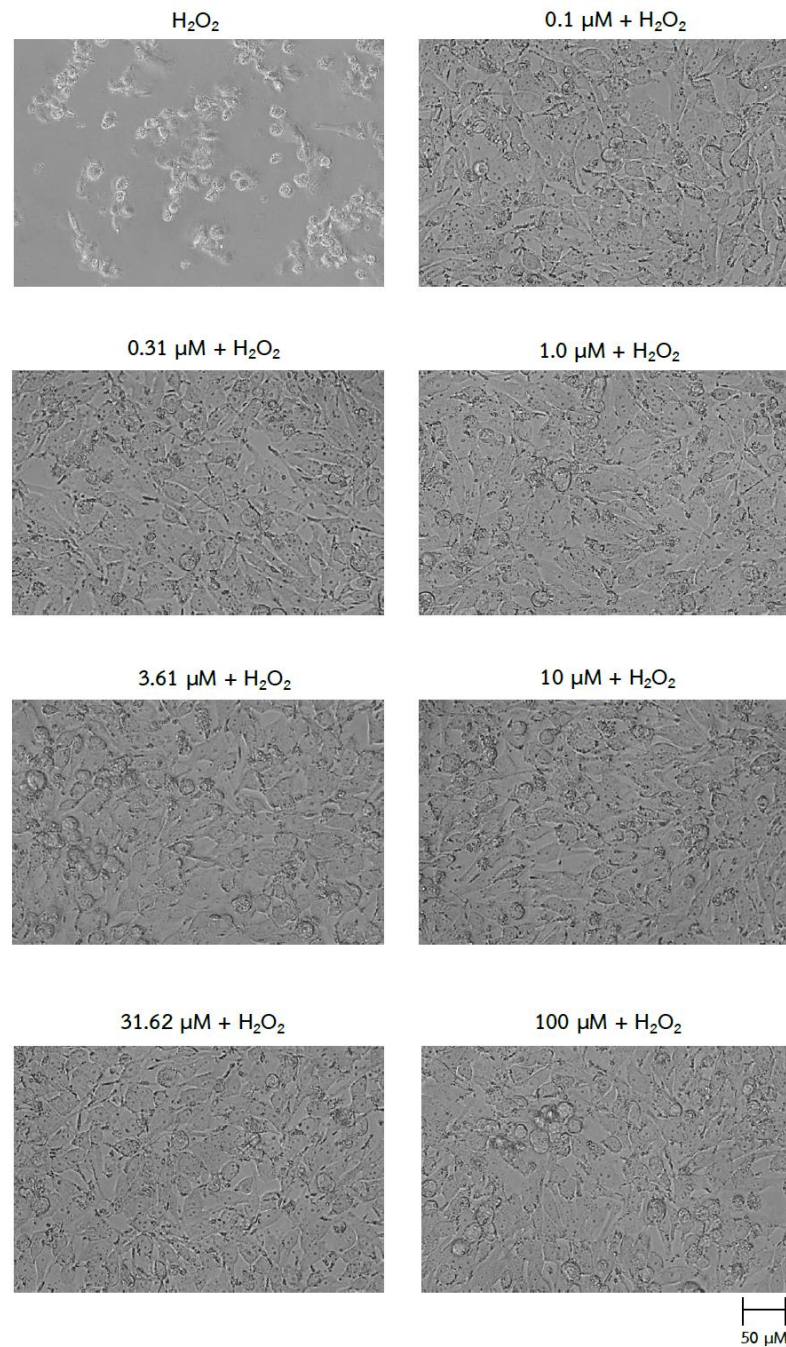
รูปภาพที่ 4.16 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเมลาโนไซต์ A-375 หลังจากได้รับไมโคสพอริน-2-ไกลอซีนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปภาพที่ 4.17 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเมลาโนซัยต์ A-375 หลังจากได้รับไมโคสพอริน-2-ไกลซีนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปภาพที่ 4.18 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเมลาโนไซต์ A-375 หลังจากได้รับกรดแอล-แอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

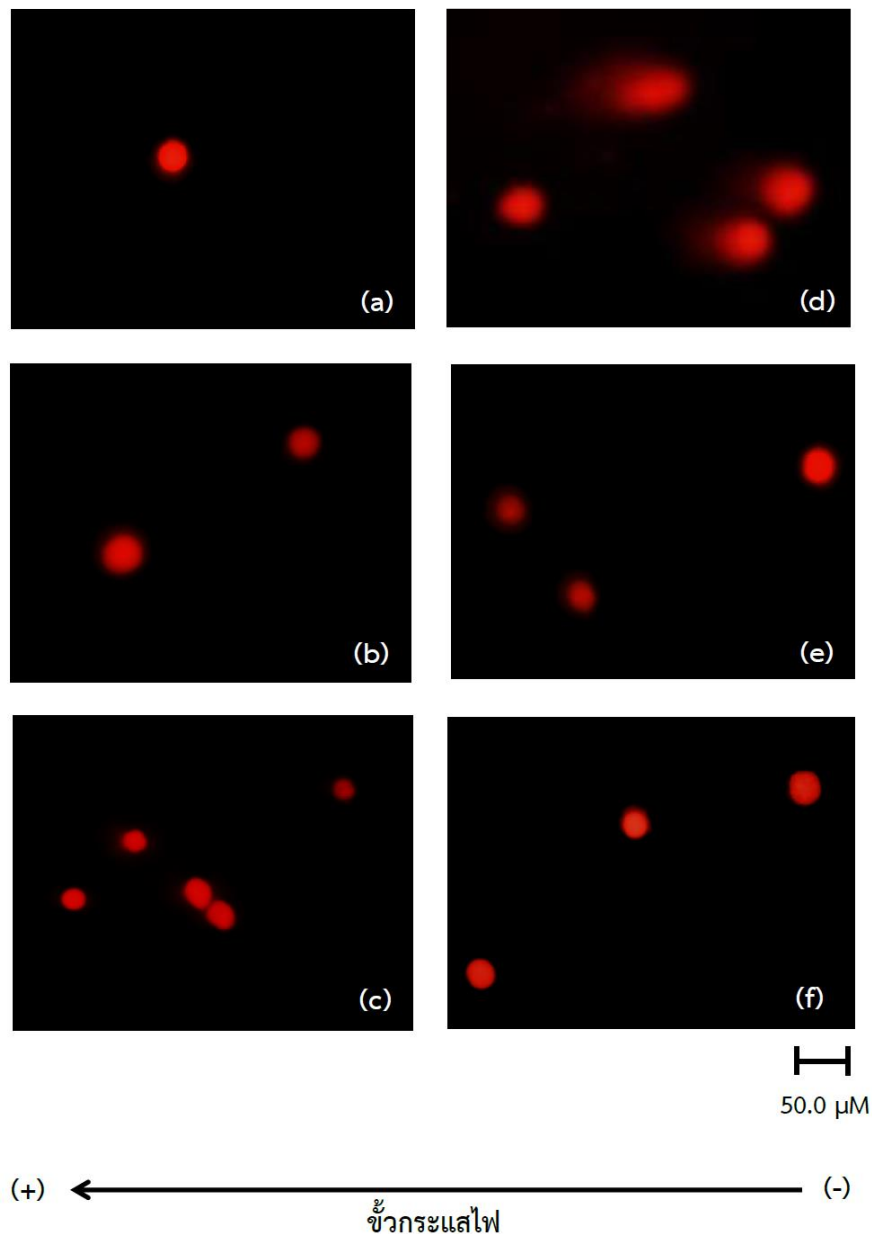


รูปภาพที่ 4.19 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเมลาโนไซต์ A-375 หลังจากได้รับกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10, 31.62 และ 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.5.4 การประเมินความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์โคเมท (Comet assay)

ทำการตรวจหาความเสียหายของดีเอ็นเอที่ถูกทำลายจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยวิธี Single Cell Gel Electrophoresis หรือ Comet assay (Tice และคณะ, 2000; Sudprasert และคณะ, 2006) โดยนำเซลล์ A-375 จำนวน 2.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะบนพื้นผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6-well plate จากนั้นทดสอบด้วย ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ กรดแอล-แอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการมี ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนหรือกรดแอล-แอสคอร์บิก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วละลายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำเซลล์ที่มีความเข้มข้น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรไปผสมกับอะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ (low-melting temperature agarose) 0.8% แล้วฝังเซลล์ลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยอะกาโรสเจล 1% ทำการปิดทับด้วยอะกาโรสเจล 1% เป็นชั้นสุดท้าย จากนั้นทำให้เซลล์แตกและแยกของสายดีเอ็นเอ โดยการนำแผ่นสไลด์ไปแช่ใน สารละลายไลซิสและสารละลายบัฟเฟอร์อัลคาไลน์ ตามลำดับ นำแผ่นสไลด์ไปทำอิเล็กโตรโฟเรซิส และย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ สุดท้ายนำไปถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และวัดทางที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม cell A เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

จากผลการทดลองดังในรูปภาพ 4.20 และตารางที่ 4.2 พบว่า เซลล์มะเร็งผิวหนัง A-375 ที่ได้รับ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอขึ้น ดังปรากฏเป็นหางที่ยืดยาว ออกมาจากส่วนหัวของนิวเคลียส โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเสียหายสัมพัทธ์ของดีเอ็นเอเท่ากับ 100 แสดงว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นเป็นพิษต่อเซลล์ แต่หากว่ามีกรดแอล-แอสคอร์บิกหรือ ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนร่วมกับการมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า สารทั้งสองชนิดสามารถป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เป็นอย่างดี โดยกรดแอล-แอสคอร์บิกหรือไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนร่วมกับการมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเสียหายสัมพัทธ์ของดีเอ็นเอเท่ากับ 7.68 และ 13.71 ตามลำดับ



รูปภาพที่ 4.20 ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีโคเมทจากเซลล์มะเร็งผิวหนัง A-375 ในกลุ่มควบคุม (a) ในกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (b) กรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (c) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (d) ไมโคสปอริน-2-ไกลซีนความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (e) และไมโคสปอริน-2-ไกลซีนความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (f) ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายภาพแบบสุ่มจำนวน 30 ภาพ จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ (three independent samples)

ตารางที่ 4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของดีเอ็นเอจากเซลล์ A-375 ในกลุ่มควบคุม กรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ กรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายภาพแบบสุ่มจำนวน 30 ภาพ จากการทดลองอิสระจำนวน 3 ซ้ำ (independent samples)

| ตัวอย่าง | ความยาวทาง (ไมโครเมตร) | ความเสียหายสัมพัทธ์ ของดีเอ็นเอ (%) |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| กลุ่มควบคุม (0.1 โมลาร์ pH 6.5 แอมโมเนียมแอสซิเตท) | 4.27 ± 0.14 | 7.13 |
| กรดแอสคอร์บิก 1 ไมโครโมลาร์ | 4.59 ± 0.21 | 7.66 |
| กรดแอสคอร์บิก 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25 ไมโครโมลาร์ | 4.61 ± 0.21 | 7.68 |
| ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน 1 ไมโครโมลาร์ | 7.34 ± 0.44 | 12.24 |
| ไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25 ไมโครโมลาร์ | 8.22 ± 0.05 | 13.71 |
| ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25 ไมโครโมลาร์ | 59.94 ± 3.28 | 100 |

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

รังสียูวีบีเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งส่งผลกระทบต่อดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน เอนไซม์ ระบบแสง II (photosystem II) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง อัตราการเจริญเติบโต อัตราการอยู่รอด การเคลื่อนที่ (motility) และกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic process) (Hader และคณะ, 2007) นอกจากนี้รังสียูวีบียังส่งผลโดยอ้อมจากการสร้างสารอนุมูลอิสระชนิด ROS จากการรายงานของ Gao และคณะ (2007) พบว่ารังสียูวีบีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสาย *Anabaena* sp. PCC7120 ได้ถึง 40% ดังนั้นสิ่งมีชีวิตจึงได้พัฒนากลไกหลายแบบขึ้นมาสำหรับป้องกันอันตรายจากการสัมผัสรังสียูวี

ในไซยาโนแบคทีเรีย หนึ่งในกลไกสำคัญที่พัฒนาขึ้นสำหรับป้องกันจากอันตรายของรังสียูวีบีคือการสังเคราะห์สารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิประเภทสารกรองรังสียูวี ซึ่งประกอบด้วย แคโรทีนอยด์ ไซโตนิมิน และ MAA ทำหน้าที่ในการกรองรังสียูวีเพราะสารประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติในการดูดซับรังสียูวีในช่วงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับสูงและป้องกันอันตรายจากรังสียูวีบี สารกรองรังสียูวีชนิด MAA เป็นสารที่ได้รับความสนใจและมีคุณลักษณะที่ดีเมื่อเทียบกับสารกลุ่มอื่นๆ กล่าวคือ เนื่องจากสามารถกรองได้ทั้งรังสียูวีบีและ/หรือรังสียูวีเอ (Sinha และ Häder, 2008) นอกจากนี้ MAA ยังมีบทบาทหน้าที่อื่นด้วย เช่น MAA สามารถทำงานเป็นออสโมโพรเทคแทนต์เมื่ออยู่ภายใต้ความเครียดจากเกลือสูง (Oren, 1997; Kogej และคณะ, 2007) งานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาเซลล์แสดงออก *E. coli* DH5 α ที่มีกลุ่มยีน (ยีน *Ap3858-Ap3855*) ซึ่งกำหนดรหัสชีวสังเคราะห์ไมโคสปอริโน-2-ไกลซีนจากการทดลองพบว่า ในภาวะความเครียดจากเกลือ ความเครียดจากอุณหภูมิสูง ความเครียดจากออกซิเดชัน และความเครียดจากแรงดันออสโมติก (รูปภาพ 4.1-4.6) เซลล์แสดงออกจะมีอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตดีกว่าเซลล์ควบคุม

รังสียูวีบีเป็นภาวะความเครียดสำคัญที่เหนี่ยวนำให้สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กสังเคราะห์และเก็บสะสมสาร MAA ไว้ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม พบว่าภายใต้ความเครียดจากเกลือสูงสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีการสังเคราะห์ MAA ชนิดไมโคสปอริโน-2-ไกลซีน อาทิเช่น ไซยาโนแบคทีเรียทนเกลือ *Euhalothece* sp.

และ *A. halophytica* (Kedar และคณะ, 2002; Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) เมื่อทำการติดตามการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์น บลอต จะเห็นได้ว่าภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 โมลาร์ มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณเป็น 2.2 และ 3.5 เท่า ตามลำดับ (รูปภาพที่ 4.7(a)) และภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 โมลาร์ มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณเป็น 3.5 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ (รูปภาพที่ 4.7(b)) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เฉพาะความเครียดเนื่องจากเกลือสองชนิด ประกอบด้วย เกลือโซเดียมคลอไรด์กับเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ที่เหนี่ยวนำการสะสมไมโคสปอริน-2-ไกลซีนได้ในเซลล์แสดงออก (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) โดยพบปริมาณการสะสมสูงสุดเท่ากับ 2.88 ± 0.14 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (รูปภาพที่ 4.10) ขณะที่ความเครียดอื่นไม่สามารถเหนี่ยวนำการสะสมไมโคสปอริน-2-ไกลซีน คือ ความเครียดจากอุณหภูมิสูง ความเครียดจากแรงดันออสโมติก และความเครียดจากออกซิเดชัน

ดังนั้นได้ทำการศึกษารายการแสดงออกของกลุ่มยีนจำนวนสี่ยีน (ยีน *Ap3858*, *Ap3857*, *Ap3856* และ *Ap3855* กำหนดรหัสให้เอนไซม์ดีเมทิล-4-ดีออกซีกาตุซอล ซินเทส เอนไซม์โอเมทิลทรานเพอเรส เอนไซม์ซี-เอ็น ไลเลส และเอนไซม์ดีอะลา-ดีอะลา ไลเลส ตามลำดับ) โดยในภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *Ap3858*, *Ap3857*, *Ap3856* และ *Ap3855* เพิ่มขึ้น 2.4, 1.8, 1.3 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ (รูปภาพที่ 4.11(a)) และภาวะความเครียดจากเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.11(b) พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *Ap3858*, *Ap3857*, *Ap3856* และ *Ap3855* เพิ่มขึ้น 2.9, 3, 2.9 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ จึงเป็นเหตุผลสนับสนุนว่าอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าที่พบในเซลล์แสดงออกน่าจะมาจากไมโคสปอริน-2-ไกลซีนที่สะสมขึ้นภายในเซลล์

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Kedar และคณะ (2002) พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Euhalothece* sp. มีการสะสมไมโคสปอริน-2-ไกลซีน เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือ นอกจากนี้ราทนเกลือ *Hortaea werneckii* พบการสะสมไมโคสปอริน-กลูตามินอล-กลูโคไซด์ (mycosporine-glutaminol-glucoside) ภายใต้ความเครียดจากความเข้มข้นของเกลือสูงอีกด้วย (Kogej และคณะ, 2007) ปัจจุบันนี้ MAA ที่ได้รับการรายงานว่ามีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ไมโคสปอริน-ไกลซีน โฟไฟลาร์-334 และซิโนริน (Oyamada และคณะ, 2008) ซึ่งไมโคส

ปอร์ริน-ไกลซีนและโพลีฟลอร์-334 ยังสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลของลิพิด (lipid peroxidation) ที่เกิดจากออกซิเจนเดี่ยว (singlet oxygen) และกำจัดอนุมูลอิสระชนิด ROS ที่เกิดขึ้นในระหว่างการสัมผัสกับรังสียูวี (Tao และคณะ, 2009) จากการทดลองพบว่าไมโคสปอร์ริน-2-ไกลซีน ซึ่งสกัดมาจากเซลล์แสดงออกก็มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระด้วยเช่นกันและมีค่า SC_{50} เท่ากับ 22 ± 1.4 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีกว่าไมโคสปอร์ริน-ไกลซีน โพลีฟลอร์-334 และซิโนริน (unpublished data) แต่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอนุมูลอิสระต่ำกว่ากรดแอสคอร์บิก (SC_{50} เท่ากับ 2.8 ± 0.1 ไมโครโมลาร์) (รูปภาพที่ 5.1)

โครงสร้างแกน MAA นั้นเกี่ยวข้องกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (skeletal structure of the MAA) โดยโครงสร้างแกนที่เป็นคาร์บอนิล (carbonyl- type MAAs) มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่าโครงสร้างแกนชนิดอิมีน (imine type MAAs) จากการศึกษาของ Coba และคณะ (2009) แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของค่า pH (pH dependent manner) ภายใต้ภาวะค่า pH ต่างๆ พบว่าโครงสร้างแกนชนิดอะมิโนไซโคลเฮกเซน อิมีน (aminocyclohexene imine) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าโครงสร้างแกนในกลุ่มคาร์บอนิล (Praveena และ Murthy, 2013) หลักฐานซึ่งมีการสนับสนุนว่าสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ MAA ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เนื่องจากโครงสร้างแกนไซโคลเฮกเซนมีพันธะคู่ ซึ่งสามารถ delocalised อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไมโคสปอร์ริน-2-ไกลซีน ในเซลล์มะเร็งจากเซลล์เมลานอซัยต์ของมนุษย์ A-375 ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเมื่อมีการเติมไมโคสปอร์ริน-2-ไกลซีนร่วมกับภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ส่วนที่ความเข้มข้นของไมโคสปอร์ริน-2-ไกลซีนสูงเกินไปกลับทำให้เซลล์รอดชีวิตน้อยลง (รูปภาพที่ 4.14) ซึ่งพบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับ MAA อื่นๆ ได้แก่ ซิโนริน (อัตราการรอดสูงที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์) โพลีฟลอร์-334 (อัตราการรอดสูงที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์) และไมโคสปอร์ริน-ไกลซีน (อัตราการรอดสูงที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์) แต่ต่างกันที่ความเข้มข้นของ MAA ทั้งสามชนิดแปรผันโดยตรงกับอัตราการรอดชีวิต (Oyamada และคณะ, 2008)

นอกจากการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย MTT สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A-375 พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารไมโคสปอร์ริน-2-ไกลซีนจะมีจำนวนของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A-375 ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์น้อยกว่าในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลง

จากรูปทรงกระสวยเป็นทรงกลม ซึ่งเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงนี้บ่งชี้ถึงการตายของเซลล์เกิดขึ้น (Okazawa และคณะ, 1998) โดยลักษณะเช่นนี้จะเกิดมากเมื่อความเข้มข้นของสารไมโคสปอริน-2-ไกลซีนเพิ่มมากขึ้น และเกิดมากที่สุดเมื่อใช้สารไมโคสปอริน-2-ไกลซีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ แล้วเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการมีสารไมโคสปอริน-2-ไกลซีน พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารไมโคสปอริน-2-ไกลซีนร่วมด้วยนั้นจะมีปริมาณเซลล์ของ A-375 เกาะอยู่บนพื้นผิวภาชนะเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปภาพ 4.15-4.18

การตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอที่ถูกทำลายจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยวิธี Single Cell Gel Electrophoresis หรือ Comet assay ได้รับการอธิบายครั้งแรกโดย Ostling และ Johanson (1984) เป็นการนำเซลล์ที่สนใจศึกษาไปผสมกับอะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ แล้วฝังเซลล์ลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยอะกาโรสเจล ทำการปิดทับด้วยอะกาโรสเจลเป็นชั้นสุดท้าย จากนั้นทำให้เซลล์แตกและแยกของสายดีเอ็นเอ โดยการนำแผ่นสไลด์ไปแช่ในสารละลายไลซิสและสารละลายบัฟเฟอร์อัลคาไลน์ ตามลำดับ นำแผ่นสไลด์ไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ สุดท้ายนำไปถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และวัดความยาวของหางที่เกิดขึ้น เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (Azevedo และคณะ, 2011) ซึ่งเทคนิคนี้ถูกนำมาศึกษาอย่างกว้างขวางในสารหลายชนิด เช่น ตรวจสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากทานาคา (Thanaka) (Wangthong และคณะ, 2010) กลุ่มวิตามิน กลุ่มแคโรทีน (carotene) กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) กลุ่มไอโซฟลาโวน (isoflavone) ทีโพลีฟีนอล (tea polyphenol) ไวน์โพลีฟีนอล (wine polyphenol) เป็นต้น (Cemeli และคณะ, 2009) แต่ในกลุ่มสารกรองรังสียูวี ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกโดยใช้ MAA ชนิดไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ผลการทดลองพบว่า เซลล์มะเร็งผิวหนัง A-375 ที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอขึ้น ดังปรากฏเป็นหางที่ยืดยาวออกมาจากส่วนหัวของนิวเคลียส โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเสียหายสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเท่ากับ 100 แสดงว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นเป็นพิษต่อเซลล์ แต่หากว่ามีกรดแอล-แอสคอร์บิกหรือ ไมโคสปอริน-2-ไกลซีนร่วมกับการมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า สารทั้งสองชนิดสามารถป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เป็นอย่างดี (รูปภาพที่ 4.19 และตารางที่ 4.1)

งานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ศึกษารายละเอียดเชิงลึกของสารไมโคสปอริน-2-ไกลซีน ในระดับ *in vitro* และ *in vivo* โดยเฉพาะในระดับ *in vivo* ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน นอกจากนี้ จากการศึกษาพบว่าไมโคสปอริน-2-ไกลซีน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างแน่นนอน และยังช่วยปกป้องเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าอาณาจักรไมโคสปอริน-2-ไกลซีนไปเป็นส่วนผสมในครีมกันแดด



รายการอ้างอิง

Azevedo F, Marques F, Fokt H, *et al.* (2011) Measuring oxidative DNA damage and DNA repair using the yeast comet assay. *Yeast* **28**: 55-61.

Balskus EP and Walsh CT (2010) The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. *Science* **329**: 1653-1656.

Bebout BM and Garcia-Pichel F (1995) UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *Applied and environmental microbiology* **61**: 4215-4222.

Bracher A and Wiencke C (2000) Simulation of the effects of naturally enhanced UV-radiation on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* **196**: 127-141.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.

Carreto JI and Carignan MO (2011) Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. chemical and ecological aspects. *Marine drugs* **9**: 387-446.

Cemeli E, Baumgartner A and Anderson D (2009) Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **681**: 51-67.

Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology* **26**: 249-261.

Crutzen PJ (1992) Ultraviolet on the increase. *Nature* **356**: 104-105.

De la Coba F, Aguilera J, Figueroa F, *et al.* (2009) Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *Journal of applied phycology* **21**: 161-169.

Delprato AM, Samadani A, Kudrolli A, *et al.* (2001) Swarming ring patterns in bacterial colonies exposed to ultraviolet radiation. *Physical Review Letters* **87**, DOI: 10.1103/PhysRevLett.87.158102

Elasri MO and Miller RV (1999) Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and environmental microbiology* **65**: 2025-2031.

Gao K, Yu H and Brown MT (2007) Solar PAR and UV radiation affects the physiology and morphology of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **89**: 117-124.

Gao Q and Garcia-Pichel F (2011) Microbial ultraviolet sunscreens. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 791-802.

Hader DP, Kumar HD, Smith RC, *et al.* (2007) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**: 267-285.

Han T, Kong J-A, Han Y-S, *et al.* (2004) UV-A/blue light-induced reactivation of spore germination in UV-B irradiated *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **40**: 315-322.

He Y-Y and Häder D-P (2002) Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences* **1**: 729-736.

Helbling EW, Chalker BE, Dunlap WC, *et al.* (1996) Photoacclimation of Antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **204**: 85-101.

Hu C, Völler G, Süßmuth R, *et al.* (2015) Functional assessment of mycosporine-like amino acids in *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806. *Environmental Microbiology* **17**: 1548-1559.

Jeffrey WH, Aas P, Lyons MM, *et al.* (1996) Ambient solar radiation-induced photodamage in marine bacterioplankton. *Photochemistry and Photobiology* **64**: 419-427.

Kedar L, Kashman Y and Oren A (2002) Mycosporine-2-glycine is the major mycosporine-like amino acid in a unicellular cyanobacterium (*Euhalothece* sp.) isolated from a gypsum crust in a hypersaline saltern pond. *FEMS Microbiology Letters* **208**: 233-237.

Kogej T, Stein M, Volkmann M, *et al.* (2007) Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology* **153**: 4261-4273.

Korbee N, Figueroa FL and Aguilera J (2006) Accumulation of mycosporine-like amino acids (MAAs): biosynthesis, photocontrol and ecophysiological functions. *Revista Chilena de Historia Natural* **79**: 119-132.

Kruschel C and Castenholz RW (1998) The effect of solar UV and visible irradiance on the vertical movements of cyanobacteria in microbial mats of hypersaline waters. *FEMS microbiology ecology* **27**: 53-72.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Levine E and Thiel T (1987) UV-inducible DNA repair in the cyanobacteria *Anabaena* spp. *Journal of Bacteriology* **169**: 3988-3993.

Lindahl T and Wood RD (1999) Quality control by DNA repair. *Science* **286**: 1897-1905.

Llewellyn C and Harbour D (2003) A temporal study of mycosporine-like amino acids in surface water phytoplankton from the English Channel and correlation with solar irradiation. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **83**: 1-9.

Lubin D and Jensen EH (1995) Effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends. *Nature* **377**: 710-713.

Manning WJ and Tiedemann Av (1995) Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases. *Environmental Pollution* **88**: 219-245.

Matsui K, Nazifi E, Kunita S, *et al.* (2011) Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **105**: 81-89.

Michalek-Wagner K (2001) Seasonal and sex-specific variations in levels of photo-protecting mycosporine-like amino acids (MAAs) in soft corals. *Marine Biology* **139**: 651-660.

Miyamoto KT, Komatsu M and Ikeda H (2014) Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from Actinomycetales microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. *Applied and environmental microbiology* **80**: 5028-5036.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**: 55-63.

Nazifi E, Wada N, Yamaba M, *et al.* (2013) Glycosylated porphyra-334 and palythine-threonine from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Marine drugs* **11**: 3124-3154.

Okazawa M, Shiraki T, Ninomiya H, *et al.* (1998) Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 12584-12592.

Oren A (1997) Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. *Geomicrobiology Journal* **14**: 231-240.

Oren A and Gunde-Cimerman N (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiology Letters* **269**: 1-10.

Ostling O and Johanson K (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* **123**: 291-298.

Ou Y, Xu S, Zhu D, *et al.* (2014) Molecular mechanisms of exopolysaccharide from *Aphanothece halaphytica* (EPSAH) induced apoptosis in HeLa cells. *PLoS One* **9**: e87223.

Oyamada C, Kaneniwa M, Ebitani K, *et al.* (2008) Mycosporine-like amino acids extracted from scallop (*Patinopecten yessoensis*) ovaries: UV protection and growth stimulation activities on human cells. *Marine Biotechnology* **10**: 141-150.

Peinado NK, Abdala Diaz RT, Figueroa FL, *et al.* (2004) Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *Journal of Phycology* **40**: 248-259.

Pierson BK, Mitchell HK and Ruff-Roberts AL (1993) Chloroflexus aurantiacus and ultraviolet radiation: implications for archaean shallow-water stromatolites. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **23**: 243-260.

Portmann RW, Daniel JS and Ravishankara AR (2012) Stratospheric ozone depletion due to nitrous oxide: influences of other gases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 1256-1264.

Portwich A and Garcia-Pichel F (1999) Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Archives of microbiology* **172**: 187-192.

Praveena B and Murthy S (2013) Role of photosynthetic pigments in protection against oxidative damage. *International journal of plant, animal and environmental sciences* **4**: 167-171.

Rastogi RP, Sinha RP, Singh SP, *et al.* (2010) Photoprotective compounds from marine organisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **37**: 537-558.

Rosen CF (2003) Topical and systemic photoprotection. *Dermatologic Therapy* **16**: 8-15.

Rosic NN (2012) Phylogenetic analysis of genes involved in mycosporine-like amino acid biosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Applied microbiology and biotechnology* **94**: 29-37.

Rozema J, Björn LO, Bornman J, *et al.* (2002) The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems-an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **66**: 2-12.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). Molecular cloning, Cold spring harbor laboratory press New York.

Sandmann G, Kuhn S and Böger P (1998) Evaluation of structurally different carotenoids in *Escherichia coli* transformants as protectants against UV-B radiation. *Applied and environmental microbiology* **64**: 1972-1974.

Shibata K (1969) Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living in the Great Barrier Reef. *Plant and Cell Physiology* **10**: 325-335.

Shick JM and Dunlap WC (2002) Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annual review of Physiology* **64**: 223-262.

Singh SP, Hader DP and Sinha RP (2010) Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing Research Reviews* **9**: 79-90.

Singh SP, Kumari S, Rastogi RP, *et al.* (2008) Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. *Indian journal of experimental biology* **46**: 7.

Singh SP, Sinha RP, Klisch M, *et al.* (2008) Mycosporine-like amino acids (MAAs) profile of a rice-field cyanobacterium *Anabaena doliolum* as influenced by PAR and UVR. *Planta* **229**: 225-233.

Sinha R, Klisch M, Gröniger A, *et al.* (1998) Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **47**: 83-94.

Sinha RP and Häder D-P (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences* **1**: 225-236.

Sinha RP and Häder D-P (2008) UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science* **174**: 278-289.

Sinha RP, Klisch M, Helbling EW, *et al.* (2001) Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **60**: 129-135.

Sivalingam P, Ikawa T and Nisizawa K (1976) Physiological roles of a substance 334 in algae. *Botanica Marina* **19**: 9-22.

Srivastava AK, Rai AN and Neilan BA (2013). Stress biology of cyanobacteria: molecular mechanisms to cellular responses, CRC Press.

Sudprasert W, Navasumrit P and Ruchirawat M (2006) Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells. *International journal of hygiene and environmental health* **209**: 503-511.

Tice R, Agurell E, Anderson D, *et al.* (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* **35**: 206-221.

Vasilkov A, Krotkov N, Herman J, *et al.* (2001) Global mapping of underwater UV irradiances and DNA-weighted exposures using total ozone mapping spectrometer

and sea-viewing wide field-of-view sensor data products. *Journal of Geophysical Research* **106**: 27205.

Waditee-Sirisattha R, Kageyama H, Sopun W, *et al.* (2014) Identification and upregulation of biosynthetic genes required for accumulation of mycosporine-2-glycine under salt stress conditions in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Applied and environmental microbiology* **80**: 1763-1769.

Waditee R, Hibino T, Tanaka Y, *et al.* (2001) Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains an Na⁺/H⁺ antiporter, homologous to eukaryotic ones, with novel ion specificity affected by C-terminal tail. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 36931-36938.

Wang G, Hu C, Li D, *et al.* (2007) The response of antioxidant systems in *Nostoc sphaeroides* against UV-B radiation and the protective effects of exogenous antioxidants. *Advances in Space Research* **39**: 1034-1042.

Wangthong S, Palaga T, Rengpipat S, *et al.* (2010) Biological activities and safety of Thanaka (*Hesperethusa crenulata*) stem bark. *Journal of ethnopharmacology* **132**: 466-472.

Wright DJ, Smith SC, Joardar V, *et al.* (2005) UV irradiation and desiccation modulate the three-dimensional extracellular matrix of *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 40271-40281.

Wu H, Abasova L, Cheregi O, *et al.* (2011) D1 protein turnover is involved in protection of photosystem II against UV-B induced damage in the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **104**: 320-325.



ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในงานวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อลูเรียเบอร์ตานี (Luria-Bertani: LB)

| | | |
|--------------------------------|----|------|
| ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) | 5 | กรัม |
| แบคโตทริปโทน (Bacto tryptone) | 10 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 10 | กรัม |

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Medium A (MMA)

| | | |
|-------------------------------------------------|-----|-----------|
| MMA salts (ความเข้มข้น 5x)* | 200 | มิลลิลิตร |
| 1 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄)* | 2 | มิลลิลิตร |
| 1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl ₂)* | 0.1 | มิลลิลิตร |
| 20% กลูโคส** | 20 | มิลลิลิตร |
| 1% วิตามินบี1 (thiamine)** | 10 | มิลลิลิตร |

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

MMA salts (ความเข้มข้น 5x) ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

| | | |
|--------------------------------------------------------------------|------|------|
| ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K ₂ HPO ₄) | 52.5 | กรัม |
| โมนอโปแทสเซียมฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄) | 22.5 | กรัม |
| โซเดียมซิเตรท | 2.5 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO ₄ .7H ₂ O) | 1.25 | กรัม |

* นำไปนั่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

** นำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน



ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทำโซเดียมซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส
(SDS-PAGE)

1. 30% อะคริลาไมด์ และ 0.8% บิสอะคริลาไมด์ (bis acrylamide)

| | | |
|-------------------------------|------|------|
| อะคริลาไมด์ | 29.2 | กรัม |
| N, N' เมทิลีน บิส อะคริลาไมด์ | 0.8 | กรัม |

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8

| | | |
|---------------------------------|-------|------|
| Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) | 18.17 | กรัม |
|---------------------------------|-------|------|

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ pH 8.8

| | | |
|---------------------------------|------|------|
| Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) | 24.2 | กรัม |
|---------------------------------|------|------|

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8

| | | |
|---------------------------------|------|------|
| Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) | 6.06 | กรัม |
|---------------------------------|------|------|

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 6.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) 12.1 กรัม

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

6. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10%

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 15 กรัม

น้ำกลั่นปลอดประจุ 150 มิลลิลิตร

7. สารละลาย B (SDS-PAGE)

Tris-Cl ความเข้มข้น 2 โมลาร์ pH 8.8 75 มิลลิลิตร

10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 4 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปลอดประจุ 21 มิลลิลิตร

8. สารละลาย C (SDS-PAGE)

Tris-Cl ความเข้มข้น 2 โมลาร์ pH 6.8 50 มิลลิลิตร

10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 4 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปลอดประจุ 46 มิลลิลิตร

9. สารละลายเซฟาริงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 10%

น้ำกลั่นปลอดประจุ 5 มิลลิลิตร

30% อะคริลาไมด์ 3.33 มิลลิลิตร

สารละลาย B 2.5 มิลลิลิตร

10% แอมโมเนียมซัลเฟต 30 ไมโครลิตร

TEMED 10 ไมโครลิตร

10. สารละลายสแต็กกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 5%

| | | |
|----------------------|------|-----------|
| น้ำกลั่นปลอดประจุ | 2.3 | มิลลิลิตร |
| 30% อะคริลาไมด์ | 0.67 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย C | 1 | มิลลิลิตร |
| 10% แอมโมเนียมซัลเฟต | 30 | ไมโครลิตร |
| TEMED | 5 | ไมโครลิตร |

11. สารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 4x (4x SDS-PAGE sample buffer)

| | | |
|-----------------------------------------------|-----|-----------|
| สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 6.8 | 0.6 | มิลลิลิตร |
| 2-เมอแคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) | 0.5 | มิลลิลิตร |
| 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) | 2 | มิลลิลิตร |
| 1% บรอมฟินอลบลู | 1 | มิลลิลิตร |
| 50% กลีเซอรอล | 5 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่นปลอดประจุ | 0.9 | มิลลิลิตร |

12. สารละลาย 10x รันนิงบัฟเฟอร์ (running buffer)

| | | |
|---------------------------------|------|------|
| Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) | 30.2 | กรัม |
| ไกลซีน (Glycine) | 144 | กรัม |
| โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) | 10 | กรัม |

ผสมสารแต่ละชนิดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำสารละลายไปใช้ต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

13. สีย้อมคูแมสซีบลู (Coomassie blue staining solution)

| | | |
|--------------------------------|-----|-----------|
| สีย้อมคูแมสซีบลูรีเฟอเรนซ์-250 | 1 | กรัม |
| 50% เมทานอล | 500 | มิลลิลิตร |

| | | |
|-----------------------|-----|-----------|
| 10% กรดอะซิติกเข้มข้น | 100 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่นปลอดประจุ | 400 | มิลลิลิตร |

14. สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

| | | |
|-----------------------|-----|-----------|
| 40% เมทานอล | 400 | มิลลิลิตร |
| 10% กรดอะซิติกเข้มข้น | 100 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่นปลอดประจุ | 100 | มิลลิลิตร |



ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทำเวสเทิร์น บลอต (Western Blot)

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สลิ้น (Phosphate-buffer-saline: PBS)

โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

2. สารละลายบัฟเฟอร์ Blocking

5% นมขาดมันเนย (skim milk) และ 0.01% ทวิน 20 (Tween20) ในสารละลาย
1x PBS

3. สารละลายบัฟเฟอร์ Blotting transfer

| | | |
|---------------------------------|------|-----------|
| Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) | 3 | กรัม |
| ไกลซีน (glycine) | 14.4 | กรัม |
| เมทานอล | 200 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่นปลอดประจุ | 800 | มิลลิลิตร |

4. สารละลายสำหรับตรวจสอบเวสเทิร์น บลอต

| | | |
|-----------------------------------------------------|-----|-----------|
| Barbital ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ pH 9.6 | 18 | มิลลิลิตร |
| NTB (Nitro Blue Tetrazolium) 0.1% | 2 | มิลลิลิตร |
| แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ | 80 | ไมโครลิตร |
| BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) 0.5% | 200 | ไมโครลิตร |

เตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบเวสเทิร์น บลอตใหม่ทุกครั้ง โดยแช่เมมเบรนเป็นเวลาไม่เกิน 30 นาที จะปรากฏแถบสีเข้มบนเมมเบรน จากนั้นล้างเมมเบรนด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2-3 รอบ

ภาคผนวก ง

วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โคเมท (Comet assay)

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สลิ้น (Phosphate-buffer-saline: PBS)

| | | |
|----------------------------------------------------|------|------|
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 8 | กรัม |
| โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) | 0.2 | กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรฟอสเฟต (Na_2HPO_4) | 1.44 | กรัม |
| โมโนโปแตสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) | 0.24 | กรัม |

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมแผ่นสไลด์และการตรึงเซลล์

1% Normal melting agarose (500 มิลลิกรัม/50 มิลลิลิตร PBS) สำหรับฉาบบนสไลด์ที่สเตอไรด์

0.8% Normal melting agarose (400 มิลลิกรัม/50 มิลลิลิตร PBS) สำหรับผสมกับเซลล์ A-375

1% Normal melting agarose (500 มิลลิกรัม/50 มิลลิลิตร น้ำปลอดประจุ) สำหรับปิดทับสไลด์ชั้นสุดท้าย

3. สารละลายบัฟเฟอร์ไลซิส (Lysis solution)

| | | |
|-----------------------------------------|-------|------|
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 146.1 | กรัม |
| เอทาลีนไดเอมีนเตตระแอะซิติกแอซิด (EDTA) | 37.2 | กรัม |
| Tris-HCl | 1.2 | กรัม |
| โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) | 8 | กรัม |

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 10 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำไปใช้ให้เตรียม lysis solution ที่เติม Triton X-100 1% กับ DMSO

10% ใหม่ทุกครั้ง และนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำแผ่นสไลด์ไปแช่

4. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับคลายเกลียวดีเอ็นเอ (DNA unwinding)

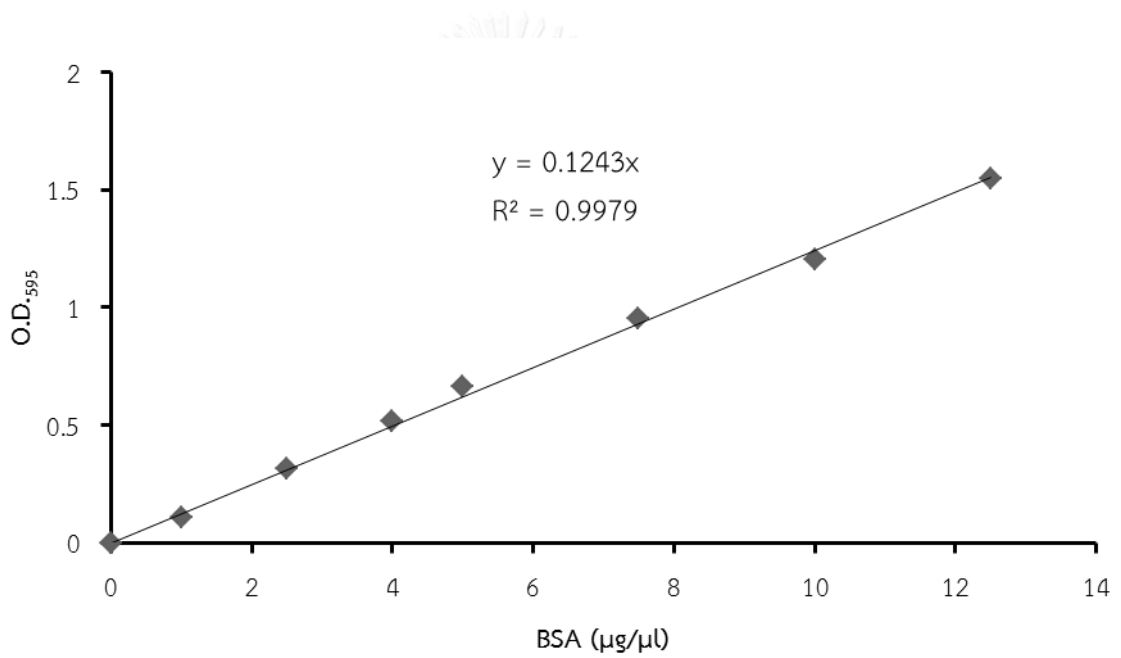
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์
เอทาลีนไดเอมีนเตตระแอสिटิกแอซิด (EDTA) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ pH 13
เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำไปใช้ให้เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์เจือจาง 1x ใหม่ทุกครั้ง (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 มิลลิลิตร และเอทาลีนไดเอมีนเตตระแอสिटิกแอซิด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร)

5. สารละลายบัฟเฟอร์ Neutralization

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) 48.5 กรัม
ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 โมลาร์ และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

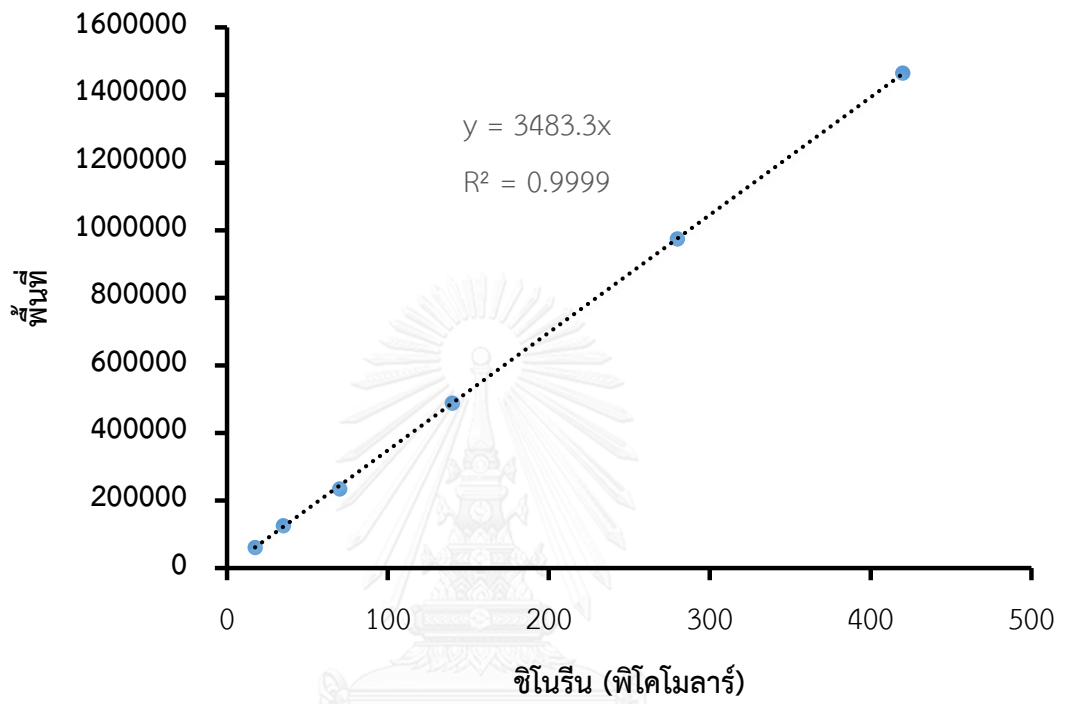
ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐานโปรตีน



ภาคผนวก ฉ

กราฟมาตรฐาน MAA



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิภาพร ชีวินธำรงโรจน์ เกิดเมื่อวันที่ 25 เมษายน พ.ศ. 2533 ที่จังหวัดยโสธร สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556 ในระหว่างการศึกษได้เข้าร่วมเสนอผลงานบางส่วนในงานประชุมวิชาการวิชาการสหราชอาณาจักรและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 สำหรับรายและแพลงก์ตอน: เพื่อสิ่งแวดล้อมที่ดีและเศรษฐกิจที่มั่นคง ห้องบอลรูม ชั้น 1 โรงแรมนารายณ์ กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2558 ในหัวข้อ Effect of salinity stress and exogenous supply of amino acids for accumulation of mycosporine-2-glycine in *Aphanothece halophytica*

