



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การโคลนและการแสดงออกของยีนที่กำหนดรหัส Glutathione S-transferase จากเฮ็กซ์ทรีโมไฟล์ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418		
	Molecular cloning and expression of glutathione S-transferase encoding gene from extremophile <i>Halotheca</i> sp. PCC7418		
ชื่อนิสิต	นายยศกร สมัญญ	เลขประจำตัว	5832343723
ภาควิชา	จุลชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2561		

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการ

การโคลนและการแสดงออกของยีนที่กำหนดรหัส Glutathione S-transferase จากเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ *Halotheca* sp. PCC7418

โดย

นายยศกร สมัญ รหัสบัณฑิต 5832343723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรัทธา

ปีการศึกษา

2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์



หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ



อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรัทธา)



กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี)



กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัสวลาภสกุล)



กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร)

ชื่อโครงการ การโคลนและการแสดงออกของยีนที่กำหนดรหัส Glutathione S-transferase จากเชื้อหริโมไฟล์ *Halothece* sp. PCC7418

นิสิตผู้เสนอโครงการ นายศกร สมัญ รหัสประจำตัวนิสิต 5832343723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน จึงจัดเป็นผู้ผลิตที่สำคัญในระบบนิเวศ อีกทั้งสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียได้เกือบทุกพื้นที่ไม่ว่าจะเป็น บนบก น้ำทะเล น้ำจืด ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบได้ในภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต เช่น ภาวะที่ความเข้มข้นของเกลือสูง จะทำให้เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเกิดความเครียดจนสามารถตายได้ แต่อย่างไรก็ตามไซยาโนแบคทีเรียก็สามารถอยู่รอดได้ด้วยกลไกการตอบสนองต่อความเครียดซึ่งมีหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น เอนไซม์ สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ โดยงานวิจัยนี้ศึกษาเอนไซม์ Glutathione S-transferase (GST) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการลดความเป็นพิษภายในเซลล์ รวมไปถึงการตอบสนองต่อภาวะความเครียด จากการสืบค้นข้อมูลทางชีวสารสนเทศพบว่า ภายในจีโนมของ *Halothece* sp. PCC7418 มียีนกำหนดรหัส GST ทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ PCC7418_1478, PCC7418_0729, PCC7418_3557 และ PCC7418_0647 โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกมาศึกษา 2 ยีน คือ PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 ซึ่งยีน PCC7418_1478 จะกำหนดรหัส GST ที่มีลำดับกรดอะมิโน 186 เรซิดิว มวลโมเลกุลทางทฤษฎีประมาณ 21 กิโลดาลตัน ค่า pI ทางทฤษฎี 5.44 ส่วนยีน PCC7418_0729 กำหนดรหัส GST ที่มีลำดับกรดอะมิโน 399 เรซิดิว มวลโมเลกุลทางทฤษฎีประมาณ 46 กิโลดาลตัน ค่า pI ทางทฤษฎี 5.48 ซึ่งได้นำยีนกำหนดรหัส GST ทั้ง 2 ยีนโคลนเข้าเวกเตอร์แสดงออก pColdI ซึ่งผลจากการสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีน PCC7418_1478 พบว่ามีทรานสฟออร์แมนท์ที่สามารถรับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน PCC7418_1478 แทรกสอดได้ แล้วนำมายืนยันด้วยการนำพลาสมิดลูกผสมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับ PCC7418_1478 และ pColdI จึงได้นำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนต่อไป แต่การสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีน PCC7418_0729 กลับไม่สามารถตรวจพบทรานสฟออร์แมนท์ที่สามารถรับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน PCC7418_0729 ได้ และจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนจากยีน PCC7418_1478 ด้วยวิธี SDS-PAGE ไม่พบแถบของโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 21 กิโลดาลตัน อีกทั้งจากการตรวจสอบด้วยวิธี เวสเทิร์น บลอตติง ก็ไม่พบสัญญาณการแสดงออกของโปรตีนด้วยเช่นกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำไม่เหมาะสม หรือ เวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำไม่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการแสดงออกได้ ดังนั้นจึงควรหาภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนเพื่อให้ยีนได้เกิดการแสดงออก ซึ่งสามารถใช้ในการศึกษาต่อไป

Project titer Molecular cloning and expression of Glutathione S-transferase encoding gene from extremophile *Halothece* sp. PCC7418

Investigator Mr Yodsagon Samun student ID 5832343723

Project advisor Associate Professor Dr. Rungaroon Waditee-Sirisattha, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Cyanobacteria are oxygenic photosynthetic bacteria which are considered to be important producer in ecosystem. Also, cyanobacteria can be found in a wide variety of habitats ranging from terrestrials to marine habitats. Interestingly, cyanobacteria can also be found in extreme environments, such as hypersaline environments that stressed cell of living organisms until lethal. However, cyanobacteria can survive in extreme environments with stress response mechanisms including enzyme and secondary metabolite. This study aims to study Glutathione S-transferase. The enzyme has predominant role of cellular detoxification. Moreover, it also can play a role in stress response. From bioinformatics analysis revealed that the whole genome of *Halothece* sp. PCC7418 encodes four putative GST genes which are PCC7418_1478, PCC7418_0729, PCC7418_3557 and PCC7418_0647. In this study focused on two genes that are PCC7418_1478 and PCC7418_0729. PCC7418_1478 comprises of 186 amino acid residues, theoretical molecular weight is 21 kDa and theoretical pI is 5.44. For another, it comprises of 399 amino acid residues, theoretical molecular weight is 46 kDa and theoretical pI is 5.48. These two genes were cloned into expression vector, pColdI. Construction of PCC7418_1478 into pColdI was success in which was confirmed by colony PCR and restriction analysis, respectively. In case of PCC7418_0729, construction was not success. The following step was recombinant protein expression analysis of PCC7418_1478 using SDS-PAGE. The results revealed no target protein (corresponding to 21 kDa) was induced. Western blotting analysis was not obtained specific band. These negative results may cause by concentration of inducer or time of induction (not suitable for protein expression). So, the optimization of protein expression will be required for further study.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ดร. รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรีธธา มา ณ ที่นี้ ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และคำสั่งสอนตลอดการทำวิจัย ไม่ว่าจะเป็น การวางแผนการทดลอง, การดำเนินการทดลอง การอภิปรายและสรุปผลการทดลอง การแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และการช่วยตรวจทานแก้ไขการเขียนโครงการเล่มนี้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้มอบความรู้ในด้านต่างๆ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ฝายวิชาการณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกในทุกๆด้าน ทั้งด้านการศึกษาและการวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆในห้องวิจัย 1904/17 ทุกคน พี่มุก พี่อุ้ม พี่บ๋ม พี่แพรว พี่โลมา พี่เป้ และนายชานาญวัต กอธีระกุล เพื่อนร่วมห้องปฏิบัติการในระดับปริญญาศึกษา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคำแนะนำที่มีประโยชน์ต่อการวิจัยและการเขียนโครงการเล่มนี้ตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ นิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่น 42 และพี่ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาไม่ว่าจะเป็นด้านการศึกษา และการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ คอยให้กำลังใจ ตลอดการทำวิจัยครั้งนี้จนสามารถสำเร็จและผ่านไปได้ด้วยดี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	15
3.1 ซิวสารสกัดของยีนกำหนดรหัส Glutathione S-transferase (GST) จาก เอ็กซ์ทรีโมไฟล์ <i>Halothece</i> sp. PCC7418	15
3.2 การเลี้ยงเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ <i>Halothece</i> sp. PCC7418	16
3.3 การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ <i>Halothece</i> sp. PCC7418	16
3.4 การเพิ่มจำนวนยีนที่กำหนดรหัส GST ด้วย ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR)	17
3.5 การเตรียมเวกเตอร์แสดงออก pColdI	18
3.6 การตัดยีนกำหนดรหัส GST ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	20
3.7 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (Competent cells)	20
3.8 การทำปฏิกิริยาไลเกท	20
3.9 การทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (<i>E.coli</i> DH5 α)	22
3.10 การทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แสดงออก (<i>E.coli</i> BL21)	22
3.11 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน	22
3.12 ออกแบบการทดลอง	26

เรื่อง	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	27
4.1 ซิวสารสนเทศของยีนกำหนดรหัส GST จาก เอ็กซ์ทรีโมไฟล์ <i>Halothece</i> sp. PCC7418	27
4.2 การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ <i>Halothece</i> sp. PCC7418	43
4.3 การเพิ่มจำนวนยีนกำหนดรหัส GST ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR)	44
4.4 เตรียมเวกเตอร์แสดงออก pColdI	45
4.5 ทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	47
4.6 สกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากตัวอย่าง	50
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	54
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	60
ภาคผนวก ข ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	62
ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pColdI	64
ภาคผนวก ง สารเคมีสำหรับทำอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส	65
ภาคผนวก จ กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ BSA	66
ภาคผนวก ฉ สารเคมีสำหรับทำ SDS-PAGE	67
ภาคผนวก ช สารเคมีสำหรับทำเวสเทิร์น บลอททิง	70

สารบัญรูปภาพ

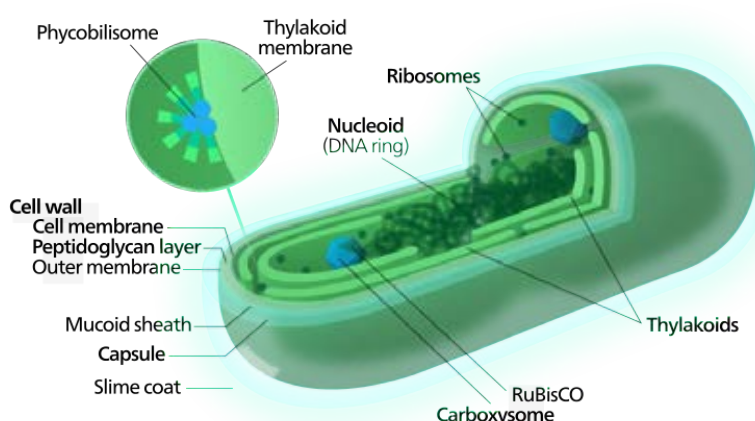
ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย	1
ภาพที่ 1.2 แผนภาพโดยรวมของผลกระทบที่ถูกชักนำจากภาวะเครียดเกลือ	3
ภาพที่ 1.3 แบบแผนการควบคุมโลหะหนักในระดับสรีรวิทยา, ระดับชีวเคมี และ ระดับโมเลกุลของไซยาโนแบคทีเรีย	4
ภาพที่ 1.4 โครงสร้างทุติยภูมิของเอนไซม์ glutathione S-transferase ซึ่งแสดงเกลียวแอลฟา แผ่นพลิตบีต้า และการม้วนพับ	5
ภาพที่ 1.5 บทบาทของเอนไซม์ glutathione S-transferase ในกระบวนการ กำจัดสารพิษภายในเซลล์	6
ภาพที่ 1.6 โครงสร้างหน่วยย่อยของ GST	7
ภาพที่ 1.7 ตำแหน่งของ L-site ที่ไม่ชัดเจน	8
ภาพที่ 1.8 แผนภาพโดยรวมของการนำ GSTs ไปประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพ	8
ภาพที่ 1.9 ปฏิกิริยา Reductive dehalogenation ของ 2,5-dichlorohydroquinone โดย Lin D (GST คลาส zeta)	9
ภาพที่ 4.1.1 โพรตีนโดเมนของ PCC7418_0647	28
ภาพที่ 4.1.2 โพรตีนโดเมนของ PCC7418_0729	29
ภาพที่ 4.1.3 โพรตีนโดเมนของ PCC7418_1478	30
ภาพที่ 4.1.4 โพรตีนโดเมนของ PCC7418_3557	31
ภาพที่ 4.1.5 Putative conserved domain ของ GST จาก PCC7418_1478	32
ภาพที่ 4.1.6 Multiple amino acid sequence alignment ของ GST จาก PCC7418_1478 กับ Ortholog	33
ภาพที่ 4.1.7 Phylogenetic tree ของ GST จาก PCC7418_1478	36
ภาพที่ 4.1.8 Putative conserved domain ของ GST จาก PCC7418_0729	37

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 4.1.9 Multiple amino acid sequence alignment ของ GST จาก PCC7418_0729 กับ Ortholog	38
ภาพที่ 4.1.10 Phylogenetic tree ของ GST จาก PCC7418_0729	41
ภาพที่ 4.2 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418	43
ภาพที่ 4.3 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของผลิตภัณฑ์ PCR	44
ภาพที่ 4.3.1 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์	45
ภาพที่ 4.4.1 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของเวกเตอร์แสดงออก pColdI	46
ภาพที่ 4.5.1.1 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิสของโคลน PCR ของ PCC7418_1478/pColdI ใน <i>E.coli</i> DH5 α	48
ภาพที่ 4.5.1.2 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิสของการตัด PCC7418_178/pColdI ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NdeI</i> และ <i>BamHI</i>	49
ภาพที่ 4.5.2 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิสของโคลน PCR ของ PCC7418_0729/pColdI ใน <i>E.coli</i> DH5 α	49
ภาพที่ 4.6 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิสของโคลน PCR ของ PCC7418_1478/pColdI ใน <i>E.coli</i> BL21	50
ภาพที่ 4.6.1 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE	52
ภาพที่ 4.6.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี เวสเทิร์น บลอททิง	53

บทที่ 1

บทนำ

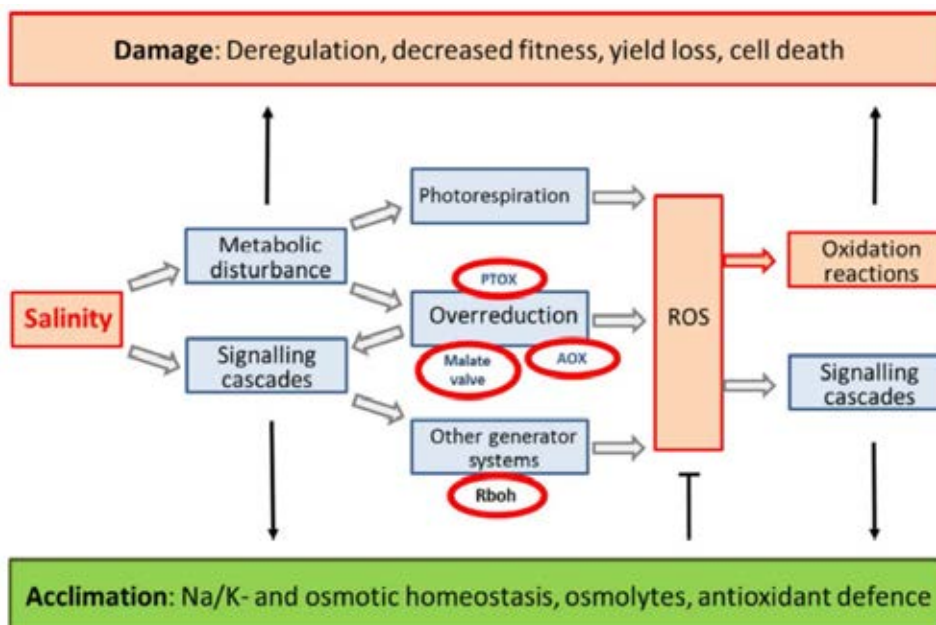
ไซยาโนแบคทีเรีย หรือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโพรคาริโอต (Prokaryote) (Saini และคณะ, 2018) ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพอย่างมาก โดยที่ไซยาโนแบคทีเรีย ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ไม่มีไมโทคอนเดรีย ไม่มีคลอโรพลาสต์ มีสารพันธุกรรมที่มีลักษณะเป็นวงแหวน (Circular DNA) มีผนังเซลล์ที่เกิดจากสารประกอบเปปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) (Nguyen และ Hoang, 2016) สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งมีบางสกุลที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Zehr, 2011) ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียจึงมีบทบาทที่สำคัญในวัฏจักรไนโตรเจน และวัฏจักรคาร์บอนบนโลก (Karl และคณะ, 2002) องค์ประกอบภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายแบคทีเรียทุกประการ แต่แตกต่างที่ไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุ (Pigment) หลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ, คลอโรฟิลล์ บี, แคโรทีนอยด์, ไฟโคไซยานิน, อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทริน (Tomitani และคณะ, 1999; Tanaka และ Tanaka, 2011; Green และ Durnford, 1996) ซึ่งรงควัตถุที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงคือ คลอโรฟิลล์ เอ (Tanaka และ Tanaka, 2011) อีกทั้งรงควัตถุเหล่านี้ก็ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่แตกต่างกันไป โดยเฉพาะการรวมกันของ ไฟโคบิลิน และคลอโรฟิลล์ เอ ทำให้เกิดเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินจึงเป็นลักษณะเฉพาะของไซยาโนแบคทีเรีย (Vincent, 2009) แต่อย่างไรก็ตามไซยาโนแบคทีเรียหลายสกุลก็มีลักษณะเป็นสีอื่นๆ เช่น เหลือง น้ำตาล ดำ และแดง เป็นต้น ซึ่งรงควัตถุทั้งหลายจะถูกสะสมอยู่ที่เยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (Douglas, 1994) ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงได้ จึงเป็นผู้ผลิตที่สำคัญในห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศ (Bryant, 2003)



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย

(ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria> เข้าถึงข้อมูลวันที่ 15 มกราคม 2562)

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เพราะมีไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer membrane) (Durai และคณะ, 2015; Hoiczky และ Hansel, 2000) อีกทั้งไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่ไม่เป็นเส้นสาย (Non-filamentous form) และเป็นเส้นสาย (Filamentous form) ซึ่งกลุ่มที่ไม่เป็นเส้นสาย ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นทรงกลม (Cocoid form) พบทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยว และอยู่กันเป็นกลุ่ม ส่วนกลุ่มที่เป็นเส้นสาย โดยเซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย (Chorus และ Bartram, 1999) สำหรับแหล่งที่อยู่ของไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียสามารถอยู่ได้เกือบทุกสภาวะบนโลกทั้ง น้ำจืด น้ำทะเล บนบก รวมทั้งภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต (Extreme environment) (Paerl และคณะ, 2000) เช่น บริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง จะพบกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม (Halophilic cyanobacteria) ซึ่งชอบอาศัยในพื้นที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ตั้งแต่ 2.5-5.2 โมลาร์ NaCl (Ali และคณะ, 2016), บริเวณที่มีอุณหภูมิสูง ไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบความร้อน (Thermophilic cyanobacteria) กลุ่มนี้จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส (Castenholz, 1988) เป็นต้น ที่น่าสนใจคือสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียในสภาวะแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยมลพิษสูง ไม่ว่าจะเป็น โลหะหนัก, สารเคมีที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่งมีโลหะทรานซิชัน (Transition metal) บางชนิดที่เป็นที่ต้องการของไซยาโนแบคทีเรียโดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน และการตรึงไนโตรเจน (Divya และคณะ, 2018) แต่อย่างไรก็ตามสารมลพิษเหล่านี้จะทำให้เซลล์เกิดความเครียด อีกทั้งยังทำให้เซลล์เกิดความเครียดตามมา (Bapsita และ Vasconcelos, 2006) แต่ไม่ใช่แค่สารมลพิษที่ทำให้เซลล์เกิดความเครียด ความเค็ม (Salinity) และภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (Oxidative) ก็สามารถทำให้เซลล์เกิดความเครียดได้เช่นกัน โดยถ้าความเค็มมีค่าสูงเกินที่ไซยาโนแบคทีเรียจะรับได้ จะเกิดภาวะเครียดเกลือ (Salt stress) (Hossain และ Dietz, 2016) อีกทั้งยังเกิดความเครียดที่เกิดจากภาวะไม่สมดุลของอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Oxidative stress) (Latifi และคณะ, 2009) ซึ่งความเครียดเหล่านี้จะส่งผลให้เซลล์เกิดอะพอพโทซิส (Apoptosis) ที่เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์แบบที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (Programmed cell death) (Rastogi และ Madamwar, 2015) แต่อย่างไรก็ตามไซยาโนแบคทีเรียหลากหลายชนิดก็สามารถอยู่รอดภายใต้ภาวะเหล่านี้ได้ โดยมีกลไกและกระบวนการที่ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียเกิดการปรับตัวภายใต้ภาวะเหล่านี้ได้ ซึ่งกลไกและกระบวนการเหล่านี้จะช่วยกำจัดสารพิษภายในเซลล์ กำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากเซลล์ หรือลดระดับความเป็นพิษภายในเซลล์ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยกลไกและกระบวนการเหล่านี้ อาจจะเป็นการสร้างโปรตีน เอนไซม์ หรือ การผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) (Latifi และคณะ, 2009)

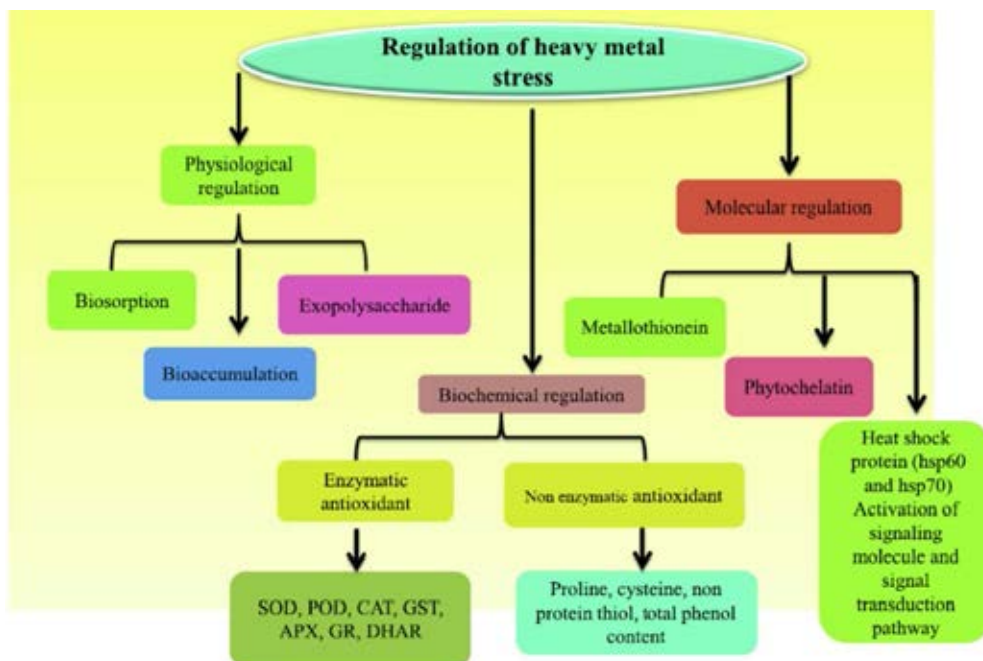


ภาพที่ 1.2 แผนภาพโดยรวมของผลกระทบที่ถูกชักนำจากภาวะเครียดเกลือ

(Hossain และ Dietz, 2016)

สำหรับไซยาโนแบคทีเรีย ที่งานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาคือ *Halotheca* sp. PCC7418 เป็นแอ็กซ์ทรีโมไฟล์ ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม เพราะคัดแยกได้จากทะเลเดดซี (Dead sea) ประเทศอิสราเอล (Waditee-sirisattha และคณะ, 2014) ซึ่งเป็นทะเลสาบน้ำเค็มที่อยู่ในพื้นที่ต่ำมากที่สุดในโลก และเค็มที่สุดในโลก โดยต่ำกว่าระดับน้ำทะเลมากกว่า 420 เมตร และมีปริมาณเกลือในแหล่งน้ำถึง 34% อีกทั้งยังมีค่า pH เท่ากับ 5.9 ซึ่งต่ำมาก จึงชี้ให้เห็นได้ว่า ทะเลเดดซีมีความเป็นกรด ยิ่งไปกว่านั้นในทะเลสาบเดดซียังพบไอออนบวกหลายชนิดและมีปริมาณมาก ดังนั้นทะเลเดดซีจึงเป็นภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไป (Jacob และคณะ, 2017) โดยภาวะดังกล่าวจะทำให้เซลล์เกิดความเครียดทั้งภาวะเครียดเกลือ ภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงศึกษากลไกการป้องกันความเครียดของ *Halotheca* sp. PCC7418

และในงานวิจัยของ Tiwari และคณะ ในปี 2019 ได้ศึกษาการควบคุมในระดับสรีรวิทยา และ ระดับโมเลกุลของโลหะในไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าไซยาโนแบคทีเรียมีหลายกลไกกระบวนการในการป้องกันความเครียดจากโลหะเพื่อให้อยู่รอดได้ในภาวะแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยโลหะ ไม่ว่าจะเป็น การสร้าง exopolysaccharides (EPS), methallothionenins, chaperone proteins ยิ่งไปกว่านั้นยังมี enzymatic antioxidants และ non-enzymatic antioxidants ดังแสดงในภาพที่ 1.3



ภาพที่ 1.3 แบบแผนการควบคุมโลหะหนักในระดับสรีรวิทยา, ระดับชีวเคมี และระดับโมเลกุลของไซยาโนแบคทีเรีย

(Tiwari และคณะ, 2019)

และในงานวิจัยของ Divya และคณะ ในปี 2018 ได้ศึกษาโปรตีน metallothionenins (MTs) ชนิดใหม่ของสิ่งมีชีวิตกลุ่มโพรคาริโอต คือ NmtA ค้นพบจากไซยาโนแบคทีเรียเส้นสาย *Anabaena* sp. PCC 7120 ซึ่งโปรตีน NmtA จะทำพันธะไดซัลไฟด์กับโลหะสังกะสี และลดความเป็นพิษของโลหะแคดเมียม ทำให้ *Anabaena* sp. PCC 7120 สามารถอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วย Cd^{2+} ได้

กลไกและกระบวนการที่ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถอยู่รอดภายใต้ภาวะเครียดต่าง ๆ นั้นจึงมีหลากหลายชนิด ในงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีความสนใจศึกษาเอนไซม์ที่มีส่วนช่วยให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถอยู่รอดภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต และหนึ่งในเอนไซม์เหล่านั้นคือ Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18)

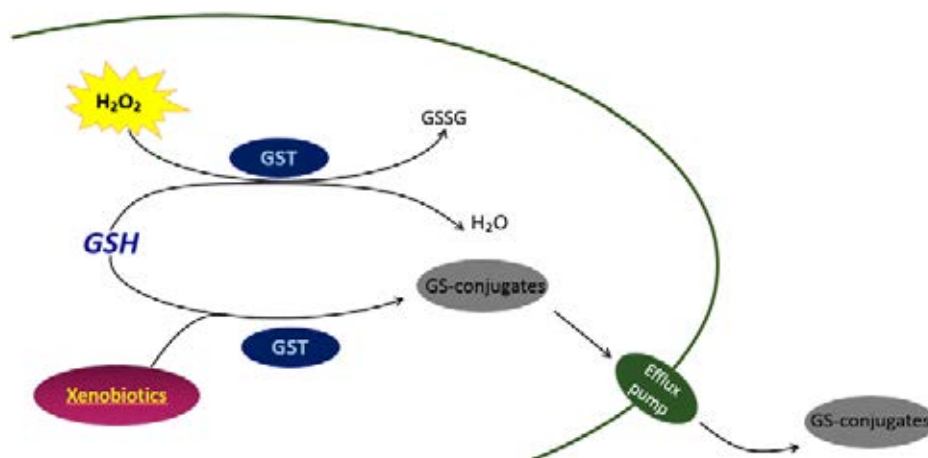


ภาพที่ 1.4 โครงสร้างทุติยภูมิของเอนไซม์ของ glutathione S-transferase ซึ่งแสดงเกลียวแอลฟา แผ่น
พลิตบีต้า และการม้วนพับ

(Perperopoulou และคณะ, 2017)

GST เป็นเอนไซม์ที่สร้างภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการกำจัดสารพิษ และลดความเครียดภายในเซลล์ โดยมีบทบาทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคอนจูเกชันระหว่างสารประกอบอเล็กโตรไฟล์ และ โปรตีนกลูต้าไธโอน (GSH) ในรูปรีดิวซ์ฟอรัม โดยจะให้สารกลุ่มนิวคลีโอไฟล์ของโปรตีนกลูต้าไธโอน (GSH) เข้าทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มอเล็กโตรไฟล์โดยสร้างพันธะไดซัลไฟด์กับโมเลกุลนั้น แล้วเปลี่ยนเป็นรูปออกซิไดส์ฟอรัม (Zhang และคณะ, 2018) ซึ่งสารประกอบอเล็กโตรไฟล์มีมากมายหลากหลายชนิด เช่น กลุ่มสารแปลกปลอม (Xenobiotics) ได้แก่ ยาฆ่าแมลง, ยา, สารเคมีกำจัดศัตรูพืช, ผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เป็นของเสีย, โลหะหนัก ซึ่งสารแปลกปลอมเหล่านี้ก็ยังสามารถทำให้เกิดความเครียดตามมาในภายหลังได้ ดังนั้นปฏิกิริยาคอนจูเกชันจึงมีส่วนช่วยในกระบวนการกำจัดสารพิษภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยมีหลายบทบาทได้แก่ 1.) กำจัดปฏิกิริยาและความเป็นพิษของสารประกอบอเล็กโตรไฟล์ที่เข้ามาในเซลล์ 2.) เพิ่มค่าการละลายให้สารประกอบอเล็กโตรไฟล์เพื่อให้ง่ายต่อการกำจัดด้วย ABC transporters (Perperopoulou และคณะ, 2017) สุดท้ายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการคอนจูเกชันสามารถละลายน้ำได้และอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถทำงานได้จึงสามารถกำจัดออกนอกเซลล์อย่างรวดเร็วด้วยกลไก efflux pump ยิ่งไปกว่านั้น เอนไซม์ GST ยังสามารถกำจัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากความเครียดจากการสร้างและสะสมสารอนุมูล

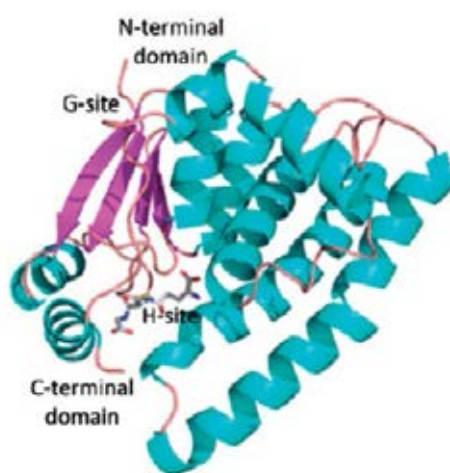
อิสระ (oxidative stress) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Pandey และคณะ, 2015a) (ดังแสดงในภาพที่ 1.5)



ภาพที่ 1.5 บทบาทของเอนไซม์ glutathione S-transferase ในกระบวนการกำจัดสารพิษภายในเซลล์

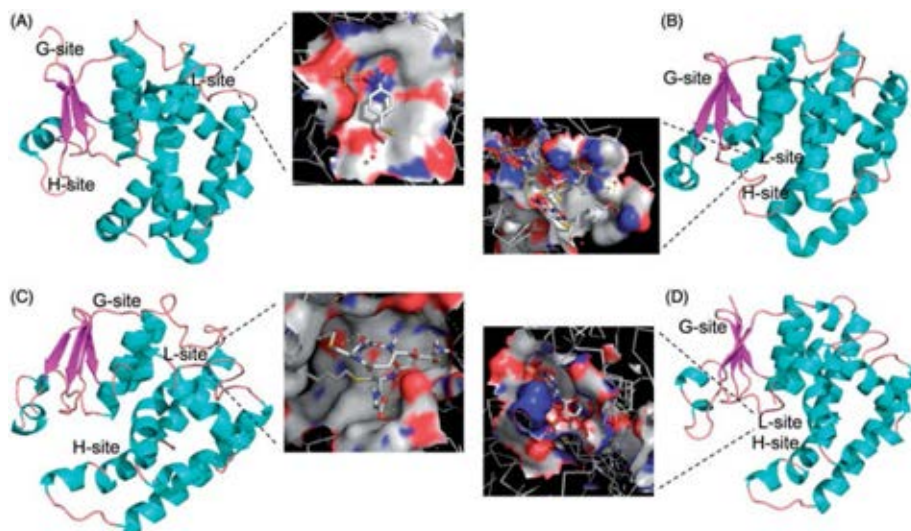
GSTs สามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรคาริโอต และยูคาริโอต ซึ่ง GST ได้ถูกจัดแบ่งออกเป็นอย่างน้อย 4 ซูเปอร์แฟมิลี ได้แก่ GST ที่อยู่ในไซโทพลาสซึม (cytosolic GSTs: cGSTs), GST ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial GSTs) หรือ GST คลาส kappa (Morel และ Aninat, 2016), GST ที่เกี่ยวข้องกับเมมเบรน (microsomal GSTs หรือ membrane-associate proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism: MAPEG) และ bacterial fosfomycin resistance proteins (FosA) ซึ่งพบเฉพาะในแบคทีเรีย (Allocati และคณะ, 2009; Ito และคณะ, 2017; Perperopoulou และคณะ, 2017; Shehu และคณะ, 2019) โดยในทุกสิ่งมีชีวิตพบว่ามี GSTs ในแฟมิลี cGSTs เป็นส่วนใหญ่เมื่อเทียบกับแฟมิลีอื่น ซึ่งใน cGSTs ได้มีการจัดแบ่งภายในออกเป็นคลาส อย่างน้อย 17 คลาส โดยใช้อักษรกรีกในการตั้งชื่อ ได้แก่ Pi, Omega, Theta, Zeta, Nu, Epsilon, Tau, Iota, Phi, Delta, Lambda, Sigma, Alpha, Mu, Chi และ Rho ซึ่งคลาส Rho เป็นคลาสที่ค้นพบใหม่ล่าสุด (Pandey และคณะ, 2015b) ในการจัดแบ่งคลาสจะใช้เกณฑ์ที่หลากหลายได้แก่ ความจำเพาะกับสารตั้งต้น (Substrate specificity), ปฏิกริยาข้ามของระบบภูมิคุ้มกัน (Immunological cross-reactivity), ความไวของสารยับยั้ง (Inhibitor sensitivities) และ ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (Amino acid sequence similarity) (Pandey และคณะ, 2015b) สำหรับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ GSTs ต้องได้มากกว่า 40 % จึงสามารถจัดให้อยู่ในคลาสเดียวกัน ถ้ามีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนน้อยกว่า 25 % จะถูกจัดให้อยู่คลาสอื่น (Perperopoulou และคณะ, 2017) ยิ่งไปกว่านั้นก็ยังมียีนที่ช่วยเสริมในการจัดคลาสอีก เช่น มวลโมเลกุล, สมบัติทางโครงสร้างตติยภูมิหรือจตุรภูมิ (Tertiary/Quaternary structural properties), กิจกรรมทางด้านชีวเคมี (Biochemical activity), จลศาสตร์ของเอนไซม์ (Enzyme kinetics) (Pandey และคณะ, 2017) จากรายงานการศึกษาพบว่า GST บางคลาสจะมีลักษณะเชิงคุณสมบัติที่เฉพาะตัว เช่น GST คลาส Chi จากไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* PCC6803 สามารถทนต่อ pH ในช่วง 2.0-11.0 ได้ (Pandey และคณะ, 2015a)

cGSTs เป็นแฟมิลีที่พบมากที่สุดที่เรีย ในแบคทีเรีย จากการศึกษาทางชีวเคมีพบว่า มีลักษณะเป็น dimeric proteins ที่ละลายน้ำได้ ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน หรือต่างกันได้ แต่หน่วยย่อยเกิดจากการพอร์มของกรดอะมิโน 200-250 ตัว ทำให้แต่ละหน่วยย่อยมีมวลโมเลกุลประมาณ 22-28 kDa อีกทั้งแต่ละหน่วยย่อยจะประกอบไปด้วย 2 โดเมน ได้แก่ โดเมนด้านปลาย N (N-terminal domain) และ โดเมนด้านปลาย C (C-terminal domain) อีกทั้งผลจากการศึกษาทางด้านผลึกศาสตร์ และชีวกายภาพแสดงให้เห็นว่าแต่ละหน่วยย่อยของ GST ต้องมีอย่างน้อย 2 ตำแหน่งจับลิแกนด์ (ligand-binding sites) คือ G-site เป็นตำแหน่งที่ทำพันธะกับ GSH และ H-site (ดังแสดงในภาพที่ 1.6) เป็นตำแหน่งที่ทำพันธะกับสารประกอบอเล็กโทรไฟล์ ซึ่ง G-site จะอยู่ในส่วนของโดเมนด้านปลาย N และมีความจำเพาะอย่างสูงกับ GSH แต่ในการศึกษาปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า tri-peptide analogs สามารถทำพันธะกับ G-site ได้แต่มีความสามารถในการจับ และประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาที่ต่ำ ส่วน H-site จะอยู่ในส่วนโดเมนด้านปลาย C ซึ่งมีโครงสร้างที่หลากหลาย รวมถึงความอ่อนตัว และสมบัติความยืดหยุ่นที่สูง ทำให้สามารถทำพันธะกับสารประกอบอเล็กโทรไฟล์ได้หลากหลายชนิด ในการศึกษาปัจจุบันพบว่า ยังมีอีก 1 ligand-binding site คือ L-site ที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนจาก G-site และ H-site โดยที่ จะไม่มีการเร่งปฏิกิริยา แต่ตำแหน่งของ L-site ในการศึกษาปัจจุบันยังไม่ชัดเจน (Perperopoulou และคณะ, 2017) (ดังแสดงในภาพที่ 1.7)



ภาพที่ 1.6 โครงสร้างหน่วยย่อยของ GST (human GSTA1-1)

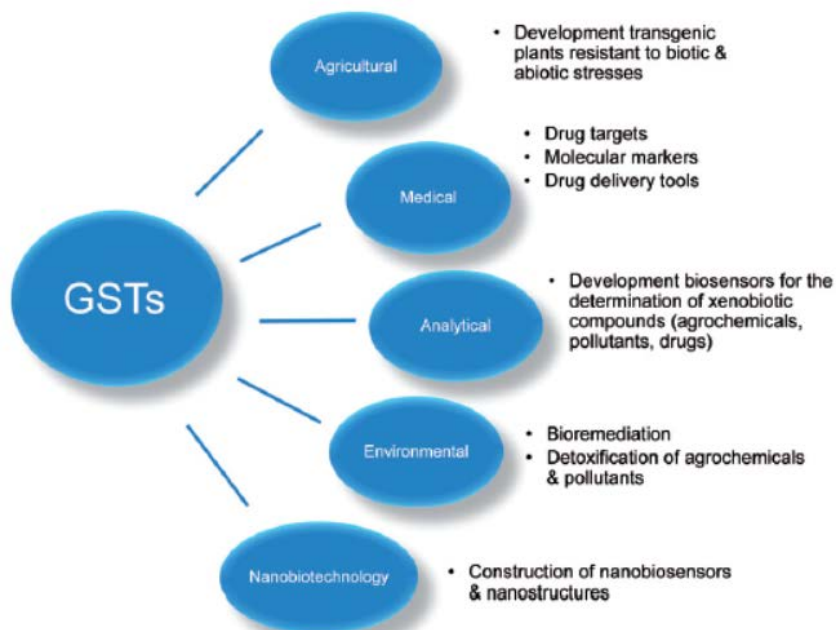
(Perperopoulou และคณะ, 2017)



ภาพที่ 1.7 ตำแหน่งของ L-site ที่ไม่ชัดเจน

(Perperopoulou และคณะ, 2017)

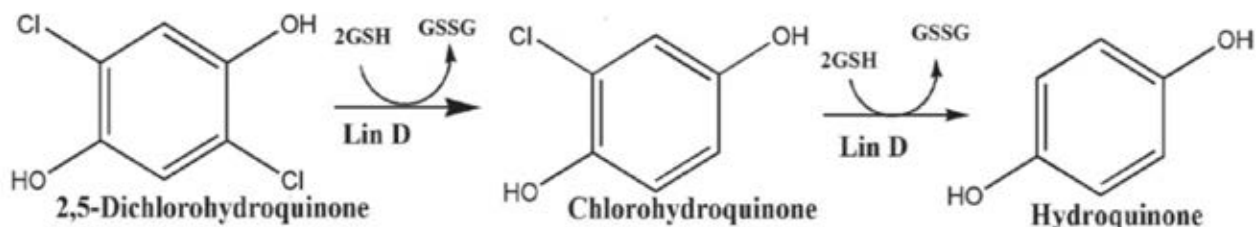
และในงานวิจัยของ Perperopoulou และคณะ ในปี 2017 ได้พบว่า GSTs เป็นเอนไซม์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย โดยสามารถนำไปพัฒนาแล้วนำไปใช้ได้หลายแง่มุม ได้แก่ ทางการเกษตร, ทางการแพทย์, ทางเคมีวิเคราะห์, ทางสิ่งแวดล้อม และ ทางนาโนไบโอเทคโนโลยี (ดังแสดงในภาพที่ 1.8) อีกทั้งยังสามารถทำวิศวกรรมโปรตีน (Protein engineering) เพื่อพัฒนาให้ GSTs มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ



ภาพที่ 1.8 แผนภาพโดยรวมของการนำ GSTs ไปประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีทางชีวภาพ

(Perperopoulou และคณะ, 2017)

งานวิจัยของ Shehu และคณะ ในปี 2019 ได้พบว่า cGSTs ในแบคทีเรียสามารถกำจัดสารมลพิษที่เป็นสารอินทรีย์ที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (Organochlorine pollutants) โดยวิธี Dehalogenation (ดังแสดงในภาพที่ 1.9)



ภาพที่ 1.9 ปฏิกริยา Reductive dehalogenation ของ 2,5-dichlorohydroquinone โดย Lin D (GST คลาส zeta จาก *Sphigomonas paucimobilis* UT26)

จึงช่วยสนับสนุนว่า เอนไซม์ GST สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้และเทคโนโลยีชีวภาพในแง่ทางสิ่งแวดล้อมได้

แต่ในทางกลับกัน เอนไซม์ GST ก็สามารถเป็นตัวปัญหาได้เช่นกัน จากงานวิจัยของ Kalita และคณะ ในปี 2017 ได้พบว่า การรักษาโรคพยาธิใบไม้ตับ (Fascioliasis) ที่เกิดจาก *Fasciola gigantica* ด้วยยา Triclabendazole ซึ่งเป็นยาที่ได้รับการแนะนำมาจากองค์การอนามัยโลกในการรักษาโรค Fascioliasis เกิดปัญหาขึ้น เนื่องจาก เอนไซม์ GST คลาส mu ภายในพยาธิ *F. gigantica* ตอบสนองต่อต้านต่อยา Triclabendazole ทำให้ไม่สามารถรักษาได้ ดังนั้น เอนไซม์ GST เป็นเป้าหมายในการพัฒนาวัคซีน และ เคมีบำบัด เพื่อการรักษาในอนาคต

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่า GSTs มีความสำคัญต่อกระบวนการกำจัดสารพิษภายในเซลล์ และกระบวนการตอบสนองต่อความเครียด ทั้งภาวะเครียดเกลือ (salt stress) และความเครียดที่เกิดจากการสร้างและสะสมสารอนุมูลอิสระ (oxidative stress) แต่ GST ยังมีการศึกษาวิจัยน้อยในไซยาโนแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST (PCC7418_1478 และ PCC7418_0729) จาก *Halothece* sp. PCC7418 ที่คัดแยกมาจากทะเลเดดซี ซึ่งทำการโคลนทั้งสองยีน เข้าสู่เวกเตอร์แสดงออก (pColdI) แล้วนำเข้าสู่ *Escherichia coli* เพื่อเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อใช้ศึกษา ลักษณะเชิงสมบัติต่อไป

บทที่ 2

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องแก้ว บริษัท Pyrex (USA)
2. จานเพาะเชื้อ (Petri dish) บริษัท Greiner bio-one (Thailand)
3. เครื่องชั่ง (Balance) รุ่น PG2002-S บริษัท Metler Toledo (Thailand)
4. เครื่องอบฆ่าเชื้อไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-215 บริษัท Meditop (Thailand)
5. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) บริษัท Contherm Scientific Limited (New Zealand)
6. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent lamp) บริษัท Lamton (Thailand)
7. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Rotary shaker) บริษัท Hercuvan Lab-system (USA)
8. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Excella E24 incubator shaker series)
บริษัท New Brunswick Scientific (USA)
9. เครื่องปั่นแยกสารชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 บริษัท
KUBOTA (Japan)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated microcentrifuge) รุ่น
Centrifuge 5418R บริษัท Eppendorf (Germany)
11. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie 2 บริษัท Scientific industries (USA)
12. เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (Thermal cycler) รุ่น T100 บริษัท BIO-RAD Laboratories
(USA)
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร (Spectrophotometer) รุ่น genesis 20 และ Biomate 35
บริษัท Thermo scientific (Thailand)
14. ชุดอุปกรณ์ทำ Electrophoresis รุ่น MJ-105 บริษัท Major Science (USA) และ
เครื่องจ่ายไฟ (Power supply) รุ่น PowerPac™ HC บริษัท BIO-RAD Laboratories (USA)

15. เครื่องอ่านเจล (Gel Doc™ EZ Gel Documentation System) บริษัท BIO-RAD Laboratories (USA)
16. เครื่องนาโนดรอป (Nano-drop) รุ่น Nanodrop 2000 บริษัท Thermo Scientific (USA)
17. ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow) รุ่น Microtech บริษัท Labmicro (Thailand)
18. ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส (Refrigerator) บริษัท MITSUBISHI (Japan)
19. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Deep freezer) บริษัท Thermoelectron Corporation (USA)
20. ตู้แช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส (Deep freezer) บริษัท Haier (China)
21. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Deep freezer) บริษัท SANYO (Japan)
22. เครื่องกำเนิดคลื่นความถี่สูง (Sonicator) รุ่น Sonics Vibra cell™
บริษัท Sonics & Materials (USA)
23. ปิเปตอัตโนมัติ (Autonomic pipette) รุ่น Proline Plus บริษัท Sarorius BioHit (Germany)
24. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก (Microcentrifuge tube)
25. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดใหญ่ (Centrifuge tube)
26. เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer) รุ่น MMS-3000 บริษัท Biosan (Latvia)
27. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (Heating block) รุ่น ThermoE
บริษัท Bioer Technology (China)
28. เครื่องบ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Memmert (Germany)
29. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น INNOVA 4330 บริษัท New Brunswick Scientific (USA)
30. เตารอบไมโครเวฟ รุ่น R-250 บริษัท SHARP (Japan)
31. ใบบิดสำหรับตัดเจล
32. ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) รุ่น Mini-PROTEIN II® Tetra Cell และเครื่องจ่ายไฟ รุ่น PowerPac™ HC
บริษัท BIO-RAD Laboratories (USA)
33. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Olympus (Japan)

34. คิวเวทท์ (Cuvette) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy (USA)
35. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น Model UE600 บริษัท Memmert (Germany)
36. เครื่องเขย่าสารแนวราบ (Orbital shaker) รุ่น Model ME3002 บริษัท Mettler Toledo (Japan)
37. เครื่องเขย่าแบบเอียงซ้ายสลับขวา (Rocking platform) รุ่น Mini Rocker บริษัท Bio-Rad Laboratories (USA)
38. เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (Thermal cycler) รุ่น C1000 Touch™ บริษัท Bio-Rad Laboratories (USA)
39. เครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer) รุ่น UV-240 บริษัท Shimadzu (Japan)

2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Ajax Finechem (Australia)
2. แบคโตทริปโตเน (Bacto tryptone) บริษัท HiMedia (India)
3. ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท HiMedia (India)
4. ผงวุ้น (Agar) บริษัท HiMedia (India)
5. ยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลลิน บริษัท AMRESCO (USA)
6. สีย้อมเจล (SYBR® Safe DNA Gel Stain) บริษัท Invitrogen (USA)
7. สีย้อมผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (DNA loading dye) บริษัท TOYOBO (Japan)
8. เอนไซม์ T4 DNA ligase บริษัท TAKARA bio (Japan)
9. ดีเอ็นเอ ไพรมเมอร์ (DNA primer) บริษัท Macrogen (Korea)
10. เอนไซม์ Taq DNA polymerase บริษัท Vivantis 9 (Malaysia)
11. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* บริษัท New England Biolabs (UK)
12. ดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ (DNA marker) บริษัท Vivantis 9 (Malaysia)
13. ผงอะกาโรส (Agarose 36GU) บริษัท FUNAKOSHI (Japan)

14. โปรตีนมาร์กเกอร์ Precision Plus Protein™ Dual Color Standards บริษัท BIO-RAD Laboratories (USA)
15. IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
16. 10X PCR buffer บริษัท Applied Biosystems (USA)
17. ผงอะกาโรส บริษัท QP Products (USA)
18. 2-Mercaptoethanol บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
19. 30% Acrylamide/Bis solution บริษัท Bio-Rad Laboratories (USA)
20. Bacto® tryptone บริษัท Merck (Germany)
21. โปรตีน BSA (Bovine Serum Albumin) บริษัท New England Biolabs (USA)
22. แคลเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck (Germany)
23. สีย้อมโปรตีน Coomassie brilliant blue G-250 บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
24. TEMED (Tetramethylethylenediamine) บริษัท Bio-Rad Laboratories (USA)
25. Bio-Rad protein assay (dye reagent concentrate) บริษัท Bio-Rad Laboratories (USA)
26. โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) บริษัท Emsure (Germany)
27. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Emsure (Germany)
28. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)
29. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)
30. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Emsure (Germany)
31. ไดโซเดียม เอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก ไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Amresco (USA)
32. กรดซิตริก (Citric acid) บริษัท Emsure (Germany)
33. แอมโมเนียม ไอรอน (III) ซิเตรต (Ammonium iron (III) citrate) บริษัท Ajax Finechem (New Zealand)
34. กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท Emsure (Germany)
35. แมงกานีส (II) คลอไรด์ เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (New Zealand)

36. ซิงค์ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Univar (New Zealand)
37. แอมโมเนียมโมลิบเดต เตตระไฮเดรต ($(Na_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) บริษัท Emsure (Germany)
38. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต เพตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) บริษัท Emsure (Germany)
39. Antibody raised against 6-histidine บริษัท R&D system (USA)
40. Antibody raised against mouse-IgG HRP conjugated บริษัท New England's Biolabs (USA)
41. สคิมมิลค์ บริษัท Himedia (India)

3. ชุดทดสอบสำเร็จ

1. ชุดสกัดจีโนมิกส์ ดีเอ็นเอ DNeasy Plant Mini Kit บริษัท QIAGEN (Germany)
2. ชุดทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR GenepHlow™ Gel/PCR Kit Quick Protocol บริษัท Geneaid (Taiwan)
3. ชุดสกัดพลาสมิด HiYield™ Plasmid Mini Kit บริษัท Life biomedical (UK)
4. ชุดคอนจูเกตโปรตีน Horseradish Peroxidase Conjugate Substrate kit บริษัท Bio-Rad Laboratories (USA)

4. เมมเบรน

1. PVDF (Polyvinylidene difluoride) บริษัท Millipore Cooperation (USA)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 ชีวสารสนเทศของยีนกำหนดรหัส Glutathione S-transferase (GST) จาก เอ็กซ์ทรีโมไฟล์

Halotheca sp. PCC7418

ฮาโลฟิลิกไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418 ที่ใช้ในการศึกษามีข้อมูลจีโนมิกส์ตีเอ็นเอที่สมบูรณ์ในฐานข้อมูล โดยเลือกใช้ฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes: KEGG (<https://www.kegg.jp>), UniProt (The Universal Protein Knowledge) (<https://www.uniprot.org>), ExPaSy (<https://www.expasy.org>) และ NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เป็นฐานข้อมูลหลักในการศึกษา

3.1.1 สืบค้นข้อมูลของยีนกำหนดรหัส GST ใน *Halotheca* sp. PCC7418

สืบค้นและเลือกยีนกำหนดรหัส GST จากฐานข้อมูล KEGG (<https://www.kegg.jp>) , NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), และ Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) ซึ่งพบว่า มีทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ PCC7418_0647, PCC7418_0729, PCC7418_1478 และ PCC7418_3557 แล้วค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน จากฐานข้อมูล KEGG และ Uniprot แล้ววิเคราะห์ค่า Isoelectric point (pI) และ มวลโมเลกุล จากฐานข้อมูล ExPASy ศึกษาโดเมนโปรตีนของ GST จากซอฟต์แวร์ SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

3.1.2 การจัดเรียงเทียบ (Multiple amino acid sequence alignment) และตรวจสอบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ GST

จัดเรียงเทียบและตรวจสอบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ GST จากยีน PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 ของไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418 กับ Ortholog โดยการใช้โปรแกรม Protein blast เลือกชุดคำสั่ง BLASTp ในฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จากนั้นเลือกลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกับ GST ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418 มากที่สุด 15 ลำดับแรก และ GST จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่เลือกให้เป็น outgroup ไปจัดเรียงเทียบและตรวจสอบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

3.1.3 ตรวจสอบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายของ GST

นำผลข้อมูลที่ได้จากการทำ Multiple amino acid sequence alignment ที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาตรวจสอบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายของ GST ใน *Halotheca* sp.

PCC7418 โดยใช้ซอฟต์แวร์ Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 (MEGA 7.0) (<https://www.megasoftware.net>) ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ-method) และ กำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1000

3.1.4 ออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับเบสของยีน PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 มาออกแบบไพรเมอร์ เพื่อใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR) โดยใช้โปรแกรม IDT OligoAnalyzer Tool (<https://sg.idtdna.com>) โดยมีการออกแบบโดยใส่นิวคลีโอไทด์สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *NdeI* และ *BamHI* โดยตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* จะถูกออกแบบในไพรเมอร์ ฟอว์เวิร์ด (Forward primer) ส่วนตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* จะถูกออกแบบในไพรเมอร์รีเวิร์ส (Reverse primer) ของทั้ง 2 ยีนเป้าหมาย

3.2 การเลี้ยงเอ็กซ์ทริโมไฟล์ *Halotheca* sp. PCC7418

ในการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 เลี้ยงในอาหาร Blue Green medium (BG11) ที่มีการเติม Turk solution กลีโอะเซียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ (ภาคผนวก ก.) (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะแสงฟลูออเรสเซนต์แสงขาวที่ความเข้มแสง 950 lux ตลอดเวลา บนเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Hercuvan Lab-system, USA) ความเร็ว 110 รอบต่อนาที

3.3 การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Halotheca* sp. PCC7418

เก็บตัวอย่างเซลล์โดยนำเซลล์แบ่งใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1500 μL แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากตะกอนเซลล์ทั้งหมด แล้วนำเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ที่แยกออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์มาสกัดดีเอ็นเอ โดยโดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิตโดยขั้นแรก เติมนั้ฟเฟอร์ AP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม (Vortex) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมนั้ฟเฟอร์ AP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf, Germany) ที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปตต์ส่วนใสไปยัง QIAshredder spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ปิเปตต์ส่วนใสที่ผ่านการกรองไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมนั้ฟเฟอร์ AP3/E ปริมาตร 1.5 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตต์ จากนั้นปิเปตต์ส่วนผสมมา 650 ไมโครลิตร ใส่ใน DNeasy Mini spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนสารละลาย ถ้ายังมีสารตัวอย่างเหลือก็ให้ทำซ้ำ จากนั้นนำ DNeasy Mini spin column ไปใส่ในหลอด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมนั้ฟเฟอร์ Aw ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนสารละลาย แล้วเติมนั้ฟเฟอร์ Aw

ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ที่มีส่วนสารละลาย แล้วย้ายส่วนของ DNeasy Mini spin column ไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เดิมบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใส (จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ) จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดย เครื่องนาโนดรอป 2000 (Thermo Scientific, USA) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.1 การตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วย เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

ใช้อะกาโรสเจล 1% (w/v) ผสมกับบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1x (ภาคผนวก ง.) และมีการ precast ด้วยสี SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) และใช้ดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ (Vivantis, Malaysia) เพื่อเทียบขนาดของดีเอ็นเอ โดยใช้บัฟเฟอร์ TAE ที่ความเข้มข้น 1x เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า กำหนดให้กระแสไฟฟ้ามี ค่าคงที่เท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเจลไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านเจล Model Gel Doc EZ™ (Bio-Rad Laboratories, USA)

3.4 การเพิ่มจำนวนยีนที่กำหนดรหัส GST ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

เพิ่มจำนวนยีนที่กำหนดรหัส GST (PCC7418_1478 และ PCC7418_0729) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ข้างต้น โดยกำหนดภาวะของแต่ละยีนไว้ดังนี้

ยีน PCC7418_1478

Pre-denaturation	95 องศาเซลเซียส	5	นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	1	นาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	30	วินาที
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5	นาที
Holding	15 องศาเซลเซียส	∞	

ยีน PCC7418_0729

Pre-denaturation	95 องศาเซลเซียส	5	นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที

Annealing	60 องศาเซลเซียส	1	นาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	1	นาที
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5	นาที
Holding	15 องศาเซลเซียส	∞	

จำนวน 50 รอบทั้ง 2 ยีน แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ด้วย PCR Cleanup Protocol ของ GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan)

3.4.1 การทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) บริสุทธิ์

ใช้ GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan) โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเทคนิค PCR ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์ Gel/PCR ปริมาตร 5 เท่าของผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) จากนั้นเปิดดีสารละลายทั้งหมดใส่ DFH column ที่อยู่ในหลอด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลว แล้วเติม Wash buffer (ที่มีการเติมเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตรแล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน DFH column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ในอุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลว แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้าย DFH column ไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมน้ำ Elution buffer (อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลง DFH column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำไปวัดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ PCR โดย เครื่องนาโนดรอป 2000 (Thermo Scientific, USA)

3.4.2 การตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) ด้วย เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

ใช้อะกาโรสเจล 1% (w/v) ผสมกับบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1x และมีการ precast ด้วย สี SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) และใช้ดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ (Vivantis, Malaysia) เพื่อเทียบขนาดของดีเอ็นเอ โดยใช้บัฟเฟอร์ TAE ที่ความเข้มข้น 1x เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า กำหนดให้กระแสไฟฟ้ามี ค่าคงที่เท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านเจล Model Gel Doc EZ™ (Bio-Rad Laboratories, USA)

3.5 การเตรียมเวกเตอร์แสดงออก pCold I

3.5.1 สกัดพลาสมิด pCold I จาก *Escherichia coli* DH5 α

นำ *E.coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pCold I มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB (low salt) 3 มิลลิลิตร ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วสกัดพลาสมิดโดยใช้ RBC Real Genomics HIYield™ Plasmid Mini Kit (Life biomedical, UK) ปิเปตต์ตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ตั้งส่วนใส ทำซ้ำจนตัวอย่างหมด แล้วเติมบัฟเฟอร์ PD1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) เป็นเวลา 1 นาที ทำให้เซลล์แตกโดยเติมบัฟเฟอร์ PD2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วผสมทันทีโดยการคว่ำหงายหลอด 10 ครั้ง ทำให้เป็นกลางโดยเติมบัฟเฟอร์ PD3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วผสมทันทีโดยการคว่ำหงายหลอด 10 ครั้ง ตะกอนดีเอ็นเอจะปรากฏออกมา จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตต์ส่วนใสไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Absolute ethanol ที่เย็นจัด (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 3 เท่าของส่วนใส ผสมโดยการคว่ำหงายหลอด 10 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ตั้งส่วนใสทั้งหมด ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายขึ้นลง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ตั้งส่วนใสทั้งหมด ทำให้ตะกอนแห้งโดยการตากลมเป็นเวลา 10 – 20 นาที เติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดความเข้มข้นของพลาสมิดโดย เครื่องนาโนดรอป 2000 (Thermo Scientific, USA) และตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดที่สกัดด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส สุดท้ายเก็บพลาสมิดที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2 การตัดเวกเตอร์แสดงออก pCold I ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตัดเวกเตอร์แสดงออก pCold I ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* (New England Biolabs, UK) และ *BamHI* (New England Biolabs, UK) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำเวกเตอร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาตรวจสอบขนาดด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

3.5.3 การทำให้เวกเตอร์แสดงออก pCold I ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบริสุทธิ์

นำเวกเตอร์แสดงออก pCold I ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มาตรวจสอบคุณภาพและขนาดด้วยวิธีเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเตรียมเจลจากผงอะกาโรส (Agarose 36GU) (FUNAKOSHI, Japan) แล้วตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นส่วน pCold I ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* ด้วยใบมีด นำไปใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ Gel/PCR ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดคิท GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan) เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 นำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนดรอป 2000 (Thermo Scientific, USA) และตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

3.6 การตัดยีนกำหนดรหัส GST (PCC7418_1478 และ PCC7418_0729) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตัดยีนกำหนดรหัส GST (PCC7418_1478 และ PCC7418_0729) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* (New England Biolabs, UK) และ *BamHI* (New England Biolabs, UK) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วนำชิ้นยีนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาตรวจสอบขนาดด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนดรอป 2000 (Thermo Scientific, USA)

3.7 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ โดยใช้ *Escherichia coli* BL21 และ *Escherichia coli* DH5 α โดยใช้วิธี CaCl₂ โดยมีวิธีการคือ นำโคลนเดี่ยวของ *E.coli* BL21 หรือ *E.coli* DH5 α ถ่ายโอนลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (low salt) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific, USA) ข้ามคืน จากนั้นถ่ายโอนเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB (low salt) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific, USA) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตจนมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.3-0.4 ปิดเตีใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร 2 หลอด แช่น้ำแข็ง 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกอาหารเหลวออกจากตะกอนเซลล์ให้หมด แล้วนำตะกอนเซลล์มาทำให้เป็นสารแขวนลอยด้วย 0.1 โมลาร์ CaCl₂ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ในภาวะเย็นจัด) จากนั้นตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนสารละลาย CaCl₂ ออกให้หมด แล้วนำตะกอนเซลล์มาทำให้เป็นสารแขวนลอยอีกครั้งด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ CaCl₂ + 15% กลีเซอรอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทรานส์ฟอร์มเมชันรีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่อไป

3.8 การทำปฏิกิริยาไลเกท

แทรกผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีชิ้นส่วนยีน PCC7418_1478 หรือ PCC7418_0729 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* เข้าสู่เวกเตอร์แสดงออก (pCold I) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *NdeI* โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (TAKARA, Japan) ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X T4 DNA ligase buffer, pCold I ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI*, ยีนกำหนดรหัส GST (PCC7418_1478 และ PCC7418_0729) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* โดยอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างเวกเตอร์และชิ้นยีน คือ 1 (40 ng) : 3 (120 ng) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.9 การทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

3.9.1 ทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ปีเปตต์ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไลเกท จากข้อ 3.8 (PCC7418_1478/pCold I และ PCC7418_0729/pCold I) ผสมลงในคอมพีเทนต์เซลล์ (*E.coli* DH5 α) ซึ่งเป็นชุดทดลอง ส่วนชุดควบคุมได้แก่ 1.) ปีเปตต์ pColdI ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะผสมลงในคอมพีเทนต์เซลล์ (*E.coli* DH5 α) 2.) ปีเปตต์ pColdI ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* (Empty vector) ผสมลงในคอมพีเทนต์เซลล์ (*E.coli* DH5 α) แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 – 30 นาที แล้วทำปฏิกิริยา heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำมาแช่แข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (low salt) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีการเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งอาหารเหลว แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (low salt) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร และเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิตร นำเซลล์ ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (low salt) + ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิตร เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน(ไม่ควรเกิน 16 ชั่วโมง) แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.9.2 การตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์

สุ่มเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (low salt) + ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิตร จากข้อ 3.9.1 แล้วนำมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (low salt) + ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิตร เพื่อเพิ่มจำนวน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำมาตรวจสอบการรับพลาสมิดลูกผสมโดยวิธี โคโลนี PCR โดยมีภาวะดังนี้

PCC7418_1478/pColdI

Pre-denaturation	95 องศาเซลเซียส	10	นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	1	นาที

Extension	72 องศาเซลเซียส	30	วินาที
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5	นาที
Holding	15 องศาเซลเซียส	∞	
PCC7418_0729/pColdI			
Pre-denaturation	95 องศาเซลเซียส	10	นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
Annealing	60 องศาเซลเซียส	1	นาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	1	นาที
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5	นาที
Holding	15 องศาเซลเซียส	∞	

จำนวน 50 รอบ แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์โคลน PCR ด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

3.9.3 การยืนยันพลาสมิดลูกผสมจาก *E.coli* DH5 α โดยการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สกัดพลาสมิดลูกผสมจาก *E.coli* DH5 α โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB (low salt) 3 มิลลิลิตร ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลา ข้ามคืน แล้วสกัดพลาสมิดโดยใช้ RBC Real Genomics HIYield™ Plasmid Mini Kit (Life biomedical, UK) ปีเปตต์ตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนใส ทำซ้ำจนตัวอย่างหมด แล้วสกัดพลาสมิดเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 แล้วตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยนำพลาสมิดลูกผสมมาผสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำพลาสมิดลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

3.10 การทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แสดงออก *E.coli* BL21

นำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จากข้อ 3.9.3 ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์แสดงออก *E.coli* BL21 โดยมีขั้นตอนเหมือนข้อ 3.9.1 แล้วเลือกโคลนที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (low salt) + ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

3.11 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

3.11.1 การเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST (PCC7418_1478)

ถ่ายโอนโคโลนีของทรานสฟอร์มแมนท์ทั้ง *E.coli* DH5 α (pColdI), *E.coli* DH5 α (PCC7418_1478), *E.coli* BL21 (pColdI) และ *E.coli* BL21 (PCC7418_1478/pColdI) ลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (low salt) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลาข้ามคืน จากนั้นเปิดตัวอย่าง ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (low salt) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลา จนมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5-0.6 แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน โดยเขย่าตลอดเวลา เพื่อสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป

3.11.2 การสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเซลล์ควบคุม (*E.coli* DH5 α) และเซลล์แสดงออก (*E.coli* BL21) จากการเลี้ยงภายใต้ภาวะเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายทริส ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง กำหนดค่าแอมพลิจูด 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วินาที 10 นาที เก็บน้ำส่วนใสที่ได้จากการแตกเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดความเข้มข้นของโปรตีนหยาบโดยวิธีเบรดฟอร์ด

3.11.3 การวัดความเข้มข้นของโปรตีนหยาบโดยวิธีเบรดฟอร์ด

นำโปรตีนหยาบที่สกัดได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับเบรดฟอร์ดรีเอเจนต์ โดยใช้ชุดคิท Bio-Rad protein assay (dye reagent concentrate) (Bio-Rad Laboratories, USA) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนหยาบตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin; BSA) (ภาคผนวก จ.) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 2-20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

3.11.4 การวิเคราะห์โปรตีนโดยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (SDS-PAGE)

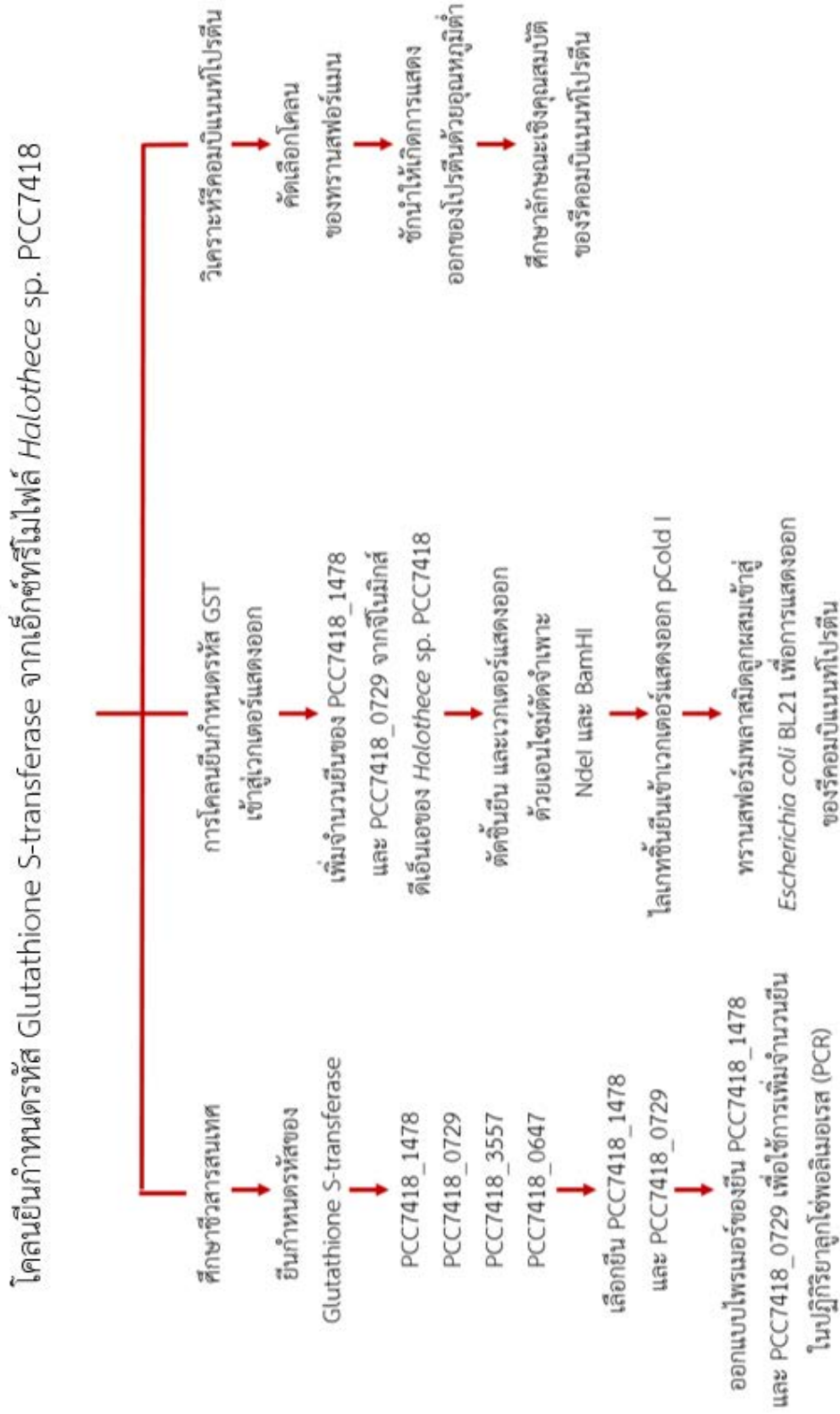
นำโปรตีนหยาบที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยเตรียมเจลสำหรับทำ SDS-PAGE ซึ่งเตรียมจากวิธีมาตรฐาน (Laemmli, 1970) เจลสำหรับการทำ SDS-PAGE จะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ สารละลายเซพาเรตติ้งเจล (Separating gel) ที่มีความเข้มข้น 10 % และสารละลายสแต็กกิงเจล (Stacking gel) ที่มีความเข้มข้น 5 % โดยเตรียมเจลในชุดคิท SDS-PAGE: Model MiniPROTEIN II® Tetra cell (Bio-Rad Laboratories, USA) แล้วนำเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดคิทอิเล็กโทรโฟเรซิส แล้วเติมรันนิ่งบัฟเฟอร์ (Running buffer) ลงในชุดคิทอิเล็กโทรโฟเรซิสจนเต็ม แล้วนำโปรตีนหยาบที่สกัดได้จากข้อ 3.11.2 มาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 20, 40 และ 60 ไมโครกรัม จากนั้นหยอดโปรตีนหยาบตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงในหลุมเจล กำหนดให้กระแสไฟฟ้ามี ค่าคงที่เท่ากับ 75 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำเจลมาย้อมด้วย 1 % CBB (Coomassie brilliant blue) เป็นเวลา 20 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วย สารล้างสี (Destaining solution) ข้ามคืน แล้วนำเจลมาวิเคราะห์ รายละเอียดการเตรียมสารเคมีทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ฉ.

3.11.5 การวิเคราะห์โปรตีนโดยเวสเทิร์น บลอตติง (Western blotting)

เวสเทิร์น บลอตติง ใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากยีน PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 ที่ติดฉลากด้วย 6X Histidine tag ตามวิธีมาตรฐาน (Timmons and Dunbar, 1990) ซึ่งหลังจากการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ที่ปรับสภาพด้วยสารละลายเมทานอล 90%(V/V) เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์เวสเทิร์น บลอตติง (Western blotting buffer) และทำการบลอตโปรตีนโดยใช้ Semi-dry transfer cell (Model Trans-Blot® SD Cell, Bio-Rad Laboratories, USA) ที่ 0.12 แอมแปร์ เป็นเวลา 50 นาที ป้องกันการเกิดโปรตีนอื่นๆที่ไม่จำเพาะเข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย Skim milk 5% (W/V) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทั้งสารละลายที่ใช้ในการบล็อกโปรตีน (Blocking solution) ต่อมานำแผ่นเมมเบรนไปบ่มกับแอนติบอดีปฐุมภูมิ (Antibody raised against 6-histidine, R&D system, USA) ข้ามคืน และล้างด้วยสารละลาย Skim milk 5% (W/V) 3 ครั้ง ในระยะเวลา 20 นาที, 10 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างอีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS โดยมีขั้นตอนการล้างเหมือนตอนล้างด้วยสารละลาย Skim milk 5% (W/V) จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (Antibody raised against mouse-IgG HRP conjugated) (New England Biolabs, USA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย Skim milk 5% (W/V) และ บัฟเฟอร์ 1X PBS

เหมือนขั้นตอนที่กล่าวก่อนหน้านี้ ตรวจสอบผลโดยแผ่นเมมเบรนลงในสารละลายที่จำเพาะต่อ เอนไซม์ฮอสมเรดิชเปอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase) โดยใช้ชุดคิท Horseradish Peroxidase Conjugate Substrate (Bio-Rad Laboratories, USA) ซึ่งจะเกิดการพัฒนาของสี โดย จะเกิดแถบที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย รายละเอียดการเตรียมสารเคมีทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ช.

3.12 ออกแบบการทดลอง



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ชีวสารสนเทศของยีนกำหนดรหัส Glutathione S-transferase (GST) จาก เอ็กซ์ทรีโมไฟล์

Halothece sp. PCC7418

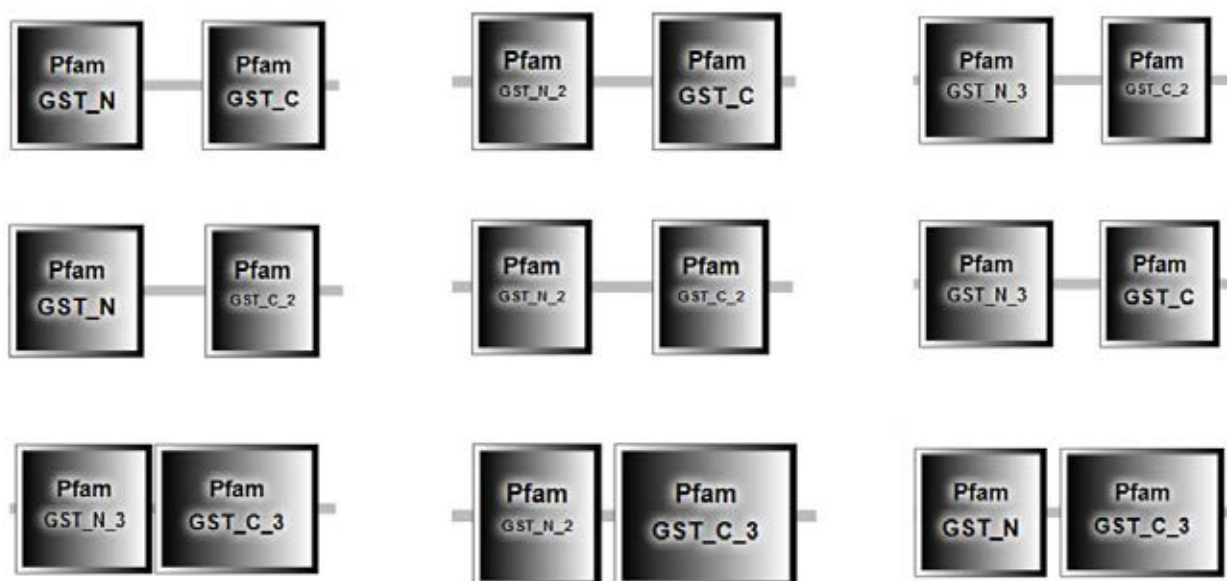
จากฐานข้อมูล KEGG พบว่า เอ็กซ์ทรีโมไฟล์ ไฮยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 มียีนกำหนดรหัส GST ทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ PCC7418_0647, PCC7418_0729, PCC7418_1478 และ PCC7418_3557 จากการหาลำดับกรดอะมิโน และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST ทั้ง 4 ยีน จากฐานข้อมูล KEGG จะได้ลำดับกรดอะมิโน และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในภาคผนวก ข และมีรายละเอียดของแต่ละยีนดังแสดงในตารางที่ 4.1 อีกทั้งยังศึกษาค่า Isoelectric point (pI) และมวลโมเลกุลของ GST แต่ละยีนจากฐานข้อมูล ExPASy ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ GST ใน *Halothece* sp. PCC7418

	จำนวนกรดอะมิโน (residue)	จำนวน นิวคลีโอไทด์ (bp)	มวลโมเลกุลที่ คำนวณได้ทาง ทฤษฎี (Da)	ค่า pI ที่คำนวณได้ ทางทฤษฎี
PCC7418_0647	183	552	20860.92	5.05
PCC7418_0729	399	1200	46344.24	5.48
PCC7418_1478	186	561	21579.78	5.44
PCC7418_3557	266	801	29464.63	5.70

ได้วิเคราะห์โดเมนโปรตีนของ GST ทั้ง 4 ยีน โดยการทำนายจากลำดับกรดอะมิโนของ GST ในแต่ละยีน ผ่านการใช้ซอฟต์แวร์ SMART ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 และ 4.1.4 ซึ่งพบว่า GST ในแต่ละยีน จะมีทั้งโดเมนด้านปลาย N และโดเมนด้านปลาย C ซึ่งมีหลายรูปแบบ ยกเว้นใน PCC7418_0729 จะมีบางลักษณะที่เกิดจากการทำนายแล้วพบว่าไม่มีโดเมนด้านปลาย N

(ก)

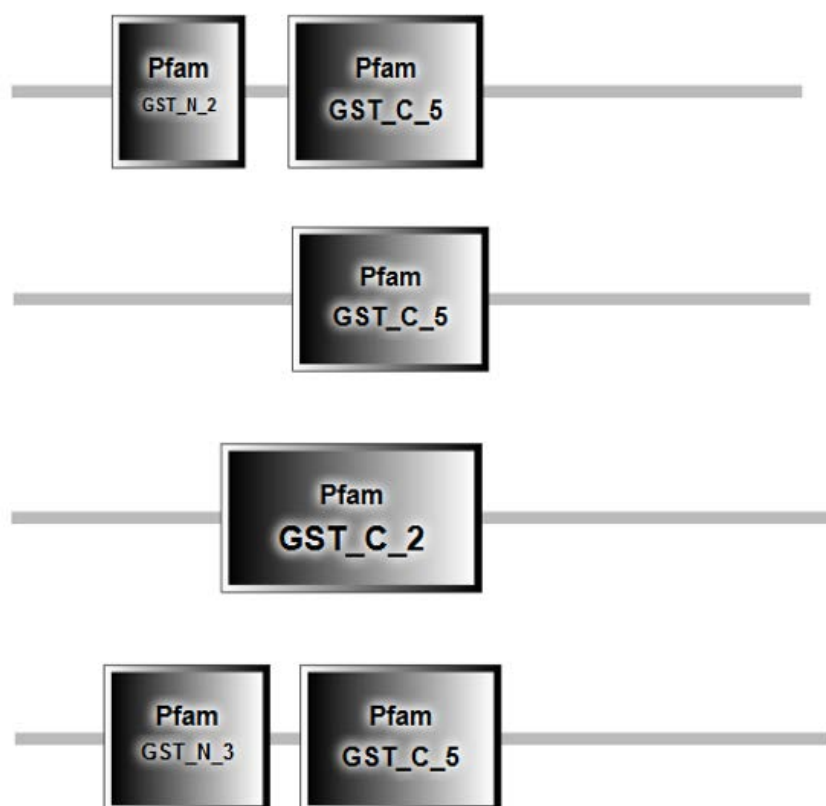


(ข)

Name	Start ▲	End	E-value
Pfam.GST_N	1	74	1.1e-23
Pfam.GST_N_3	4	80	8.9e-18
Pfam.GST_N_2	11	75	1.7e-12
Pfam.GST_C_3	82	173	1.7e-8
Pfam.GST_C	107	175	7e-12
Pfam.GST_C_2	108	170	9.1e-9

ภาพที่ 4.1.1 โพรตีนโดเมนของ PCC7418_0647 ที่เกิดจากการทำนายจากลำดับกรดอะมิโน (ซอฟต์แวร์ SMART) (ก) กล่องไล่ระดับสี แสดงถึงแฟมิลีของโปรตีนโดเมน เส้นสีเทา แสดงถึงสายลำดับกรดอะมิโน (ข) ตารางที่แสดงถึงตำแหน่งเริ่มต้นและตำแหน่งสุดท้ายของโดเมนด้านปลาย N และโดเมนด้านปลาย C แต่ละรูปแบบ และมีค่า E-value ที่แสดงถึงความน่าเชื่อถือโดยค่า E-value ที่มีค่าต่ำจะมีความน่าเชื่อถือมาก

(ก)



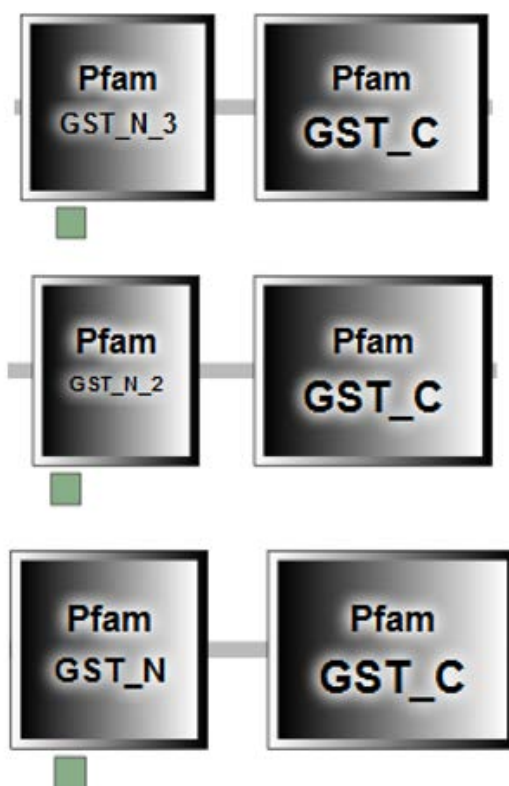
(ข)

Name	Start ▲	End	E-value
Pfam:GST_N_3	44	125	4.8e-21
Pfam:GST_N_2	51	118	2e-15
Pfam:GST_C_2	102	228	7.5e-8
Pfam:GST_C_5	140	238	2.9e-11

ภาพที่ 4.1.2 โดเมนโปรตีนของ PCC7418_0729 ที่เกิดจากการทำนายจากลำดับกรดอะมิโน

(ก) กล่องไล่ระดับสี แสดงถึงแฟมิลียของโปรตีนโดเมน เส้นสีเทา แสดงถึงสายลำดับกรดอะมิโน (ข) ตารางที่แสดงถึงตำแหน่งเริ่มต้นและตำแหน่งสุดท้ายของโดเมนด้านปลาย N และโดเมนด้านปลาย C แต่ละรูปแบบ และมีค่า E-value ที่แสดงถึงความน่าเชื่อถือ โดยค่า E-value ที่มีค่าต่ำจะมีความน่าเชื่อถือมาก

(ก)



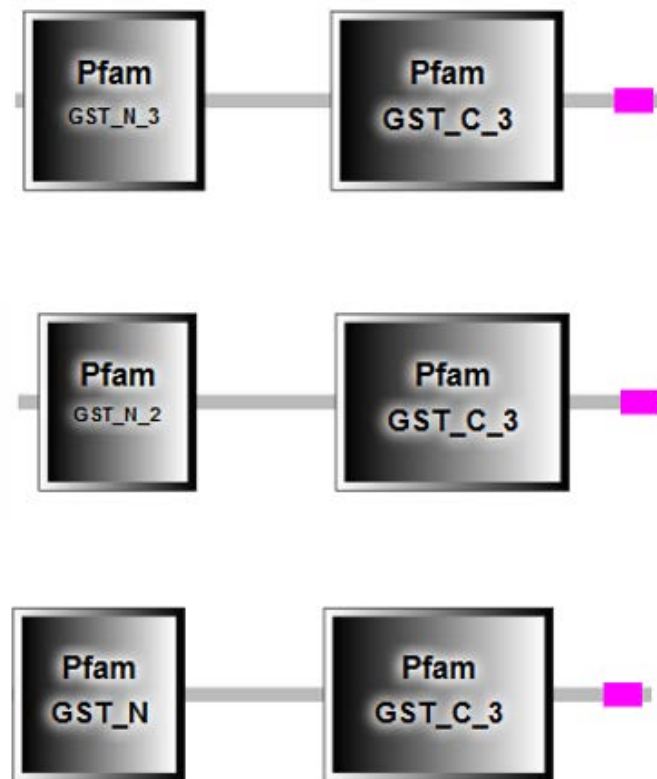
(ข)

Name	Start ▲	End	E-value
Pfam:GST_N	1	72	2.9e-15
Pfam:GST_N_3	3	78	2.1e-16
Pfam:GST_N_2	10	73	3e-12
Pfam:GST_C	94	184	0.0000012

ภาพที่ 4.1.3 โดเมนโปรตีนของ PCC7418_1478 ที่เกิดจากการทำนายจากลำดับกรดอะมิโน

(ก) กล่องไล่ระดับสี แสดงถึงแฟมิลีของโปรตีนโดเมน เส้นสีเทา แสดงถึงสายลำดับกรดอะมิโน
 กล่องสีเขียว แสดงถึงบริเวณที่ไม่สามารถแสดงได้ว่าเป็นอะไร (Low complexity region) (ข)
 ตารางที่แสดงถึงตำแหน่งเริ่มต้นและตำแหน่งสุดท้ายของโดเมนด้านปลาย N และโดเมนด้านปลาย
 C แต่ละรูปแบบ และมีค่า E-value ที่แสดงถึงความน่าเชื่อถือ โดยค่า E-value ที่มีค่าต่ำจะมีความ
 น่าเชื่อถือมาก

(ก)



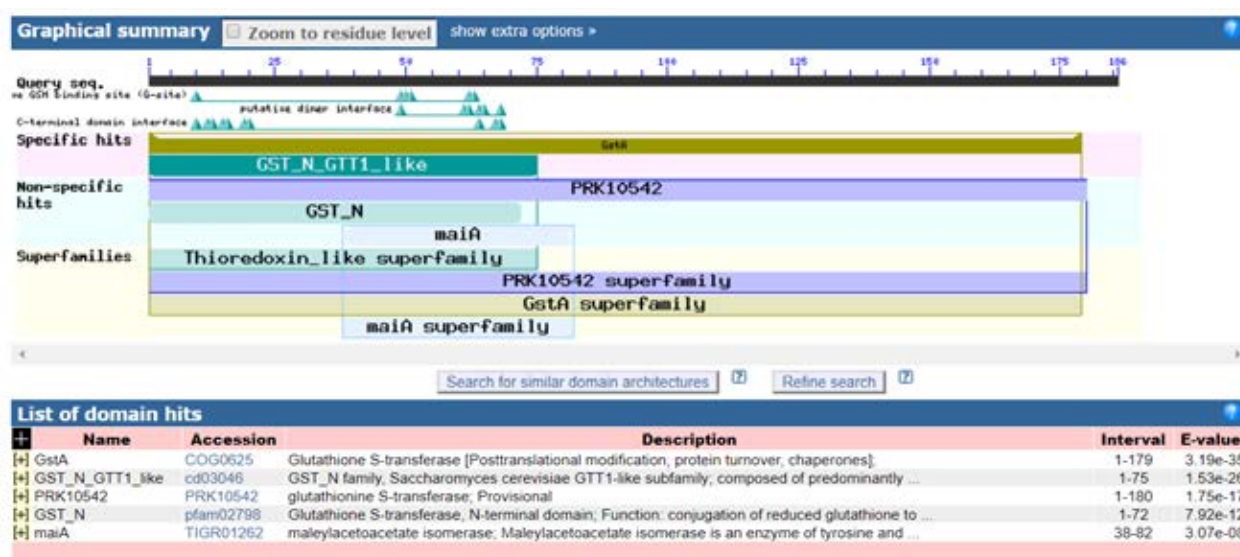
(ข)

Name	Start ▲	End	E-value
Pfam:GST_N	1	72	1.5e-8
Pfam:GST_N_3	4	78	8.3e-20
Pfam:GST_N_2	9	73	3.9e-11
Pfam:GST_C_3	130	225	1.9e-8
low complexity	246	262	N/A

ภาพที่ 4.1.4 โดเมนโปรตีนของ PCC7418_3557 ที่เกิดจากการทำนายจากลำดับกรดอะมิโน

(ก) กล่องไล้ระดับสี่ แสดงถึงแฟมิลียของโปรตีนโดเมน เส้นสีเทา แสดงถึงสายลำดับกรดอะมิโน กล่องสี่ชมพู แสดงถึงบริเวณที่ไม่สามารถแสดงได้ว่าเป็นอะไร (ข) ตารางที่แสดงถึงตำแหน่งเริ่มต้นและตำแหน่งสุดท้ายของโดเมนด้านปลาย N และโดเมนด้านปลาย C แต่ละรูปแบบ และมีค่า E-value ที่แสดงถึงความน่าเชื่อถือ โดยค่า E-value ที่มีค่าต่ำจะมีความน่าเชื่อถือมาก

จากผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศของยีนกำหนดรหัส GST ใน *Halothece* sp. PCC7418 งานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาจำเพาะเพียง 2 ยีน คือ PCC7418_0729 และ PCC7418_1478 เนื่องจากมีค่า pi ที่คำนวณได้ทางทฤษฎีที่ใกล้เคียงกัน จึงได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายของ GST จากยีน PCC7418_0729 และ PCC7418_1478 ใน *Halothece* sp. PCC7418 โดยใช้โปรแกรม Protein blast เลือกชุดคำสั่ง BLASTp ในฐานข้อมูล NCBI มีการตรวจสอบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ GST โดยใช้การเรียงเทียบลำดับกรดอะมิโน (Multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal Omega และสร้างแผนภูมิต้นไม้ โดยใช้ซอฟต์แวร์ MEGA 7.0 ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ-method) และ กำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1000



ภาพที่ 4.1.5 Putative conserved domain ของ GST ที่เกิดจากการวิเคราะห์จากยีน

PCC7418_1478 โดยใช้โปรแกรม Protein blast เลือกชุดคำสั่ง BLASTp ในฐานข้อมูล NCBI

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AAT06769.1      -----MAEKPKLHYFNARGRMESTRWLLAAAGVEFEFKFSAEOLDKLRNDGYL      50
PS047553.1      -----MKLYYIPLTRATRPRWLLLEEMELSYELINVVE--NPHRFEHKQRH      43
WP_015225543.1  -----MKLYYIPLTRASRPHWLLLEELISYELIQVTPOEMSEKPEYKGLH      45
WP_096590453.1  -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEIGVPPYELIQVDM-SMTQPEYKGLH      44
GAX46190.1      MSERLIEANRLIKKVMKLYIPTTRAVRPRWLLLEEMGVPPYELVRVDM-NMAQOPEYQKLH      59
WP_089131565.1  -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEEMGVPPYELVRVDM-NMAQOPEYQKLH      44
TFI55082.1      -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEEMGVPPYELVRVDM-NMSKQPEYQKLH      44
BAZ71228.1      -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEEMGVSYELVRVDM-NMTQOPEYQKLH      44
WP_131121628.1  -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEEMGVPPYELVRVDM-NMSKQPEYQKLH      44
RMG11768.1      -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEELAPYELIYIRP-GMMEQPEYKHLH      44
CUR14504.1      -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEELIGISYELVYVVM-AMTQEPGYEKLH      44
WP_072717184.1  -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEELGISYELVYVVM-AMTQEPGYEKLH      44
WP_019507507.1  -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEEMGIEYELITVSM-EMSRQPEYRILH      44
WP_027847055.1  -----MKLYYIPTTRAVRPRWLLLEIDISYDLVWVMT-EMSRSEYANLN      44
WP_029315177.1  -----MKLYFMPTTRAVRPRWLLLEELNISYELIRVTM-DMSRSKEYGHLH      44
WP_012165678.1  -----MKLYFMPTTRAVRPRWLLLEELNISYKLRIVAM-DMSRSKKGHLH      44
          *: * :*: * .. :

AAT06769.1      TFQQVPMVEIDGMKLVQTRAILNVIASKYNLYGKDIKERALIDMYIEGIADL-----      102
PS047553.1      PHGKVPVFDNYVAIYESAICAYLADQYPEKQFAPS5KSPARAYYYYQWLFYASVTLLEAP      103
WP_015225543.1  PHGKIPVLDONITIHESAGICAYLADQYPKQLAPSLMSPARGYYYQWLFYAAVTLLEPP      105
WP_096590453.1  PHGKVPILIDGCVTIFESAAICAYLADKYQTMGFAPAIDSPERGYYYQWLFYATLLEPP      104
GAX46190.1      PHGKVPILVDEEVTIFESAAICAYLADKYIDKGMAPALEQTERGYYYQWLFYATSTLEPP      119
WP_089131565.1  PHGKVPILVDEEVTIFESAAICAYLADKYIDKGMAPALEQTERGYYYQWLFYATSTLEPP      104
TFI55082.1      PHGKVPVLDGCVTIFESAAICAYLADKYLDKGIAPALDTPERGYYYQWLFYATSTLEPP      104
BAZ71228.1      PHGKVPILVDEEVTIFESAAICAYLADKYLVKGLAPALDAPERGYYYQWLFYATSTLEPP      104
WP_131121628.1  PHGKVPVLDGCVTIFESAAICAYLADKYLVKGLAPALDAPERGYYYQWLFYATSTLEPP      104
RMG11768.1      PHGKVPVLDVDEAVTIFESAAICAYLADKYSEKGLAPEPNDSPARAYYYYQWLFYATLLEPP      104
CUR14504.1      PHRKVPVLDVGDIIIFESAAICAYLADKFFPEKELAPSPMSPARSYYYQWLFYASLTLLEAP      104
WP_072717184.1  PHRKVPVLDVGDIIIFESAAICAYLADKFFPEKQLAPSPMSPARSYYYQWLFYASLTLLEAP      104
WP_019507507.1  PHGKVPVLDVDDQVTIFESAAICTYLADKYLEKGFAPKINSARAYYYYQWLFYASLTLLEAP      104
WP_027847055.1  PHGKVPVLDVEMVTIFESAAICAYLADKYLREGFAPKLESSARAYYYYQWLFYASLTLLEAP      104
WP_029315177.1  PHGKVPVLDVETVTIFESAAICAYLADKYIDHGFAPKLDAPARAYYYYQWLFYASLTLLEAP      104
WP_012165678.1  PHGKVPVLDVEMVTIFESAAICAYLADKYIDHGFAPQLDAPARAYYYYQWLFYASLTLLEAP      104
          . :*:.. : : : : * * : : : *

AAT06769.1      --GEMILLVPCPPEE--KDAKLALIKEIKNRYFPAFEKVL--KSHGDDYLVGNKLSRA      156
PS047553.1      VEKYLQKNPHLPELSPNSEKLSQEE-ILQWFAKVCQPLHQLNANNVYLVENQLTTA      162
WP_015225543.1  VERYLFHFVPHLSEKVLPOSEYENLSKDE-TLHWFGKVCQPLNDHLKENQYLVENQFTAA      164
WP_096590453.1  VEHFMDVLPNLPKELIIPKARSASVTQE-ALQWFDKVSPLTELLSDKNYLVAOKFSAA      163
GAX46190.1      VEHFMDVLPNLPKELIIPKARSASVTQE-ALQWFDKVSPLTELLSDKNYLVAOKFSAA      178
WP_089131565.1  VEHFMDVLPNLPKELIIPKARSASVTQE-ALQWFDKVSPLTELLSDKNYLVAOKFSAA      163
TFI55082.1      VEHFMDVLPNLPKELIIPKARSASVTQE-ALQWFDKVSPLTELLSDKNYLVAOKFSAA      163
BAZ71228.1      VEHFMDVLPNLPKELIIPKARSASVTQE-ALQWFDKVSPLTELLSDKNYLVAOKFSAA      163
WP_131121628.1  VEHFMDVLPNLPKELIIPKARSASVTQE-ALQWFDKVSPLTELLSDKNYLVAOKFSAA      163
RMG11768.1      VEQYMFNVPNLPKELPKDAQTHLSTTD-AQTWFDKVCQPLDRVLTDRDYLVENKFSVA      163
CUR14504.1      VEQYMFNVPNLPKELPKDAQTHLSTTD-AQTWFDKVCQPLDRVLTDRDYLVENKFSVA      163
WP_072717184.1  VEQYMFNVPNLPKELPKDAQTHLSTTD-AQTWFDKVCQPLDRVLTDRDYLVENKFSVA      163
WP_019507507.1  VEQYMFNVPNLPKELPKDAQTHLSTTD-AQTWFDKVCQPLDRVLTDRDYLVENKFSVA      163
WP_027847055.1  VEQYMFHVLPLPEKLLPKQAQAKVTPEE-ATQWFAKVCQPLNELLKDNVYLVENSFTAA      163
WP_029315177.1  VEQYMFHVLPLPEKLLPKQAQAKVTPEE-ATQWFAKVCQPLNELLKDNVYLVENSFTAA      163
WP_012165678.1  VEQYMFHVLPLPEKLLPKQAQAKVTPEE-ATQWFAKVCQPLNELLKDNVYLVENSFTAA      163
          .. :* .. : : : : * * : : : *

AAT06769.1      DIHLVELLYVEELDSSLISSFPLLKALKTRISNLPVTKK----FLQPGSPRKPPMDEKS      212
PS047553.1      DIVTGGVLYWAFLLGMM--TEQTLVKNYLMRLMERPAFKRVHKEKNVENLNYQC-----      214
WP_015225543.1  DIVTGGVLYWAFKIGLL--KKKPP-----                          186
WP_096590453.1  DIVTGGVLYWAFKLGML--KDSPLNRYIKRLMERPALMRADEDFVS-----      208
GAX46190.1      DIVTGGVLLWAKKLGML--SDSDPLSRYINLMDQRAAFIRADEFYAKIAPSVQ--F---      231
WP_089131565.1  DIVTGGVLLWAKKLGML--SDSDPLSRYINLMDQRAAFIRADEFYAKIAPSVQ--F---      216
TFI55082.1      DIVTGGVLLWAKKLGML--SDSDPLSRYINLMDQRAAFIRADEFYAKIAPSVQ--F---      219
BAZ71228.1      DIVTGGVLLWAKKLGML--SDSDPLSRYINLMDQRAAFIRADEFYAKIAPSVQ--F---      214
WP_131121628.1  DIVTGGVLLWAKKLGML--SDSDPLSRYINLMDQRAAFIRADEFYAKIAPSVQ--F---      218
RMG11768.1      DIVTGGVLLWAKKLGML--SDSDPLSRYINLMDQRAAFIRADEFYAKIAPSVQ--F---      216
CUR14504.1      DVVTGGVLLWAKKLGML--KAEPTIKLYLEKLMQRPGLFRADEFYAKVGEENP--S---      212
WP_072717184.1  DVVTGGVLLWAKKLGML--KAEPTIKLYLEKLMQRPGLFRADEFYAKVGEENP--S---      212
WP_019507507.1  DVVTGGVLLWAKKLGML--KAEPTIKLYLEKLMQRPGLFRADEFYAKVGEENP--S---      211
WP_027847055.1  DVVTGGVLLWAKKLGML--KAEPTIKLYLEKLMQRPGLFRADEFYAKVGEENP--S---      211
WP_029315177.1  DIVTGGVLLWAKKLGML--KQESPVKSYLARLMPALQKADEDFYAKVQ-----      211
WP_012165678.1  DIVTGGVLLWAKKLGML--KQESPVKSYLARLMPALQKADEDFYAKVQ-----      211
          *: * :* .. :

AAT06769.1      LEEARKIFRF      222
PS047553.1      -----      214
WP_015225543.1  -----      186
WP_096590453.1  -----      208
GAX46190.1      -----      231
WP_089131565.1  -----      216
TFI55082.1      L-----      220
BAZ71228.1      -----      214
WP_131121628.1  -----      218
RMG11768.1      -----      216
CUR14504.1      -----      212
WP_072717184.1  -----      212
WP_019507507.1  -----      211
WP_027847055.1  -----      211
WP_029315177.1  -----      211
WP_012165678.1  -----      211

```

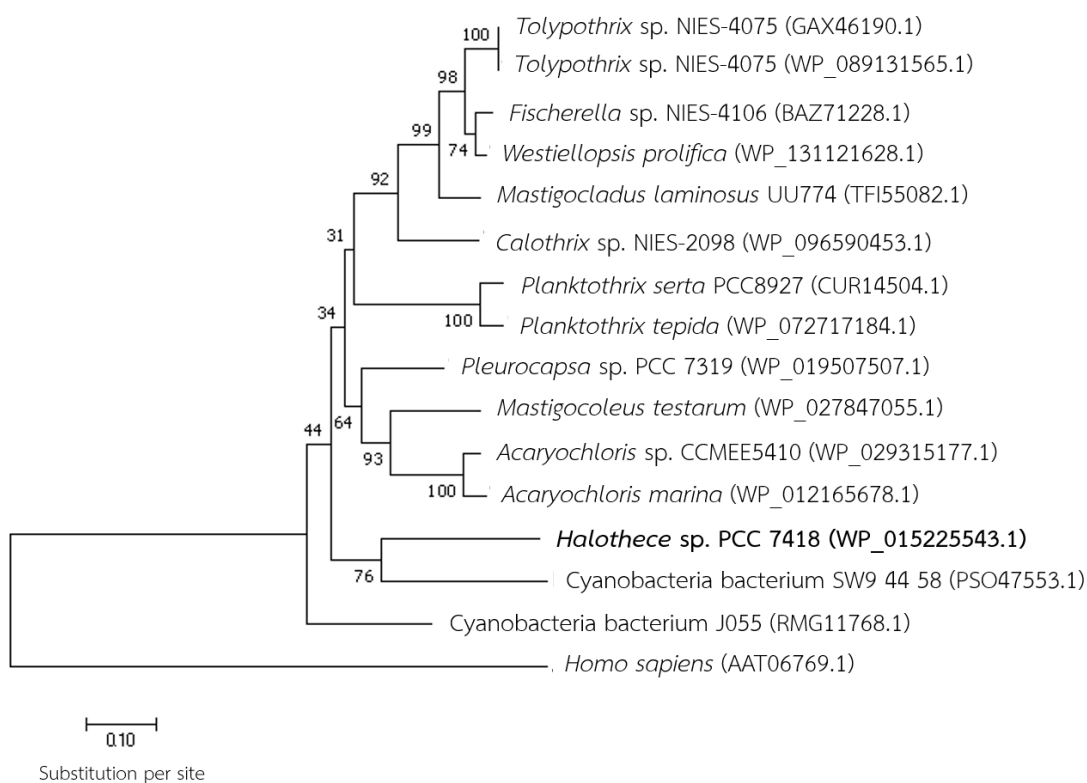
ภาพที่ 4.1.6 การเรียงเทียบลำดับกรดอะมิโนของ GST จากยีน PCC718_1478 กับ Ortholog

(Multiple amino acid sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega ซึ่งใช้ลำดับกรดอะมิโนของ glutathione S-transferase A1 [*Homo sapiens*] (AAT06769.1) , glutathione S-transferase family protein [*Halotheca* sp. PCC 7418] (WP_015225543.1), glutathione S-transferase family protein [*Pleurocapsa* sp. PCC7319] (WP_019507507), glutathione S-transferase [*Cyanobacteria bacterium* SW_9_44_58] (PSO47553.1), glutathione S-transferase family protein [*Mastigocoleus testarum*] (WP_027847055.1), glutathione S-transferase family protein [*Acaryochloris* sp. CCMEE5410] (WP_029315177.1), glutathione S-transferase family protein [*Acaryochloris marina*] (WP_012165678.1), glutathione S-transferase family protein [*Cyanobacteria bacterium* J055] (RMG11768.1), putative Glutathione S-transferase [*Planktothrix sarta* PCC 8927] (CUR14504.1), glutathione S-transferase family protein [*Planktothrix tepida*] (WP_072717184.1) และ glutathione S-transferase family protein [*Mastigocladus laminosus*] (WP_135106164.1), glutathione S-transferase family protein [*Calothrix* sp. NIES-2098] (WP_096590453.1), putative glutathione S-transferase [*Tolypothrix* sp. NIES-4075] (GAX46190.1), glutathione S-transferase family protein [*Tolypothrix* sp. NIES-4075] (WP_089131565.1), putative glutathione S-transferase (plasmid) [*Fischerella* sp. NIES-4106] (BAZ71228.1) และ glutathione S-transferase family protein [*Westiellopsis prolifica*] (WP_131121628.1) ซึ่ง glutathione S-transferase A1 [*Homo sapiens*] (AAT06769.1) เป็น Outgroup โดยแสดงเป็น Accession number ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด อีกทั้ง Identical residue จะถูกแสดงด้วยสัญลักษณ์ “*”, conserved substitution residues ถูกแสดงด้วยสัญลักษณ์ “:” และ semi-conserved substitution residues ถูกแสดงด้วยสัญลักษณ์ “.”

ตารางที่ 2 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) ของ GST จากยีน PCC718_1478 กับ Ortholog

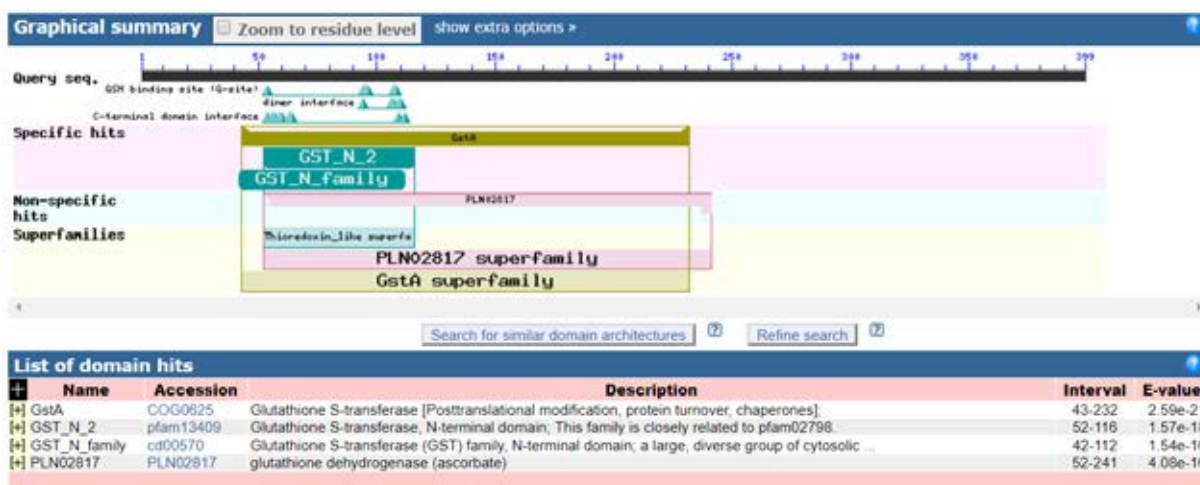
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
A	100.00															
B	18.88	100.00														
C	18.86	62.50	100.00													
D	21.58	55.07	58.92	100.00												
E	19.70	52.34	57.84	75.96	100.00	100.00										
F	19.70	52.34	57.84	75.96	100.00	100.00										
G	22.77	53.74	57.84	75.48	83.33	83.33	100.00									
H	21.43	53.52	57.30	75.48	89.72	89.72	85.05	100.00								
I	22.00	53.74	57.84	75.96	87.04	87.04	89.91	93.93	100.00							
J	21.72	55.14	62.16	64.42	62.96	62.96	62.50	62.15	62.96	100.00						
K	19.59	54.98	60.54	67.31	60.85	60.85	63.68	62.26	62.96	60.85	100.00					
L	20.10	54.50	60.54	65.38	61.32	61.32	64.15	62.74	62.74	60.85	93.40	100.00				
M	22.28	59.05	64.86	65.87	63.51	63.51	63.51	62.56	63.98	65.88	65.40	65.88	100.00			
N	20.21	58.57	62.16	65.87	63.51	63.51	64.93	63.98	64.45	63.51	68.25	68.25	73.46	100.00		
O	21.76	56.67	61.08	67.79	63.03	63.03	64.93	63.98	64.45	63.98	64.45	64.45	72.51	78.67	100.00	
P	21.24	56.19	61.08	67.31	62.56	62.56	63.51	62.56	63.03	64.93	64.45	64.45	72.04	78.20	94.79	100.00

โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega ใช้ลำดับกรดอะมิโนของ GST จากยีน PCC718_1478 และ Ortholog ได้แก่ A: *Homo sapiens* (AAT06769.1), B: Cyanobacteria bacterium SW9 44 58 (PSO47553.1), C: *Halothece* sp. PCC 7418 (WP_015225543.1), D: *Calothrix* sp. NIES-2098 (WP_096590453.1), E: *Tolypothrix* sp. NIES-4075 (GAX46190.1), F: *Tolypothrix* sp. NIES-4075 (WP_089131565.1), G: *Mastigocladus laminosus* UU774 (TFI55082.1), H: *Fischerella* sp. NIES-4106 (BAZ71228.1), I: *Westiellopsis prolifica* (WP_131121628.1), J: Cyanobacteria bacterium J055 (RMG11768.1), K: *Planktothrix sarta* PCC8927 (CUR14504.1), L: *Planktothrix tepida* (WP_072717184.1), M: *Pleurocapsa* sp. PCC 7319 (WP_019507507.1), N: *Mastigocoleus testarum* (WP_027847055.1), O: *Acaryochloris* sp. CCME5410 (WP_029315177.1) และ P: *Acaryochloris marina* (WP_012165678.1) ซึ่ง glutathione S-transferase A1 [*Homo sapiens*] (AAT06769.1) เป็น Outgroup



ภาพที่ 4.1.7 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของ GST ที่แสดงออกจายีน PCC718_1478 (WP_015225543.1) โดยใช้ซอฟต์แวร์ MEGA 7.0 โดยวิธี Neighbor Joining (NJ) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1000 replicates แสดงร่วมกับ accession number ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งใช้ลำดับกรดอะมิโนของ glutathione S-transferase A1 [*Homo sapiens*] (AAT06769.1) เป็น Outgroup

จากภาพที่ 4.1.5 - 4.1.7 และตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า GST จากยีน PCC7418_1478 (WP_01522543.1) เป็น GST ที่อยู่ใน GSTA ซูเปอร์แฟมิลี โดยมีค่า E-value ที่ต่ำที่สุด จึงทำให้น่าเชื่อถือได้มากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่สูงถึง 64.86% เมื่อเทียบกับ glutathione S-transferase family protein ของ *Pleurocapsa* sp. PCC7319 (WP_019507507) อีกทั้ง GST จากยีน PCC7418_1478 (WP_01522543.1) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ glutathione S-transferase ของ *Cyanobacteria bacterium* SW_9_44_58 (PSO47553.1) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน 62.50%



ภาพที่ 4.1.8 Putative conserved domain ของ GST ที่แสดงออกจากยีน PCC7418_0729 โดยใช้โปรแกรม Protein blast เลือกชุดคำสั่ง BLASTp ในฐานข้อมูล NCBI

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AA086769.1 -----MAEKPLKHYFNAR----- 113
WP_015224827.1 -----MQALSMEELNRFNFEIDRVNQPNAQSRLRFGDSEVRYVLYRDHHA 51
WP_015230394.1 -----MKPLSMEELKTKNPLNDRVNGNTNHSRLRFGQNESEVRYVLYRDHHA 51
PM651878.1 -----MKRSLMEELKTKNPLNDRVNGNTNHSRLRFGQNESEVRYVLYRDHHA 56
WP_124142889.1 -----MISTKSLFLSMEELQQLATFERDINGPNSQARLRLGQASDVRVLYRDHHA 53
WP_071185349.1 -----MSIAPLTMDELEALDFKIDTVNGAINAQSCLRLFGFTESDIRVLYRDHHA 58
AOX04445.1 -----MKPTFMSLAPLTMDELEALDFKIDTVNGAINAQSCLRLFGFTESDIRVLYRDHHA 53
WP_083385646.1 -----MSIAPLTMDELEALDFKIDTVNGAINAQSCLRLFGFTESDIRVLYRDHHA 51
WP_081431508.1 -----MAPLTMDELEALDFKIDTVNGAINAQSCLRLFGFTESDIRVLYRDHHA 53
OL160924.1 -----MSIAPLTMDELEALDFKIDTVNGAINAQSCLRLFGFTESDIRVLYRDHHA 52
WP_018472817.1 -----MSTPSMEELADRTFLDIPNQPNAQSCLRLFGQSDNDRVLYRDHHA 53
WP_107668389.1 -----MTTAPFQMTLETLELNKIDINPINAQALLRFGQESDVRVLYRDHHA 60
EAZ98333.1 -----MTLIDKMTLPLSMLELENLNMKIDINPINAQALLRFGQESDVRVLYRDHHA 53
WP_035799667.1 -----MTPLSMLELENLNMKIDINPINAQALLRFGQESDVRVLYRDHHA 53
WP_017287664.1 -----MAALSMEELALDFKIDTVNGAINAQSCLRLFGQESDVRVLYRDHHA 53
WP_009787989.1 -----MTRPLTMDELEALDFKIDTVNGAINAQSCLRLFGQESDVRVLYRDHHA 53
      : * :

AA086769.1 GRMSTRHLAAA-GVEFEKFKES- AEDLKLNDGVLTFQQVPMVEIDGMKLVQTRA 71
WP_015224827.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 111
WP_015230394.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 111
PM651878.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 111
WP_124142889.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 116
WP_071185349.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 113
AOX04445.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 118
WP_083385646.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 113
WP_081431508.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 111
OL160924.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 113
WP_018472817.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 112
WP_107668389.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 113
EAZ98333.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 113
WP_035799667.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 113
WP_017287664.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 113
WP_009787989.1 CPYCKQVWLMLLEEQIPYRKIVYMFYCKGKERVKYQVPSGMLPAKLLDRLLTESDDI 113
      : * :
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *
      : * :

AA086769.1 LNYIASKYLVE-KDIKERALIDMVEIGIADLGEMILL- --LPVCPPEKDAKLAIKE 126
WP_015224827.1 LSOLETFGLG-YSMNDASIALR- --KLER-LLFRAMCSWLCVPSARRD- --Q 160
WP_015230394.1 LLALEDAFGVLE-YSMKDSKVIPLK- --KLER-LLFRAMCSWLCVPSARRD- --E 160
PM651878.1 LLALEDAFGVLE-YSMKDSKVIPLK- --KLER-LLFRAMCSWLCVPSARRD- --E 160
WP_124142889.1 LLALEDAFGVLE-YSMKDSKVIPLK- --KLER-LLFRAMCSWLCVPSARRD- --Q 162
WP_071185349.1 LGLLRFVFKPLE-QSMKDPAVIKLR- --QLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 162
AOX04445.1 LGLLRFVFKPLE-QSMKDPAVIKLR- --QLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 166
WP_083385646.1 LGLLRFVFKPLE-QSMKDPAVIKLR- --QLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 162
WP_081431508.1 LGLLRFVFKPLE-QSMKDPAVIKLR- --QLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 160
OL160924.1 LGLLRFVFKPLE-QSMKDPAVIKLR- --QLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 162
WP_018472817.1 LLALEDAFGVLE-YSMKDSKVIPLK- --KLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 160
WP_107668389.1 LLALEDAFGVLE-YSMKDSKVIPLK- --KLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 162
EAZ98333.1 LMLAAEFGALN-HSMKDANVPLR- --QLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 169
WP_035799667.1 LMLAAEFGALN-HSMKDANVPLR- --QLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 162
WP_017287664.1 LMLAAEFGALN-HSMKDANVPLR- --QLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 160
WP_009787989.1 LMLAAEFGALN-HSMKDANVPLR- --QLER-LLFRAMCWLCPYTRSSKEE- --Q 162
      * : : : : : : : : : : : * : :

AA086769.1 KIKNRYFA--FEKVLKSHGQVYLVNKLSDIHLVLLVYLEDSSLIS- ----- 176
WP_015224827.1 YNRQFQDVSDVEDALQTPGPFYLD- FSIIDL- --IFPFLRNMNLSFYKGYSLR 216
WP_015230394.1 KNRQFQDVTEKVEVTALETGPFYLD- FSIIDV- --LFPPFLRNMNLSFYKGYSLR 216
PM651878.1 SNRQFQDVTEKVEVTALETGPFYLD- FSIIDV- --LFPPFLRNMNLSFYKGYSLR 216
WP_124142889.1 HQDOFQIQQVMENALSTPGPFYLD- FGTVDV- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 222
WP_071185349.1 HQDOFQIQQVMENALSTPGPFYLD- FGTVDV- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 218
AOX04445.1 HQDOFQIQQVMENALSTPGPFYLD- FGTVDV- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 223
WP_083385646.1 HQDOFQIQQVMENALSTPGPFYLD- FGTVDV- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 218
WP_081431508.1 HQDOFQIQQVMENALSTPGPFYLD- FGTVDV- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 216
OL160924.1 HQDOFQIQQVMENALSTPGPFYLD- FGTVDV- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 218
WP_018472817.1 RNRQFQVSVKVEEALSTPGPFYLD- FGTADA- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 216
WP_107668389.1 RNRQFQVSVKVEEALSTPGPFYLD- FGTADA- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 216
EAZ98333.1 QNRQFQVSVKVEEALSTPGPFYLD- FGTVDV- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 225
WP_035799667.1 QNRQFQVSVKVEEALSTPGPFYLD- FGTVDV- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 218
WP_017287664.1 RNRQFQVSVKVEEALSTPGPFYLD- FGTVDV- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 216
WP_009787989.1 RNRQFQVSVKVEEALSTPGPFYLD- FGTADA- --IFPVMERNMNSLYYKGYSLR 218
      : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

AA086769.1 --SPLL- --LEALKTRISLNPYKFKLQPSKPPKPPMD----- 209
WP_015224827.1 EENPQLGMLFDGMEGRSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 276
WP_015230394.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 276
PM651878.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 276
WP_124142889.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 276
WP_071185349.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 278
AOX04445.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 283
WP_083385646.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 278
WP_081431508.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 278
OL160924.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 278
WP_018472817.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 276
WP_107668389.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 278
EAZ98333.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 285
WP_035799667.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 278
WP_017287664.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 276
WP_009787989.1 EENPLKQFAGMEARSITYGTSDFHTHVDLPQMGCCYANDPQTKLNQARVDGPF 278
      : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

AA086769.1 -----EKSLTE- --ARKIFRE----- 222
WP_015224827.1 EGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 336
WP_015230394.1 LGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 336
PM651878.1 LGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 342
WP_124142889.1 LGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 338
WP_071185349.1 EGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 343
AOX04445.1 EGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 338
WP_083385646.1 EGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 338
WP_081431508.1 EGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 336
OL160924.1 SELPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 336
WP_018472817.1 FGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 338
WP_107668389.1 LGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 345
EAZ98333.1 LGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 338
WP_035799667.1 LGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 336
WP_017287664.1 LGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 336
WP_009787989.1 MGLPDVYPEPETSRAELQRLVLRKHNIIKVNPMDELFQALRICALTHMIIGETCMPP 338
      * :

AA086769.1 ----- 222
WP_015224827.1 AQSAGLYRLRDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 396
WP_015230394.1 AQSAGLYRLRDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 396
PM651878.1 AQSAGLYRLRDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 396
WP_124142889.1 SASDPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 402
WP_071185349.1 LGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 403
AOX04445.1 LGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 398
WP_083385646.1 LGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 398
WP_081431508.1 LGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 396
OL160924.1 LGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 398
WP_018472817.1 PGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 396
WP_107668389.1 KGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 398
EAZ98333.1 KGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 405
WP_035799667.1 KGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 398
WP_017287664.1 AGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 396
WP_009787989.1 SGSOPALRYLDRINVPDMISYAAKRLRESELTAAVLEQDQETPIPVQHRRODPANF 398

AA086769.1 ----- 222
WP_015224827.1 ARK- -- 399
WP_015230394.1 SLTSLH- -- 402
PM651878.1 SIKR- -- 400
WP_124142889.1 TQI- -- 405
WP_071185349.1 AKAI- -- 402
AOX04445.1 AKAI- -- 407
WP_083385646.1 AKAI- -- 402
WP_081431508.1 AKAI- -- 400
OL160924.1 AKAI- -- 402
WP_018472817.1 AKAI- -- 399
WP_107668389.1 VV- -- 400
EAZ98333.1 VV- -- 411
WP_035799667.1 VV- -- 405
WP_017287664.1 VSL- -- 399
WP_009787989.1 AS- -- 400

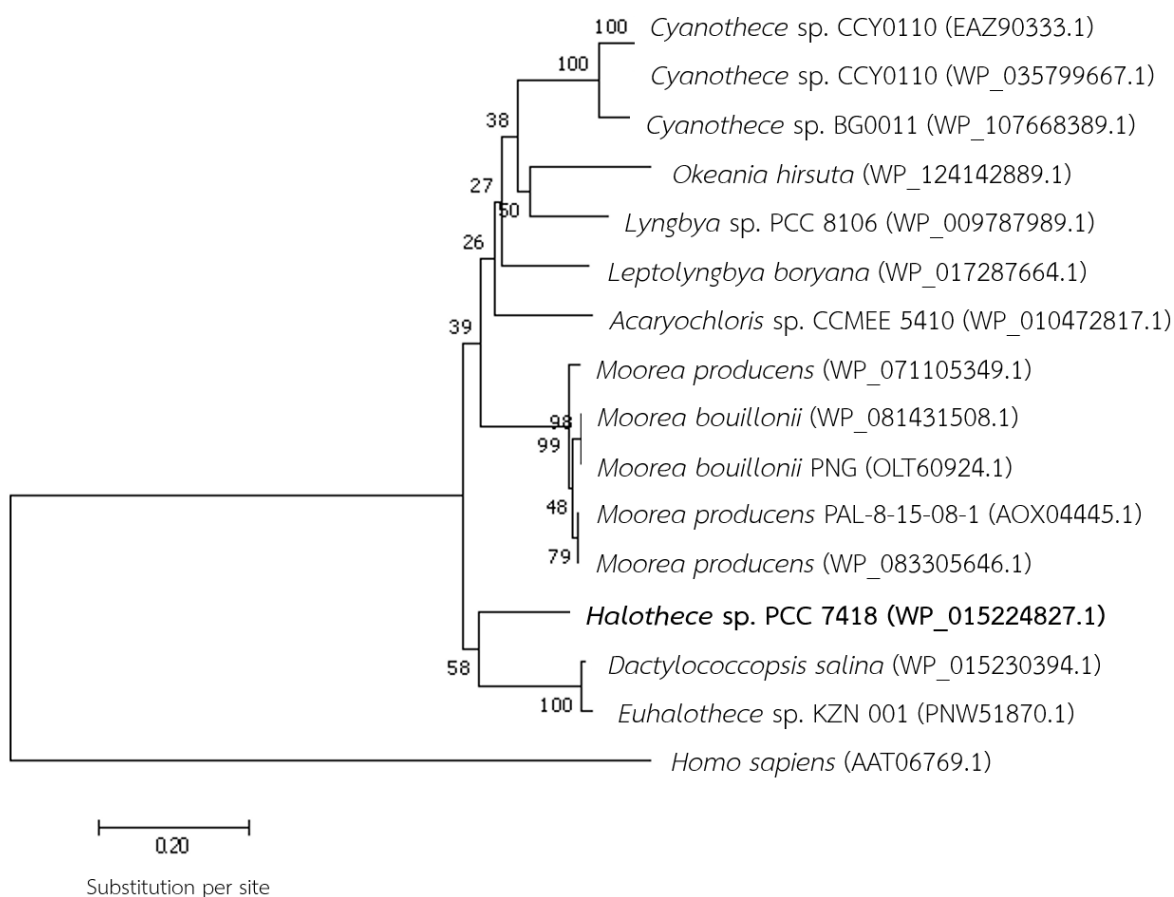
```

ภาพที่ 4.1.9 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ GST จากยีน PCC718_0729 กับ Ortholog (Multiple amino acid sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega ซึ่งใช้ลำดับกรดอะมิโนของ glutathione S-transferase A1 [*Homo sapiens*] (AAT06769.1), glutathione S-transferase family protein [*Halotheca* sp. PCC 7418] (WP_015224827.1), glutathione S-transferase family protein [*Dactylococcopsis salina*] (WP_015230394.1), glutathione S-transferase [*Euhalotheca* sp. KZN 001] (PNW51870.1), glutathione S-transferase family protein [*Moorea bouillonii*] (WP_081431508.1), glutathione S-transferase family protein [*Okeania hirsuta*] (WP_124142889.1), glutathione S-transferase family protein [*Cyanothece* sp. BG0011] (WP_107668389.1), glutathione S-transferase [*Moorea producens* PAL-8-15-08-1] (AOX04445.1), glutathione S-transferase family protein [*Moorea producens*] (WP_083305646.1), glutathione S-transferase [*Moorea bouillonii* PNG] (OLT60924.1) และ hypothetical protein CY0110_04683 [*Cyanothece* sp. CCY0110] (EAZ90333.1), glutathione S-transferase family protein [*Cyanothece* sp. CCY0110] (WP_035799667.1), glutathione S-transferase family protein [*Acaryochloris* sp. CCME 5410] (WP_010472817.1), glutathione S-transferase family protein [*Leptolyngbya boryana*] (WP_017287664.1), glutathione S-transferase family protein [*Moorea producens*] (WP_071105349.1) และ glutathione S-transferase family protein [*Lyngbya* sp. PCC 8106] (WP_009787989.1) โดยใช้ glutathione S-transferase A1 [*Homo sapiens*] (AAT06769.1) เป็น Outgroup โดยแสดงเป็น Accession number ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด อีกทั้ง Identical residue จะถูกแสดงด้วยสัญลักษณ์ “*”, conserved substitution residues ถูกแสดงด้วยสัญลักษณ์ “:” และ semi-conserved substitution residues ถูกแสดงด้วยสัญลักษณ์ “.”

ตารางที่ 3 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) ของ GST จากยีน PCC718_0729 กับ Ortholog

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
A	100.00															
B	17.31	100.00														
C	18.75	77.44	100.00													
D	18.27	76.94	97.50	100.00												
E	17.79	72.68	72.18	71.43	100.00											
F	18.75	72.18	70.50	70.25	72.57	100.00										
G	20.19	72.18	70.50	70.50	72.28	97.01	100.00									
H	20.19	72.18	70.50	70.50	72.82	97.01	100.00	100.00								
I	20.19	72.93	70.75	70.75	73.68	96.00	98.00	98.00	100.00							
J	20.19	72.68	70.50	70.50	73.32	96.27	98.26	98.26	99.75	100.00						
K	18.36	72.61	72.86	71.86	74.69	76.19	76.19	76.19	76.38	76.19	100.00					
L	19.23	71.61	72.61	72.61	75.25	76.00	75.50	75.50	75.88	75.75	75.13	100.00				
M	20.19	71.18	72.14	72.50	74.75	75.12	73.71	74.63	75.25	75.12	74.19	91.50	100.00			
N	20.19	71.18	72.14	72.50	75.31	75.12	74.63	74.63	75.25	75.12	74.19	91.50	100.00	100.00		
O	17.79	73.43	73.18	72.43	75.94	75.69	75.69	75.69	75.44	75.19	78.14	75.63	74.44	74.44	100.00	
P	18.27	71.36	71.36	70.60	76.25	77.50	76.25	76.25	76.13	76.00	76.88	77.50	77.75	77.75	78.89	100.00

โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega ใช้ลำดับกรดอะมิโนของ GST จากยีน PCC718_1478 และ Ortholog ได้แก่ A: *Homo sapiens* (AAT06769.1), B: *Halotheca* sp. PCC 7418 (WP_015224827.1), C: *Dactylococcopsis salina* (WP_015230394.1), D: *Euhalotheca* sp. KZN 001 (PNW51870.1), E: *Okeania hirsuta* (WP_124142889.1), F: *Moorea producens* (WP_071105349.1), G: *Moorea producens* PAL-8-15-08-1 (AOX04445.1), H: *Moorea producens* (WP_083305646.1), I: *Moorea bouillonii* (WP_081431508.1), J: *Moorea bouillonii* PNG (OLT60924.1), K: *Acaryochloris* sp. CCME 5410 (WP_010472817.1), L: *Cyanothece* sp. BG0011 (WP_107668389.1), M: *Cyanothece* sp. CCY0110 (EAZ90333.1), N: *Cyanothece* sp. CCY0110 (WP_035799667.1), O: *Leptolyngbya boryana* (WP_017287664.1), P: *Lyngbya* sp. PCC 8106 (WP_009787989.1) ซึ่ง glutathione S-transferase A1 [*Homo sapiens*] (AAT06769.1) เป็น Outgroup



ภาพที่ 4.1.10 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของ GST ที่แสดงออกจากยีน PCC718_0729 (WP_015225543.1) โดยใช้ซอฟต์แวร์ MEGA 7.0 โดยวิธี Neighbor Joining (NJ) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1000 replicates แสดงร่วมกับ accession number ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่ง

ใช้ลำดับกรดอะมิโนของ glutathione S-transferase A1 [Homo sapiens] (AAT06769.1) เป็น Outgroup

จากภาพที่ 4.1.8–4.1.10 และ ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า GST จากยีน PCC7418_0729 (WP_015224827.1) เป็น GST ที่อยู่ใน GSTA ซูเปอร์แฟมิลี โดยมีค่า E-value ที่ต่ำที่สุด จึงทำให้น่าเชื่อถือได้มากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) ที่สูงถึง 77.44 % เมื่อเทียบกับ glutathione S-transferase family protein ของ *Dactylococcopsis salina* (WP_015230394.1) อีกทั้ง GST จากยีน PCC7418_0729 (WP_015224827.1) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ glutathione S-transferase family protein ของ *Dactylococcopsis salina* (WP_015230394.1)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยฐานข้อมูล NCBI พบว่า GST จากยีน PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 ใน *Halotheca* sp. PCC7418 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ GSTA ซูเปอร์แฟมิลี เมื่อวิเคราะห์ลำดับสายวิวัฒนาการจาก phylogenetic tree จะเห็นได้ว่า GST ใน *Halotheca* sp. PCC7418 ที่แสดงออกจากยีนกำหนดรหัส 2 ยีน ไม่มีความใกล้ชิดของสายวิวัฒนาการกับ GSTA1 ในมนุษย์เลย อีกทั้งยังมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในระดับกรดอะมิโนที่ต่ำ ซึ่งอาจสรุปได้ว่า GST ใน *Halotheca* sp. PCC7418 แม้จะอยู่ในซูเปอร์แฟมิลีเดียวกันกับ GSTA1 ในมนุษย์ แต่ไม่มีความใกล้ชิดกันของสายวิวัฒนาการ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ GST ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ มีความหลากหลายสูงมาก และหากจะจัดจำแนกคลาส GST ใน *Halotheca* sp. PCC7418 จำเป็นต้องพิจารณาถึงองค์ประกอบอื่นๆ เพิ่มเติม รวมถึงการศึกษาลักษณะเชิงคุณสมบัติของเอนไซม์ GST เพื่อเป็นการยืนยันถึงคลาสของ GST ดังกล่าว อาจไม่ใช่ GST คลาส alpha อาจจะเป็นคลาสอื่นเนื่องจาก GST คลาส alpha จะพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Perperopoulou และคณะ, 2017)

จากฐานข้อมูล KEGG และ NCBI ที่ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST ทั้ง 2 ยีน จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในภาคผนวก ข และได้ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม IDT OligoAnalyzer Tool ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละไพรเมอร์ในตารางที่ 2

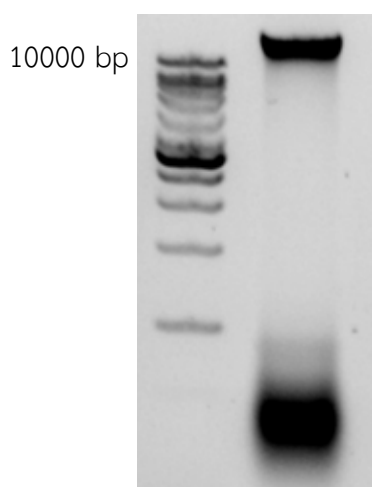
ตารางที่ 2 ไพรมเมอร์ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ของยีนกำหนดรหัส GST ใน

Halotheca sp. PCC7418

Primer	Sequence	T _m (°C)	Length (bp)
PCC7418_1478-NdeI-F	5'-ACCAATGGTACATATGATGAAACTTTATTA-3'	54	30
PCC7418_1478-BamHI-R	5'-AGATAATTTTGGATCCTCACGGGGT-3'	63	28
PCC7418_0729-NdeI-F	5'-GTTAAGTATTCATATGATGCAGGCACTGAG-3'	60	30
PCC7418_0729-BamHI-R	5'-TTCTCTGCGAGGATCCTCAAACCTTTTGCAA-3'	65	30

4.2 การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Halotheca* sp. PCC7418

เมื่อสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ จาก *Halotheca* sp. PCC7418 ด้วย DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) แล้วตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส และหาความเข้มข้นของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องนาโนดรอป จากผลการตรวจคุณภาพ พบว่าเกิดแถบแสดงขนาดดีเอ็นเอของ *Halotheca* sp. PCC7418 1 แถบ ซึ่งมีขนาดใหญ่มากกว่า 10,000 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ (Vivantis 9, Malaysia) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ต้องการ อีกทั้งแถบดีเอ็นเอที่ได้ยังไม่มีการแตกหัก ดังภาพที่ 4.2 โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 47.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ 30.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร อีกทั้งอัตราส่วนการดูดกลืนแสง A₂₆₀/A₂₈₀ มีค่า 1.99 และ 2.09 บ่งบอกได้ว่า จีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดมีความบริสุทธิ์ (Morin และ คณะ, 2010) จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

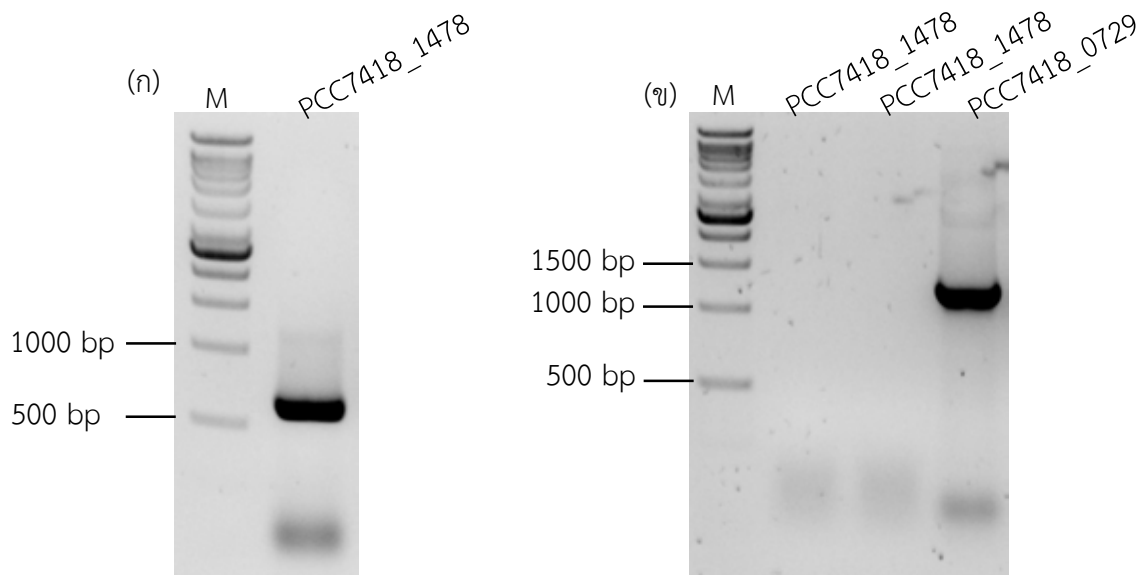


ภาพที่ 4.2 ตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ที่สกัดจาก *Halotheca* sp. PCC7418 ด้วยวิธีเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (อะกาโรสเจลเตรียมด้วยความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1.2 % (w/v) แล้ว

พรีแคสด้วย 1X SYBR® Safe DNA Gel stain) M: ดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ (Vivantis 9, Malaysia)

4.3 การเพิ่มจำนวนยีนที่กำหนดรหัส GST ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR)

เพิ่มจำนวนยีนที่กำหนดรหัส GST (PCC7418_1478 และ PCC7418_0729) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Halotheca* sp. PCC7418 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase พบว่าเกิดแถบแสดงขนาดดีเอ็นเอประมาณ 561 และ 1200 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดตรงกับยีนที่กำหนดรหัส GST (ภาคผนวก ข.) ดังภาพที่ 4.3

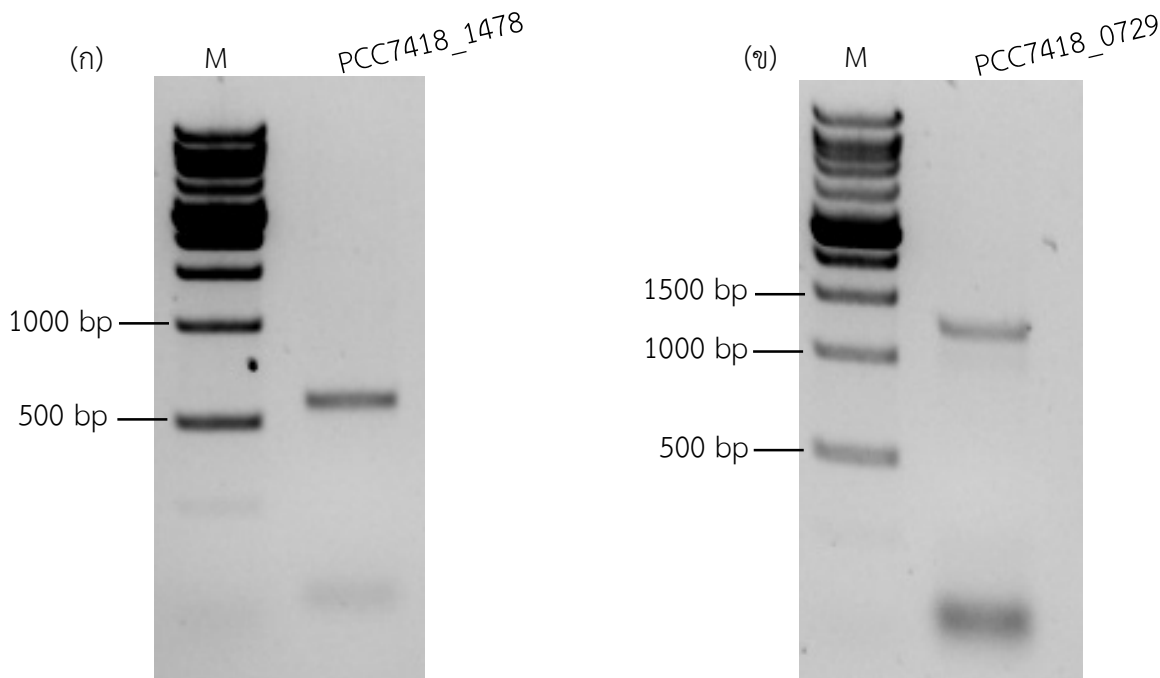


ภาพที่ 4.3 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) (อะกาโรสเจลเตรียมด้วยความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1.2 % (w/v) แล้วพรีแคสด้วย 1X SYBR® Safe DNA Gel stain) M: ดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ (Vivantis 9, Malaysia) (ก) ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ของยีน PCC7418_1478 โดยใช้อุณหภูมิในระยะ Annealing คือ 55 องศาเซลเซียส (ข) ช่องที่ 2: ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ของยีน PCC7418_1478 โดยใช้อุณหภูมิในระยะ Annealing คือ 60 องศาเซลเซียส ช่องที่ 3: ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ของยีน PCC7418_1478 โดยใช้ อุณหภูมิในระยะ Annealing คือ 50 องศาเซลเซียส ช่องที่ 4: ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ของยีน PCC7418_0729 โดยใช้อุณหภูมิในระยะ Annealing คือ 60 องศาเซลเซียส

4.3.1 การทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ของยีนที่กำหนดรหัส GST ทั้ง PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 ที่ได้ จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย GenepHlow™ Gel/PCR Kit Quick Protocol (Geneaid, Taiwan) แล้วตรวจสอบการทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส มีความบริสุทธิ์ โดยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส และวัดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วยเครื่องนาโนทรอป 2000 ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาดประมาณ 500 และ 1200 คู่เบส ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.3.2 แล้วมีความเข้มข้นเท่ากับ 7.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ 17.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ อีกทั้งอัตราส่วนการดูดกลืนแสง A260/A280 มีค่า 1.87 และ 1.80 ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกได้ว่าผลิตภัณฑ์ PCR มีความบริสุทธิ์



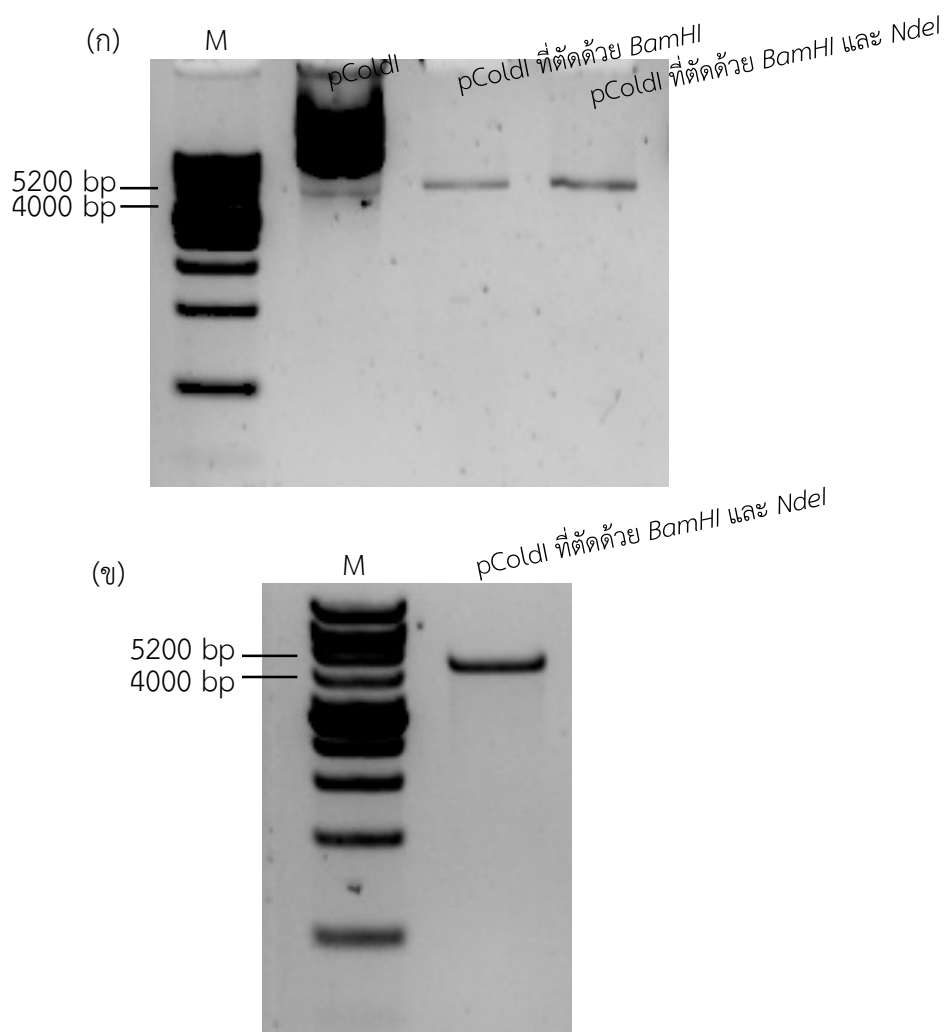
ภาพที่ 4.3.1 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR) ที่บริสุทธิ์ (อะกาโรสเจลเตรียมด้วยความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1.2 % (w/v) แล้วพรีแคสด้วย 1X SYBR® Safe DNA Gel stain) M: ดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ (Vivantis 9, Malaysia) (ก) ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ของยีน PCC7418_1478 ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ (ข) ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ของยีน PCC7418_0729 ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์

4.4 เตรียมเวกเตอร์แสดงออก pColdI

4.4.1 สกัดพลาสมิด pColdI จาก *Escherichia coli* DH5 α และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI*

สกัดเวกเตอร์แสดงออก pCold I จาก *E.coli* DH5 α ด้วย RBC Real Genomics HIYield™ Plasmid Mini Kit (Life biomedical, UK) นำไปวัดความเข้มข้นของพลาสมิดโดย เครื่องนาโนดรอป 2000 และตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดที่สกัดด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนดรอป 2000 มีความเข้มข้นเท่ากับ 53 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* โดยบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า เกิดแถบของดีเอ็นเอ 1 แถบ ซึ่งมีขนาด

ประมาณ 4400 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของ pCold I ดังภาพที่ 4.4.1 จากนั้นตัดเจลตรงส่วนที่เป็นแถบดีเอ็นเอของเวกเตอร์แสดงออก pCold I ที่โดนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* แล้วสกัดออกมาจากเจลด้วย GenepHlow™ Gel/PCR Kit Quick Protocol (Geneaid, Taiwan) นำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนทรอป 2000 (Thermo Scientific, USA) มีความเข้มข้นเท่ากับ 9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง A260/A280 มีค่า 1.88



ภาพที่ 4.4.1 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของเวกเตอร์แสดงออก pColdI (อะกาโรสเจลเตรียมด้วยความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1.2 % (w/v) แล้วพรีแคสด้วย 1X SYBR® Safe DNA Gel stain) M: ดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ (Vivantis 9, Malaysia) (ก) ช่องที่ 2: เวกเตอร์แสดงออก pColdI ที่ไม่โดนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, ช่องที่ 3: เวกเตอร์แสดงออก pColdI ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* อย่างเดียว และ ช่องที่ 4: เวกเตอร์แสดงออก pColdI ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* (ข) เวกเตอร์แสดงออก pCold I ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* ที่สกัดออกมาจากเจล

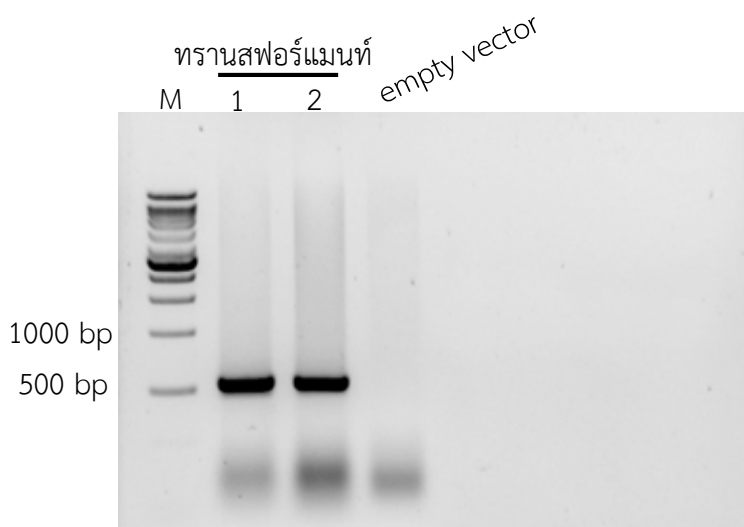
4.5 การทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

เมื่อโคลนยีนกำหนดรหัส GST (PCC7418_1478 และ PCC7418_0729) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* เข้าสู่เวกเตอร์แสดงออก pColdI แล้ว จึงทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่คอมพิวเตอร์เซลล์ โดยทรานสฟอร์มเข้า *E.coli* DH5 α จากนั้นนำเซลล์ทรานสฟอร์มเม้นท์มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB(low salt) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำโคโลนีที่เกิดไปขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB(low salt) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตรวจสอบการรับพลาสมิดลูกผสมของทรานสฟอร์มเม้นท์โดยวิธี โคลน PCR

4.5.1 การตรวจสอบทรานสฟอร์มเม้นท์ และการยืนยันพลาสมิดลูกผสม

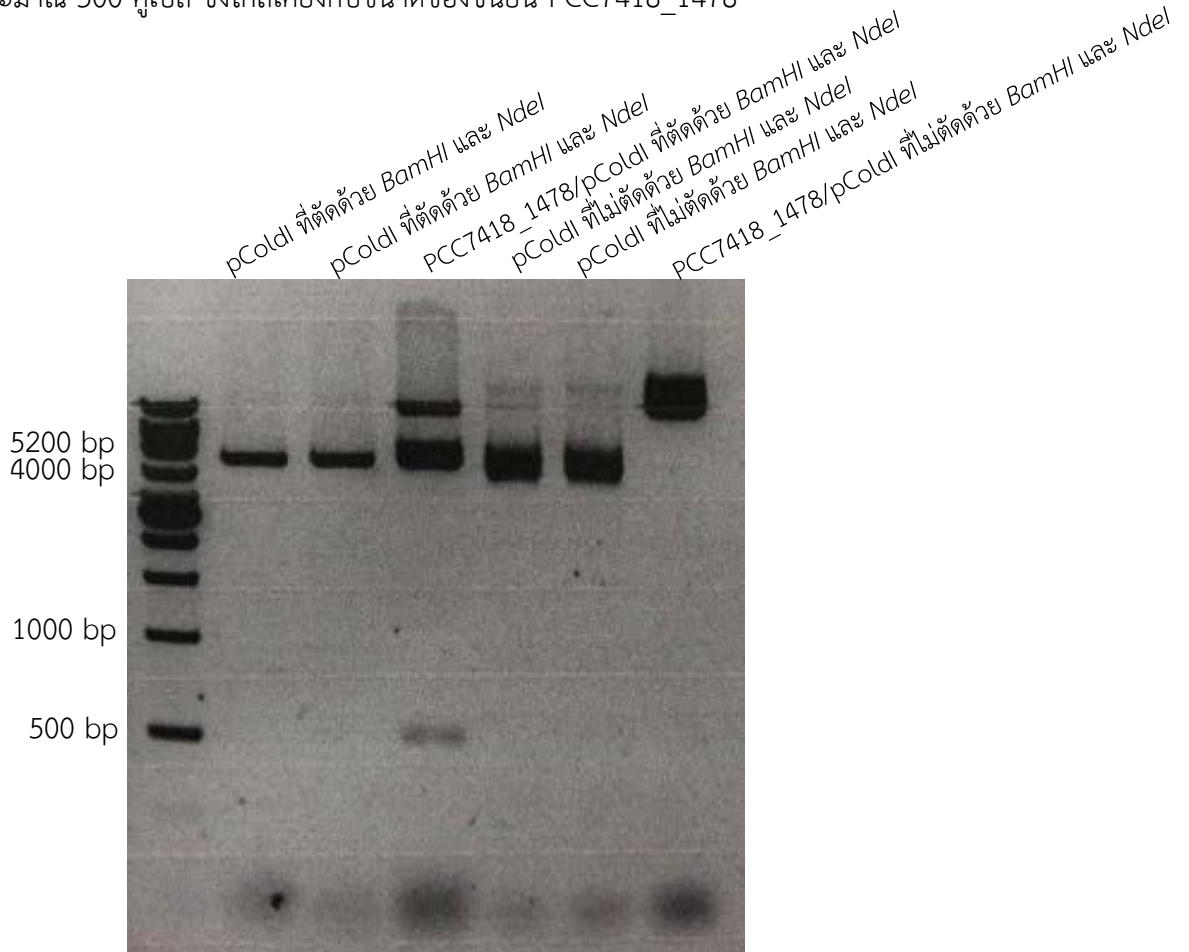
PCC7418_1478/pColdI

นำโคโลนีของทรานสฟอร์มเม้นท์มาตรวจสอบการรับพลาสมิดลูกผสม PCC7418_1478/pColdI ด้วยวิธี โคลน PCR ได้ดังภาพที่ 4.5.1.1 พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่แสดงขนาดประมาณ 500 คู่เบส จำนวน 2 แถว หรือจากโคโลนีจำนวน 2 โคลน จึงเลือกมา 1 โคลนเพื่อไปทำการเตรียมพลาสมิดและยืนยันความถูกต้องของชิ้นยีน PCC7418_1478 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* ต่อไป



ภาพที่ 4.5.1.1 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของโคลน PCR (อะกาโรสเจลเตรียมด้วยความเข้มข้นของอะกาโรส เจล 1 % (w/v) แล้วพรีแคสด้วย 1X SYBR[®] Safe DNA Gel stain) M: ดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ (Vivantis 9, Malaysia) ทรานสฟอร์มเม้นท์ (*E.coli* DH5 α) ของพลาสมิดลูกผสมที่โคลนยีน PCC7418_1478

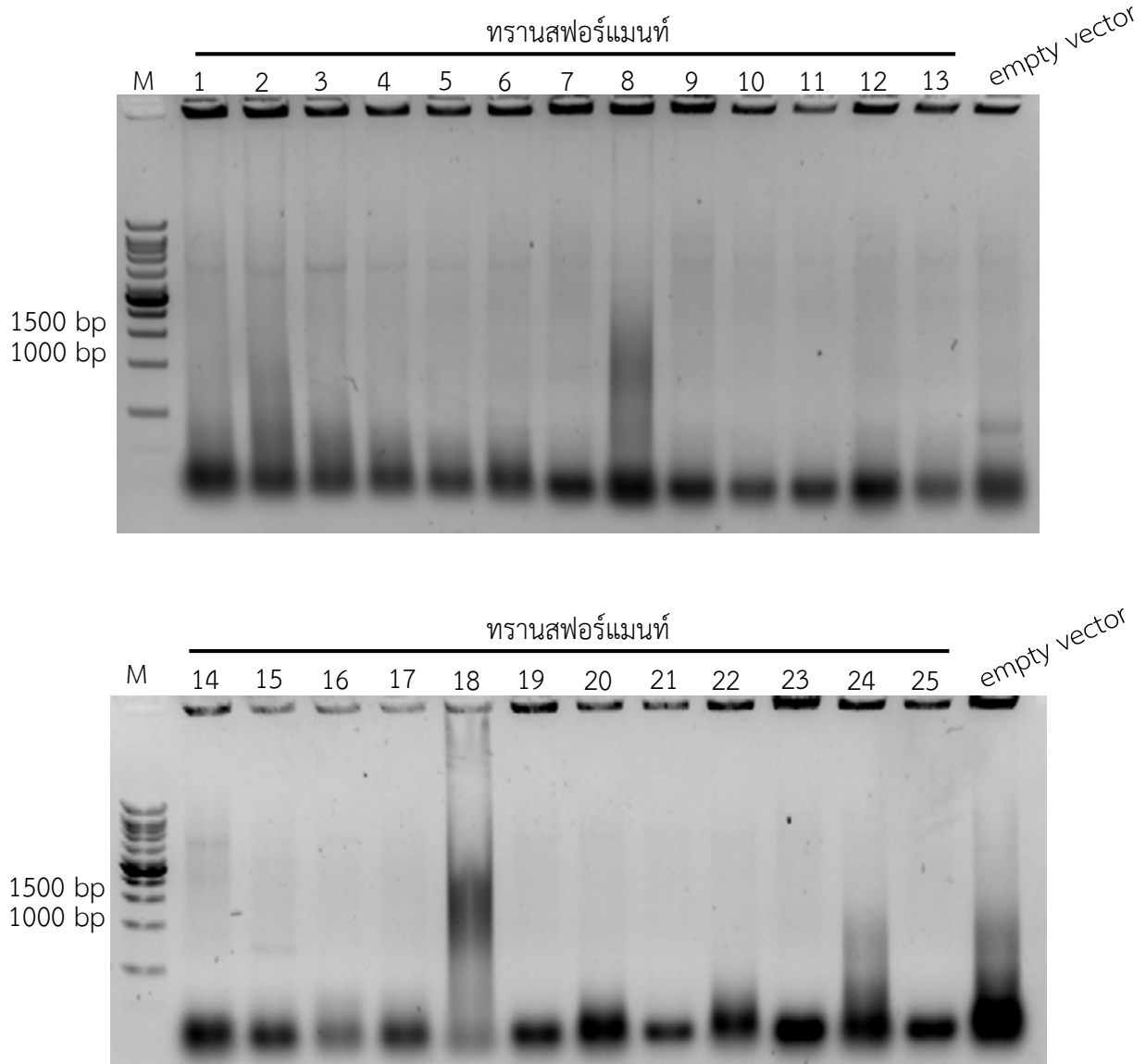
นำโคลนนิ่งของ *E.coli* DH5 α ที่ตรวจสอบด้วยวิธี โคลนนิ่ง PCR แล้วพบแถบดีเอ็นเอที่เป็นของ ซีนียีน PCC7418_1478 มาสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วย RBC Real Genomics HIYield™ Plasmid Mini Kit (Life biomedical, UK) ตรวจสอบด้วยการตัดกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4400 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของเวกเตอร์แสดงออก pColdI และเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของซีนียีน PCC7418_1478



ภาพที่ 4.5.1.2 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการตัดพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จาก *E.coli* DH5 α ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* 2 ชั่วโมง (อะกาโรสเจลเตรียมด้วยความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1 % (w/v) แล้วพรีแคสด้วย 1X SYBR® Safe DNA Gel stain) M: ดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ (Vivantis 9, Malaysia)

4.5.2 การตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ และการยืนยันพลาสมิดลูกผสม PCC7418_0729/pColdI

นำโคลนีย์ของทรานสฟอร์มแมนท์มาตรวจสอบการรับพลาสมิดลูกผสม PCC7418_0729/pColdI ด้วยวิธี โคลนีย์ PCR ได้ดังภาพที่ 4.5.1.2 พบว่าไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่แสดงขนาดประมาณ 1200 คู่เบส

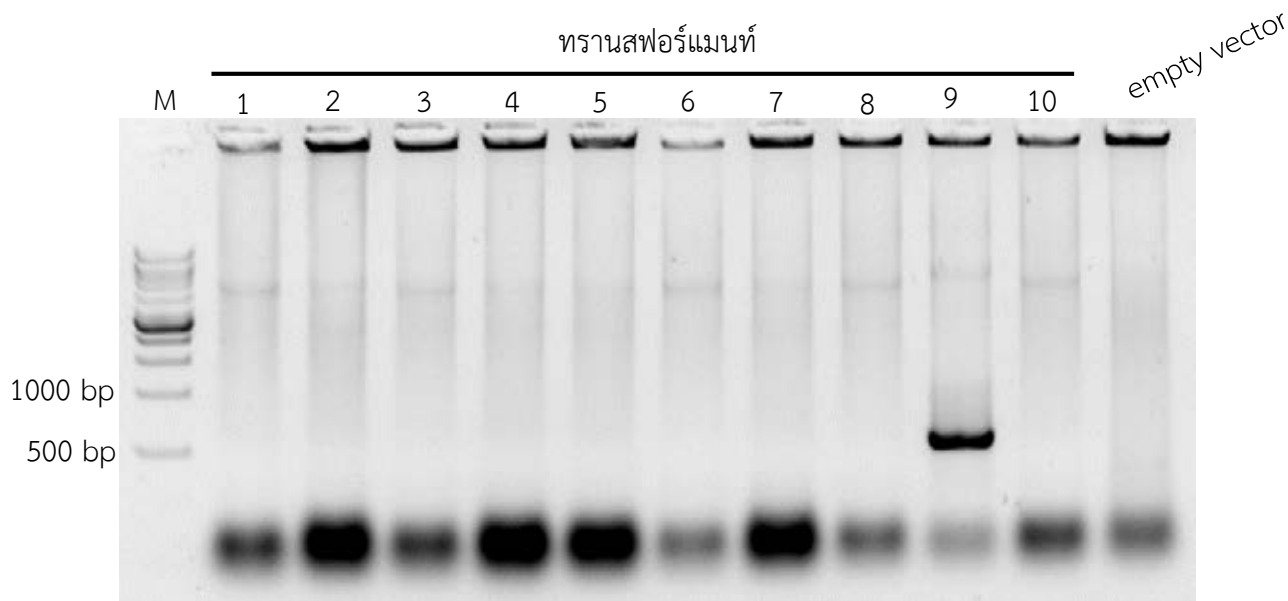


ภาพที่ 4.5.2 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของโคลนีย์ PCR (อะกาโรสเจลเตรียมด้วยความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1 % (w/v) แล้วพรีแคสด้วย 1X SYBR® Safe DNA Gel stain) M: ดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ (Vivantis 9, Malaysia) ทรานสฟอร์มแมน (E.coli DH5 α) ของพลาสมิดลูกผสมที่โคลนีย์ PCC7418_0729

ซึ่งจากการที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1200 คู่เบส อาจเกิดจากความเข้มข้นระหว่างเวกเตอร์และชิ้นยีนในปฏิกิริยาไลเกตไม่เหมาะสม อาจจะต้องเพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้น ดังนั้นจึงศึกษาต่อเฉพาะพลาสมิดลูกผสม PCC7418_1478/pColdI ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

4.6 การสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากตัวอย่าง

นำพลาสมิดลูกผสมของยีน PCC7418_1478 ที่สกัดได้จาก *E.coli* DH5 α ทรานส์ฟอร์มเข้า *E.coli* BL21 จากนั้นนำเซลล์ทรานส์ฟอร์มเม้นท์มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB(low salt) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตรวจสอบทรานส์ฟอร์มเม้นท์ด้วยวิธี โคลนนิ่ง PCR แล้วตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ดังภาพที่ 4.6 จากนั้นนำโคลนนิ่ง *E.coli* BL21 ที่รับพลาสมิดลูกผสม PCC7418_1478/pColdI ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB (low salt) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นถ่ายโอนลงอาหารเหลว LB (low salt) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5-0.6 แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนโดยเติม IPTG โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เขย่าตลอดเวลา เก็บตัวอย่างเซลล์ควบคุม (*E.coli* DH5 α) และเซลล์แสดงออก (*E.coli* BL21) จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นความถี่สูง ปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนน้ำใส ไปด้วยความเข้มข้นของโปรตีนหยابที่สกัดได้ด้วยวิธี แบริดฟอร์ด ซึ่งนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก จ.) เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนหยاب ดังตารางที่ 4



ภาพที่ 4.6 เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของโคลนนิ่ง PCR (อะกาโรสเจลเตรียมด้วยความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1 % (w/v) แล้วพรีแคสด้วย 1X SYBR[®] Safe DNA Gel stain) M: ดีเอ็นเอ มาร์กเกอร์ (Vivantis 9, Malaysia) ทรานส์ฟอร์มเม้นท์ (*E.coli* BL21) ของ PCC7418_1478/pColdI

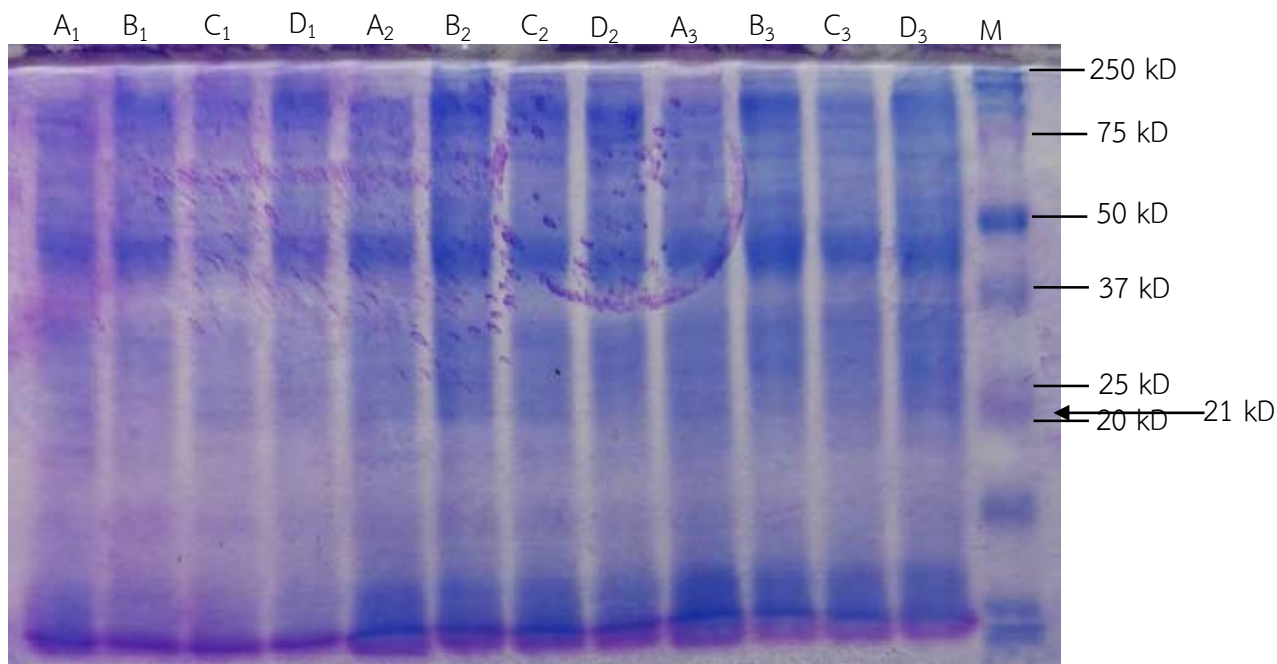
ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของโปรตีนหายาที่วัดด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

แหล่งของโปรตีน	ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₅₉₅)	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
<i>E.coli</i> DH5 α ที่มี pColdI (empty vector)	0.212	5.34
<i>E.coli</i> DH5 α ที่มี PCC7418_1478/pColdI	0.110	2.77
<i>E.coli</i> BL21 ที่มี pColdI (empty vector)	0.192	4.84
<i>E.coli</i> BL21 ที่มี PCC7418_1478/pColdI	0.202	5.09

ผลจากการหาความเข้มข้นของโปรตีนหายาด้วยวิธีแบรดฟอร์ด พบว่า *E.coli* DH5 α ที่มี pColdI มีความเข้มข้นของโปรตีนหายาสูงสุด และ *E.coli* DH5 α ที่มี PCC7418_1478/pColdI มีความเข้มข้นของโปรตีนหายาต่ำสุด แต่อย่างไรก็ตาม วิธีแบรดฟอร์ดก็ไม่สามารถยืนยันได้ถึงการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน จึงต้องนำโปรตีนหายาที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ วิธีเวสเทิร์น บลอตทิง

4.6.1 การวิเคราะห์โปรตีนโดยโซเดียม ซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

นำส่วนน้ำใสของโปรตีนหายาที่ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนปริมาณสูงในภาวะอุณหภูมิต่ำ (Cold-shock induction) ทั้งในเซลล์ควบคุม (*E.coli* DH5 α) และเซลล์แสดงออก (*E.coli* BL21) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่า โปรตีนจากทรานสเฟอร์แมนท์ที่มียีนกำหนดรหัส GST (PCC7418_1478) ไม่มีแถบโปรตีนขนาดประมาณ 21 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดมวลโมเลกุลของ GST จากยีน PCC7418_1478 ซึ่งคาดว่า GST จากยีน PCC7418_1478 ไม่เกิดการแสดงออกภายใต้สภาวะที่ทดลอง



ภาพที่ 4.6.1 วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GST จากยีน PCC7418_1478 ภายใต้ภาวะการเหนี่ยวนำจากอุณหภูมิต่ำ โดยวิธี SDS-PAGE (10% Separating gel และ 5% Stacking gel) โดยความเข้มข้นของโปรตีนได้แก่ 20 ไมโครกรัม (A₁-D₁), 40 ไมโครกรัม (A₂-D₂) และ 60 ไมโครกรัม (A₃-D₃) กำหนดความต่างกระแสไฟฟ้ามี ค่าคงที่เท่ากับ 75 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำเจลมาย้อมด้วย 1 % CBB (Coomassie brilliant blue) เป็นเวลา 20 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วย สารล้างสี (Destaining solution) ข้ามคืน M: โปรตีนมาร์กเกอร์ Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories, USA)

A: ทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีน PCC7418_1478 ใน *E.coli* DH5 α

B: ทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีน PCC7418_1478 ใน *E.coli* BL21

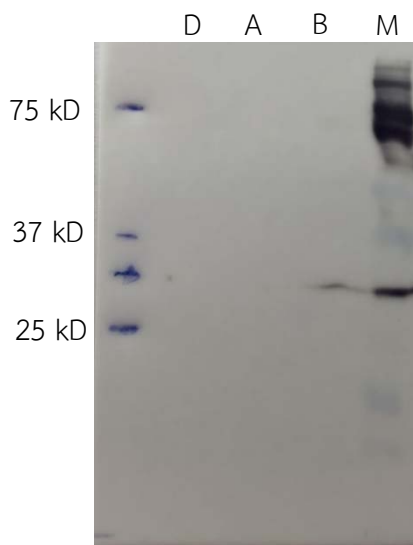
C: ทรานสฟอร์มแมนท์ที่ไม่มียีน PCC7418_1478 ใน *E.coli* DH5 α

D: ทรานสฟอร์มแมนท์ที่ไม่มียีน PCC7418_1478 ใน *E.coli* BL21

4.6.2 การวิเคราะห์โปรตีนเป้าหมายด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอตติง

นำส่วนน้ำใสของโปรตีนหยาบได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนปริมาณสูงในภาวะอุณหภูมิต่ำ (Cold-shock induction) ทั้งในเซลล์ควบคุม (*E.coli* DH5 α) และเซลล์แสดงออก (*E.coli* BL21) นำมาตรวจจับสัญญาณการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอตติง โดยนำโปรตีนไปบลอตกับ แอนติบอดีปฐมภูมิ (Antibody raised against 6-histidine, R&D system, USA) และแอนติบอดีทุติยภูมิ (Antibody raised against mouse-IgG HRP conjugated)

(New England Biolabs, USA) จากนั้นตรวจสอบผลโดยแผ่นเมมเบรนลงในสารละลายที่จำเพาะต่อเอนไซม์ฮอสมเรดิชเปอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase) โดยใช้ชุดคิท Horseradish Peroxidase Conjugate Substrate (Bio-Rad Laboratories, USA) ซึ่งจะเกิดการพัฒนาของสีพบว่า ไม่มีสัญญาณของโปรตีนเป้าหมายที่ติดฉลากด้วย 6X ฮิสทีดีน ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่า GST จาก ยีน PCC7418_1478 ไม่เกิดการแสดงออก ภาพที่ 4.6.2



ภาพที่ 4.6.2 ผลจากการทำเวสเทิร์น บลอตติง โดยความเข้มข้นของโปรตีนคือ 20 ไมโครกรัม

M: โปรตีนมาร์กเกอร์ Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories, USA)

A: ทรานสเฟอร์แมนที่มียีน PCC7418_1478 ใน *E.coli* DH5 α

B: ทรานสเฟอร์แมนที่มียีน PCC7418_1478 ใน *E.coli* BL21

D: ทรานสเฟอร์แมนที่ไม่มียีน PCC7418_1478 ใน *E.coli* BL21

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของยีนกำหนดรหัส GST ทั้ง PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 พบว่าทั้ง 2 ยีนอยู่ในซูเปอร์แฟมิลีเดียวกันคือ Gsta โดย GST จากยีน PCC7418_1478 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุดที่ระดับกรดอะมิโนที่ 64.86 % เมื่อเทียบกับ glutathione S-transferase family protein ของ *Pleurocapsa* sp. PCC7319 และ มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ glutathione S-transferase ของ *Cyanobacteria* bacterium SW_9_44_58 ส่วน GST จากยีน PCC7418_0729 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ระดับกรดอะมิโนที่สูงถึง 77.44 % เมื่อเทียบกับ glutathione S-transferase family protein ของ *Dactylococcopsis salina* และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ glutathione S-transferase family protein ของ *D.salina* แต่เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 ไปจัดเรียงเทียบกับ ยีน GSTA1 ซึ่งอยู่ใน Gsta ซูเปอร์แฟมิลีเหมือนกัน พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ระดับกรดอะมิโนที่ต่ำคือ 18.86% และ 17.31% ตามลำดับ อีกทั้งยังไม่มีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงอีกด้วย ดังนั้น GST ทั้ง 2 ยีน อาจจะไม่อยู่ในคลาส alpha ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Perperopoulou และคณะ ในปี 2017 เนื่องจาก GST คลาส alpha จะพบแต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม อีกทั้งถ้าจะจัดให้เอนไซม์ GST อยู่ในคลาสเดียวกันต้องมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ระดับกรดอะมิโนมากกว่า 40% อีกทั้ง GST ของ *Pleurocapsa* sp. PCC7319 และ *D.salina* ก็ยังไม่ทราบคลาส ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงลักษณะเชิงโครงสร้าง และลักษณะเชิงคุณสมบัติของ GST จากยีน PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 เพื่อจะได้จัดจำแนกคลาสต่อไป

จากการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจาก *Halothece* sp. PCC7418 แล้วตรวจสอบคุณภาพและขนาด ด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่ค่อนข้างสมบูรณ์ (Intact) ซึ่งมีขนาดมากกว่า 10,000 คู่เบส จึงคาดว่าเป็น จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ เลยนำไปวัดความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป 2000 จะเห็นได้ว่ามีความเข้มข้นมากกว่า 30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนค่า A_{260}/A_{280} ที่บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ในแง่ของการปนเปื้อนโปรตีน (Morin และคณะ, 2010) มีค่ามากกว่า 1.8 ซึ่งแสดงได้ว่า จีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดออกมามีการปนเปื้อนด้วยโปรตีนต่ำ จึงมีความบริสุทธิ์สูง อีกทั้งเมื่อนำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการเพิ่มจำนวนยีนกำหนดรหัส GST ทั้ง PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) แล้วตรวจสอบคุณภาพและขนาดด้วยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 500 คู่เบส และ 1200 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นยีน PCC7418_1478 และ PCC7418_0729 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 10000 คู่เบส เป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Halothece* sp. PCC7418 และสามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) ได้

ในการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย ในงานวิจัยได้เลือกเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายคือ pColdI ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ใช้ระบบ Cold shock ในการที่จะเหนี่ยวนำให้ยีนเป้าหมาย

เกิดการแสดงออก ซึ่งในระบบของ pColdI เป็นที่น่าสนใจ เพราะทำให้โปรตีนสามารถเกิดการแสดงออกได้ที่อุณหภูมิต่ำ ในที่นี้คือ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งการแสดงออกที่อุณหภูมิต่ำนี้ จะทำให้โปรตีนเป้าหมายไม่โดนย่อยสลายจากเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆได้ จึงเป็นระบบที่สามารถทำให้โปรตีนเป้าหมายโดยไม่เกิดการสูญเสีย อีกทั้งระบบของเวกเตอร์ pColdI ยังสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกและสมบัติการละลายน้ำให้กับโปรตีนเป้าหมายได้อีกด้วย

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าทรานสเฟอร์แมนที่มียีน PCC7418_1478 ไม่เกิดแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 21 กิโลดาลตัน (มวลโมเลกุลของ GST จากยีน PCC7418_1478) ซึ่งพบทั้งใน *E.coli* BL21 และ *E.coli* DH5 α ดังนั้นเพื่อการยืนยันถึงการแสดงออกของ GST จากยีน PCC7418_1478 ให้แน่ชัด จึงวิเคราะห์การแสดงออกของ GST เป้าหมายด้วยวิธีเวสต์เทิร์นบลอตติง โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิที่จำเพาะกับ 6X ฮิสทีดิน ซึ่งติดฉลากอยู่บนโปรตีนเป้าหมาย (Antibody raised against 6-histidine) แต่ปรากฏว่าไม่พบสัญญาณของโปรตีน GST เป้าหมายที่ติดฉลากด้วย 6X ฮิสทีดิน จึงสามารถยืนยันได้ว่า GST จากยีน PCC7418_1478 ไม่แสดงออกภายใต้ภาวะที่ทดลอง ซึ่งอาจจะเกิดจากหลายสาเหตุ

1. ความเข้มข้นของ IPTG ที่เติมลงไป อาจไม่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการแสดงออกของ GST
2. เวลา และ อุณหภูมิในการบ่มเพาะเลี้ยงเซลล์แสดงออก อาจไม่เพียงพอ
3. ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมายไม่เพียงพอ

ดังนั้น แนวทางแก้ไขปัญหาล่าช้านี้ต้องหาคความเข้มข้นของ IPTG ใหม่ ที่เหมาะสมที่ เหมาะสมกับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST ใน *Halothece* sp. PCC7418 ซึ่งควรอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 1 มิลลิโมลาร์ อีกทั้งควรเปลี่ยนระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก รวมถึงอุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเพาะเชื้อแสดงออก เพื่อให้ยีนได้เกิดการแสดงออก เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. Ali, I., Prasongsuk, S., Akbar, A. (2016). Hypersaline habitats and halophilic microorganisms. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 10(03), 330-345.
2. Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., Ilio C. D. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal*, 276, 58–75.
3. Bryant, D. A. (2003). The beauty in small things revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9647–9649.
4. Baptista, M. S., & Vasconcelos, M. T. (2006). Cyanobacteria Metal Interactions: Requirements, Toxicity, and Ecological Implications. *Critical Reviews in Microbiology*, 32:3, 127-137.
5. Castenholz, R. W. (1988). Thermophilic Cyanobacteria: Special Problems. *Methods in enzymology*, 167.
6. Chorus, I., and Bartram, J. (1999). A guide to their public health consequences, monitoring and management. *Toxic cyanobacteria in water*.
7. Divya, T. V., Chandwadkar, P., Acharya, C., (2018). NmtA, a novel metallothionein of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 imparts protection against cadmium stress but not oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 199, 152-161.
8. Douglas, S.E. (1994). Chloroplast origins and evolution. In: D.A. Bryant [Ed.] *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 91-118.
9. Durai, P., Batool, M., and Choi, S. (2015). Structure and Effects of Cyanobacterial Lipopolysaccharides. *Marine drugs*, 13, 4217-4230.
10. Green, B. R., and Durnford, D. G. (1996). THE CHLOROPHYLL-CAROTENOID PROTEINS OF OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:685–714.
11. Hoiczyk, E., and Hansel, A. (2000). Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 1191–1199.
12. Hossain, M. S., and Dietz, K-J. (2016). Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Front. Plant Sci*, 7:548.
13. Ito, R., Tomich, A. D., McElheny, C. L. *et al.* (2017). Inhibition of Fosfomycin Resistance Protein FosA by Phosphonoformate (Foscarnet) in Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61.

14. Jacob, J. H., Hussein, E. I., Shakhathreh, M., & Cornelison, C. T. (2017). Microbial Community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing. *Microbiology Open*, 6(5).
15. Karl, D., Michaels, A., Bergman, B., *et al.* (2002). Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry*, 87(88), 47–98.
16. Kalita, J., Shukla, R., Shukla, H., Gadhave, K., Giri, R., & Tripathi, T. (2017). Comprehensive analysis of the catalytic and structural properties of a mu-class glutathione S-transferase from *Fasciola gigantica*. *Scientific Reports*, 7: 17547.
17. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
18. Latifi, A., Ruiz, M., & Zhang, C.C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 33, 258–278.
19. Morel, F., & Aninat, C. (2011). The glutathione transferase kappa family. *Drug Metabolism Reviews*, 43:2, 281-291.
20. Morin, N., Vallaey, T., Hendrickx, L., Natalie, L. and Wilmotte, A. (2010). An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. *J Microbiol Meth*, 80, 148-154.
20. Nguyen, M. A., Hoang, A. L. (2016). A review on microalgae and cyanobacteria in biofuel production. *Economies and finances*.
21. Paerl, H. W., Pinckney, J. L., and Steppe T. F. (2000). Cyanobacterial±bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environmental Microbiology*, 2(1), 11-26.
22. Pandey, T., Singh, S. K., Chhetri, G., Tripathi, T., Singh, A. K. (2015a). Characterization of A Highly pH Stable Chi-Class Glutathione S-Transferase from *Synechocystis* PCC 6803. *PLoS ONE*, 10(5).
23. Pandey, T., Chhetri, G., Chinta, R., Kumar, B., Singh, D. B., Tripathi, T., & Singh, A. K. (2015b). Functional classification and biochemical characterization of a novel rho class glutathione S-transferase in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS open bio*, 5, 1–7.

24. Perperopoulou, F., Pouliou, F., & Labrou, N. E. (2017). Recent advances in protein engineering and biotechnological applications of glutathione transferases. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38:4, 511-528.
25. Rastogi, R. P., and Madamwar, D. (2015). UV-Induced Oxidative Stress in Cyanobacteria: How Life is able to Survive? *Biochem Anal Biochem*, 4:2.
26. Sainia, D. K., Pabbib, S., Shukla, P. (2018). Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 616–624.
27. Shehu, D., Abdullahi, N., Alias, Z. (2019). Cytosolic Glutathione S-transferase in Bacteria: A Review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 28(2), 515-528.
28. Tanaka, R., and Tanaka, A. (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 968–976.
29. Timmons, T.M., Dunbar B.S. (1990). Protein blotting and immunodetection. *Method in Enzymology*, 182, 679-688.
30. Tiwari, B., Verma, E., Chakraborty, S., Srivastava, A. K., Mishra, A. K. (2018). Tolerance strategies in cyanobacterium *Fischerella* sp. under pesticide stress and possible role of a carbohydrate-binding protein in the metabolism of methyl parathion (MP). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 127, 217–226.
31. Tiwari, S., Parihar, P., Patel, A., Singh, R., Prasad, S. M. (2019). Metals in Cyanobacteria: Physiological and Molecular Regulation. *Cyanobacteria From Basic Science to Applications*, 261-276.
32. Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijsk, H. C. P., Ohno, T., & Tanaka, A. (1999). Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature*, 400.
33. Vincent, W.F. (2009). Cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Inland Waters* (ed. Likens, G.E.). Elsevier Inc., Oxford, pp. 226–232.
34. Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Sopun, W., Tanaka, Y., Takabe, T. (2014). Identification and up-regulation 1 of biosynthetic genes required for accumulation of Mycosporine-2-glycine under salt stress in halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Appl. Environ. Microbiol*, 80(5), 1763-1769.

35. Zehr, J. P. (2011). Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends in Microbiology*, 19(4), 162–173.
36. Zhang, J., Ye, Z. W., Singh, S., Townsend, D. M., and Tew, K. D. (2018). An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 120: 204-216.

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 + สารละลาย Turk ปริมาตร 1 ลิตร สำหรับเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418
ภายใต้ภาวะปกติ (0.5 โมลาร์ NaCl)

สารละลาย BG11

NaNO ₃	1.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.04	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.02	กรัม
EDTA·2Na	0.01	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม

สารละลายแร่ธาตุ

H ₃ BO ₃	2.83	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22	กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39	กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	กรัม
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049	กรัม

สารละลาย Turk

NaCl	28.17	กรัม
KCl	0.67	กรัม

MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.92	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.50	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.47	กรัม

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ low-salt Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 1 ลิตร

สำหรับเลี้ยง *E.coli* DH5 α และ *E.coli* BL21

NaCl	5	กรัม
Bacto Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน หากต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เติมผงอะกาโรส 12 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อภายในตู้อบฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ้าต้องการใส่ยาปฏิชีวนะ ต้องใส่ขณะที่อาหารมีอุณหภูมิอุ่น ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะคือ 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ภาคผนวก ข.

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST ใน *Halotheca* sp. PCC7418

แถบสีเหลือง หมายถึงบริเวณที่ไพรเมอร์เข้ามาจับ

1. PCC7418_1478 (561 นิวคลีโอไทด์)

ATGAAACTTTATTA TCTTCCGTTAACCCGAGCCAGTCGCCCTCATTGGCTATTAGAAGAACTGGAAATTT
 CCTATGAATTAATTCAAGTGACCCCTGATGAAATGTCGGAGAAACCAGAATATAAAGGACTCCATCCTCA
 TGGTAAGATTCCAGTTTTAGTTGATGATAATATCACAATTCATGAATCTGCTGGAATTTGTGCTTATTTAG
 CCGATCAATATCCTGATAAACTTGTCCCTCTCTTATGAGTCCCGCAAGAGGCTATTATTATCAATG
 GTTGTTTTATGCTGCGGTGACGTTAGAACCTCCTGTGGAACGATATCTTTTTCATGTTTTCCCTCATTG
 TCAGAGAAAGTATTACCTGATAGTGAATATGAAAACCTTTCTAAGGACGAAACATTACACTGGTTTGGAA
 AAGTCTGTCAACCCCTCAATGACCACTTAAAAGAGAATCAATATCTCGTTGAAAATCAATTTACGGCTGC
 TGATGTTATTACAGGTGGTGTGTTTTGTTTTGGGCGTTCAAATAGGATTACTAAAAAAGAAACCCCGTGA

2. PCC7418_0729 (1200 นิวคลีโอไทด์)

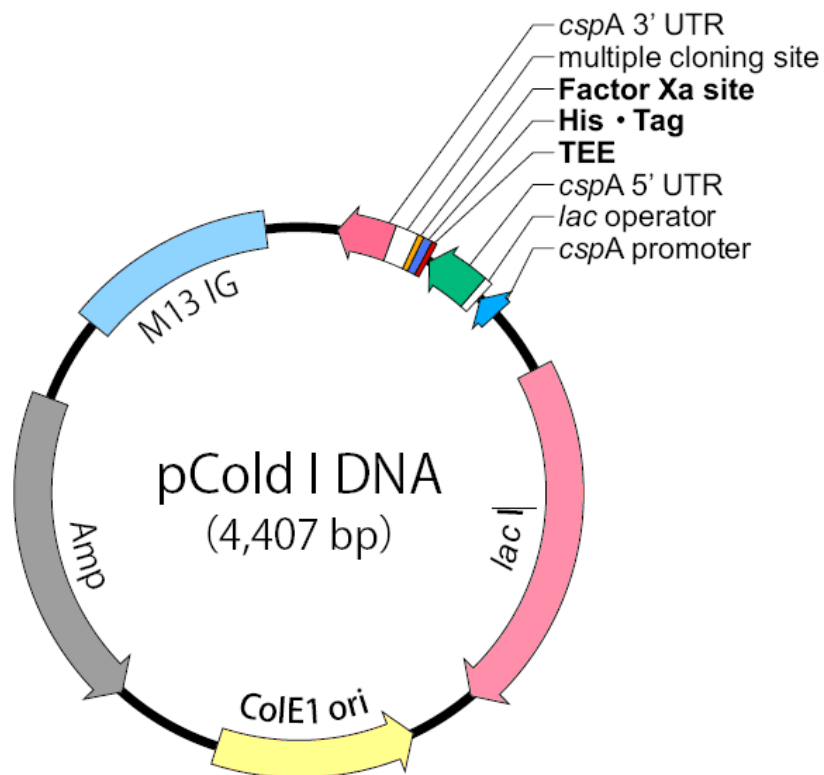
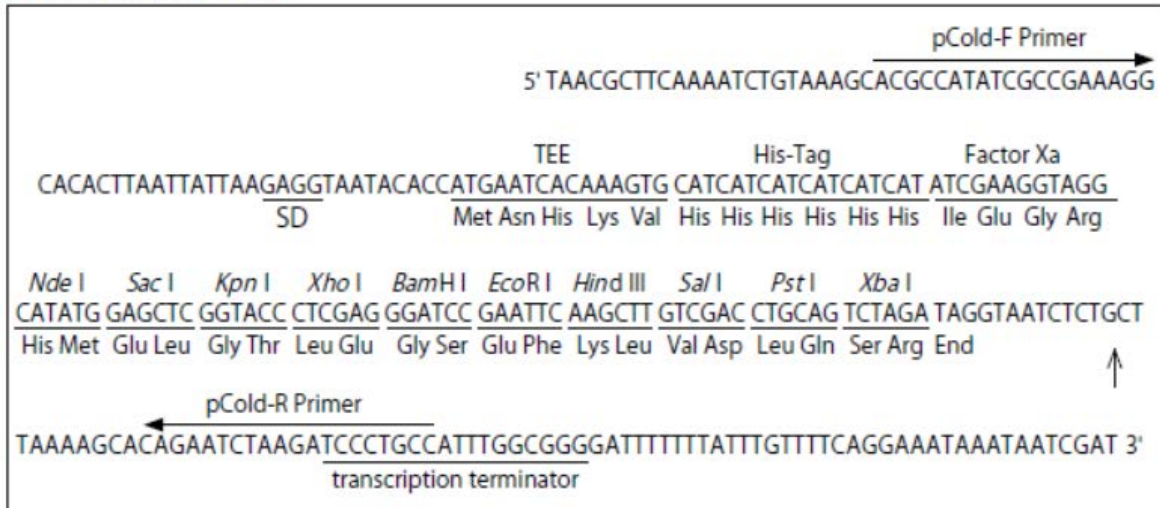
ATGCAGGCACTGAG TTGGGAAGAATTAGAAAACCGTACAAATTTTGAATTGATCGCGTTAATGGACCGA
 CGAATGCACAATCTCGTTTACGCTTATTTGGGCGCGATGAATCGGAGGTTGAGTGACGTTATACCGTGA
 CCATCATGCTTGGTGTCCCTATTGTCAGAAAGTTTGGTTATGGTTAGAAGAAAACAAGTTCCTATCGT
 GTGGAAAAAGTCACGATGTTTTGCTATGGGGATAAAGAGCGTTGGTATAAGCAGATTGTTCTTCAGGGA
 TGTTACCTGCGTTAAACTCGATGATCGTTTGCTTACTGAAAGTGATGATATTTTAAGCCAACTTGAGCA
 AACCTTCGGAACGCTGGGTTATAGTATGAACGATCGCGCCAGTATTGCCCTACGGAAGTTAGAACGACT
 GTTATTTTCGGGCGTGGTGTAGTTGGTTATGTGTTCTGCGCGATCGCGCCGTGAAGACCAGTATAACCG
 CCAACAGTTTACGGATGTGGTCTCCCAAGTTGAGGACGCGCTACAACAAACCCCGGGTCTTATTTCCGA
 GACAGCTTTAGCATTATTGATCTTATCTTTACCCCGTTTCTGGAACGGATGAACGCCAGTTTATTCTATT
 ACAAAGGGTACTCCCTACGAGAAGAAAACCTCAACTGGGCTTATGGTTTGTGATGGGATGGAACAGCGAT
 CCACCTATCGCGGAACGCAAAGTGATTTTCATACCCACGTTTCATGATTTACCCCCACAGATGGGCGGTTG
 CTATGCTAACGATGAACCGCAAACAAAACCTGAATCAAGCACGGGTGGATCAGGGACCTTGGCTAGGTTT
 ACCTGATGTGATGTATCCTGAACCCGAAACCTCGCGAGAAGAAGCCTTACAACGGGTTTTAAAGCATCGA
 GAGAACTTGTTAAACGTGAATCCAGCCTCAGAAGACTTATTTGAGGAAGCCTTGCCTGTGCGTTAACCA
 ATTTGATTACTGGTGAAGTGTGTTCTCCCCCTGCTGGATCAGCATCTGCATTAAGATATTTGCGCGATCG
 CGTGAGTGTTCTAGAGATATGTGATTTATGCAGCCAAACGCTTACGAGAAGCCTTAGAAAACACCGCC

AGCTTAGCTGGAGACGAACAAGGAACACCGATTCCAGTTCGACATCGGCGCGATCAAGATCCCGCGAAT
TTTGCAAAAGTTTGA

ภาคผนวก ค.

แผนผังแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pCold I™ DNA

pCold I DNA (Cat. #3361)



ภาคผนวก ง.

วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทำอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

1. สารละลายบัฟเฟอร์ 10X TAE (Tris-Acetate-EDTA)

Tris base	48.4	กรัม
EDTA	3.72	กรัม
กรดแอสซิติค	11.4	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทุกอย่างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ถ้าต้องการเจือจางให้ได้สารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น

2. 1.2% อะกาโรส เจล

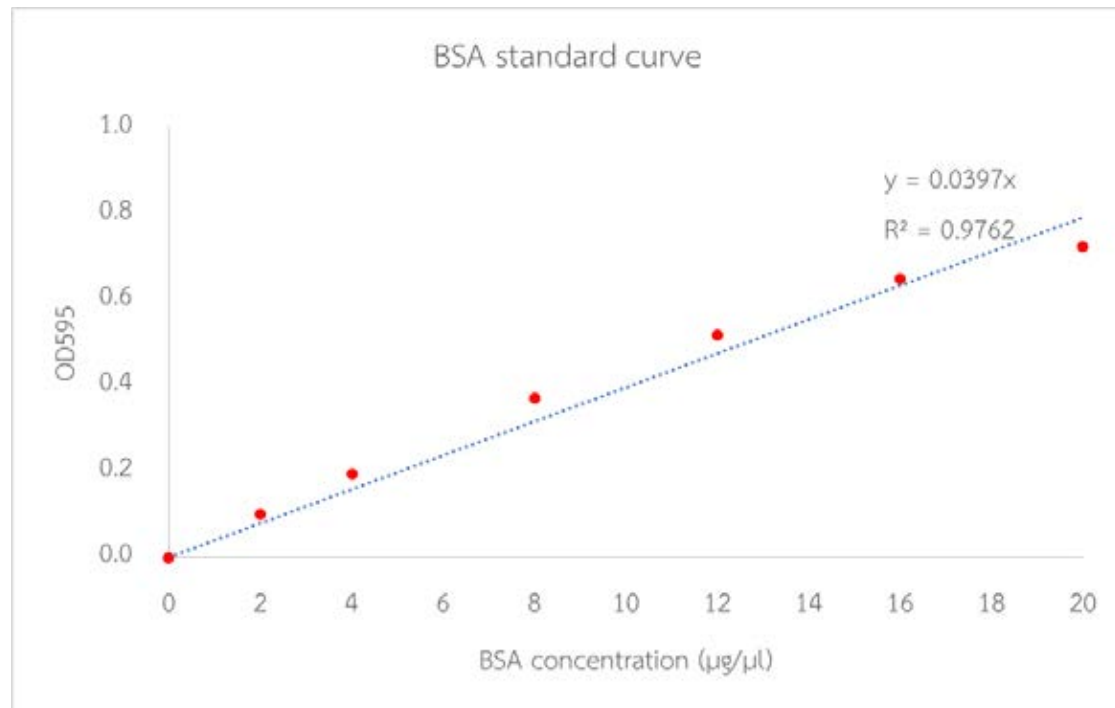
ผงวุ้นอะกาโรส	0.24	กรัม
สารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE	20	มิลลิลิตร

ละลายผงอะกาโรสด้วยความร้อนจนกระทั่งละลายหมด รอให้สารละลายเย็นตัวลงแล้วเติม SYBR® safe DNA gel stain ปริมาตร 4 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก จ.

กราฟมาตรฐานโปรตีน

สำหรับวัดความเข้มข้นของโปรตีนในวิธี แบริดฟอร์ด



ภาคผนวก ฉ.

วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทำโซเดียมซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (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. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) 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. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) 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

4. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.0

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.21	กรัม
---------------------------------	------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 %

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	15	กรัม
----------------------------	----	------

น้ำกลั่นปลอดประจุ	150	มิลลิลิตร
-------------------	-----	-----------

6. สารละลายเซพาราติงเจล (Separating gel) ความเข้มข้น 10%

น้ำกลั่นปลอดประจุ	7.12	มิลลิลิตร
-------------------	------	-----------

สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8	4.5	มิลลิลิตร
---	-----	-----------

10% SDS	180	ไมโครลิตร
---------	-----	-----------

30% อะคริลาไมด์	6	มิลลิลิตร
TEMED	15	ไมโครลิตร
APS (Ammonium persulphate)	50	ไมโครลิตร
7. สารละลายสแต็กกิงเจล (Stacking gel) ความเข้มข้น 5%		
น้ำกลั่นปลอดประจุ	2.8	มิลลิลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8	1.25	มิลลิลิตร
10% SDS	50	ไมโครลิตร
30% อะคริลาไมด์	0.83	มิลลิลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
APS (Ammonium persulphate)	50	ไมโครลิตร
8. สารละลายบัฟเฟอร์โปรตีนตัวอย่าง 4X (4X protein loading buffer)		
สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 6.8	0.6	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	0.5	มิลลิลิตร
10% SDS	2	มิลลิลิตร
1% บรอมฟินอลบลู	1	มิลลิลิตร
50% กลีเซอรอล	5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	0.9	มิลลิลิตร
9. สารละลายรันนิ่งบัฟเฟอร์ 10X (10X Running buffer)		
Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	30.2	กรัม
ไกลซีน	144	กรัม
โซเดียมลอริลซัลเฟต (Sodium lauryl sulfate)	10	กรัม
ผสมสารแต่ละชนิดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำสารละลายไปใช้ ต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ		

10. สีย้อมคูแมซีบลู (Coomassie brilliant blue staining solution)

สีคูแมซีบลูบริลเลียนท์บลูจี-250	1	กรัม
50% เมทานอล	500	มิลลิลิตร
10% กรดแอสีติกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	400	มิลลิลิตร

11. สารละลายสำหรับล้างสี (Destaining solution)

เมทานอล	200	มิลลิลิตร
กรดแอสีติก	70	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	730	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข.

วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทำเวสเทิร์น บลอททิง

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 1X (Phosphate buffer saline: PBS) pH 7.4

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl หรือ NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. สารละลาย 0.1% Tween 20 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 1X

Tween 20	1	มิลลิลิตร
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 1X	1	ลิตร

3. Blocking solution

ผง Skim milk	5	กรัม
สารละลาย 0.1% Tween 20 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 1X	100	มิลลิลิตร

4. สารละลายบัฟเฟอร์เวสเทิร์นบลอททิง

Tris base	3	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
เมธานอล	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	800	มิลลิลิตร

หัวข้อโครงการ

การโคลนและการแสดงออกของยีนที่กำหนดรหัส Glutathione S-transferase จากเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ *Halotheca* sp. PCC7418

โดย

นายยศกร สมัญ รหัสบัณฑิต 5832343723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรัทธา

ปีการศึกษา

2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์



หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ



อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรัทธา)



กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี)



กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัสวลาภสกุล)



กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร)