การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

Production of recombinant protein Cyclophilin A using molasses as a carbon source

กวินทิพย์มณี อินทร์แป้น

ขวัญจิรา เรียงผา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of recombinant protein Cyclophilin A using molasses as a carbon source

Kawinthipmanee Inpaen

Khwanjira Raingpha

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (Biotechnology)

DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน Production of recombinant protein Cyclophilin A using molasses as a carbon source
ชื่อนักศึกษา	นางสาว กวินทิพย์มณี อินทร์แป้น รหัสนักศึกษา 62050471 นางสาว ขวัญจิรา เรียงผา รหัสนักศึกษา 62050474
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. นิลเนตร อัศวะศิริจินดา ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการ	
ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อ การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ชื่อนักศึกษา นางสาว กวินทิพย์มณี อินทร์แป้น รหัสนักศึกษา 62050471

นางสาว ขวัญจิรา เรียงผา รหัสนักศึกษา 62050474

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

กากน้ำตาลเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลจากอ้อย ซึ่งในกากน้ำตาลมีองค์ประกอบของน้ำตาลรวมประมาณ 50% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นซูโครสประมาณ 13% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และที่เหลือเป็นสารอาหารอื่นๆ ซึ่งเหมาะแก่การนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการนำกากน้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาต่ำมาแทนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีราคาแพง เพื่อลดต้นทุนในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วย *Escherichia coli* โดยการใช้ LB เป็นชุดควบคุมและอาหารจากกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับ คือ 0.75%, 1.5%, 3% พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ของ LB ที่ใช้เป็นชุดควบคุมกับกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1.5% มีการผลิตโปรตีน เท่ากับ 1.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเลือกกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นข้น 1.5% เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมลงไปปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร, 6 กรัมต่อลิตร, 12 กรัมต่อลิตร พบว่ากากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1.5% ที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัมต่อลิตร มีการผลิตโปรตีนได้ดีที่สุดเท่ากับ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : รีคอมบิแนนท์โปรตีน, กากน้ำตาล, แอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Production of recombinant protein Cyclophilin A using molasses as a carbon source

Students Miss Kawinthipmanee Inpaen Student ID 62050471

Miss Khwanjira Raingpha Student ID 62050474

Degree Bachelor of Science (Program in Biotechnology)

Department Biology

School Science

University King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)

Academic Year 2022

Advisor Asst.Prof.Dr.Tripachai Vatanavicharn

Abstract

Molasses is a by-product of the sugar cane industry in which molasses comprises about 50% (w/v) of total sugars, about 13%. Which is suitable for use in microbial culture. In this project, molasses as a low-cost carbon source was used to replace the expensive LB medium to reduce the cost of recombinant protein production. Cyclophilin A proteins were cultured with *Escherichia coli* using LB as control and molasses medium with three concentrations: 0.75%, 1.5%, 3%. The recombinant protein cyclophilin A of LB used as a control with molasses concentration 1.5% produced protein equal to 1.7 mg/ml. After that, molasses was selected at a concentration of 1.5%, adding ammonium sulfate as a source of nitrogen as an additional in the amount of 3 g/l, 6 g/l, 12 g/l. It was found that molasses at 1.5% concentration with 6 g/l of ammonium sulfate added had the best protein production of 1.2 mg/ml.

Keywords : Recombinant protein, molasses, ammonium sulfate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือ ความดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี คำแนะนำ คำปรึกษา และแนวคิดในการจัดทำงานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความกรุณาในการเป็นที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบโครงงาน

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบโครงงาน

ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ทุกๆ คน ที่คอยให้คำแนะนำ ปรึกษา ช่วยเหลือ และให้กำลังใจเพื่อปรับปรุงให้การทำงานในครั้งนี้มีความสมบูรณ์ จนสำเร็จเป็นชิ้นงานออกมา

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ตลอดจนสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

ท้ายสุดผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่สนับสนุนด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจตลอดมา และครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาทความรู้ทั้งปวงแก่ผู้วิจัย

กวินทิพย์มณี อินทร์แป้น
ขวัญจิรา เรียงผา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 2
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 Recombinant protein 3
2.1.1 *Escherichia coli* 3
2.1.2 *Escherichia coli* BL21(DE3) หรือ *E. coli* BL21(DE3) 5
2.2 Cyclophilins 6
2.3 กากน้ำตาล 6
2.3.1 ที่มาของกากน้ำตาล 7
2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Medium (LB Medium) 9
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 11
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 11
3.1.1 สารเคมีและเชื้อแบคทีเรียสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน 11
3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน 11
3.1.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับ SDS-PAGE 12
3.1.4 สารเคมีสำหรับ SDS-PAGE 12
3.1.5 อุปกรณ์ Sonication 12
3.1.6 อุปกรณ์ของ Bradford protein assay 12
3.1.7 สารเคมีสำหรับทำ Bradford protein assay 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ที่มีแหล่งคาร์บอน 13
3.2.1 การปรับสภาพกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ 13
3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ 13
3.2.3 การหากราฟมาตรฐานช่วงเวลาการเติบโตของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 13
3.2.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในระบบ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) 15
3.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ที่มีแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน 17
3.3.1 การปรับสภาพกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ 17
3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ 17
3.3.3 การหากราฟมาตรฐานช่วงเวลาการเติบโตของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 17
3.3.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในระบบ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) 18
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 21
4.1 การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Colony Forming Unit : CFU) คาร์บอน 21
4.2 ผลการตรวจสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยวิธี Bradford protein assay 22
4.3 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนของ รีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วยวิธี SDS-PAGE 23
4.4 การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Colony Forming Unit : CFU) ไนโตรเจน 25
4.5 ผลการตรวจสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยวิธี Bradford protein assay 26
4.6 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนของ รีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วยวิธี SDS-PAGE ไนโตรเจน 27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 30
5.1 สรุปผลการวิจัย 30
5.2 ข้อเสนอแนะ 30
เอกสารอ้างอิง 32

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก..... 33
ภาคผนวก ก..... 34
ภาคผนวก ข..... 44
ภาคผนวก ค..... 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Medium 1 ลิตร..... 9
ตารางที่ 3.1 ปริมาตรและสารละลายที่ใช้ในการเตรียมชุด Separating gel 12% gel โดยเตรียม 20 มิลลิลิตร..... 16
ตารางที่ 3.2 ปริมาตรและสารละลายที่ใช้ในการเตรียมชุด Stacking gel โดยเตรียม 6 มิลลิลิตร. 16
ตารางที่ 3.3 ปริมาตรและสารละลายที่ใช้ในการเตรียมชุด Separating gel 12% gel โดยเตรียม 20 มิลลิลิตร..... 19
ตารางที่ 3.4 ปริมาตรและสารละลายที่ใช้ในการเตรียมชุด Stacking gel โดยเตรียม 6 มิลลิลิตร. 20
ตารางที่ ก.1 การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อไซโคลฟิลิน เอในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอนแบบไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต..... 34
ตารางที่ ก.2 แสดงค่ามาตรฐานโปรตีนที่ได้จากการวัดเครื่องไมโครเพลทลีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร..... 37
ตารางที่ ก.3 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร..... 38
ตารางที่ ก.4 แสดงค่ามาตรฐานโปรตีนที่ได้จากการวัดเครื่องไมโครเพลทลีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร..... 39
ตารางที่ ก.5 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร..... 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 2.1 รูปร่าง *Escherichia coli*..... 1
รูปที่ 2.2 โครงสร้างผลึกของไซโคลฟิลิน เอ ของมนุษย์ซับซ้อนซึ่งมีเปปไทด์เป็นสารตั้งต้น 2
รูปที่ 2.3 กากน้ำตาลจากอุตสาหกรรม..... 2
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ 0 – 32 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าจำนวนโคโลนี log CFU/ml. 21
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ 0 – 10 ชั่วโมง กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ 0 – 32 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าจำนวนโคโลนี log CFU/ml..... 21
รูปที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ 22
รูปที่ 4.4 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ชั่วโมงที่ 0 (a,b) , ชั่วโมงที่ 1 (c,d) , ชั่วโมงที่ 2 (e,f) , ชั่วโมงที่ 3 (g,h) ตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โดยใช้ความเข้มข้นของ Acrylamide 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 23
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ 0 – 32 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าจำนวนโคโลนี log CFU/ml..... 25
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ 0 – 10 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าจำนวนโคโลนี log CFU/ml..... 25
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต.... 26
รูปที่ 4.8 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ชั่วโมงที่ 0 (a,b) , ชั่วโมงที่ 1 (c,d) , ชั่วโมงที่ 2 (e,f) , ชั่วโมงที่ 3 (g,h) ตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โดยใช้ความเข้มข้นของ Acrylamide 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250..... 27
รูปที่ ก.1 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 1 (a) , ชั่วโมงที่ 2 และ ชั่วโมงที่ 3 (b) ตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โดยใช้ความเข้มข้นของ Acrylamide 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250..... 35
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานโปรตีนที่แสดงค่ามาตรฐาน (mg/ml) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ก.3 กราฟแสดงอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆกับความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) 37
รูปที่ ก.4 กราฟกราฟมาตรฐานโปรตีนที่แสดงค่ามาตรฐาน (mg/ml) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร..... 39
รูปที่ ก.5 กราฟแสดงอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆกับความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) 40
รูปที่ ข.1 แผนภาพเวกเตอร์..... 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
LB	อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani
IPTG	Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside
AMP	Ampicillin
BSA	Bovine Serum Albumin
CypA	Cyclophilin A
TEMED	Tetramethyl ethylenediamine
PBS	Phosphate buffer saline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โปรตีนเป็นชีวโมเลกุลสำคัญที่นักวิจัยได้ให้ความสำคัญในการศึกษาค้นคว้ากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีความสลับซับซ้อนทั้งในด้านโครงสร้างและกลไกการทำงาน โดยโปรตีนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรม รวมถึงการนำไปสู่การพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่างๆ (Dana, 2010) ปัจจุบันจึงมีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ที่เป็นรูปแบบของโปรตีนถูกควบคุม สร้างขึ้นในรูปแบบต่างๆ เพื่อผลิตโปรตีนให้มีปริมาณมาก และนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ที่มีประโยชน์ ซึ่งการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรียจะมีการถ่ายโอนเวกเตอร์แทรกในชิ้นส่วน DNA เป้าหมายไปยังเซลล์เจ้าบ้านเพื่อกระตุ้นการผลิตโปรตีน วิธีนี้เป็นวิธีที่น่าสนใจและมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรีย นิยมใช้เชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ชัดเจน การผสมอย่างรวดเร็ว ต้นทุนต่ำ การแสดงออกสูง ทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ได้ง่าย และความสามารถในการป้องกันมลพิษที่แข็งแกร่ง(Creative BioMart, 2017) อาหารที่นิยมใช้ในการเลี้ยงเชื้อคืออาหาร LB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตของ *E.coli* และอื่น ๆ นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในงานรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ และขั้นตอนทางอณูชีววิทยาอื่นๆ ในอาหาร LB มีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน และแร่ธาตุ ที่ใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยในการศึกษาจะใช้กากน้ำตาลที่เป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลที่มูลค่าต่ำมาเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งในกากน้ำตาลที่นำมาใช้มีองค์ประกอบของน้ำตาลรวมประมาณ 50% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นซูโครสประมาณ 13% (น้ำหนักต่อปริมาตร)(เขมวิทย์ จันต๊ะมา, 2565) นำมาเจือจางเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ในเซลล์ *E. coli* และมีการเติมแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนก็เป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตโปรตีน ซึ่งในกากน้ำตาลมีแหล่งไนโตรเจนน้อยจึงทำการเติมเข้าไปเพื่อให้สามารถผลิตโปรตีนได้มากขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากเชื้อ *E. coli* และทำการตรวจสอบคุณภาพโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และวิธี bradford protein assay ที่เป็นการเพิ่มผลผลิตจากการใช้กากน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อหาความเข้มข้นของกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอจากเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด PET22b-PmCyclophilin A

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 0.75%, 1.5%, 3% เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน
2. ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 3 g/L, 6 g/L, 12 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน
3. ตรวจสอบปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอที่ได้จากเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด PET22b-PmCyclophilin A

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอจาก *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด PET22b-PmCyclophilin A ได้
2. ทราบความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Recombinant protein

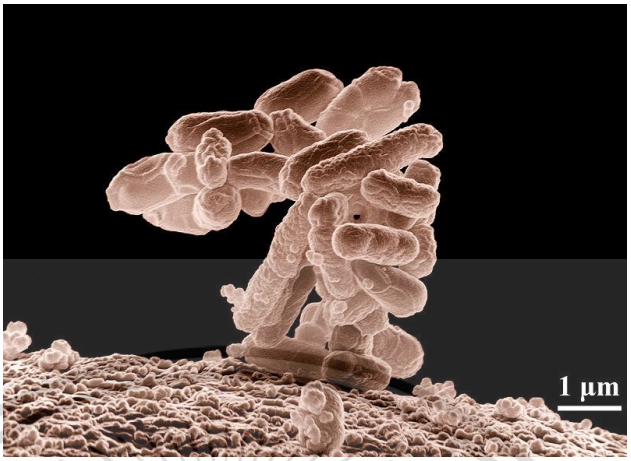
โปรตีนลูกผสม (recombinant protein) เป็นโปรตีนที่มีการดัดแปลงรหัสดีเอ็นเอโดยพื้นฐาน ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ประกอบด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอชนิดหนึ่งเชื่อมต่อกับโมเลกุลดีเอ็น เออีกชนิดหนึ่งที่แตกต่างแหล่งที่มาเข้าด้วยกันเพื่อต้องการโคลนยีนที่สนใจหรือสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปร พันธุกรรมให้มีลักษณะตามที่ต้องการ โดยแยกดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็น เอที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้มาเชื่อมต่อกับโมเลกุลดีเอ็นเอ ขนาดเล็กที่ทำหน้าที่เป็นตัวนำหรือเวกเตอร์ (vector) ซึ่งอาจใช้โครโมโซมของไวรัสหรือโครโมโซมของ แบคทีเรียที่เรียกว่า พลาสมิด (plasmid) จากนั้นรหัสดีเอ็นเอจะถูกแปล (translated) เป็นโปรตีนที่มีลักษณะใหม่ๆ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้วคือโมเลกุลดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ซึ่งหมายถึง โมเลกุลดีเอ็นเอที่เกิดจากการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกัน เช่น ดีเอ็นเอของคน เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โมเลกุลดีเอ็นเอลูกผสมจะถูกใส่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรียเพื่อให้ยีนได้มีการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย

2.1.1 *Escherichia coli*

แบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นสิ่งมีชีวิตที่เข้าใจได้ดีที่สุดอย่างไม่ต้องสงสัย การศึกษาทางพันธุกรรมและชีวเคมีอย่างกว้างขวางของ *E. coli* ในช่วงทศวรรษที่ 1960 และ 1970 เป็นรากฐานสำหรับเทคโนโลยีดีเอ็นเอลูกผสมสมัยใหม่ เนื่องจาก *E coli* นั้นง่ายต่อการจัดการในการทดลองและเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่อนข้างง่าย เป็นสิ่งมีชีวิตที่โฮสต์ที่ใช้กันมากที่สุดสำหรับการแสดงออกของยีนลูกผสม โคลนนิ่งเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับ *E. coli* โดยทั่วไปคือพลาสมิดโดยทั่วไปมีลักษณะดังต่อไปนี้

1. เครื่องหมายที่เลือกได้เพื่อให้แน่ใจว่ามีการบำรุงรักษาเวกเตอร์ในเซลล์
2. โปรโมเตอร์ transcnptional ที่ควบคุมได้ เช่น lac, trp เป็นต้นที่สามารถเหนี่ยวนำได้เพื่อสร้างทรานสคริปต์ mRNA จำนวนมากจากลำดับดีเอ็นเอโคลน
3. ลำดับการควบคุมเชิงการแปลที่เหมาะสมสำหรับการจับเอ็นโบโซมและการเริ่มต้นของการแปลและ
4. ไซต์โคลน Polylinker เพื่ออำนวยความสะดวกในการแทรกลำดับที่น่าสนใจลงในเวกเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 รูปร่าง *Escherichia coli*

ที่มา : (Agricultural Researt Service et al, 2563)

Escherichia coli ยังเป็นที่รู้จักกันในนาม *E. coli* คือแกรมลบแบบไม่ใช้ออกซิเจน รูปทรงแท่งโคลิฟอร์มแบคทีเรียในสกุล *Escherichia* ที่พบได้ทั่วไปในลำไส้เล็กของสิ่งมีชีวิตเลือดอุ่น เชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่ไม่เป็นอันตรายแต่ซีโรไทป์บางประเภท (EPEC , ETEC เป็นต้น) อาจทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ร้ายแรงในโฮสต์ และบางครั้งต้องรับผิดชอบต่อ เหตุการณ์การปนเปื้อนในอาหารที่กระตุ้นให้มีการเรียกคืนผลิตภัณฑ์ สายพันธุ์ที่ไม่เป็นอันตรายเป็นส่วนหนึ่งของจุลินทรีย์ในลำไส้ปกติ และสามารถเป็นประโยชน์ต่อโฮสต์ของพวกมันโดยการผลิตวิตามินเค และป้องกันการล่าอาณานิคมของลำไส้ด้วยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค มี ความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน *E. coli* ถูกขับออกสู่สิ่งแวดล้อมภายในอุจจาระ แบคทีเรียเติบโตอย่างหนาแน่นในอุจจาระสดภายใต้สภาวะแอโรบิกเป็นเวลาสามวัน แต่จำนวนแบคทีเรียจะลดลงอย่างช้าๆ ในภายหลัง

E. coli และจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจนอื่นๆ ประกอบด้วยจุลินทรีย์ในลำไส้ประมาณ 0.1% และการแพร่เชื้อทางปากและอุจจาระเป็นเส้นทางหลักที่แบคทีเรียก่อโรคทำให้เกิดโรค เซลล์สามารถอยู่รอดนอกร่างกายได้ในระยะเวลาที่จำกัด ซึ่งทำให้เซลล์เหล่านี้สามารถบ่งชี้สิ่งมีชีวิตในการทดสอบตัวอย่างสิ่งแวดล้อมสำหรับการ ปนเปื้อนในอุจจาระงานวิจัยที่เติบโตขึ้นเรื่อยๆ ได้ตรวจสอบ *E. coli* ที่ทนทานต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถอยู่รอดได้เป็นเวลาหลายวันและเติบโตนอกโฮสต์ แบคทีเรียสามารถปลูกและเพาะเลี้ยงได้ง่ายและราคาไม่แพงในห้องปฏิบัติการ และได้รับการตรวจสอบอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

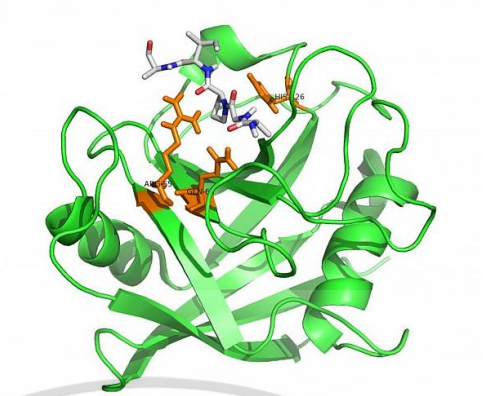
เข้มข้นมากว่า 60 ปี *E. coli* เป็น สารเคมีที่มีการกำหนดตัวกลางต้องมีแหล่งที่มาของคาร์บอนและพลังงาน *E. coli* เป็น สิ่งมีชีวิตต้นแบบโปรคาริโอตที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางที่สุดและเป็นสปีชีส์ที่สำคัญในด้านเทคโนโลยีชีวภาพและจุลชีววิทยาซึ่งมันทำหน้าที่เป็นสิ่งมีชีวิตหลักสำหรับการทำงานส่วนใหญ่กับ DNA รีคอมบิแนนท์ ภายใต้เงื่อนไขที่เอื้ออำนวยจะใช้เวลาเพียง 20 นาทีในการทำซ้ำ

2.1.2 *Escherichia coli* BL21(DE3) หรือ *E. coli* BL21(DE3)

Escherichia coli เป็นหนึ่งในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ที่นิยมใช้มากสำหรับการแสดงออกที่มาก (overexpression) ของโปรตีนลูกผสม เนื่องจากมีการเจริญเติบโตเร็วและมีประสิทธิภาพ ส่วนใหญ่สายพันธุ์ *E. coli* ที่นิยมใช้ในการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม คือ BL21 และอนุพันธ์อื่น เพราะว่าสายพันธุ์ BL21 ไม่มี protease Lon และ outer membrane protease (Omp) ใน cytoplasmic การกลายพันธุ์ (mutation) เหล่านี้ทำให้เกิดการสะสม (accumulation) ของ heterologous proteins (อนุพันธ์โปรตีนจากสายพันธุ์หรือชนิดของเซลล์ที่ต่างจากเซลล์เจ้าบ้าน) ภายในเซลล์ (intracellular) สูงในขณะที่การสลายตัวของโปรตีนระหว่างการทำบริสุทธิ์น้อย ภายในเซลล์เจ้าบ้านมีการแสดงออกของยีน RNA polymerase บนพลาสมิดที่มีการถ่ายโอน (transformed plasmid) ประกอบด้วย cloned gene ซึ่งอาจจะขับเคลื่อนด้วย promoter เช่น *lac* หรือ *tac* อย่างไรก็ตาม promoter เหล่านี้ให้การแสดงออกของ cloned gene ที่ค่อนข้างอ่อนแอดังนั้นจึงไม่เหมาะสำหรับการแสดงออกที่รุนแรงของ cloned gene ดังนั้นสายพันธุ์ BL21(DE3) อาจจะมีการดัดแปลงด้วย promoter ของ bacteriophage T7 promoter เพื่อเพิ่มการแสดงออกของ cloned recombinant proteins ในระบบการแสดงออกของ T7 สายพันธุ์ BL21 ถูกดัดแปลงด้วย λDE3 lysogen เพื่อแสดงออก T7 RNA polymerase ภายใต้การควบคุมของ lac promoter ที่ถูกดัดแปลง คือ lacUV5 promoter ซึ่ง lacUV5 promoter ถูกควบคุมเชิงบวกด้วย IPTG ซึ่งปกติจะถูกใช้เพื่อชักนำการ transcription ภายในเซลล์โดย T7 RNA polymerase ยีนที่แสดงออกมาสามารถ cloned downstream ของ T7 RNA polymerase promoter บน vector และชักนำจาก DE3 โดยผ่าน IPTG โดยเรียกการดัดแปลงสายพันธุ์ BL21 ว่า BL21(DE3) (scientific, 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Cyclophilins



รูปที่ 2.2 โครงสร้างผลึกของไซโคลฟิลิน เอ ของมนุษย์ซับซ้อนซึ่งมีเปปไทด์เป็นสารตั้งต้น

ที่มา: (MARITIN-LUTHER-UNIVERSITATHALLE-WITTENBERG et al., 2020)

Cyclophilin A (CYPA) หรือที่รู้จักในชื่อ peptidylprolyl isomerase A (PPIA) ซึ่งพบใน cytosol มีโครงสร้างแบบ beta barrel ที่มี alpha helices และ beta-sheet ไซโคลฟิลินชนิดอื่นๆ มีโครงสร้างคล้ายกับไซโคลฟิลลิน เอ ไซโคลสปอริน-ไซโคลฟิลิน เอ คอมเพล็กซ์ยับยั้งฟอสฟาเตสที่ขึ้นกับแคลเซียม/แคลโมดูลิน แคลซินูริน ซึ่งคิดว่าจะยับยั้งการปฏิเสธอวัยวะโดยหยุดการผลิตโมเลกุลโปรอักเสบ TNF อัลฟาและอินเตอร์ลิวคิน ไซโคลฟิลินเอยังเป็นที่รู้จักว่าได้รับคัดเลือกโดย Gag polyprotein ระหว่างการติดเชื้อไวรัส HIV-1 และการรวมตัวกันของไซโคลฟิลินในอนุภาคไวรัสใหม่นั้นจำเป็นสำหรับการติดเชื้อ HIV-1 (Wikipedia the free encyclopedia, 2022)

2.3 กากน้ำตาล

รูปที่ 2.3 กากน้ำตาลจากอุตสาหกรรม

ที่มา: (puechkaset, 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 ที่มาของกากน้ำตาล

กากน้ำตาล (Molasses) เป็นผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลทราย โดยการผลิตน้ำตาลทราย 1 ตัน จะใช้น้ำอ้อยดิบ 10 ตัน และเกิดผลพลอยได้ของกากน้ำตาล ประมาณ 50 กิโลกรัม

กากน้ำตาลจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ

1. การสกัดน้ำอ้อยจากลำอ้อยด้วยชุดหีบรีดน้ำอ้อยออกมา (Juice Extraction) โดยกากอ้อยหรือชานอ้อยที่เหลือจะถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อไอน้ำ
2. นำน้ำอ้อยเข้าสู่กระบวนการทำความสะอาด หรือเรียกว่า การทำใส (Juice Purification) ได้แก่ การผ่านเครื่องกรอง การต้มให้ความร้อน และการเติมปูนขาว จนได้น้ำอ้อยที่มีลักษณะใส ไม่มีสารแขวนลอย
3. การต้ม (Evaporation) โดยนำน้ำต้มเข้าสู่หม้อต้ม เพื่อระเหยน้ำออก จนได้น้ำอ้อยเข้มข้น หรือที่เรียกว่า น้ำเชื่อม (Syrup)
4. การเคี่ยว (Crystallization) โดยนำน้ำเชื่อม (Syrup) เข้าหม้อต้มเคี่ยว จนน้ำตาลตกผลึกเป็นเกล็ด เรียกน้ำตาลนี้ว่า น้ำตาลทรายดิบ ซึ่งรวมอยู่กับกากน้ำตาลที่ไม่ตกผลึก หรือเรียกว่า messecuite ขั้นตอนนี้ มีผลพลอยได้ คือ กากน้ำตาล นั่นเอง
5. นำส่วนผสมของเกล็ดน้ำตาล และกากน้ำตาลมาปั่นแยกออก จนได้น้ำตาลทรายดิบ และกากน้ำตาลในที่สุด

กากน้ำตาลจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลรีไฟน์

1. นำน้ำตาลทรายดิบมาละลายในน้ำร้อน เรียกน้ำตาลทรายดิบที่ละลายนี้ว่า แมกม่า (Magma) แล้วนำไปปั่นเพื่อละลายคราบกากน้ำตาลจากกระบวนการแรกที่ติดถังออก
2. นำสารละลายน้ำตาลทรายดิบมาเข้าสู่กระบวนการทำความสะอาด และฟอกสีโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวฟอก ก่อนเข้าสู่กระบวนการกรอง และนำไปฟอกครั้งสุดท้ายด้วยการแลกเปลี่ยนประจุ สุดท้ายได้น้ำเชื่อมรีไฟน์
3. นำน้ำเชื่อมเข้าสู่กระบวนการต้มเพื่อระเหยน้ำออก
4. น้ำเชื่อมเข้มข้นเข้าสู่ประบวนการเคี่ยวเพื่อให้เกล็ดน้ำตาลตกผลึก ดังข้อที่ 4 ของการผลิตน้ำตาลทรายดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำ messecuite มาปั่นแยกน้ำตาลทรายขาว และกากน้ำตาลที่ไม่ตกผลึกออกจากกัน ซึ่งจะได้เกล็ดน้ำตาลทรายขาว และกากน้ำตาลในที่สุด (วังขนายกรุ๊ป 2550)

ลักษณะของกากน้ำตาล

กากน้ำตาล (molasses) เป็นของเหลวที่มีลักษณะหนืดข้น มีสีดำอมน้ำตาล ซึ่งเป็นผลผลิตอย่างหนึ่งในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย โดยมีอ้อยเป็นวัตถุดิบ กากน้ำตาลนี้ จะแยกออกจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายในขั้นตอนสุดท้าย ด้วยการแยกออกจากเกล็ดน้ำตาลโดยวิธีการปั่น (Centrifuge) ซึ่งไม่สามารถตกผลึกเป็นเกล็ดน้ำตาลได้ด้วยวิธีทั่วไป และไม่นำกลับมาใช้ผลิตน้ำตาลทราย

ชนิดกากน้ำตาล

1. black–strap molasses

   กากน้ำตาลจากผลพลอยได้การผลิตน้ำตาลทรายขาว เรียกกากน้ำตาลชนิดนี้ว่า black–strap molasses เป็นกากน้ำตาลเหนียวข้นที่มีสีดำอมน้ำตาล จะมีปริมาณน้ำตาลประมาณ 50–60%

2. refinery molasses

   กากน้ำตาลจากผลพลอยได้การผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ เรียกกากน้ำตาลชนิดนี้ว่า refinery molasses เป็นกากน้ำตาลที่ข้นน้อยกว่า และมีสีจางกว่าชนิด black–strap molasses จะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48

3. invert molasses

   กากน้ำตาลจากการผลิตโดยตรง หรือที่เรียกว่า invert molasses เป็นกากน้ำตาลที่ผลิตได้จากการนำน้ำอ้อยมาระเหยเข้มข้น มีน้ำตาลประมาณร้อยละ 77

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Medium (LB Medium)

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Medium 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาตร
Trytone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมโดยผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ได้ นำไปปรับพีเอชให้ได้ 7 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารแข็ง LB agar จะมีการเติมผงวุ้น 20 กรัม (2.0 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเตรียมโดยผสมองค์ประกอบต่างๆในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ยกเว้นผงวุ้น นำไปต้มให้ความร้อนจนวุ้นหลอมละลาย tributyrin oil 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นขณะร้อนด้วยเครื่องปั่นผสม ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารแข็งที่มีการเติมยาแอมพิซิลลิน เตรียมโดย ผสมสารละลายแอมพิซิลลินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นางสาว สุบงกช เหมือนวงศ์ธรรม (2564) ศึกษาความเข้มข้นต่าง ๆของน้ำตาลต่างๆที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pET-11a ต่ออาหาร LB broth เตรียมกล้าเชื้อโดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ค่าประมาณ 1.0 แล้วเติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์และเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนนโนส อะราบิโนส ไซโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครสที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, และ 10 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ที่เวลา 25 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสและเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Bin dong และคณะ (2564) การผลิตไลโซไซม์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังของ Scylla paramamosain การเหนี่ยวนำความเข้มข้น IPGT เหมาะสมที่สุดคือที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส มีการผลิตถึง 18% จึงใช้อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสในการทำให้บริสุทธิ์เพื่อง่ายต่อการวิเคราะห์โดยได้รับการทดสอบกับ IPGT พบว่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดคือ 0.6 มิลลิโมลาร์ มีการผลิตโปรตีนถึง 22% พบโปรตีนขนาด 23 กิโลดอลตัน

Agnieszka Stryjewska และคณะ (2556) เทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรม ดีเอ็นเอและรีคอมบิแนนท์โปรตีน ขั้นตอนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

อติกานต์ สติปัฏฐาน, ชนิตโชต ปิยพิทยานันต์ และเทพปัญญา เจริญรัตน (2563) การพัฒนาอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง *Escherichia coli DH5*α ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง *E. coli DH5*α สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร LB แสดงให้เห็น ว่ายีสต์สกัดและเพปโตนที่เป็นองค์ประกอบหลัก ของอาหาร LB มีสารที่จำเป็นต่อการเจริญของ *E. coli* DH5α ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการรวม องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund เข้ากับอาหาร LB เพื่อให้สามารถเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมีและเชื้อแบคทีเรียสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

1. *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี pET22b-PmCyclophilin A
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar
4. อาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล (molasses) ยี่ห้อ มิตรผล
5. 1M IPTG
6. SDS-PAGE Protein Loading Buffer 5X
7. Ampicillin 100 mg/ml
8. Deionized Wateer (DI)
9. น้ำกลั่น

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
2. ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge รุ่น Rotina 380R)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอดขนาดเล็ก (centrifuge รุ่น 5418R)
5. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
7. เครื่องวัดค่าพีเอช รุ่น S20 Seven Eazy
8. หลอด Centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร
9. หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
10. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
11. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micro Pipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ แท่งคนสาร บีกเกอร์ ช้อนตักสาร ขวดดูแรน
13. จานเพาะเชื้อ (Plate)
14. ถังน้ำแข็ง
15. Loop
16. ตะเกียงแอลกฮอล์ และ ไฟแช๊ก
17. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
18. เครื่องชั่งสาร
19. เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง
20. Autoclave

3.1.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับ SDS-PAGE

1. Mini-PROTEAN Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 0.75 mm thick handcast gels #1658000FC
2. เครื่องเขย่า (Orbital shaker)
3. กล่องย้อมเจล
4. Power supply

3.1.4 สารเคมีสำหรับ SDS-PAGE

1. 30% Acrylamide mix
2. 1.5M Tris pH 8.8
3. 10% SDS
4. 10% APS (Ammonium persulfate)
5. TEMED
6. 1.0M Tris pH 6.8
7. Tricolor Broad Range Prestained Protein Ladder
8. Coomassie brilliant blue R-250
9. Destain solution

3.1.5 อุปกรณ์ Sonication

1. เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic Processor)

3.1.6 อุปกรณ์ของ Bradford protein assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. 96-well plate
2. เครื่อง Microplate Reader
3. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micro pipette)
4. Pipette Tip
5. บีกเกอร์

3.1.7 สารเคมีสำหรับทำ Bradford protein assay

1. BSA
2. PBS
3. น้ำกลั่น

3.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ที่ทดสอบแหล่งคาร์บอน

3.2.1 การปรับสภาพกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้นความเข้มข้น 24% จากนั้นนำกากน้ำตาลที่ได้มาเจือจางอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.75% (TM1), 1.5% (TM2), 3% (TM3) เพื่อหาความเข้มข้นที่เชื้อสามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จากนั้นนำกากน้ำตาลที่เจือจางทั้ง 3 ระดับแล้วไปปรับพีเอชให้อยู่ที่ pH 7.0

3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด PET22b-PmCyclophilin A ซึ่งได้มาจากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร มา streak ลงในอาหาร LB agar จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน หลังจากข้ามคืนทำการเขี่ยโคโลนีหัวเชื้อในอาหาร LB agar ที่บ่มไว้ 2-3 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลิน 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่าที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน

3.2.3 การหากราฟมาตรฐานช่วงเวลาการเติบโตของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.3.1 การเจือจางกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้นความเข้มข้น 24% จากนั้นนำกากน้ำตาลที่ได้มาเจือจางอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.75% (TM1), 1.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(TM2), 3% (TM3) เพื่อหาความเข้มข้นที่เชื้อสามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จากนั้นนำกากน้ำตาลที่เจือจางทั้ง 3 ระดับใส่แอมโมเนียมซัลเฟต 6 g/L แล้วนำไปปรับพีเอช ให้อยู่ที่ pH 7.0

3.2.3.2 การเตรียมอาหาร LB agar

ชั่งเปปโตน, โซเดียมคลอไรด์, สารสกัดยีสต์, ผงวุ้น ผสมกับน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เมื่อครบตามเวลา นำออกมาให้คลายร้อนและเติมแอมพิซิลลินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทใส่เพลทอาหาร เมื่ออาหารแข็งได้ที่ให้ตากเพลทอาหารจนแห้งและนำมาขีดเส้นแบ่งเป็น 4 ส่วน

3.2.3.3 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด PET22b-PmCyclophilin A มา streak ลงในอาหาร LB agar จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน หลังจากข้ามคืนทำการเขี่ยโคโลนีหัวเชื้อในอาหาร LB agar ที่บ่มไว้ 2-3 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลิน 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่าที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน

3.2.3.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำหัวเชื้อ (starter) ที่ได้ทำการบ่มไว้ข้ามคืนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำหัวเชื้อ (starter) 1 มิลลิลิตร ที่ได้ทำการบ่มข้ามคืนไว้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม และนำหัวเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาลปริมาตรต่างๆทั้ง 3 ความเข้มข้น คือ TM1,TM2,TM3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรขวดละ 1 มิลลิลิตร และเติมแอมพิซิลลินขวดละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่เครื่องบ่มแบบเขย่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

3.2.3.5 การนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี Dot plate

เก็บตัวอย่างหลังเติมแอมพิซิลลินมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นจะเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 1, 2, 4, 6, 10, 26, 32, 50 จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมาทำ dilution factor กับน้ำเกลือให้ได้ช่วงค่าที่เหมาะสม แล้วนำไปหยดลงบนเพลทอาหารที่ได้แบ่งไว้ 4 ส่วนส่วนละ 5 หยด หยดละ 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เมื่อครบข้ามคืนเอาเพลทอาหารมานับจำนวนโคโลนีและนำไปคำนวณกราฟมาตรฐานให้เป็นกราฟ log จากนั้นคำนวณช่วง log phase จากสมการที่ได้จากกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในระบบ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

3.2.4.1 การเจือจางกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.75% (TM1), 1.5% (TM2), 3% (TM3) เพื่อหาความเข้มข้นที่เชื้อสามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จากนั้นนำกากน้ำตาลที่เจือจางทั้ง 3 ระดับใส่แอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปปรับพีเอช ให้อยู่ที่ pH 7.0

3.2.4.2 การหาปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำหัวเชื้อ (starter) ที่ได้ทำการบ่มข้ามคืน ทำการดูดหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลิน 50 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม และนำมาเลี้ยงลงในกากน้ำตาลที่ปริมาตรต่างๆทั้ง 4 ความเข้มข้น คือ 0.75%, 1.5%, 3%, และ 6% ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลิน 50 ไมโครลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth มา 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุกครึ่งชั่วโมง เมื่อค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเท่ากับ 0.5-0.6 จากนั้นเติมสาร IPTG แล้วเก็บตัวอย่างจนครบ 3 ชั่วโมง จากนั้นก็เริ่มดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลที่ปริมาตรต่างๆทั้ง 4 ความเข้มข้นตามตาราง จากนั้นเติมสาร IPTG แล้วเก็บตัวอย่างจนครบ 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำตัวอย่างหลอดละ 1 มิลลิลิตร 2 หลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm 3 นาที และเทอาหารออกจากนั้นเติม 1X PBS 100 ไมโครลิตรและนำไป vortex เสร็จแล้วนำไป Sonicated เพื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Bradford protein assay

3.2.4.3 การใช้คลื่นความถี่เพื่อให้เซลล์แตก

นำตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บมา 1 มิลลิลิตรในหลอด tube 1.5 มิลลิลิตรของตัวอย่างทุกๆ ชั่วโมงมาทำการ Sonicated เพื่อทำให้เซลล์โปรตีนแตก โดยในการทำจะนำตัวอย่างในหลอด tube 1.5 มิลลิลิตร มาใช้ในบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็ง จากนั้นทำการ Sonicated โดยใช้ความถี่ 20% กิโลเฮิร์ทซ์ เป็นเวลา 10 วินาที ขณะทำต้องคอยดูอย่าให้เกิดฟองมากจนไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.4 การตรวจสอบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธีการแบบ Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำตัวอย่างที่เก็บในชั่วโมงต่างๆ มาทำการ sonicated ที่ 20% กิโลเฮิร์ทซ์ เวลา 10 วินาที จากนั้นใส่ดูดตัวอย่างของแต่ละชั่วโมงมา 20 ไมโครลิตร ใส่ 5X SDS Dye 5 ไมโครลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,00 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปต้ม 100 องศาเซลเซียส 10 นาที ทำการเตรียมชุด Separating gel 12% gel โดยเตรียม 20 มิลลิลิตร ดัง ตารางที่ 3 และเตรียมชุด Stacking gel 5% gelโดยเตรียม 6 มิลลิลิตร

เตรียม sample 15 ไมโครลิตร และเตรียม marker 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมอุปกรณ์เพื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 25 โวลต์ต่อแผ่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจะนำไปย้อมด้วยสี Coomassie Blue Stain R-250 เวลา 1 ชั่วโมง และนำแผ่นเจลที่ได้ไปล้างด้วย Destain Solution จนกว่าแผ่นเจลจะใส จากนั้นถ่ายรูปเพื่อบันทึกผล

ตารางที่ 3.1 ปริมาตรและสารละลายที่ใช้ในการเตรียมชุด Separating gel 12% gel โดยเตรียม 20 มิลลิลิตร

สารเคมี	ปริมาตรที่ใส่ µL (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	6,600 µL
Acrylamide Mix (30%)	8,000 µL
Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	5,000 µL
10% SDS	200 µL
Ammonium persulfate (10%)	200 µL
TEMED	8 µL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ปริมาตรและสารละลายที่ใช้ในการเตรียมชุด Stacking gel โดยเตรียม 6 มิลลิลิตร

สารเคมี	ปริมาตรที่ใส่ µL (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	4,100 µL
Acrylamide (30%)	1,000 µL
Tris-HCl (1 M, pH 6.8)	750 µL
10% SDS	60 µL
Ammonium persulfate (10%)	60 µL
TEMED	6 µL

3.2.4.5 การวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay

เตรียมค่ามาตรฐานโดยนำ BSA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางกับน้ำกลั่นให้ได้ 10 เท่า จากนั้นนำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมาหยอดในไมโครเวลเพลทหลุมละ 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นหลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1X Bradford 200 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

3.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ที่ทดสอบแหล่งไนโตรเจน

3.3.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้นความเข้มข้น 24% จากนั้นน้ำกากน้ำตาลที่ได้มาเจือจางอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1.5% จากนั้นเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 3 ความเข้มข้นคือ 3 กรัมต่อลิตร(TM1) , 6 กรัมต่อลิตร(TM2) และ 12 กรัมต่อลิตร(TM3) เพื่อหาความเข้มข้นที่เชื้อสามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จากนั้นนำกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตทั้ง 3 ความเข้มข้นแล้วไปปรับพีเอช ให้อยู่ที่ pH 7.0

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด PET22b-PmCyclophilin A ซึ่งได้มาจากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร มา streak ลงในอาหาร LB agar จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน หลังจากข้ามคืนทำการเขี่ยโคโลนีเชื้อในอาหาร LB agar ที่บ่มไว้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลลิน 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน

3.3.3 การหากราฟมาตรฐานช่วงเวลาการเติบโตของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.1 การเจือจางกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้นความเข้มข้น 24% จากนั้นน้ำกากน้ำตาลที่ได้มาเจือจางอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1.5% จากนั้นเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 3 ความเข้มข้นคือ 3 กรัมต่อลิตร(TM1) , 6 กรัมต่อลิตร(TM2) และ 12 กรัมต่อลิตร(TM3) เพื่อหาความเข้มข้นที่เชื้อสามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จากนั้นนำกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตทั้ง 3 ความเข้มข้นแล้วไปปรับพีเอช ให้อยู่ที่ pH 7.0

3.3.3.2 การเตรียม LB agar

ชั่งเปปโตน, โซเดียมคลอไรด์, สารสกัดยีสต์, ผงวุ้น ผสมกับน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เมื่อครบตามเวลา นำออกมาให้คลายร้อนและเติมแอมพิซิลลินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทใส่เพลทอาหาร เมื่ออาหารแข็งได้ที่ให้ตากเพลทอาหารจนแห้งและนำมาขีดเส้นแบ่งเป็น 4 ส่วน

3.3.3.3 การผลิตรีคอมบิแนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำหัวเชื้อ (stater) ที่ได้ทำการบ่มไว้ข้ามคืนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ นาโนเมตร จากนั้นนำหัวเชื้อ (stater) 1 มิลลิลิตร ที่ได้ทำการบ่มข้ามคืนไว้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม และนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 3 ความเข้มข้น คือ TM1,TM2,TM3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรขวดละ 1 มิลลิลิตร และเติมแอมพิซิลลินขวดละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

3.3.3.4 **การนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี Dot plate**

ทำการเก็บตัวอย่างหลังเติมแอมพิซิลลินมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร และนำไปแช่ไว้ในถังน้ำแข็ง หลังจากนั้นจะเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 1, 2, 4, 6, 10, 26, 32, 50 และนำไปแช่ในถังน้ำแข็ง จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมามาทำ dilution factor กับน้ำเกลือให้ได้ช่วงค่าที่เหมาะสม จากนั้นนำไปหยดลงบนเพลทอาหารที่ได้แบ่งไว้ 4 ส่วนส่วนละ 5 หยด หยดละ 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเมื่อครบข้ามคืนเอาเพลทอาหารมานับจำนวนโคโลนีและนำไปคำนวณกราฟมาตรฐานให้เป็นกราฟ log จากนั้นคำนวณช่วง log phase จากสมการที่ได้จากกราฟ

3.3.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในระบบ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

3.3.4.1 การเจือจางกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้นความเข้มข้น 24% จากนั้นน้ำกากน้ำตาลที่ได้มาเจือจางอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.75% (TM1), 1.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(TM2), 3% (TM3) เพื่อหาความเข้มข้นที่เชื้อสามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จากนั้นนำกากน้ำตาลที่เจือจางทั้ง 3 ระดับแล้วไปปรับพีเอช ให้อยู่ที่ pH 7.0

3.3.4.2 การหาปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ

นำหัวเชื้อ (starter) 1 มิลลิลิตร ที่ได้ทำการบ่มข้ามคืนไว้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม และนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลทั้ง 3 ความเข้มข้น คือ TM1,TM2,TM3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรขวดละ 1 มิลลิลิตร และเติมแอมพิซิลลินขวดละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เมื่อบ่มครบเวลาตามที่ได้คำนวณจากกราฟแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาเติม IPTG ให้ปริมาตรสุดท้ายที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร จำนวนตัวอย่างละ 2 หลอด แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที แล้วเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 1, 2, และ 3 จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเลา 3 นาที แล้วเทอาหารออก จากนั้นเติม 1X PBS 100 ไมโครลิตรและนำไป vortex เสร็จแล้วนำไป Sonicated เพื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Bradford protein assay

3.3.4.3 การใช้คลื่นความถี่เพื่อให้เซลล์แตก

นำตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บมา 1 มิลลิลิตรในหลอด tube 1.5 มิลลิลิตรของตัวอย่างทุกๆชั่วโมงมาทำการ Sonicated เพื่อทำให้เซลล์โปรตีนแตก โดยในการทำจะนำตัวอย่างในหลอด tube 1.5 มิลลิลิตรมาใช้ในบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็ง จากนั้นทำการ Sonicated โดยใช้ 20% กิโลเฮิร์ทซ์ เวลา 10 วินาที ขณะทำต้องคอยดูอย่าให้เกิดฟองมากจนไป

3.3.4.5 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ Bradford protein assay

นำตัวอย่างที่เก็บในชั่วโมงต่างๆ มาทำการ sonicated ที่ 20% กิโลเฮิร์ทซ์ เวลา 10 วินาที จากนั้นใส่ดูดตัวอย่างของแต่ละชั่วโมงมา 20 ไมโครลิตร ใส่ 5X SDS Dye 5 ไมโครลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,00 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปต้ม 100 องศาเซลเซียส 10 นาที ทำการเตรียมชุด Separating gel 12% gel โดยเตรียม 20 มิลลิลิตร ดัง ตารางที่ 3 และเตรียมชุด Stacking gel โดยเตรียม 6 มิลลิลิตร

เตรียม sample 15 ไมโครลิตร และเตรียม marker 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมอุปกรณ์เพื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 25 โวลต์ต่อแผ่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจะนำไปย้อมด้วยสี Coomassie Blue Stain R-250 เวลา 1 ชั่วโมง และนำแผ่นเจลที่ได้ไปล้างด้วย Destain Solution จนกว่าแผ่นเจลจะใส จากนั้นถ่ายรูปเพื่อบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ปริมาตรและสารละลายที่ใช้ในการเตรียม ชุด separating gel 12% gel โดยเตรียม 20 มิลลิลิตร

สารละลาย	ปริมาตรที่ใส่ µL (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	6,600
30% Acrylamide	8,000
1.5M Tris pH 8.8	5,000
10% SDS	200
10% Ammonium persulfate	200
TEMED	8

ตารางที่ 3.4 ปริมาตรและสารละลายที่ใช้ในการเตรียม ชุด stacking gel โดยเตรียม 6 มิลลิลิตร

สารละลาย	ปริมาตรที่ใส่ µL (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	4,100
30% Acrylamide	1,000
1.5M Tris pH 6.8	750
10% SDS	60
10% Ammonium persulfate	60
TEMED	6

3.3.4.5 การวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay

เตรียมค่ามาตรฐานโดยนำ BSA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางกับน้ำกลั่นให้ได้ 10 เท่า จากนั้นนำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมาหยอดในไมโครเวลเพลทหลุมละ 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นหลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1X Bradford 200 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

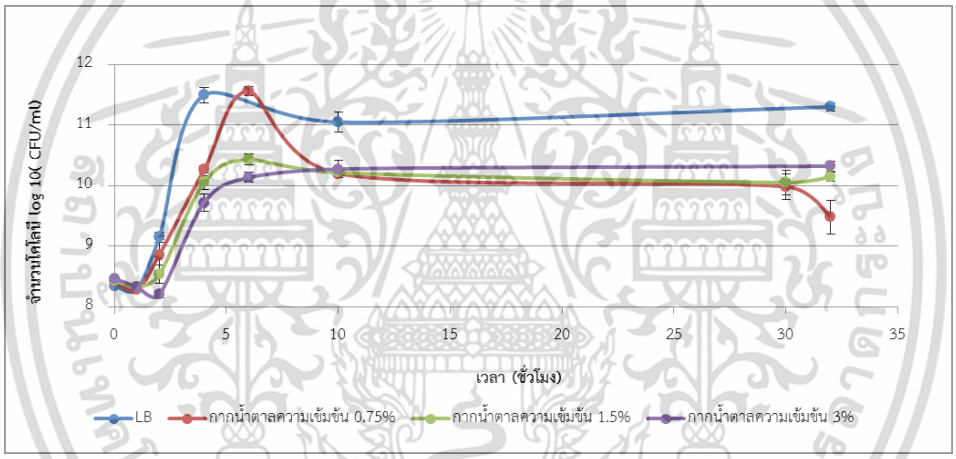
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

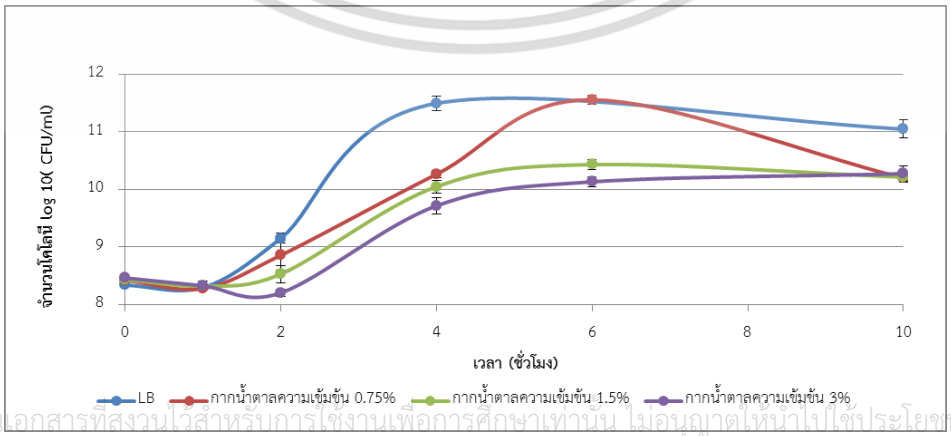
ผลการวิจัยและการผล

4.1 การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Colony Forming Unit : CFU) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอน

หลังจากเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 1, 2, 4, 6, 10, 26, 32 และนำไปแช่ในถังน้ำแข็ง จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมามาทำ dilution factor กับน้ำเกลือให้ได้ช่วงค่าที่เหมาะสม จากนั้นนำไปหยดลงบนเพลทอาหารที่ได้แบ่งไว้ 4 ส่วนส่วนละ 5 หยด หยดละ 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเมื่อครบข้ามคืนเอาเพลทอาหารมานับจำนวนโคโลนีและนำไปคำนวณกราฟมาตรฐานให้เป็นกราฟ log ได้ผลดังกราฟ



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ 0 – 32 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าจำนวนโคโลนี log CFU/ml



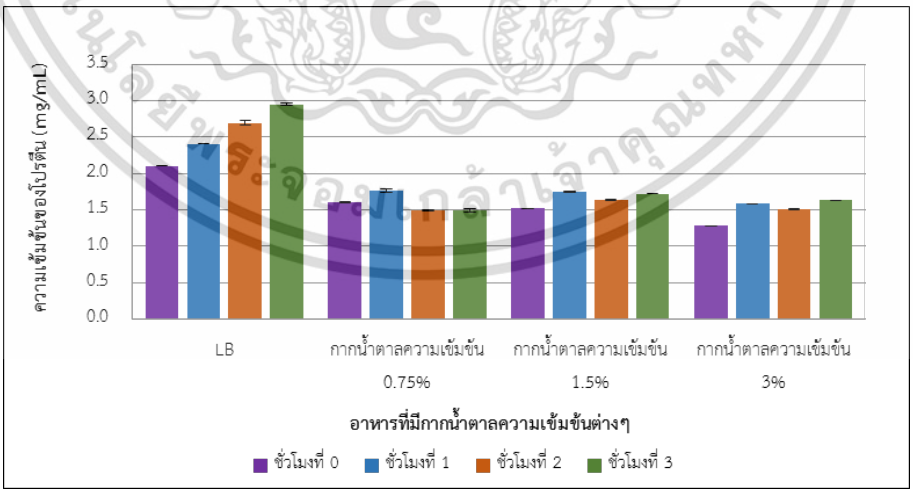
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ 0 – 10 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าจำนวนโคโลนี log CFU/ml

จากกราฟพบว่าอาหาร LB จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยช่วง log phase ของ LB จะมีแนวโน้มสูงที่สุดและรองลงมาก็คือ 0.75, 1.5 และ 3 และเมื่อได้นำช่วง log phase ที่เป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโต (R. E. Buchanan.1918) มาคำนวณหาช่วงระยะเวลาในการ induce ได้ผลดังนี้ LB เวลา 1.30 ชั่วโมง, 0.75% เวลา 2.17 ชั่วโมง, 1.5% เวลา 2.06 ชั่วโมง, 3% เวลา 1.5 ชั่วโมง

4.2 ผลการตรวจสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยวิธี Bradford protein assay ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอน

เมื่อได้ทำการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคฟิลิน เอ จากการทดสอบด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยง เชื้อที่มีความข้นต่างกันโดย LB+AMP เป็นชุดควบคุมและมีความเข้มข้นของอาหารกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตแบ่งเป็น 3 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้น TM1 (0.75 %) ความเข้มข้น TM2 (1.5%) และ ความเข้มข้น TM3 (3%) เมื่อเราทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ครบชั่วโมงที่ได้คำนวณจากกราฟหลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีหลังจากนั้นเติม IPTG ลงไปและวัดการเจริญของ เชื้อนับทุกชั่วโมง ชั่วโมงที่ 0 , 1 , 2 , 3 จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางกับน้ำกลั่นให้ได้ 10 เท่า จากนั้นนำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมาหยอดในไมโครเวลเพลทหลุมละ 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นหลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1X Bradford 200 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ได้ดังผลในกราฟ



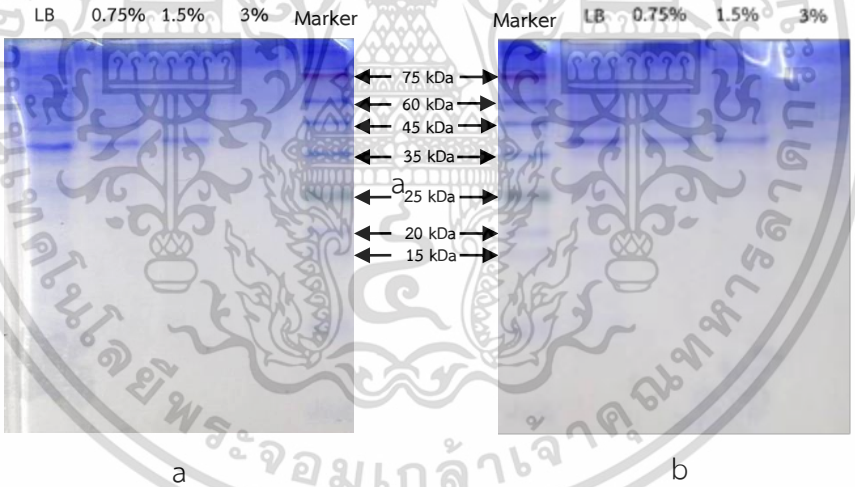
รูปที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอน

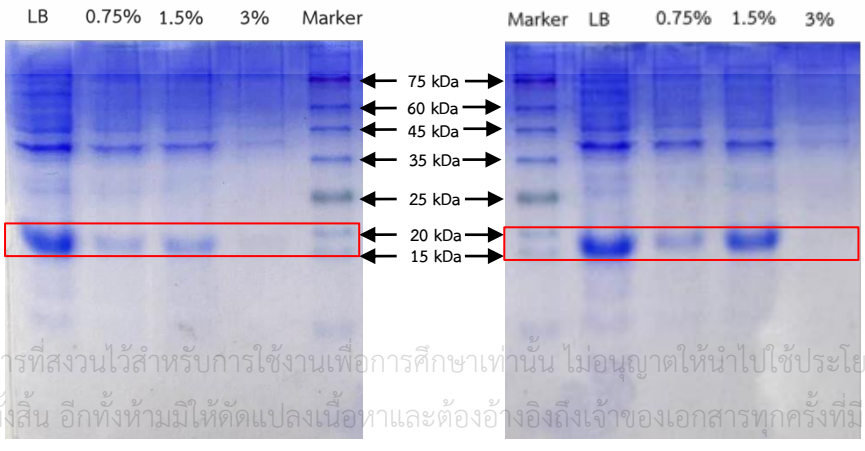
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า LB เป็นอาหารที่มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเชื้อมากที่สุดเพราะเป็นอาหารที่มีสารอาหารครบถ้วน ลำดับถัดมาคือ TM2 (กากน้ำตาล 3.125 มิลลิลิตร : น้ำกลั่น 46.875 มิลลิลิตร : แอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัม/ลิตร) ได้ผลปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเชื้อดีที่สุดในบรรดาอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล จากนั้นตามมาด้วย TM1 (กากน้ำตาล 1.5625 มิลลิลิตร : น้ำกลั่น 48.4375 มิลลิลิตร : แอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัมต่อลิตร) และ TM3 (กากน้ำตาล 6.25 มิลลิลิตร : น้ำกลั่น 43.75 มิลลิลิตร : แอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัมต่อลิตร) ได้ผลปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเชื้อน้อยที่สุด

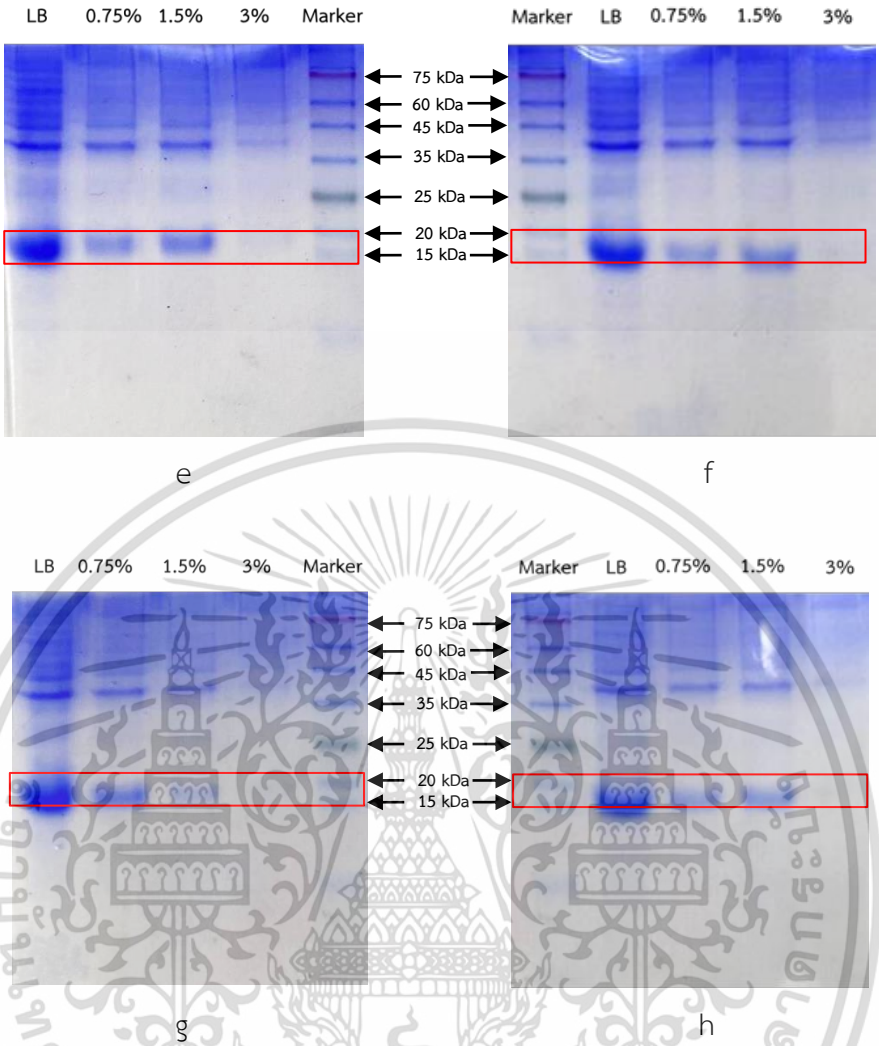
4.3 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนของ รีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วยวิธี SDS-PAGE ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอน

หลังจากที่นำตัวอย่าง TM1, TM2 และ TM3 ที่ได้ทำการ Sonicate แล้วมา 20 ไมโครลิตร และนำมาผสมกับ Dye 5 ไมโครลิตรและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปโหลดลงใน 12% separating gel โหลดตัวอย่างลงไปหลุมละ 15 ไมโครลิตร และโหลด Marker หลุมละ 2.5 ไมโครลิตร และใช้กระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมป์ต่อแผ่น เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสี Coomassie blue เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำเจลไปล้างด้วย Destain solution จนกว่าเจลจะใส และได้ผลการทดลองดังรูป





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



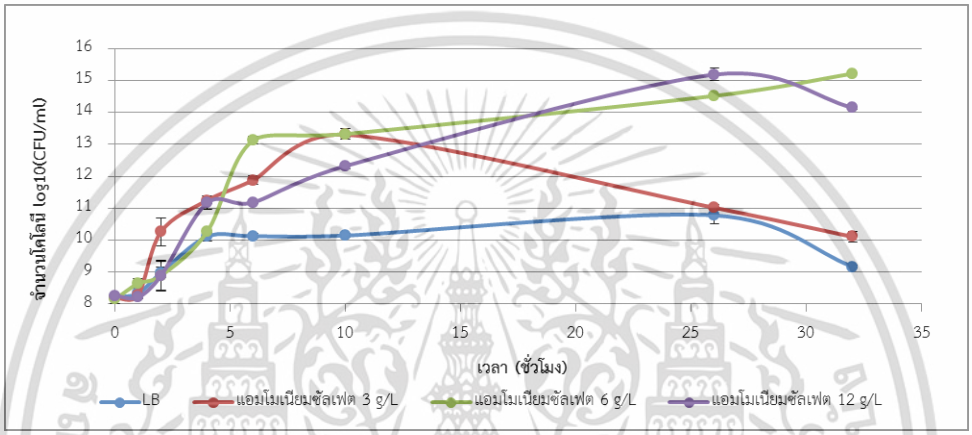
รูปที่ 4.4 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ชั่วโมงที่ 0 (a,b) , ชั่วโมงที่ 1 (c,d) , ชั่วโมงที่ 2 (e,f) , ชั่วโมงที่ 3 (g,h) ตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โดยใช้ความเข้มข้นของ Acrylamide 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250

จากการทำ SDS-PAGE พบว่า LB มีลักษณะแถบแบรนด์ในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 มีสีเข้มชัดเจน และแถบแบรนด์ที่พบได้ชัดเจนรองลงมาคือ TM2 พบแถบแบรนด์แสดงชัดเจนในชั่วโมงที่ 1, 2, และ 3 ส่วนตัวอย่าง TM1 และ TM3 แสดงแถบแบรนด์ที่ไม่ชัดเจนหรืออาจไม่พบแถบแบรนด์เลยในชั่วโมงที่ 1, 2, และ 3โดยพบว่าโปรตีนไซโคฟิลิน เอ มีขนาดโปรตีนประมาณ 18 kDa

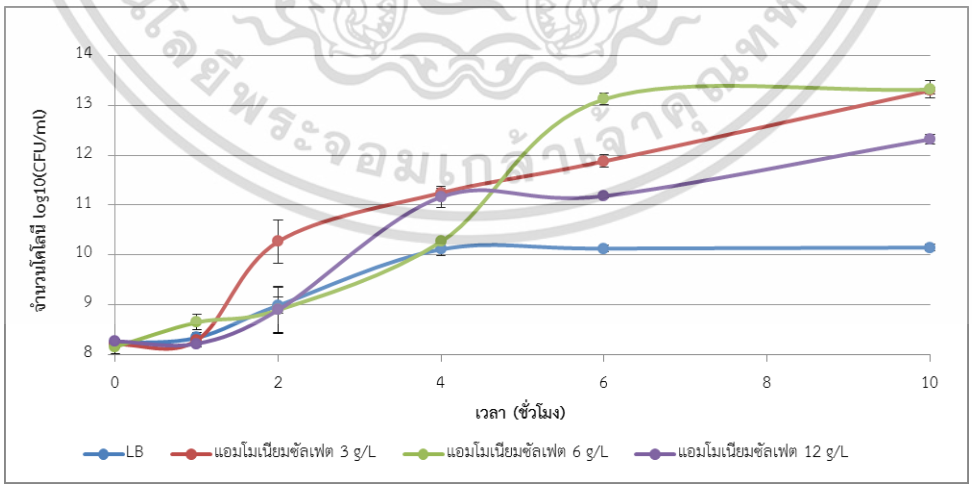
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Colony Forming Unit : CFU) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งไนโตรเจน

หลังจากเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 1, 2, 4, 6, 10, 26, 32 และนำไปแช่ในถังน้ำแข็ง จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมามาทำ dilution factor กับน้ำเกลือให้ได้ช่วงค่าที่เหมาะสม จากนั้นนำไปหยดลงบนเพลทอาหารที่ได้แบ่งไว้ 4 ส่วนส่วนละ 5 หยด หยดละ 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเมื่อครบข้ามคืนเอาเพลทอาหารมานับจำนวนโคโลนีและนำไปคำนวณกราฟมาตรฐานให้เป็นกราฟ log ได้ผลดังกราฟ



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ 0 – 32 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าจำนวนโคโลนี log CFU/ml



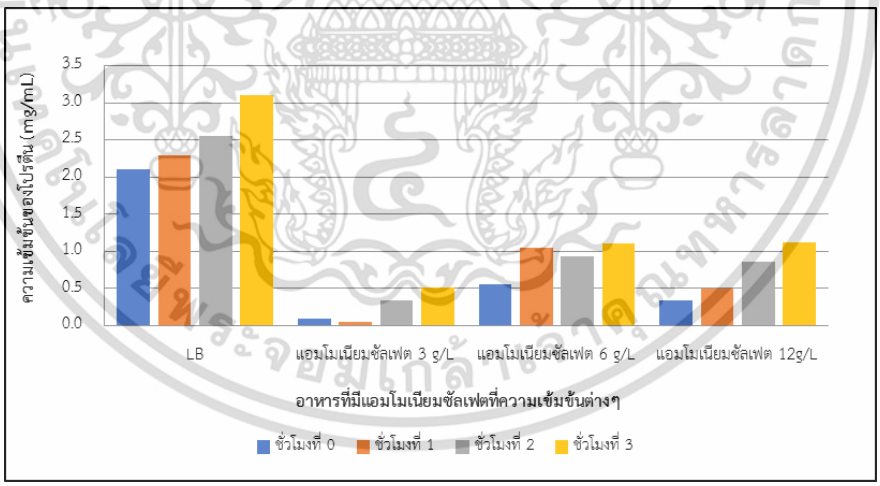
กราฟที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ 0 – 10 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าจำนวนโคโลนี log CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟพบว่าอาหาร LB จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยช่วง log phase ของ LB จะมีแนวโน้มสูงที่สุดและรองลงมาก็คือ 0.75, 1.5 และ 3 และเมื่อได้นำช่วง log phase ที่เป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโต (R. E. Buchanan.1918) มาคำนวณหาช่วงระยะเวลาในการ induce ได้ผลดังนี้ LB เวลา 1.45 ชั่วโมง, 0.75% เวลา 1.03 ชั่วโมง, 1.5% เวลา 2.20 ชั่วโมง, 3% เวลา 1.26 ชั่วโมง

4.5 ผลการตรวจสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยวิธี Bradford protein assay ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งไนโตรเจน

เมื่อได้ทำการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคฟิลิน เอ จากการทดสอบด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยง เชื้อที่มีความข้นต่างกันโดย LB+AMP เป็นชุดควบคุมและมีความเข้มข้นของอาหารกากน้ำตาลคือ 1.5%จากนั้นทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตโดยแบ่งเป็น 3 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้น TM1 (3 กรัมต่อลิตร) ความเข้มข้น TM2 (6 กรัมต่อลิตร) และ ความเข้มข้น TM3 (12 กรัมต่อลิตร) เมื่อเราทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ครบชั่วโมงที่ได้คำนวณจากกราฟหลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียสบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีหลังจากนั้นเติม IPTG ลงไปและวัดการเจริญของ เชื้อนับทุกชั่วโมง ชั่วโมงที่ 0 , 1 , 2 , 3 จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางกับน้ำกลั่นให้ได้ 10 เท่า จากนั้นนำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมาหยอดในไมโครเวลเพลทหลุมละ 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นหลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1X Bradford 200 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ได้ดังผลในกราฟ



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งไนโตรเจน

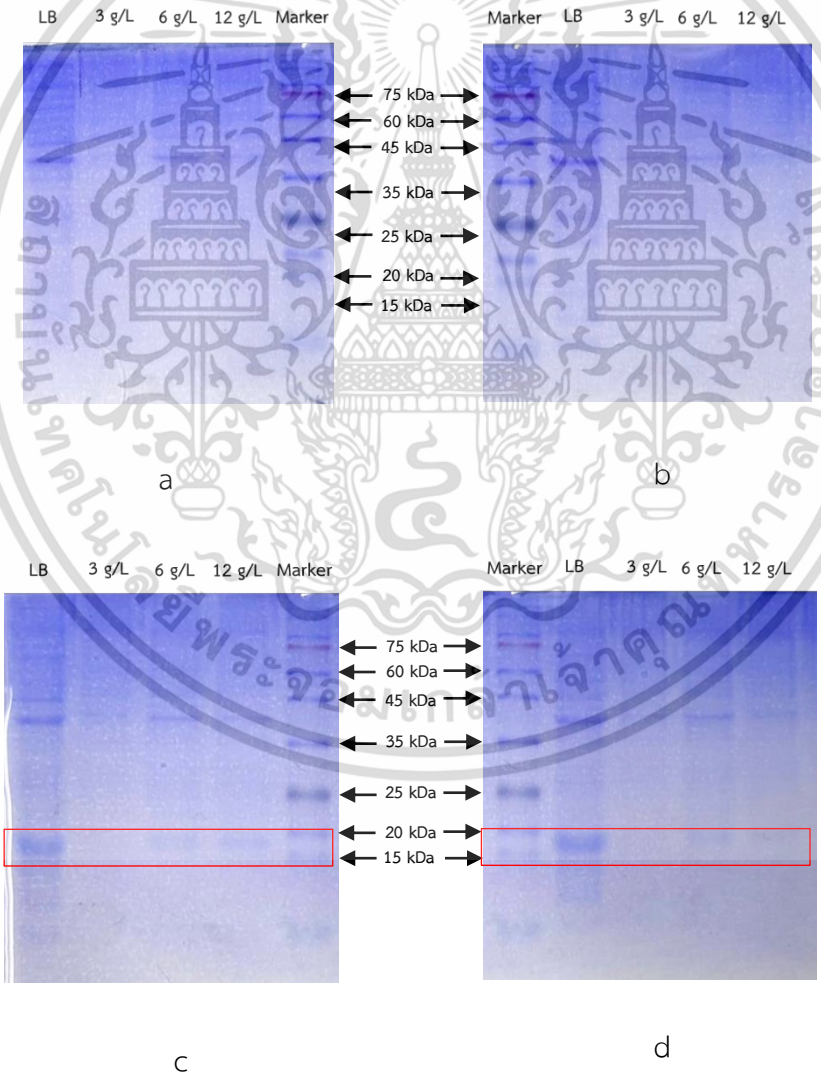
พบว่า LB เป็นอาหารที่มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเชื้อมากที่สุดเพราะเป็นอาหารที่มีสารอาหารครบถ้วน ลำดับถัดมาคือ TM2 (กากน้ำตาล 3.125 มิลลิลิตร : น้ำกลั่น 46.875 มิลลิลิตร : แอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัม/ลิตร) ได้ผลปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเชื้อดีที่สุดในบรรดาอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล จากนั้นตามมาด้วย TM1 (กากน้ำตาล 3.125 มิลลิลิตร : น้ำกลั่น 46.875 มิลลิลิตร : แอมโมเนียมซัลเฟต 12 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

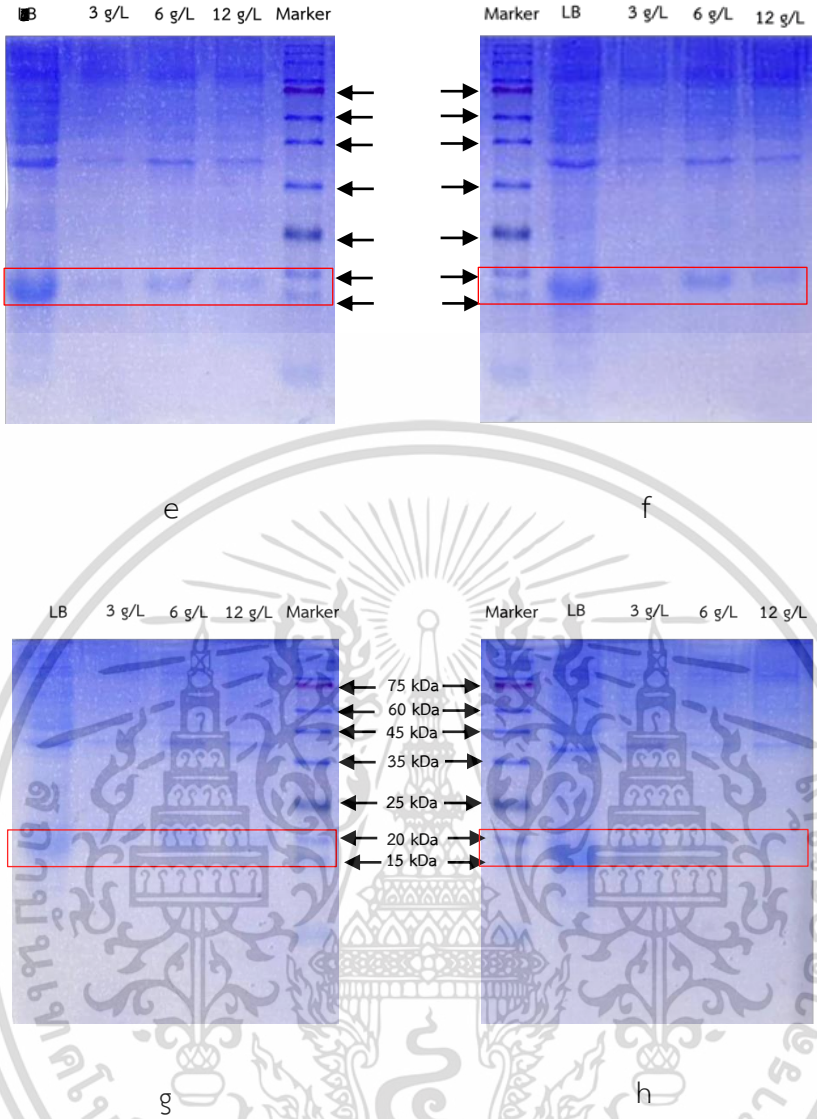
ต่อลิตร) และ TM3 (กากน้ำตาล 3.125 มิลลิลิตร : น้ำกลั่น 46.875 มิลลิลิตร : แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร) ได้ ผลปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเชื้อน้อยที่สุด

4.6 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนของ รีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วยวิธี SDS-PAGE ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งไนโตรเจน

หลังจากที่นำตัวอย่างTM1, TM2 และ TM3 ที่ได้ทำการ Sonicated แล้วมา 20 ไมโครลิตร และนำมาผสมกับ Dye 5 ไมโครลิตรและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปโหลดลงใน 12% separating gel โหลดตัวอย่างลงไปหลุมละ 15 ไมโครลิตร และโหลด Marker หลุมละ 2.5 ไมโครลิตร และใช้กระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมป์ต่อแผ่นเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสี Coomassie blue เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำเจลไปล้างด้วย Destain solution จนกว่าเจลจะใส และได้ผลการทดลองดังรูป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ชั่วโมงที่ 0 (a,b) , ชั่วโมงที่ 1 (c,d) , ชั่วโมงที่ 2 (e,f) , ชั่วโมงที่ 3 (g,h) ตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โดยใช้ความเข้มข้นของ Acrylamide 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250

จากการทำ SDS-PAGE พบว่า LB มีลักษณะแถบดีเอ็นเอในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 มีสีเข้มชัดเจน และแถบดีเอ็นเอที่พบได้ชัดเจนรองลงมาคือ TM2 พบแถบดีเอ็นเอแสดงชัดเจนในชั่วโมงที่ 1, 2, และ 3 ส่วนตัวอย่าง TM1 และ TM3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจนในชั่วโมงที่ 1, 2, และ 3 โดยพบว่าโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ มีขนาดโปรตีนประมาณ 18 kDa

จากการทดลองที่มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่ากากน้ำตาลสามารถนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกที่สามารถนำมาเลี้ยงเชื้อได้จริง(Marzieh Dehghan Shasaltaneh, Jamshid Fooladi, Seyedeh Zahra MoosaviNejad.2010) แต่การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากการเลี้ยงในอาหารที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ใช่อาหารที่มีสารอาหารครบถ้วนจะทำใช้เชื้อเจริญเติบโตได้น้อยเลยทำการเติมแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟตเข้าไปเพื่อให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้มากขึ้น (Ram Shankar Velur Selvamani , Karl Friehs , Erwin Flaschel .2014) โดยการเลี้ยงเชื้อแบบทางเลือกเป็นการประหยัดต้นทุนซึ่งสารอาหารอาจจะไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของเชื้อได้เท่ากับอาหาร LB แต่พบการแสดงออกของไซโคลฟิลินเอ โดยทำการตรวจสอบโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วยวิธีการ SDS-PAGE ซึ่งเป็นขั้นในการยืนยันผลการทดลองโดยการทดลองที่รายงานผลก่อนหน้าพบว่าไซโคลฟิลิน เอ มีขนาดโปรตีนอยู่ที่ประมาณ 18 kDa (สุภาวดี ง้อเหรียญ,กษิดิศ ดิษฐบรรจง,ชยานิจ ดิษฐบรรจง,พยุงศักดิ์ รวยอารี,หทัยรัตน์ อุไรรงค์.2010) และจากการทดลองของอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลและอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลที่เติมไนโตรเจนพบว่ามีแสดงของไซโคลฟิลิน เอ ที่มีขนาดโปรตีนประมาณ 18 kDa ด้วยเช่นกัน โดยอาหารทางเลือกเพื่อลดต้นทุนในการผลิตสามารถโดยใช้กากน้ำตาลแทนอาหาร LB ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่องานวิจัยหรือการต่อยอดอื่นๆได้ โดยกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น TM2 หรือกากน้ำตาล 1.5% ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตไซโคลฟิลิน เอ ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Colony Forming Unit : CFU) การวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay และการทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วยวิธี SDS-PAGE ของเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE23) ที่มีพลาสมิด pEt22b-PmCyclophilin A โดยมีการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Colony Forming Unit : CFU) ด้วยวิธี Dot pate จากนั้นทำการนับโคโลนี และสร้างกราฟการเจริญของเชื้อเพื่อหาช่วงเวลาในช่วง log phase มา Induce พบว่าการเจริญของเชื้อของ LB กับกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของที่ 1.5% มีการเจริญของเชื้อที่ใกล้เคียงกัน การวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay พบว่า ปริมาณโปรตีนของกากน้ำตาลที่ความเข้นข้น1.5% มีค่าใกล้เคียงกับ LB การทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับ คือ 0.75%, 1.5%, 3% และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LB เป็นชุดควบคุม ที่มีการบ่มด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-3 ชั่วโมง และทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากการตรวจสอบการเจริญของเชื้อพบว่าโปรตีนมีขนาด 18 kDa โดยพบการผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอปริมาณมากที่สุดในอาหาร LB และในกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1.5% ดังนั้นจึงเลือกกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นข้น 1.5% ทำการใส่แอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมลงไป โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร, 6 กรัมต่อลิตร, 12 กรัมต่อลิตรพบว่ากากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1.5% ที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัมต่อลิตร ที่ระยะการเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 2 ของการวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay และการทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วยวิธี SDS-PAGE มีการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกับ LB มากที่สุด ดังนั้นการใช้กากน้ำตาลที่เป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลที่มูลค่าต่ำมาเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน และมีการเติมแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเชื้อช่วยลดต้นทุนในการผลิต และสามารถนำไปต่อยอดในอนาคตได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองการเลี้ยงเชื้อโดยใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1.5% ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 6 g/L มีการเจริญเติบโตของเชื้อและผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ได้มากที่สุด เมื่อสังเกตจากการวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay และการทำ SDS-PAGE ในการทดลองครั้งนี้การเจริญของเชื้อที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงไม่แน่ชัด ควรใช้วิธีการวัดการเจริญอื่นๆ เช่น การตรวจสอบ

เอกสารนี้ [illegible] ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนที่เฉพาะจง (ELISA) เพื่อให้ทราบปริมาณ และคุณภาพที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบตะกอนของกากน้ำตาล และสีของกากน้ำตาลที่เป็นปัญหาในการวัดค่าดูดกลืนแสงอาจจะหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการหาการเจริญของเชื้อเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลินเอ โดยการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหาร : คีตภัทร ไชยธรรม ,ธนัช สัชฌุกรกุล ,ปิยนุช รัตนวรมณี

สุบงกช เหมือนวงศ์ธรรม. (2564). การศึกษาผลของการเติมน้ำตาลต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ใน Escherichia coli BL21(DE3). [Online]. เข้าถึงได้จาก http://ithesis-ir.su.ac.th/dspace/bitstream/123456789/4021/1/620920067.pdf

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ค่าทางน้ำตาลและสารอนุพันธ์. 2021. กากน้ำตาล ประโยชน์ และวิธีทำกากน้ำตาล. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.csdlabservices.com/2021/

Barbeau, J. (2018). Introduction to Recombinant Proteins - Crown Bioscience. Available: https://blog.crownbio.com/overview-recombinant-proteins

BioExplorer.net. (2022, August 22). Recombinant Proteins. Bio Explorer. Available: https://www.bioexplorer.net/recombinant-proteins.html/

Kai-Jiun Lo1, Sook-Kuan Lee1, Chi-Te Liu. (2020). Development of a low-cost culture medium for the rapid production of plant growthpromoting Rhodopseudomonas palustris strain PS3. Available: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371

Netinbag.com. (2022). โปรตีน Recombinant คืออะไร?. [Online]. Available: https://www.netinbag.com/th/science/what-is-a-recombinant-protein.html

Maria, Mac. 2006. Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol. Available: https://asm.org/getattachment

PANITSARA.S. 2022. Western blot. [Online]. Available: https://www.anhsci.com/wester

Wikipedia, the free encyclopedia. (2020). Cyclophilin. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclophilin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การทดสอบการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอนแบบไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1.5 % , 3 % และ 6 % และนำไปเลี้ยงเชื้อ โดยใส่หัวเชื้อลงไปในอาหาร 1 มิลลิลิตร และนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 1 ชั่วโมงและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

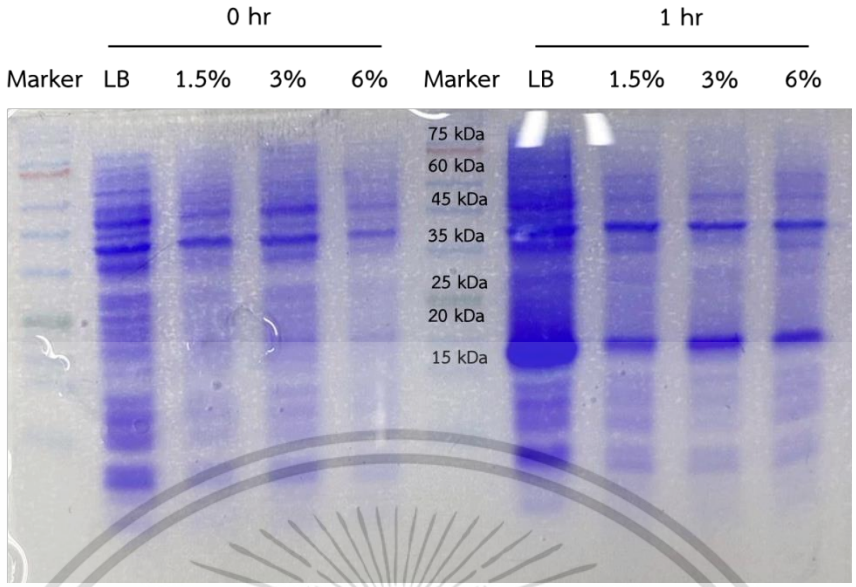
ตารางที่ ก.1 การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อไซโคลฟิลิน เอในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอนแบบไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต

Time (hr)	OD_{600} nm			
	LB control	1.5%	3%	6%
0	0.054	0.308	0.212	0.505
1.00	0.211	0.388	0.213	0.559
1.30	0.482	0.403	0.180	0.412
2.00	0.623	0.472	0.265	0.479
2.30	-	0.258	0.262	0.419
3.00	-	0.506	0.375	0.465
3.30	-	-	0.451	0.598
4.00	-	-	0.441	-
4.30	-	-	0.522	-

2. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนของ รีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ด้วยวิธี SDS-PAGE ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแหล่งคาร์บอนแบบไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต

นำตัวอย่างที่ได้เก็บมา 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงและเทอาหารออกจากนั้นเติม dye 5 ไมโครลิตร แล้วนำตัวอย่าง 15 ไมโครลิตรโหลดลงใน Separating gel 12% และ Stacking gel 5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(a)

(b)

รูปที่ ก.1 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 1 (a) , ชั่วโมงที่ 2 และ ชั่วโมงที่ 3 (b) ตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โดยใช้ความเข้มข้นของ Acrylamide 12% และนำไปย้อมโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250

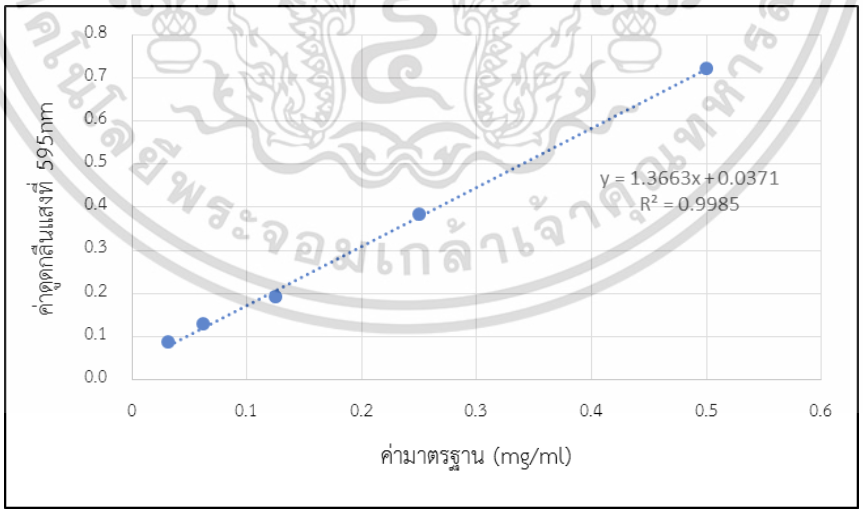
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่าอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงค่อนข้างนานแตกต่างจากอาหาร LB ที่เป็นชุดควบคุม จึงทำให้ผู้ทดลองตัดสินใจเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปเข้าไปเพื่อลดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อลง

3. การตรวจสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยวิธี Bradford protein assay ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อได้ทำการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ จากการทดสอบด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยง เชื้อที่มีความข้นต่างกันโดย LB+AMP เป็นชุดควบคุมและมีความเข้มข้นของอาหารกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตแบ่งเป็น 3 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้น TM1 (0.75 %) ความเข้มข้น TM2 (1.5%) และ ความเข้มข้น TM3 (3%) เมื่อเราทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ครบชั่วโมงที่ได้คำนวณจากกราฟหลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีหลังจากนั้นเติม IPTG ลงไปและวัดการเจริญของเชื้อนับทุกชั่วโมง ชั่วโมงที่ 0 , 1 , 2 , 3 จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางกับน้ำกลั่นให้ได้ 10 เท่า จากนั้นนำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมาหยอดในไมโครเวลเพลทหลุมละ 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นหลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1X Bradford 200 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ได้ผลดังนี้

3.1 กราฟมาตรฐานโปรตีน



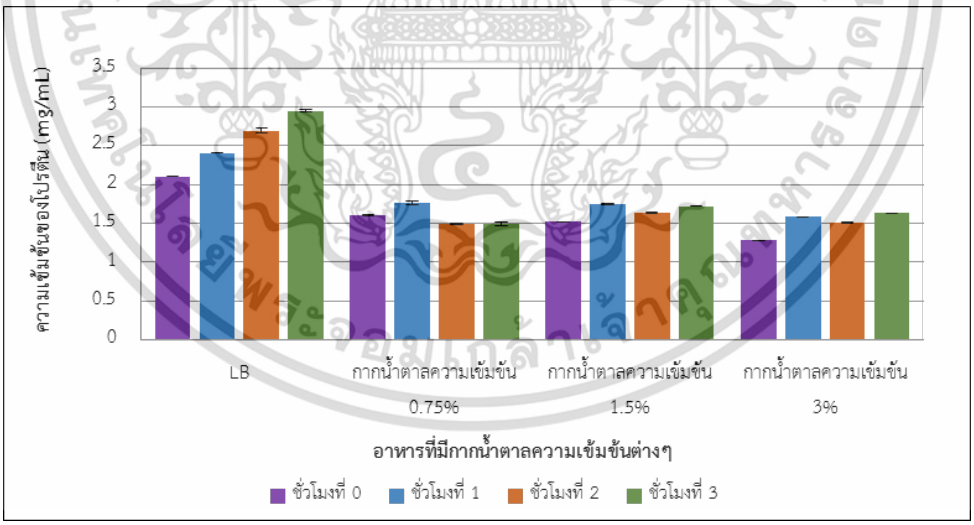
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานโปรตีนที่แสดงค่ามาตรฐาน (mg/ml) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 แสดงค่ามาตรฐานโปรตีนที่ได้จากการวัดเครื่องไมโครเพลทลีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

	Abs 595						
std mg/mL	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	avg	A595-B	Ripa	dilution factor	Pro. Conc. (mg/mL)
0	0.4238	0.4649	0.444350	0	0.3231	10	0
0.03125	0.5313	0.5295	0.530400	0.086050		10	0.86050
0.0625	0.5836	0.5609	0.572250	0.127900		10	1.27900
0.125	0.6324	0.6371	0.634750	0.190400		10	1.90400
0.25	0.7856	0.8704	0.828000	0.383650		10	3.83650
0.5	1.0787	1.2521	1.165400	0.721050		10	7.21050
1	1.4553	1.5257	1.490500	1.046150		10	10.46150

3.2 กราฟปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ ก.3 กราฟแสดงอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆกับความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	avg	A595-Ripa	y=1.366x+0.0371	dilution factor	Pro. Conc. (mg/mL)
LB0	0.56550	0.55610	0.56080	0.23770	0.210546373	10	2.105463734
LB1	0.58670	0.59540	0.59105	0.26795	0.240796373	10	2.407963734
LB2	0.59800	0.64120	0.61960	0.29650	0.269346373	10	2.693463734
LB3	0.66060	0.62980	0.64520	0.32210	0.294946373	10	2.949463734
0.75 0	0.50530	0.51600	0.51065	0.18755	0.160396373	10	1.603963734
0.75 1	0.54200	0.51000	0.52600	0.20290	0.175746373	10	1.757463734
0.75 2	0.49590	0.50350	0.49970	0.17660	0.149446373	10	1.494463734
0.75 3	0.51910	0.48040	0.49975	0.17665	0.149496373	10	1.494963734
1.5 0	0.50310	0.50190	0.50250	0.17940	0.152246373	10	1.522463734
1.5 1	0.52880	0.52050	0.52465	0.20155	0.174396373	10	1.743963734
1.5 2	0.50650	0.52010	0.51330	0.19020	0.163046373	10	1.630463734
1.5 3	0.52740	0.51770	0.52255	0.19945	0.172296373	10	1.722963734
3 0	0.47910	0.47730	0.47820	0.15510	0.127946373	10	1.279463734
3 1	0.50800	0.50920	0.50860	0.18550	0.158346373	10	1.583463734
3 2	0.50090	0.50130	0.50110	0.17800	0.150846373	10	1.508463734
3 3	0.51580	0.51050	0.51315	0.19005	0.162896373	10	1.628963734

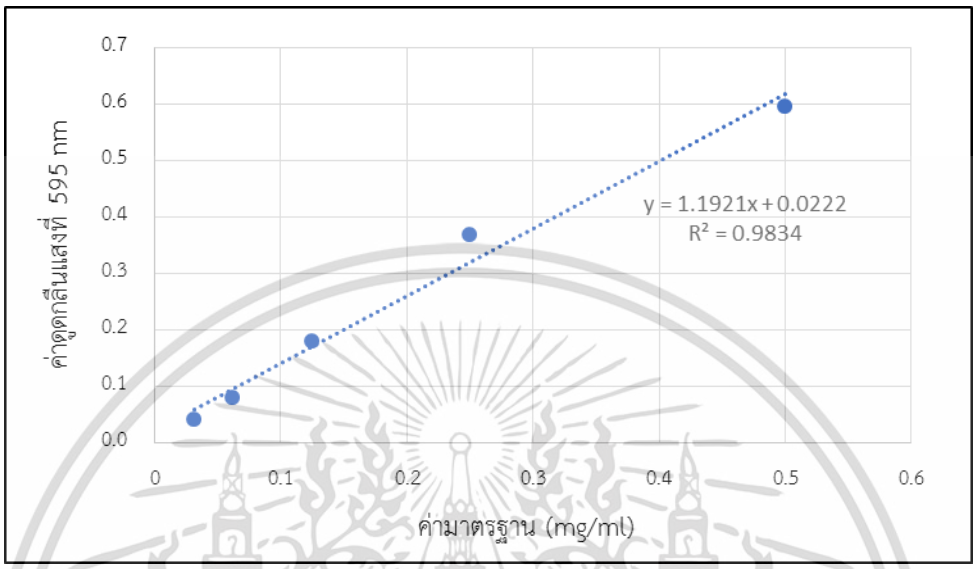
4. การตรวจสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยวิธี Bradford protein assay ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อได้ทำการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ จากการทดสอบด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยง เชื้อที่มีความข้นต่างกันโดย LB+AMP เป็นชุดควบคุมและมีความเข้มข้นของอาหารกากน้ำตาลคือ 1.5%จากนั้นทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตโดยแบ่งเป็น 3 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้น TM1 (3 กรัมต่อลิตร) ความเข้มข้น TM2 (6 กรัมต่อลิตร) และ ความเข้มข้น TM3 (12 กรัมต่อลิตร) เมื่อเราทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ครบชั่วโมงที่ได้คำนวณจากกราฟหลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียสบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีหลังจากนั้นเติม IPTG ลงไปและวัดการเจริญของ เชื้อนับทุกชั่วโมง ชั่วโมงที่ 0 , 1 , 2 , 3 จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางกับน้ำกลั่นให้ได้ 10 เท่า จากนั้นนำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมาหยอดในไมโครเวลเพลทหลุมละ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร และน้ำกลั่นหลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1X Bradford 200 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ได้ผลดังนี้

4.1 กราฟมาตรฐานโปรตีน



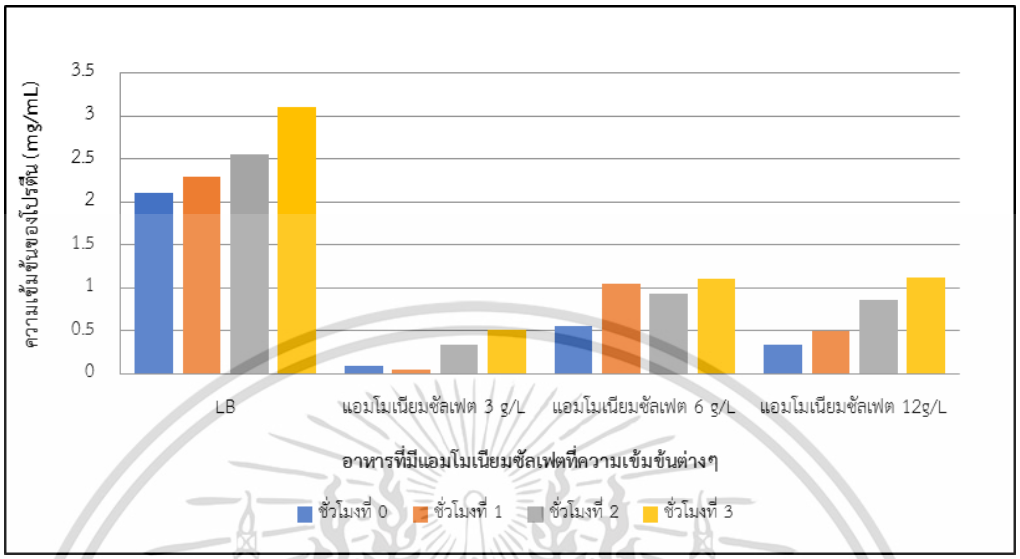
รูปที่ ก.4 กราฟกราฟมาตรฐานโปรตีนที่แสดงค่ามาตรฐาน (mg/ml) กับค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

ตารางที่ ก.4 แสดงค่ามาตรฐานโปรตีนที่ได้จากการวัดเครื่องไมโครเพลทลีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

	Abs 595						
std mg/mL	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	avg	A595-B	PBS	dilution factor	Pro. Conc. (mg/mL)
0	0.3697	0.335	0.352350	0	0.3468	10	0
0.03125	0.3960	0.3927	0.394350	0.04200		10	0.42000
0.0625	0.4406	0.4254	0.433000	0.08065		10	0.80650
0.125	0.5343	0.5301	0.532200	0.17985		10	1.79850
0.25	0.7147	0.7267	0.720700	0.36835		10	3.68350
0.5	0.9644	0.9307	0.947550	0.59520		10	5.95200
1	1.2434	1.2672	1.255300	0.90295		10	9.02950

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 กราฟปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ ก.5 กราฟแสดงอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆกับความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)

ตารางที่ ก.5 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	avg	A595-PBS	y=1.366x+0.0371	dilution factor	Pro. Conc. (mg/mL)
LB0	0.5617	0.5910	0.57635	0.2296	0.210927401	10	2.109274012
LB1	0.5417	0.6491	0.59540	0.2486	0.229977401	10	2.299774012
LB2	0.6235	0.6172	0.62035	0.2736	0.254927401	10	2.549274012
LB3	0.6617	0.6913	0.67650	0.3297	0.311077401	10	3.110774012
3 0	0.3784	0.3707	0.37455	0.0278	0.009127401	10	0.091274012
3 1	0.3427	0.3978	0.37025	0.0235	0.004827401	10	0.048274012
3 2	0.3967	0.4022	0.39945	0.0527	0.034027401	10	0.340274012
3 3	0.4051	0.4287	0.41690	0.0701	0.051477401	10	0.514774012
6 0	0.4126	0.4299	0.42125	0.0745	0.055827401	10	0.558274012
6 1	0.4755	0.4647	0.47010	0.1233	0.104677401	10	1.046774012
6 2	0.4501	0.4664	0.45825	0.1115	0.092827401	10	0.928274012
6 3	0.4811	0.4704	0.47575	0.1290	0.110327401	10	1.103274012
12 0	0.3992	0.4005	0.39985	0.0531	0.034427401	10	0.344274012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12 1	0.4093	0.4227	0.41600	0.0692	0.050577401	10	0.505774012
12 2	0.4562	0.4479	0.45205	0.1053	0.086627401	10	0.866274012
12 3	0.4599	0.4939	0.47690	0.1301	0.111477401	10	1.114774012

การเตรียมสารเคมี

1. **Coomassie brilliant blue R-250**

   ผงสี Coomassie brilliant blue R-250 0.5 กรัม

   Glacial acetic acid 50 มิลลิลิตร

   Methanol (ใส่เป็นลำดับสุดท้ายในตู้ดูดควัน) 250 มิลลิลิตร

   ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

2. **Destain solution**

   น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

   Methanol 400 มิลลิลิตร

   Acetic acid (ใส่เป็นลำดับสุดท้ายในตู้ดูดควัน) 100 มิลลิลิตร

3. **10X running buffer**

   Glycine 72 กรัม

   Tris base 15.1 กรัม

   SDS 5 กรัม

   ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 500 มิลลิลิตร

4. **1.5 M TRIS pH 8.8**

   ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

   Tris base 18.17 กรัม

   ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้ได้ 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณภูมิห้อง

5. **Luria-Bertani Medium (LB Medium)**

   ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

   peptone 10 กรัม

   Yeast extract 5 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NaCl 10 กรัม

ละลายส่วยนำผสมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมเป็นอาหารแข็งให้เติม

Agar 1.7 กรัม

6. **1 M TRIS pH 6.8**

ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Tris base 12.114 กรัม

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้ได้ 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. **10% sodium dodecyl sulphate (SDS)**

ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

SDS 10 กรัม

ละลาย SDS ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. **30% ammonium persulfate (APS)**

ในการเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

ammonium persulfate 10 กรัม

ละลาย ammonium persulfate ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. Ammonium sulfate

ในการเตรียมสารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Ammonium sulfate 0.15 กรัม

ละลาย Ammonium sulfate ด้วยกากน้ำตาลและปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

Ammonium sulfate 0.3 กรัม

ละลาย Ammonium sulfate ด้วยกากน้ำตาลและปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

Ammonium sulfate 0.6 กรัม

ละลาย Ammonium sulfate ด้วยกากน้ำตาลและปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาล

ในการเตรียมกากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

(0.75%)

กากน้ำตาล 1.88 มิลลิลิตร

(1.50%)

กากน้ำตาล 3.75 มิลลิลิตร

(3%)

กากน้ำตาล 7.5 มิลลิลิตร

(6%)

กากน้ำตาล 15 มิลลิลิตร

ในการเตรียมกากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ 50 มิลลิลิตรที่มีแหล่งไนโตรเจน ประกอบด้วย

(0.75%)

กากน้ำตาล 1.88 มิลลิลิตร

(1.50%)

กากน้ำตาล 3.75 มิลลิลิตร

(3%)

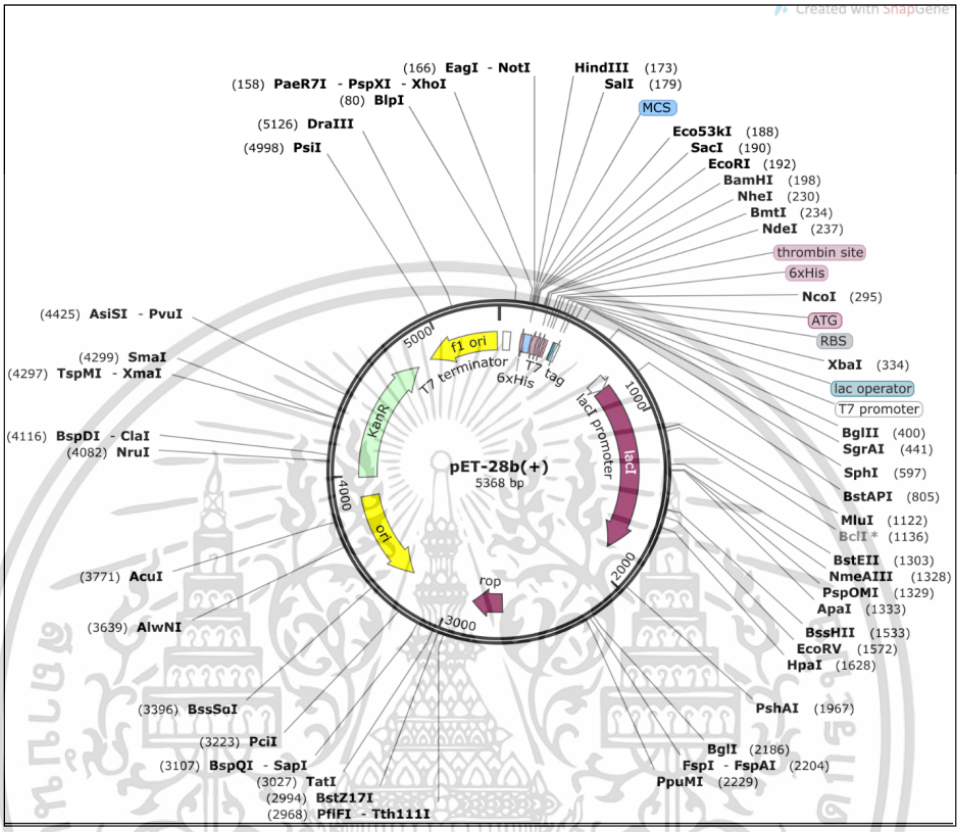
กากน้ำตาล 7.5 มิลลิลิตร

(6%)

กากน้ำตาล 15 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข



รูปที่ ข.1 แผนภาพเวกเตอร์

ที่มา : https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=pet_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-28b(%2B)&format=png

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในชั่วโมงที่ 0 ถึง 3

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในสภาวะต่างๆ ชั่วโมงที่ 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในสภาวะต่างๆ ชั่วโมงที่ 1 ที่มีการเติม IPTG

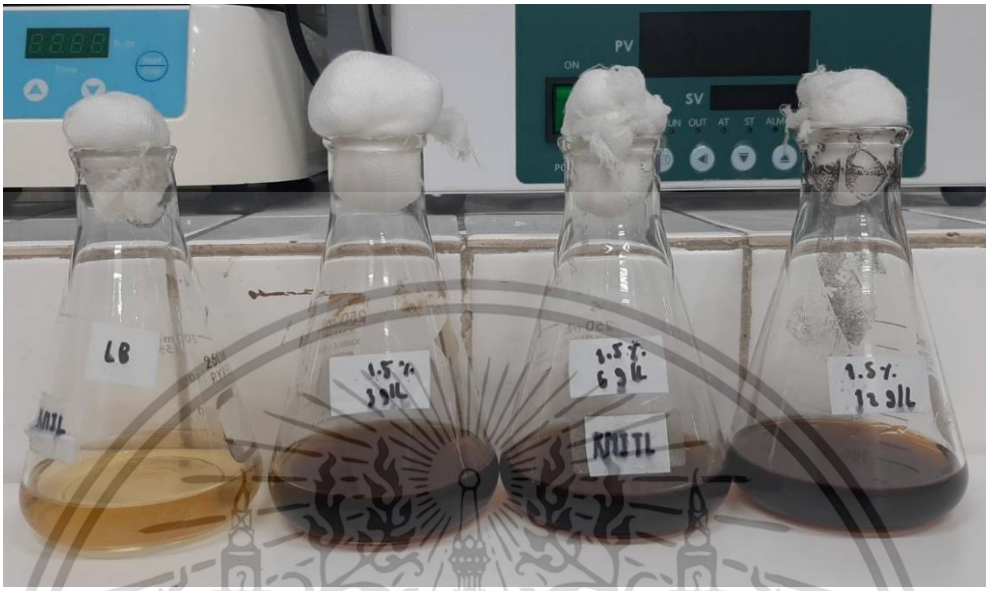
การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในสภาวะต่างๆ ชั่วโมงที่ 2 ที่มีการเติม IPTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในสภาวะต่างๆ ชั่วโมงที่ 3 ที่มีการเติม IPTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

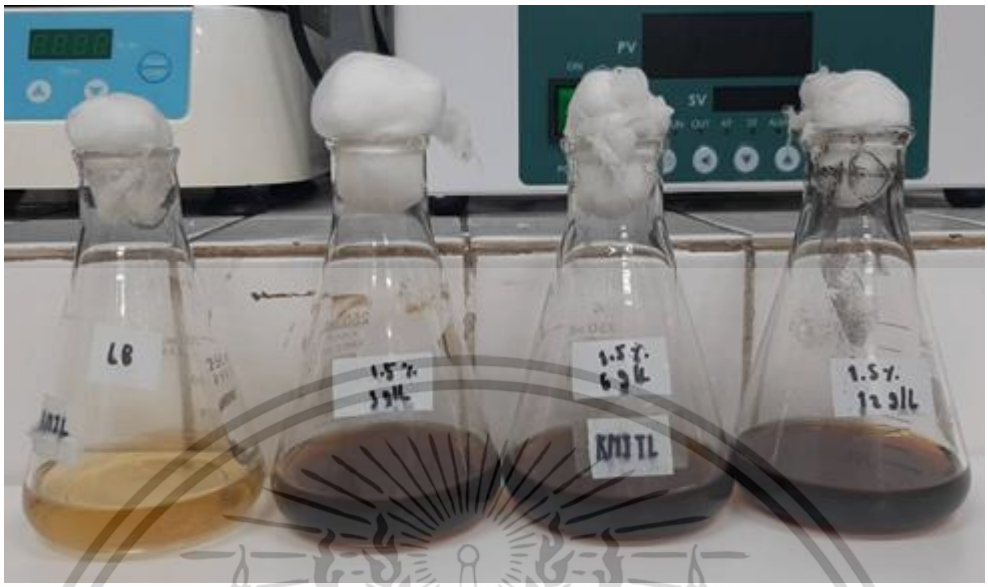
การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในชั่วโมงที่ 0 ถึง 3 ที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร, 6 กรัมต่อลิตร, 12 กรัมต่อลิตร



การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในสภาวะต่างๆ ชั่วโมงที่ 0 ที่มีการเติม IPTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในสภาวะต่างๆ ชั่วโมงที่ 1 ที่มีการเติม IPTG



การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในสภาวะต่างๆ ชั่วโมงที่ 2 ที่มีการเติม IPTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน เอ ในสภาวะต่างๆ ชั่วโมงที่ 3 ที่มีการเติม IPTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ

วันที่ 29 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2565

ข้าพเจ้า นางสาว กวินทิพย์มณี อินทร์แป้น รหัสประจำตัว 62050471

นางสาว ขวัญจิรา เรียงผา รหัสประจำตัว 62050474

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา วิทยาศาสตร์ ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไซโคลฟิลิน เอ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ชื่อภาษาอังกฤษ Production of recombinant protein Cyclophilin A using molasses as a carbon source

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.71%

ลงชื่อ.....กวินทิพย์มณี อินทร์แป้น..... ลงชื่อ.....ขวัญจิรา.....

(นางสาว กวินทิพย์มณี อินทร์แป้น) (นางสาว ขวัญจิรา เรียงผา)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....ธิปชัย วัฒนวิจารณ์.....

(ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้