รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

โครงการวิจัย เรื่อง การใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อผลิตเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการแบ่งตัวของเซลล์จากเมล็ดผลไม้ไทยใน *Pichia pastoris* GS115

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

อาจารย์ ดร.ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ
สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจากรศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวนิช ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. อภิชาติ กาญจนทัต ผู้ร่วมวิจัยโครงการสำหรับการคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยโครงการ น.ส.ธนพร วิชัย และนิสิตในความดูแล น.ส.วรรณพรรณ ภู่เล็กที่ช่วยวิจัยโครงการในนี้

นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณบุคคลากรทุกท่านในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือทุกๆอย่างจนรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้สำเร็จได้

และสุดท้ายนี้ขอขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2557 สำหรับทุนวิจัยในโครงการนี้ด้วย

บทคัดย่อ

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งธรรมชาติได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน เมล็ดผลไม้เป็นแหล่งสะสมอาหารซึ่งมีความเป็นไปสูงในการพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 2 สายจากเมล็ดลำไย ได้แก่ Longan 1 (ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF) และ Longan 2 (TLAMHYF) ทั้งนี้การสกัดจากธรรมชาติโดยตรงยังพบปัญหา เช่น ได้ปริมาณเปปไทด์ที่ต้องการน้อยแต่ใช้ตัวอย่างจำนวนมาก งานวิจัยนี้จึงเลือกเทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมาแก้ปัญหาเหล่านี้ โดยออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้ประกอบด้วยออกแบบนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสแล้วได้เป็นลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ Logan 1 เรียงต่อกัน 4 ชุด แต่ละชุดคั่นด้วยโคดอนกรดอะมิโนแอสพาร์ติก และเปปไทด์ Logan 2 เรียงต่อกัน 10 ชุด แต่ละชุดคั่นด้วยโคดอนกรดอะมิโนไลซีน เพื่อให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอยาวเพียงพอสำหรับการจัดการด้วยเทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล จากนั้นตัดต่อเข้าเวคเตอร์พาหะ pPICZαA และนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pasotoris GS115* เพื่อให้ *P. pasotoris* ผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ดังกล่าว โดยงานวิจัยนี้สามารถสร้าง *P. pasotoris* สายพันธุ์ TWLG1PP และ WPLG2 สำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 1 และ Logan 2 ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ TWLG1PP ได้รับการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ส่วน WPLG2 ได้ตรวจสอบความถูกต้องเบื้องต้นและกำลังอยู่ระหว่างยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนี้ *P.pastoris* ทั้งสองสายพันธุ์จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ และจะถูกตัดให้เป็นเปปไทด์สายสั้นเหมือนที่พบในเมล็ดลำไยด้วยเอนไซม์ Endoproteinase AspN สำหรับรีคอมบิแนนท์เปปไทด์จากสายพันธุ์ TWLG1PP และทริปซิน กับ Carboxyldase B สำหรับรีคอมบิแนนท์เปปไทด์จากสายพันธุ์ WGLG2 จากนั้นจะนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งต่อไป

คำสำคัญ: เปปไทด์, ลำไย, *P. pastoris*

ABSTRACT

Bioactive peptides from natural sources are currently favorable. Fruit seeds are sources of accumulated food, so there are potential sources for discovering bioactive peptides. In this research, two antioxidative peptides from longan seeds, Longan 1 (ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF) and Longan 2 (TLAMHYF) were selected. However, direct extraction of the peptides from natural sources encounters some problems such as low yield of peptide. To overcome these problems, molecular genetic technique is chosen in this research by designing DNA fragment containing 4 copies of the peptide Longan 1 linked by the codons of Aspartic acid and DNA fragment containing 10 copies of the peptide Longan 2 linked by the codons of Lysine in oder to obtain adequetly long peptides for being manipulated by molecular genetic teqnique. Then, both DNA fragments were inserted into the expression vector, pPICZαA and further integrated onto *P. pastoris* GS115 chromosome for producing those peptides. For this research, two strains of *P. pasotoris*, TWLG1PP and WPLG2, were constrcted for producing peptide Longan 1 and Longan 2, respectively. For the strain TWLG1PP, nucleotide sequence was already verified. However, the strain WPLG2 was preliminary verified while nucleotide sequence verification is in progress. Then, both strains will be induced to express recombinant peptides. The rerombinant petide from TWLG1PP strain will further cut by Endoproteinase AspN while that from WGLG2 will further cut by trypsin Carboxyldase B. Next, antioxidative and antiproliferative activities will be tested.

Keywords: peptides, longan, *P. pastoris*

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อ..... ข
ABSTRACT..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญภาพ..... ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 การทบทวนวรรณกรรม..... 1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย..... 3
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย..... 5
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย..... 5
1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย..... 6
1.6 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป..... 7
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 8
บทที่ 2 อุปกรณ์ วิธีดำเนินงานวิจัย..... 9
2.1 อุปกรณ์..... 9
2.2 จุลินทรีย์ พลาสมิด และไพรเมอร์..... 11
2.2.1 พลาสมิด..... 11
2.2.2 จุลินทรีย์..... 11
2.2.3 ไพรเมอร์..... 11
2.3 การคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจากเมล็ดผลไม้..... 12
2.4 การออกแบบนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ผลิตเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมล็ดผลไม้..... 12
2.5 การสร้าง *P. pastoris* สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมล็ดผลไม้..... 12
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 15

3.1 การคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจากเมล็ดผลไม้……..15
3.2 การออกแบบนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ผลิตเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมล็ดผลไม้…….....15
3.3 การสร้าง *P. pastoris* สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมล็ดผลไม้……...16
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ……..24
4.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล 24
4.2 ข้อเสนอแนะ 24
ภาคผนวก 26
บรรณานุกรม……...…….27
ประวัติผู้วิจัย 29

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งออกแบบสำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ได้จากเมล็ดลำไยซึ่งมีความเป็นไปได้ในการมีฤทธิ์ทางชีวภาพ……14
รูปที่ 3.1 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan1 และ Longan 2 ก่อนนำเข้าพลาสมิด pPicαA……18
รูปที่ 3.2 การตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการบนพลาสมิด pPicαA..... 19
รูปที่ 3.3 การตัด pWPLGα2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I..... 20
รูปที่ 3.4 หลักการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายบนพลาสมิด pPicZαA ลงบนโครโมโซมของ *P. pastoris*……21
รูปที่ 3.5 การทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโมโซมของ *P. pastoris*……..22
รูปที่ 3.6 การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์จากเทคนิค colony PCR เบื้องต้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiW*I……23

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

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

บทที่ 1

บทนำ

1.1 การทบทวนวรรณกรรม

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด เนื่องจากอนุมูลอิสระประกอบด้วยอิเล็คตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมทำให้มีความไม่คงตัวและว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา อนุมูลอิสระต้องการหาอิเล็คตรอนมาจับคู่เพื่อให้มีความคงตัว จึงสามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ เพื่อดึงอิเล็คตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอม หรือเข้าไปจับคู่กับอิเล็คตรอนของสารชีวโมเลกุลทำให้สมบัติของสารชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมากมาย เช่น โรคแก่กว่าวัย มะเร็ง อัลไซเมอร์ (Ames et al. 1993a, Ames et al. 1993b, Slater 1984) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังสามารถทำปฏิกิริยากับ LDL (Low- density lipoprotein) เกิดเป็น oxidized LDL ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว ทำให้เกิดโรคหัวใจ (Sinatra and DeMarco 1995)

อนุมูลอิสระเป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการเผาผลาญอาหารในร่างกาย เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายมาจากปฏิกิริยาที่ใช้ออกซิเจนจึงมีชื่อเรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (superoxide anion; $O_2^{\cdot-}$), ไฮโดรเปอร์ออกซิล แรดิคอล (hydroperoxyl radical; $HOO^{\cdot}$) และไฮดรอกซิล แรดิคอล (hydroxyl radical; $OH^{\cdot}$) ซึ่งร่างกายเองก็มีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ เช่น กระบวนการ oxidative stress ซึ่งกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) คาตาเลส (catalase; CAT) กลูตาไทโอน- เปอร์ซิเดส (glutathione peroxidase; GPx) (Barber et al. 2006) แต่เนื่องจากอนุมูลอิสระเกิดได้อย่างรวดเร็วและทำปฏิกิริยาอย่างว่องไว ประกอบกับวิถีการดำเนินชีวิตและธรรมชาติที่เปลี่ยนไป เช่น การรับประทานเนื้อสัตว์ปิ้งย่างที่มีไขมันสูง มลพิษทางอากาศ รังสียูวี ควันบุหรี่ ดังนั้นการรับสารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant) จากภายนอกจึงเป็นทางเลือกเพื่อลดการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายหรือลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระคือสารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชั่น ซึ่งสามารถพบได้ในองค์ประกอบของอาหาร เช่น วิตามินเอ ซีและอี ซิลิเนียม แคโรทีนอยด์ (Diplock 1991) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเปปไตด์เหล่านี้จะมีกรดอะมิโนวงแหวนอะโรมาติก เช่น ฟีนิลอะลานิน (Phenylalanine) ไทโรซีน (Thirosine) และทริปโตเฟน (Tryptophane) ที่สามารถให้โปรตอนแก่อนุมูลอิสระได้ ส่งผลให้อนุมูลอิสระนั้นถูกทำลายไป

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

เปปไตด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสกัดได้จากธรรมชาติกำลังได้รับความสนใจเพื่อใช้ในการผลิตเป็นยา อาหารเสริมสุขภาพ และผลิตภัณฑ์เสริมความงาม เนื่องจากผู้บริโภคตระหนักถึงความปลอดภัย จึงมีงานวิจัยหลากหลายในการหาเปปไทด์เหล่านี้จากธรรมชาติ เช่น เปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 1,000 ดาลตันที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นซึ่งสกัดจากถั่วแอลฟาฟา (Xie *et al.* 2008) ในพืชตระกูลถั่วอีกชนิดคือถั่วลิสง พบเปปไทด์ขนาด 3,000 ถึง 5,000 ดาลตันที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและการเข้าจับกับโลหะ ในปีค.ศ. 2010 มีรายงานการสกัดเปปไทด์จากเอนโดสเปิร์มของข้าวซึ่งพบว่าเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุล 959.5 ดาลตัน มีลำดับกรดอะมิโนคือ ฟีนิลอะลานิน- อาร์จินิน-กรดแอสพาติก-กรดกลูตามิก-ฮิสติดีน-ไลซีน-ไลซีน (Phe-Arg-Asp-Glu-His-Lys-Lys) และเปปไทด์ขนาด 1,002.5 ดาลตัน มีลำดับกรดอะมิโนคือ ไลซีน-ฮิสติดิน-กรดแอสพาติก-อาร์จินิน-ไกลซีน-กรดแอสพาติก-กรดกลูตามิค-ฟีนิลอะลานิน (Lys-His-Asp-Arg-Gly-Asp-Glu-Phe) (Zhang et al. 2010) นอกจากนี้ Cheng และคณะ พบเปปไทด์จากการย่อยมันฝรั่งด้วยเอลเคเลสที่มีที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดมีลำดับกรดอะมิโน คือ เซอรีน-เซอรีน-กลูตามีน-ฟีนิลอะลานิน-ไทโรซีน-ทริปโตเฟน (Ser-Ser-Glu-Phe-Thr-Tyr) ซึ่งตรงกับลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ metallocarboxypeptidase inhibitor และไอโซลูซีน-ไทโรซีน-ลิวซีน-ไกลซีน-กรดกลูตามิค (Ile-Tyr-Leu-Gly-Glu) ซึ่งกับลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ Lipoxygenase1 (Cheng et al. 2010)

สำหรับพืชที่พบในประเทศไทยมีการศึกษาในเช่น การสกัดโปรตีนจากลูกสมอไทยพบว่าโปรตีนพบว่าโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16 กิโลดาลตัน (Srivastava et al. 2012) การสกัดโปรตีนในว่านชักมดลูกพบโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นขนาดประมาณ 18 กิโลดาลตัน หรือในพืชวงศ์ขิง ซึ่งพบเปปไทด์ที่สามารถยับยั้ง angiotensin I-converting enzyme ซึ่งเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับโรคความดันโลหิตสูง ทั้งนี้ข้อได้เปรียบของประเทศไทยคือความหลากหลายทางชีวภาพ คนไทยมีการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรเหล่านี้มานานดังจะเห็นได้จากตำรับยาสมุนไพร หรืออาหารไทยที่อาจเรียกได้ว่าเป็นโภชนาการบำบัด แต่ทั้งนี้การศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชในประเทศไทยยังไม่เป็นที่หลากหลายนัก ผลไม้ไทยก็เป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจในการศึกษา เนื่องจากผลไม้ไทยมีความหลากหลายและมีเอกลักษณ์ทั้งในเรื่องรูปลักษณ์และรสชาติ นอกจากนี้ยังสามารถ

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

ปัญหาที่พบจากการสกัดสารจากตัวอย่างตามธรรมชาติคือสารที่ต้องการมักมีปริมาณน้อย ต้องใช้ตัวอย่างจำนวนมาก รวมทั้งการเก็บรักษาก็มีความสำคัญ หากตัวอย่างมีการเสียสภาพ สารที่ต้องการ เช่น โปรตีนก็มีการเสื่อมสภาพเช่นกัน ดังนั้นเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลจึงถูกนำมาใช้เพื่อการผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดผลไม้ให้มีประสิทธิภาพ ซึ่งยีสต์ *P. pastoris* เป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิต recombinant protein เนื่องจากมีความปลอดภัย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ซับซ้อน เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตเซลล์เดียวทำให้มีกระบวนการ post-translational modification ซึ่งทำให้โปรตีนที่ผลิตได้ใกล้เคียงกับโปรตีนต้นแบบ และโปรตีนที่สนใจนั้นจะถูกแสดงออกภายใต้การควบคุมของ *AOX1* promoter ซึ่งกระตุ้นได้ด้วยเมทานอลทำให้ง่ายในการควบคุมการแสดงออก (Li et al. 2007) เนื่องจากเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นเปปไทด์สายสั้น การตรวจสอบและตรวจติดตามเมื่อใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเป็นเรื่องที่ยุ่งยาก การแก้ปัญหาเรื่องนี้สามารถทำได้โดยให้นิวคลีโอไทด์ที่ผลิตเปปไทด์นี้มีจำนวนหลายชุดเรียงต่อกันเพื่อให้สายดีเอ็นเอที่ยาวขึ้น เมื่อนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนจะประกอบด้วยเปปไทด์สายยาวขึ้นประกอบด้วยเปปท์ที่ต้องการหลายสายเรียงต่อกัน เมื่อทำการตัดบริเวณที่กรดอะมิโนที่เชื่อมสายเปปไทด์เหล่านี้ก็จะได้เปปไทด์ที่ต้องการหลายสายในเวลาเดียวกัน ซึ่งตัวอย่างของการใช้เทคนิคดังกล่าวผลิตเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก เช่น การผลิตเปปไทด์ที่เป็นสารแต่งรสเนื้อ (Wang, Yanping et al. 2011, Zheng et al. 2010) เปปไทด์ Gsp ซึ่งพบในรากโสมและใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน (Yan et al. 2003) เทคนิคที่กล่าวมาจะช่วยให้การผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและ/หรือต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่พบจากเมล็ดผลไม้ไทยมีประสิทธิภาพ โดยเปปไทด์เหล่านี้สามารถต่อยอดไปใช้ในอุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม อาหารเสริมสุขภาพ หรือผลิตภัณฑ์เสริมความงามต่อไปได้

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อนุมูลอิสระ เช่น ไฮดรอกซิล แรดิคอล (hydroxyl radical; $OH^{\bullet}$) ซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออน (superoxide anion; $O_2^{\bullet-}$) ไฮโดรเปอร์ออกซิล แรดิคอล (hydroperoxyl radical; $HOO^{\bullet}$) และแอลคอกซิล แรดิคอล (alkoxyl radical; $RO^{\bullet}$) เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการใช้ออกซิเจนเผาผลาญอาหารแบบใช้ออกซิเจน โดยอนุมูลอิสระมีอิเลคตรอนอิสระที่อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุลทำให้มี

ความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา รวมทั้งปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลสำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ โดยความเสียหายที่เกิดขึ้นเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ความดันโลหิตสูง มะเร็ง และโรคแก่ก่อนวัย (aging) เป็นต้น โดยปกติแล้วร่างกายมีกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่จะทำอันตรายต่อสารประกอบและเนื้อเยื่อในเซลล์ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ทั้งนี้เนื่องจากอนุมูลอิสระเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วประกอบกับพฤติกรรมในการใช้ชีวิตทำให้ร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจากภายนอกในปริมาณมากขึ้น เช่น การรับประทานอาหารปิ้งย่างที่ประกอบด้วยเนื้อสัตว์ที่มีไขมันสูง การรับประทานอาหารประเภททอดที่ใช้ความร้อนสูง รวมถึงมลพิษและรังสียูวี ทำให้ร่างกายได้รับอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ร่างกายจะกำจัดได้ทัน การรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่นจากอาหาร จึงเป็นหนทางในการควบคุมและป้องกันความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ องค์ประกอบที่พบในอาหาร เช่น วิตามินเอ ซี และอี รวมทั้งแคโรทีนอยด์ สามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถชะลอความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระก็ได้รับการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะมีกรดอะมิโนชนิดวงแหวนอะโรมาติกที่สามารถให้โปรตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ โดยช่วงหลายปีที่ผ่านมา เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้ได้พัฒนาเพื่อการผลิตยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมความงามจำนวนมาก นอกจากจะมีประสิทธิภาพสูงในการรักษาแล้ว ยังพบว่ามีผลข้างเคียงน้อย ซึ่งเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้สามารถสกัดได้จากพืช เช่น ถั่ว ดอกทานตะวัน แปะก๊วย เป็นต้น นอกจากนี้พืชสมุนไพรไทยหลายชนิด เช่น ไพลดำ ว่านชักมดลูก ขมิ้นดำ ลูกเนียง ได้รับการวิจัยจากห้องปฏิบัติการวิจัยด้านโปรตีนและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ว่าเป็นแหล่งของโปรตีน โปรตีนไฮโดรไลเสตและเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพมาก ทั้งนี้รวมถึงผลไม้ไทยที่มีความหลากหลายและมีชื่อเสียงไปทั่วโลกถึงรสชาติ และคุณค่าทางโภชนาการ ด้วยความอุดมสมบูรณ์ของผลไม้นานาชนิดที่มีให้รับประทานตลอดปี การแปรรูปผลไม้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตผลการเกษตรเหล่านี้ อุตสาหกรรมการแปรรูปผลไม้ทำให้เกิดทิ้งเมล็ดผลไม้จำนวนมาก ซึ่งเมล็ดผลไม้เหล่านี้มีความเป็นไปได้ว่าจะมีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการ เนื่องจากเมล็ดเป็นแหล่งสะสมอาหารเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ โดยโครงการวิจัยนี้สนใจหาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต้านอนุมูลอิสระและต้านการแบ่งตัวของเซลล์จำพวกเซลล์มะเร็ง จากเมล็ดผลไม้ที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการแปรรูปผลไม้ เช่น มะละกอ ลิ้นจี่ ลำไย ทั้งนี้ปัญหาจากการสกัดสารจากธรรมชาติรวมถึงเปปไทด์จากเมล็ดผลไม้คือ สารที่ต้องการมีปริมาณน้อยจึงต้องใช้ปริมาณตัวอย่างจำนวนมากใน

การสกัด นอกจากนี้การเก็บรักษาตัวอย่างก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญ นอกจากต้องมีสถานที่เก็บตัวอย่างเหมาะสม การเก็บตัวอย่างเป็นเวลานานทำให้เกิดการเน่าเสียและการเสื่อมสภาพของตัวอย่างซึ่งส่งผลต่อการสกัดด้วย ดังนั้นเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลจะถูกนำมาใช้เพื่อใช้ในการผลิตเปปไทด์ที่ต้องการในปริมาณมาก โดยใช้ยีสต์ *Pichia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่ง *P. pastoris* เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตเซลล์เดียวที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว มีความปลอดภัย หรือ GRAS (Generally Recognized as Safe) มีโปรโมเตอร์ที่แข็งแรงและสามารถกระตุ้นได้ด้วยเมทานอลเพื่อให้ยีนที่สนใจแสดงออก ทั้งนี้เปปไทด์ดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมความงามต่อไป รวมทั้งกระบวนการผลิตนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสารและเปปไทด์อื่นๆที่ต้องการได้เช่นกัน

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะสมบัติและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเปปไทด์ที่สกัดได้จากเมล็ดผลไม้ไทย เช่น มะละกอ ลิ้นจี่ ลำไย ในการต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

2.ใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อให้ *P .pastoris* ผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

3.เปรียบเทียบลักษณะสมบัติของเปปไทด์ที่สกัดได้จากเมล็ดผลไม้กับเปปไทด์ที่แสดงออกใน *P. pastoris*

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในปีงบประมาณ 2557 โครงงานจะครอบคลุมถึงการคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจากเมล็ดผลไม้ และการสร้างสายพันธุ์ *P. pastoris* สำหรับการสร้างเปปไทด์ดังกล่าว โดยการคัดเลือกเปปไทด์ได้มาจากการนำเมล็ดผลไม้ไทย เช่น มะละกอ ลิ้นจี่ ลำไย ที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ ถูกนำมาเตรียมเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยการย่อยโปรตีนหยาบด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนเครติน (pancreatin) ซึ่งจำลองมาจากระบบการย่อยอาหารในมนุษย์ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการต้านออกซิเดชันด้วยสาร DPPH (Sharma and Bhat 2009) จากนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะถูกบริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันและเทคนิคโครมาโตรกราฟี เช่น โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หลังจากตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนแล้ว โปรตีนไฮโดรไลเสตนี้ได้ถูกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี และคัดเลือกเปปไทด์ที่คาดว่ามีความเป็นไปได้ในการต้านอนุมูลอิระและ/หรือต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งซึ่ง

พิจารณาจากลำดับกรดอะมิโน จากนั้นทำการสร้าง *P. pastoris* สำหรับการสร้างเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการแปรกลับลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่คาดว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อทำการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์แล้วจะตัดต่อนำเข้าเวคเตอร์พาหะ pPicZαA (Invitrogen Inc., USA) เพื่อนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากเปปไทด์ที่ต้องการเป็นโปรตีนที่ผ่านการย่อยมาแล้วบางส่วนทำให้เป็นเปปไทด์สายสั้น การสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้นมักประสบปัญหา เช่น การตรวจสอบและการตรวจติดตาม การแก้ปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้โดยทำให้สายเปปไทด์ยาวขึ้น ทั้งนี้นิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้จะถูกออกแบบให้เรียงต่อกัน 4-10 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดจะคั่นด้วยรหัสโคดอนของกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) เพื่อให้ตัดเปปไทด์สายยาวนี้ได้ด้วยเอนไซม์ทริปซินและ Carboxypeptidase B (Zheng *et al.* 2010) หรือรหัสโคดอนของกรดแอสปาติก (Aspartic acid) เพื่อให้ตัดเปปไทด์สายยาวนี้ได้ด้วยเอนไซม์ Endoproteinase AspN

ดังนั้นใน 1 สายของนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น เมื่อทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วจะประกอบด้วยเปปไทด์ที่ต้องการ 4-10 สาย นิวคลีโอไทด์นี้อยู่ภายใต้การควบคุมของ *AOX1* promoter ซึ่งกระตุ้นได้ด้วยเมทานอล นอกจากนี้เวคเตอร์พาหะ pPicZαA ยังประกอบด้วย α-factor ของ *Sacchromyces cerevisiae* ซึ่งทำให้เปปไทด์ที่ต้องการหลั่งออกนอกเซลล์ (Kjeldsen et al. 1999) และประกอบด้วย His-Tag ซึ่งทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นโครงการต่อเนื่อง ในปีงบประมาณ 2558 จะศึกษาการผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ในระดับ Shake flask หลังจากสกัดและทำให้บริสุทธิ์แล้ว เปปไทด์สายยาวที่ได้จากการผลิตในยีสต์จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ทริปซินและ Carboxypeptidase B หรือ Endoproteinase AspN เพื่อให้ได้เปปไทด์สายสั้นดังที่พบและสกัดได้จากเมล็ดผลไม้ จากนั้นนำไปหาค่าความเข้มข้น ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยการต้านออกซิเดชันด้วยสาร DPPH และทดสอบฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ไลน์มะเร็งในมนุษย์ เพื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของเปปไทด์ที่สกัดได้จากเมล็ดผลไม้โดยตรง นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเปปไทด์ในยีสต์ เช่น อุณหภูมิ แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของเมทานอลที่ใช้กระตุ้นก็จะทำการศึกษาด้วย

1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากเมล็ดพืชเป็นแหล่งสะสมอาหารเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ ดังนั้นจึงควรพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากการสกัดสารจากธรรมชาติ เช่น การเน่าเสียของตัวอย่างที่เก็บรักษาไม่ดี การใช้ตัวอย่างในการสกัดจำนวนมาก นิวคลี

โอไทด์ที่สร้างเปปไทด์นี้จะตัดต่อด้วยเทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลใส่ลงบนโครโมโซมและให้แสดงออกในยีสต์ *P. pastoris* โดยเปปไทด์ที่ผลิตจากยีสต์ควรมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใกล้เคียงกับเปปไทด์ซึ่งสกัดได้จากเมล็ดพืช แต่ปริมาณที่สกัดได้จากยีสต์ควรมีมากกว่าและการสกัดทำได้ง่ายกว่าเพราะพลาสมิดพาหะที่นำนิวคลีโอไทด์แทรกลงบนโครโมโซมของ *P. pastoris* มี α- factor ทำให้เปปไทด์ที่ผลิตได้จากยีสต์หลั่งออกมานอกเซลล์อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ไม่จำเป็นต้องทำเซลล์ให้แตก

1.6 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

ในปีงบประมาณ 2557 โครงงานจะครอบคลุมถึงการคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจากเมล็ดผลไม้ และการสร้างสายพันธุ์ *P. pastoris* สำหรับการสร้างเปปไทด์ดังกล่าว

1. การคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจากเมล็ดผลไม้ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.อภิชาติ กาญจนทัต สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยในขั้นตอนการคัดเลือกประกอบด้วย
   - การเตรียมโปรตีนหยาบจากเมล็ดผลไม้ไทย เช่น มะละกอ ลิ้นจี่ ลำไย โดยนำตัวอย่างเมล็ดผลไม้ไทยมาบดในสารละลายบัฟเฟอร์ นำมากรอง ปั่นแยกส่วนใส ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต นำมาไดอะไลซีสเพื่อให้ได้ส่วนโปรตีนหยาบ
   - การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยการนำโปรตีนหยาบมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนครีเอติน (pancreatin) ซึ่งเป็นเอนไซม์จากกะเพาะและตับอ่อนที่พบในระบบย่อยอาหารของมนุษย์
   - การนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปแยกตามขนาดด้วยวิธี ultrafiltration
   - การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบการยับยั้งออกซิเดชันด้วยสาร DPPH, ABTS assay, NO assay และ H2O2 assay
   - การทำโปรตีนไฮโดรไลเสตให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค High Performanece Liquid Chromotography (HPLC) และพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีนไฮโดรไลเสตโดย mass spectrometer
2. การสร้างสายพันธุ์ *P. pastoris* สำหรับการสร้างเปปไทด์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้
   - สั่งสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ที่แปรรหัสแล้วได้เป็นลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (IDT, USA) โดยให้โดยประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเปปไทด์นี้เรียงต่อกัน 4-10 ชุด แต่ละชุดคั่นด้วยกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) หรือกรดแอสปาติก (Aspartic acid) แล้วตัดต่อเข้าเวคเตอร์พาหะ pPICZαA (Invitrogen, USA) จากนั้นนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pasotoris* GS115 ด้วยชุด *Pichia* EasyComp^{TM} Transformation Kit (Invitrogen, USA)

- ตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ด้วยวิธี colony PCR, การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ DNA Sequencing (Macrogen, Korea)

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลงานที่ได้สามารถนำไปจดสิทธิบัตรและ/หรือเผยแพร่ในวารสารหรืองานประชุมวิชาการได้

2. การผลิตจะได้เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในปริมาณมากขึ้น มีกระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพ และมีแนวโน้มที่จะมีความคุ้มทุน โดยเปปไทด์เหล่านี้สามารถนำไปต่อยอดในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น เภสัชกรรม อาหารเสริม เครื่องสำอาง และเทคนิคการผลิตนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตโปรตีนเปปไทด์และสารอื่นๆ ด้วย

บทที่ 2

อุปกรณ์ วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์

เครื่อง PCR	Applied Biosystems, Singapore
(Polymerase Chain Reaction Thermocycer)	
เครื่องเขย่าผสมรุ่น Vortex-Genie2	Scientific Industries, USA
(Vortex mixer: model Vortex-Genie2)	
เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ	New Brunswick Scientific, USA
(Refrigerated incubator shaker : model Innova 4330)	
เครื่องชั่งแบบละเอียดรุ่น FX-180	A&D Co., Ltd., Japan
(Electronic balance : model FX-180)	
เครื่องชั่งแบบหยาบ รุ่น FX-3000	A&D Co., Ltd, Japan
(Electronic balance : model FX-3000)	
เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงยูวี	UVItec, UK
(Uvitec Platinum Gel Documentation system)	
เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ	Kubota cooperating, Japan
(Refrigerated high speed centrifuge)	
เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอด micro-tube ความเร็วสูงรุ่น MTX-150	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
(High speed micro refrigerated centrifuge : model MTX-150)	
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo, USA
(pH meter)	
เครื่องวิ่งเจลอะกาโรส	ADVANCE Co., Ltd., Japan

(Agarose gel electrophoresis equipments)	
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ	Taladlab, Thailand
(Autoclave)	
เครื่องอังน้ำ	Yamato, Japan
(Water bath)	
ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล	MACHEREY-NAGEL, Germany
(NucleoSpin® Extract II Kits)	
ชุดสกัดพลาสมิด	MACHEREY-NAGEL, Germany
(NucleoSpin® plasmid)	
ชุดนำดีเอ็นเอเข้าสู่โครโมโซม *P. pastoris*	Invitrogen, USA
(*Pichia* EasyComp™ Transformation Kit)	
ตู้แช่แข็ง –20°C	Sanyo, Japan
(Freezer –20°C)	
ตู้แช่แข็ง –70°C	Sanyo, Japan
(Freezer –70°C)	
ตู้ปลอดเชื้อรุ่น HF safe-12006	Heal Force, China
(Laminar flow: model HF safe-12006)	
ตู้เพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37°C	Sanyo, Japan
(Growth cabinet)	
ตู้อบแห้งรุ่น UNB-400	Memmert Co.,Ltd., Germany
(Oven : model UNB-400)	
ไมโครปิเปตรุ่น Discovery Comfort	Mettler Toledo, USA
(Micro auto pipette: model Discovery Comfort)	

2.2 จุลินทรีย์ พลาสมิด และไพรเมอร์

2.2.1 พลาสมิด

pPicZαA	Invitrogen, USA
pLG1αA	Plasmid pPicZαA ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างเปปไทด์ Longan1
pWPLGα2	Plasmid pPicZαA ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างเปปไทด์ Longan2

2.2.2 จุลินทรีย์

E. coli competent cells สายพันธุ์ Super 10^9 HIT-DH5a	RBC Bioscience, Taiwan
P. pastoris GS115	อ.ดร.ศรินทิพ สุกใส, สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
TWLG1PP	*P. pastoris* ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างเปปไทด์ Longan1
WPLG2	*P. pastoris* ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างเปปไทด์ Longan2

2.2.3 ไพรเมอร์

AOX1 forward	GACTGGTTCCAATTGACAAG
AOX1 reverse	GCAAATGGCATTCTGACATCC
L1F	CTCGAGAAAAGAGATATTAG
L1R	CTCGAGCGTACGGTCGAAACC
L2F	CTCGAGAAAAGAACCCTCGCG
L2R	CTCGAGCGTACGCTTGAAGTAG

2.3 การคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจากเมล็ดผลไม้

เมล็ดผลไม้ ได้แก่ เมล็ดลำไย (*Diomocarpus longan* Lour. subsp.) ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) เงาะ (*Nephelium lapppaceum* L.) และมะละกอ (*Carica papaya* L.) ทั้งแบบสุกและไม่สุก จากโรงงานบริษัทมาลี สามพรานและบริษัทกลุ่มกิมจั๊ว นำมาล้างและปั่นใน phosphate buffer pH 7.2 ในอัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดต่อ phosphate buffer 1:5 ด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำไปคนที่ 4^{O}C เป็นเวลา12 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยผ้าและปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate และนำเกลือออกด้วยวิธี dialysis นำโปรตีนในส่วนนี้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze drying แล้วเก็บไว้เป็นส่วนโปรตีนหยาบ (Crude protein) จากนั้นเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate) โดยนำส่วนโปรตีนหยาบไปย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin และ Pancreatin ซึ่งเป็นการจำลองระบบย่อยอาหารของมนุษย์ แล้วนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปแยกตามขนาดด้วยวิธี ultrafiltration ด้วยขนาดเมมเบรนน้อยว่า 5,000 และ 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเมล็ดผลไม้ดังกล่าวไปทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ได้แก่ DPPH assay, ABTS assay, NO assay และ H2O2 assay แล้วนำโปรตีนส่วนที่ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดในทุกการทดสอบไปแยกด้วย HPLC และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย mass spectrometer

2.4 การออกแบบนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ผลิตเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมล็ดผลไม้

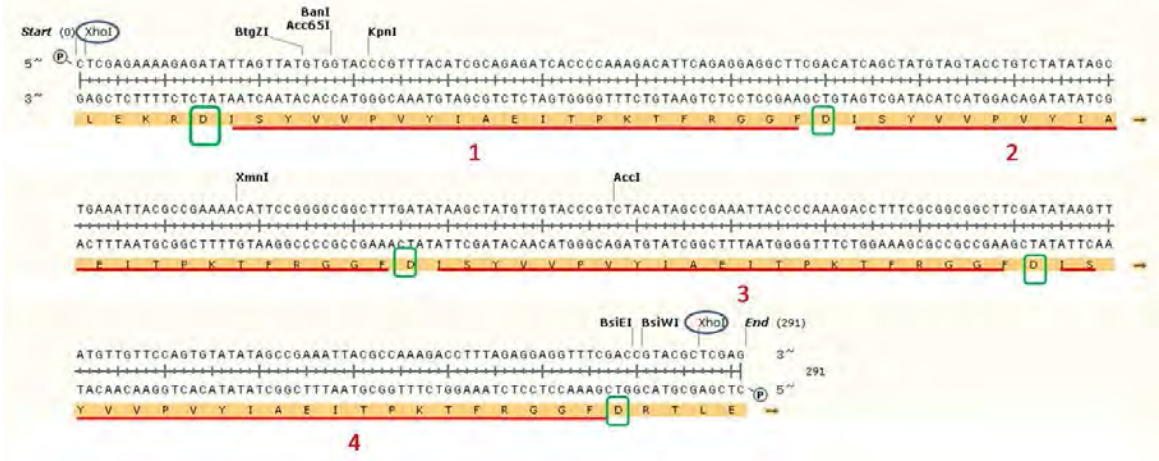
เปปไทด์ที่น่าสนใจและคาดว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพมี 2 ตัวได้แก่ Longan 1 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคือ คือ ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF และ Longan 2 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคือ TLAMHYF เนื่องจากเปปไทด์ Longan 1 และ Longan 2 เป็นเปปไทด์สายสั้น ทำให้เกิดความยุ่งยากในการตรวจติดตามเมื่อการใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบให้เปปไทด์สายดังกล่าวยาวขึ้นโดยการออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของเปปไทด์ Longan 1 ให้เรียงต่อกัน 4 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดจะคั่นด้วยรหัสโคดอนของกรดอะมิโนกรดแอสปาติก (Aspartic acid) (รูปที่ 2 ก) ส่วนเปปไทด์ Longan 2 การออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของเปปไทด์นี้ให้เรียงต่อกัน 10 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดจะคั่นด้วยรหัสโคดอนของกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) (รูปที่ 2 ข)

2.5 การสร้าง *P. pastoris* สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมล็ดผลไม้

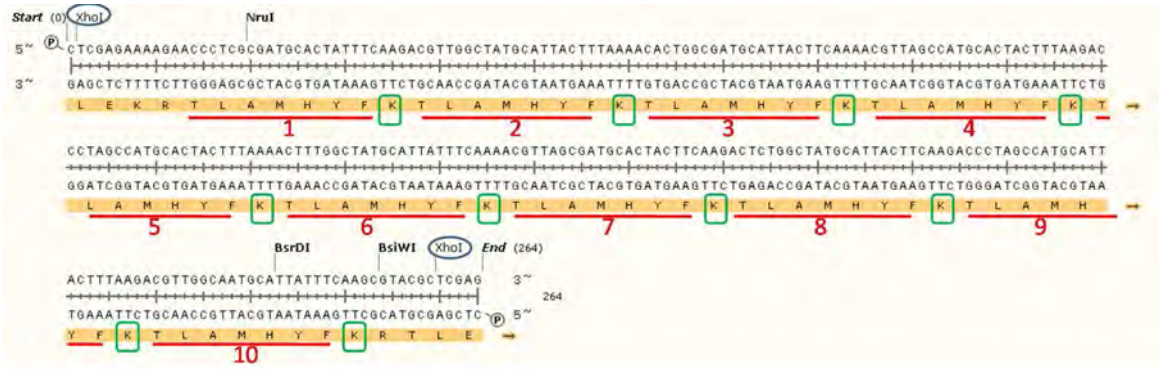
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับใช้ผลิตเปปไทด์ Longan 1 และ Longan 2 ได้ส่งไปทำการสังสังเคราะห์และได้รับมาดดยอยู่บนพลาสมิด pIDT-blue (IDT, USA) ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัด

จำเพาะ *Xho*I แล้วนำไปเชื่อมติดกับพลาสมิด pPicZαA ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์เดียวกันด้วยเทคนิค DNA Ligation ซึ่งใช้เอนไซม์ T4 Ligase นำปฏิกิริยา Ligation เข้าสู่เซลล์ *E. coli* competent cells สายพันธุ์ Super 10^{9} HIT-DH5a ด้วยเทคนิค Chemical Transformation แล้วคัดเลือกโคโลนีซึ่งโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Low salt LB ซึ่งมี Zeocin เข้มข้น 25 µg/ml จากนั้นทำการสกัดลาสมิดและตรวจสอบความถูกต้องด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiW*I และ DNA sequencing (Macrogen, Korea) จากนั้นนำพลาสมิดที่ถูกต้องไปตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I ให้เป็นเส้นตรง แล้วนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ด้วยชุด *Pichia* EasyComp™ Transformation Kit (Invitrogen, USA) แล้วคัดเลือกโคโลนีซึ่งโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ซึ่งมี Zeocin เข้มข้น 100 µg/ml ตรวจสอบความถูกต้องด้วยเทคนิค colony PCR ซึ่งเป็นการคัดเลือกโคโลนีมาทำการย่อยผนังเซลล์ของ *P. pastoris* ด้วยเอนไซม์ Lyticase ที่ 37^{O}C เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g นำส่วนใสซึ่งมีดีเอ็นเอมาเป็นต้นแบบในการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse สำหรับ Longan 1 ตรวจสอบเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ L1F กับ L1R และ Longan 2ใช้ไพรเมอร์ L2F กับ L2R ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse นำมาสกัดออกจากเจลแล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiW*I และ DNA sequencing (Macrogen, Korea)

ก.



ข.



รูปที่ 2.1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งออกแบบสำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ได้จากเมล็ดลำไยซึ่งมีความเป็นไปได้ในการมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (ก.) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์เปปไทด์ Longan 1 สามารถถอดรหัสได้เป็น ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF เรียงต่อกัน 4 ชุด แต่ละชุดคั่นด้วยกรดแอสปาติก (Aspartic acid) (ข.) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์เปปไทด์ Longan 2 สามารถถอดรหัสได้เป็น TLAMHYF เรียงต่อกัน 10 ชุด แต่ละชุดคั่นด้วยไลซีน (Lysine)

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจากเมล็ดผลไม้

การทดลองในส่วนนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.อภิชาติ กาญจนทัต สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้ทำการทดลองโดยใช้เมล็ดลำไย (*Diomocarpus longan* Lour. subsp.) ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) เงาะ (*Nephelium lapppaceum* L.) และมะละกอ (*Carica papaya* L.) ทั้งแบบสุกและไม่สุก ในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate) โดยนำส่วนโปรตีนหยาบไปย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin และ Pancreatin ซึ่งเป็นการจำลองระบบย่อยอาหารของมนุษย์ เมื่อแยกโปรตีนไฮโดรไลเสตตามขนาดด้วยวิธี ultrafiltration ด้วยขนาดเมมเบรนน้อยว่า 5,000 และ 10,000 ดาลตัน ซึงได้โปรตีนไฮโดรไลเสตน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน ระหว่าง 5-10 กิโลดาลตันและมากกว่า 10 กิโลดาลตัน และนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ได้แก่ DPPH assay, ABTS assay, NO assay และ H_2O_2 assay พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเมล็ดลำไยน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตันให้ผลการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดในทุกการทดสอบ เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเมล็ดลำไยน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตันนี้ไปแยกด้วย HPLC และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย mass spectrometer พบเปปไทด์ที่น่าสนใจ 2 สาย ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคือ ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF (ตั้งชื่อว่า Longan 1) และ TLAMHYF (ตั้งชื่อว่า Longan 2)

3.2 การออกแบบนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ผลิตเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมล็ดผลไม้

เนื่องจากเปปไทด์ Longan 1 และ Longan 2 เป็นเปปไทด์สายสั้น ทำให้เกิดความยุ่งยากในการตรวจติดตามเมื่อการใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ดังกล่าวจาก *P. pastoris* คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบให้เปปไทด์สายดังกล่าวยาวขึ้นโดยการออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของเปปไทด์ Longan 1 ให้เรียงต่อกัน 4 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดจะคั่นด้วยรหัสโคดอนของกรดอะมิโนกรดแอสปาติก (Aspartic acid) (รูปที่ 2 ก) ดังนั้นใน 1 สายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้น เมื่อทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วจะประกอบด้วยเปปไทด์ Longan 1 จำนวน 4 ชุดเรียงต่อกันและสามารถตัดได้ด้วยด้วย Endoproteinase AspN เพื่อให้ได้เปปไทด์สายสั้นเหมือนดังเปปไทด์ต้นแบบ ดังนั้นใน

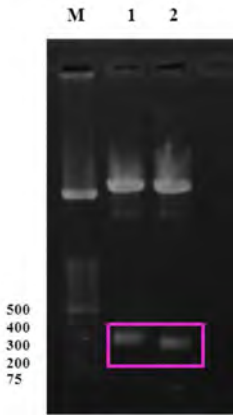
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ออกแบบ 1 สายสามารถสร้างเปปไทด์ Longan 1 ได้ 4 ชุด ส่วนเปปไทด์ Longan 2 การออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของเปปไทด์นี้ให้เรียงต่อกัน 10 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดจะคั่นด้วยรหัสโคดอนของกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) (รูปที่ 2 ข) ดังนั้นใน 1 สายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้น เมื่อทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วจะประกอบด้วยเปปไทด์ Longan 2 จำนวน 6 ชุด เรียงต่อกันและเมื่อตัดได้ด้วยด้วยเอนไซม์ Trypsin และ Carboxypeptidase B เพื่อให้ได้เปปไทด์สายสั้นเหมือนดังเปปไทด์ต้นแบบ ดังนั้นในชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ออกแบบ 1 สายที่ออกแบบสามารถสร้างเปปไทด์ Longan 2 ได้ 10 ชุด

3.3 การสร้าง *P. pastoris* สายพันธุ์สำหรับผลิตต้านอนุมูลอิสระ/หรือการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมล็ดผลไม้

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ออกแบบขึ้นนี้สำหรับ Logan 1 และ Longan 2 ได้ถูกสั่งสังเคราะห์ขึ้นและใส่อยู่ในพลาสมิด IDT-Blue (IDT, USA) เมื่อได้รับพลาสมิดมาได้ถูกนำเข้า *Escherichia coli* competent HIT-DH5α (RBC Bioscience, Taiwan) เพื่อเก็บรักษาและเพิ่มจำนวน พลาสมิดดังกล่าวถูกสกัดและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดจำเพาะ *Xho*I แล้วเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pPICZαA (Invitrogen, USA) ที่ตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน (รูปที่ 3.1) เมื่อทำการเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 Ligase แล้วนำปฏิกิริยา Ligationใส่เข้า *E. coli* competent HIT-DH5α คัดเลือกบนอาหารแข็ง LB low salt ที่มี Zeocin เข้มข้น 25 μg/ml จากนั้นคัดเลือกโคโลนีแล้วทำการสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือไม่และใส่ในพลาสมิดด้วยทิศทางที่ถูกต้องหรือไม่พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 1 ในทิศทางที่ถูกต้องเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *BsiW*I ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280 คู่เบส และ 3600 คู่เบส(รูปที่ 3.2 ก) สำหรับพลาสมิดมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 2 ได้ตรวจสอบการแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอลงบนพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I ซึ่งพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่จะตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I แล้วได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 260 คู่เบส และ 3600 คู่เบส(รูปที่ 3.2 ข) พลาสมิดที่ตัดได้ชิ้นส่วนที่ถูกต้องได้นำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing (Macrogen, Korea) พลาสมิดที่ถูกต้องได้ถูกตั้งชื่อว่า pLG1αA สำหรับ Longan 1 และpWPLGα2 สำหรับ Longan2

พลาสมิด pLG1αA และ pWPLGα2 ถูกนำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I (รูปที่ 3.3) เพื่อนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ด้วยชุด *Pichia* EasyComp™ Transformation Kit (Invitrogen, USA) โดยใช้หลักการนำเข้าสู่โครโมโซมด้วยการเกิด recombination จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับบริเวณ 5' *AOX1* บน pPICZαA กับโครโมโซม (รูปที่ 3.4) และคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ซึ่งมี Zeocin เข้มข้น 100 μg/ml สำหรับ Longan 1 โคโลนีที่คัดเลือกมาถูกตรวจสอบความถูกต้องด้วยเทคนิค colony

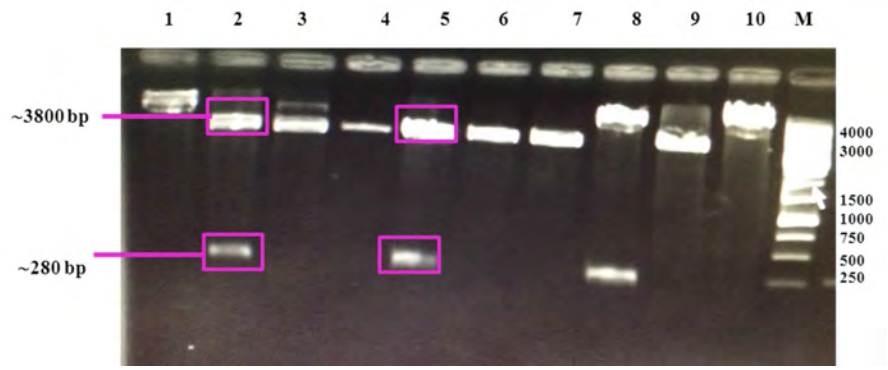
PCR ด้วยไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse ตรวจสอบเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ L1F กับ L1R หากมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายบนโครโมโซมจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 760 คู่เบสจากไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse และ 290 คู่เบสจากไพรเมอร์ L1F กับ L1R (รูปที่ 3.5 ก) ทำการสกัดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 760 คู่เบสจากไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse แล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiW*I ซึ่งชิ้นส่วนที่ถูกต้องเมื่อถูกเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiW*I ได้ขนาดประมาณ 520 และ 240 คู่เบส (รูปที่ 3.6) จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 760 คู่เบสจากไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse ส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย DNA sequencing (Macrogen, Korea) โดยใช้ไพรเมอร์ AOX1 forward, AOX1 reverse, L1F และ L1R แต่เนื่องจากการอ่านผล DNA sequencing ไม่สามารถอ่านได้หลายครั้งซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนในตัวอย่าง ทำให้คณะผู้วิจัยต้องทำ Re-PCR โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 760 คู่เบสจากไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse มาทำ PCR ใหม่อีกครั้งด้วยไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse แล้วจึงสกัดผลิตภัณฑ์ PCR นี้ไปทำ DNA sequencing ซึ่งในที่สุดก็ได้ *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 1 โดยตั้งชื่อว่า TWLG1PP สำหรับ Longan 2 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR ด้วยไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse ได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 760 คู่เบส (รูปที่ 3.5 ข) ได้ตั้งชื่อสายพันธุ์นี้ว่า WPLG2 และได้นำส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อทำ DNA sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ AOX1 forward, AOX1 reverse, L2F และ L2R พบว่าไม่สามารถอ่านผล DNA sequencing ทั้งที่เมื่อตรวจสอบเพิ่มเติมด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiW*I กับการทำ colony PCR ด้วย L2F และ L2R ได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกต้อง ซึ่งทำให้ยังไม่สามารถนำสายพันธุ์ WPLG2 มาใช้งานได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้กำลังดำเนินการ Re-PCR ดังที่ทำกับสายพันธุ์ TWLG1PP ก่อนที่จะตรวจสอบด้วย DNA sequencing อีกครั้งเพื่อให้มั่นใจว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีความถูกต้อง



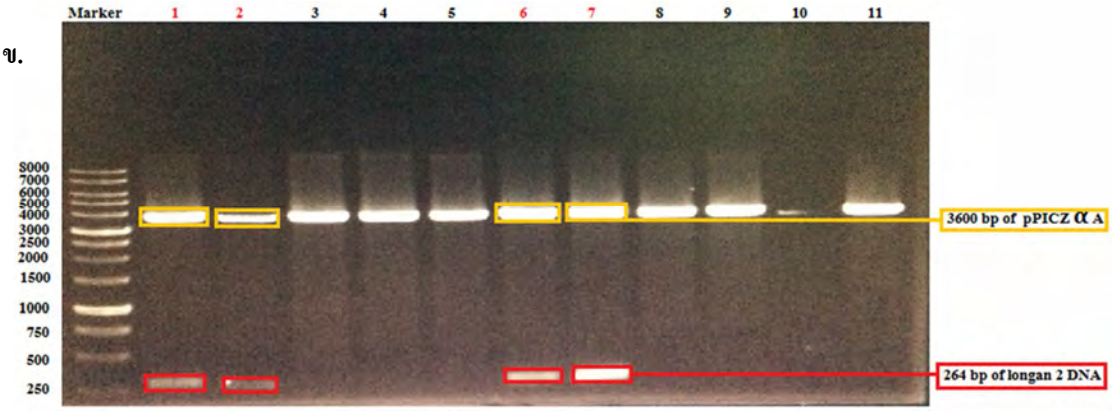
รูปที่ 3.1 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan1 และ Longan 2 ก่อนนำเข้าพลาสมิด pPicαA

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan1 และ Longan 2 ที่สั่งสังเคราะห์ขึ้นอยู่ในพลาสมิด IDT-Blue (IDT, USA) ซึ่งเมื่อตัดออกจากพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Xho*I ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการขนาดประมาณ 290 คู่เบสสำหรับ Longan1 (Lane 1) และ 260 คู่เบสสำหรับ Longan 2 (Lane 2) โดยใช้ Agarose Electrophoresis ในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ Agarose มีความเข้มข้น 1.2% w/v

ก.

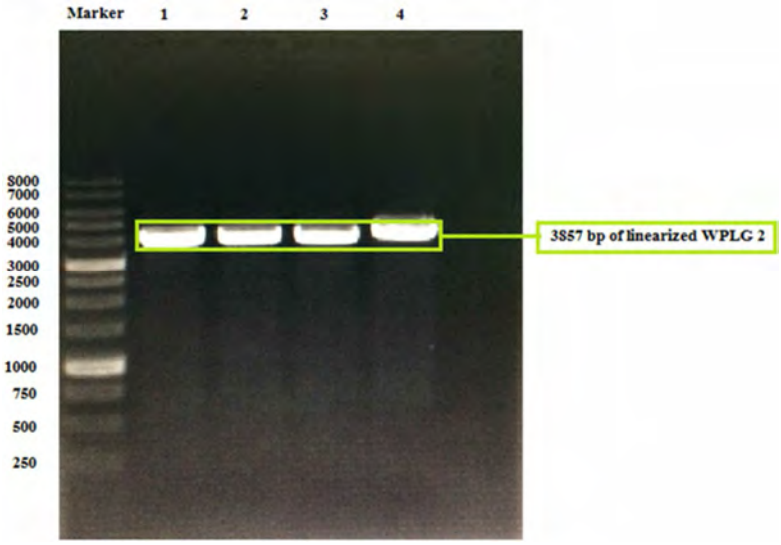


ข.



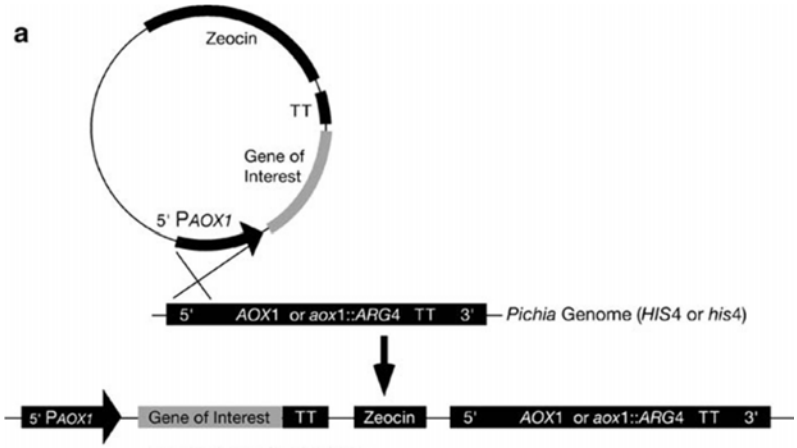
รูปที่ 3.2 การตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการบนพลาสมิด pPicαA

(ก.) พลาสมิด pPicαA ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างเปปไทด์ Logan 1 ในทิศทางที่ถูกต้อง เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiW*I ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280 และ 3600 คู่เบส (Lane 2 และ 5) (ข.) พลาสมิด pPicαA ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับสร้างเปปไทด์ Logan 2 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 260 และ 3600 คู่เบส พลาสมิดเหล่านี้ได้นำไปส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA Sequencing ต่อไป โดยรูปเจลที่แสดงในรูปเป็น1% w/v Agarose Electrophoresis



รูปที่ 3.3 การตัด pWPLGα2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I

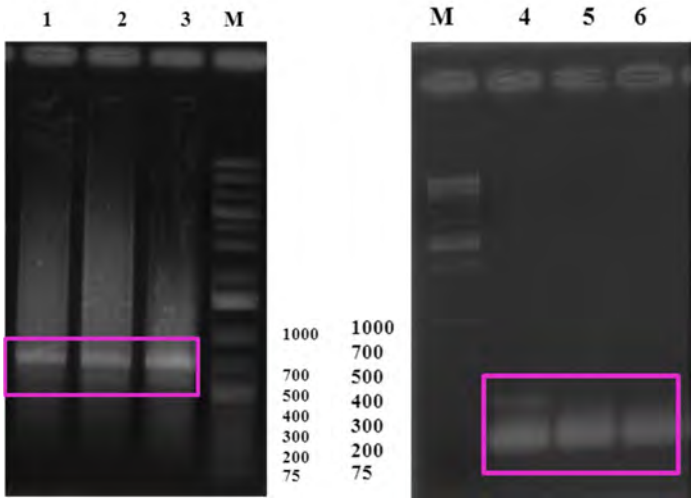
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 3800 คู่เบส ได้ถูกสกัดเพื่อนำเข้าโครโมโซมของ *P. pastoris* ในลำดับต่อไป โดยรูปเจลที่แสดงในรูปเป็น1% w/v Agarose Electrophoresis



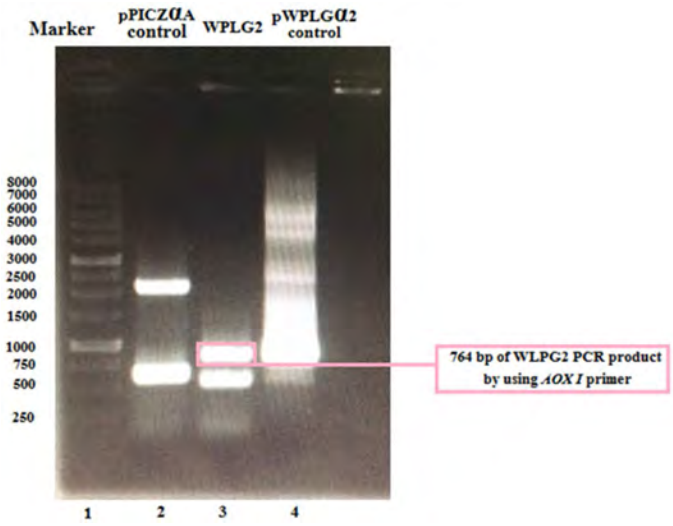
รูปที่ 3.4 หลักการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายบนพลาสมิด pPicZαA ลงบนโครโมโซมของ *P. pastoris*

อาศัยหลักการเกิด recombination จากความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5'*AOX1* บนพลาสมิด pPicZαA และบนโครโมโซมของ *P. pastoris*

ก.

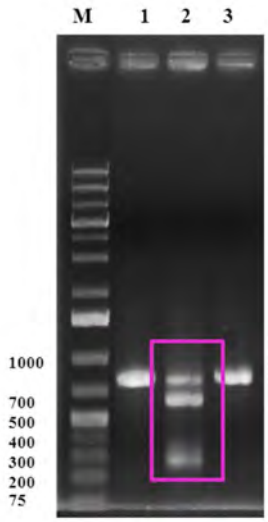


ข.



รูปที่ 3.5 การทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ *P. pastoris*

(ก.) ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 1 ด้วยไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 760 คู่เบส (Lane1-3) และไพรเมอร์ L1F กับ L1R ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 290 คู่เบส (Lane 4-6) (ข.) ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 2 ด้วยไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 760 คู่เบส (Lane WGLG2)



รูปที่ 3.6 การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์จากเทคนิค colony PCR เบื้องต้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiW*I

ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 760 คู่เบส จากการตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 1 ด้วยไพรเมอร์ AOX1 forward กับ AOX1 reverse เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsiW*I ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณประมาณ 520 และ 240 คู่เบส (Lane 2)

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

โครงการวิจัยนี้ได้พบเปปไทด์ที่คาดว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดลำไย ได้แก่ เปปไทด์ Longan 1 (ISYVVPVYIAEITPKTFRGGF) และ Longan 2 (TLAMHYF) ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 1 ให้เรียงต่อกัน 4 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดจะคั่นด้วยรหัสโคดอนของกรดอะมิโนกรดแอสปาติก (Aspartic acid) ส่วนเปปไทด์ Longan 2 การออกแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของเปปไทด์นี้ให้เรียงต่อกัน 10 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดจะคั่นด้วยรหัสโคดอนของกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) เพื่อให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีความยาวมากพอในการตรวจติดตามเมื่อใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นและได้ตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด pPicZαA ได้ปีนพลาสมิดชื่อ pTWLG1 และpWPLG สำหรับ Longan 1 และ Longan 2 ตามลำดับ จากนั้นได้ทำการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ซึ่งได้สายพันธุ์ TWLG1PP สำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 1 และ WGLG2 สำหรับผลิตเปปไทด์ Longan 2 ในส่วนของสายพันธุ์ TWLG1PP ได้ตรวจสอบว่ามีความถูกต้องโดยลงลึกถึงลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วแต่สำหรับสายพันธุ์ WGLG2 แม้ว่าการตรวจสอบเบื้องต้นจะให้ผลที่ถูกต้องแต่ยังไม่สามารถอ่านผล DNA sequencing ได้ ซึ่งต้องทำการทดลองเพิ่มเติมให้ได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้องก่อนนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2. ข้อเสนอแนะ

ในการได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ WGLG2 คณะผู้วิจัยได้ทำ Re-PCR หรือการทำ PCR จากผลิตภัณฑ์ colony PCR อีกครั้ง เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์มาขึ้น ทั้งนี้การที่ไม่สามารถอ่านผลผลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing ได้ อาจเพราะมีการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะในตัวอย่าง

ในการทดลองถัดไป คณะผู้วิจัยจะทำการทดสอบการแสดงออกของเปปไทด์ที่ต้องการด้วยการเลี้ยงเชื้อและเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล จากนั้นจะทำการตัดเปปไทด์ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นเหมือนที่พบใน

เมล็ดลำไยด้วยเอนไซม์ Endoproteinase AspN สำหรับ Longan 1 และ ทริปซินกับ Carboxylase B สำหรับ Longan 2 และทำการทดสอบการต้านออกซิเดชั่นและการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในห้องปฏิบัติการต่อไป

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว LB (1 L)

10 g Bacto-peptone

5 g Yeast extract

10 g NaCl

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

2 อาหารแข็ง LB

อาหารเหลว LB เติม 2% Bacto-agarแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

3.อาหารเหลว low salt LB (1 L)

10 g Bacto-peptone

5 g Yeast extract

5 g NaCl

4. อาหารแข็ง low salt LB

อาหารเหลว LB เติม 2% Bacto-agarแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

5. อาหารเหลว YPD (1 L)

10 g Yeast Extract

20 g Peptone

20 g Dextrose

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

6. อาหารแข็ง YPD

อาหารเหลว LB เติม 1.5% Bacto-agarแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

บรรณานุกรม

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Gold, L.S., 1993a. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: Three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, **101 Suppl 5**: 35-44.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993b. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(17): 7915-7922.

Barber, S.C., Mead, R.J., Shaw, P.J., 2006. Oxidative stress in als: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*, **1762**(11-12): 1051-1067.

Cheng, Y., Xiong, Y.L., Chen, J., 2010. Fractionation, separation, and identification of antioxidative peptides in potato protein hydrolysate that enhance oxidative stability of soybean oil emulsions. *J Food Sci*, **75**(9): C760-765.

Diplock, A.T., 1991. Antioxidant nutrients and disease prevention: An overview. *Am J Clin Nutr*, **53**(1 Suppl): 189S-193S.

Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K., Kumagai, H., Feng, Y., Takahashi, K., 1998. Antioxidative activity of soluble elastin peptides. *J. Agric. Food Chem.*, **46**(6): 2167-2170.

Kjeldsen, T., Pettersson, A.F., Hach, M., 1999. Secretory expression and characterization of insulin in pichia pastoris. *Biotechnol Appl Biochem*, **29 (Pt 1)**: 79-86.

Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Duzgunes, N., Renugopalakrishnan, V., 2007. Expression of recombinant proteins in pichia pastoris. *Appl Biochem Biotechnol*, **142**(2): 105-124.

Qian, Z.J., Jung, W.K., Kim, S.K., 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, rana catesbeiana shaw. *Bioresour Technol*, **99**(6): 1690-1698.

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., Kim, S.K., 2005. Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J Nutr Biochem*, **16**(9): 562-569.

Sharma, O.P., Bhat, T.K., 2009. Dpph antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, **113**(4): 1202-1205.

Sinatra, S.T., DeMarco, J., 1995. Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (ldl), and the heart: Antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Conn Med*, **59**(10): 579-588.

Slater, T.F., 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*, **222**(1): 1-15.

Srivastava, P., Raut, H.N., Wagh, R.S., Puntambekar, H.M., Kulkarn, M.J., 2012. Purification and characterization of an antioxidant protein (～16 kda) from terminalia chebula fruit original. *Food Chemistry*, **131**(1): 141-148.

Wang, W., De Mejia, E.G., 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **4**(4): 63-78.

Wang, Y., Meng, Q., Gao, W., Hou, J., Ahmed, Z., 2011. Expression and purification of beefy meaty peptide in *pichia pastoris*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **28**(3): 848-852.

Xie, Z., Huang, J., Xu, X., Jin, Z., 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, **11**(2).

Yan, Y., Chen, J., Li, J., 2003. Overexpression of a small medicinal peptide from ginseng in the yeast pichia pastoris. *Protein Expr Purif*, **29**(2): 161-166.

Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, X., Yao, H., 2010. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and maldi-tof/tof ms/ms. *Food Chemistry*, **119**(1): 226-234.

Zheng, S.-R., Wang, Y.-P., Yang, Y.-Q., Zhang, J., 2010. Expression and identification of a small recombinant beefy meaty peptide secreted by the methylotrophic yeast *pichia pastoris*. *African Journal of Microbiology Research*, **4**(24): 2754-2762.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

(ภาษาอังกฤษ) Dr. RUETHAIRAT BOONSOMBAT

ตำแหน่งปัจจุบันอาจารย์ A-5

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน3 ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

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

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

โทรศัพท์ (080) 9991465

ประวัติการศึกษา

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

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ พันธุศาสตร์โมเลกุล

ผลงานทางวิชาการ

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

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

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

Moon-ai, W., Niyomploy, P., **Boonsombat, R.,** Sangvanich, P. and Karnchanatat, A. (2012) A superoxide dismutase purified from the rhizome of Curcuma aeruginosa Roxb. as inhibitor of

nitric oxide production in the macrophage-like RAW 264.7 cell line. *Appl Biochem Biotechnol* **166**: 2138-2155

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

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

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

ผู้ร่วมวิจัย

(ภาษาไทย) ผศ. ดร. อภิชาติ กาญจนทัต

(ภาษาอังกฤษ) Asst. Prof. Dr. APHICHART KARNCHANATAT

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ A-4

ตำแหน่งบริหาร รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน3 ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

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

ประวัติการศึกษา

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

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

1. พันธุศาสตร์โมเลกุล เทคโนโลยีชีวภาพของเอนไซม์ (enzyme biotechnology)

2. เคมีของโปรตีน: โครงสร้าง และหน้าที่ (protein chemistry: structure and function)

3. เคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (chemical natural products)

4. ชีววิธีการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยเชื้อรา (fungal bioremediation)

ผลงานวิชาการ

Saisavoey, T., Palaga, T., Malaivijitnond, S., Jaroenporn, S., Thongchul, S., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2014) Anti-osteoclastogenic, estrogenic, and antioxidant activities of cell suspension cultures and tuber root extracts from *Pueraria mirifica*. *Food science and biotechnology* **23:** 1253-1259.

Saisavoey, T., Thongchul, S., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2014) Effect of methyl jasmonate on isoflavonoid accumulation and antioxidant enzymes in *Pueraria mirifica* cell suspension culture. *Journal of medicinal plant research* **8:** 401-407**.**

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

Niyomploy, P., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Vinayavekhin, N., **Karnchanatat, A.,** and Sangvanich, P. (2013) Superoxide dismutase isozyme detection using two-dimensional gel electrophoresis zymograms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **90:** 72-77

Rungsaeng, P., Sangvanich, P.**,** and **Karnchanatat, A.** (2013) Zingipain, a Ginger Protease with Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *App biochem biotech* DOI: 10.1007/s12010-013-0243-x

Charungchitrak, S., Petsom, A., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2013) Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food Chemistry* **126:** 1025-1032

Tangngamsakul**,** P., **Karnchanatat, A., Sihanonth, P., and Sangvanich, P.** (2013) An extracellular glucoamylase produced by endophytic fungus EF6**.** *Applied Biochem Microbiol* **47:** 455-461

Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piapukiew, J., Whalley A.J.S., Reynolds, C.D., Gadd, G.M., and Sihanonth, P. (2013) A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *Enzyme and Microbial Technology* **270:** 404-413

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

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

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

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

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

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

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

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

Baebprasert, W., **Karnchanatat, A.**, Linblad, P., and Incharoensakdi A. (2011) Na^+-stimulated nitrate uptake with increased activity under osmotic upshift in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27:** 2467-2473.

Sawaengsak, W., Saisavoey, T., Chuntaratin, P., and **Karnchanatat, A.** (2011) Micropropagation of the medicinal herb *Glycyrrhiza glabra* L., through shoot tip explant culture and glycyrrhizin detection. *International Research Journal of Plant Science* **2:**129-136.

Tangngamsakul, P., **Karnchanatat, A.**, Sihanonth, P. and Sangvanich, P. (2011) An extracellular glucoamylase produced by endophytic fungus EF6. *App Biochem Microbiol* **47:** 412-418.

Karnchanatat, A.*, Tiengburanatam, N., Boonmee, A., Puthong, S., and Sangvanich, P. (2011) Zingipain, A cysteine protease from *Zingiber ottensii* Valeton rhizomes with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines. *Prep biochemis biotech* **41:** 201-217.

Charungchitrak, S., Petsom, A., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2011) Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Neilson. *Food Chemistry* **126:**1025-1032.

Boonmee, A., Srisomsap, C., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2011) An antioxidant protein in *Curcuma comosa* Roxb. rhizomes. *Food Chemistry* **124:** 476-480.

Tiengburanatam, N., Sangvanich, P., Boonmee, A and **Karnchanatat, A.** (2010) A novel α-glucosidase inhibitor protein from the rhizomes of *Zingiber ottensii* Valeton. *AppBiochem Biotech* **162:** 1938-1951.

Petnual, P., Sangvanich, P., and **Karnchanatat, A.** (2010) A lectin from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.) and its antifungal, antibacterial and alpha-glucosidase inhibitory activities. *Food Science and Biotechnology* **19:** 907-916.

Konkumnerd, W., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2010) A thermostable lectin from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90:** 1920-1925.

Niyomploy, P., Thunyakitpisal, P., **Karnchanatat, A.**, and Sangvanich, P. (2010) Cell proliferative effect of polyxyloses extracted from the rhizomes of wild tumeric, *Curcuma aromatic* Salisb. *Pharmaceutical Biology* **48:** 932-937.

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

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

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

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

ผลงานแต่งหรือเรียบเรียง ตำรา หนังสือ หรือบทความทางวิชาการ

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

ผู้ช่วยวิจัย

(ภาษาไทย) นางสาวธนพร วิชัย

(ภาษาอังกฤษ) Miss THANAPORN WICHAI

ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัย(ฝ่ายวิจัยและพัฒนา)

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน3 ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

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

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

โทรศัพท์ 0870090075

ประวัติการศึกษา

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

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ พันธุศาสตร์โมเลกุล

ผลงานวิชาการและการเสนอผลงานวิจัย

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