

สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน ออสทีโอพอนทินในพืชโดยใช้เจมินีไวรัสเวกเตอร์

- ชื่อนิสิตผู้วิจัย
1. นายพีรวัส พัฒนประยูรวงศ์ รหัสประจำตัวนิสิต 5536561633
 2. นางสาวดุขฎิ โฉ้วพฤกษ์มณี รหัสประจำตัวนิสิต 5536529633
 3. นางสาวธนพร ทิรัญสถิต รหัสประจำตัวนิสิต 5536534733

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตร์บัณฑิตสาขาวิชาเภสัชศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการงานปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Optimization of osteopontin protein expression in plant using geminiviral vectors

Researchers 1. Mr. Peravas Pattanaprayoonwong Student Number 5536561633
2. Miss Dusadee Lowpruckmanee Student Number 5536529633
3. Miss Thanaporn Hirunsatit Student Number 5536534733



A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement
for the Doctor of Pharmacy Program in Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
2016

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

หัวข้อโครงการปริญญาานิพนธ์	สาขาการค้นพบและพัฒนา สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนออกทีโอพอนทินในพืชโดยใช้เจมิณีไวรัสเวกเตอร์
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	1. นายพีรวัส พัฒนประยูรวงศ์ 5536561633 2. นางสาวดุษฎี โล้วพฤกษ์มณี 5536529633 3. นางสาวธนพร หิรัญสถิต 5536534733
สาขาวิชา/ภาควิชา	การค้นพบและพัฒนา/เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรัญญู พูลเจริญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

.....คณบดี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รุ่งแพ็ชร สกุลบำรุงศิลป์)

.....ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุญาณี พงษ์ธนานิกร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรัญญู พูลเจริญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

คำนำ

โครงการปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โปรตีนออสทีโอพอนทินในต้นยาสูบด้วยเทคนิคการแสดงออกแบบชั่วคราว เพื่อให้ได้มาซึ่งโปรตีนที่มี คุณภาพและปริมาณสูง

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญาานิพนธ์นี้คงเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจการ ค้นพบและพัฒนาสารชีวโมเลกุลเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ต่อไป หากมีข้อผิดพลาด ประการใดคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้



คณะผู้จัดทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการงานปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ : สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินในพืชโดยใช้เจมินีไวรัล
 เวกเตอร์

หัวหน้าโครงการ : นายพีรวัส พัฒนประยูรวงศ์ 5536561633

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวดุษฎี โล้วพฤกษ์มณี 5536529633
 : นางสาวธนพร ทิรัญสถิต 5536534733

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร.วรัญญู พูลเจริญ, ผศ. ภญ. ดร.ทักษิณา ชวนอาษา

สาขา/ภาควิชา : การค้นพบและพัฒนาายา/เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นเทคโนโลยีที่มุ่งปรับปรุงหรือทดแทนเนื้อเยื่อและอวัยวะที่เสียหาย โปรตีนรีคอมบิแนนท์หลายชนิดมีความจำเป็นต้องนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงหรือทำหน้าที่ทางชีวภาพทดแทน ซึ่งนำไปสู่ค่าใช้จ่ายของเทคโนโลยีที่สูงมาก ดังนั้นคนจำนวนมากในประเทศกำลังพัฒนาจึงไม่สามารถเข้าถึงการรักษาได้ ในปัจจุบันพืชมีการนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์หลายชนิด เนื่องจากข้อดีหลายประการของพืชที่เหนือกว่าระบบอื่นๆ เช่น ต้นทุนการผลิตต่ำ ความสามารถในการขยายปริมาณการผลิต ปราศจากเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และกระบวนการปรับแต่งโปรตีนที่จำเป็นของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต ข้อมูลเบื้องต้นในห้องทดลองพบว่าโปรตีนออสทีโอพอนทินเป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีศักยภาพในการกระตุ้นการงอกของกระดูก วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินในใบยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) โดยอะโกรแบคทีเรีย GV3101 ถูกนำมาใช้สำหรับการถ่ายโอนยีนออสทีโอพอนทินในเวกเตอร์เจมินีไวรัลเข้าสู่เซลล์พืช ความหนาแน่นของอะโกรแบคทีเรียถูกเปรียบเทียบกับที่ 600 nm (OD₆₀₀) 0.125 ถึง 0.8 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ OD₆₀₀ 0.5 เป็นความหนาแน่นของอะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทิน งานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า ยีน p19 สามารถยับยั้งการยับยั้งกระบวนการ gene silencing ได้ ผลการทดลองนี้จึงเป็นการยืนยันว่า การรบกวนของเวกเตอร์ p19 กับเวกเตอร์ที่มียีนออสทีโอพอนทินสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินได้ นอกจากนี้ใบยาสูบถูกเก็บระหว่าง 1-5 วันหลังการส่งถ่ายยีน และถูกนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Western blot การแสดงออกของออสทีโอพอนทินสูงที่สุดที่วันที่ 3 หลังถูกส่งถ่ายยีน การศึกษานี้เป็นการเสนอแนะถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินในพืช ซึ่งจะจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตโปรตีนเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อในอนาคต

คณะเภสัชศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลายมือชื่อนิสิต
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
 เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทนี้ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรัญญู พูลเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ให้สมบูรณ์ดียิ่งขึ้น ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการปริญญาโทนี้

ขอขอบคุณ ดร.แก้วตา รัตนะพิสิฐ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำให้ความรู้และสนับสนุนทั้งในด้านของสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำโครงการปริญญาโทนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณคณาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และช่วยเหลือในทุกๆ ด้านที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการปริญญาโทนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ที่ให้ความสะดวก และช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ ตลอดระยะเวลาการทำโครงการ ปริญญาโทนี้

คณะผู้จัดทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทนี้ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3 วิธีดำเนินการวิจัย	6
3.1 วัสดุหรือตัวอย่างทางชีวภาพ	6
3.2 สารเคมี	6
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	7
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน	7
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	14
4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบผลของ p19 ต่อปริมาณโปรตีน ออสทีโอพอนทิน	14
4.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างต่อปริมาณ ออสทีโอพอนทิน	15
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	17
5.1 สรุปผลการวิจัย	17
5.2 อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	17
รายการอ้างอิง	19
ภาคผนวก	22

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 : โพรตีนที่มีการผลิตโดยใช้ geminiviral vectors	2
ตารางที่ 2 : ส่วนประกอบสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	7
ตารางที่ 3 : ส่วนประกอบสำหรับการเตรียมเจล SDS-PAGE	9
ตารางที่ 4 : ส่วนประกอบสำหรับการเตรียม running buffer	10
ตารางที่ 5 : ส่วนประกอบสำหรับการเตรียม destaining agent	11
ตารางที่ 6 : ส่วนประกอบสำหรับการเตรียม transfer buffer	12
ตารางที่ 7 : การคำนวณ % ของโปรตีนออสทีโอพอนทินเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ อะโครแบคทีเรียมและผลของ p19	15
ตารางที่ 8 : การคำนวณ % ของโปรตีนออสทีโอพอนทินเพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาใน การเก็บตัวอย่าง	16



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 : ตำแหน่งการเติมสารละลายตัวอย่าง	11
ภาพที่ 2 : SDS-PAGE เปรียบเทียบปริมาณเชื้ออะโกราแบคทีเรีย OD ₆₀₀ และผลของ p19	14
ภาพที่ 3 : Western blot เปรียบเทียบปริมาณเชื้ออะโกราแบคทีเรีย OD ₆₀₀ และผลของ p19	14
ภาพที่ 4 : SDS-PAGE เปรียบเทียบระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง	15
ภาพที่ 5 : Western blot เปรียบเทียบระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง	16



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เป็นกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อเพื่อทดแทนและซ่อมแซมอวัยวะที่เกิดความเสียหาย ซึ่งปกติแล้วอวัยวะเหล่านี้จะไม่มีการสร้างใหม่ในมนุษย์ เช่น เนื้อเยื่อผิวหนัง และเนื้อเยื่อกระดูก เป็นต้น โดยกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อมีการพัฒนาวัสดุชีวภาพเพื่อใช้เป็นโครงในการเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการให้มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นใส่เข้าไปในเนื้อเยื่อเป้าหมายเพื่อให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อและทำงานได้ตามปกติ¹

เทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นวิธีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่โดยสร้างจากร่างกายของผู้ป่วยเอง จึงมีข้อดีคือ ไม่เกิดปัญหาความเข้ากันไม่ได้ระหว่างเนื้อเยื่อและร่างกายของผู้ป่วยซึ่งเกิดจากการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนการทำที่ง่าย และสามารถประยุกต์ใช้ได้กับเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น กระดูกและฟัน ผิวหนัง หลอดเลือด เซลล์ประสาทส่วนปลาย เป็นต้น อย่างไรก็ตามจากความยุ่งยากซับซ้อนของเครื่องมือที่ใช้ จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญในการปฏิบัติ รวมไปถึงค่าใช้จ่ายที่สูงจึงเป็นอุปสรรคในการเข้าถึงการรักษาของผู้ป่วย เนื่องจากโปรตีนต่างๆ ที่จำเป็นต้องใส่ในโครงในการเลี้ยงเซลล์เพื่อกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่ออย่างมีประสิทธิภาพนั้นมีราคาการผลิตที่สูงมาก

จากปัญหาข้างต้นจึงนำมาสู่การคิดค้นและพัฒนาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อที่มีประสิทธิภาพจากพืช เนื่องจากการผลิตโปรตีนในพืชมีข้อดีหลายประการ เช่น ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ต้นทุนการผลิตต่ำ ตลอดจนมีกระบวนการ post-translation ที่คล้ายคลึงกับมนุษย์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยต่างๆ ที่พยายามพัฒนาโดยนำชิ้นส่วนของไวรัสจากพืชบางชนิดมาใช้ในการเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีนในพืช ทำให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในพืชได้ในปริมาณสูงขึ้น ไวรัสที่นิยมนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวได้แก่ geminivirus จากการศึกษาพบว่า มีการนำ geminivirus มาใช้ในการเพิ่มปริมาณโปรตีนหลายชนิดและได้ปริมาณโปรตีนสูงดังแสดงในตารางที่ 1³

ตารางที่ 1 โปรตีนที่มีการผลิตโดยใช้ geminiviral vectors³

Therapeutic Protein	Vector Used	Host Plant	Expression Level	Immunogenicity Tested	Reference
SEB	BeYDV	<i>N. benthamiana</i>	n/a *	yes	[31]
Norwalk Virus VLPs	BeYDV	Tobacco, lettuce	0.34 mg/g LFW **	yes	[36]
HBVcAg	BeYDV	<i>N. benthamiana</i>	0.8 mg/g LFW	no	[34]
WNV E protein Mab	BeYDV	Tobacco, lettuce	0.23–0.27 mg/g LFW	yes	[35]
Ebola Virus GP1Mab	BeYDV	Tobacco, lettuce	0.23–0.27 g/g LFW	yes	[35]
HPV-1 L1 protein	BeYDV, mild strain	<i>N. benthamiana</i>	n/a	no	[38]
HIV-1 type C p24	BeYDV, mild strain	<i>N. benthamiana</i>	n/a	no	[38]
HAV VP1	BCTV	<i>N. benthamiana</i>	n/a	no	[41]
vitronectin	TYDV	<i>N. benthamiana</i>	2.3% TSP ***	n/a	[42]

* n/a: not applicable; ** LFW: leaf fresh weight; *** TSP: total soluble protein.

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินในพืช เพื่อนำมาใช้ในการกระตุ้นการสร้างกระดูกพ่น โดยใช้ geminiviral vectors เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทิน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินในพืชโดยใช้ geminiviral vectors

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ออสทีโอพอนติน (Osteopontin) เป็นไกลโคโปรตีนชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 300 ตัวต่อกับส่วนของคาร์โบไฮเดรต ออสทีโอพอนตินถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein (SIBLING) พบได้มากในกระดูก และยังสามารถพบได้ในของเหลวของร่างกาย เช่น พลาสมา ซีรัม น้ำนม และปัสสาวะ เป็นต้น ออสทีโอพอนตินมีหน้าที่หลากหลายทั้งในด้านการเปลี่ยนแปลงกระดูก ควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และการแบ่งตัวของเซลล์ เป็นต้น ในส่วนของการเปลี่ยนแปลงกระดูก ออสทีโอพอนตินเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่าง osteoclast และแร้ธาตุในสโตรมาของกระดูก แร้ธาตุที่สำคัญคือ hydroxyapatite ($\text{Ca}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$) หากร่างกายได้รับแคลเซียมซึ่งเป็นองค์ประกอบในแร้ธาตุชนิดนี้ไม่เพียงพออาจทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้ โดยออสทีโอพอนตินจะถูกสร้างขึ้นทั้งใน osteoclast และ osteoblast ขึ้นกับสถานะของร่างกาย⁴⁻⁶

ในปี ค.ศ. 2005 Julio C. Rincon และคณะได้ทำการศึกษการสร้างออสทีโอพอนตินในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรากฟันของหนูพบว่า epithelial cell rests of Malassez (ERM) มี mRNA ที่แสดงออกให้โปรตีนออสทีโอพอนติน ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการเกาะกันของเซลล์กระดูก ควบคุมการทำงานของ osteoclast ควบคุมการเปลี่ยนแปลงแร้ธาตุในสโตรมาของกระดูกและช่วยในการสร้างสารเคลือบฟัน⁵ นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2012 Sebastian Schlafer และคณะได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของออสทีโอพอนตินในการป้องกันฟันผุพบว่า ออสทีโอพอนตินสามารถลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ทำให้สามารถป้องกันฟันผุได้อีกด้วยและยังมีการศึกษาของ Saito K และคณะในปี ค.ศ. 2016 ที่ยืนยันฤทธิ์ของออสทีโอพอนตินในการกระตุ้นเซลล์ odontoblast-like ในกระบวนการปลูกฟัน โดยการสะสมของออสทีโอพอนตินจำเป็นต่อการหลั่งสารคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อฟัน⁶⁻⁸

ปัจจุบันสารชีวโมเลกุลที่มีการใช้ประโยชน์ในมนุษย์ส่วนมากถูกผลิตขึ้นจากเซลล์สัตว์และเซลล์แบคทีเรีย สำหรับการผลิตออสทีโอพอนติน Erin Martin และคณะได้ทำการศึกษาโดยนำยีนของออสทีโอพอนตินเข้าสู่เชื้อ E. coli และให้เชื้อเหล่านี้ผลิตโปรตีนขึ้นมาเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรค vascular calcification⁹ ในปี ค.ศ. 2007 Xiangzong Hana และคณะได้ทำการศึกษาก่อนการผลิตออสทีโอพอนตินจาก HEK 293 ซึ่งเป็นเซลล์สัตว์โดยใช้วิธีการแสดงออกแบบชั่วคราว (transient expression) ในเซลล์สัตว์จะมีขั้นตอน post-translation modification ทำให้โปรตีนที่ได้มีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่สร้างในมนุษย์ ซึ่งในเซลล์โปรคาริโอตจะไม่มีขั้นตอนดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนออสทีโอพอนตินสามารถแสดงออกใน HEK 293 ได้นอกจากนี้ เซลล์ดังกล่าวยังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้หลากหลายชนิด เช่น erythropoietin (EPO) เป็นต้น¹⁰ แต่การใช้เซลล์สัตว์มีข้อจำกัดหลายประการ ทั้งในด้านต้นทุนการผลิตที่สูง และการปนเปื้อนเชื้อโรคจากสัตว์ พืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการผลิตโปรตีนในทางเภสัชกรรม ซึ่งสามารถขยายขนาดการผลิตได้ง่าย รวดเร็ว มีต้นทุนการผลิตต่ำ มีความปลอดภัยจากการปนเปื้อนและยังเป็นวิธีการผลิตโปรตีนที่ได้รับการรับรองจาก FDA อีกด้วย¹¹

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

การใช้พืชเป็นแหล่งผลิตโปรตีนได้มีการทดลองในพืชหลายชนิด เช่น ผักกาดหอม มะเขือเทศ องุ่น ฝ้าย และทานตะวัน เป็นต้น พืชที่ได้รับความนิยมคือ ต้นยาสูบสายพันธุ์ *Nicotiana benthamiana* แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (Transient expression) และการแสดงออกของยีนแบบถาวร (Stable genetic transformation) โดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* เป็นตัวนำส่งยีนเข้าสู่พืชผ่านการฉีดหรือใช้เครื่องอัดสุญญากาศ วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถควบคุมปริมาณและการผสมผสานของยีนได้และทำให้เนื้อเยื่อพืชเสียหายน้อย ซึ่งการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราวจะใช้ระยะเวลายาวนานกว่าแบบถาวร¹¹⁻¹⁷

ในปี ค.ศ. 1995 Jen Sheen และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ Green-fluorescent protein (GFP) เพื่อใช้เป็น marker ในเซลล์พืช โดยส่งถ่ายยีนดังกล่าวเข้าสู่พืชพบว่า มีการแสดงออกของ GFP เนื่องจากมีการเรืองแสงสีเขียวภายใต้รังสี UV ดังนั้นจึงมีการใช้ GFP ในการตรวจสอบการส่งถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่พืชได้ และในปี ค.ศ. 2005 Marillonnet และคณะได้ทดลองเปรียบเทียบสถานะต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน green fluorescent protein (GFP) ในพืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นตัวนำส่งยีนเข้าสู่พืชโดยมีการเปรียบเทียบผลของปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียชนิดของยีน อายุของพืชที่ใช้ และระยะเวลาเก็บตัวอย่างหลังจากฉีดอะโกรแบคทีเรียเข้าสู่พืชพบว่า ปริมาณโปรตีนที่พืชแสดงออกมีความสัมพันธ์กับชนิดของยีนที่ใช้ โดยปริมาณของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเชื้อ อย่างไรก็ตามหากปริมาณเชื้อเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้บริเวณที่ได้รับเชื้อของพืชเกิดการตายได้ โดยมีปริมาณเชื้อเหมาะสมนั้นไม่ควรเกิน $OD_{600} = 0.12$ ตามงานศึกษาของ Leuzinger และคณะ ในปี 2013 ที่มีการวัดผลนาน 15 วันหลังจากต้นยาสูบได้รับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างใบมีความแตกต่างกันในยีนแต่ละชนิด เช่น ในการศึกษาของ Zhong Huang และคณะในปี ค.ศ. 2010 การผลิตอีโบล่าเอนติบอดีให้ผลผลิตสูงสุดวันที่ 4 หลังจากการได้รับเชื้อ $OD_{600} 0.2$ และการศึกษาของ Zhong Huang และคณะในปี ค.ศ. 2009 ในการสร้างแอนติเจนไวรัสตับอักเสบบีพบว่าเกิดการตายของใบหลังจากได้รับเชื้อ 7 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า ในพืชบางชนิดหลังจากวันที่มีการสร้างโปรตีนสูงสุด ปริมาณโปรตีนอาจจะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเกิด post-transcriptional gene silencing (PTGS) ที่ขัดขวางการแสดงออกของยีนแปลกปลอมภายในพืชได้อีกด้วย^{2, 18-23} นอกจากนี้ตำแหน่งของใบที่ส่งผลต่อปริมาณการผลิตโปรตีนได้เช่นกัน โดยในปี ค.ศ. 2006 Wydro และคณะได้ทำการศึกษาโดยใช้ใบในตำแหน่งต่างๆ พบว่ายอดสามารถผลิตโปรตีนได้สูงที่สุด รองลงมาคือตำแหน่งกลางต้น และโคนต้นตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sheludko และคณะในปี ค.ศ. 2006 ที่พบว่าใบที่ 1-6 นับจากยอดและใบที่ 3 จากยอดเป็นใบที่ผลิตได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบอายุของต้นยาสูบที่ใช้เป็นแหล่งผลิตโปรตีนพบว่า พืชที่มีอายุ 8-10 สัปดาห์เป็นระยะที่พืชผลิตโปรตีนสูงที่สุด^{23, 24}

ในส่วนของ การผลิตโปรตีนสำหรับมนุษย์โดยใช้พืชเป็นแหล่งผลิตด้วยวิธีการแสดงออกแบบชั่วคราวให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ เช่น การศึกษาของ Ruggiero F และคณะในปี ค.ศ. 2000 Human homotrimeric collagen ในต้นยาสูบ ที่ให้ผลผลิตเพียง <0.01% ของน้ำหนักสดและการศึกษาของ Cramer C และคณะในปี ค.ศ. 1999 Human epidermal growth ในต้นยาสูบ ที่ให้ผลผลิตเพียง <0.01% ของปริมาณโปรตีนรวม^{25, 26} อาจเกิดจาก post-transcriptional gene silencing (PTGS) ทำให้ปริมาณโปรตีนลดลง จึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน p19 จาก tomato bushy stunt virus

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

(TBSV) ซึ่งสามารถยับยั้งกระบวนการ PTGS ได้ ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีนได้เป็นอย่างดี^{23, 27}



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุหรือตัวอย่างทางชีวภาพ

1. *Nicotiana bentamina*
2. *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

3.2 สารเคมี

1. Luria Bertani Broth (LB broth), Miller HIMEDIA®
2. Tris 1 KG Ultrapure, MB Grade Affymetrix®
3. Skim Milk HIMEDIA®
4. Glycine reagent grade 98% VETEC®
5. Brilliant Blue R-250 Coomassie®
6. TWEEN 40 SIGMA®
7. Sodium dodecyl sulfate AMRESCO®
8. Kanamycin Sulfate Biochemica (AppliChem/Panreac)
9. Rifampin USBio Analyzed Affymetrix®
10. Gentamicin USBio Analyzed Affymetrix®
11. Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1 (40 %w/v), 2.6 %C SERVA®
12. TemedVivantis®
13. HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit Novex® invitrogen™
14. Methanol AR, ≥99.5% VETEC®
15. Acetic acid AR, ≥99.8% VETEC®
16. Mouse anti-human osteopontin(1mg/ml)
17. HRP conjugated rabbit anti-mouseIgG(2mg/ml)
18. Purified BSA 100X BioLab®
19. Phosphate Buffered saline
20. Liquid nitrogen
21. Osteopontin standard 10ug/30uL
22. Precision Plus Protein™ Dual Color Standards BIO-RAD®
23. MES FREE ACID MONOHYDRATE Ultra Pure AMRESCO®
24. MgSO4.7H2O Sigma-Aldrich®

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ImageQuant LAS4000
2. Mini-PROTEAN Tetra cell Set
3. Pipet Tips 0.5-10, 1-200, 1-1000 μ L AXYGEN®
4. Polypropylene centrifuge tube 15 และ 50 มิลลิลิตร
5. Microcentrifuge tube 1.5 mL Axygen®
6. Western Blot set BIO-RAD®
7. Pipette PIPETMAN® P10N P100N P20N P200N
8. Brushless microcentrifuge Denville® 260D
9. Orbital shaker BIOSAN®
10. Vertical shaker Hervucan®
11. Heating block MS Elite®
12. Vortex GENIE® 2 Model EL01
13. Porcelain pestle and mortar
14. Spin down centrifuge GMC-260 LabTech®
15. Weighing machine HCB602H ADAM® Highland™
16. Power supply 300V 400mA 75W BIO-RAD® PowerPac™
17. Benchtop centrifuge ROTINA 380R Hettich®
18. pH meter METTLER TOLEDO™
19. Syringe 1 mL Nipro®
20. Erlenmeyer flask 500 mL
21. UV spectrophotometer
22. Autoclave
23. Deionized water machine

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
LB broth	5 g
Kanamycin	200 μ L
Rifampin	200 μ L
Gentamicin	200 μ L
Deionized water	200 mL

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

1. ชั่ง LB broth ละลายลงใน deionized water ปรับปริมาตรจนเป็น 200 มิลลิลิตร
2. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
3. รอให้อุณหภูมิเย็นลงถึงประมาณ 40 องศาเซลเซียส เติม kanamycin rifampin และ gentamicin ลงไปตามปริมาณที่กำหนด

- การเพิ่มจำนวนอะโครแบคทีเรียมที่มียีนออสทีโอพอนทิน

1. เพิ่มปริมาณเชื้ออะโครแบคทีเรียมที่มียีนออสทีโอพอนทินและ p19 โดยปิเปต 5 ไมโครลิตร ของ stock bacterial suspension ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 มิลลิลิตรนำไปเขย่าใน incubator ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ปิเปตเชื้ออะโครแบคทีเรียมที่เลี้ยงได้ 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตรนำไปเขย่าใน incubator ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ถ่ายบรรจุเชื้อลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตรนำไป centrifuge เชื้อที่ได้ด้วยความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมสารละลาย 1x filtrate buffer ลงในปริมาณที่เหมาะสม (ใช้ปิเปตช่วยให้เชื้อกระจายตัว) และนำไปปรับความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer ให้ได้ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.125 0.25 0.5 และ 0.8

- การส่งถ่ายยีนเข้าสู่พีช (Transformation)

1. ฉีด bacterial suspension เข้าสู่พีช โดยใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร
2. เลี้ยงพีชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนแล้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
3. เก็บตัวอย่างตามระยะเวลาที่กำหนด และเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ :

- ในกรณีของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมจะเก็บตัวอย่างวันที่ 3 หลังการส่งถ่ายยีน
- ในกรณีของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมจะเก็บตัวอย่างทุกวัน ตั้งแต่วันที่ 1-5 หลังการส่งถ่ายยีน

- การสกัดโปรตีน

1. นำตัวอย่างที่เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส มาบดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวจนละเอียด
2. ชั่งลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ให้ได้น้ำหนักตัวอย่างที่เท่ากัน
3. ปิเปต Extraction buffer ใส่ลงในตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
4. นำไป centrifuge ที่ 14000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที
5. ปิเปตสารละลายในส่วนใส (supernatant) ออกมาใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

-การทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

1. เตรียมสารละลายเปรียบเทียบ (blank) โดยใช้ deionized water 1 มิลลิลิตร
2. เตรียม standard BSA ที่ความเข้มข้น 50 100 200 และ 400 ng/uL จากความเข้มข้น 10 mg/ml
3. นำ standard BSA แต่ละความเข้มข้นปริมาณ 20 ไมโครลิตรผสมกับ Bradford's reagent 980 ไมโครลิตร
4. นำไปวัดโดยใช้ UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
5. นำค่าที่ได้มาวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นและ OD₅₉₅

-การวัดความเข้มข้นโปรตีน

1. เตรียมสารละลายเปรียบเทียบ (blank) โดยใช้ Extraction buffer
2. นำ supernatant ของตัวอย่างที่ได้มา 2 ไมโครลิตร ผสมกับ deionized water 18 ไมโครลิตร และ Bradford's reagent 980 ไมโครลิตร
3. นำไปวัดโดยใช้ UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
4. นำค่าที่ได้มาเทียบกับ Standard curve
5. ปรับความเข้มข้นของทุกตัวอย่างให้เท่ากันปริมาตรมา 90 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
6. ใส่สี 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
7. นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 นาที

-การเตรียมเจลสำหรับ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบสำหรับการเตรียมเจล SDS-PAGE

ส่วนประกอบ \ ชนิดเจล	10% Resolving Gel 10 มิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	5% Stacking Gel 3 มิลลิลิตร (มิลลิลิตร)
Deionized water	4.870	2.235
40%w/v Acrylamide/Bis	2.480	0.380
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.500	-
1M Tris (pH 6.8)	-	0.380
20%w/v SDS	0.050	0.015
10%w/v APS	0.100	0.030
TEMED	0.004	0.003

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

1. ประกอบกระจกเข้าด้วยกันโดยใช้อุปกรณ์ เตรียมกระจกทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง
2. ผสมส่วนประกอบของ 10% Resolving Gel เข้าด้วยกันตามลำดับ
3. ใช้ปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตรดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงในกระจกแผ่นละ 5 มิลลิลิตร
4. เติมน้ำ deionized water ลงบนชั้นของ Resolving Gel เพื่อให้ผิวเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เจลเกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 15-20 นาที
5. เตรียมส่วนผสมของ 5% Stacking Gel เข้าด้วยกันตามลำดับ
6. เท deionized water ออก และเติม Stacking Gel ลงไปแผ่นละ 1.5 มิลลิลิตร จนเต็มแผ่นกระจก
7. ใส่หวีเพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับใส่ตัวอย่างลงไปทันทีก่อนเจลเกิดการแข็งตัว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ และทิ้งไว้ให้เจลเกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 15-20 นาที
8. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วให้อาหิวออก

หมายเหตุ :

- 10% Resolving Gel 10 มิลลิลิตรและ 5% Stacking Gel 3 มิลลิลิตร สามารถเตรียมกระจกได้ 2 การทดลอง

- การเตรียม Running buffer สำหรับ sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบสำหรับการเตรียม running buffer

ส่วนประกอบ	Running buffer (กรัม)
Tris-Glycine	3
Glycine	14.4
SDS	1

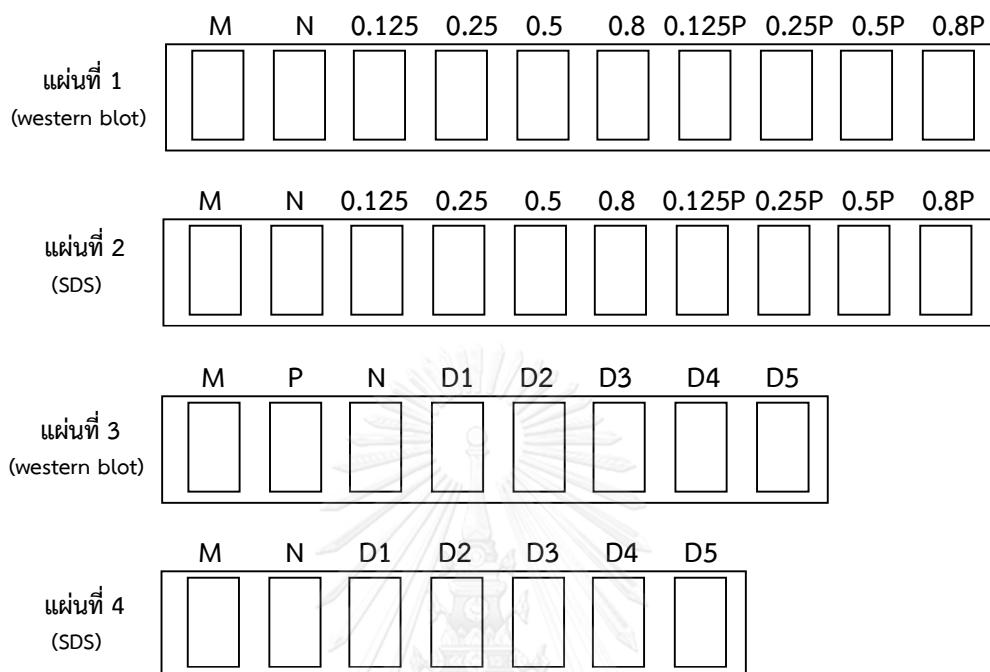
1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดตามตาราง ละลายลงใน deionized water ตามลำดับ
2. ปรับปริมาตรจนเป็น 1000 มิลลิลิตร

- การทำ sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)

1. ประกอบกระจกเข้ากับชุดการทดลอง และใส่ลงใน chamber
2. ใส่ running ลงไปในช่องระหว่างกระจก และใน chamber เพื่อให้กระแสไฟฟ้าสามารถวิ่งได้ครบวงจร
3. ใช้ปิเปตใส่ marker (M) ลงในช่อง 5 ไมโครลิตร และในตัวอย่างลงไปตัวอย่างละ 25 ไมโครลิตร ตามภาพที่ 1
4. เปิดเครื่อง ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าเป็น 40 mA เริ่มการทำงานโดยใช้เวลาประมาณ 45 นาที
5. นำไปตรวจสอบผล
 - 5.1 ตรวจสอบโปรตีนทั้งหมด (total protein) ด้วย coomassie-blue

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

5.2 ตรวจสอบโปรตีนออสทีโอพอนทินด้วย western blot analysis



ภาพที่ 1 ตำแหน่งการเติมสารละลายตัวอย่าง โดย M คือ เครื่องหมาย (protein marker), P คือ สารมาตรฐานออสทีโอพอนทิน (positive control), N คือ wild type (negative control), 0.125 ถึง 0.8 คือ OD₆₀₀ ของอะโกรแบคทีเรีย, p19 คือ มีการแสดงร่วมของ p19, D1 ถึง D5 คือ ตัวอย่างจากวันที่ 1 ถึง 5 หลังจากได้รับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

-การเตรียม Destaining agent

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบสำหรับการเตรียม destaining agent

ส่วนประกอบ	Destaining agent (มิลลิลิตร)
Gracial acetic acid	50
Methanol	150
Deionized water	300

- 1.ตวงส่วนประกอบต่างๆ และผสมให้เข้ากันตามลำดับ
- 2.ปรับปริมาตรจนเป็น 500 มิลลิลิตร

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

-การตรวจสอบโปรตีนทั้งหมด (Total protein) ด้วย coomassie-blue

1. นำเจลที่ผ่าน SDS-PAGE ไปแช่ใน coomassie-blue นำไปวางบนเครื่อง orbital shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ทำการล้าง coomassie-blue ด้วย destaining agent นำไปบนเครื่อง vertical shaker
3. เปลี่ยน destaining agent ทุก 12 ชั่วโมง จนสีจางลงและเห็นผลชัดเจน
4. นำเจลที่ผ่านการล้าง coomassie-blue เรียบร้อยแล้ว มาแช่ในน้ำเพื่อให้เจลพองตัวเต็มที่
5. บันทึกผล

-การเตรียม transfer buffer สำหรับ Western blot analysis

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบสำหรับการเตรียม transfer buffer

ส่วนประกอบ	Transfer buffer (กรัม)
Tris-Glycine	1.54
Glycine	7.2

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดตามตาราง ละลายลงใน deionized water ตามลำดับ
2. ปรับปริมาตรจนเป็น 800 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายที่ได้ไปผสมกับ methanol 200 มิลลิลิตร
4. นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้งาน

-การทำ Western blot analysis

1. นำเจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE มา transfer ลง nitrocellulose membrane โดยนำมา ประกอบเข้ากับชุดการทำ western blot และใส่ลงใน chamber
2. ใส่ transfer buffer ลงใน chamber จนท่วม membrane
3. เปิดเครื่อง ตั้งค่าความต่างศักย์ 40 โวลต์ เริ่มการทำงานโดยใช้เวลาประมาณ 900 นาที
4. นำ membrane ออกมาแช่ใน 5% skim milk และนำไปวางบนเครื่อง vertical shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. เท skim milk ออก และทำ first antibody attach โดยใช้ 2% skim milk ที่มี Mouse anti-human osteopontin (1mg/ml) 5 ไมโครลิตร (1:2000) นำไปวางบนเครื่อง vertical shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. ล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย PBS + 0.05% tween20 จำนวน 2 รอบ และ PBS จำนวน 1 รอบ ใช้เวลารอบละ 10 นาที
7. เท first antibody ออก และทำ second antibody attach โดนใช้ 2% skim milk ที่มี HRP conjugated rabbit anti-mouse IgG (2mg/ml) 1 ไมโครลิตร (1:5000) นำไปวางบนเครื่อง vertical shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

8. ล้างเมมเบรนด้วย PBS + 0.05% tween20 จำนวน 2 รอบ และ PBS จำนวน 1 รอบ ใช้เวลารอบละ 5 นาที
9. นำไปทำการตรวจสอบโปรตีน

-การตรวจสอบโปรตีนออสทีโอพอนทิน

1. ใส่ HRP chemiluminescent substrate reagent A 750 ไมโครลิตร ผสมกับ reagent B 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. ใช้ปิเปตดูดสารละลายใส่ลงบน membrane กระจายสารละลายให้ทั่ว membrane เป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที
3. นำไปอ่านผลด้วยเครื่อง imageQuant
4. เลือกระยะเวลาที่ใช้ในการอ่านผล ตั้งแต่ 30 วินาที ถึง 20 นาที
5. บันทึกผล

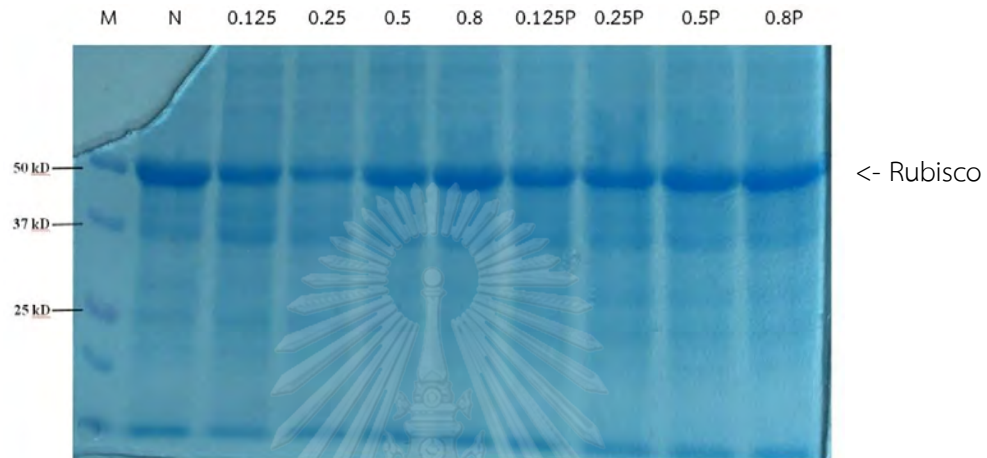


บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

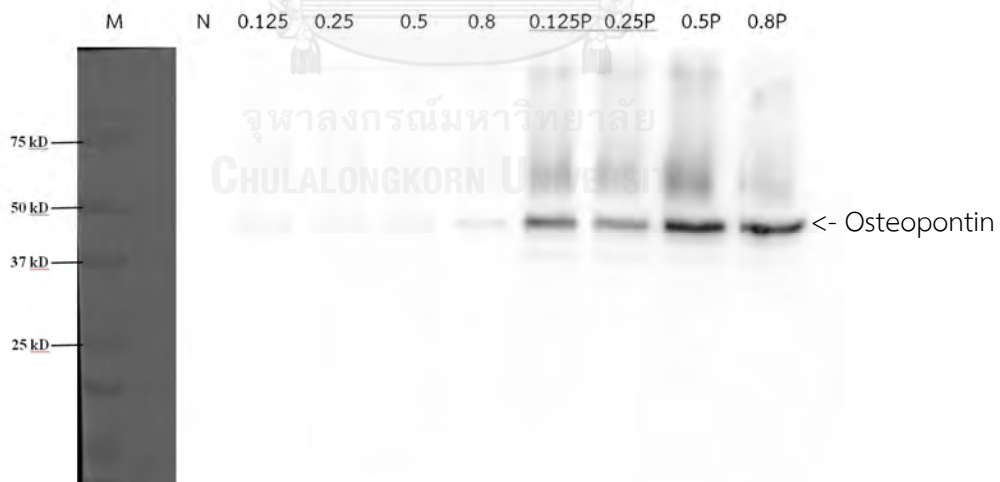
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลของปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียและการแสดงออกร่วมของยีน p19 กับการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทิน



ภาพที่ 2 SDS-PAGE เปรียบเทียบปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรีย OD₆₀₀ และผลของ p19 (P) โดย M คือ โปรตีนมาร์คเกอร์ และ N คือ โปรตีนจากสารสกัดจากไบทันยาสูบชนิด wild type



ภาพที่ 3 Western blot เปรียบเทียบปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรีย OD₆₀₀ และผลของ p19 (P) โดย M คือ โปรตีนมาร์คเกอร์ และ N คือ โปรตีนจากสารสกัดจากไบทันยาสูบชนิด wild type

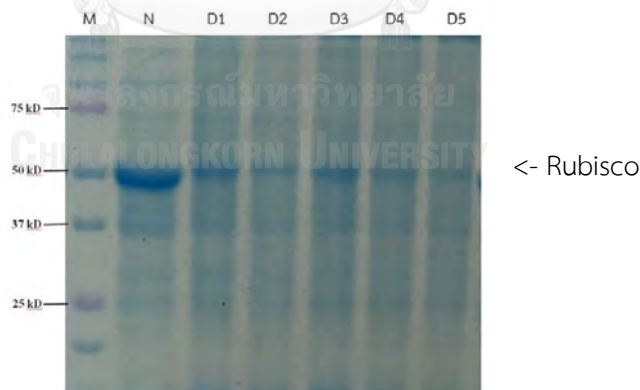
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

ตารางที่ 7 การคำนวณ % ของโปรตีนออสทีโอพอนทินเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียและผลของ p19

		ไม่มี p19			
ความเข้มข้น	N	0.125	0.25	0.5	0.8
OPN	0	230.768	176.15	219.901	416.926
Rubisco Protein	3405.368	2488.968	2033.871	2456.284	2742.581
% OPN/Protein	0.00	9.27	8.66	8.95	15.20
		มี p19			
ความเข้มข้น		0.125	0.25	0.5	0.8
OPN		3277.36	2840.703	6359.126	5643.946
Rubisco Protein		2220.46	2633.771	2608.12	2472.833
% OPN/Protein		147.60	107.86	243.82	228.24

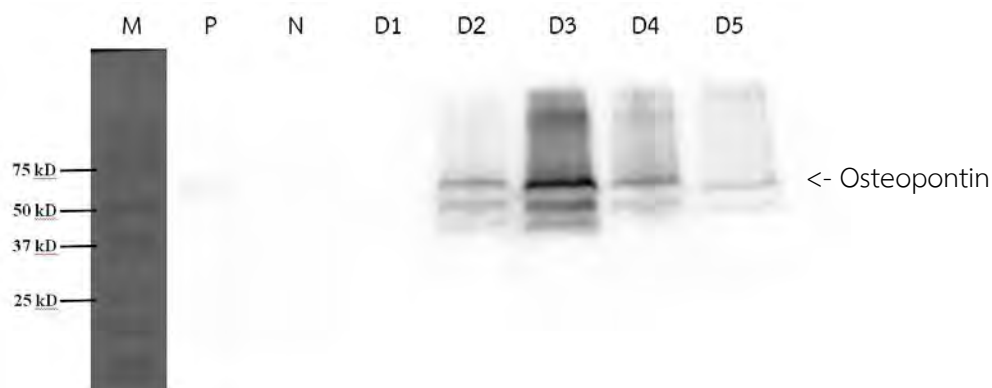
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณอะโกรแบคทีเรียที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.125, 0.25, 0.5 และ 0.8 โดยไม่มีผลของ p19 มาเกี่ยวข้องพบว่า ที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.8 ให้ปริมาณออสทีโอพอนทินมากที่สุดเท่ากับ 15.20 %OPN/Rubisco protein และเมื่อมีผลของ p19 เข้ามาเกี่ยวข้องในอัตราส่วนของ OPN : p19 เท่ากับ 1:1 พบว่า ที่ทุกความเข้มข้นให้ %OPN มากกว่ากลุ่มที่ไม่มี p19 และที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 ให้ %OPN มากที่สุดเท่ากับ 243.82 %OPN/Rubisco protein

4.2 ผลของระยะเวลาในการเก็บผลผลิตกับการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทิน



ภาพที่ 4 SDS-PAGE เปรียบเทียบระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง (D1-D5) โดย M คือ โปรตีนมาร์คเกอร์ และ N คือ โปรตีนจากสารสกัดจากใบต้นยาสูบชนิด wild type

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด



ภาพที่ 5 Western blot เปรียบเทียบระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง (D1-D5) โดย M คือ โปรตีน มาร์คเกอร์ P คือ โปรตีนออสทีโอพอนทินมาตรฐาน 10 ไมโครกรัม และ N คือ โปรตีนจากสารสกัด จากใบต้นยาสูบชนิด wild type

ตารางที่ 8 การคำนวณ % ของโปรตีนออสทีโอพอนทินเพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง

ความเข้มข้น/เวลา	P	N	1	2	3	4	5
OPN	124.485	0	0	3693.23	9938.116	4204.566	1798.049
Rubisco Protein		4407.963	2499.529	1792.411	2598.306	2323.925	1989.024
% OPN/Protein		0.00	0.00	206.05	382.48	180.93	90.40

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างจะเห็นว่า ในวันที่ 1 ยังไม่เกิดการสร้างโปรตีน สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไปจนถึงวันที่ 5 โดยมีปริมาณออสทีโอพอนทินสูงที่สุดในวันที่ 3 เท่ากับ 382.48 %OPN/Rubisco protein หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนจะลดลงในวันที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการแสดงออกของ p19 มีผลทำให้มีการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินในต้นยาสูบเพิ่มขึ้น นอกจากนี้สภาวะด้านปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ใช้และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างนั้นก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินอีกด้วย

5.2 อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินให้ได้มีปริมาณสูงสุด จะต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น การใช้เทคนิคการแสดงออกร่วมกันระหว่างยีนรีคอมบิแนนออสทีโอพอนทินกับยีน p19 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 การหาปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียและระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมเพื่อนำไปตรวจสอบผลโดยการเปรียบเทียบขนาดโปรตีนตัวอย่างกับสารมาตรฐานของโปรตีนออสทีโอพอนทินด้วยเทคนิค western blot analysis พบว่าสารตัวอย่างมีขนาดโปรตีนประมาณ 61kD นอกจากนี้ยังมีการใช้โปรตีนรูบิสโก ซึ่งมีขนาดประมาณ 50 kD ในการเปรียบเทียบเช่นกัน เพื่อให้ทราบถึงปริมาณที่แท้จริงของสารตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากโปรตีนรูบิสโกนี้เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลัก และสามารถพบได้ง่ายในพืช²⁸

ในส่วนของการเปรียบเทียบปริมาณของอะโกรแบคทีเรียและระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง เป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินในพืช โดยจะเห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณของยีนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาของ Kuta และคณะเมื่อปี ค.ศ. 2005¹⁸ ที่ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการสร้างโปรตีน และการศึกษาของ Leuzinger และคณะในปี ค.ศ. 2013 ได้ทำการศึกษาโดยใช้อะโกรแบคทีเรียที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.12 เป็นเวลา 15 วันหลังจากต้นยาสูบได้รับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย¹⁹ ส่วนการศึกษาของ Huang และคณะในปี ค.ศ. 2009 ได้ทำการผลิตอีโบล่าเอนติบอดี พบว่ามีการผลิตโปรตีนสูงที่สุดในวันที่ 4 หลังจากการได้รับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.2 เนื่องจากปริมาณอะโกรแบคทีเรียที่มากเกินไปและระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างที่นานเกินไปมีโอกาสทำให้เกิดการตายแบบ necrosis และโปรตีนถูกทำลายได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้มีการใช้ปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เกินกว่าการศึกษาต่างๆ ที่ได้กล่าวมา ซึ่งมีผลทำให้ใบเกิดการตายแบบ necrosis บางบริเวณเท่านั้น แต่ปริมาณโปรตีนกลับสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ในส่วนของระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างพบว่า มีความใกล้เคียงกับการผลิตอีโบล่าเอนติบอดีของ Huang และคณะ เมื่อปี 2010²⁰ ที่พบว่าวันที่ 4 หลังจากต้นยาสูบได้รับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.2 ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด แต่ในการศึกษาการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินพบว่า วันที่ 3 หลังจากต้นยาสูบได้รับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.25 ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด นอกจากนี้การศึกษานี้ยังได้ทำการวัดปริมาณโปรตีนทุกวันหลังจากที่ต้นยาสูบได้รับเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งจะเห็นแนวโน้มที่ลดลงของโปรตีนหลังจากวันที่ 3 เนื่องจากเมื่อพืชมีการสร้างปริมาณโปรตีนมากขึ้น โปรตีนนั้นอาจเป็นพิษต่อพืชทำให้เซลล์พืชเกิดการตายแบบ necrosis ทำให้ปริมาณโปรตีนลดลง

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

แม้ว่าจะมีการควบคุมสภาวะการเลี้ยงต้นยาสูบทั้งอุณหภูมิ ความชื้น สารอาหาร น้ำ และ ปริมาณแสงที่ได้รับต่อวัน แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในด้านของระยะเวลาที่ใช้ในการนำเชื้อเข้าสู่ต้นพืช เนื่องจากหลังจากที่ทำการวัดปริมาณของเชื้ออะโกราแบคทีเรียแล้ว ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการซึ่งเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลาในการดำเนินงาน ทำให้เชื้ออะโกราแบคทีเรียที่เตรียมได้มีปริมาณที่เปลี่ยนแปลงไปจากเวลาที่ทำการวัด อย่างไรก็ตามไม่ใช่เพียงปัจจัยด้านปริมาณเชื้ออะโกราแบคทีเรียที่ใช้หรือระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวผลผลิต ยังมีปัจจัยสภาวะแวดล้อมอื่นๆที่สำคัญและมีผลต่อการออกแสดงของโปรตีนออสทีโอพอนทินได้ เช่น สายพันธุ์ของเชื้ออะโกราแบคทีเรีย ชนิดของเวกเตอร์ไวรัส และการใส่สารอะซิโตไซริงโคน เป็นต้นซึ่งจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

รายการอ้างอิง

1. Bioengineering NloBl. Tissue engineering and Regenerative medicine. Available from: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>.
2. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*. 2006;3(10):589-601.
3. Hefferon KL. DNA Virus Vectors for Vaccine Production in Plants: Spotlight on Geminiviruses. *Vaccines*. 2014;2(3):642-53.
4. McKee MD, Zalzal S, Nanci A. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *The Anatomical record*. 1996;245(2):293-312.
5. Rincon JC, Xiao Y, Young WG, Bartold PM. Production of osteopontin by cultured porcine epithelial cell rests of Malassez. *Journal of periodontal research*. 2005;40(5):417-26.
6. Sudhir P. Sase, Jayashree V. Ganu, Nagane N. Osteopontin: A Novel Protein Molecule. *Indian Medical Gazette*. 2012 February:62-6.
7. Schlafer S, Raarup MK, Wejse PL, Nyvad B, Stadler BM, Sutherland DS, et al. Osteopontin reduces biofilm formation in a multi-species model of dental biofilm. *PloS one*. 2012;7(8):e41534.
8. Martin E, Pai AS, Lund M, Giachelli CM. Production and Purification of an Optimized Osteopontin Peptide for Use in Vascular Calcification Treatment Studies.
9. Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H. Osteopontin Is Essential for Type I Collagen Secretion in Reparative Dentin. *Journal of dental research*. 2016;95(9):1034-41.
10. Han X, Sun L, Fang Q, Li D, Gong X, Wu Y, et al. Transient expression of osteopontin in HEK 293 cells in serum-free culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;41(1-2):133-40.
11. Chen Q, Lai H. Gene delivery into plant cells for recombinant protein production. *BioMed research international*. 2015;2015.
12. Birch RG. PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 1997;48:297-326.
13. Goldstein DA, Thomas JA. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2004;97(11):705-16.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

14. Rybicki EP. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol J*. 2010;8(5):620-37.
15. Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in plant science*. 2001;6(5):219-26.
16. Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Leuzinger K, Dent M. Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Advanced techniques in biology & medicine*. 2013;1(1):103.
17. Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotech*. 2005;23(6):718-23.
18. Kuta DD, Tripathi L. *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology*. 2005;4(8):752-7.
19. Leuzinger K, Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, Zhou X, et al. Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2013(77):50521.
20. Huang Z, Phoolcharoen W, Lai H, Piensook K, Cardineau G, Zeitlin L, et al. High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnol Bioeng*. 2010;106(1):9-17.
21. Huang Z, Chen Q, Hjelm B, Arntzen C, Mason H. A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnology and bioengineering*. 2009;103(4):706-14.
22. Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H, Galbraith DW. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 1995;8(5):777-84.
23. Wydro M, Kozubek E, Lehmann P. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*-. 2006;53(2):289.
24. Sheludko YV, Sindarovska YR, Gerasymenko IM, Bannikova MA, Kuchuk NV. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007;96(3):608-14.
25. Ruggiero F, Exposito JY, Bournat P, Gruber V, Perret S, Comte J, et al. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Letters*. 2000;469(1):132-6.

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

26. Cramer CL, Boothe JG, Oishi KK. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Current topics in microbiology and immunology*. 1999;240:95-118.
27. Lombardi R, Circelli P, Villani ME, Buriani G, Nardi L, Coppola V, et al. High-level HIV-1 Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinckle Virus. *BMC Biotechnology*. 2009;9(1):96.
28. Bob B. Buchanan WG, Russell L. Jones. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2nd Edition ed: American Society of Plant Physiologists; 2000.



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

UV-VIS Spectrophotometer

หลักการ

UV-VIS spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนแสงของสารในช่วง ultra violet (UV) และ visible (VIS) สารแต่ละชนิดจะดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ต่างกันโดยปริมาณการดูดกลืนแสงจะขึ้นกับความเข้มข้นของสาร ผลการวิเคราะห์จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และค่าความยาวคลื่น (wavelength) ในรูปแบบ spectrum

ส่วนประกอบของ UV-VIS Spectrophotometer

1. แหล่งกำเนิดแสง (Light source)

แหล่งกำเนิดแสงจะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องคงที่ตลอดเวลา และมีความเข้มแสงที่มากพอแหล่งกำเนิดแสงในช่วง UV เช่น H₂ และ D₂ lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ในย่าน 160-380 นาโนเมตร และในช่วง visible เช่น tungsten/halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 นาโนเมตร

2. Monochromator

ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงที่มีความยาวคลื่นเดียว โดยใช้ปริซึม (prism) หรือเกรตติง (grating)

3. เซลล์ (Cell sample)

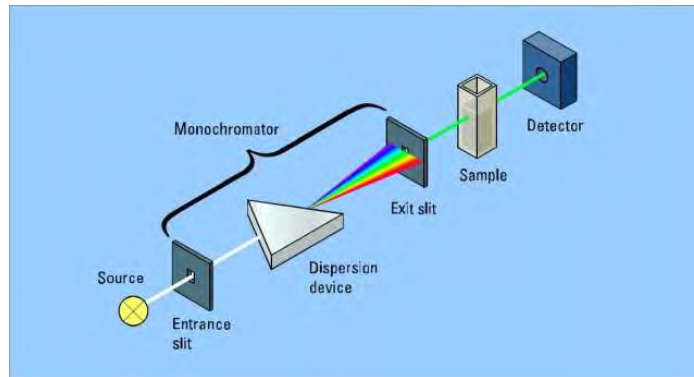
เซลล์ หรือ คิวเวทท์ (cuvettes) ที่ทำด้วยแก้วมักใช้กับแสงในช่วง visible เนื่องจากแก้วสามารถดูดกลืนแสงในช่วง UV ได้ ส่วนเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกาและควอร์ตซ์ (quartz) จะใช้ได้ทั้งช่วง UV และ visible

4. ตัวรับสัญญาณ (Detector)

ตัวรับสัญญาณใช้ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยแปลงพลังงานแสงให้เป็นพลังงานไฟฟ้า เช่น photomultiplier tube (PMT) และ silicon diode detector เป็นต้น

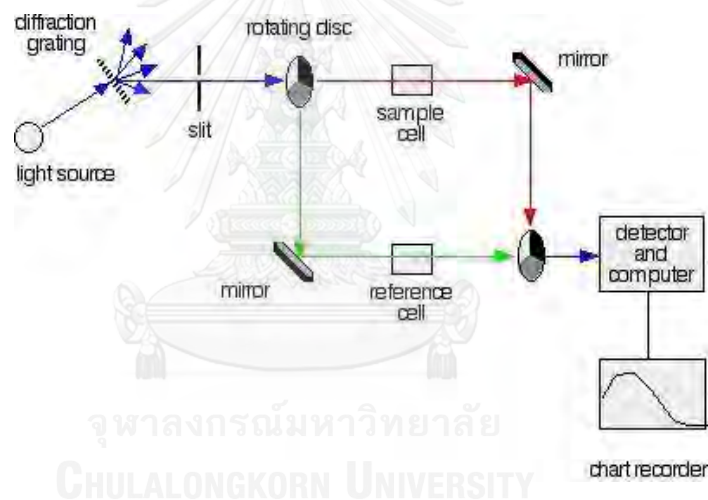
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. Single-Beam spectrophotometer แสงที่ออกจากแหล่งกำเนิดแสงจะผ่านเลนส์โมโนโครเมเตอร์ ผ่านสารตัวอย่าง แล้วจึงเข้าสู่อุปกรณ์ตรวจจับ โดยใช้ลำแสงเพียงลำเดียวผ่านจากโมโนโครเมเตอร์ไปสู่สารละลาย



ภาพ Single-Beam spectrophotometer

2. Double-Beam Spectrophotometer แสงจากแหล่งกำเนิดจะผ่านโมโนโครเมเตอร์ 2 ครั้ง เมื่อออกจาก exit slit แล้ว แสงจะไปสู่ beam chopper ตัดลำแสงแยกออกเป็นสองลำที่มีความเข้มเท่ากัน ผ่านสารตัวอย่าง และผ่านสารอ้างอิง เข้าสู่ detector



ภาพ Double-Beam Spectrophotometer

เอกสารอ้างอิง

Boonwattana J. UV-Visible spectrophotometer Mae FahLuang University [27 Apr 2017]. Available from: <http://web2.mfu.ac.th/center/stic/spectroscopy-chem-analysis-instrument/itemlist/user/87>.

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Western blot

หลักการ

เทคนิค Western blot ถูกใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับเซลล์และชีวโมเลกุลเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนจำเพาะ โดยจะมีขั้นตอนหลักๆ อยู่ 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนแยกโปรตีนตามขนาดของโมเลกุล ขั้นตอนถ่ายย้ายโปรตีนสู่แผ่นรองรับ และขั้นตอนการจับด้วย antibodies ที่จำเพาะต่อโปรตีนนั้นๆ ซึ่งจะทำให้เราสามารถสังเกตและวิเคราะห์ผลโปรตีนได้

เทคนิคที่เกี่ยวข้อง

การเตรียมเจล

การเตรียมเจลเพื่อใช้ในการแยกขนาดโปรตีนนั้นต้องเตรียมเจลทั้งหมด 2 ประเภท ได้แก่ Stacking gel และ Separating gel ตามสูตรเตรียมเจลด้านล่าง

10% Stacking gel	dd H ₂ O	3 mL
	1 M Tris-HCl	2.1 mL (pH 8.9)
	30% Acr Bis	2.8 mL
	10% SDS	80 μL
	10% APS*	56 μL
	TEMED*	6 μL
6% Separating gel	dd H ₂ O	2 mL
	1M Tris-HCl	400 μL (pH 6.7)
	30% Acr Bis	600 μL
	10% SDS*	36 μL
	10% APS*	24 μL
	TEMED	4 μL

* , APS: Ammonium Persulfate ; TEMED: Tetramethylethylenediamine;
SDS: Sodium dodecyl sulfate

ภาพสูตรการเตรียมเจล

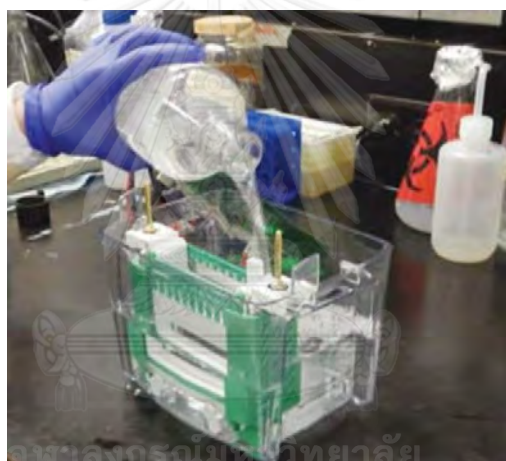
โดยจะต้องเตรียมส่วน Separating gel ก่อนบนฐานตั้ง (Assembled rack) และจึงเตรียมส่วนของ Stacking gel เติมใส่ในส่วนชั้นบนต่อจาก Separating gel



ภาพการเตรียมเจลบนฐานตั้ง

อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิสถูกใช้ในการแยกโปรตีนตามขนาด และมี Running buffer เป็นสารน้ำตัวกลางในการนำไฟฟ้าซึ่งจะทำในเครื่อง Electrophorator ที่ 60-140 V



ภาพการเติม Running buffer ลงใน Electrophorator

อิเล็กโทรทรานเฟอร์ (Electrotransfer)

อิเล็กโทรทรานเฟอร์เป็นการถ่ายย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลเข้าสู่แผ่นรองรับซึ่งมีหลายประเภท เช่น polyvinylidene fluoride โดยจะต้องประกบแผ่นรองรับกับแผ่นเจลในชุดประกบ (ฟองน้ำ-กระดาษกรอง-แผ่นรองรับ-กระดาษกรอง-ฟองน้ำ) และมี Transferring buffer เป็นสารน้ำตัวกลางในการนำไฟฟ้าซึ่งจะทำในเครื่อง Electrophorator ที่อุณหภูมิ 4°C

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)



ภาพการดำเนินเครื่อง Electrophorator สำหรับการทำอิเล็กโตรฟอเรซิส

การบล็อกโปรตีนและจับด้วย antibodies

การบล็อกโปรตีนนั้นทำได้โดยเขย่าแผ่นรองรับที่มีโปรตีนกับสารละลาย 5% skim milk ในตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น TBST หลังจากนั้นทำการเขย่าเข้ากับ antibodies ที่จำเพาะกับโปรตีนที่ต้องการต่อไป โดยจะแบ่งออกเป็นสองขั้นได้แก่ ขั้นที่จับด้วย primary antibody และขั้นที่จับด้วย secondary antibody สุดท้ายจะต้องเติมสารตรวจจับ เช่น สารเรืองแสง ที่มีความสามารถในการจับและจำเพาะกับ antibody ที่ใช้ เพื่อตรวจสอบและวิเคราะห์ผลโปรตีนที่ต้องการ



ภาพการเขย่าแช่แผ่นรองรับที่มีโปรตีนกับสารละลาย skim milk

เอกสารอ้างอิง

Mahmood T, Yang P. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. North American Journal of Medical Sciences [Internet]. 2012 [cited 29 April 2017];4(9):429–434. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3456489/#>.

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Extraction Buffer

ส่วนประกอบ

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (มิลลิลิตร)
1.5 M Tris-HCL (pH 8.8)	4.17
10% SDS	5
50% glycerol	10
100 mM Na ₂ S ₂ C ₅	25
Deionized water	5.93

วิธีการเตรียม

1. ปิเปิด Deionized water 5.93 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร
2. ปิเปิดส่วนประกอบอื่นตามตารางใส่ลงในหลอดข้อ 1. ผสมให้เข้ากัน



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)