

สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินในต้นยาสูบ

นางสาวโสภณัฐ วิเชียรสรรค์ 5736578533

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
เภสัชศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Optimization of osteopontin protein expression  
in *Nicotiana benthamiana*

Sopanut Wichiansun 5736578533



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

2018  
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการปริญญาโท

สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน  
ออสทีโอพอนทินในต้นยาสูบ

นิสิตผู้ดำเนินโครงการ

นางสาวโสภณัฐ วิเชียรสรรค์

สาขาวิชา/ภาควิชา

การค้นพบและพัฒนาญา / ภาควิชาเภสัชเวชและ  
เภสัชพันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท

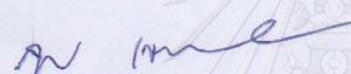
รศ.ดร.วรัญญา พูลเจริญ

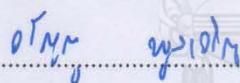
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

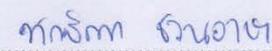
ผศ.ภญ.ดร.ทักษิณา ชวนอาษา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต

  
..... คณบดี  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพ็ชร สุกุลบำรุงศิลป์)

  
..... ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนาญา  
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรัญญา พูลเจริญ)

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

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โสภณัฐ วิเชียรสรรรค์: สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินในต้นยาสูบ (Optimization of Osteopontin Protein Expression in *Nicotiana benthamiana*) อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.วรัญญู พูลเจริญ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ภญ.ดร.ทักษิณา ชวนอาษา. 32 หน้า.

ออสทีโอพอนทินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถทำหน้าที่เป็นโมเลกุลให้สัญญาณ (signaling molecules) ในเทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) โดยมีบทบาทเกี่ยวกับการสร้างและเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อกระดูก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าออสทีโอพอนทินที่ผลิตจากต้นยาสูบ *Nicotiana benthamiana* สามารถกระตุ้นยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ bone remodeling ได้นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการผลิตออสทีโอพอนทินโดยปรับปรุงชิ้นส่วนของยีนส์ให้เหลือเฉพาะส่วนของ C-terminal และนำไปทดสอบกับเซลล์เอ็นดอทีทนต์ ผลปรากฏว่าออสทีโอพอนทินส่วน C-terminal สามารถกระตุ้นยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ bone remodeling ได้ดีกว่าออสทีโอพอนทินส่วนอื่นๆ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินส่วน C-terminal ในต้นยาสูบ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pBYR2eK2Md-C-OPN-His มาศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ในการฉีดเข้าไปของต้นยาสูบ ซึ่งศึกษาที่ OD<sub>600</sub> = 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 โดยทำการศึกษาเป็นเวลา 6 วัน (1-6 dpi) หลังทำการฉีดเชื้อ นำไปไม่มาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค western blot จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินส่วน C-terminal ในต้นยาสูบคือใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ OD<sub>600</sub> = 0.4 โดยเก็บใบหลังจากฉีดเป็นเวลา 3 วัน (3 dpi)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คณะเภสัชศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

SOPANUT WICHANSUN: OPTIMIZATION OF OSTEOPONTIN PROTEIN EXPRESSION IN *Nicotiana benthamiana* ADVISOR: ASSOC. PROF. WARANYOO PHOOLCHAROEN PH.D. CO-ADVISSOR: ASSIST. PROF. TAKSINA CHUANASA PH.D. 32 pp.

Osteopontin is a protein which plays an important role in the bone remodeling process, it can act as a signaling molecules in tissue engineering. The previous study showed that plant-produced osteopontin has been reported to stimulate osteogenic related genes. Furthermore, it has been shown that a C-terminal truncated OPN appeared more effective in stimulating the expression of osteogenic related genes than full-length OPN and N-terminal OPN. The aim of this study is to optimize the conditions of C-terminal fragment truncated osteopontin protein expression including concentration of *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strains containing pBYR2eK2Md-C-OPN-His, OD<sub>600</sub> of 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 were used for agroinfiltration, and day post-infiltration (dpi). Infiltrated leaves were collected at 1-6 dpi, extracted and analyzed Western blotting. The results indicate that OD<sub>600</sub> of 0.4 of agrobacterium at 3 days post-infiltration is the optimized condition for C-terminal fragment truncated OPN protein expression in *N.benthamiana*.



Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University

Student's signature .....  
Advisor's signature .....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## กิตติกรรมประกาศ

ดิฉันขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร.วรัญญู พูลเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการปริญญาโท และ ผศ. ภญ. ดร.ทักษิณา ชวนอาษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการปริญญาโท ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ แนวคิด และข้อคิดเห็นต่างๆตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงการปริญญาโทฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิก WP lab ทุกคนและเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในทุกๆด้าน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและสมาชิกในครอบครัวที่ให้ความสนับสนุนในทุกๆด้านตลอดมา



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 กระบวนการสลายและสร้างกระดูก (bone remodeling).....	3
2.2 โปรตีนออสทีโอพอนทิน.....	4
2.3 ระบบที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน.....	5
2.4 การถ่ายทอดยีนเข้าสู่พืชโดยใช้ agrobacterium เป็นพาหะ.....	6
2.5 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา.....	9
3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	9
3.1.1 พืช เชื้อแบคทีเรียและเวกเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	9
3.1.2 โปรตีนมาตรฐาน.....	10
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	10
3.1.4 สารเคมี.....	10
3.1.5 เครื่องมือ.....	10
3.1.6 อุปกรณ์อื่นๆ.....	11

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.2 วิธีกรทดลอง .....	11
3.2.1 การเลี้ยงเชื้อ Agrobacterium tumefaciens .....	11
3.2.2 กระบวนการ agroinfiltration .....	11
3.3.3 การสกัดโปรตีน .....	12
3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน .....	13
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	15
4.1 ผลการวัดปริมาณเชื้อ agrobacterium .....	15
4.2 ผลการเจือจางสารแขวนลอยเชื้อ agrobacterium .....	15
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน .....	15
4.4 ผลการแสดงออกของไบยาสูบหลังได้รับเชื้อ agrobacterium.....	21
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง .....	22
5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....	22
5.2 สรุปผลการทดลอง.....	23
รายการอ้างอิง.....	24
ภาคผนวก ก .....	27
ภาคผนวก ข .....	30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ค่า $A_{595}$ ของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) .....	15
ตารางที่ 2 ค่า $A_{595}$ ของสารสกัดตัวอย่าง .....	16
ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นของ total protein คำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐานโปรตีน .....	17
ตารางที่ 4 ปริมาณสารสกัดตัวอย่างที่มีค่าความเข้มข้นของ total protein = 10 $\mu\text{g}$ .....	17
ตารางที่ 5 ปริมาณสารสกัดตัวอย่างที่มีค่าความเข้มข้นของ total protein = 15 $\mu\text{g}$ .....	17
ตารางที่ 6 ปริมาณเชื้อและ infiltration buffer ที่ใช้ในการเจือจางเชื้อ .....	31
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร .....	32



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 osteoclast lineage.....	3
รูปที่ 2 osteoblast lineage .....	4
รูปที่ 3 โครงสร้างของออสทีโอพอนทิน.....	5
รูปที่ 4 กระบวนการถ่ายถอดยีนจากแบคทีเรียสู่จีโนมของพืช.....	7
รูปที่ 5 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิด pBYR2eK2Md-GFP .....	9
รูปที่ 6 โครงสร้างของ T-DNA บนพลาสมิด pBYR2eK2Md-C-OPN-His .....	9
รูปที่ 7 โครงสร้างของออสทีโอพอนทินส่วน C-terminal (C-OPN-His).....	9
รูปที่ 8 รูปแบบการฉีดใบด้วย agrobacterium.....	12
รูปที่ 9 ลำดับการเก็บใบของต้นยาสูบ .....	12
รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานโปรตีน BSA.....	16
รูปที่ 11 SDS-PAGE ของสารสกัดโปรตีน.....	18
รูปที่ 12 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนออสทีโอพอนทินด้วยวิธี Western blot .....	20
รูปที่ 13 ลักษณะของใบยาสูบหลังได้รับเชื้อ agrobacterium ที่ระยะเวลาต่างๆ.....	21

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เป็นเทคนิคที่มีวัตถุประสงค์เพื่อซ่อมแซม ปรับปรุง และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ถูกทำลายโดยไม่ก่อให้เกิดการต่อต้านทางระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นการนำความรู้ทางด้านวิศวกรรมและชีววิทยามาประยุกต์ใช้ร่วมกัน โดยมีองค์ประกอบหลัก 3 อย่างคือ เซลล์ (cells) ที่จะนำมาใช้ให้เกิดการสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อ โครงร่าง (scaffolds) ที่ให้เซลล์ไปยึดเกาะและอาศัยอยู่ และโมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecules) ซึ่งเป็นสารที่ควบคุมการทำงานและการเจริญของเซลล์ (Langer & Vacanti, 1993) ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีความพยายามที่จะศึกษาการใช้โมเลกุลส่งสัญญาณ มากระตุ้นการเจริญของเซลล์ ซึ่งหนึ่งในโมเลกุลส่งสัญญาณที่มีการศึกษาอยู่ในปัจจุบันคือออสทีโอพอนทิน (osteopontin) (Srithanyarat, 2019)

ออสทีโอพอนทินเป็นไกลโคโปรตีนชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มของ Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLING family) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหลายอย่างในร่างกายเช่น ทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ในกระบวนการเกิดการอักเสบ ระบบภูมิคุ้มกัน การลุกลามของมะเร็ง รวมถึงกระบวนการสลายและการสร้างกระดูก (bone remodeling) (Standal, Borset, & Sundan, 2004) จากผลของกระบวนการ post-translation modification (phosphorylation, glycosylation, sulfation and proteolysis) ทำให้โปรตีนออสทีโอพอนทินมีความหลากหลายทั้งในด้านของโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน (Anborgh, Mutrie, Tuck, & Chambers, 2011) ในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินจึงจำเป็นต้องเลือกระบบการผลิตที่มีกระบวนการ post-translation modification เพื่อแต่งเติมโปรตีนให้เหมือนกับในมนุษย์ เพราะจะมีผลต่อการทำงานของโปรตีน

การผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินจำเป็นผลิตในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต เช่น mammalian cells เนื่องจากเป็นระบบที่มีกระบวนการ post-translation modification แต่ก็จะทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ใช้ระยะเวลานาน และปริมาณการผลิตต่ำ (Du et al., 2019) พืชจึงเป็นหนึ่งในระบบการผลิตที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินที่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเป็นระบบการผลิตที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ ใช้ระยะเวลาสั้น ปราศจากเชื้อก่อโรคในมนุษย์ และมีกระบวนการ post-translation modification (Viana, Dias, Franco, & Lacorte, 2013)

ที่ผ่านมาเคยมีการศึกษาการผลิต recombinant human osteopontin ในต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) แล้วนำโปรตีนออสทีโอพอนทินไปทดสอบกับเซลล์เอ็นไคต์ปริทันต์ (periodontal ligament cells) ผลปรากฏว่าโปรตีนออสทีโอพอนทินที่ผลิตจากต้นยาสูบสามารถกระตุ้นยีนส์ *DMP1*, *Wnt3a* และ *OSX* ซึ่งเป็นยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ bone remodeling ได้ดีกว่า commercial human osteopontin (Rattanapisit et al., 2017) นอกจากนี้ยังมี

การศึกษาการนำส่วนต่างๆของโปรตีนออสทีโอพอนทิน ได้แก่ full-length, osteopontin, N-  
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

terminal osteopontin และ C-terminal osteopontin มาศึกษาบทบาทของแต่ละส่วน โดยทดสอบกับ periodontal ligament cells ผลปรากฏว่า C-terminal osteopontin สามารถกระตุ้น ยีนส์ *DMP1* และ *Wnt3a* ได้ดีกว่าทั้ง full-length osteopontin และ N-terminal osteopontin

ในการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาโปรตีนออสทีโอพอนทินในส่วนของ C-terminal เนื่องจากในการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าโปรตีนออสทีโอพอนทินส่วนนี้มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้กระตุ้นการเกิด bone remodeling ได้ และจากขนาดที่เล็กกว่าของ C-terminal osteopontin น่าจะทำให้สามารถเข้าไปจับกับ receptor ที่อวัยวะเป้าหมายได้ง่ายและดีกว่า full-length osteopontin (Goddard, 1991)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินส่วน C-terminal ในต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pBYR2eK2Md-C-OPN-His



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

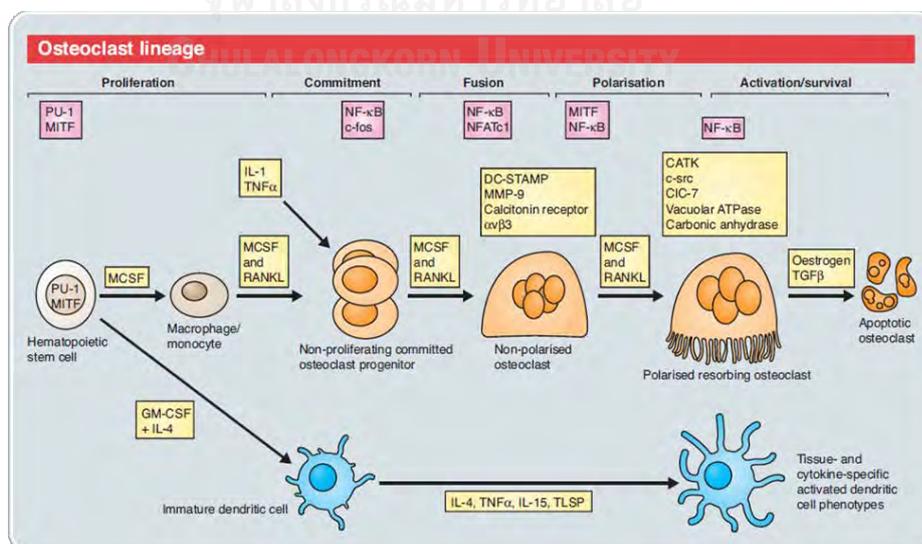
## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 กระบวนการสลายและสร้างกระดูก (bone remodeling)

กระบวนการสลายและสร้างกระดูก (bone remodeling) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตั้งแต่ก่อนคลอดและเกิดขึ้นเรื่อยๆตลอดชีวิตเพื่อให้กระดูกคงความแข็งแรงและรักษาสมดุลแร่ธาตุ (mineral homeostasis) กระบวนการ bone remodeling เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูกเก่าและแทนที่ด้วยการสร้างกระดูกใหม่จาก osteoid ซึ่งจะเกิดกระบวนการ mineralization เกิดเป็นกระดูกใหม่ขึ้นมา โดยปกติกระบวนการสร้างและการสลายกระดูกจะเกิดขึ้นอย่างสมดุล แต่หากมีความไม่สมดุลเกิดขึ้นก็จะเกิดโรคเกี่ยวกับกระดูก เช่น หากเกิดการสลายกระดูกมากเกินไปจะเกิดโรค osteoporosis แต่หากกระบวนการสร้างกระดูกมากเกินไปจะเกิดโรค osteopetrosis (Katsimbri, 2017)

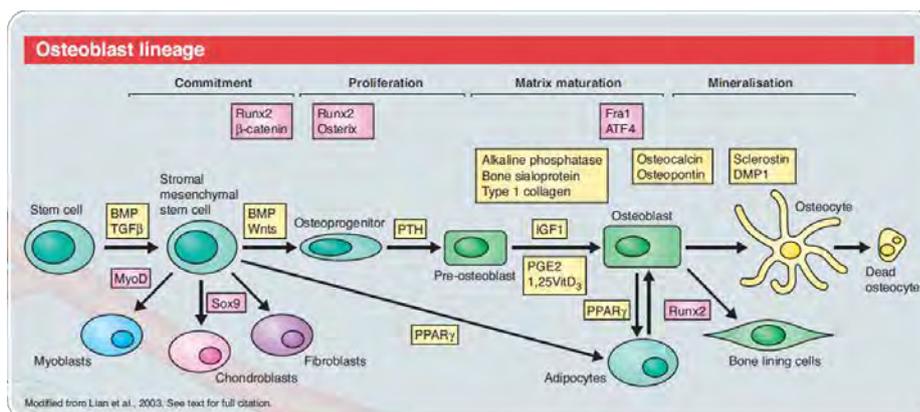
กระบวนการ bone remodeling เกิดขึ้นโดยอาศัยการทำงานของ osteoclast ซึ่งเจริญมาจาก haematopoietic stem cells โดยอาศัย growth factor เช่น Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), tumor necrosis factor (TNF) (รูปที่ 1) ทำหน้าที่ในการสลายกระดูก (Asagiri & Takayanagi, 2007) และ osteoblast ซึ่งเจริญมาจาก mesenchymal stem cells โดยอาศัย growth factor เช่น Wnt, BMP, DMP1, Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Osterix (Osx), osteocalcin, osteopontin (รูปที่ 2) ทำหน้าที่สังเคราะห์ bone matrix และบางส่วนจะเกิด differentiate ต่อไปเป็น osteocyte (de Baat, Heijboer, & de Baat, 2005)



รูปที่ 1 osteoclast lineage (Crockett, Rogers, Coxon, Hocking, & Helfrich, 2011)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 2 osteoblast lineage (Crockett et al., 2011)

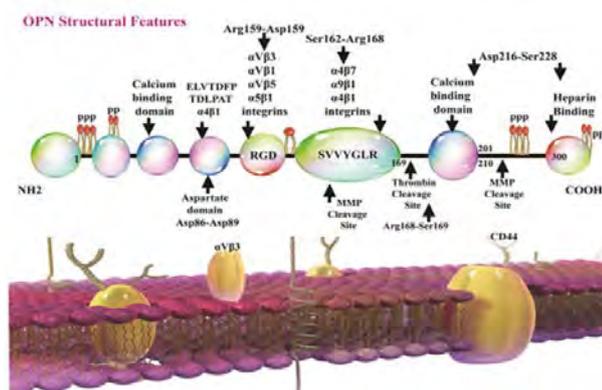
กระบวนการ bone remodeling ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนคือ 1. Activation เมื่อมีการกระตุ้น osteoclasts มายังตำแหน่งที่จะเกิด bone remodeling ซึ่งเดิมอยู่ในระยะ quiescence มี bone lining cells ปกคลุมอยู่ bone lining cells จะแยกออกจากกันเพื่อให้ osteoclast เข้าไปทำการสลายเนื้อกระดูก 2. Resorption หลังจาก osteoclast ไปเกาะอยู่บริเวณผิวของกระดูกแล้ว osteoclast จะเริ่มทำการสลายกระดูกและเมื่อทำการสลายกระดูกเสร็จแล้ว osteoclast จะเกิดการตายแบบ apoptosis 3. Reverse กลุ่มของ macrophage-like cells เข้ามาทำการสลายเศษซากที่เกิดขึ้นระหว่างเกิดกระบวนการสลายกระดูก 4. Formation มีการหลั่ง growth factors เช่น bone morphogenetic proteins (BMPs), fibroblast growth factors (FGFs), transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) มายังบริเวณที่จะเกิดการสร้างกระดูกใหม่จากนั้นจะเกิดการสังเคราะห์ bone matrix และเกิดกระบวนการ mineralization จนได้กระดูกที่แข็งแรง (Rucci, 2008)

## 2.2 โปรตีนออสทีโอพอนทิน

ออสทีโอพอนทิน (osteopontin) หรือที่รู้จักกันในชื่อ bone sialoprotein1 (BSP1) (Mirzaei et al., 2018) เป็น non-collagenous protein ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 300 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงตั้งแต่ 41 ถึง 75 กิโลดาลตัน เป็นหนึ่งในสมาชิกของ Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLING family) ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มที่พบในเนื้อเยื่อที่มีการสะสมแร่ธาตุ (mineralized tissue) และโปรตีนในกลุ่มนี้จะมีลักษณะบางอย่างที่คล้ายคลึงกัน เช่น กระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) กระบวนการเติมน้ำตาล (glycosylation) และโครงสร้างของโปรตีน (Huang et al., 2008) ซึ่งประกอบด้วย integrin binding domains ได้แก่ กรดอะมิโน RGD (RGD sequence) และลำดับกรดอะมิโน (SWVYGLR sequence) calcium binding domains และ heparin binding domains นอกจากนี้ยังมีส่วนของ proteolytic cleavage site ซึ่งประกอบไปด้วย thrombin cleavage site และ MMP cleavage site แสดงดังรูปที่ 3 (Mirzaei et al., 2018)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 3 โครงสร้างของออสทีโอพอนทิน (Mirzaei et al., 2018)

เนื่องจากกระบวนการ post-translational modification ที่มีความหลากหลายตามอวัยวะที่พบโปรตีนออสทีโอพอนทินซึ่งมีกระบวนการ post-translational modification ที่แตกต่างกัน จึงเป็นผลทำให้เกิดโปรตีนออสทีโอพอนทินมีโครงสร้างและหน้าที่ที่แตกต่างกัน (Hao et al., 2017) โปรตีนออสทีโอพอนทินสามารถพบได้ในอวัยวะหลายส่วนในร่างกาย เช่น น้ำนม ไต ปัสสาวะ กระดูก และฟัน ซึ่งออสทีโอพอนทินมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการหลายอย่างในร่างกาย เช่น ทำหน้าที่เป็น cytokines ในกระบวนการเกิดการอักเสบ ระบบภูมิคุ้มกัน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของหลอดเลือด การลุกลามของมะเร็ง การกระตุ้นการหายของบาดแผล (wound healing) การสลายและการสร้างกระดูก (bone remodeling) เป็นต้น (Anborgh et al., 2011)

### 2.3 ระบบที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ในปัจจุบันมีการพัฒนาระบบผลิตอย่างมากมายอย่างเช่นแบคทีเรีย ยีสต์ mammalian cells ซึ่งแต่ละระบบการผลิตก็มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากแบคทีเรีย เป็นวิธีที่มีการนำไปใช้มากที่สุด เนื่องจากการผลิตที่มีต้นทุนต่ำและสามารถผลิตโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว แต่การใช้แบคทีเรียในการผลิต โปรตีน ก็ยังมีข้อจำกัดคือ โปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียจะไม่เหมือน eukaryotic protein เนื่องจากแบคทีเรียไม่มีกระบวนการ post-translational modification ซึ่งเป็นกระบวนการที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การละลาย ความคงตัว ค่าครึ่งชีวิตและการต้านทานการถูกตัดสายของโปรตีน (McKenzie & Abbott, 2018)

ยีสต์เป็นเซลล์ยูคาริโอตที่ดีที่นำมาใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เนื่องจากต้นทุนการผลิตค่อนข้างต่ำ สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีนได้ง่าย ไม่มี endotoxin หรือ lytic virus และไม่มีก่อโรคในคน ยีสต์มีกระบวนการ post-translational modification แต่แตกต่างจากคนมากซึ่งก็จะส่งผลต่อการม้วนตัวและการทำงานของโปรตีน (Mattanovich et al., 2012)

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

**เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Mammalian cells เป็นระบบที่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการมีกระบวนการ post-translational modification ที่เหมือนกับในมนุษย์ แต่การผลิตโปรตีนจาก mammalian cells มีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงและการเพิ่มปริมาณการผลิตทำได้ยาก ดังนั้นจึงมีการคิดค้นและพัฒนาระบบที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีคุณภาพ ซึ่งการใช้พืชเป็นแหล่งผลิตโปรตีนก็เป็นระบบที่เกิดขึ้นใหม่ซึ่งมีข้อดีหลายอย่างเช่น มีกระบวนการ post-translational modification ที่คล้ายกับคน ต้นทุนการผลิตต่ำ เพิ่มปริมาณการผลิตได้ง่าย ปลอดภัยปราศจากเชื้อก่อโรคในคนและใช้ระยะเวลาการผลิตสั้น (Yusibov & Mammedov, 2010)

#### 2.4 การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้ agrobacterium เป็นพาหะ

*Agrobacterium tumefaciens* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน มีความสามารถในการก่อโรคในพืชที่เรียกว่า crown gall disease โดยก่อให้เกิดก้อนเนื้อที่สามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ด้วยการถ่ายยีนขึ้นยีนที่เรียกว่า transfer DNA (T-DNA) ที่อยู่บน tumor-inducing (Ti) plasmid และมียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต opines ซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนให้แก่ agrobacterium เข้าสู่จีโนมของพืช (Lacroix & Citovsky, 2013)

การถ่ายยีนโดยใช้ agrobacterium ต้องอาศัย 2 องค์ประกอบบน Ti plasmid คือ T-DNA ซึ่งอยู่ระหว่าง left border (LB) และ right border (RB) และ virulence (vir) region ซึ่งมีการกระตุ่น *chvA chvB pscA* และ *att* (Douglas, Staneloni, Rubin, & Nester, 1985) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ cyclic  $\beta$ -1,2-glucan และน้ำตาลประเภทอื่นๆ บนเซลล์ของแบคทีเรีย (Zorreguieta et al., 1988) และในระหว่างที่แบคทีเรียยึดเกาะอยู่บนเซลล์พืช จะมีการสังเคราะห์ cellulose fibrils ที่ช่วยให้เกิดการยึดเกาะของแบคทีเรียบริเวณบาดแผลของพืช พืชจะหลั่งสารประกอบ phenolic เช่น lignin และ flavonoid precursors ที่สามารถกระตุ้น virulence gene expression ได้ สาร phenolic ที่สามารถกระตุ้น vir gene ได้ผลดีที่สุดคือ monocyclic phenolics เช่น 3,5-dimethoxy acetophenone (acetosyringone) (Subramoni, Nathoo, Klimov, & Yuan, 2014)

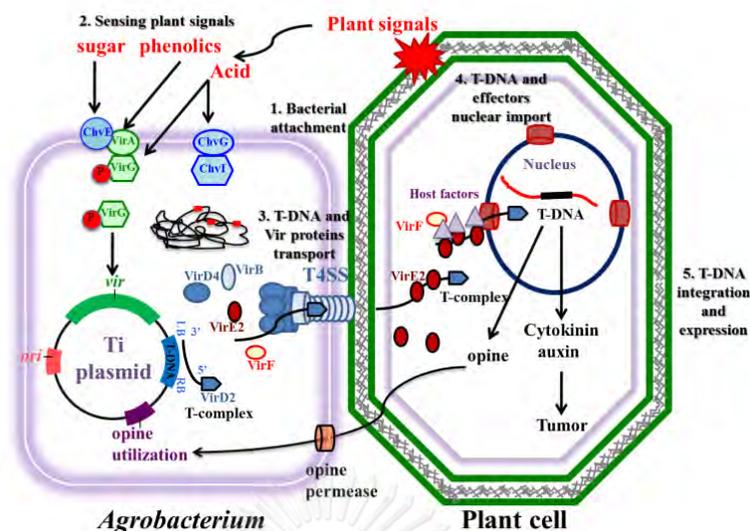
แบคทีเรียจะใช้ยีน VirA/VirG ในการควบคุมการกระตุ้น vir gene โดยเริ่มจากสาร phenolic จะกระตุ้น *virA* ซึ่งเป็น transmembrane protein ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณและเป็นตัวกระตุ้น vir gene ตัวอื่นๆ ต่อไป (Hu, Zhao, DeGrado, & Binns, 2013) จากนั้นการเกิด virulence gene expression จะทำให้เกิดการสร้าง T-DNA สายเดี่ยว (T-strand) ซึ่งจะเป็นส่วนที่ถูกส่งเข้าไปในจีโนมของพืช โดยการทำงานร่วมกันของ VirD1 และ VirD2 ที่จะปล่อยเอนไซม์ออกมาตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ T-DNA ในบริเวณ RB และ LB ที่สาย bottom strand บน Ti plasmid หลังจากถูกตัด T-strand จะถูกจับด้วยโปรตีนจาก VirD2 ที่ปลาย 5' ทางด้าน RB แล้วเคลื่อนย้าย T-strand จาก agrobacterium เข้าสู่เซลล์พืชโดยผ่าน Type IV secretion system (T4SS) โดยมีการส่ง VirD5, VirE2, VirE3 และ VirF เข้าไปสู่เซลล์พืชจากนั้นจะเกิดการจับกันของ T-strand, VirD2 และ VirE2 เป็น T-complex (Gelvin, 2017) และเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าไปสู่นิวเคลียสของพืชโดยมีโปรตีนจากพืชมาช่วยในการเคลื่อนที่ (Li & Pan, 2017)

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

**เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 4 กระบวนการถ่ายยีนจากแบคทีเรียสู่จีโนมของพืช

1. agrobacterium จับกับ receptor บนพืช
2. พืชหลั่งสาร phenolic ซึ่งมีผลกระตุ้นการทำงานของยีนใน agrobacterium
3. T-DNA เคลื่อนที่จาก agrobacterium เข้าสู่เซลล์พืช
4. T-DNA เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของพืช
5. T-DNA แทรกตัวเข้าสู่จีโนมพืช

(Hwang, Yu, & Lai, 2017)

## 2.5 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาที่ผ่านมาในปี 2005 เคยมีการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินในเชื้อ *E.coli* ซึ่งมีการนำออสทีโอพอนทินที่ผลิตได้ไปทดสอบกับ human osteoblastic cell line ผลปรากฏว่าออสทีโอพอนทินสามารถทำให้เกิด cell adhesion, proliferation และ differentiation ของ osteoblast ได้ (Jang & Kim, 2005) ซึ่งการทำงานของออสทีโอพอนทินเป็นผลมาจากกระบวนการ post-translational modification (Rangaswami, Bulbule, & Kundu, 2006)

จากแนวคิดที่ว่าการทำงานของออสทีโอพอนทินจะมีผลควบคุม cell adhesion ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างกระดูก ดังนั้นพืชจึงเป็นระบบการผลิตโปรตีนที่เหมาะสมที่จะนำมาผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินจากข้อดีของพืชคือมีกระบวนการ post-translational modification ในปี 2017 จึงมีการศึกษาการผลิตโปรตีนในพืช โดยใช้ต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamina*) เป็นแหล่งในการผลิตโปรตีน จากนั้นจึงนำออสทีโอพอนทินไปทดสอบกับ periodontal ligament stem cells ผลปรากฏว่าออสทีโอพอนทินที่ผลิตจากพืชสามารถกระตุ้นยีน *DMP1*, *Wnt3a* และ *OSX* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ bone remodeling ได้ดีกว่า commercial osteopontin ซึ่ง

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เป็นการแสดงให้เห็นว่าพืชเป็นระบบที่สามารถนำมาใช้ผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินได้ (Rattanapisit et al., 2017)

จากนั้นในปี 2019 มีการศึกษาการนำออสทีโอพอนทินมาเชื่อมต่อด้วย ส่วนของ Fc ของ human antibody และใช้ต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamina*) ในการผลิตโปรตีน ผลปรากฏว่า ออสทีโอพอนทินที่เชื่อมต่อด้วยส่วนของ Fc ของ human antibody มีปริมาณการผลิตที่เพิ่มมากขึ้น และ purification ได้ง่ายขึ้นโดยไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน (Rattanapisit, Srifa, Kaewpungsup, Pavasant, & Phoolcharoen, 2019)

นอกจากนี้ในปี 2019 ยังมีการศึกษาการนำส่วนต่างๆของโปรตีนออสทีโอพอนทิน ได้แก่ full-length osteopontin, N-terminal osteopontin และ C-terminal osteopontin มาศึกษา บทบาทหน้าที่ของแต่ละส่วน โดยทดสอบกับ periodontal ligament cells ผลปรากฏว่า C-terminal osteopontin สามารถกระตุ้นยีนส์ *DMP1* และ *Wnt3a* ได้ดีกว่าทั้ง full-length osteopontin และ N-terminal osteopontin



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

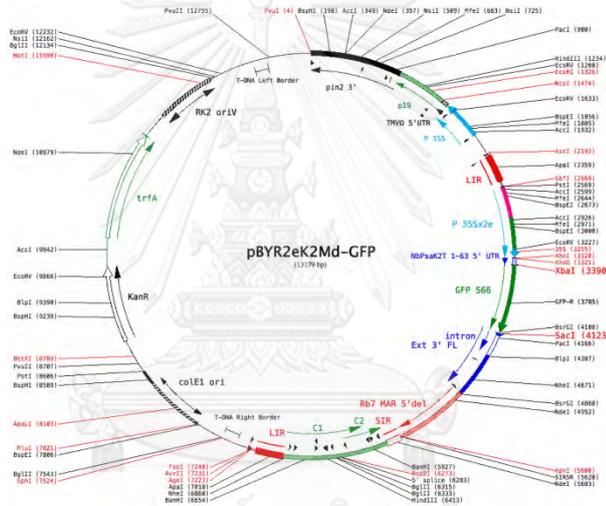
# บทที่ 3

## วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา

### 3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

#### 3.1.1 พืช เชื้อแบคทีเรียและเวกเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

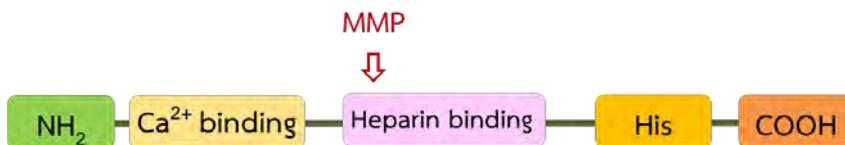
- ต้นยาสูบ *Nicotiana benthamiana*
- *Agrobacterium tumefaciens* strains GV3101 ที่มีพลาสมิด pBYR2eK2Md-C-OPN-His



รูปที่ 5 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิด pBYR2eK2Md-GFP



รูปที่ 6 โครงสร้างของ T-DNA บนพลาสมิด pBYR2eK2Md-C-OPN-His



รูปที่ 7 โครงสร้างของออสทีโอพอนตินส่วน C-terminal (C-OPN-His)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

### 3.1.2 โปรตีนมาตรฐาน

- สารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- โปรตีนมาตรฐาน (protein marker)

### 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเหลว LB (ภาคผนวก)
- ยาปฏิชีวนะ (Rifampin, Gentamycin, Kanamycin)

### 3.1.4 สารเคมี

- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
- infiltration buffer (ภาคผนวก)
- extraction buffer (ภาคผนวก)
- Bradford reagent
- น้ำอัลตราเพียว (ultrapure water)
- loading dye (ภาคผนวก)
- acrylamide gel (ภาคผนวก)
- running buffer (ภาคผนวก)
- Coomassie brilliant blue
- destaining solution (ภาคผนวก)
- transfer buffer (ภาคผนวก)
- skim milk (ภาคผนวก)
- HRP conjugated anti-His antibody
- TBS-T buffer
- ECL plus detection reagent

### 3.1.5 เครื่องมือ

- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer)
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอ่านวิเคราะห์สารตัวอย่างเรืองแสง (Chemi-luminescence documentation)
- ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

### 3.1.6 อุปกรณ์อื่นๆ

- forcep
- gel cassette
- โกร่งและลูกโกร่ง (mortar and pestle)
- กระบอกฉีดยา (syringe)
- คิวเวต (cuvette)
- ซองน้ำแข็ง (ice pack)
- ถุงซิปล็อค
- ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน
- ฟองน้ำ
- ไมโครปิเปตและปิเปตทิป (pipette and pipette tip)
- ไมโครเพลท 96 หลุม (96 well-plate)
- หลอด microcentrifuge

## 3.2 วิธีการทดลอง

### 3.2.1 การเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

นำเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* strains GV3101 ที่มีพลาสมิด pBYR2eK2Md-C-OPN-His จาก stock culture 20 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่เติม Rifampin, Kanamycin และ Gentamycin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แล้วทำการถ่ายเชื้อไปเลี้ยงในอาหารใหม่ (subculture) โดยปิเปตเชื้อ agrobacterium 1 มิลลิลิตรจากเชื้อที่เลี้ยงไว้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว 20 มิลลิลิตรที่เติม Rifampin, Kanamycin และ Gentamycin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นจำนวน 3 หลอด ในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ต่ออีก 1 วันแล้วทำการเก็บเซลล์ agrobacterium โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งล้างตะกอนเซลล์ด้วย infiltration buffer ปริมาณหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเท infiltration buffer ทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย infiltration buffer หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วรวมสารแขวนลอย agrobacterium เป็นหลอดเดียวกัน

### 3.2.2 กระบวนการ agroinfiltration

นำสารแขวนลอย agrobacterium ไปวัดปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Optical density; OD<sub>600</sub>) ของสารแขวนลอย agrobacterium ที่เจือจาง 20 เท่า โดยใช้ infiltration buffer 950 ไมโครลิตร และ เชื้อ agrobacterium 50 ไมโครลิตร นำค่า OD<sub>600</sub> ที่วัดได้คำนวณกลับเป็น OD<sub>600</sub> ของสารแขวนลอย agrobacterium ที่ไม่ได้เจือจาง แล้วจึงคำนวณปริมาณสารแขวนลอย

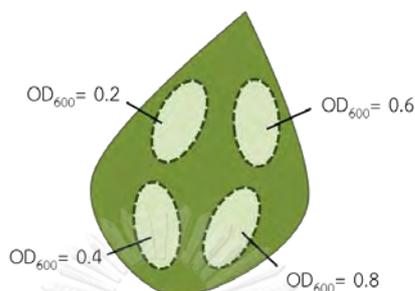
**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

**เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

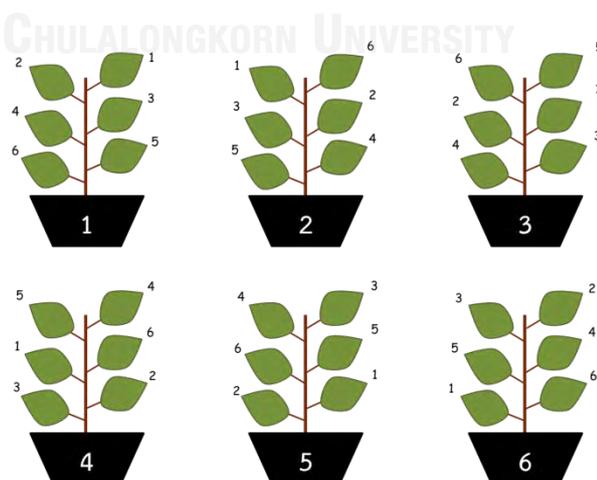
agrobacterium ที่ต้องใช้เพื่อเจือจางด้วย infiltration buffer ให้ได้สารแขวนลอย agrobacterium ที่มี OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 จากนั้นนำสารแขวนลอย agrobacterium ที่เจือจางแล้วไปฉีดเข้าที่หลังใบของต้นยาสูบ โดยฉีดทั้งหมด 6 ต้น ต้นละ 6 ใบ และมีกลุ่มควบคุมแบบลบ (negative control) คือใบยาสูบปกติที่ไม่ได้ถูกฉีดด้วย agrobacterium (wild type; WT) จำนวน 6 ใบ จากต้นยาสูบทั้ง 6 ต้น



รูปที่ 8 รูปแบบการฉีดใบด้วย agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub>=0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 (หลังใบ)

### 3.3.3 การสกัดโปรตีน

เก็บใบในวันที่ 1-6 หลังจากฉีด agrobacterium เข้าไปในใบ (1-6 days post-infiltration; dpi) โดยเก็บใบจากทุกต้น ต้นละ 1 ใบ ตัดแยกใบแต่ละส่วนที่มี OD<sub>600</sub> ต่างกัน แล้วนำชิ้นส่วนใบที่มี OD<sub>600</sub> เท่ากันจากแต่ละใบมาเก็บไว้ด้วยกันในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อคงสภาพจนกว่าจะดำเนินการขั้นตอนต่อไป (ในแต่ละวันจะมีตัวอย่างทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ที่มี OD<sub>600</sub> ต่างกัน เก็บใบทั้งหมด 6 วัน มีตัวอย่างทั้งหมด 24 ตัวอย่าง) จากนั้นนำใบมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนได้เป็นผงแห้ง ละเอียด เติม extraction buffer 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าผสมด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนสารละลายใส (supernatant) ด้านบนเพื่อไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน



รูปที่ 9 ลำดับการเก็บใบของต้นยาสูบจากต้นยาสูบทั้ง 6 ต้นในวันที่ 1-6 หลังฉีด agrobacterium บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

### 3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

#### 3.3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

นำสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) มาเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยทำการเจือจางเชื้อจากด้สารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างเป็นลำดับ (serial dilution) โดยเริ่มจากการใช้สารละลายโปรตีน (BSA) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ 10 ไมโครลิตร จะได้สารละลายโปรตีนความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เป็นปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นดูดสารละลายโปรตีนนี้ 10 ไมโครลิตรไปใส่ในหลอด microcentrifuge ถัดไปซึ่งใส่น้ำไว้ 10 ไมโครลิตร ก็จะได้สารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนได้สารละลายโปรตีนความเข้มข้น 0.078 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นเตรียม Bradford reagent 12 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Bradford reagent ลงในไมโครเพลทหลุมละ 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐานโปรตีนและสารสกัดตัวอย่างลงในแต่ละหลุม หลุมละ 1 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader สร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน แล้วคำนวณความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวม (total protein) ในสารสกัดตัวอย่างแต่ละตัวโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

#### 3.3.4.2 การแยกโปรตีนออสทีโอพอนทินด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ประกอบกระจกและเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ 15% resolving gel ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้เจลแข็ง แล้วเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ 5% stacking gel จำนวน 3 แผ่น ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็ง นำสารสกัดตัวอย่างมาผสม loading buffer อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยอดสารสกัดตัวอย่างแต่ละตัวให้มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 10 ไมโครกรัม และ protein marker 3 ไมโครลิตร ลงในเจล ทำการ run gel ด้วยกระแสไฟฟ้า 90 มิลลิแอมป์แอมป์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเจลไปย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant blue เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย destaining solution 2 ครั้ง

เตรียมเจลอัตราส่วน 5% stacking gel และ 15% resolving gel อีก 3 แผ่น นำสารสกัดตัวอย่างมาผสม loading buffer อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยอดสารสกัดตัวอย่างแต่ละตัวให้มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 15 ไมโครกรัม และ protein marker 3 ไมโครลิตร ลงในเจล ทำการ run gel ด้วยกระแสไฟฟ้า 90 มิลลิแอมป์แอมป์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนออสทีโอพอนทินด้วยวิธี Western blot

#### 3.3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนออสทีโอพอนทินด้วยวิธี Western blot

เท transfer buffer ลงในแท็งค์ แล้วนำฟองน้ำ กระดาษและแผ่นเมมเบรนจุ่มลงใน transfer buffer แล้ววางฟองน้ำ กระดาษ แผ่นเมมเบรนและเจล (ที่ได้ทำการ run gel เพื่อแยกโปรตีนแล้ว) ลงบน gel cassette ตามลำดับ ปิด gel cassette แล้วนำลงไปในแท็งค์ โดยให้เจลอยู่ทางซ้าย และแผ่นเมมเบรนอยู่ทางขวามือของแท็งค์ นำ ice pack ใส่ลงไปในแท็งค์ ปิดแท็งค์ แล้ว transfer โปรตีนจากเจลลงบนแผ่นเมมเบรนโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

**เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เมื่อครบเวลา นำแผ่นเมมเบรนออกมาจาก gel cassette แล้วทำการบล็อกป้องกันโปรตีนอื่นเข้ามาจับโดยแช่ 5% skim milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น probe เมมเบรนด้วย HRP conjugated anti-His antibody ใน 3% skim milk อัตราส่วน 1:5000 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างเมมเบรนด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วใส่ chemiluminescence reagent เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องอ่านวิเคราะห์สารตัวอย่างเรืองแสง



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 ผลการวัดปริมาณเชื้อ agrobacterium

จากการนำสารแขวนลอย agrobacterium ไปวัดปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดค่า OD<sub>600</sub> ของสารแขวนลอย agrobacterium พบว่าสารแขวนลอย agrobacterium ที่เจือจาง 20 เท่าวัดค่า OD<sub>600</sub> ได้เท่ากับ 0.24 เมื่อคำนวณกลับเป็น OD<sub>600</sub> ของสารแขวนลอย agrobacterium ที่ไม่ได้ถูกเจือจาง (สารแขวนลอย agrobacterium 100%) จะได้ค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 4.8

#### 4.2 ผลการเจือจางสารแขวนลอยเชื้อ agrobacterium

เมื่อนำค่า OD<sub>600</sub> ของสารแขวนลอย agrobacterium 100% มาคำนวณปริมาณเชื้อที่ต้องใช้ในการเจือจางด้วย infiltration buffer ให้ได้สารแขวนลอย agrobacterium ที่มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 จะต้องใช้ สารแขวนลอย agrobacterium ปริมาณ 0.58, 1.17, 1.75 และ 2.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเติม infiltration buffer จนครบ 14 มิลลิลิตร

#### 4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

##### 4.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

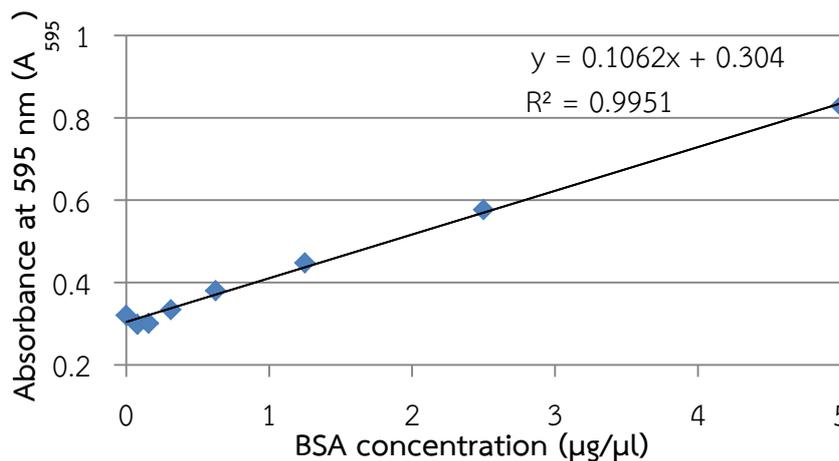
ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) และ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A<sub>595</sub>) ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) และ A<sub>595</sub> ไปสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน จะได้กราฟที่มีสมการคือ  $y = 0.1062x + 0.304$  และค่า R-squared (R<sup>2</sup>) เท่ากับ 0.9951 (รูปที่ 10)

ตารางที่ 1 ค่า A<sub>595</sub> ของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) ด้วยวิธี Bradford

ความเข้มข้นของ BSA (µg/µl)	ค่าเฉลี่ย A <sub>595</sub>
0	0.320333
0.078	0.298
0.156	0.301
0.313	0.334
0.625	0.38
1.250	0.447333
2.000	0.576667
5.000	0.828667

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานโปรตีน BSA ด้วยวิธี Bradford

ค่า  $A_{595}$  ของสารสกัดตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำ ค่า  $A_{595}$  ของสารสกัดตัวอย่างไปคำนวณหาความเข้มข้นของ total protein โดยคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน จะได้ค่าความเข้มข้นของ total protein ของแต่ละสารสกัดตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3 และเมื่อนำค่าความเข้มข้นของ total protein ไปคำนวณปริมาณสารสกัดตัวอย่างแต่ละตัวให้มีความเข้มข้นของปริมาณของ total protein เท่ากับ 10 และ 15 ไมโครกรัม ได้ผลดังตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่า  $A_{595}$  ของสารสกัดตัวอย่าง ด้วยวิธี Bradford

dpi \ OD <sub>600</sub>	0.2	0.4	0.6	0.8
1	0.524	0.459	0.614	0.51
2	0.6	0.469	0.474	0.515
3	0.515	0.372	0.533	0.462
4	0.443	0.488	0.472	0.443
5	0.443	0.368	0.439	0.378
6	0.429	0.445	0.421	0.417
WT	0.523			

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นของ total protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) คำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐานโปรตีน

dpi \ OD <sub>600</sub>	0.2	0.4	0.6	0.8
1	7.240909	10.27742	5.13871	7.73301
2	5.381757	9.654545	9.370588	7.549763
3	7.549763	23.42647	6.956332	10.08228
4	11.46043	8.657609	9.482143	11.46043
5	11.46043	24.89063	11.8	21.52703
6	12.744	11.29787	13.61538	14.09735
WT	7.273973			

ตารางที่ 4 ปริมาณสารสกัดตัวอย่าง ( $\mu\text{L}$ ) ที่มีค่าความเข้มข้นของ total protein = 10  $\mu\text{g}$

dpi \ OD <sub>600</sub>	0.2	0.4	0.6	0.8
1	4.827273	6.851613	3.425806	5.15534
2	3.587838	6.436364	6.247059	5.033175
3	5.033175	15.61765	4.637555	6.721519
4	7.640288	5.771739	6.321429	7.640288
5	7.640288	16.59375	7.866667	14.35135
6	8.496	7.531915	9.076923	9.39823
WT	4.849315			

ตารางที่ 5 ปริมาณสารสกัดตัวอย่าง ( $\mu\text{L}$ ) ที่มีค่าความเข้มข้นของ total protein = 15  $\mu\text{g}$

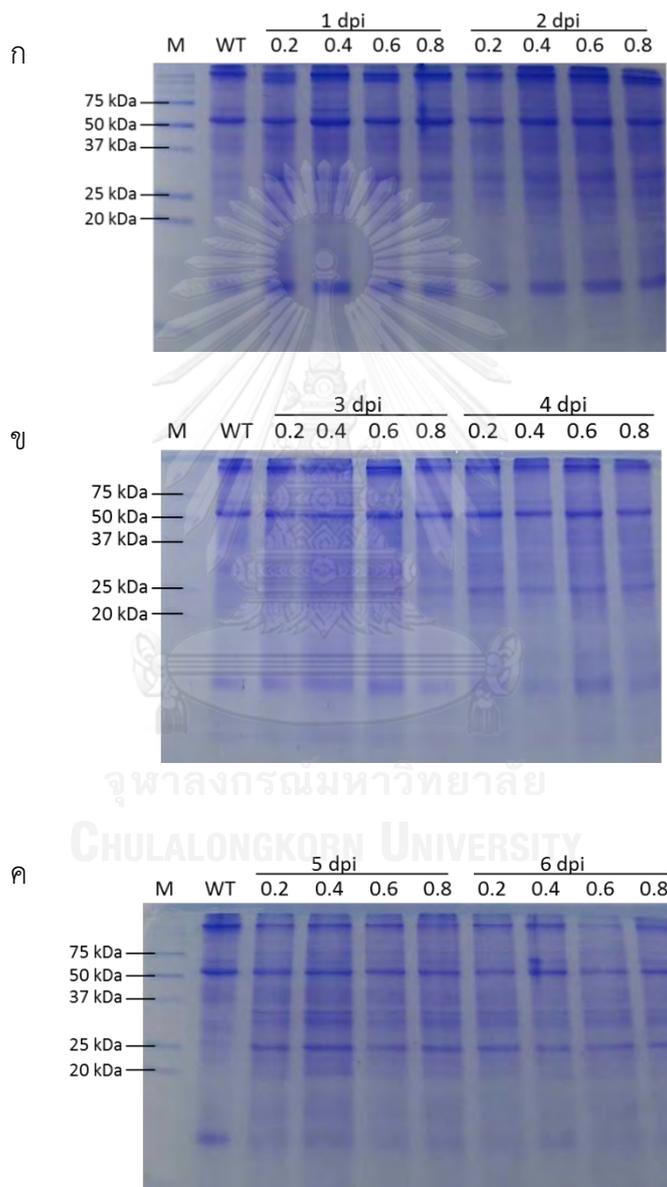
dpi \ OD <sub>600</sub>	0.2	0.4	0.6	0.8
1	2.071563	1.45951	2.919021	1.939736
2	2.787194	1.553672	1.600753	1.986817
3	1.986817	0.640301	2.156309	1.487759
4	1.308851	1.73258	1.581921	1.308851
5	1.308851	0.602637	1.271186	0.696798
6	1.177024	1.327684	1.101695	1.06403
WT	2.062147			

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

#### 4.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

จากการนำเจลโพลีอะคริลาไมด์ไปย้อมสีด้วย Coomassie พบว่าความเข้มข้นของ total protein ที่ใช้ในการหยอดเจลของสารสกัดตัวอย่างแต่ละตัวมีความเข้มข้นเท่ากัน โดยสังเกตได้จากแบนด์ของรูบิสโกซึ่งเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดในพืช โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน ที่ปรากฏแบนด์ขนาดใกล้เคียงกันในทุกสารสกัดตัวอย่าง



รูปที่ 11 SDS-PAGE ของสารสกัดโปรตีน (ก) 1-2 dpi (ข) 3-4 dpi (ค) 5-6 dpi

M โปรตีนมาตรฐาน (protein marker)

WT wild type

dpi ระยะเวลาที่เก็บใบหลังจากฉีด agrobacterium (day post-infiltration)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

#### 4.3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนออสทีโอพอนทินด้วยวิธี Western blot

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนออสทีโอพอนทินซึ่งมีขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน ด้วยวิธี Western blot พบว่าปรากฏแถบโปรตีนออสทีโอพอนทินของสารสกัดตัวอย่างจากใบยาสูบที่ถูกเก็บในวันที่ 2-4 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (2-4 dpi) และเมื่อวิเคราะห์ขนาดของแถบที่เกิดขึ้นพบว่าแถบโปรตีนออสทีโอพอนทินของสารสกัดตัวอย่างจากใบยาสูบที่ใช้ความเข้มข้นของ agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 และ 0.6 ในการฉีดโดยเก็บใบในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (3 dpi) มีสีเข้มและหนาที่สุดเมื่อเทียบกับแถบของสารสกัดตัวอย่างจากใบยาสูบที่ถูกเก็บในวันอื่นๆ

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของแถบโปรตีนออสทีโอพอนทินจากใบยาสูบที่ถูกฉีดด้วยสารแขวนลอย agrobacterium ความเข้มข้นเดียวกัน ซึ่งถูกเก็บในแต่ละวัน พบว่าสารแขวนลอย agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.2 แถบโปรตีนจะมีสีเข้มและหนาขึ้นในทุกๆวันตั้งแต่วันที่ 2 ถึง 4 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium ซึ่งแถบโปรตีนจะเข้มที่สุดในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium

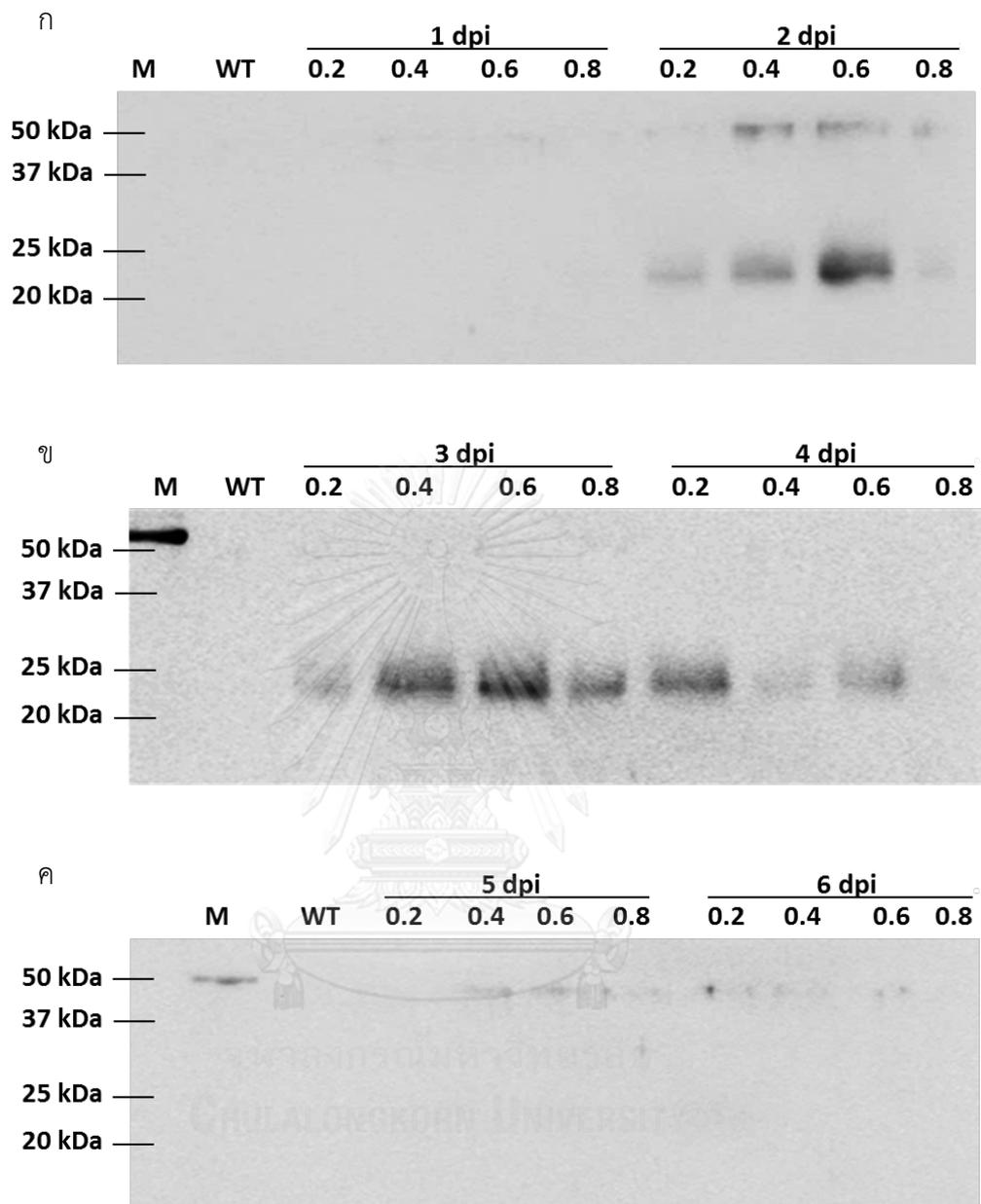
สารแขวนลอย agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 และ 0.6 จะให้ผลไปในทางเดียวกัน คือแถบโปรตีนจะมีสีเข้มและหนาขึ้นในวันที่ 2 และ 3 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (2 และ 3 dpi) ซึ่งแถบโปรตีนจะเข้มที่สุดในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (3 dpi) และแถบโปรตีนจะจางลงในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (4 dpi)

สารแขวนลอย agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.8 เมื่อเปรียบเทียบในวันเดียวกันจะสังเกตเห็นแถบโปรตีนมีสีจางกว่าความเข้มข้นเชื้ออื่นๆ โดยจะเห็นแถบโปรตีนจางๆในวันที่ 2 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (2 dpi) แถบโปรตีนจะมีสีเข้มและหนาที่สุดในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (3 dpi) และแถบโปรตีนจางหายไปในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (4 dpi)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 12 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนออสทีโอพอนทินด้วยวิธี Western blot  
(ก) 1-2 dpi (ข) 3-4 dpi (ค) 5-6 dpi

M โปรตีนมาตรฐาน (protein marker)

WT wild type

dpi ระยะเวลาที่เก็บใบหลังจากฉีด agrobacterium (day post-infiltration)

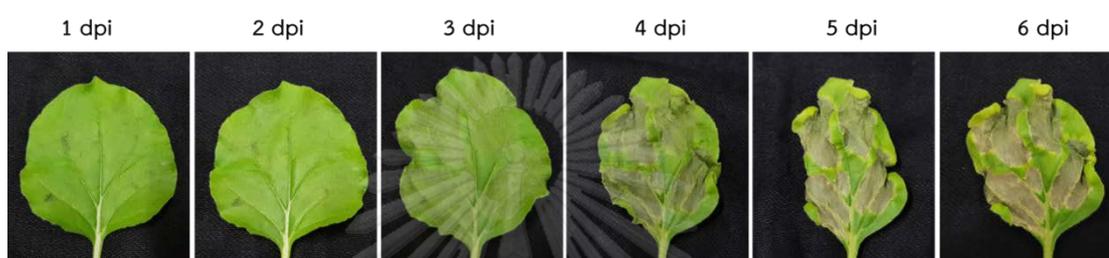
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

#### 4.4 ผลการแสดงผลของใบยาสูบหลังได้รับเชื้อ agrobacterium

เมื่อสังเกตลักษณะของใบยาสูบหลังจากฉีดเชื้อ agrobacterium เข้าไป พบการเกิด necrosis บนใบของต้นยาสูบบริเวณที่ได้รับเชื้อ ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (3 dpi) และหลังจากนั้นในวันที่ 4, 5 และ 6 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (4-6 dpi) ใบเกิดการ necrosis เหี่ยว และตายเพิ่มขึ้นในทุกๆวัน ส่วนบริเวณใบที่ไม่ได้รับเชื้อ agrobacterium (บริเวณขอบใบและระหว่างความเข้มข้นของสารแขวนลอย agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub> ต่างกัน) จะไม่เกิดการเกิด necrosis จนถึงวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (6 dpi)



รูปที่ 13 ลักษณะของใบยาสูบหลังได้รับเชื้อ agrobacterium ที่ระยะเวลาต่างๆ

dpi ระยะเวลาที่เก็บใบหลังจากฉีด agrobacterium (day post-infiltration)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## บทที่ 5

### อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

#### 5.1 อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินในใบของต้นยาสูบด้วยวิธี Western blot พบว่าในวันที่ 1 หลังจากฉีดเชื้อ agrobacterium ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทิน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับใบที่ได้รับเชื้อ ซึ่งอาจเป็นเพราะยังไม่มีการผลิตโปรตีนเกิดขึ้น สามารถเห็นการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินได้ในวันที่ 2 ถึง 4 หลังจากฉีดเชื้อ agrobacterium (2-4 dpi) โดยการแสดงออกจะมากที่สุดในวันที่ 3 หลังจากฉีดเชื้อ agrobacterium (3 dpi) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับลักษณะการแสดงออกของใบที่สังเกตเห็นได้ คือ บริเวณใบที่ได้รับเชื้อเริ่มเกิด necrosis ในวันที่ 3 หลังจากฉีดเชื้อ agrobacterium (3 dpi) ซึ่งผลที่ได้นี้ก็สอดคล้องกับการศึกษาที่เคยมีมา (Rattanapisit et al., 2017) การแสดงออกของโปรตีนจะลดลงในวันที่ 4 หลังจากฉีดเชื้อ agrobacterium (4 dpi) และในวันที่ 5 และ 6 หลังจากฉีดเชื้อ agrobacterium (5-6 dpi) จะไม่เห็นการแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทิน ซึ่งก็จะสอดคล้องกับลักษณะการแสดงออกของใบ คือ ในวันที่ 4 ถึง 6 หลังจากฉีดเชื้อ agrobacterium (4-6 dpi) บริเวณใบที่ได้รับเชื้อ agrobacterium มีการเกิด necrosis มาก จนเห็นใบมีลักษณะเหี่ยวแห้งและตาย ซึ่งเป็นสัญญาณที่แสดงให้เห็นว่าใบได้รับเชื้อ agrobacterium และน่าจะมีการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินเกิดขึ้น แต่ที่ไม่สามารถสังเกตเห็นการแสดงออกของโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot อาจเป็นเพราะว่าโปรตีนออสทีโอพอนทินที่ผลิตออกมาเป็นพิษต่อใบของต้นยาสูบ ทำให้ใบยาสูบตาย และโปรตีนออสทีโอพอนทินที่ถูกผลิตออกมาจึงสลายไปด้วย

ความเข้มข้นของสารแขวนลอย agrobacterium ที่ต่ำหรือสูงเกินไปทำให้การแสดงออกของโปรตีนไม่ค่อยดี จะเห็นได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot การใช้สารแขวนลอย agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.2 และ 0.8 ส่วนใหญ่จะเกิดแบนด์โปรตีนที่จางกว่าการใช้สารแขวนลอย agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub> อื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบในวันเดียวกัน ซึ่งความเข้มข้นของสารแขวนลอย agrobacterium ที่ทำให้การแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินมากที่สุดคือความเข้มข้นที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 และ 0.6 (ในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium; 3 dpi) สังเกตได้จากลักษณะของแบนด์ที่เกิดขึ้นซึ่งจะเห็นว่าแบนด์มีความหนาและความเข้มมากที่สุด ซึ่งแบนด์ของทั้ง 2 ความเข้มข้นนี้เข้มและหนาใกล้เคียงกันมาก ซึ่งหมายถึงโปรตีนที่ผลิตได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน

เมื่อพิจารณาทั้งในด้านระยะเวลาและต้นทุน ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตโปรตีน การใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอย agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 ในการผลิตโปรตีนชนิดนี้จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมมากกว่าการใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอย agrobacterium ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.6 เมื่อเก็บใบในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อ agrobacterium (3 dpi) เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นของเชื้อน้อยกว่าทำให้ประหยัดทั้งระยะเวลา และต้นทุนในการผลิตอื่นๆ ซึ่งก็สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

**เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ในกรณีที่มีข้อจำกัดทางด้านเวลา หรือต้องการใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในการผลิตโปรตีน อาจพิจารณาเลือกใช้สารแขวนลอย *agrobacterium* ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.6 ในการฉีดใบแทน จะสามารถลดระยะเวลาการรอเก็บใบได้จาก 3 วัน เหลือ 2 วัน เนื่องจากในวันที่ 2 หลังฉีดเชื้อ *agrobacterium* (2 dpi) การแสดงออกของโปรตีนออสทีโอพอนทินจะมากที่สุด (แบนด์หนาที่สุด) เมื่อใช้เชื้อ *agrobacterium* ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.6 เมื่อพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot

## 5.2 สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตโปรตีนออสทีโอพอนทินส่วน C-terminal ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายและสร้างกระดูก (bone remodeling) ในต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pBYR2eK2Md-C-OPN-His คือใช้ความเข้มข้นของ *agrobacterium* ที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 และเก็บใบในวันที่ 3 หลังจากฉีดเชื้อ *agrobacterium* (3 dpi)



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## รายการอ้างอิง

1. Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
2. Srithanyarat SS. งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเกี่ยวกับกระบวนทัศน์ใหม่ในการรักษาโรคปริทันต์  
Tissue Engineering: A New Paradigm for Periodontal Treatment. *Journal of the Dental Association of Thailand*. 2019;69(1):121.
3. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Experimental oncology*. 2004;26(3):179-84.
4. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF. Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. *Journal of cell communication and signaling*. 2011;5(2):111-22.
5. Du T, Buenbrazo N, Kell L, Rahmani S, Sim L, Withers SG, et al. A Bacterial Expression Platform for Production of Therapeutic Proteins Containing Human-like O-Linked Glycans. *Cell Chemical Biology*. 2019;26(2):203-12.e5.
6. Viana JF, Dias SC, Franco OL, Lacorte C. Heterologous production of peptides in plants: fusion proteins and beyond. *Current protein & peptide science*. 2013;14(7):568-79.
7. Rattanapisit K, Abdulheem S, Chaikewkaew D, Kubera A, Mason HS, Ma JKC, et al. Recombinant human osteopontin expressed in *Nicotiana benthamiana* stimulates osteogenesis related genes in human periodontal ligament cells. *Scientific Reports*. 2017;7(1):17358.
8. Goddard P. Therapeutic proteins — a pharmaceutical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991;6(2):103-31.
9. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*. 2017;26(6):e12740.
10. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40(2):251-64.
11. de Baat P, Heijboer MP, de Baat C. [Development, physiology, and cell activity of bone]. *Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde*. 2005;112(7):258-63.
12. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 7):991-8.
13. Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 2008;5(1):49-56.

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

**The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.**

14. Mirzaei A, Mohammadi S, Ghaffari SH, Yaghmaie M, Vaezi M, Alimoghaddam K, et al. Osteopontin b and c Splice isoforms in Leukemias and Solid Tumors: Angiogenesis Alongside Chemoresistance. *Asian Pacific journal of cancer prevention* : APJCP. 2018;19(3):615-23.
15. Huang B, Sun Y, Maciejewska I, Qin D, Peng T, McIntyre B, et al. Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone. *European journal of oral sciences*. 2008;116(2):104-12.
16. Hao C, Cui Y, Owen S, Li W, Cheng S, Jiang WG. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review). *International journal of molecular medicine*. 2017;39(6):1327-37.
17. McKenzie EA, Abbott WM. Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Methods*. 2018;147:40-9.
18. Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. Recombinant protein production in yeasts. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2012;824:329-58.
19. Yusibov V, Mammedov T. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens 2010. 195-200 p.
20. Lacroix B, Citovsky V. The roles of bacterial and host plant factors in Agrobacterium-mediated genetic transformation. *The International journal of developmental biology*. 2013;57(6-8):467-81.
21. Douglas CJ, Staneloni RJ, Rubin RA, Nester EW. Identification and genetic analysis of an Agrobacterium tumefaciens chromosomal virulence region. *Journal of bacteriology*. 1985;161(3):850-60.
22. Zorreguieta A, Geremia RA, Cavaignac S, Cangelosi GA, Nester EW, Ugalde RA. Identification of the product of an Agrobacterium tumefaciens chromosomal virulence gene. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. 1988;1(3):121-7.
23. Subramoni S, Nathoo N, Klimov E, Yuan Z-C. Agrobacterium tumefaciens responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in plant science*. 2014;5:322-.
24. Hu X, Zhao J, DeGrado WF, Binns AN. Agrobacterium tumefaciens recognizes its host environment using ChvE to bind diverse plant sugars as virulence signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(2):678-83.
25. Gelvin SB. Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*. 2017;51(1):195-217.
26. Li X, Pan SQ. Agrobacterium delivers VirE2 protein into host cells via clathrin-mediated endocytosis. *Science advances*. 2017;3(3):e1601528.

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

**The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.**

27. Hwang H-H, Yu M, Lai E-M. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications: BIOONE; 2017.
28. Jang JH, Kim JH. Improved cellular response of osteoblast cells using recombinant human osteopontin protein produced by Escherichia coli. Biotechnology letters. 2005;27(22):1767-70.
29. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. Trends in Cell Biology. 2006;16(2):79-87.
30. Rattanapisit K, Srifa S, Kaewpungsup P, Pavasant P, Phoolcharoen W. Plant-produced recombinant Osteopontin-Fc fusion protein enhanced osteogenesis. Biotechnology Reports. 2019;21:e00312.



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## สารเคมี

### 1. ส่วนประกอบอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) ปริมาณ 1 ลิตร

Peptone	10 กรัม
Sodium Chloride	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม

### 2. สูตรของ infiltration buffer

10 mM MES
10 mM MgSO <sub>4</sub>

### 3. สูตรของ extraction buffer (IMAC5)

20 mM Tri-HCl
50 mM NaCl
5 mM Imidazole

### 4. สูตรของ loading dye

125 mM Tris-HCl
12% (w/v) SDS
10% (v/v) glycerol
22% (v/v) β-mercaptoethanol
0.001% (w/v) bromophenol blue

### 5. ส่วนประกอบของ 15% acrylamide gel

- 15% resolving gel 15 มิลลิลิตร

H <sub>2</sub> O	8.82	มิลลิลิตร
40% Acrylamide mix	9.38	มิลลิลิตร
1.5 M Tris (pH 8.8)	6.30	มิลลิลิตร
10% SDS	0.25	มิลลิลิตร
10% APS	0.25	มิลลิลิตร
TEMED	0.01	มิลลิลิตร

- 5% stacking gel 6 มิลลิลิตร

H <sub>2</sub> O	4.35	มิลลิลิตร
40% Acrylamide mix	0.75	มิลลิลิตร
1 M Tris (pH 6.8)	0.75	มิลลิลิตร
10% SDS	0.06	มิลลิลิตร
10% APS	0.06	มิลลิลิตร
TEMED	0.006	มิลลิลิตร

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

**6. ส่วนประกอบของ running buffer ความเข้มข้น 1 เท่า**

Tris-base 3 กรัม  
 Glycine 14.4 กรัม  
 10% SDS 10 มิลลิลิตร  
 H<sub>2</sub>O qs. 1 ลิตร

**7. ส่วนประกอบของ destaining solution**

20% methanol  
 10% acetic acid

**8. ส่วนประกอบของ transfer buffer ความเข้มข้น 1 เท่า**

Tris-base 1.5 กรัม  
 Glycine 7.2 กรัม  
 MeOH qs. 150 มิลลิลิตร

**9. skim milk**

- ส่วนประกอบของ 5% skim milk
  - Skim milk 1.6 กรัม
  - 1X TBS qs. 32 มิลลิลิตร
- ส่วนประกอบของ 1:5000 HRP conjugated anti-His antibody ใน 3% skim milk
  - 5% skim milk 12 มิลลิลิตร
  - 1X TBS qs. 20 มิลลิลิตร
  - HRP conjugated anti-His antibody 4 ไมโครลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
 เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
 are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

## การคำนวณต่างๆ

### 1. การเจือจางสารแขวนลอยเชื้อ agrobacterium

- OD<sub>600</sub> ของสารแขวนลอย agrobacterium 100% = 4.8
- ต้องการเตรียมสารแขวนลอยเชื้อ agrobacterium ความเข้มข้นละ 14 มิลลิลิตร
- จากสูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$  โดย  $C_1$  คือ OD<sub>600</sub> ของสารแขวนลอย agrobacterium 100%  
 $V_1$  คือ ปริมาตรของสารแขวนลอย agrobacterium 100%  
 $C_2$  คือ OD<sub>600</sub> ของสารแขวนลอย agrobacterium ที่จะเตรียม  
 $V_2$  คือ ปริมาตรของสารแขวนลอย agrobacterium ที่จะเตรียม

ผลการคำนวณปริมาณสารแขวนลอยเชื้อ agrobacterium เพื่อเจือจางให้ได้สารแขวนลอยเชื้อ agrobacterium ที่มี OD<sub>600</sub> = 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณเชื้อและ infiltration buffer ที่ใช้ในการเจือจางเชื้อ

OD <sub>600</sub>	ปริมาตรของสารแขวนลอย agrobacterium 100% (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของ infiltration buffer (มิลลิลิตร)
0.2	0.58	13.42
0.4	1.17	12.83
0.6	1.75	12.25
0.8	2.30	11.7

### 2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) และ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A<sub>595</sub>) โดยทำการวัด 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 7 เมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) และ A<sub>595</sub> ไปสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน และสามารถนำไปคำนวณค่าความเข้มข้นของ total protein ได้ดังนี้

จากกราฟมาตรฐานโปรตีน (รูปที่ 10) จะได้สมการ  $y = 0.1062x + 0.304$   
 โดย  $y$  คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร  
 $x$  คือ ความเข้มข้นของ total protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

สามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้ดังนี้

$$\text{Total protein } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{595} - 0.304)/0.1062$$

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หลังจากได้ค่าความเข้มข้นของ total protein (ตารางที่ 3) แล้วจึงคำนวณปริมาณของสารสกัด ตัวอย่างที่จะมีปริมาณของสารสกัดโปรตีน เท่ากับ 10 และ 15 ไมโครกรัม ตามลำดับ

สามารถคำนวณหาปริมาณของสารสกัดโปรตีนได้ดังนี้

ปริมาณของสารสกัดโปรตีนที่มีปริมาณของสารสกัดโปรตีนเท่ากับ 10 ไมโครกรัม ( $V_{10}$ )

$$V_{10} (\mu\text{l}) = 10/\text{total protein}$$

ปริมาณของสารสกัดโปรตีนที่มีปริมาณของสารสกัดโปรตีนเท่ากับ 15 ไมโครกรัม ( $V_{15}$ )

$$V_{15} (\mu\text{l}) = 15/\text{total protein}$$

**ตารางที่ 7** ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ความเข้มข้น BSA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	$A_{595}$			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0.321	0.322	0.318	0.320333
0.078125	0.299	0.295	0.3	0.298
0.15625	0.302	0.308	0.293	0.301
0.3125	0.348	0.331	0.323	0.334
0.625	0.374	0.39	0.376	0.38
1.25	0.474	0.48	0.388	0.447333
2.5	0.625	0.529	0.576	0.576667
5	0.864	0.837	0.785	0.828667

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.