

การแสดงออกของโปรตีนฮีโมโกลบินโดยใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน



วราทิพย์ ชวนคิด

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2566

การแสดงออกของโปรตีนฮีโมโกลบินโดยใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน



วราทิพย์ ชวนคิด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักบริหารและพัฒนาระบบราชการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การแสดงออกของโปรตีนฮีโมโกลบินโดยใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน

วราทิพย์ ชวนคิด

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(อาจารย์ ดร.ทิพปภา พิสิษฐ์กุล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รองอธิการบดี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การแสดงออกของโปรตีนฮีโมโดยใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน
ชื่อผู้เขียน	นางสาววราทิพย์ ชวนคิด
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร.ทิพปภา พิสิษฐ์กุล

บทคัดย่อ

การผลิตโปรตีนจากยูแคริโอตโดยใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้านนั้น เป็นเทคโนโลยีทางด้านอณูชีววิทยาที่มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โปรตีนฮีโมเป็นหนึ่งในโปรตีนจากยูแคริโอตที่น่าสนใจ เนื่องจากการค้นพบว่าโปรตีนฮีโมเป็นโมเลกุลสำคัญที่ให้รสและกลิ่นของเนื้อสัตว์ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ผลิตเนื้อจากพืชนำโปรตีนชนิดนี้ คือ เลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin) มาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านต่างสายพันธุ์ (heterologous protein expression) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่มียีน *LBA* และ *Mb* ที่สร้างโปรตีนเลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin) และไมโอโกลบิน (myoglobin) ตามลำดับ ตลอดจนทดสอบการแสดงออกของยีนและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนฮีโมดังกล่าว จากการดำเนินงานวิจัย พบว่าสามารถนำส่งยีน *LBA* ที่ออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์จากถั่วเหลือง และยีน *Mb* ที่ออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์จากวัว เข้าสู่ *E. coli* ได้สำเร็จ และยีนดังกล่าวสามารถนำไปสู่การผลิตโปรตีนเลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin) และไมโอโกลบิน (myoglobin) ได้ โดย ประเมิน จาก sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดย *E. coli* สายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนเลกฮีโมโกลบินเจริญได้ดีเทียบเท่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ซึ่งมี doubling time ประมาณ 35 นาที ในขณะที่ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผลิตไมโอโกลบินเจริญได้ช้าลง (doubling time ประมาณ 67 นาที) จากการประเมินปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการผลิตโปรตีนฮีโม ได้แก่ ความเข้มข้นของสารเหนียวน้ำ (0.1-1 mM lactose) ระยะเวลาในการเหนียวน้ำการแสดงออกของยีน (4-24 ชั่วโมง) และอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ (23-37 องศาเซลเซียส) ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ไม่พบปัจจัยที่กระทบต่อการผลิตโปรตีนฮีโมในช่วงที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ พบเพียงผลกระทบที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนฮีโมทางอ้อม คือ ปริมาณการผลิตโปรตีนรวมและจำนวนเชื้อที่มีชีวิตที่เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ จากงานวิจัยนี้ทำให้ได้สายพันธุ์ *E. coli* ที่สามารถผลิตโปรตีนฮีโม 2 สายพันธุ์ในสภาวะที่มีสารเหนียวน้ำแล็กโทสอย่างน้อย 0.1 mM เหนียวน้ำเป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตโปรตีนฮีโมได้ที่อุณหภูมิห้อง สามารถนำองค์ความรู้และกระบวนการทดลองดังกล่าวไปต่อยอดสำหรับการผลิต

โปรตีนฮีมและโปรตีนอื่น ๆ ในแบคทีเรียได้ในอนาคต

คำสำคัญ : โปรตีนฮีม, เลกฮีโมโกลบิน, ไมโอโกลบิน, การแสดงออกของยีน, การผลิตโปรตีนในเซลล์
เจ้าบ้านต่างสายพันธุ์



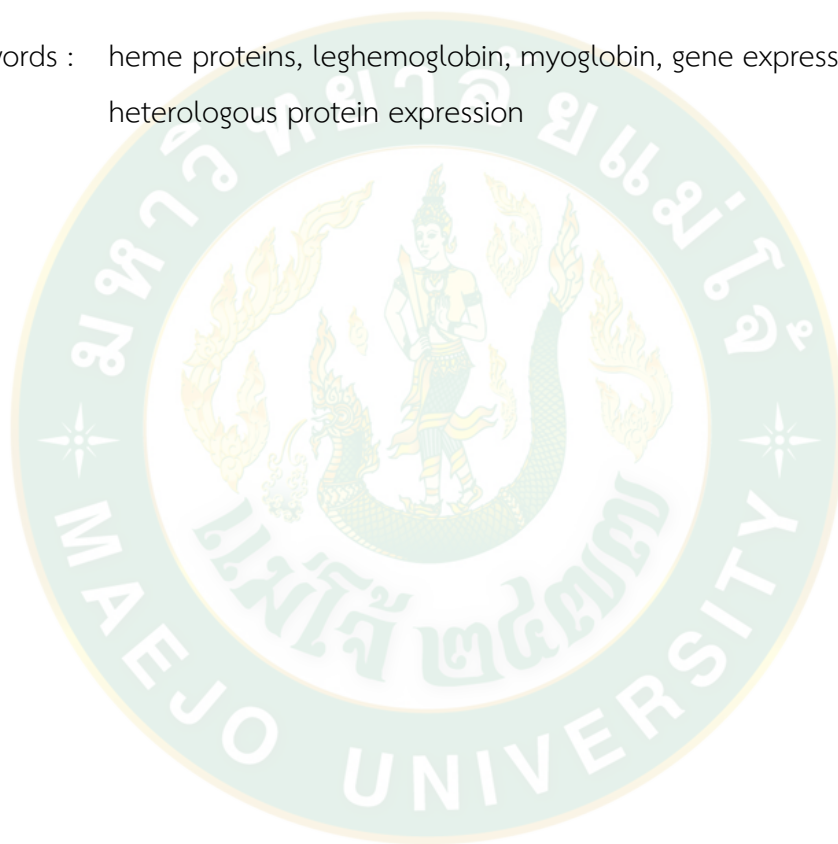
Title	HETEROLOGOUS EXPRESSION OF HEMOPROTEINS USING BACTERIAL HOSTS
Author	Miss Warathip Chuankid
Degree	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Dr. Tippapha Pisithkul

ABSTRACT

The production of eukaryotic proteins using bacteria as host cells represents a continuously evolving field in biotechnology. Hemoproteins are of particular interest due to their role in providing the taste and aroma of meat. This is a motivating factor for plant-based meat producers to employ such proteins, such as leghemoglobin (LBA), in food products. In this research endeavor, our aim was to investigate the heterologous expression of hemoproteins in bacterial host cells. Specifically, we sought to produce leghemoglobin (LBA) and myoglobin (Mb) using *Escherichia coli* strains carrying the *LBA* and *Mb* genes, respectively. Additionally, we aimed to optimize gene expression and conditions suitable for the production of these hemoproteins. This research revealed successful introduction and expression of the *LBA* gene designed with a nucleotide sequence from soybean (*Glycine max*) and the *Mb* gene designed with a nucleotide sequence from cattle (*Bos taurus*) into *E. coli*. Evaluation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) indicated robust hemoprotein production by the modified *E. coli* strains. The leghemoglobin-producing strain grew comparably to the wild-type strain with a doubling time of approximately 35 minutes. In contrast, the myoglobin-producing *E. coli* strain exhibited a slower doubling time of approximately 67 minutes. Factors influencing hemoglobin production, including lactose concentration (0.1-1 mM lactose), induction time (4-24 hours), and cultivation temperature (23-37 degrees Celsius), were assessed using a Box-Behnken experimental design. Notably, none of these factors significantly impacted hemoglobin production within the tested ranges, except for the overall protein yield and cell viability, which increased with prolonged

incubation time. In summary, this research has yielded *E. coli* strains capable of producing two hemoprotein variants under environmentally amenable conditions, with a minimum of 0.1 mM lactose induction for at least 4 hours at room temperature. The knowledge and experimental processes obtained from this study can be further developed for the production of hemoproteins and other proteins in bacteria in the future.

Keywords : heme proteins, leghemoglobin, myoglobin, gene expression, heterologous protein expression



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.ทิพภา พิสิษฐ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ คำปรึกษา คำแนะนำเป็นอย่างดี และคอยถ่ายทอดเทคนิค และประสบการณ์ในการใช้ชีวิต ตลอดจนช่วยปรับปรุง แก้ไขข้อบกพร่องในปฏิบัติงาน ตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ รวมถึงการคอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจ เมื่อข้าพเจ้าเกิดปัญหาต่าง ๆ ข้าพเจ้าตระหนักถึงความทุ่มเท การดูแล และความเอาใจใส่อย่างดียิ่งของอาจารย์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบคุณ ผศ. ดร.ปิยะ นุช เนียมทรัพย์ และ ผศ. ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์มา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.กฤษฎา อุ่นบ้าน ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานสอบ วิทยานิพนธ์ ให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมสำหรับการแก้ไขและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณนางสาวรุ่งทิพย์ กาวารี และนางสาวนิชมน ธรรมรักษ์) ผู้ช่วยนักวิจัยในการช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในส่วนของเครื่องมือ อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ต้องใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณแหล่งทุน “ทุนศิษย์ก้นกุฏิ” จากฝ่ายบัณฑิตศึกษา สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และทุนโครงการทุนบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรม จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ปีงบประมาณ 2565 ผู้สนับสนุนหลักในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนายกุลธร ชวนคิด บิดาของข้าพเจ้าที่ทำงานหนักเพื่อส่งเสียข้าพเจ้า และขอขอบคุณนางสมจิตรชวนคิด ที่คอยให้กำลังใจและห่วงใยข้าพเจ้าในวันที่เหน็ดเหนื่อย และขอขอบคุณชัญญชิตา ทาเจริญ เพื่อนร่วมงาน และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ ที่คอยร่วมทุกข์ร่วมสุข ให้คำแนะนำและช่วยกันแก้ปัญหา ตลอดระยะเวลาที่ปฏิบัติงานร่วมกันมา

ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งอย่างสูง และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจและสถาบันอยู่ไม่น้อย ข้าพเจ้าจึงขอมอบความดีความชอบทั้งหมดนี้ให้แก่ อาจารย์ที่ปรึกษาที่เคารพรัก เหล่าคณาจารย์ผู้ร่วมงานในห้องปฏิบัติการและผู้มีความเกี่ยวข้องทุกท่าน ข้าพเจ้ามีความยินดีเป็นอย่างยิ่งที่จะรับฟังคำแนะนำจากที่ท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อนำคำแนะนำของท่านไปพัฒนางานวิจัยต่อไป ข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

วราทิพย์ ชวนคิด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....ช	ช
สารบัญ.....ช	ช
สารบัญตาราง.....ฉ	ฉ
สารบัญภาพ.....ช	ช
บทที่ 1 บทนำ..... 1	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร..... 4	4
1. อาหารจากพืช..... 4	4
2. ฮีม (Heme)..... 5	5
3. โปรตีนฮีม (Heme protein)..... 6	6
3.1. ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin)..... 6	6
3.2. ไมโอโกลบิน (Myoglobin)..... 7	7
3.3. เลกฮีโมโกลบิน (Leghemoglobin)..... 8	8
4. การแสดงออกของยีนในเซลล์เจ้าบ้านต่างสายพันธุ์ (Heterologous expression)..... 9	9
5. เครื่องมือในการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านต่างสายพันธุ์ (heterologous protein expression tools)..... 11	11
5.1. พลาสมิด (plasmid)..... 11	11
5.2. เครื่องหมายในการคัดเลือก (Selective markers)..... 12	12
5.3. กระบวนการปรับใช้โคดอน (codon optimization, codon usage)..... 13	13
5.4. เซลล์เจ้าบ้าน (host cells)..... 13	13

5.4.1. <i>Escherichia coli</i>	14
6. เทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular techniques) ที่เกี่ยวข้องในการทำ heterologous protein expression	15
6.1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	15
6.2. Fitness assay.....	15
6.2.1. โปรตีนเรืองแสงสีแดง mCherry	16
งานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง	19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	20
อุปกรณ์และสารเคมี.....	20
วิธีการดำเนินงานวิจัย	24
ภาพรวมการดำเนินงานวิจัย	24
1. การเลี้ยงเชื้อและเตรียมดีเอ็นเอ construct เพื่อการแสดงออกของยีน.....	24
1.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย.....	24
1.2 การเตรียมลำดับนิวคลีโอไทด์และพลาสมิดสำหรับการแสดงออกยีนที่สนใจ	25
1.3 การส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation).....	27
1.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction; PCR)	28
2. การศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัส (transcriptional expression) ด้วยวิธี reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	28
3. การศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัส (translational expression) ด้วย sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	29
3.1 การเหนี่ยวนำการแสดงออกในระดับขวดรูปชมพู่ (small-scale induction).....	29
3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	30

4.	การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมาก	30
4.1	การวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธีการแบรดฟอร์ด (Bradford's protein assay)	33
4.2	วัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังการเหนี่ยวนำโดยวิธีการดรอเพลต (Drop plate technique)	33
4.3	วิเคราะห์ความอัตรส่วนของโปรตีนฮีมาจากโปรตีนทั้งหมดด้วยโปรแกรม ImageQuant™ TL.....	33
5.	การประเมินลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีนฮีมาและการเจริญของเชื้อภายใต้สภาวะเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน	34
5.1.	การเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียลูกผสม	34
5.3.	การศึกษาลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM).....	36
บทที่ 4	ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	37
1.	การออกแบบยีนและนำส่งยีนที่นำไปสู่การสร้างโปรตีนฮีมา 2 ชนิด – เลกฮีโมโกลบินและไมโอโกลบิน	37
2.	ผลจากการตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน <i>Escherichia coli</i>	38
3.	ผลการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัส	39
4.	ผลการตรวจสอบการแสดงออกระดับยีนในระดับการแปลรหัส (พลาสมิด pBR322)	40
5.	ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด	42
6.	ผลการประเมินประสิทธิภาพการเจริญของแบคทีเรียด้วยเทคนิค competition assay	43
7.	การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM).....	45
8.	ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนฮีมา ใน <i>Escherichia coli</i>	46
บทที่ 5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	54
	ข้อเสนอแนะ	56
	ภาคผนวก	57

ภาคผนวก ก.....	57
ภาคผนวก ข.....	58
ภาคผนวก ค.....	61
ภาคผนวก ง.....	62
ภาคผนวก จ.....	64
ภาคผนวก ฉ.....	66
บรรณานุกรม.....	69
ประวัติผู้วิจัย.....	76



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1: ข้อดีและข้อเสียของเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกโปรตีน	10
ตารางที่ 2: การแสดงออกของโปรตีนลูกผสมในเซลล์แบคทีเรีย	11
ตารางที่ 5: พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง	25
ตารางที่ 4: โปรเมอ์ที่ใช้ในการเตรียม DNA constructs	26
ตารางที่ 6: โปรเมอ์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีนในระดับการถอดรหัส	29
ตารางที่ 9: ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง.....	31
ตารางที่ 10: แผนการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ที่ใช้ในการทดลอง.....	32
ตารางที่ 7: เชื้อที่นำมาวัดการเจริญในการทำ competition assay.....	35
ตารางที่ 8: ระดับความเข้มข้นของ FO growth supplement.....	35
ตารางที่ 11: โปรเมอ์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและ RT-PCR	39
ตารางที่ 12: การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน LBA ระดับการถอดรหัสใน E. coli BL21	39
ตารางที่ 13: การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน Mb ระดับการถอดรหัสใน E. coli BL21	40
ตารางที่ 14: Doubling time (Td) ของแบคทีเรียลูกผสมแต่ละสายพันธุ์.....	42
ตารางที่ 15: จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียลูกผสมเทียบกับชุดควบคุม (mCherry)	44
ตารางที่ 17: ผลการตอบสนองโปรตีน leghemoglobin (LBA).....	47
ตารางที่ 18: ผลกระทบของตัวแปรอิสระ	48
ตารางที่ 19: ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของตัวแปรอิสระต่อการตอบสนอง ของความเข้มข้น ของโปรตีนทั้งหมด สัดส่วนของโปรตีน leghemoglobin และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำ การแสดงออก	49
ตารางที่ 20: ผลการตอบสนองโปรตีน Myoglobin (Mb)	51

- ตารางที่ 21: ผลกระทบของตัวแปรอิสระ ได้แก่ ความเข้มข้นของแลคโตส (X1) ระยะเวลาหลังจากการเหนี่ยวนำ (X2) และ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (X3) ต่อความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด สัดส่วนของโปรตีน leghemoglobin และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออก52
- ตารางที่ 22: ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของตัวแปรอิสระต่อการตอบสนอง ของความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด สัดส่วนของโปรตีน myoglobin และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออก.....52



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1: โครงสร้างและการสังเคราะห์ของฮีโมโกลบินของวัว (Bos taurus)	5
ภาพที่ 2: ลักษณะของไมโอโกลบิน.....	7
ภาพที่ 3: โครงสร้างของเลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin).....	8
ภาพที่ 4: รูปร่างของ Escherichia coli ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	14
ภาพที่ 5: โปรตีนเรืองแสงในกลุ่ม Green fluorescent protein (GFP) และโปรตีนกลุ่ม mFruits .16	
ภาพที่ 6: โครงสร้างเบต้าบาเรลของโปรตีน mCherry.....	18
ภาพที่ 7: ภาพรวมการดำเนินงานวิจัย	24
ภาพที่ 8: แผนที่พลาสมิดของ pET151 ที่มียีนไมโอโกลบิน (Bos taurus Mb) (GeneArt Gene Synthesis, Thermo-Fisher Scientific, USA)	26
ภาพที่ 9: (A) ภาพของไมโครเพลตขนาด 96 หลุมขณะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (B) ภาพของเครื่อง microplate reader ที่ใช้ในการวัดค่าดูดกลืนแสง	34
ภาพที่ 10: ลักษณะของโคลน Escherichia coli BL21 ที่ได้รับการส่งถ่ายดีเอ็นเอพาหะ สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีแอมพิซิลลิน (100 µg/mL).....	37
ภาพที่ 11: (A) ภาพของพลาสมิดที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ได้รับการคัดเลือก (B) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน LBA ขนาด 432 bp	38
ภาพที่ 12: (A) ภาพของพลาสมิดที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ได้รับการคัดเลือก (B) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน Mb ขนาด 462 bp.....	38
ภาพที่ 13: ภาพของการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE และ Coomassie staining เพื่อการแยกและย้อมสีโปรตีนที่ได้จาก cell lysates ของ E. coli BL21.....	41
ภาพที่ 14: Growth curve ที่วัดด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD ₆₀₀) ของเชื้อแบคทีเรียลูกผสมในอาหาร LB แบบเหลว เป็นเวลาชั่วโมง การเจริญเติบโตในระยะ exponential phase ถูกนำไปคำนวณหา doubling time ต่อไป	42

ภาพที่ 15: ภาพสัดส่วนของโคโลนีจากการทำ competition assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากทำการทดสอบ competition assay.....	43
ภาพที่ 16: ภาพเซลล์ E. coli ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 15,000 เท่า.....	45
ภาพที่ 17: ภาพกราฟพื้นผิวการตอบสนองแบบ 3 มิติ ของการสนองต่อปัจจัยต่างๆของ E.coli BL21 LBA.....	50
ภาพที่ 18: ภาพกราฟพื้นผิวการตอบสนองแบบ 3 มิติ ของการสนองต่อปัจจัยต่างๆของ E. coli BL21 Mb.....	53
ภาพที่ 19: กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหาร LB broth และทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่วัดด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD ₆₀₀).....	64
ภาพที่ 20: กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหาร LB broth ที่มีส่วนผสมของ 0.1% FO growth supplement และเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่วัดด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD ₆₀₀).....	65
ภาพที่ 21: กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหาร LB broth ที่มีส่วนผสมของ 0.5% FO growth supplement และเหนี่ยวนำด้วย IPTG.....	65
ภาพที่ 22: (A) แบคทีเรียที่ผ่านการ transformation ด้วยพลาสมิดจาก Escherichia coli DH5 α pBR322 bla::mCherry มีความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีแอมพิซิลลิน (B) โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง เมื่อผ่านไปประมาณ 2 วัน.....	67
ภาพที่ 23: ลักษณะของผงแห้งที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแห้งเยือกแข็งโดยเครื่อง freeze dryer.....	67
ภาพที่ 24: (A) ผลการสกัดพลาสมิด mCherry จาก DH5 α :bla::mCherry (B) ภาพผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน mCherry 771 base pair.....	68
ภาพที่ 25: ลักษณะของโคโลนี E. coli BL21: mCherry.....	68

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันแนวโน้มของอุตสาหกรรมของอาหารจากพืชและเนื้อปรุงแต่งจากพืช (plant-based food) มีแนวโน้มขยายตัวแบบก้าวกระโดดจากหลายปัจจัย ทั้งเหตุผลทางด้านสุขภาพ และการตระหนักถึงปัญหาทางสิ่งแวดล้อม ในด้านสุขภาพนั้น อาหารมังสวิรัต (vegetarian food) ได้ชี้ให้เห็นว่าคุณค่าทางอาหาร กากใย (fiber) โดยที่มีปริมาณของไขมันและคอเลสเตอรอลต่ำเมื่อเทียบกับการบริโภคเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังลดปัญหาการเกิดผลิตรกรดยูริก (uric acid) ที่เกิดจากการย่อยเพียวรีน (purine) ในอาหาร และกำจัดกรดยูริกในกระแสเลือดไม่ทันจึงเกิดภาวะ hyperuricemia ที่นำไปสู่การสะสมผลึกยูริกที่ก่อให้เกิดอาการของโรคเก๊าท์ (gout) นั่นเอง อาหารที่มีเพียวรีนในปริมาณสูง ยกตัวอย่างเช่น เนื้อสัตว์ (เช่น เนื้อวัว ไก่ แกะ หมู กุ้ง ชาร์ดีน เป็นต้น การรับประทานอาหารจากพืชจึงเป็นทางเลือกสุขภาพที่น่าสนใจ

ในเชิงสิ่งแวดล้อม มีงานวิจัยและข้อมูลการสำรวจประชากรโลกจำนวนไม่น้อยที่สนับสนุนว่า อุตสาหกรรมปศุสัตว์นั้นส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการเกษตรที่เน้นการผลิตพืช (Reijnders และ Soret, 2003) กล่าวคือ การทำปศุสัตว์นั้น ไม่ยั่งยืน (unsustainable) และด้วยอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโลกนั้น ภายในปีค.ศ. 2050 ที่คาดว่าขนาดประชากรโลกจะพุ่งสูงกว่า 9 พันล้านคน มนุษย์จะต้องมีทางเลือกของอาหารมากกว่าการบริโภคเนื้อสัตว์ที่มาจากปศุสัตว์ เนื่องจากพื้นที่การทำฟาร์มสัตว์บนโลกนั้นจะไม่เพียงพอต่อความต้องการในการผลิตสัตว์เพื่อการบริโภค (ข้อมูลจาก <https://feeding9billion.com>) อาหารทางเลือกจึงเป็นประเด็นสำคัญที่ต้องการการวิจัยและพัฒนา หนึ่งในนั้นคือเนื้อจากพืชที่กำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางจากตลาดทั่วโลก ตัวอย่างความสำเร็จทางธุรกิจโดยบริษัทอย่างเช่น Modern Meat Inc. จากประเทศแคนาดาที่ปัจจุบันได้เริ่มมีการขยายตลาดมาถึงประเทศออสเตรเลีย และบริษัท Impossible Foods Inc. ที่มีส่วนแบ่งในตลาดอุตสาหกรรมเนื้อมากถึง 5% ในกลุ่มอุตสาหกรรมเหล่านี้

บริษัท Impossible Foods Inc. ได้ตั้งจากการค้นพบว่าฮีม (heme) เป็นโมเลกุลสำคัญที่ทำให้รส กลิ่น และความรู้สึกของการได้บริโภคเนื้อ ทางหน่วยวิจัยของ Impossible Foods Inc. ได้ใช้โปรตีน leghemoglobin จากปมรากถั่วมาแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* โดยโปรตีนที่สังเคราะห์ออกมาได้นั้นได้มีการทดสอบว่าไม่ก่อให้เกิดการแพ้ในมนุษย์อีกด้วย (Jin และคณะ, 2018) เป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตส่วนประกอบของอาหาร งานวิจัยและการพัฒนาดังกล่าวเป็นอีกก้าวสำคัญสำหรับการพัฒนาการผลิต “เนื้อ” จากพืช โดยเฉพาะสำหรับกลุ่มผู้บริโภคที่ยังติดรสชาติและกลิ่นเฉพาะของการบริโภคเนื้อสัตว์

ในการผลิตโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น (heterologous protein expression) นั้น นอกจากยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia pastoris* แล้ว สามารถใช้แบคทีเรียเป็นโรงงานผลิตโปรตีนได้เช่นกัน ระบบแบคทีเรียเจ้าบ้านที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Bacillus* sp. ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และมีเทคนิคการทำพันธุวิศวกรรมที่หลากหลาย ยกตัวอย่างเช่นการนำ *E. coli* มาใช้ผลิตอินซูลินเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน (Goeddel และคณะ, 1979) หรือใช้ผลิตอินเทอร์เฟียร์อนแอลฟา และอินเทอร์เฟียร์อนแกมมา เป็นต้น (Choi และคณะ, 2006) โดย *E. coli* และเวกเตอร์ในการแสดงออกที่สามารถใช้กับ *E. coli* ได้นั้น มีหลากหลายชนิดที่อยู่ในรายการของการใช้จุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม (Good Industrial Large Scale Practice (GILSP)) (National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 2015) ซึ่งในปัจจุบันเกิดเป็นแพลตฟอร์มให้บริการผลิต (production service platform) โดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และภาคเอกชน ซึ่งทางห้องปฏิบัติการก็มีความสนใจที่จะพัฒนากระบวนการการผลิตโปรตีนโดยใช้จุลินทรีย์เป็นเซลล์เจ้าบ้านเช่นกัน โดยเลือกโปรตีนฮีมเป็นจากพืช ได้แก่ เลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin) และโปรตีนฮีมจากสัตว์ ได้แก่ ไมโอโกลบิน (myoglobin) เป็นโปรตีนต้นแบบ และประเมินว่าการแสดงออกของโปรตีนฮีมโดยใช้แบคทีเรียมาเป็นเซลล์เจ้าบ้านมีความเป็นไปได้สูง เมื่อสร้างแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนฮีมสำเร็จแล้ว การนำเชื้อไปทดสอบทางกายภาพและชีวภาพ ตลอดจนหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน เป็นประเด็นสำคัญที่จะนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมเนื้อจากพืช (plant-based meat) และการพัฒนาแพลตฟอร์มการผลิตโปรตีน เอนไซม์ ตลอดจนงานทางชีววิทยาสังเคราะห์อื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์และนำส่งยีน *LBA* (leghemoglobin) และ *Mb* (myoglobin) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli*
2. เพื่อทดสอบการผลิตโปรตีนจากยูคาริโอตได้แก่ leghemoglobin และ myoglobin ใน *Escherichia coli*
3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน leghemoglobin และ myoglobin ใน *Escherichia coli*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถผลิตโปรตีนฮีโมที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 สายพันธุ์ (strains)
2. ได้กระบวนการผลิตโปรตีนจากยูคาริโอตในเซลล์แบคทีเรีย
3. ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตโปรตีน



บทที่ 2

ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

1. อาหารจากพืช

อาหารจากพืช (plant-based food) คือ อาหารที่องค์ประกอบหลักเป็น พืช ผลไม้ ผัก และธัญพืช โดยไม่มีส่วนประกอบจากเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลย โดยอาจจะมีการปรุงแต่งสีธรรมชาติจากพืช และใช้ส่วนที่เป็นน้ำมันจากพืชในการเพิ่มความฉ่ำของเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์ เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว เป็นต้น (Ostfeld, 2017)

ในปัจจุบันนั้น อาหารจากพืชและเนื้อจากพืชได้รับความนิยมจากผู้บริโภคมากขึ้นและมีการเจริญเติบโตทางการตลาดอย่างก้าวกระโดด โดยสามารถสังเกตได้จากผลิตภัณฑ์ของหลาย ๆ บริษัทที่ได้ผลิตออกมาแข่งขันกันอย่างมากมาย ซึ่งในประเทศไทยนั้น มีผลิตภัณฑ์เนื้อจากพืชในท้องตลาด ยกตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์ Meat ZERO จากบริษัท Charoen Pokphand Foods (CPF) ผลิตภัณฑ์หมูกรอบจำแลง และหมูบดจำแลง จากบริษัท food AVATAR ที่มุ่งมั่นที่จะผลิตอาหารจากพืชให้мирรสชาติจัดจ้าน ถูกปากคนไทย ผลิตภัณฑ์ Omn! Meat™ Mince ของบริษัท OmniFoods จากประเทศฮ่องกง บริษัท Beyond Meat บริษัทที่ผลิตเนื้อทดแทนจากเนื้อสัตว์ที่มีส่วนผสมจากโปรตีนจากถั่ว น้ำมันมะพร้าวและผสมน้ำบีทรูทเพื่อให้มีสี รูปลักษณ์ และรสชาติใกล้เคียงกับเนื้อ ในขณะที่คู่แข่งอย่างบริษัท Impossible Foods Inc. ซึ่งเป็นบริษัทที่มุ่งเน้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทดแทนจากพืช เพื่อให้เนื้อจากพืชให้รสชาติ รสสัมผัส ให้ใกล้เคียงเหมือนกับเนื้อมากที่สุดและยังคงคุณค่าทางโภชนาการแก่ผู้บริโภคมากที่สุด อีกทั้งยังโด่งดังจากการค้นพบโมเลกุลที่เป็นตัวแทนของความหอมอร่อยของเนื้อ ที่เรียกว่า “ฮีม”

ผลิตภัณฑ์เนื้อจากพืช (plant-based meat) นั้นมีความแตกต่างกับเนื้อเพาะเลี้ยง (culture-based) โดยเนื้อจากพืชคือการนำพืชและส่วนผสมต่าง ๆ มารวมเป็นองค์ประกอบ อาจมีการเสริมรสชาติ เนื้อสัมผัสให้ใกล้เคียงกับเนื้อโดยไม่มีส่วนผสมจากเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ แต่ culture-based meat คือการนำเซลล์สัตว์มาเลี้ยงให้กลายเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อ หรือ scaffold ให้ยึดเกาะเพื่อโครงสร้างและเนื้อสัมผัสที่เหมือนชิ้นเนื้อ โดยไม่ต้องเลี้ยงและฆ่าตัวสัตว์ (<https://edu.gcfglobal.org/en/thenow/what-is-labgrown-meat/1/>)

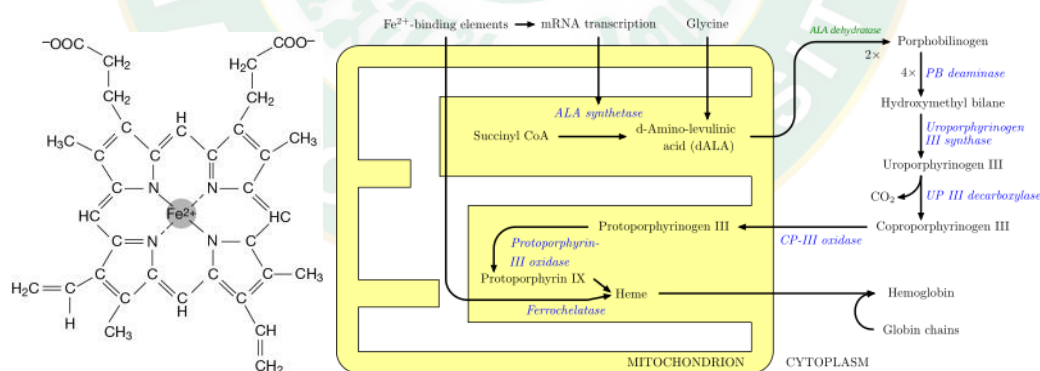
อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์อาหารจากพืชนั้น ยังมีขีดจำกัด โดยเฉพาะกลิ่นและรสชาติที่ยังไม่สามารถทดแทนความรู้สึกของผู้บริโภคเคยบริโภคเนื้อได้ ในด้านของเนื้อสัมผัสที่ยังขาดความ

ชุ่มฉ่ำซึ่งมักจะได้จากการส่วนที่เป็นของไขมันของเนื้อสัตว์ และสีส้มของอาหารที่ยังอาจจะต้องอาศัยสังเคราะห์หรือสังเคราะห์ที่นำมาปรุงแต่งเพื่อให้มีความน่ารับประทานมากขึ้น อีกทั้งคุณค่าทางอาหาร เช่น โปรตีน วิตามินบี 12 และธาตุเหล็กในรูปของฮีม ก็ยังเป็นรองกลุ่มผลิตภัณฑ์จากสัตว์อยู่ ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อปรุงแต่งพืชให้มีรสชาติใกล้เคียงกับเนื้อเพื่อให้ได้รสชาติที่สมบูรณ์แบบสำหรับผู้ไม่ต้องการบริโภคเนื้อจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ

2. ฮีม (Heme)

ฮีม (ภาพที่ 1) เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีธาตุเหล็กโมเลกุลกลาง มีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต เป็นองค์ประกอบสำคัญในโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจ ยกตัวอย่างเช่น ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และไมโอโกลบิน (myoglobin) โดยทั้งสองโมเลกุลนี้มีบทบาทสำคัญในสิ่งมีชีวิต (Ponka, 1999)

ปกติแล้วนั้น โมเลกุลของฮีมจะพบในน้ำเลือดของสัตว์ (Kongkachuichai และคณะ, 2002) แต่ในพืชนั้น ก็มีสารประกอบชนิดนี้เช่นกัน ทำหน้าที่คล้ายกับโมเลกุลของฮีมในสัตว์ โดยสารประกอบดังกล่าวนี้มีชื่อว่า เลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin) ซึ่งมาจากชื่อของพืชตระกูลถั่ว (legumes) รวมกับชื่อโมเลกุล hemoglobin โดยเลกฮีโมโกลบินนั้นทำหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนไปยังแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในปมรากของพืชตระกูลถั่ว (Appleby, 1984)



ภาพที่ 1: โครงสร้างและการสังเคราะห์ของฮีมของวัว (*Bos taurus*)

ที่มา: (Wyman Jr, 1948)

3. โปรตีนฮีม (Heme protein)

ฮีมโปรตีน (heme protein) หรือ ฮีโมโปรตีน (hemoproteins) ประกอบด้วยองค์ประกอบสองส่วน คือ โปรตีนเชิงซ้อนที่จับคู่กับโมเลกุลของฮีมที่จับอยู่กับธาตุเหล็ก และส่วนที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง (scaffold) ทั้งหมดนี้บรรจุอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของเม็ดเลือดแดง เรียกว่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ซึ่งมีหน้าที่ในการลำเลียงออกซิเจนไปสู่ยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย และอีกทั้งยังทำหน้าที่รับและขนส่งคาร์บอนไดออกไซด์ออกมากำจัดทิ้งอีกด้วย สีแดงของเลือดของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำมนั้นมาจากโมเลกุลของฮีมนั่นเอง โดยฮีมนั้นสามารถพบได้ในหลายโมเลกุล ยกตัวอย่างเช่น hemoglobin และ myoglobin ที่มีส่วนประกอบของฮีมโปรตีนอยู่ด้วย

Carlsson และคณะ (2020) ได้ทำวิจัยการแสดงออกโปรตีนไมโอโกลบิน (myoglobin) ในใบยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium* spp.) เป็นตัวกลางในการส่งถ่ายสารพันธุกรรม พบว่ามีการรวมตัวของโมเลกุลฮีมเข้ากับโปรตีนที่ผลิต อีกทั้งโปรตีนที่ได้ยังมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับโปรตีนฮีมต้นแบบอีกด้วย และตัวอย่างโมเลกุลอื่น ๆ ที่มีฮีมเป็นองค์ประกอบ เช่น cytochromes ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เฟอร์ริติน (ferritin) และฮีโมไซด์ริน (hemosiderin) ที่เป็นโปรตีนทำหน้าที่เป็นตัวยึดเก็บธาตุเหล็กไว้ในเม็ดเลือดแดง และแลคโตเฟอร์ริน (lactoferrin) โกลโคโปรตีนที่มีหน้าที่ในการยึดจับกับธาตุเหล็ก เป็นต้น (Kontoghiorghis และคณะ, 2015)

ในปัจจุบันมีการสังเคราะห์ฮีม และโปรตีนฮีมอย่างหลากหลายในเซลล์เจ้าบ้านหลายสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ และมีแนวโน้มที่มีการนำไปใช้ในการปรุงอาหาร ด้านการแพทย์และดูแลสุขภาพ เพื่อทดแทนการบริโภคเนื้อสัตว์เพื่อให้ได้ฮีม ซึ่งการสกัดฮีมจากเลือดสัตว์สัตว์หรือแยกออกจากเซลล์พืชนั้น เป็นสิ่งที่ซับซ้อนและใช้ทรัพยากรมาก ดังนั้น ในการผลิตโปรตีนโดยใช้แบคทีเรียจึงเป็นวิธีการที่เป็นไปได้ในการผลิตฮีมสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (Ko และคณะ, 2021)

3.1. ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin)

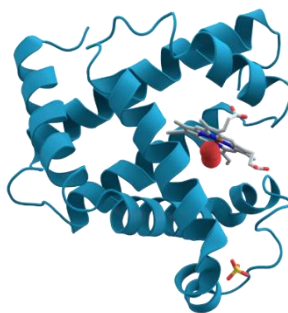
โกลบิน เป็นส่วนโปรตีนของฮีโมโกลบิน (hemoglobin; Hb) ที่มีหน้าที่ขนส่ง CO_2 ในขณะที่ส่วนฮีมช่วยขนส่งออกซิเจน (O_2) โกลบินประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 4 สาย แต่ละสายจะขดเป็นกระเปาะ ภายในมีฮีมเกาะอยู่ การสังเคราะห์ของฮีโมโกลบินนั้น เกิดขึ้นภายในเม็ด

เลือดแดง การสังเคราะห์แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การสังเคราะห์ฮีม เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย และการสังเคราะห์โกลบินเกิดขึ้นที่ไรโบโซม (ribosomal protein synthesis) โดยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์วงแหวน protoporphyrin เมื่อรวมกับโมเลกุลเหล็ก จะได้เป็น ฮีม จากนั้นจึงรวมกับโกลบิน ที่ประกอบด้วยสายแอลฟา และสายเบตาอย่างละ 2 สาย ได้เป็นโมเลกุล Hb ที่เป็นโปรตีนสำคัญของเม็ดเลือดแดง

ในปีคศ. 2023 Wang และคณะผู้วิจัยทำการศึกษาการผลิตฮีมโกลบินจากพืช โดยใช้เซลล์เจ้าบ้าน คือ *Corynebacterium glutamicum* ที่ปราศจากการผลิตเอนโดท็อกซินและเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม generally recognized as safe (GRAS) โดยผู้วิจัยได้ทำการแสดงออกฮีมโกลบินในปริมาณมาก และวิเคราะห์ผลการแสดงออกปริมาณมากต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พบว่า มีการผลิตฮีมโกลบินได้มากถึง 20% เมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมด และมีการหลีกเลี่ยงการใช้สารเหนี่ยวนำที่เป็นอาจพิษอย่าง isopropyl- β -thiogalactopyranoside โดยใช้สารประกอบ เช่น propionate และ glutamate เป็นสารเหนี่ยวนำทดแทน อีกทั้งยังพบว่าการผลิตโปรตีนดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับกับเซลล์ต้นแบบ (wildtype) (Wang และคณะ, 2023)

3.2. ไมโอโกลบิน (Myoglobin)

ไมโอโกลบิน (ภาพที่ 2) เป็นโปรตีนที่จับอยู่กับธาตุเหล็ก ที่พบในธรรมชาติ ทำหน้าเป็นรงควัตถุสีชมพูแดง และทำหน้าที่ในการขนส่งและลำเลียงออกซิเจนไปยังไมโทคอนเดรีย ที่พบมากในกล้ามเนื้อสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (mammals) และปลาบางชนิด ไมโอโกลบินมีปริมาณมากในบริเวณที่เป็นเนื้อแดง โดยสีของไมโอโกลบินนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อสัมผัสกับออกซิเจน ดังต่อไปนี้



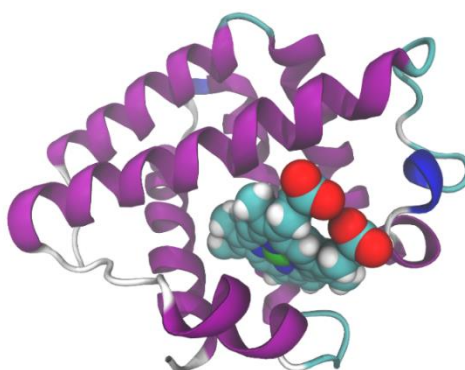
ภาพที่ 2: ลักษณะของไมโอโกลบิน

ที่มา: (Kendrew และคณะ, 1997)

- ออกซิไมโอโกลบิน (Oxymyoglobin) โดยปกติแล้วโปรตีนไมโอโกลบินจะมีสีเป็นสีแดงสว่าง
- ดิออกซิไมโอโกลบิน (Deoxymyoglobin) เมื่ออยู่ในสถานะที่มีออกซิเจนต่ำลงนั้น (0.5-1.0%) จะส่งผลให้โมเลกุลของไมโอโกลบินเปลี่ยนเป็นสีม่วงคล้ำ
- เมทไมโอโกลบิน (Metmyoglobin) เกิดจากการออกซิเดชันอย่างช้าและส่งผลให้สีของเนื้อสัตว์เปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาล จากงานวิจัยของ (Yancey และคณะ, 2006) พบว่าความเข้มข้นของไมโอโกลบินนั้น มีผลทำให้รสชาติของเนื้อสัตว์มีรสชาติที่เปลี่ยนไป

ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของไมโอโกลบินนั้นมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวแทนของสีและความฉ่ำของเนื้อสัตว์ที่เป็นสีแดง โดยในปี ค.ศ. 2020 Carlsson และคณะได้ทำวิจัยการแสดงโปรตีนของไมโอโกลบินในใบยาสูบ (tobacco) โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium* spp.) เป็นตัวกลางในการส่งถ่ายสารพันธุกรรม พบว่ามีการผลิตและรวมตัวของโมเลกุลฮีม อีกทั้งผลผลิตดังกล่าวยังมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับโมเลกุลฮีมต้นแบบอีกด้วย (Carlsson และคณะ, 2020)

3.3. เลกฮีโมโกลบิน (Leghemoglobin)



ภาพที่ 3: โครงสร้างของเลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin)

ที่มา: (Singh และVarma, 2017)

นอกจากในน้ำเลือดของสัตว์ สามารถพบฮีมในพืชได้เช่นกัน โดยตัวอย่างโปรตีนฮีมของพืชที่ทำหน้าที่คล้ายกับโปรตีนฮีมในสัตว์ เช่น เลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin) (ภาพที่ 3) ซึ่งมาจากชื่อของพืชตระกูลถั่ว (legumes) รวมกับชื่อโมเลกุล hemoglobin เลกฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่สามารถพบได้พืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง เป็นต้น โดยมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ-

ตรึงไนโตรเจนแก่พืช โดยการทำให้ไนโตรเจนที่มีอยู่ในอากาศให้อยู่ในรูปแบบที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ โดยใช้การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase)

โครงสร้างของเลกฮีโมโกลบินนั้น มีส่วนที่คล้ายคลึงกับเฮโมโกลบิน มีขนาดประมาณ 16 kDa โดยเลกฮีโมโกลบินนั้น ทำหน้าที่เช่นเดียวกับฮีโมโกลบินในสัตว์ คือ ลำเลียงออกซิเจนไปยังแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในปมรากของพืชตระกูลถั่ว (Appleby, 1984)

ในปีค.ศ. 2013 กลุ่มวิจัยของบริษัท Impossible food ได้ทำการแสดงออกยีน *legA* ในยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อนำไปเป็นสารปรุงแต่งรสในอาหารจากพืชให้มีรสชาติคล้ายคลึงกับเนื้อมากขึ้น และในปีค.ศ. 2022 Shao และคณะ ได้ทำการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรมเพื่อพัฒนาในการเพิ่มความสามารถของยีสต์ในการผลิตและหลั่งโปรตีนเลกฮีโมโกลบิน ในระดับอุตสาหกรรมได้ดียิ่งขึ้น โดยจากผลการศึกษพบว่ายีสต์ดังกล่าวสามารถผลิตเลกฮีโมโกลบินได้มากถึง 3.5 g ต่อปริมาณเชื้อในอาหารเหลว 1 L (Shao และคณะ, 2022)

4. การแสดงออกของยีนในเซลล์เจ้าบ้านต่างสายพันธุ์ (Heterologous expression)

เป็นการนำรหัสของสารพันธุกรรมไม่ว่าจะเป็น DNA (cDNA) หรือ RNA ที่มีความสามารถในการแปลเป็นโปรตีน จากสิ่งมีชีวิตหนึ่งเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านอีกชนิดหรือสายพันธุ์หนึ่ง โดยที่อาศัยกลไกของเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายที่ได้ส่งถ่ายยีนเข้าไปภายในเซลล์ (Gagnon, 2009) โดยเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมนำมาใช้ในการแสดงออกที่เป็นตัวแทนของโพรแคริโอติกเซลล์คือ *Escherichia coli* เนื่องจาก *E.coli* นั้น ได้มีการศึกษากลไกการแสดงออกของยีนอย่างกว้างขวาง และยูแคริโอติกเซลล์ เช่น ยีสต์ *Pichia pastoris* ซึ่งก็นิยมมาใช้ในการผลิตโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์เช่นกัน โดยมีจุดเด่นและจุดด้อยแตกต่างกันไป (ตารางที่ 1)

ในปัจจุบันมีการผลิตโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ ยกตัวอย่างการนำยีนจากสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอต (eukaryote) ไปแสดงออกในแบคทีเรียที่เป็นโพรแคริโอต (prokaryote) ดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2

ตารางที่ 1: ข้อดีและข้อเสียของเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกโปรตีน

ระบบเซลล์เจ้าบ้าน	ข้อดี	ข้อเสีย
<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - สามารถแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว - ค่าใช้จ่ายไม่สูง ต้นทุนต่ำ - ง่าย 	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่สามารถตัดส่วนที่มี intron ออกเองได้ - เมื่อมีอินแปลกปลอมเข้าสู่ภายในเซลล์อาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนเจ้าบ้าน - Codon bias
<i>Bacillus subtilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - มีความสามารถในการรับดีเอ็นเอและพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้อย่างง่ายดาย - มีความสามารถในการหลั่งโปรตีนออกภายนอกเซลล์ - สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์โปรตีนได้ง่าย 	<ul style="list-style-type: none"> - Protease ที่เซลล์ผลิตอาจทำการย่อยโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการได้ - การมีอยู่ของพลาสมิดใน <i>B. subtilis</i> ไม่เสถียร - การแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายเมื่อเทียบกับ <i>E. coli</i> มีปริมาณที่น้อยกว่า
Yeast	<ul style="list-style-type: none"> - สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุนต่ำ - มีการปรับแต่ง post-translational - ไม่ผลิต endotoxins 	<ul style="list-style-type: none"> - สามารถเกิดโปรตีน hyper glycosylation - Codon bias

ดัดแปลงจาก: (Gomes และคณะ, 2016)

ตารางที่ 2: การแสดงออกของโปรตีนลูกผสมในเซลล์แบคทีเรีย

ที่	เซลล์เจ้าบ้าน (Host)	โปรตีนที่แสดงออก	อ้างอิง (references)
1	<i>Escherichia coli</i> BL21	Chitinase	(Tsujiho และคณะ, 2003)
2	<i>Escherichia coli</i>	Insulin	(Goeddel และคณะ, 1979)
3	<i>Escherichia coli</i>	β -defensin 2	(Corrales-García และคณะ, 2020)
4	<i>Pichia pastoris</i>	LegHb	(Jin และคณะ, 2018)
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hepatitis b surface antigen	(McAlear และคณะ, 1984)
6	<i>Sphingomonas sp.</i>	welan gum	(Liu และคณะ, 2017)

ปริมาณของโปรตีนเป้าหมายที่สนใจนั้น ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับยีนพาหะที่ได้รับการส่งถ่ายเข้าไป ยกตัวอย่างเช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำที่ใช้ ปริมาณของการเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาของการเหนี่ยวนำ เป็นต้น

5. เครื่องมือในการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านต่างสายพันธุ์ (heterologous protein expression tools)

5.1. พลาสมิด (plasmid)

เป็นสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซม (Smillie และคณะ, 2010) เป็น extrachromosomal ที่เป็น DNA ทั่วไปแล้วพลาสมิดสามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตโพรแคริโอต ดิกและยูคาริโอต ลักษณะรูปร่างของพลาสมิดนั้นมีทั้งในรูปแบบที่เป็น เส้นตรง แบบวง และเกลียว อีกทั้งยังมีความสามารถในการจำลองตัวเองได้โดยไม่ต้องอาศัยโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน (Bos, 2000) และด้วยคุณสมบัติที่สามารถจำลองตัวเองได้ด้วยตัวเอง พลาสมิดเป็นเครื่องมือที่สำคัญในทางพันธุศาสตร์ เพื่อใช้ในการเป็นพาหะในการส่งและถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เพื่อตัดแปลง แสดงออก ผลิตโปรตีน หรือจะใช้ในการกำจัดยีนเป้าหมาย เป็นต้น

โครงสร้างของพลาสมิดนั้นประกอบด้วยองค์ประกอบหลักหลายอย่างยกตัวอย่างเช่น origin of replication เป็นบริเวณที่การจำลองตัวเองของพลาสมิดอีกทั้งมีส่วน multicloning site

บริเวณตัดจำเพาะที่สามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะได้ในตำแหน่งต่างๆ ที่ทำให้สามารถแทรกยีนที่ต้องการแสดงออกเข้าไปได้

พลาสมิดสามารถแบ่งได้หลากหลายประเภทตามลักษณะหรือหน้าที่ (Smalla และคณะ, 2015) โดยในแต่ละพลาสมิดนั้นอาจจะมี กลไกการจำลองตัวเอง ความสามารถในการแสดงในโฮสต์ชนิดต่างๆ จะมีความแตกต่างกันไป ยกตัวอย่างเช่น

- High-copy plasmid พลาสมิดชนิดนี้นั้นมีความสามารถในการทำสำเนาในปริมาณมากภายในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เป็นอย่างมากในงาน downstream ในงานพวกอุตสาหกรรม
- Low-copy plasmid พลาสมิดชนิดนี้นั้นจะมีการจำลองตัวเองน้อยกว่าพลาสมิดแบบ high-copy number เนื่องจากมีความเสถียรมากกว่าในระหว่างการจำลองและแบ่งตัว โดยใช้ในงานที่มีการต้องการแสดงออกของยีนที่มีขนาดใหญ่

โดยในการจะเลือกใช้พลาสมิดนั้นขึ้นอยู่กับการนำไปใช้งาน ยกตัวอย่างเช่นความแตกต่างระหว่าง พลาสมิด low-copy number และ high-copy number ในแง่ของปริมาณของผลผลิตและปริมาณในการแสดงออก แต่ถ้าต้องการแสดงออกของยีนที่มีขนาดใหญ่และมีความถูกต้องสูง พลาสมิดชนิด low-copy number จะมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการแสดงออกมากกว่า (Dmowski และ Jagura-Burdzy, 2013)

5.2. เครื่องหมายในการคัดเลือก (Selective markers)

ในการทำพันธุวิศวกรรมนั้นจะมีเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบว่า ดีเอ็นเอพาทะนั้นนั้นได้เข้าไปสู่ยั้งเซลล์เจ้าบ้านหรือไม่ หรือตรวจสอบว่ายีนที่สนใจนั้นเข้าไปแทรกอยู่กับดีเอ็นเอพาทะโดยทั่วไปแล้วนั้นจะใช้ selective marker ที่เป็นช่วงยีนที่มีความสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance gene) ยกตัวอย่างเช่น *ampR* หรือ *bla* ที่มีความต้านทานต่อยา ampicillin *tetA* ที่มีความต้านทานต่อ tetracycline และ *kanR* มีความต้านทานต่อ kanamycin เป็นต้น

และการตรวจสอบว่ายีนที่สนใจนั้นไปอยู่ที่บริเวณ multiple cloning site หรือไม่ สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค Blue-white colony โดยเป็นการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับ ดีเอ็นเอพาทะที่ยีนที่สนใจ มีบริเวณของยีน *lacZ* ที่มีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) โดยจะสามารถคัดเลือกได้โดย ทำการใส่สารตั้งต้นในการสร้าง

เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส สารนั้นคือ X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucopyranoside) ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลแลคโตส และมี indicator เป็นสีในการบ่งบอกว่าหากมีการเปลี่ยนสีเป็นสีฟ้านั้นหมายความว่า X-Gal ได้ถูกย่อยเนื่องจากไม่มียีนที่สนใจแทรกลงไป ในบริเวณดังกล่าว ดังนั้นหากต้องการเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะที่มีบริเวณยีนที่สนใจจะต้องเลือกเชื้อที่เกิดเป็น colony สีขาวเท่านั้น (Gagnon, 2009)

5.3. กระบวนการปรับใช้โคดอน (codon optimization, codon usage)

การปรับใช้โคดอนเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของโคดอนเพื่อการปรับปรุงความเหมาะสมของโคดอนโดยไม่ทำการเปลี่ยนแปลงลำดับของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งการแสดงออกของยีนที่มาจากสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอติก ในสิ่งมีชีวิตโพรแคริโอติกนั้นจะต้องมีปรับใช้ชนิดของโคดอนให้เหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้าน เพราะจะเป็นการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนให้มีปริมาณมากขึ้นและถูกต้อง เนื่องจากสิ่งมีชีวิตพวกโพรแคริโอติกนั้นไม่มีกระบวนการ post translational modification ที่ทำการตัดส่วนที่เป็น intron ออกและเชื่อม exon เข้าด้วยกันอย่างสิ่งมีชีวิตยูคาริโอติก (Kurland และ Gallant, 1996)

โดยโคดอนของแต่ละสิ่งมีชีวิตทั้งเซลล์โพรแคริโอติก และยูคาริโอติกเซลล์ที่แตกต่างกันนั้นส่งผลอย่างมากต่อการผลิต heterologous protein (Kanjawattana, 2010) เนื่องจากกระบวนการในการได้มาซึ่งโปรตีนในระบบเจ้าบ้านแบคทีเรีย นั้นไม่มีกระบวนการ post-translational modification เหมือนกับสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอต ซึ่งความแตกต่างของโคดอนนั้นอาจจะส่งผลทำให้เกิดการผลิตโปรตีนได้ในปริมาณที่น้อยหรืออาจจะมีโอกาสที่จะ misfold ได้เนื่องจากจำนวนประชากรของ tRNA population ของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันนั้นมีไม่เท่ากัน

โดยยกตัวอย่างในกรณีของ รหัสโคดอน AUG ที่แปลรหัสเป็น isoleucine และรหัส AGG ใน arginine ที่มีปริมาณสัดส่วนของ tRNA ที่น้อยกว่ารหัสโคดอนตัวอื่นๆที่สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโนตัวเดียวกัน (Corrales-García และคณะ, 2020)

5.4. เซลล์เจ้าบ้าน (host cells)

เซลล์เจ้าบ้านคือ เซลล์เป้าหมายที่จะเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการแสดงออกของดีเอ็นเอที่เราต้องให้มีการแสดงออกดีเอ็นเอนั้นๆ

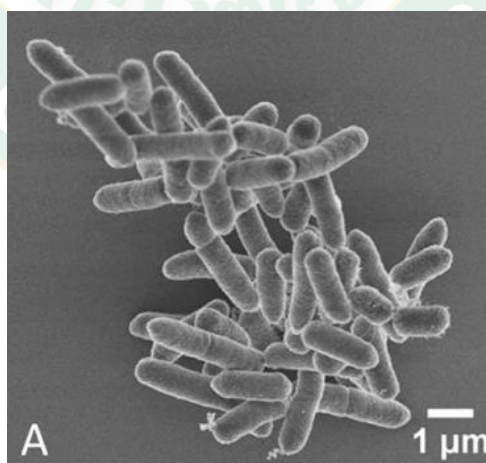
ในการคัดเลือกเซลล์ที่จะใช้ในการทำเป็นเซลล์เจ้าบ้านนั้น มีหลายปัจจัยที่จะต้องคำนึงถึง ยิ่งการจะนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หรือส่วนประกอบของอาหาร จะต้องมีการศึกษา ผ่านการทดสอบทาง

วิทยาศาสตร์ว่าแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ดังกล่าวมีคุณสมบัติ มีฤทธิ์และมีความปลอดภัยและได้รับการรับรองจากสถาบันที่มีความน่าเชื่อถือ ยกตัวอย่างเช่นแบคทีเรียในกลุ่ม ที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded as Safe หรือ GRAS) ที่ได้รับการรับรองว่ามีความปลอดภัยจากองค์กรอนามัยโลก

5.4.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นสิ่งมีชีวิตแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างและลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอก มีขนาดความยาวประมาณ 1.0-2.0 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางรัศมี 0.5 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 4 สามารถเจริญและแบ่งตัวได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ โดยทั่วไปแล้ว *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่อยู่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิประมาณ 37 °C *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เป็นแบคทีเรียที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย ในการใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในระบบเจ้าบ้านแบบแบคทีเรีย เนื่องจาก นั้นได้มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมอย่างกว้างขวาง มีความสามารถในการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วภายในเวลาสั้นๆเพียง 20-30 นาที มีลำดับทางพันธุกรรมที่รู้ชัดเจน มีพลาสมิดที่สามารถเลือกใช้ในการแสดงออกได้อย่างหลากหลาย (Snustad และ Simmons, 2015) อีกทั้งยังมีระบบการแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ระบบ T7 ทำให้ได้รับความนิยมในการนำมาแสดงออกดีเอ็นเอจึงทำให้ได้ผลผลิตโปรตีนที่ต้องการจำนวนมาก

ภาพที่ 4: รูปร่างของ *Escherichia coli* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



ที่มา: (Mojsoska และคณะ, 2017)

6. เทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular techniques) ที่เกี่ยวข้องในการทำ heterologous protein expression

6.1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

กระบวนการพีซีอาร์ คือ เป็นปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยอาศัยการทำงานของ Taq polymerase ในหลอดทดลองโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (Mullis, 1994) โดยในหนึ่งปฏิกิริยาของกระบวนการพีซีอาร์ ประกอบไปด้วยสามขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นกระบวนการที่ใช้ความร้อนสูงประมาณ 94-95 °C เพื่อให้ความร้อนจะทำลายส่วนที่เป็นพันธะไฮโดรเจน ส่งผลให้ดีเอ็นเอแยกออกจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว
2. Annealing ในขั้นตอนนี้จะใช้ความร้อนประมาณ 55-65 °C เป็นเวลา 30-60 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอแม่แบบจับกันอย่างจำเพาะเจาะจง (โดยไพรเมอร์ที่รับจากการสังเคราะห์จะมีความระบุด้าน T_m) ที่ปลายสายดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 3'
3. Extension เมื่อมีการระบุตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์แล้วนั้น จึงเพิ่มอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการทำงานของ Taq polymerase ที่จะทำหน้าที่สังเคราะห์ ดีเอ็นเอสายใหม่จากปลาย 3' ที่ไพรเมอร์เกาะอยู่จากทิศทาง 5' ไปยังทิศทาง 3'

6.2. Fitness assay

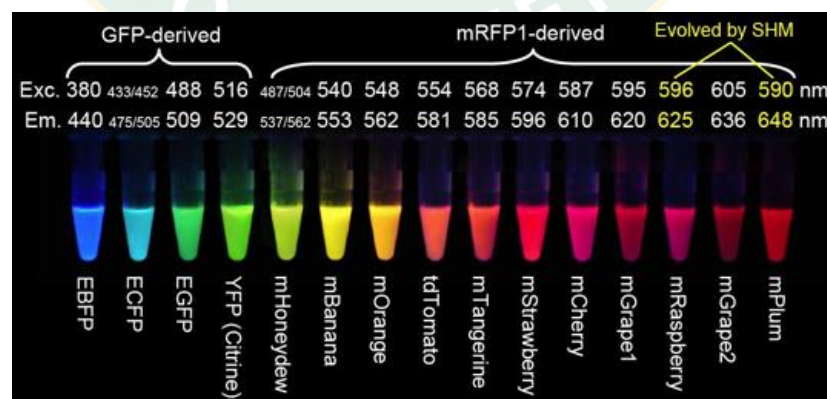
คำว่า fitness นั้น มาจากศัพท์ภาษาอังกฤษว่า "Darwinian fitness" มักจะใช้หมายถึงความเหมาะสมที่วัดได้ โดยแตกต่างจากคำว่า "physical fitness" ซึ่งหมายถึงความแข็งแรงของร่างกาย เป็นแนวคิดหลักอย่างหนึ่งในทฤษฎีวิวัฒนาการ ในสิ่งแวดล้อมหนึ่ง ๆ จะกำหนดโดยลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) หรือลักษณะปรากฏ (phenotype) ก็ได้ ในกรณีนี้ทั้งสอง สามารถอธิบายได้ว่า เป็นความสามารถที่จะรอดและสืบพันธุ์ได้ ฟิตเนส (fitness) ในบริบทนี้ จึงหมายถึงความสามารถของแบคทีเรียในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ความหนาแน่นประชากร และสามารถอยู่รอดและสืบพันธุ์ได้

ในการทำพันธุวิศวกรรมเพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ของแบคทีเรียที่ลักษณะปรากฏที่ต้องการ อาจส่งผลต่อความเหมาะสม หรือความสามารถในการอยู่รอด (fitness) ของแบคทีเรียได้ (Bartke, Garoff, Huseby, Brandis, & Hughes, 2020; Bialy, 1984) และการใช้ระบบโปรโมเตอร์ T7 จากการคะเนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) สามารถให้ผลผลิตได้ถึงร้อยละ 25-40 ของโปรตีนในเซลล์ (Ye et al., 2022) จากตัวเลขดังกล่าว การผลิตโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ อาจส่งผลกระทบต่อวิถีเมแทบอลิซึม และการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของแบคทีเรียเจ้าบ้านได้ (Khosla & Bailey, 1988; Sheehan, Sleator, Fitzgerald, & Hill, 2006)

การทดสอบนี้นั้นจำเป็นจะต้องมีเชื้อที่เป็นเชื้ออ้างอิงในการเปรียบเทียบ fitness ของเชื้อที่ต้องการทดสอบ ปกติทั่วไปแล้วจะนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีลักษณะและสีที่แตกต่างกัน เพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อที่เป็นชุดควบคุมและเชื้อที่เป็นชุดทดสอบ

6.2.1. โปรตีนเรืองแสงสีแดง mCherry

ในการศึกษานี้ใช้โปรตีน mCherry เป็นเครื่องมือในการทำ competition assay เพื่อแยกประชากรเซลล์ออกจากกัน โปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนเรืองแสงสีแดง (red fluorescent protein; RFP) สามารถสังเคราะห์ได้ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งโปรตีน mCherry นั้นมีแหล่งที่มาจากโปรตีน DsRed ที่ได้จากดอกไม้ทะเลกลุ่ม Discosoma



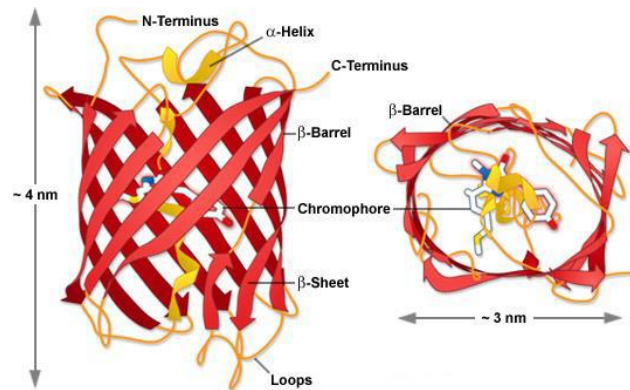
ภาพที่ 5: โปรตีนเรืองแสงในกลุ่ม Green fluorescent protein (GFP) และโปรตีนกลุ่ม mFruits

ที่มา: (Shaner และคณะ, 2004)

โปรตีน mCherry เป็นโปรตีนในกลุ่มของ mFruits (Shaner, 2013) (ภาพที่ 5) ที่นิยมนำมาใช้งานวิจัยมากที่สุดเนื่องจากมีประสิทธิภาพที่คงที่ และยังไม่กระทบกับเซลล์เป้าหมายที่ใช้ในการแสดงออก อีกทั้งมีคุณสมบัติในการติดฉลากอย่างมีประสิทธิภาพ ในการวิจัย โปรตีน mCherry มักจะใช้ในเป็นสารในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน เช่น การติดฉลากกำกับติดตามยีน เซลล์ หรือออแกเนลล์เป้าหมาย ใช้เป็น โพรบ (probe) ในการจับกับ ดีเอ็นเอหรือโมเลกุลเป้าหมาย เพื่อให้สามารถติดตามได้จากเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Winterflood และEwers, 2014) ซึ่งในประโยชน์ในการทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมอย่างจำเพาะเจาะจง อีกทั้ง mCherry ยังสามารถใช้ในการศึกษาการเคลื่อนที่ และปฏิกิริยาต่าง ๆ ของโปรตีนในตำแหน่งต่าง ๆ ได้อีกด้วย เช่น เทคนิค Förster resonance energy transfer (FRET) ที่อาศัยโปรตีนเรืองแสง 2 ตัวในการบอก proximity ของโมเลกุล 2 โมเลกุลในตัวอย่าง (McCulloch และคณะ, 2020)

โครงสร้างของ mCherry ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 711 คู่เบส (base pairs; bp) โดย mCherry นั้นเป็นโปรตีนโมโนเมอร์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 236 ตัว มีมวล 26.7 kDa ถือเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีความสามารถในการจัดโครงสร้าง (folding) ในอัตราค่อนข้างเร็วกว่า tetrameric proteins เช่น DsRed ชนิดของกรดอะมิโนที่มีจำนวนมากที่สุดในลำดับปฐมภูมิของ mCherry คือ ไลซีน (lysine) ไกลซีน (glycine) และกลูตาเมต (glutamate) ตามลำดับ และกรดอะมิโนที่มีสัดส่วนน้อยที่สุด คือ อะลานีน (alanine) โดยคิดเป็นเพียงร้อยละ 5 ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดใน mCherry (Myšková et al., 2020)

โปรตีน mCherry ไม่มีโครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) กล่าวคือทั้งหมดประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์เพียงเส้นเดียว โครงสร้างสามมิติของ mCherry วิเคราะห์โดยการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray) ให้ความละเอียดในระดับอังสตรอม mCherry พบว่าประกอบด้วยเกลียวแอลฟา (alpha-helix) และแผ่นเบต้า (beta-sheet) 13 แผ่น โดยโครงสร้างส่วนใหญ่ของ mCherry คือ beta-sheet ซึ่งล้อมรอบ chromophore (ligand) และเกลียวกลางเป็นโครงสร้างคล้ายลำกล้องเรียกว่าเบต้าบาเรล (beta-barrel; ภาพที่ 6) (Stepanenko et al., 2013)



ภาพที่ 6: โครงสร้างเบต้าบาเรลของโปรตีน mCherry

ที่มา : <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/anthozoafps.html>



งานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2020 Carlsson และคณะได้ทำวิจัยการแสดงโปรตีนของ myoglobin ในใบยาสูบ โดยใช้เอกราบแบคทีเรีย (*Agrobacterium* spp.) เป็นตัวกลางในการส่งถ่ายสารพันธุกรรม พบว่ามีการผลิตและรวมตัวของโมเลกุลฮีม อีกทั้งผลผลิตดังกล่าวยังมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับโมเลกุลฮีมต้นแบบอีกด้วย (Carlsson และคณะ, 2020) ไม่เพียงแต่การแสดงออกโปรตีน myoglobin จากสัตว์ในใบยาสูบ ทาง Cutruzzola และคณะยังได้ทำการศึกษากการแสดงออกของ limacinamyoglobin (Mb) ในเซลล์เจ้าบ้านอย่าง *E. coli* INV α F และ TB-1 ได้ อีกทั้งยังได้โปรตีนลูกผสมนั้นยังมีความใกล้เคียงกับโปรตีนต้นแบบอีกด้วย (CUTRUZZOLA และคณะ, 1996)

ตัวอย่างโมเลกุลอื่น ๆ ที่มีฮีมเป็นองค์ประกอบ เช่น ไซโตโครม (cytochromes) ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย เฟอร์ริติน (ferritin) และฮีโมไซเดอริน (hemosiderin) ที่เป็นโปรตีนทำหน้าที่เป็นตัวยึดเก็บธาตุเหล็กไว้ในเม็ดเลือดแดง แลกโตเฟอร์ริน (lactoferrin) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่มีหน้าที่ในการยึดจับกับธาตุเหล็กเป็นต้น (Kontoghiorghis และคณะ, 2015)

Bhard และคณะ ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *bINH- α* ที่แปลรหัส alpha Inhibin จากวัว (Indian Sahiwal Cattle; *Bos indicus*) ใน *E. coli* และทำการนำไปทดสอบในหนูตะเภาพบว่าสามารถออกฤทธิ์ได้ปกติโดย Nicholson และคณะใช้ AmyE locus ในการทำ chromosome integration ใน *E. coli* นั้นแสดงให้เห็นไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์และการแบ่งเซลล์ (Nicholson และคณะ, 1987)

ดังที่กล่าวมาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ระบบของแบคทีเรียในการแสดงออกโปรตีนฮีมเพื่อเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารในอนาคตต่อไปได้

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อจุลินทรีย์

<i>Escherichia coli</i> BL21	ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พรชัย แก้วทรัพย์ศักดิ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, MA, USA
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, MA, USA

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Luria-Bertani broth/agar	Himedia, India
Nutrient broth	Himedia, India
MC medium (competent medium)	-

3. สารเคมี

30% Acrylamide	Himedia, India
Agar powder	Himedia, India
Ampicillin, sodium salt	Bio Basic, Canada
Ammonium persulfate	Himedia, India
Acetic acid	Sigma-Aldrich, USA
Bacteriological agar	Difco™, USA
Beta-mercaptone ethanol	Himedia, India
Bromophenol blue	PanReac AppliChem, USA
Coomassie brilliant blue	Bio Basic, Canada
Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Qiagen, Germany
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	RCI Labscan Ltd, Ireland
Dithiothreitol (DTT)	fisher bioagents,
Ethanol	RCI Labscan Ltd, Ireland
Glacial acetic acid	RCI Labscan Ltd, Ireland
Glycine	Vivantis, Malaysia

Glycerol	Kemaus, Australia
Hydrochloric acid	RCI Labscan Ltd, Ireland
IRON (II) sulphate 7-hydrate	Kemaus, Australia
Imidazole	Himedia, India
Isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG)	Vivantis, Malaysia
Isopropanol	RCI Labscan Ltd, Ireland
Methanol	RCI Labscan Ltd, Ireland
Molecular grade water	panreac applichem, India
N, N'-Methylene bis-acrylamide	Sigma-Aldrich, Germany
Oligonucleotides	IDT, Singapore
Potassium chloride	RCI Labscan Ltd, Ireland
Potassium dihydrogen phosphate	AJAX Finechem, Australia
Sodium chloride	Merck, Germany
Sodium lauryl sulfate	Loba, India
<i>Taq</i> DNA polymerase	Qiagen, Germany
Tris free base	Himedia, India
Tryptone	Himedia, India
Yeast extract	Himedia, India
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)	Vivantis, USA

4. ดีเอ็นเอมาตรฐาน และโปรตีนมาตรฐาน

ExcelBand 1 KB (0.25-10kb)	SMOBIO Technology, Taiwan
BH 100 bp DNA ladder RTU	Bio-Helix, Taiwan
OneMARK B DNA Ladder	Bio-Helix, Taiwan
Pre-stained 3-color protein ladder (PM2500, 10-180 kDa)	SMOBIO Technology, Taiwan

5. เอนไซม์ตัดจำเพาะ

<i>NdeI</i>	New England Biolabs, MA, USA
<i>XhoI</i>	New England Biolabs, MA, USA
<i>SphI</i>	New England Biolabs, MA, USA
<i>Sall</i>	New England Biolabs, MA, USA

6. อุปกรณ์

miniamp plus thermal cycler	Thermo Fisher
the mini heating dry bath incubator	Biosan, Latvia
QIAquant real-time PCR cycler	Qiagen
เครื่องถ่ายภาพเจล (ImageQuant™)	Cytiva, USA
ชุดเครื่องรันเจลดีเอ็นเอ (gel electrophoresis)	Hercuvan, Malaysia
ชุดรันเจลโปรตีน (SDS-PAGE system)	Bio-Rad, USA
เครื่องส่องเจล (UV transilluminator)	Bio-Helix, Taiwan
Micro-volume spectrophotometer (OneDrop™)	Biometrics Technology, USA
High intensity ultrasonic processor	Sonics & Materials, USA
เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง (heating block)	Major Science, USA
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอน้ำ (autoclave)	Zealway, USA
ไมโครเวฟ (microwave)	Sharps, Japan
เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (automatic pipette)	Sartorius, Germany
ไมโครปิเปตทิป (pipette tip)	Hycon, USA
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (analytical balance)	OHAUS, USA
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical balance)	OHAUS, USA
ตู้อบลมร้อน (hot air oven)	Memmert
เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)	Biosan, Latvia
ตู้ชีวนิรภัย (biological safety cabinet)	Haier Biomedical, China
ตู้อบเชื้อจุลินทรีย์ (incubator)	Gallenkamp, China
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubator)	Wiggins, China
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Apera Instruments®
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	Drawell Scientific, USA

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	Biosan, Latvia
เครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นสุญญากาศ (freeze dryer)	Drawell Scientific, USA
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)	TESCAN, Czech
เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)	Biosan, Latvia
จานเพาะเชื้อ (petri dish)	Hycon plastics, USA
หลอดทดลอง (test tubes)	PYREX, USA
หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube)	Kirgen, USA
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)	Schott Duran, Germany
ถุงมือไนไตรล์ (nitrile gloves)	MG PRO

7. ชุดสกัดและทำให้บริสุทธิ์สำเร็จรูป

GeneJET plasmid miniprep kit	Thermo Scientific, USA
TIANGEN DNA extraction kit	TIANGEN, China
TIANquick PCR purification kit	TIANGEN, China
QIAquick gel extraction kit	Qiagen, Germany
RNeasy RNA extraction kit	Qiagen, Germany
QIAzol reagent	Qiagen, Germany

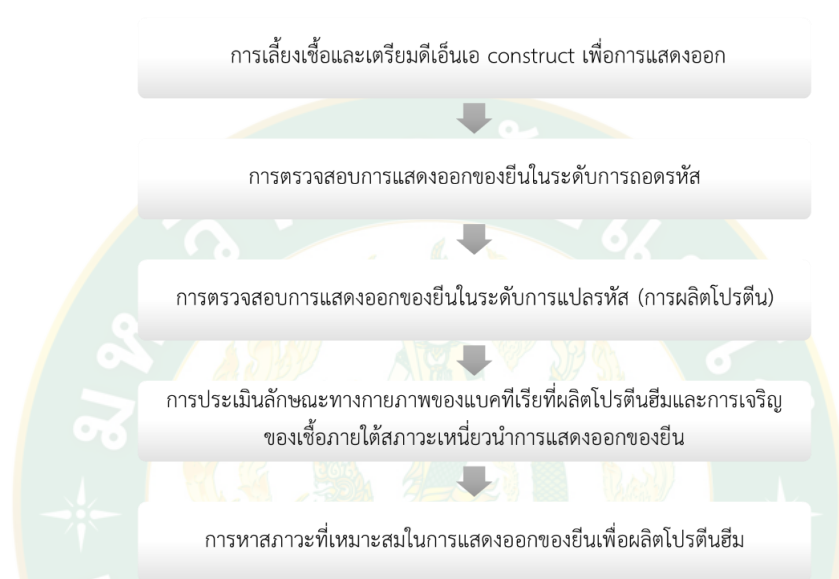
8. โปรแกรม และฐานข้อมูล

ApE primer editor
 Bio-edit
 ImageQuant (Gel documentation system)
 design expert version 13
 Vision work

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ภาพรวมการดำเนินงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน/โปรตีนฮีโม 2 ชนิด ได้แก่ leghemoglobin จากถั่วเหลืองและ myoglobin จากวัว ในแบคทีเรีย โดยได้ทดลองใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และในส่วนของงานทดสอบต่าง ๆ แบ่งออกเป็นกลุ่มงานดัง ภาพที่ 7



ภาพที่ 7: ภาพรวมการดำเนินงานวิจัย

1. การเลี้ยงเชื้อและเตรียมดีเอ็นเอ construct เพื่อการแสดงออกของยีน

1.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Escherichia coli* ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) แบบแข็ง และแบบเหลว ขึ้นอยู่กับการใช้งาน ในขั้นตอนถัดไป โดยเชื้อที่มีพลาสมิดจะต้องเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลวเนื่องจากพลาสมิดที่ใส่อาศัยยีน *bla* ซึ่ง confers ampicillin resistance ซึ่ง *E. coli* สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37 °C และมี doubling time ประมาณ 30-40 นาทีในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบมีอากาศ

1.2 การเตรียมลำดับนิวคลีโอไทด์และพลาสมิดสำหรับการแสดงออกยีนที่สนใจ

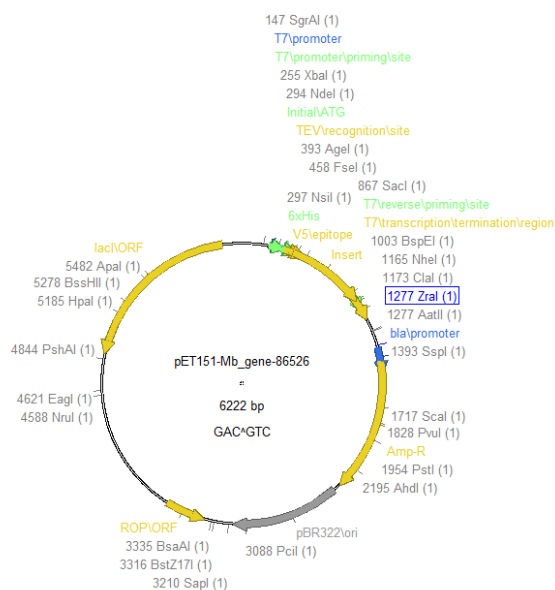
ในงานวิจัยนี้ มีความสนใจที่ผลิตโปรตีนฮีโม 2 ชนิด ได้แก่ ไมโอโกลบิน (myoglobin; *Mb*) ซึ่งเป็นโปรตีนฮีโมจากสัตว์ และเลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin; *LBA*) ซึ่งเป็นโปรตีนฮีโมจากพืช โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากวัว (*Bos taurus*) (transcript_ID: NM_173881.2) และถั่วเหลือง (*Glycine max*) (transcript_ID: NM_001248999.3) ตามลำดับ โดยพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์และออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยซอฟต์แวร์ ApE plasmid Editor (Davis และ Jorgensen, 2022) และใช้แพลตฟอร์ม เพื่อทำ codon optimization ให้เหมาะสมกับการแสดงออกของยีนใน *E. coli* (Chin และคณะ, 2014)

ส่วนในการแสดงออกพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกโปรตีน myoglobin นั้น จะทำการจ้างเหมาบริษัทสังเคราะห์ *Mb* แบบดีเอ็นเอสายคู่โคลนเข้าสู่พลาสมิด pET151 **ภาพที่ 8** และสังเคราะห์ยีน *LBA* แบบดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ทำการสังเคราะห์ยีน (GeneArt, Thermo-Fisher Scientific, USA)

ในการเตรียมพลาสมิดก่อนการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน แบ่งออกเป็น 2 กรณี ได้แก่ ยีน *LBA* พลาสมิดเวกเตอร์ pET151 ที่มียีน *Mb* เนื่องจากการสังเคราะห์ยีน *LBA* นั้นเป็นแบบ dsDNA จึงนำสายดีเอ็นเอชิ้นนี้มาเติมบริเวณตัดจำเพาะโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) และไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มี ตำแหน่งตัดจำเพาะ (restriction sites) ที่ปลาย 5' และ 3' และลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-CATCACCATCACCATCAC-3' ที่ปลาย 3' ก่อน double stop codon เพื่อติดฉลากฮิสทีดีน (Hisx6 tag) จากนั้นทำการ subcloning สายผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (TIANGEN PCR purification kit, TIANGEN, China) เข้ากับพลาสมิด pBR322 ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* (New England Biolabs, MA, USA) และเอนไซม์ T4 ligase (Vivantis, Malaysia) ส่วนยีน *Mb* นั้น ใช้การจ้างเหมาสังเคราะห์ dsDNA และโคลนเข้าสู่พลาสมิด pET151 จึงพร้อมนำส่งเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (GeneArt, Thermo-Fisher Scientific, USA) ด้วยวิธี transformation

ตารางที่ 3: พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิด	หน้าที่
pBR322	แสดงออกยีน/โปรตีน <i>LBA</i>
pET151	แสดงออกยีน/โปรตีน <i>Mb</i> (สังเคราะห์)



ภาพที่ 8: แผนที่พลาสมิดของ pET151 ที่มียีนไมโอโกลบิน (*Bos taurus Mb*) (GeneArt Gene Synthesis, Thermo-Fisher Scientific, USA)

ตารางที่ 4: ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเตรียม DNA constructs

Primers	Sequence (5' → 3')	Annealing temp (°C)	Product size (bp)	Target gene
NdeI_LBA_F1 (PCR, RT-PCR)	CATATGGTGGCGTTTACCGA AAA	55	432	LBA
LBA_his6_XhoI_R1 (PCR)	CTCGAGTTATTAGTGATGGT GATGCGCTTTTTTAATCGCC GCC	55		
LBA_R2 (RT-PCR)	CGCTTTTTTAATCGCCGCC	55		
Mb_F2 (PCR, RT-PCR)	CGAAGCCGAAGTGAAACACC	52	462	Mb
Mb_R2 (PCR, RT-PCR)	TTATTAGCCATGAAAGCCCA GC	52		

1.3 การส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation)

ในการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เริ่มต้นจากการใช้ *E. coli* DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดไว้ใช้ในลำดับถัดไป โดยเตรียมโคโลนีของ *E. coli* DH5 α บนอาหารแข็ง จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ ด้วยการปั่นเหวี่ยง กำจัดส่วนใสและเติมสารละลาย 0.1 M CaCl₂ ปริมาตร 50 μ L ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง กำจัดส่วนใสและเติม CaCl₂ ปริมาตร 50 μ L อีกครั้ง จากนั้นเติมพลาสมิดดีเอ็นเอ (ความเข้มข้น 10 ng/ μ L ปริมาตร 1-2 μ L) ลงไปในหลอดที่มีเซลล์ บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไป heat-shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาทีในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) และนำไปบ่มต่อในน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงเติมอาหาร LB แบบเหลว 1 mL ที่ pre-warmed ไว้แล้วลงในหลอด บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 45-60 นาที จึงนำไปเกลี่ยลงบนอาหาร LB แบบแข็งที่มีแอมพิซิลลิน (ampicillin; 100 μ g/mL) isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; 0.1 mM) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal; 20 μ g/mL) เพื่อใช้ในการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มี DNA insert

เมื่อได้โคโลนีของ *E. coli* DH5 α พร้อมแล้ว จึงนำไปสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป (GeneJET Plasmid Miniprep kit, Thermo Fisher Scientific Inc., USA หรือ TIANprep Rapid Mini Plasmid Kit, TIANGEN, China) จากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Single-pass sequencing, ATGC Co., Ltd., Thailand) และเมื่อได้รับการยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องแล้ว ทั้ง *LBA* และ *Mb* จึงทำการเก็บเชื้อ *E. coli* DH5 α : *LBA* และ *E. coli* DH5 α : *Mb* ไว้ใน 12.5% (v/v) กลีเซอรอล ในถังไนโตรเจนเหลว สำหรับการผลิตพลาสมิดดังกล่าวไว้ใช้ในลำดับถัดไป

และทำการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* DH5 α : *LBA* และ *E. coli* DH5 α : *Mb* ใน LB ที่มีแอมพิซิลลิน เพื่อสกัดพลาสมิด จึงนำพลาสมิดทั้ง 2 แบบมาถ่ายเข้าสู่ *E. coli* BL21 เพื่อการผลิตโปรตีน ในการถ่ายพลาสมิดและการยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้วิธีการที่ได้อธิบายมาแล้วข้างต้น ทั้งนี้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียและการทำ PCR มีรายละเอียดดังอธิบาย **หัวข้อ 1.4**

1.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (polymerase chain reaction; PCR)

เมื่อได้โคลนีจากการถ่ายพลาสมิดแล้ว ทำการแยกโคลนีอีกครั้งบนอาหาร LB ที่มี แอมพิซิลลิน IPTG และ X-Gal เพื่อยืนยันสีของโคลนี จากนั้นสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo-Fisher Scientific Inc., USA) โดยใช้วิธีการตามคู่มือผลิตภัณฑ์ โดยนำเชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้ตะกอนเซลล์ หลังจากใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป นำพลาสมิดที่ได้มาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (อะกาโรส 1% (w/v)) และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (OneDrop, Biometrics Technologies, USA) และเก็บรักษาที่ -20°C ก่อนการนำไปวิเคราะห์/ใช้งาน ตรวจสอบยีนที่ต้องการ (ฮีโมโปรตีน) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ในตารางที่ 2 โดยใช้ชุด 2X PCR MasterMix (Vivantis, Malaysia) และ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (1% (w/v) กำลังไฟฟ้า 100V เป็นเวลา 30 นาที และหลังจากนั้นนำไปดูผลภายใต้แสง UV LED (ใช้ RedSafe™ เป็นสารเพื่อ visualization) และใช้ gel documentation system (Cytiva, USA) ในกรณีที่ต้องการบันทึกภาพ

2. การศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัส (transcriptional expression) ด้วยวิธี reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เมื่อต้องการประเมินการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัส นำแบคทีเรียในอาหารเหลวที่สภาวะต่าง ๆ ไปสกัดอาร์เอ็นเอด้วย QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, USA) และเก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ใน RNA stabilizing solution (Qiagen, USA) ที่อุณหภูมิ -80°C ก่อนนำไปวิเคราะห์ เมื่อรวบรวมตัวอย่างอาร์เอ็นเอ ได้ครบทั้งการทดลอง (ทุกสภาวะการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน) และนำอาร์เอ็นเอดังกล่าวมาใช้เพื่อเป็น template ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้น้ำยาแบบ 1-step reaction (SensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step Kit, Bioline Reagents Ltd., UK) ตามคำแนะนำการใช้ผลิตภัณฑ์ และวิเคราะห์ผลปฏิกิริยา 20 μL ด้วย QIAquant 96 5-plex (FEM, Qiagen, USA) (ปฏิกิริยาประกอบด้วย 45°C 10 นาที, 95°C 2 นาที และ 40 รอบของ 95°C 5 วินาทีและ 60°C 30 วินาที) ทำซ้ำ 2 ครั้ง (biological duplicates) โดยแต่ละครั้งทำ 3 ปฏิกิริยา (technical triplicates) และให้โปรแกรม QIAquant ประเมินระดับทรานสคริปต์โดยการคำนวณค่าเฉลี่ย cycle threshold (Ct) ด้วยไพรเมอร์ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 5: ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีนในระดับการถอดรหัส

Primers	Sequence (5' → 3')	Target gene
NdeI_LBA_F1	CATATGGTGGCGTTTACCGAAAA	LBA
LBA_R2	CGCTTTTTTAATCGCCGCC	
Mb_F2	CGAAGCCGAAGTGAACACC	Mb
Mb_R2	TTATTAGCCATGAAAGCCCAGC	

3. การศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัส (translational expression) ด้วย sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นอกจากการประเมินในระดับการแปลรหัสของยีน จึงทำการประเมินการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัสหรือการผลิตโปรตีน โดยวิธี sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เพื่อดูขนาดของโปรตีนทั้งหมด (whole cell lysates) และทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วย IPTG เพื่อให้มีการผลิตโปรตีนเป้าหมายในปริมาณมากภายใต้ระบบการแสดงออก T7 promotor

3.1 การเหนี่ยวนำการแสดงออกในระดับขวดรูปชมพู่ (small-scale induction)

เลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทำการแสดงออกในอาหารเหลวที่มี 100 µg/mL แอมพิซิลลินจนกระทั่งมีความขุ่นที่ OD₆₀₀ ประมาณ 0.3 – 0.4 จากนั้นเติมสารเหนี่ยวนำ IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM และบ่มที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้น จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง homogenizer (high intensity ultrasonic processor รุ่น VC/VCX 130,500,750 ,SONIC) ที่ amplitude 30% เป็นห้วง sonicate ช่วงละ 10 วินาที เว้น 20 วินาที 3-5 ครั้ง ทำการ sonicate ตัวอย่างทั้งหมดบนน้ำแข็ง และเติม protease inhibitor cocktail (VWR Inc., PA, USA) 1-2 µL หากดำเนินการหลายตัวอย่างในคราวเดียวและต้องใช้เวลาในการทำเพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน

3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยการ homogenizer ไปวิเคราะห์โปรตีน โดยเทคนิค sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยเติมสารละลาย 2X Laemmli buffer (Karlsson และคณะ, 1994) ผสมให้เข้ากันและให้ความร้อนที่ 80°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายโปรตีนสู่เจลพอลิอะคริลาไมด์ (12% polyacrylamide gel) โดยรันตัวอย่างด้วยกำลังไฟ 90-100V หลังจากนั้นนำเจลมาข้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue (Brunelle และ Green, 2014) และนำมาล้างด้วยสารละลาย de-staining (50% ethanol, 40% water, 10% acetic acid) จนเห็นแถบโปรตีน

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมาก

การแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมากโดยใช้ IPTG เป็นสารที่ช่วยในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก ร่วมกับการใช้ Fe^{+} ที่เป็น co-factor ของโปรตีนฮีโม โดยทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 ในอาหารเหลวที่มีแอมพิซิลลิน 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และทำการกระตุ้นแบคทีเรียให้สร้างโปรตีนโดยเติม 0.1 mM หรือ 1 mM IPTG และเติมสารละลายเหล็กความเข้มข้น 50 mM ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C ความเร็วรอบ 120 rpm ข้ามคืน เก็บเกี่ยวเซลล์ในหลอด conical vial ขนาด 50 mL ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์และส่วนใส โดยนำทั้งส่วนที่เป็นตะกอนและส่วนใสมาผสมกับ protein lysis buffer ปริมาณ 20 mL (หรือตามปริมาณชีวมวล) และนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง homogenizer (Vibra Cell, Model VCX750; Sonics & Materials. Inc., USA) โดยตั้งค่าสภาวะเครื่องดังนี้ อุณหภูมิ 25 °C pulse on 20 วินาที pulse off 10 วินาที amplitude 30 นานเป็นเวลา 2 นาที โดยใช้น้ำแข็งช่วยรักษาอุณหภูมิของตัวอย่างให้เย็นอยู่เสมอ เติม protease inhibitor cocktail เพื่อป้องกันการถูกทำลายของโปรตีน

เพื่อทำการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน โดยใช้การวิเคราะห์โดยวิธีการตอบสนองต่อพื้นผิว (response surface methodology: RSM) เพื่อใช้ค่าทางสถิติในการหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิต (Atkinson และ Donev, 1992) โดยเลือกการใช้แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design เพื่อใช้ในการหาสภาวะที่มี ตัวแปรหลายตัว

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน leghemoglobin และ โปรตีน myoglobin โดยทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากเซลล์ *E. coli* ทำการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken โดยกำหนดเป็น 3 ปัจจัยที่ต้องการศึกษาคือ ความเข้มข้นของ IPTG (X_1) ระยะเวลาหลังจากการเหนี่ยวนำ (X_2) และ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (X_3) ดังตารางที่ 9 ซึ่งการดำเนินการออกแบบการทดลองดังนี้ ทำการกำหนดระดับของปัจจัยในการหา

สภาวะ แบ่งเป็น 3 ระดับด้วยกัน คือระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) เพื่อดูการตอบสนอง 3 การตอบสนอง ได้แก่ ปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด (R1) ปริมาณโปรตีนที่สนใจเมื่อเทียบกับอัตราส่วนของโปรตีนฮีมาโตโปรตีนทั้งหมด (R2) และปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากการทำกรเหนียวน้ำตาลแลคโตส (R3) เมื่อทำการกำหนดระดับปัจจัยเป็นที่เรียบร้อยแล้วจึงทำการออกแบบการทดลอง Box-Behnken โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป design expert version13 โดยกำหนดปัจจัยเป็น 3 ระดับโดยในแต่ละระดับมีความแตกต่างกันที่ 3 ระดับมีการทำซ้ำ 5 ครั้งจึงมีการทดลองทั้งหมด 17 runs ต่อยิน ดังตารางที่10

ตารางที่ 6: ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

ปัจจัย	ระดับ		
	-1	0	1
X_1 : ความเข้มข้นของแลคโทส (mM)	0.1	0.55	1
X_2 : อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย (°C)	23	30	37
X_3 : เวลาหลังใส่สารเหนียวน้ำตาล (ชั่วโมง)	4	14	24

ตารางที่ 7: แผนการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ที่ใช้ในการทดลอง

Run	X1	X2	X3
1	0.1	37	14
2	0.1	30	4
3	0.55	23	24
4	0.55	37	24
5	0.1	23	14
6	1	37	14
7	0.55	30	14
8	0.1	30	24
9	0.55	30	14
10	1	23	14
11	0.55	23	4
12	0.55	30	14
13	0.55	30	14
14	0.55	37	4
15	1	30	24
16	0.55	30	14
17	1	30	4

ในการวิเคราะห์ผลจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมาก ได้วิเคราะห์การตอบสนองของแผนการทดลองโดยประเมินปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่สนใจเมื่อเทียบกับอัตราส่วนของโปรตีนฮีมต่อโปรตีนทั้งหมด และปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากการทำการเหนี่ยวนำด้วยแลคโตส

4.1 การวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธีการแบรดฟอร์ด (Bradford's protein assay)

หลังจากทำเตรียมตัวอย่างโดยการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง แบ่งตัวอย่างออกมาปริมาณ 200 μ L ผสมน้ำปริมาณ 100 μ L และสารละลายแบรดฟอร์ด 200 μ L เพื่อนำมาวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธีการ Bradford's protein assay โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนในการทำการหามาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบและคำนวณปริมาณของโปรตีนทั้งหมด

4.2 วัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังการเหนี่ยวนำโดยวิธีการร็อบเพลต (Drop plate technique)

เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของโปรตีนต่อปริมาณจึงจะต้องมีการทำการประเมินความหนาแน่นของเซลล์ก่อนนำไปเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน โดยผสมตัวอย่าง 100 μ L กับสารละลาย 0.85% NaCl 900 μ L หลังจากนั้นทำการเจือจางและทำการหยดบนอาหาร LB agar เพื่อนำมาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในหน่วย CFU/mL

4.3 วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนฮีมจากโปรตีนทั้งหมดด้วยโปรแกรม ImageQuant™ TL

นำอะครีลาไมด์เจลที่ได้ทำการล้างสี Coomassie ที่ไม่จำเพาะออกเรียบร้อยแล้วไปถ่ายภาพด้วยเครื่อง gel documentation (ImageQuant™ TL, Cytiva, USA) โดยใช้โหมด colorimetric นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (pre-stained protein ladder) และนำมาคำนวณสัดส่วนเปรียบเทียบกับโปรตีนทั้งหมด

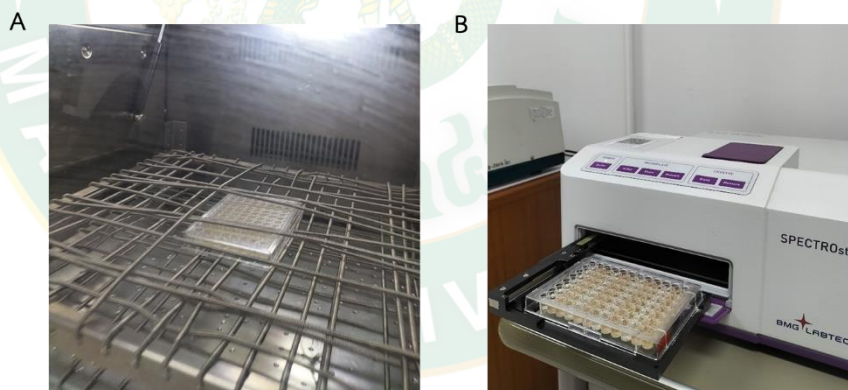
$$\text{อัตราส่วนของโปรตีนที่สนใจ} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่คำนวณจากโปรแกรม (mg)}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg)}}$$

5. การประเมินลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีนฮีโมโกลบินและการเจริญของเชื้อภายใต้สภาวะเหนียวนำการแสดงออกของยีน

5.1. การเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียลูกผสม

เพื่อดูการเจริญของแบคทีเรียพันธุ์ผสมโดยการเปรียบเทียบกับ *E. coli* BL21 (wild type) และ *E. coli: mCherry* นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะของยีน *LBA* และ *Mb* ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37°C (120 rpm) และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm (OD_{600}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อสร้าง growth curve และคำนวณ doubling time (T_d) โดย $T_d = \ln 2/B$ ซึ่ง B ได้จากสมการของกราฟ exponential trend line ($y = Ae^{Bx}$) สร้างจาก growth curve ในสเกล \log_2

และมีการเสริมสาร FO growth supplement ที่เป็นผง hemoglobin มาทดสอบกับ *E. coli* BL21 ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth เปรียบเทียบกับ *E. coli* สายพันธุ์ที่เป็น wild type และสายพันธุ์ที่ได้รับพลาสมิดทั้งระบบ pBR322 (Ascpf1) โดยนำเชื้อทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีการเติมแอมพิซิลลิน ในภาชนะที่เป็นเพลตชนิด 96 หลุม นำไปบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37°C และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุก 30 นาที โดยเครื่อง microplate reader จนครบ 16 ชั่วโมง



ภาพที่ 9: (A) ภาพของไมโครเพลตขนาด 96 หลุมขณะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (B) ภาพของเครื่อง microplate reader ที่ใช้ในการวัดค่าดูดกลืนแสง

ตารางที่ 8: เชื้อที่นำมาวัดการเจริญในการทำ competition assay

Strains
<i>E. coli</i> BL21
<i>E. coli</i> BL21 pBR322: <i>LBA</i>
<i>E. coli</i> BL21 pET151: <i>Mb</i>

ตารางที่ 9: ระดับความเข้มข้นของ FO growth supplement

ปัจจัย	ระดับ		
	control	ต่ำ	สูง
ความเข้มข้นของ FO growth supplement	0	0.1	0.5

5.2. การทดสอบ competition assay

ในการทดสอบ fitness ใช้ *E. coli* BL21 ที่มียีน *mCherry* ที่สร้างโปรตีนเรืองแสงเพื่อการแยกเซลล์ทดสอบออกจากชุดควบคุม มาเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตและความสามารถในการแข่งขันของ *E. coli* BL21:*LBA* และ *E. coli* BL21:*Mb* นำเซลล์แบคทีเรียทั้งสามมาเลี้ยงในอาหารเหลว inoculate ให้เชื้อแต่ละตัวให้มีค่า OD₆₀₀ ที่เท่ากัน และจึงนำมาทำการผสมเชื้อ *E. coli* BL21:*mCherry* กับ *E. coli* BL21:*LBA* และ *E. coli* BL21 :*mCherry* กับ *E. coli* BL21::*Mb* กันในอาหาร LB broth ที่มีแอมพิซิลลิน บ่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ และเจือจางก่อนนำมามาเกลี่ยลงบนอาหาร เมื่อทำการบ่มจนเพาะเชื้อในตู้บ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงเป็นที่เรียบร้อยแล้ว นำจานเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ลูกผสมไปส่องภายใต้เครื่อง gel documentation system (Cytiva, USA) ใช้โปรแกรม ImageQuant™ LAS500 เลือกรายการถ่ายภาพด้วยโหมด fluorescence และใส่แผ่นฟิลเตอร์ที่เหมาะสมในช่อง gel documentation และกด start-expose ทำการแปรผลภาพด้วยซอฟต์แวร์ ImageQuant™ LAS500 และ VisionWorks (Germany)

5.3. การศึกษาลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM)

ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างของก่อนนำไปส่องภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอพหุมาเลี้ยงในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิข้ามคืน หลังจากนั้นนำมาเก็บเกี่ยวเซลล์ในหลอด conical vial 50 mL นำมาปั่นเหวี่ยง เพื่อนำส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อออก และนำมาละลายด้วยสารละลาย 0.85 % (w/v) NaCl และนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนได้ตัวอย่างแห้งที่เป็นผงออกมา

หลังจากนำตัวอย่างผงที่ได้จากกระบวนการ freeze dry ไปดูลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าลักษณะของเซลล์ทั้งหมดไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ จึงปรับใช้การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการ ethanol series dehydration

ในขั้นตอนการทำ ethanol series dehydration เตรียมตัวอย่างของก่อนนำไปส่องภายใต้ SEM ด้วยการนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอพหุมาเลี้ยงในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิข้ามคืน หลังจากนั้นนำมาเก็บเกี่ยวเซลล์ ปั่นเหวี่ยงและทิ้งส่วนใสและล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl เป็นจำนวนสามครั้ง เมื่อล้างด้วยน้ำเกลือแล้วเติมสารละลายของ 0.85% (w/v) NaCl ที่มีส่วนผสมของ 4% (w/v) paraformaldehyde เพื่อทำการตรึงเซลล์ และนำไปบ่มในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°Cข้ามคืน เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl อีกครั้งและนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์ และนำมาผสมกับเอทานอลตั้งแต่ความเข้มข้น 30% 50% 70% 80% 90% และ 99% การบ่มในความเข้มข้นแต่ละจะใช้เวลา 10 นาที และเมื่อถึง 99% เอทานอลให้ทำการบ่มเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปเข้าสู่กระบวนการ CPD (critical point drying) เพื่อทำแห้งที่อุณหภูมิวิกฤตแบบอัตโนมัติ

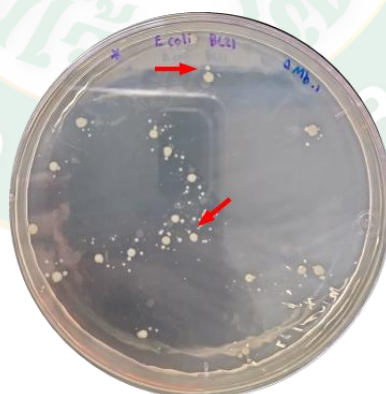
เมื่อได้ตัวอย่างที่แห้งนำตัวอย่างไปติดกับเทปคาร์บอนที่อยู่บน stub และเนื่องจากตัวอย่างของเซลล์แบคทีเรานั้นไม่มีการนำไฟฟ้า จึงจำเป็นต้องเคลือบด้วยอนุภาคทองคำหนาประมาณ 5 nm หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้ SEM ที่กำลังขยาย 5,000 และ 15,000 เท่า เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ wild type และเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การออกแบบยีนและนำส่งยีนที่นำไปสู่การสร้างโปรตีนฮีโมโกลบิน 2 ชนิด - เลกฮีโมโกลบินและไมโอโกลบิน

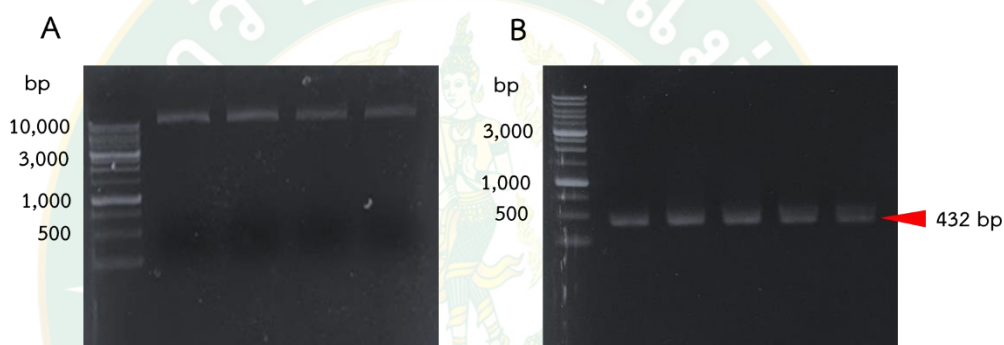
ในการเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนของยูแคริโอตไปแสดงออกในโพรแคริโอต ได้มีการเลือกลำดับจาก mRNA (ไม่มีอินทรอน) ของยีน และ/หรือแปลรหัสย้อนกลับจากกรดอะมิโน จากนั้นปรับลำดับนิวคลีโอไทด์ตามการใช้โคดอนตาม *Bacillus subtilis* แล้วทำการสังเคราะห์ยีน *LBA* (encodes leghemoglobin) จากถั่วเหลือง (*Glycine max*) และยีน *Mb* (encodes myoglobin) จากวัว (*Bos taurus*) โดยยีน *LBA* ทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิดเองโดยใช้พลาสมิด pBR322 (AsCpf1) ทำ ligation เชื่อมต่อยีนที่ออกแบบและเวกเตอร์ที่มียีน selection marker (*bla*) ที่จะสร้างเอนไซม์เบตาแลกแทมเมส (β -lactamase) เพื่อสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีแอมพิซิลลิน ส่วน ยีน *Mb* ทำการจำเพาะโคลนเข้าสู่พลาสมิด pET151 จากนั้นทำการถ่ายพลาสมิดที่เตรียม construct แล้วเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยการทำ transformation และตรวจสอบการมีอยู่ของ heterologous gene ดังกล่าวในเซลล์เจ้าบ้านได้เป็นผลสำเร็จ โดยพบโคโลนีของ *E. coli* ที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีแอมพิซิลลิน ดังภาพที่ 11



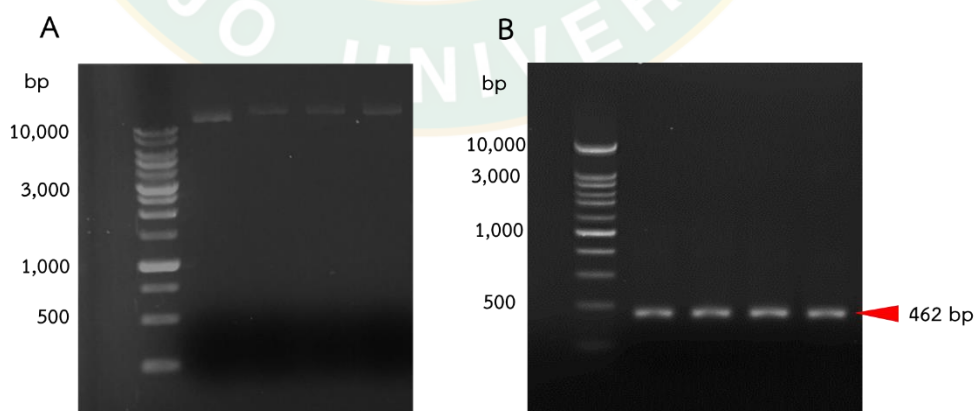
ภาพที่ 10: ลักษณะของโคโลนี *Escherichia coli* BL21 ที่ได้รับการส่งถ่ายดีเอ็นเอพาหะ สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีแอมพิซิลลิน (100 μ g/mL)

2. ผลจากการตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli*

เมื่อทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีความสามารถในการเจริญได้บนอาหารที่มีส่วนประกอบของแอมพิซิลิน หลังจากนั้นจึงทำการสกัดพลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีบนอาหาร ไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR และเจลิอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่า เมื่อนำพลาสมิดที่สกัดได้จาก *E.coli* BL21 มาเป็นแม่แบบในการทำ PCR กับไพรเมอร์ NdeI_LBA_F1 และ LBA_his6_XhoI_R1 พบว่ายีน LBA นั้นมีผลผลิตภัณฑ์ของยีนเป้าหมายที่ขนาดประมาณ 432 คู่เบส **ดังภาพที่ 12** และพลาสมิดที่สกัดได้จาก *E.coli* BL21 ::Mb นำมาทำเป็นแม่แบบ PCR นั้นมีผลของผลิตภัณฑ์ของยีนเป้าหมายที่ขนาด 462 คู่เบส **ดังภาพที่ 13** ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการส่งถ่ายยีนเพื่อการผลิตโปรตีนฮีมาเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้สำเร็จ



ภาพที่ 11: (A) ภาพของพลาสมิดที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ได้รับการคัดเลือก (B) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน LBA ขนาด 432 bp



ภาพที่ 12: (A) ภาพของพลาสมิดที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ได้รับการคัดเลือก (B) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน Mb ขนาด 462 bp

3. ผลการแสดงผลของยีนในระดับการถอดรหัส

เมื่อยืนยันการมีอยู่ของยีนที่ส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้สำเร็จแล้ว ในลำดับถัดไป จึงทดสอบการแสดงผลของยีนในระดับการถอดรหัส โดยสกัดอาร์เอ็นแล้วทำ reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

เมื่อนำ RNA จากแบคทีเรียที่สกัดได้ ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี RT-qPCR (ไพรเมอร์ตารางที่ 11) พบว่ามีการแสดงผลของยีนในระดับการถอดรหัส และการแสดงออกดังกล่าวสามารถถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG และธาตุเหล็ก ยีนที่ผลิตขึ้นมาจะมีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาหลังการเหนี่ยวนำ ทั้งยีน *LBA* (ตารางที่ 11) และยีน *Mb* (ตารางที่ 12) แม้ว่าจะไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

ตารางที่ 10: ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและ RT-PCR

Primers	Sequence (5'----->3')	Annealing temp (°C)	Product size (bp)	Target gene
NdeI_LBA_F1 (PCR, RT-PCR)	CATATGGTGGCGTTTACCGAAAA	55	432	<i>LBA</i>
LBA_R2 (RT-PCR)	CGCTTTTTTAATCGCCGCC	55		
Mb_F2 (PCR, RT-PCR)	CGAAGCCGAAGTGAAACACC	52	320	<i>Mb</i>
<i>Mb</i> _R2 (PCR, RT-PCR)	TTATTAGCCATGAAAGCCCAGC	52		

ตารางที่ 11: การเหนี่ยวนำการแสดงผลของยีน *LBA* ระดับการถอดรหัสใน *E. coli* BL21

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย Ct
<i>E. coli</i> BL21: <i>LBA</i> no-induction control	24.823 ^a
<i>E. coli</i> BL21: <i>LBA</i> (+IPTG 1hr)	24.293 ^{ab}
<i>E. coli</i> DH5- α : <i>LBA</i> (+IPTG 3hr)	24.187 ^{ab}
<i>E. coli</i> BL21: <i>LBA</i> (+Fe & IPTG 3hr)	23.090 ^{ab}
<i>E. coli</i> BL21: <i>LBA</i> (+Fe & IPTG 1hr)	21.647 ^b
Pr > F(Model)	0.148
Significant	No

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a, b) แสดงข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P value < 0.05) จากการวิเคราะห์ DMRT

ตารางที่ 12: การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *Mb* ระดับการถอดรหัสใน *E. coli* BL21

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย Ct
Mb (+IPTG 1 hr)	15.387 a
Mb (no-induction control)	10.177 a
Mb (+IPTG & Fe 3 hr)	9.937 a
Mb (+IPTG & Fe 1 hr)	9.873 a
Mb (+IPTG 3 hr)	9.503 a
Pr > F(Model)	0.458
Significant	No

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a, b) แสดงข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P value < 0.05) จากการวิเคราะห์ DMRT

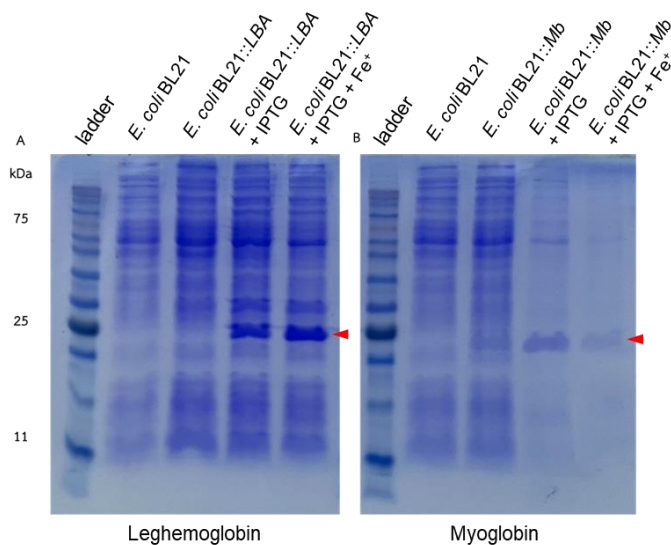
พบว่าการผลิตโปรตีนที่ต้องการจากการแสดงออกของยีนเมื่อทำการทดสอบด้วย RT-PCR นั้นไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากการแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์นี้อาจ leaky เกิดการแสดงออกและมีการแปลรหัสได้โดยไม่ต้องอาศัยสารที่ช่วยในการเหนี่ยวนำ จึงทำการทดสอบการผลิตโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE และตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่ทำการแสดงออกในปริมาณมาก (overexpression) เพื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย

4. ผลการตรวจสอบการแสดงออกระดับยีนในระดับการแปลรหัส (พลาสมิด pBR322)

เมื่อยืนยันการมีอยู่ของยีนในเซลล์เจ้าบ้านเรียบร้อยแล้ว จึงทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัส (การผลิตโปรตีน) ในขั้นตอนนี้ใช้วิธี SDS-PAGE เพื่อแยกโปรตีนจาก cell lysates และทำการย้อมสีด้วย Coomassie staining จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG ร่วมกับ Fe^{+} นั้นพบว่าการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมากที่ขนาด 24 kDa และ 18 kDa ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของโปรตีนเป้าหมาย Leghemoglobin และโปรตีน Myoglobin ตามลำดับ (ภาพที่ 13)

จากรูปที่ จะเห็นว่าโปรตีน leghemoglobin และ myoglobin นั้นถูกผลิตขึ้นมาจากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG และเหล็ก โดยจะเห็นว่าไม่มีแถบโปรตีนที่ไม่ปรากฏใน wildtype (*E. coli* BL21) และเซลล์ลูกผสมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย IPTG แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการควบคุมการแสดงออกด้วยโปรโมเตอร์ที่ใช้ นอกจากนี้ จึงใช้ซอฟต์แวร์ ImageQuant ร่วมกับ gel

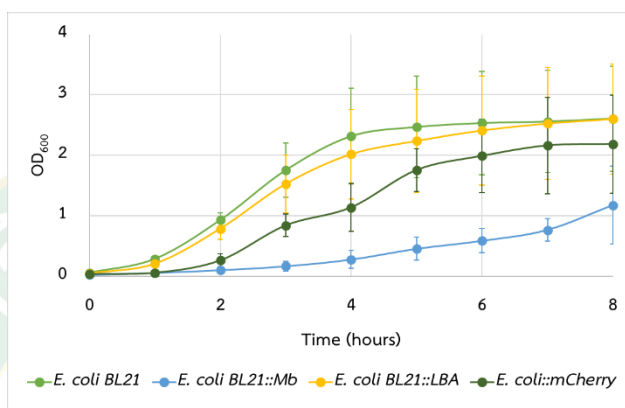
documentation system เพื่อประเมินความเข้มข้นของแถบโปรตีน พบว่าในขณะที่ leghemoglobin นั้นคิดเป็นปริมาณ ~10-15% ของโปรตีนในตัวอย่าง โปรตีน myoglobin สามารถผลิตได้ในปริมาณที่คิดเป็น ~20-25% ของโปรตีนในตัวอย่าง (protein content) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานในบาซิลลัสที่สามารถแสดงออกโปรตีนได้ในปริมาณมากถึง 25-40% ด้วยโปรโมเตอร์ T7 (Ye และคณะ, 2022)



ภาพที่ 13: ภาพของการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE และ Coomassie staining เพื่อการแยกและย้อมสีโปรตีนที่ได้จาก cell lysates ของ *E. coli* BL21

5. ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด

จากการเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดกับ wild type พบว่า *E. coli* BL21 ที่เป็น wild type และ *E. coli* BL21: *LBA* มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แต่ *E. coli* BL21: *Mb* มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าสายพันธุ์ลูกผสมอื่น ๆ (ภาพที่ 16 และ ตารางที่ 14)



ภาพที่ 14: Growth curve ที่วัดด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) ของเชื้อแบคทีเรียลูกผสมในอาหาร LB แบบเหลว เป็นเวลาชั่วโมง การเจริญเติบโตในระยะ exponential phase ถูกนำไปคำนวณหา doubling time ต่อไป

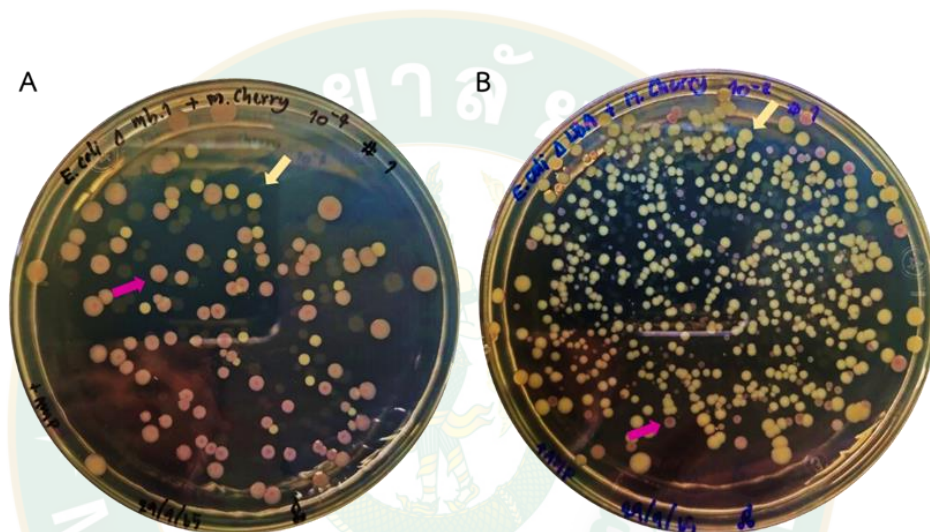
ตารางที่ 13: Doubling time (Td) ของแบคทีเรียลูกผสมแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	trendline equation ($y = Ae^{Bx}$)	B	T _d (hour)	T _d (min)
<i>E. coli</i> BL21	0.0237e ^{1.1364x}	1.1364	0.60995	36.597
<i>E. coli</i> BL21: Mb	0.0152e ^{0.6181x}	0.6181	1.12142	67.285
<i>E. coli</i> BL21: LBA	0.0167e ^{1.1873x}	1.1873	0.58380	35.028
<i>E. coli</i> : mCherry	0.0093e ^{1.0992x}	1.0992	0.63059	37.836

จากการเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดกับ wild type และ เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดในอาหารผสมที่เสริมสาร FO growth supplement (heme powder) ในความเข้มข้น 0.1% และ 0.5% ในอาหาร LB ชนิดเหลว และทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG พบว่าการเจริญของเชื้อ *E. coli* BL21 ที่มีการผลิตโปรตีนนั้นมีการเจริญที่ใกล้เคียงกับ *E. coli* BL21 wild type ดังภาคผนวก จ

6. ผลการประเมินประสิทธิภาพการเจริญของแบคทีเรียด้วยเทคนิค competition assay

เพื่อทดสอบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ลูกผสมที่ผลิตโปรตีนฮีมนั้น มีความเหมาะสมในการอยู่รอด (fitness) แตกต่างจากแบคทีเรียดั้งเดิม (ตั้งต้น) หรือไม่ โคนใช้วิธีการ fitness evaluation ด้วย competition assay โดยใช้ประโยชน์จากโปรตีน mCherry ซึ่งมีงานวิจัยที่ใช้ mCherry ในการทดสอบที่ไม่มีกระทบต่อ fitness ของชุดควบคุม (Durão, Amicone, Perfeito, & Gordo, 2021) โดยโปรตีนเรืองแสง mCherry สามารถให้สีแกลโคโลนี (ภาพที่ 23) ทั้งจากการสังเคราะห์และภายใต้แสง LED fluorescent ใน gel documentation system (Cytiva, USA)



ภาพที่ 15: ภาพสัดส่วนของโคโลนีจากการทำ competition assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากทำการทดสอบ competition assay

(A) โคโลนีของ *Escherichia coli* BL21: Mb (ลูกศรสีเหลือง) และโคโลนีของ *Escherichia coli* BL21: mCherry (ลูกศรสีชมพู)

(B) โคโลนีของ *Escherichia coli* BL21: LBA (ลูกศรสีเหลือง) และโคโลนีของ *Escherichia coli* BL21: mCherry (ลูกศรสีชมพู)

เมื่อได้โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจึงนับจำนวนโคโลนีชุดควบคุม (mCherry สีชมพู) เทียบกับจำนวนโคโลนีของ *E. coli* สายพันธุ์ลูกผสมที่ผลิตโปรตีนฮีม (สีขาวเหลือง) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย t-test เพื่อประเมินความแตกต่างทาง fitness ระหว่างคู่เทียบ (ตารางที่ 15) ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ (T_d) ของเชื้อที่ทดสอบ โดยเห็นได้ชัดว่า *E. coli* BL21: Mb มี fitness ที่ลดลง ทั้งนี้อาจมาจากการที่แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตโปรตีน myoglobin ได้ในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับ protein content ในเซลล์ (ภาพที่ 14)

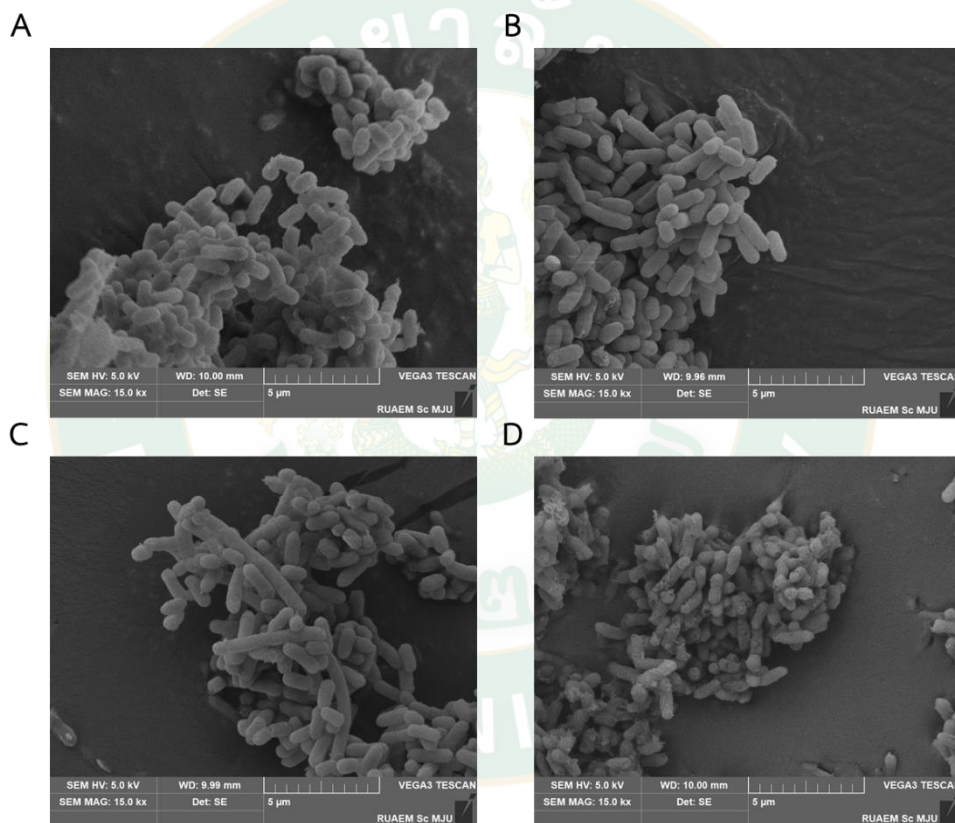
ตารางที่ 14: จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ถูกผสมเทียบกับชุดควบคุม (mCherry)

Time points	Samples	(mCherry control)	(heme protein-expressing cells)	T-test (2-tailed, pair)
		red colonies (avg CFU)	white colonies (avg CFU)	
initial (t = 0)	<i>E. coli</i> BL21: <i>Mb</i>	131.44	109.78	0.159
3 hours	<i>E. coli</i> BL21: <i>Mb</i>	181.56	122.22	0.029
initial (t = 0)	<i>E. coli</i> BL21: <i>LBA</i>	162.00	195.89	0.087
3 hours	<i>E. coli</i> BL21: <i>LBA</i>	271.89	227.67	0.270

Two-tailed, pair t-test คำนวณจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง (biological triplicates) และแต่ละครั้งด้วย 3 ซ้ำทางเทคนิค (3 technological triplicates) การนับโคโลนีใช้ทั้งวิธีนับเองและใช้ซอฟต์แวร์ (VisionWorks LS, Germany) ผสมผสานกัน

7. การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM)

เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียโปรตีนลูกผสมส่องดูลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเซลล์มีลักษณะทางกายภาพที่คล้ายคลึงกันระหว่างแบคทีเรียพันธุ์ดั้งเดิมและแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด แต่ในกรณีของเซลล์ที่มีการผลิตโปรตีนไมโอโกลบินนั้น มีลักษณะผนังเซลล์ที่มีลักษณะที่แตกต่างจากเซลล์กลุ่มอื่นที่ได้รับพลาสมิดที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 16: ภาพเซลล์ *E. coli* ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 15,000 เท่า (A) *E. coli* BL21 (wild type); (B) *E. coli* BL21 *mCherry*; (C) *E. coli* BL21 LBA (D) *E. coli* BL21 *Mb*) ผ่านการทำแห้งด้วยเอทานอล (ethanol series dehydration)

8. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนฮีโมใน *Escherichia coli*

ในลำดับสุดท้าย เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนฮีโม และศึกษาการใช้แลคโทสเป็นสารเหนี่ยวนำแทนการใช้ IPTG ที่มีรายงานว่าอาจเป็นพิษต่อเซลล์และผู้ปฏิบัติงานหรือผู้บริโภคได้

จากการทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนพบว่าเมื่อดูผลกระทบของปัจจัยต่างๆต่อการตอบสนองโดยมีปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG (X_1) ระยะเวลาหลังจากการเหนี่ยวนำ (X_2) และ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (X_3) เพื่อดูการตอบสนอง 3 การตอบสนอง ได้แก่ ปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด (total protein) (R1) ปริมาณโปรตีนที่สนใจเมื่อเทียบกับอัตราส่วนของโปรตีนทั้งหมด (R2) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากการทำการเหนี่ยวนำด้วยแลคโทส (R3)

ตารางที่ 17 ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในผลิตโปรตีน leghemoglobin แสดงให้เห็นถึงแบบแผนการทดลองหลังรันด้วยโปรแกรม design expert ได้แผนการทดลองทั้งหมด 17 รัน การทำซ้ำระดับกลาง 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารแลคโทส อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง และระยะเวลาเก็บหลังทำการเหนี่ยวนำ และตัวแปรตอบสนอง 3 ตัว ได้แก่ ปริมาณโปรตีนรวม ปริมาณโปรตีนที่สนใจ และความหนาแน่นของเซลล์หลังการเหนี่ยวนำ พบว่าในช่วงสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ศึกษาจะให้ ปริมาณโปรตีนรวม โปรตีนที่สนใจ และปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตมากที่สุดคือ 1062.546 $\mu\text{g/mL}$ 34.3494 $\mu\text{g/mL}$ และ 6.10×10^{10} CFU/mL ตามลำดับ

ตารางที่ 15: ผลการตอบสนองโปรตีน leghemoglobin (LBA)

Run	ปัจจัย			R1 ปริมาณ โปรตีนรวม ($\mu\text{g/mL}$)	R2 ปริมาณ โปรตีนที่ สนใจ 24 kDa ($\mu\text{g/mL}$)	R3 จำนวนเซลล์ ที่มีชีวิต หลังจาก เหนี่ยวนำ การ แสดงออก CFU/mL
	ความ เข้มข้นของ แลคโทส (mM) X1	อุณหภูมิที่ใช้ ในการเลี้ยง แบคทีเรีย ($^{\circ}\text{C}$) X2	เวลาหลัง ใส่สาร เหนี่ยวนำ (ชั่วโมง) X3			
1	0.1	37	14	324.0846	23.1421	2.50E+08
2	0.1	30	4	312.5462	4.799291	6.10E+10
3	0.55	23	24	562.5462	11.55461	5.80E+08
4	0.55	37	24	589.4692	2.120552	7.00E+07
5	0.1	23	14	843.3154	12.45086	5.40E+08
6	1	37	14	297.1615	11.77811	2.10E+08
7	0.55	30	14	281.7769	19.51899	1.50E+08
8	0.1	30	24	427.9308	16.94199	3.00E+08
9	0.55	30	14	327.9308	22.87068	2.20E+08
10	1	23	14	643.3154	12.43558	6.20E+08
11	0.55	23	4	608.7	12.32134	1.12E+10
12	0.55	30	14	1062.546	9.411356	1.90E+08
13	0.55	30	14	339.4692	20.62043	2.30E+08
14	0.55	37	4	320.2385	34.3494	1.41E+08
15	1	30	24	712.5462	12.63076	9.00E+07
16	0.55	30	14	424.0846	28.29624	1.00E+08
17	1	30	4	547.1615	21.01756	1.35E+10

ตารางที่ 16: ผลกระทบของตัวแปรอิสระ

Independence (ตัวแปรอิสระ)	Effect (ผลกระทบ)			p-value		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
A: ปริมาณแลคโทส	2958.58	108.86	2.841E+20	0.3679	0.0804	0.1595
B: อุณหภูมิ	24881.66	35.00	1.882E+19	0.0269	0.2848	0.6975
C: เวลาในการ เหนี่ยวนำ	69593.20	15.06	8.989E+20	0.0023	0.4723	0.0265
AB	76686.39	59.66	3.600E+15	0.0018	0.1743	0.9957
AC	946.75	12.97	5.591E+20	0.6030	0.5036	0.0630
BC	15147.93	11.93	2.782E+19	0.0659	0.5207	0.6374
A ²	157.12	-0.9965	7.976E+09	0.0007	0.7009	0.1702
B ²	41.73	0.3752	-7.749E+09	0.1735	0.8845	0.1811
C ²	-2.50	-1.84	1.057E+10	0.9302	0.4832	0.0825

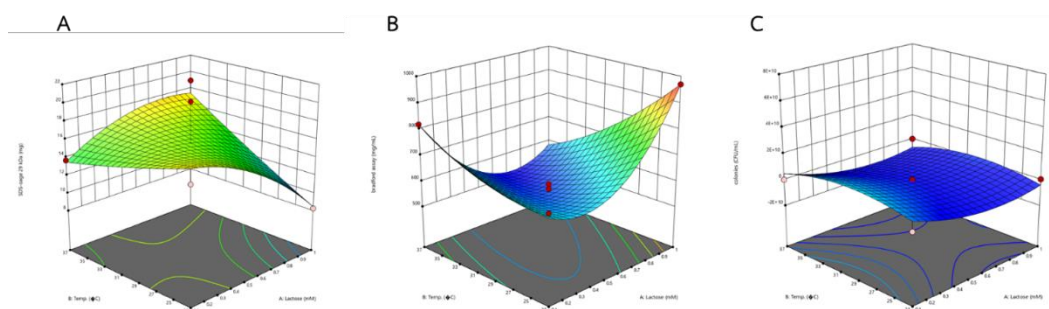
*Statistically significant at 95% of confidence level

ตารางที่ 17:ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของตัวแปรอิสระต่อการตอบสนอง ของความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด สัดส่วนของโปรตีน leghemoglobin และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออก

factors	Sum of square				Mean square				f-value			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Model	3.050E+05	263.04	109.59	2.758E+21	33890.81	29.23	12.18	3.064E+20	10.61	1.12	1.5	2.67
Residue	22356.51	182.70	54.29	8.025E+20	3193.79	26.10	7.7	1.146E+20				
Lack of fit	20184.91	47.22	27.26	8.025E+20	6728.30	15.74	9.0	2.675E+20	12.39	0.46	1.3	93208.00
Pure error	2171.60	135.48	27.02	1.148E+16	542.90	33.87	6.7	2.870E+15				
Total	3.274E+05	445.73	163.87	3.560E+21								
R ²	0.9317	0.5901	0.6687	0.7746								
Adjusted R ²	0.8439	0.0631	0.2428	0.4847								
Predicted R ²	0.0031	1.169	1.9196	-2.6068								
Adeq Precision	10.8923	3.8542	4.2793	6.7960								

ในการหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน Leghemoglobin จากการนำผลการทดลองมารันด้วยโปรแกรม Design expert version 13 พบว่าโมเดลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการอธิบายผลของค่าตัวแปรตอบสนองทั้ง 3 ตัวแปร ที่โปรแกรมให้ใช้คือแบบ Quadratic เมื่อพิจารณาว่า R² ที่บ่งบอกถึงปริมาณค่า error ระหว่างผลการทดลองที่ได้กับค่าโมเดลที่โปรแกรมได้ทำนายไว้ โดยการทดลองนี้ค่า R² ของปริมาณโปรตีนรวม ปริมาณโปรตีนที่สนใจ และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกเท่ากับ 0.9317 0.5901 0.6687 และ 0.7746 ตามลำดับ ค่า Adjusted R² จะให้คำนิยามถึงตัวแปรที่มีความสำคัญต่อโมเดล โดยทั่วไปแล้วจะต้องมีค่าต่ำกว่าค่า R² และถ้าในกรณีที่ค่าต่างจากค่า R² มากจะหมายความว่า มีตัวแปรที่มีผลต่อโมเดลน้อยหรือไม่ได้มีความสำคัญต่อโมเดล ซึ่งในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 0.8439 0.0631 0.2428 และ 0.4847 ตามลำดับ เช่นเดียวกับค่า predict R² หากมีค่านั้นมีความแตกต่างกับค่า R² และ adjusted R² มากจะหมายความว่าตัวแปรนั้นส่งผลต่อโมเดลน้อยมาก ซึ่งจากค่าทดลองพบว่าค่า predict R² มีค่าเท่ากับ 0.0031 -1.169 -

1.9196 และ -2.6068 ตามลำดับ พบว่าค่าของ predict R^2 มีความแตกต่างกับค่า R^2 และ Adjusted R^2 มากแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันเป็นอย่างมาก และค่า Adeg precision เป็นค่าที่ทำอัตราส่วนของค่าทำนายต่อค่าเฉลี่ยที่ทำนายผิดพลาด ในการทดลองนี้ได้ค่าเท่ากับ 10.8923 3.8542 4.2793 และ 6.7960 ตามลำดับ และในทางสถิตินี้ ค่า model ที่ได้ควรจะเป็น significant ($p < 0.05$) และค่า lack of fit เป็น not significant ($p > 0.05$)



ภาพที่ 17: ภาพกราฟพื้นผิวการตอบสนองแบบ 3 มิติ ของการสนองต่อปัจจัยต่างๆของ *E.coli* BL21 LBA

(A) ผลของปัจจัยที่มีต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด (B) ผลของปัจจัยต่ออัตราส่วนของโปรตีน leghemoglobin ต่อโปรตีนทั้งหมด (C) ผลของปัจจัยต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วยแลคโตส

ในตารางที่ 20 ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในผลิตโปรตีน myoglobin แสดงให้เห็นถึงแบบแผนการทดลองหลังรันด้วยโปรแกรม design expert ได้แผนการทดลองทั้งหมด 17 รัน การทำซ้ำระดับกลาง 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารแลคโทส อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง และระยะเวลาเก็บหลังทำการเหนี่ยวนำ และตัวแปรตอบสนอง 3 ตัว ได้แก่ ปริมาณโปรตีนรวม ปริมาณโปรตีนที่สนใจ และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออก พบว่าในช่วงสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ศึกษาจะให้ ปริมาณโปรตีนรวม โปรตีนที่สนใจ และความหนาแน่นของเซลล์ที่มากที่สุดคือ 1204.854 $\mu\text{g/mL}$ 33.35245 $\mu\text{g/mL}$ และ 8.80×10^{11} CFU/mL ตามลำดับ

ตารางที่ 18: ผลการตอบสนองโปรตีน Myoglobin (Mb)

Run	ปัจจัย			การตอบสนอง		
	ความเข้มข้น ของแลคโทส (mM) X1	อุณหภูมิที่ใช้ใน การเลี้ยง แบคทีเรีย (°C) X2	เวลาหลังใส่ สารเหนี่ยวนำ (ชั่วโมง) X3	R1 ปริมาณ โปรตีน รวม (µg/mL)	R2 ปริมาณ โปรตีนที่ สนใจ 24 kDa (µg/mL)	R3 จำนวน เซลล์ที่มี ชีวิต หลังจาก เหนี่ยวนำ การ แสดงออก CFU/mL
1	0.1	37	14	712.5462	21.05127	2.50E+08
2	0.1	30	4	254.8538	33.35245	1.18E+11
3	0.55	23	24	777.9308	11.24779	1.40E+12
4	0.55	37	24	939.4692	11.70874	4.20E+11
5	0.1	23	14	693.3154	9.375243	1.02E+09
6	1	37	14	420.2385	23.79601	2.50E+08
7	0.55	30	14	704.8538	19.15291	2.10E+08
8	0.1	30	24	670.2385	14.92006	1.07E+12
9	0.55	30	14	1070.238	17.28587	2.10E+08
10	1	23	14	785.6231	16.22916	2.30E+08
11	0.55	23	4	497.1615	23.13131	1.26E+10
12	0.55	30	14	558.7	25.05817	2.00E+08
13	0.55	30	14	916.3923	14.18606	1.80E+08
14	0.55	37	4	1204.854	12.65714	9.60E+10
15	1	30	24	720.2385	17.00826	8.80E+11
16	0.55	30	14	774.0846	18.08588	2.20E+08
17	1	30	4	547.1615	21.01756	1.02E+11

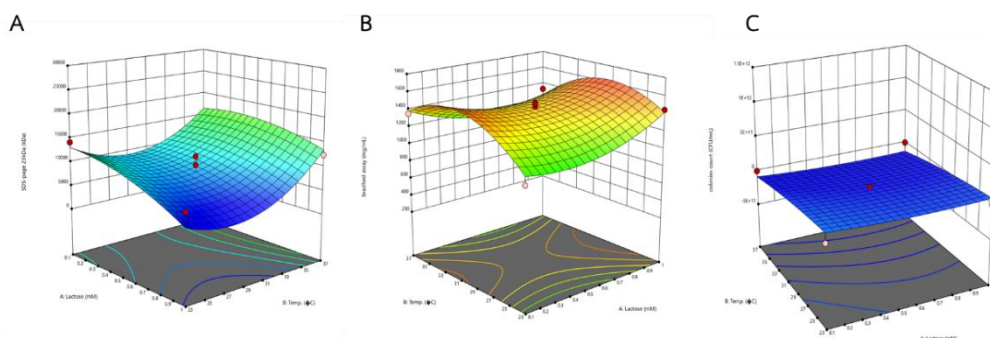
ตารางที่ 19: ผลกระทบของตัวแปรอิสระ ได้แก่ ความเข้มข้นของแลคโตส (X1) ระยะเวลาหลังจากการเหนี่ยวนำ (X2) และ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (X3) ต่อความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด สัดส่วนของโปรตีน leghemoglobin และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออก

factors	Sum of square			Mean square			f-value		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Model	2.733E+06	4.708E+08	2.994E+24	3.036E+05	5.232E+07	3.327E+23	9.36	4.43	22.05
Residue	2.271E+05	8.271E+07	1.056E+23	32443.05	1.182E+07	1.509E+22			
Lack of fit	1.695E+05	5.920E+07	1.056E+23	56505.18	1.973E+07	3.521E+22	3.92	3.3	1.531E+08
Pure error	57585.80	2.351E+07	9.200E+14	14396.45	5.878E+06	2.300E+14			
Total	2.960E+06	5.536E+08	3.100E+24						
R ²	0.9233	0.8506	0.9659						
Adjusted R ²	0.8246	0.6585	0.9221						
Predicted R ²	0.0533	-0.7774	0.4548						
Adeq	9.8698	7.8105	15.1542						
Precision									

ตารางที่ 20: ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของตัวแปรอิสระต่อการตอบสนอง ของความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด สัดส่วนของโปรตีน myoglobin และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออก

Independence	Effect (ผลกระทบ)			p-value		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
A: ปริมาณแลคโตส	39.90	-2785.73	-2.585E+10	0.5508	0.0556	0.5705
B: อุณหภูมิ	22.60	2974.78	-1.122E+11	0.7332	0.0443	0.0363
C: เวลาในการเหนี่ยวนำ	347.12	486.38	4.302E+11	0.0010	0.7009	< 0.0001
AB	-109.62	1268.06	1.975E+08	0.2630	0.4846	0.9975
AC	152.88	1266.38	-4.350E+10	0.1334	0.4852	0.5017
BC	35.58	-5489.06	-2.658E+11	0.7046	0.0152	0.0034
A ²	161.15	-1797.62	3.029E+10	0.1090	0.3188	0.6284
B ²	-302.31	5461.98	-3.006E+10	0.0108	0.0139	0.6310
C ²	-509.04	3787.68	5.120E+11	0.0007	0.0582	< 0.0001

*Statistically significant at 95% of confidence level



ภาพที่ 18: ภาพกราฟพื้นผิวการตอบสนองแบบ 3 มิติ ของการสนองต่อปัจจัยต่างๆของ *E. coli* BL21 *Mb*

(A) ผลของปัจจัยที่มีต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด (B) ผลของปัจจัยต่ออัตราส่วนของโปรตีน myoglobin ต่อโปรตีนทั้งหมด (C) ผลของปัจจัยต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออก

ในการหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน myoglobin จากการนำผลการทดลองมารันด้วยโปรแกรม Design expert version 13 พบว่าโมเดลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการอธิบายผลของค่าตัวแปรตอบสนองทั้ง 3 ตัวแปร ที่โปรแกรมให้ใช้คือแบบ Quadratic เมื่อพิจารณาค่า R^2 ที่บ่งบอกถึงปริมาณค่า error ระหว่างผลการทดลองที่ได้กับค่าโมเดลที่โปรแกรมได้ทำนายไว้ โดยการทดลองนี้ค่า R^2 ของปริมาณโปรตีนรวม ปริมาณโปรตีนที่สนใจ และความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ 0.9233 0.8506 และ 0.9659 ตามลำดับ ค่า Adjusted R^2 จะให้ค่าไปถึงตัวแปรที่มีความสำคัญต่อโมเดล โดยทั่วไปแล้วจะต้องมีค่าต่ำกว่าค่า R^2 และถ้าในกรณีที่มีค่าต่างจากค่า R^2 มากจะหมายความว่า มีตัวแปรที่มีผลต่อโมเดลน้อยหรือไม่ได้มีความสำคัญต่อโมเดล ซึ่งในการทดลองนี้มีค่า 0.8246 0.6585 และ 0.9221 ตามลำดับ เช่นเดียวกับค่า predict R^2 หากมีค่านั้นมีความแตกต่างกับค่า R^2 และ adjusted R^2 มากจะหมายความว่าตัวแปรนั้นส่งผลต่อโมเดลน้อยมาก ซึ่งจากค่าทดลองพบว่าค่า predict R^2 มีค่าเท่ากับ 0.0533 -0.7774 และ 0.4548 ตามลำดับ พบว่าค่าของ predict R^2 มีความแตกต่างกับค่า R^2 และ Adjusted R^2 มากแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันเป็นอย่างมาก และค่า Adeq precision เป็นค่าที่ทำอัตราส่วนของค่าทำนายต่อค่าเฉลี่ยที่ทำนายผิดพลาด ในการทดลองนี้ได้ค่าเท่ากับ 9.8698 7.8105 และ 15.1542 ตามลำดับ และในทางสถิตินั้น ค่า model ที่ได้ควรจะเป็น significant ($p < 0.05$) และค่า lack of fit เป็น not significant ($p > 0.05$)

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่ายีน *LBA* และ *Mb* ที่ออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถนำส่งเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* ทั้งสายพันธุ์ DH5- α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดและสายพันธุ์ BL21 เพื่อผลิตโปรตีนได้สำเร็จ การนำส่งยีนดังกล่าวนำไปสู่การแสดงออกของยีน แม้ว่าผลการประเมินการแสดงออกในระดับการถอดรหัส (transcriptional expression) ด้วยวิธีการ RT-PCR จะไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจนก็ตาม แต่ในระดับการแปลรหัส (translational expression) นั้น ปรากฏเป็นแถบโปรตีนชัดเจนตามขนาดที่คาดหวัง และแถบโปรตีนปรากฏเด่นเฉพาะในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG หรือแลกโทสเท่านั้น

การประเมินการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัสด้วยวิธี RT-PCR ในการศึกษานี้ผู้วิจัยใช้การสกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) ตามด้วยการทำปฏิกิริยาแบบ one-step RT-PCR กล่าวคือมีการทำ reverse transcription ต่อด้วยการทำ PCR ในหลอดเดียวกัน โดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นสารตั้งต้น จากงานวิจัยโดย Wacker และ Kodard (Wacker และ Godard, 2005) พบว่า two-step RT-PCR ที่เปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น complementary DNA (cDNA) ก่อน แล้วจึงทำ PCR มีประสิทธิภาพสูงกว่า ในการทำการทดลองกับอาร์เอ็นเอ นั้น ต้องคำนึงถึงความเสถียรของอาร์เอ็นเอและการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNase อยู่แล้ว (Mathay และคณะ, 2012) อีกทั้งยังพบว่าเมื่อใส่เอนไซม์ reverse transcriptase ลงไปผสมกับ DNA polymerase และมีสารตั้งต้นที่หลากหลายอาจทำให้ปฏิกิริยาไม่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด จึงทำให้การประเมินการแสดงออกของยีนได้ไม่ดีเท่าการวัดปริมาณโปรตีนด้วย SDS-PAGE

ในการทำ SDS-PAGE ผู้วิจัยอาศัยขนาดของโปรตีนฮิมที่จำเพาะในการบ่งชี้แถบของโปรตีนฮิมที่ผลิตในการศึกษา อีกทั้งยังอาศัยการที่แบคทีเรีย *E. coli* ไม่มียีนที่ผลิตโปรตีนฮิมตามธรรมชาติ จึงใช้ differential expression ในสภาวะที่เหนี่ยวนำ และไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG ในการระบุโปรตีนฮิมได้ ทั้งเลกฮิมโกลบินและไมโอโกลบิน ซึ่งมีขนาด 24 kDa และ 18 kDa ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ยังไม่ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากฉลากฮิสทีดีน (Hisx6 tag) เท่าที่ควร โดยศึกษาเพียงการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลคอลัมน์ในเบื้องต้นเท่านั้น แต่ยังไม่ได้ออกผล % yield ตลอดจนการระบุโปรตีนที่จำเพาะเจาะจงด้วย Western blotting ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์จาก anti-Hisx6 tag antibody ได้ (Zentgraf และคณะ, 1995) เป็นต้น

เมื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีนฮิมใน *E. coli* ได้สำเร็จแล้ว ผู้วิจัยจึงศึกษาผลของการผลิตโปรตีนต่อลักษณะทางกายภาพและการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ลูกผสม (recombinant strains) ในการศึกษาอัตราการแบ่งตัว (doubling time) พบว่าการแสดงออกของโปรตีน ไมโอโกลบินด้วยเวกเตอร์พลาสมิด pET151 ส่งผลให้เซลล์ *E. coli* BL21 เจริญช้าลง โดยมีระยะการแบ่งเซลล์ที่ยาวขึ้นใกล้เคียงสองเท่า (doubling time เพิ่มขึ้นจาก ~35 เป็น 67 นาที) ผลการศึกษาดังกล่าวนี้สอดคล้อง

กับผลจากการประเมิน fitness ด้วย competition assay ซึ่งในการศึกษานี้ ผู้วิจัยใช้ *E. coli::mCherry* ที่ผลิตโปรตีนเรืองแสงสีแดงเป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อให้สามารถจำแนกเซลล์/โคโลนี จากสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนฮีม (ไม่เรืองแสง) ได้ จากงานวิจัยโดย van Zyl และคณะ พบว่าการผลิตโปรตีน mCherry ไม่กระทบต่อการเจริญของ *E. coli* และ *Lactobacillus* sp. (van Zyl และคณะ, 2015)

อย่างไรก็ดี *E. coli* สายพันธุ์ลูกผสมที่ผลิตเลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin) นั้น มี doubling time เทียบเท่ากับ wild type (*E. coli* BL21) และสายพันธุ์อ้างอิง *E. coli::mCherry* และการแสดงออกของโปรตีนฮีม นั้นไม่ได้ทำให้ลักษณะทางกายภาพของเซลล์แตกต่างจากเซลล์ดั้งเดิมสังเกตได้จากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จึงเป็นข้อสังเกตที่น่าสนใจว่าการผลิตโปรตีนฮีมไม่โอโกลบิน ทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยาของเซลล์แตกต่างจากเลกฮีโมโกลบินซึ่งเป็นโปรตีนฮีมเช่นกัน และมีขนาดใกล้เคียงกันกับไม่โอโกลบิน ผู้วิจัยคาดว่าอาจมาจากการใช้พลาสมิดต่างชนิดกัน ได้แก่ pET151 และ pBR322 อย่างไรก็ตามทั้งสองพลาสมิดมีการใช้กันอย่างแพร่หลายใน *E. coli* (Karki, 2012) ปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจเป็นไปได้ คือ ความเป็นพิษของโปรตีนต่อเซลล์เจ้าบ้าน (protein toxicity) และการใช้ทรัพยากรในการผลิตโปรตีนฮีมแทนการผลิตชีวมวลของ *E. coli::Mb* ซึ่งควรมีการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตโปรตีนต่อไปหากต้องการนำไปใช้ประโยชน์

จากการศึกษาผลกระทบของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง *E. coli* BL21 ที่มีการผลิตโปรตีนฮีม เลกฮีโมโกลบินและไม่โอโกลบิน โดยการศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำแลกโทส (0.1-1 mM) ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน (4-24 ชั่วโมง) และอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ (23-37°C) พบว่าปัจจัยเหล่านี้แทบไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีนฮีมทั้งสองในปริมาณมาก (protein overexpression) แต่มีระยะเวลาและอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ วัดจากการอยู่รอดของเชื้อในหน่วย CFU/mL และการผลิตโปรตีนรวม ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น จึงสรุปได้ว่า สามารถผลิตโปรตีนฮีมได้โดยใช้การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยแลกโทส 0.1 mM เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อประหยัดสารเหนี่ยวนำและเวลาในการผลิต อีกทั้งยังสามารถทำการผลิตโปรตีนฮีมได้ในอุณหภูมิห้อง (28-30°C) และควรมีการปรับการทดลอง คือ ปรับช่วงการทดลองในปัจจัยต่าง ๆ เพื่อให้ครอบคลุมช่วงที่สามารถเห็นผลการทำ protein overexpression ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญได้

ข้อเสนอแนะ

ในการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม จำเป็นต้องทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งโปรตีนที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular proteins) จะสามารถเก็บเกี่ยวได้ง่ายกว่าโปรตีนที่ผลิตในเซลล์ (intracellular proteins) ที่ต้องอาศัยการทำ cell lysis

ในการผลิตโปรตีนเพื่อให้เซลล์ส่งออกสู่ภายนอกเซลล์ (secretion) สามารถทำได้โดยเทคนิคต่าง ๆ เช่น การเติมลำดับกรดอะมิโนที่เป็นสัญญาณสำหรับการส่งออกโปรตีนไปยัง extracellular space (Schierle et al., 2003) เพื่อความสะดวกในการเก็บเกี่ยวโปรตีน เช่น ลำดับกรดอะมิโนของ PelB และ DsbA เป็นต้น (Kulmala และคณะ, 2022)

นอกจากนี้อาจนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม generally recognized as safe (GRAS) เช่น *Bacillus* sp. และ *Lactobacillus* spp. โดยจะต้องมีการปรับการใช้โคดอน และการใช้พลาสมิดเวกเตอร์ที่เหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้านต่อไป

ในการนำโปรตีนฮีโมไปใช้ประโยชน์ ควรศึกษาสภาวะที่โปรตีนสามารถตรึงฮีโมและหรือธาตุเหล็กไว้ในโมเลกุลได้ ทั้งนี้ ควรมีการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และอาจมีการศึกษาการส่งถ่ายและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮีโมเพิ่มเติมด้วย เช่น ALAS (ALA synthase) (Chiabrando และคณะ, 2014) *cyoE* (heme o synthase) (Geng และคณะ, 2022) และ *ctaA* (heme a synthase) (Svensson และ Hederstedt, 1994) เป็นต้น

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

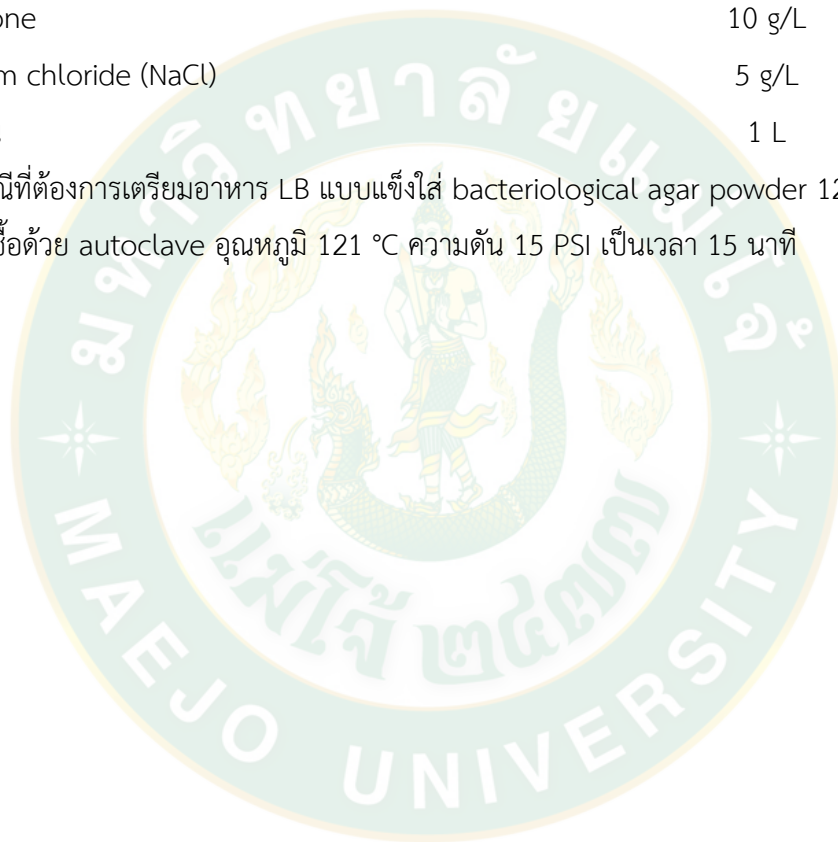
อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Luria-Bertani (LB) broth (สูตรลดปริมาณ NaCl 50%)

Yeast extract	5 g/L
Tryptone	10 g/L
Sodium chloride (NaCl)	5 g/L
น้ำกลั่น	1 L

*ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหาร LB แบบแข็งใส่ bacteriological agar powder 12 g/น้ำ 1 L
 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 PSI เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข
 ปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และ RT-PCR

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR

2x Taq master mix (Vivantis, Malaysia)

Reagents	Volume (μL)
2x Taq master mix	6.25
forward primer (10 μM)	0.6
reverse primer (10 μM)	0.6
molecular-grade water	3.5
DNA template	2 หรือตามความเข้มข้น ปรับให้เป็น 12.5 μL ด้วยน้ำ

Taq PCR master mix (QIAGEN, USA)

Reagents	Volume (μL)
10x buffer	1.25
2 mM dNTP	0.25
forward primer (10 μM)	0.5
reverse primer (10 μM)	0.5
molecular-grade water	7.9
Taq DNA polymerase	0.06
DNA template	2 หรือตามความเข้มข้น
รวม	ปรับให้เป็น 12.5 μL ด้วยน้ำ

SensiFAST SYBR one-step mix (Bioline, UK)

Reagents	Volume (μL)
2x sensiFAST mix	10
Forward primer (10 μM)	0.8
Reverse primer (10 μM)	0.8
Reverse transcriptase	0.2
H ₂ O (DEPC-treated)	3.8
RNA Template	4
รวม	20

สถานะในการทำ PCR ด้วยเครื่อง thermal cycler**สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *LBA***

	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (นาที:วินาที)
Initial Denaturation	95	5:00
Denaturation	95	0:30
Annealing	57	0:35
Extension	72	0:45
Final extension	72	7:00

สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *Mb*

	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที:วินาที)
Initial Denaturation	95	2:00
Denaturation	95	0:24
Annealing	65	0:35
Extension	72	0:45
Final extension	72	7:00

สถานะในการทำ RT-PCR

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *LBA* และ *Mb* ในระดับการถอดรหัส

	scan	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที:วินาที)	goto	loop
Reverse transcription		45	10:00		
Denaturation		95	2:00		
Annealing		95	0:05		
Extension		57	0:30	3	39
Final extension	*	72	7:00		
Melting curve	*	Melting curve 60 °C ถึง 95 °C 15 วินาที ด้วย ΔT 1 °C			

ภาคผนวก ค

ปฏิกิริยา restriction digestion และ ligation

ปฏิกิริยา Restriction digestion สำหรับตัด พลาสมิด pBR322

Reagents	Volume (μL)
DNA template	6
Buffer V5	12
<i>Xho</i> I	0.5
<i>Nde</i> I	0.5
Molecular grade water	105.5
รวม	120

ปฏิกิริยา ligation สำหรับเชื่อมพลาสมิด pBR322

Reagents	Volume (μL)
Molecular grade water	6
10x buffer (T4 DNA ligase)	3
Restriction digestion Product	20
T4 DNA Ligase	1
รวม	30

ภาคผนวก ง
บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง

บัฟเฟอร์สำหรับ gel electrophoresis

10 TAE buffer 10X (stock solution)

Tris-base (tris(hydroxymethyl)aminomethane)	48.4 g
glacial acetic acid	11.4 mL
EDTA	3.7 g
น้ำกลั่น	988 mL

บัฟเฟอร์และสารละลายที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE

Protein lysis buffer

50 mM KH_2PO_4	15 mL
300 mM KCl	15 mL
10 mM imidazole	150 μL
น้ำกลั่น	120 mL
รวม	150 mL

*ก่อนใช้เติม 1M DTT 150 μL

Laemmli sample buffer (2X)

10% (w/v) SDS	4 mL
glycerol	2 mL
1 M Tris-Cl (pH 6.8)	1.2 mL
molecular-grade water	2.8 mL
bromophenol blue	0.02% (w/v)

10x SDS-PAGE Running Buffer

Tris-base	30.3 g
glycine	144 g
SDS	10 g
น้ำกลั่น/molecular-grade water	1,000 mL

Coomassie staining buffer

Coomassie blue	0.1% (w/v)
methanol	40% (w/v)
acetic acid glacial	10% (w/v)
น้ำกลั่น/molecular-grade water	50% (w/v)

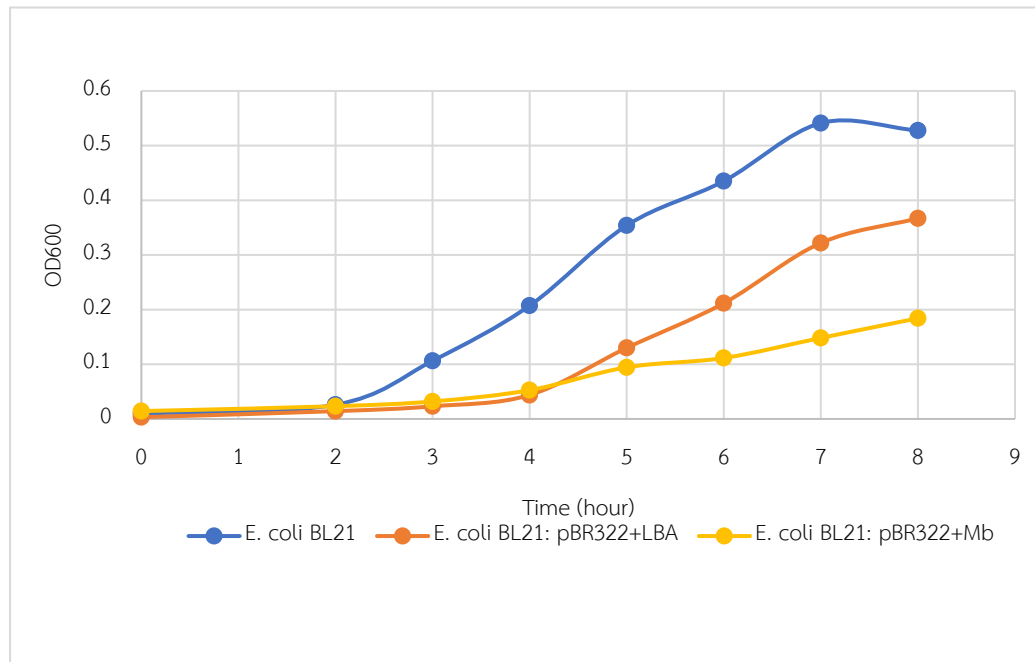
Distaining solution

ethanol	300 mL
glacial acetic acid	100 mL
น้ำกลั่น/molecular-grade water	600 mL
รวม	1,000 mL

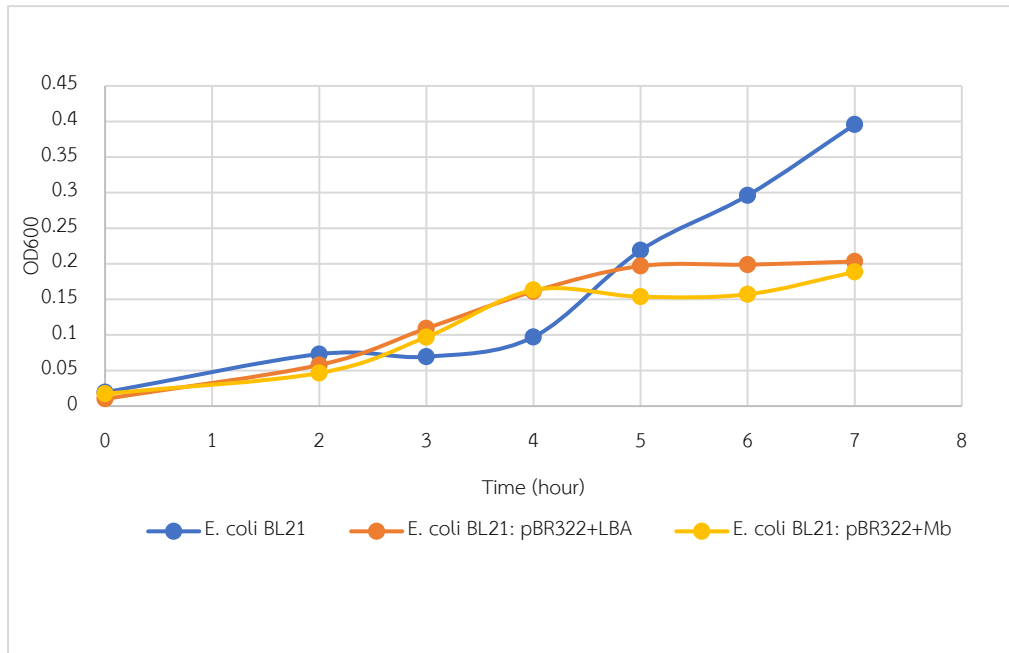


ภาคผนวก จ

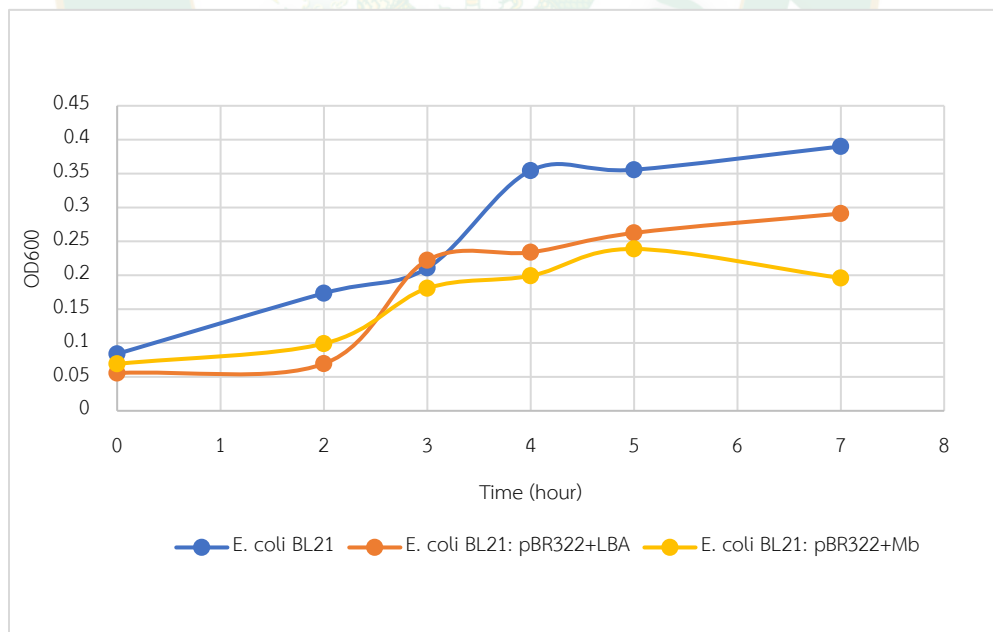
ผลการเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดในอาหารที่เสริม FO growth supplement



ภาพที่ 19: กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหาร LB broth และทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่วัดด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀)



ภาพที่ 20: กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหาร LB broth ที่มีส่วนผสมของ 0.1% FO growth supplement และเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่วัดด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD600)



ภาพที่ 21: กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหาร LB broth ที่มีส่วนผสมของ 0.5% FO growth supplement และเหนี่ยวนำด้วย IPTG

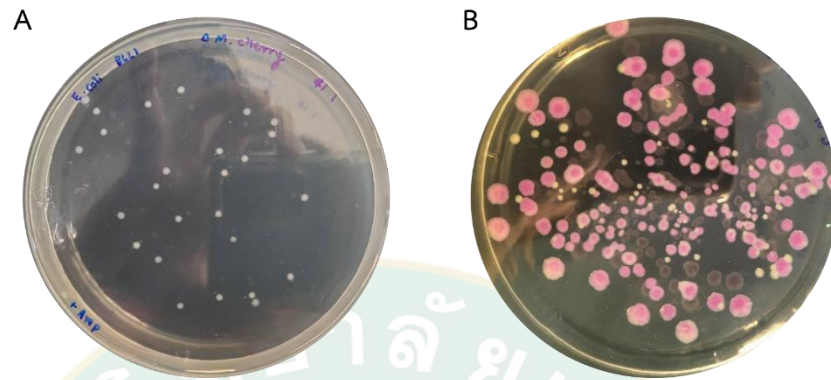
ภาคผนวก ฉ

การสร้างสายพันธุ์อ้างอิง *E.coli* BL21:mCherryการส่งถ่ายยีน mCherry เข้าสู่เจ้าบ้าน *Escherichia coli*

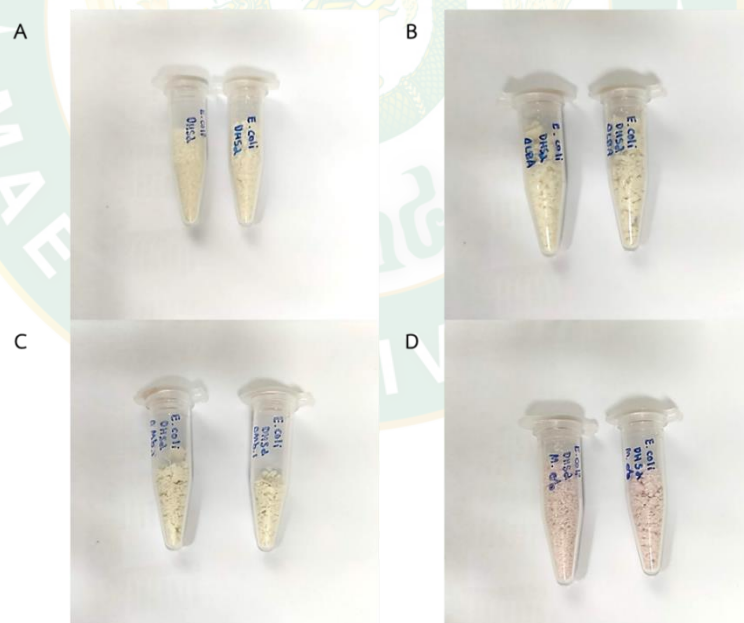
เพื่อเป็นการสร้างแบคทีเรียที่เป็นชุดควบคุมในการประเมินความเหมาะสม (fitness) ของแบคทีเรียที่ผ่านการทำพันธุวิศวกรรม โดยใช้ประโยชน์จาก mCherry โปรตีนที่มีการให้สีเป็นตัวจำแนกระหว่างสายพันธุ์

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 และ *E. coli* DH5 ใน LB ชนิดเหลวข้ามคืน และนำมา subculture ที่อุณหภูมิ 37°C อีกครั้งก่อนนำมาใช้งาน โดยทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยหลอด 1.5 mL microcentrifuge tube กำจัดส่วนใสทิ้งและเติมสารละลาย 0.1 M CaCl₂ ปริมาณ 50 µL นำไปปั่นเหวี่ยง (benchtop centrifuge, maximum speed, 1 min) กำจัดส่วนใสทิ้ง และเติม CaCl₂ ความเข้มข้น ปริมาตร 50 µL อีกครั้ง ผสมให้เข้ากันกับเซลล์ (resuspend) เติมพลาสติกลงในหลอด และนำไปบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที และนำหลอดไป heat-shock ที่อุณหภูมิ 42 °C เซลล์แช่ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาแล้วนำหลอดลงไปบ่มต่อในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหาร LB แบบเหลวลงในหลอดปริมาณ 1 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้บ่มเป็นเวลา 60 นาทีและนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าอุณหภูมิเป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลานำมาเกลี่ยบนอาหาร LB แบบแข็ง ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลลิน (100 µg/mL)

ผลการส่งถ่ายพลาสมิด mCherry เข้าสู่ *Escherichia coli* BL21



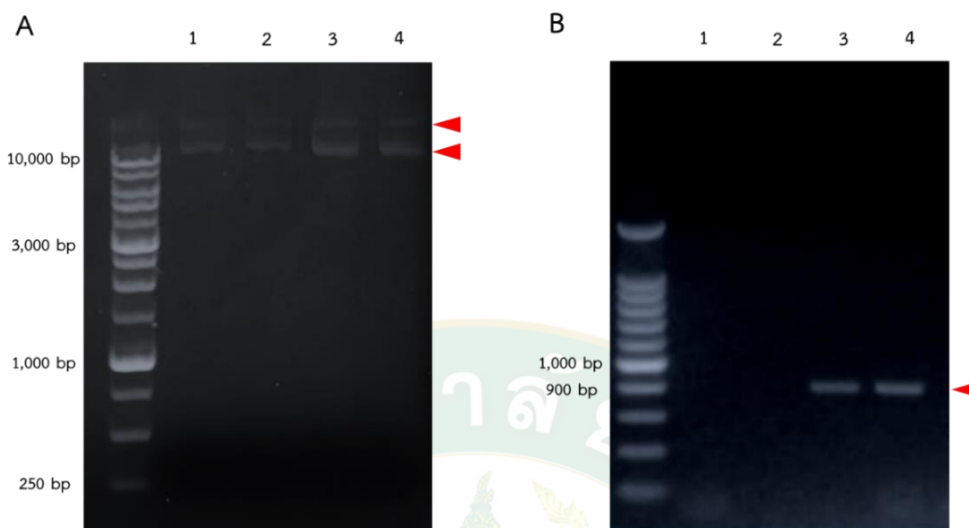
ภาพที่ 22: (A) แบคทีเรียที่ผ่านการ transformation ด้วยพลาสมิดจาก *Escherichia coli* DH5 α pBR322 *bla::mCherry* มีความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีแอมพิซิลลิน (B) โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง เมื่อผ่านไปประมาณ 2 วัน



ภาพที่ 23: ลักษณะของผงแห้งที่ผ่านการทำแห้งแบบแห้งเยือกแข็งโดยเครื่อง freeze dryer

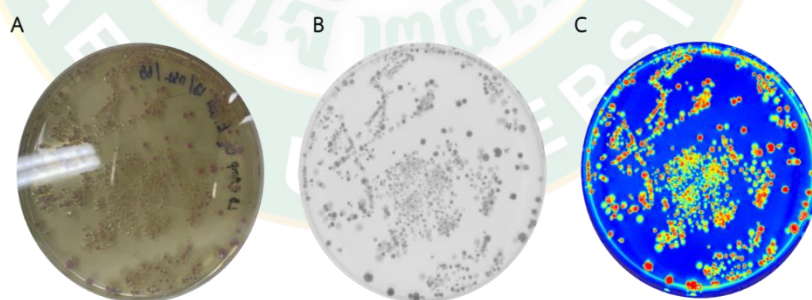
(A) เซลล์ของเซลล์ wild type (B) ผงของเซลล์ของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ผลิตโปรตีน LBA (C) ผงของเซลล์ของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ผลิตโปรตีน myoglobin (D) ผงของเซลล์ของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ผลิตโปรตีน mCherry (โดยผงของเซลล์ที่ผลิตโปรตีน mCherry นั้นจะมีลักษณะเป็นสีชมพู)

ผลจากการตรวจสอบ ยีน mCherry จากเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli*



ภาพที่ 24: (A) ผลการสกัดพลาสมิด mCherry จาก DH5 α :bla:mCherry (B) ภาพผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน mCherry 771 base pair

การเรืองแสงของโปรตีน mCherry และผลจากการถ่ายภาพได้ระบบ gel documentation system



ภาพที่ 25: ลักษณะของโคโลนี *E. coli* BL21: mCherry

(A) ภาพของโคโลนีภายใต้แสงธรรมชาติ (โคโลนีสีแดง *E. coli* BL21: mCherry โคโลนีสีเหลือง *E. coli* BL21 ชุดทดสอบ) (B) ภาพของโคโลนีภายใต้แสง UV ที่มีฟิลเตอร์ (โคโลนีสีดำ *E. coli* BL21: mCherry โคโลนีสีเทา *E. coli* BL21 ชุดทดสอบ) (C) ภาพของโคโลนีภายใต้ fluorescence และภาพของโคโลนีเมื่อนำมาปรับสีภาพด้วย rainbow mode ในโปรแกรม ImageQuant TL (โคโลนีสีแดง *E. coli* BL21: mCherry โคโลนีสีเขียว *E. coli* BL21 ชุดทดสอบ)

บรรณานุกรม

- Appleby, Cyril A. 1984. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. **Annual Review of Plant Physiology**,35(1), 443-478.
- Atkinson, Anthony Curtis และDonev, Alexander N. 1992. **Optimum experimental designs**. Clarendon Press.
- Bos, Lute. 2000. 100 years of virology: from vitalism via molecular biology to genetic engineering. **Trends in Microbiology**,8(2), 82-87.
- Brunelle, Julie L และGreen, Rachel. (2014). Coomassie blue staining. In **Methods in enzymology** (Vol. 541, pp. 161-167): Elsevier.
- Carlsson, Magnus LR, Kanagarajan, Selvaraju, Bülow, Leif และZhu, Li-Hua. 2020. Plant based production of myoglobin-a novel source of the muscle heme-protein. **Scientific reports**,10(1), 1-10.
- Chiabrando, Deborah, Mercurio, Sonia และTolosano, Emanuela. 2014. Heme and erythropoiesis: more than a structural role. **haematologica**,99(6), 973.
- Chin, Ju Xin, Chung, Bevan Kai-Sheng และLee, Dong-Yup. 2014. Codon Optimization OnLine (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design. **Bioinformatics**,30(15), 2210-2212.
- Choi, Jong Hyun, Keum, Ki Chang และLee, Sang Yup. 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli. **Chemical engineering science**,61(3), 876-885.
- Corrales-García, Ligia Luz, Serrano-Carreón, Leobardo และCorzo, Gerardo. 2020. Improving the heterologous expression of human β -defensin 2 (HBD2) using an experimental design. **Protein expression and purification**,167(105539).
- CUTRUZZOLÀ, Francesca, ALLOCATELLI, Carlo TRAVAGLINI, BRANCACCIO, Andrea และ BRUNORI, Maurizio. 1996. Aplysia limacina myoglobin cDNA cloning: an alternative mechanism of oxygen stabilization as studied by active-site mutagenesis. **Biochemical Journal**,314(1), 83-90.
- Davis, M Wayne และJorgensen, Erik M. 2022. ApE, a plasmid editor: a freely available DNA manipulation and visualization program. **Frontiers in**

Bioinformatics,2(8)18619.

- Dmowski, Michal และ Jagura-Burdzy, Grazyna. 2013. Active stable maintenance functions in low copy-number plasmids of Gram-positive bacteria I. Partition systems. **Polish journal of microbiology**,62(1), 3-16.
- Gagnon, Kenneth. 2009. Measuring Electroneutral Chloride-dependent Ion Fluxes in Mammalian Cells and in Heterologous Expression Systems. **Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System: From Molecules to Diseases**149.
- Geng, Zhexian, Ge, Jinxia, Cui, Wei, Zhou, Hui, Deng, Jieying และ Xu, Baocai. 2022. Efficient De Novo Biosynthesis of Heme by Membrane Engineering in Escherichia coli. **International Journal of Molecular Sciences**,23(24), 15524.
- Goeddel, David V, Kleid, Dennis G, Bolivar, Francisco, Heyneker, Herbert L, Yansura, Daniel G, Crea, Roberto, Hirose, Tadaaki, Kraszewski, Adam, Itakura, Keiichi และ Riggs, Arthur D. 1979. Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,76(1), 106-110.
- Gomes, Amitha Reena, Byregowda, Sonnahallipura Munivenkatappa, Veeregowda, Belamaranahally Muniveerappa และ Balamurugan, Vinayagamurthy. 2016. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins.
- Jin, Yuan, He, Xiaoyun, Andoh-Kumi, Kwame, Fraser, Rachel Z, Lu, Mei และ Goodman, Richard E. 2018. Evaluating potential risks of food allergy and toxicity of soy leghemoglobin expressed in Pichia pastoris. **Molecular nutrition & food research**,62(1), 1700297.
- Kanjanawattana, Sasiprapa. 2010. **The expression and detection of rice sfr2 in escherichia coli and pichia pastoris**. School of Biotechnology Institute of Agricultural Technology Suranaree
- Karki, Pralav. 2012. **Recombinant expression of transglutaminase from Atlantic cod in E. coli**. University of Stavanger, Norway.
- Karlsson, Jan-Olof, Ostwald, Klas, Kabjorn, Christina และ Andersson, Madeleine. 1994. A

- method for protein assay in Laemmli buffer. **Analytical biochemistry**,219(1), 144-146.
- Kendrew, J, Dickerson, R, Strandberg, B และ Hart, R. 1997. Structure of myoglobin. **Science Is Not a Quiet Life: Unravelling the Atomic Mechanism of Haemoglobin**,4(169-175.
- Ko, Young Jin, Kim, Minhye, You, Seung Kyou, Shin, Sang Kyu, Chang, Joonhee, Choi, Hae Jin, Jeong, Wu-Young, Lee, Myeong-Eun, Hwang, Dong-Hyeok และ Han, Sung Ok. 2021. Animal-free heme production for artificial meat in *Corynebacterium glutamicum* via systems metabolic and membrane engineering. **Metabolic engineering**,66(217-228.
- Kongkachuichai, R, Napatthalung, P และ Charoensiri, R. 2002. Heme and nonheme iron content of animal products commonly consumed in Thailand. **Journal of Food Composition and Analysis**,15(4), 389-398.
- Kontoghiorghes, Christina N, Kolnagou, Annita และ Kontoghiorghes, George J. 2015. Phytochelators intended for clinical use in iron overload, other diseases of iron imbalance and free radical pathology. **Molecules**,20(11), 20841-20872.
- Kulmala, Antti, Lappalainen, Matias, Lamminmaki, Urpo และ Huovinen, Tuomas. 2022. Synonymous Codons and Hydrophobicity Optimization of Post-translational Signal Peptide PelB Increase Phage Display Efficiency of DARPins. **ACS Synthetic Biology**,11(10), 3174-3181.
- Kurland, Charles และ Gallant, Jonathan. 1996. Errors of heterologous protein expression. **Current opinion in biotechnology**,7(5), 489-493.
- Liu, Xiaoliu, Zhu, Ping, Jiang, Ruifan, Wu, Lingtian, Feng, Xiaohai, Li, Sha และ Xu, Hong. 2017. Enhancement of welan gum production in *Sphingomonas* sp. HT-1 via heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. **Carbohydrate polymers**,156(135-142.
- Mathay, Conny, Yan, Wusheng, Chuaqui, Rodrigo, Skubitz, Amy PN, Jeon, Jae-Pil, Fall, Ndate, Betsou, Fay และ Barnes, Michael. 2012. Short-term stability study of RNA at room temperature. **Biopreservation and biobanking**,10(6), 532-542.
- McAleer, William J, Buynak, Eugene B, Maigetter, Robert Z, Wampler, D Eugene, Miller, William J และ Hilleman, Maurice R. 1984. Human hepatitis B vaccine from

- recombinant yeast. **Nature**,307(5947), 178-180.
- McCulloch, Tyler W, MacLean, David M และKammermeier, Paul J. 2020. Comparing the performance of mScarlet-I, mRuby3, and mCherry as FRET acceptors for mNeonGreen. **PloS one**,15(2), e0219886.
- Mojsoska, Biljana, Carretero, Gustavo, Larsen, Sylvester, Mateiu, Ramona Valentina และ Jenssen, Håvard. 2017. Peptoids successfully inhibit the growth of gram negative E. coli causing substantial membrane damage. **Scientific Reports**,7(1), 42332.
- Mullis, Kary B. 1994. **The polymerase chain reaction**. Springer science & business media.
- National Science and Technology Development Agency (NSTDA). 2015. **Biosafety Guidelines for Contained Use of Genetically Modified Microorganisms at Pilot and Industrial Scales**. Bangkok: P.A. Living Printing Co.,Ltd.
- Nicholson, Wayne L, Park, Yong-Keun, Henkin, Tina M, Won, Misun, Weickert, Michael J, Gaskell, Jill A และChambliss, Glenn H. 1987. Catabolite repression-resistant mutations of the Bacillus subtilis alpha-amylase promoter affect transcription levels and are in an operator-like sequence. **Journal of molecular biology**,198(4), 609-618.
- Ostfeld, Robert J. 2017. Definition of a plant-based diet and overview of this special issue. **Journal of geriatric cardiology: JGC**,14(5), 315.
- Ponka, Prem. 1999. Cell biology of heme. **The American journal of the medical sciences**,318(4), 241-256.
- Reijnders, Lucas และSoret, Sam. 2003. Quantification of the environmental impact of different dietary protein choices. **The American Journal of Clinical Nutrition**,78(3), 664S-668S.
- Shaner, Nathan C. 2013. The mFruit collection of monomeric fluorescent proteins. **Clinical Chemistry**,59(2), 440-441.
- Shaner, Nathan C, Campbell, Robert E, Steinbach, Paul A, Giepmans, Ben NG, Palmer, Amy E และTsien, Roger Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. **Nature biotechnology**,22(12), 1567-1572.

- Shao, Youran, Xue, Changlu, Liu, Wenqian, Zuo, Siqi, Wei, Peilian, Huang, Lei, Lian, Jiazhang และ Xu, Zhinan. 2022. High-level secretory production of leghemoglobin in *Pichia pastoris* through enhanced globin expression and heme biosynthesis. **Bioresource Technology**,363(127884).
- Singh, Saumya และ Varma, Ajit. 2017. Structure, function, and estimation of leghemoglobin. **Rhizobium biology and biotechnology**309-330.
- Smalla, Kornelia, Jechalke, Sven และ Top, Eva M. 2015. Plasmid detection, characterization, and ecology. **Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery**445-458.
- Smillie, Chris, Garcillán-Barcia, M Pilar, Francia, M Victoria, Rocha, Eduardo PC และ de la Cruz, Fernando. 2010. Mobility of plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**,74(3), 434-452.
- Snustad, D Peter และ Simmons, Michael J. 2015. **Principles of genetics**. John Wiley & Sons.
- Svensson, Birgitta และ Hederstedt, Lars. 1994. *Bacillus subtilis* CtaA is a heme-containing membrane protein involved in heme A biosynthesis. **Journal of bacteriology**,176(21), 6663-6671.
- Tsujibo, Hiroshi, Kubota, Takahiro, Yamamoto, Mitsugu, Miyamoto, Katsushiro และ Inamori, Yoshihiko. 2003. Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardiosis prasina* OPC-131. **Applied and environmental microbiology**,69(2), 894-900.
- van Zyl, Winschau F, Deane, Shelly M และ Dicks, Leon MT. 2015. Use of the mCherry fluorescent protein to study intestinal colonization by *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 in mice. **Applied and environmental microbiology**,81(17), 5993-6002.
- Wacker, Michael J และ Godard, Michael P. 2005. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. **Journal of biomolecular techniques: JBT**,16(3), 266.
- Wang, Mengmeng, Shi, Zhong, Gao, Ning, Zhou, Yingyu, Ni, Xiaomeng, Chen, Jiuzhou, Liu, Jiao, Zhou, Wenjuan, Guo, Xuan และ Xin, Bo. 2023. Sustainable and high-level microbial production of plant hemoglobin in *Corynebacterium*

- glutamicum. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**,16(1), 80.
- Winterflood, Christian M และEwers, Helge. 2014. Single-molecule localization microscopy using mCherry. **ChemPhysChem**,15(16), 3447-3451.
- Wyman Jr, Jeffries. (1948). Heme proteins. In **Advances in protein chemistry** (Vol. 4, pp. 407-531): Elsevier.
- Yancey, EJ, Grobbel, JP, Dikeman, ME, Smith, JS, Hachmeister, KA, Chambers Iv, EC, Gadgil, P, Milliken, GA และDressler, EA. 2006. Effects of total iron, myoglobin, hemoglobin, and lipid oxidation of uncooked muscles on livery flavor development and volatiles of cooked beef steaks. **Meat science**,73(4), 680-686.
- Ye, Jing, Li, Yunjie, Bai, Yuqing, Zhang, Ting, Jiang, Wei, Shi, Ting, Wu, Zijian และZhang, Yi-Heng P. 2022. A facile and robust T7-promoter-based high-expression of heterologous proteins in Bacillus subtilis. **Bioresources and Bioprocessing**,9(1), 1-12.
- Zentgraf, Hanswalter, Frey, Manfred, Schwinn, Susanne, Tessmer, Claudia, Willemann, Bernhard, Samstag, Yvonne และVelhagen, Iris. 1995. Detection of histidine-tagged fusion proteins by using a high-specific mouse monoclonal anti-histidine tag antibody. **Nucleic acids research**,23(16), 3347.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาววราทิพย์ ชวนคิด
เกิดเมื่อ 8 กรกฎาคม 2541
ประวัติการศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนตาคลีประชาสรรค์ 2555-2560
ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 2560-2564

