



การโคลนและการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไฮโล-ซีไฟโคไซยานิน

หน่วยย่อยแอลฟาจาก *Nostoc* spp. และ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

Cloning and Analysis of Holo-C-Phycocyanin Alpha Subunit Synthesis Genes from

Nostoc spp. and *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

วิภาวี ศรีทัศน์ย์¹, เทพปัญญา เจริญรัตน์¹, สุเปญญา จิตตพันธ์¹, ภูภิภัทร ใจแก้ว¹,

พลายพล เดชวิศิษฐ์สกุล² และ ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์^{1*}

Wipawee Sritusnee¹, Theppanya Charoenrat¹, Supenya Chittapun¹, Phuphiphat Jaikaew¹,

Plaipol Dedvisitsakul² and Chanitchote Piyapittayanun^{1*}

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University

² สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

² School of Science, Mae Fah Luang University

Received : 4 March 2020

Revised : 29 May 2020

Accepted : 18 June 2020

บทคัดย่อ

ซีไฟโคไซยานิน คือ โปรตีนสีน้ำเงินที่ถูกใช้เป็นสารเรืองแสงในการวิเคราะห์ด้านภูมิคุ้มกันวิทยา และถูกใช้เป็นสีธรรมชาติในอาหารและเครื่องสำอาง มีรายงานว่าซีไฟโคไซยานินมีศักยภาพที่จะพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ เนื่องจากมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อโคลนยีนที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ไฮโล-ซีไฟโคไซยานิน ได้แก่ ยีน *hox1* และ *pcyA* จากไซยาโนแบคทีเรียกลุ่ม *Nostoc* ยีน *cpcE* และ *cpcF* จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ผู้วิจัยได้โคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน รวมถึงทำนายโครงสร้างทุติยภูมิและวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซยาโนแบคทีเรียในฐานข้อมูล Nucleotide databases ของ NCBI พบว่า ยีน *hox1* ของ *Nostoc* sp. TUBT04 และ *pcyA* ของ *Nostoc* sp. TUBT01 มีความเหมือนกันกับยีน *hox1* และ *pcyA* ของ *Nostoc* sp. NIES-4103 ที่ระดับ 97 เปอร์เซ็นต์ และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ ยีน *cpcE* และ *cpcF* ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีความเหมือนกันกับยีน *cpcE* และ *cpcF* ของ *Thermosynechococcus* sp. CL-1, *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542, *Thermosynechococcus vulcanus* NIES-2134 และ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 ที่ระดับ 90-92 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ผลิตไฮโล-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ในระบบ *Escherichia coli* ต่อไป

คำสำคัญ : *hox1* ; *pcyA* ; *cpcE* ; *cpcF*



Abstract

C-phycoyanin is a blue-colored protein used as a fluorescent reagent for immunological analysis and natural pigment in food and cosmetics. Furthermore, many studies reported the pharmaceutical potential of C-phycoyanin due to its antioxidant properties. This study was conducted to isolate and clone the necessary genes for the synthesis of holo-C-phycoyanin alpha subunit including *hox1* and *pcyA* from *Nostoc* spp. as well as *cpcE* and *cpcF* from *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01. The genes were successfully identified, cloned, and sequenced. Physicochemical properties and secondary structure of proteins were analyzed and predicted. The nucleotide sequences of each gene were aligned with those of other cyanobacterial strains available in the GenBank. The results indicated that the nucleotide sequences of *hox1* from *Nostoc* sp. TUBT04 and *pcyA* from *Nostoc* sp. TUBT01 had 97% and 96% identity to those from *Nostoc* sp. NIES-4103 respectively. While the nucleotide sequences of *cpcE* and *cpcF* from *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 had 90-92% identity to those from *Thermosynechococcus* sp. CL-1, *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542, *Thermosynechococcus vulcanus* NIES-2134, and *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Results obtained from this study will be very beneficial for the production of holo-C-phycoyanin from *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 using *Escherichia coli* expression system in the near future.

Keywords : *hox1* ; *pcyA* ; *cpcE* ; *cpcF*



บทนำ

กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย อาศัยรงควัตถุหลายชนิดที่ช่วยในการดูดกลืนแสง คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และ ไฟโคบิลิโปรตีน ซึ่งแต่ละกลุ่มจะดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นที่แตกต่างกัน ไฟโคบิลิโปรตีนจะทำหน้าที่ในการดูดกลืนแสงแล้วส่งต่อไปให้คลอโรฟิลล์เอบริเวณเยื่อหุ้มไทลาคอยด์เพื่อเข้าสู่ระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยไฟโคบิลิโปรตีนประกอบไปด้วยโปรตีน 3 ชนิดหลัก ได้แก่ ไฟโคอิริทริน มีสีแดง อัลโลไฟโคไซยานินมีสีน้ำเงินแกมเขียว และไฟโคไซยานินมีสีน้ำเงิน ไฟโคบิลิโปรตีนทั้งสามชนิดจะอยู่รวมกันเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน เรียกว่าไฟโคบิลิโซม (Sidler, 1994; Guan *et al.*, 2007)

ซีไฟโคไซยานิน มีค่าการดูดกลืนแสงช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร และเปล่งฟลูออเรสเซนซ์ที่ 650 นาโนเมตร โดยโครงสร้างและส่วนประกอบหลักของโมเลกุลซีไฟโคไซยานิน ประกอบไป 2 ส่วนคือ 1) อะโปโปรตีน (apoprotein) ซีไฟโคไซยานิน หน่วยย่อยแอลฟาและเบตา 2) ไฟโคไซยาโนบิลิน ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ทำให้เกิดสีฟ้า (chromophore) โดยไฟโคไซยาโนบิลินจะเชื่อมต่อกับซีไฟโคไซยานินด้วยพันธะโควาเลนต์บริเวณกรดอะมิโนซิสเทอีนที่เป็นลำดับอนุรักษ์บนหน่วยย่อยแอลฟา 1 ตำแหน่งและเบตา 2 ตำแหน่ง (Zhao *et al.*, 2006) ซีไฟโคไซยานินถูกนำไปใช้ประโยชน์ในหลากหลายด้าน เช่น ใช้เป็นสารฟลูออเรสเซนซ์ในการวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยา ใช้เป็นสารสีผสมในอาหาร และเครื่องสำอาง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าซีไฟโคไซยานินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งการแบ่งเซลล์มะเร็ง ซีไฟโคไซยานินจึงถูกพิจารณาว่ามีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ (Kuddus *et al.*, 2013)

การผลิตโปรตีนด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์โดยใช้ *Escherichia coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านถูกใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจาก *Escherichia coli* เติบโตได้อย่างรวดเร็วและให้ผลผลิตโปรตีนในปริมาณสูง ซึ่งสามารถลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการผลิต รวมถึงง่ายต่อการดัดแปลงพันธุกรรมและนำไปทำให้บริสุทธิ์ มีรายงานการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโฮโล-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาใน *Escherichia coli* ได้สำเร็จ โดยมีการแสดงออกยีนที่สำคัญอย่างน้อย 5 ยีน ได้แก่ ยีน *cpcA* กำหนดการสร้างอะโปซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (apo-C-phycoyanin alpha subunit) ยีน *hox1* กำหนดการสร้างโปรตีน heme oxygenase 1 และ *pcyA* กำหนดการสร้างโปรตีน phycoyanobilin-ferredoxin oxidoreductase ซึ่งทั้งสองโปรตีนนี้ทำหน้าที่ร่วมกันในการผลิตไฟโคไซยาโนบิลิน ยีน *cpcE* และ *cpcF* กำหนดการสร้างเฮนไซม์บิลินไลเอส CpcE และ CpcF ซึ่งจะจับกันเป็น heterodimer ทำหน้าที่เชื่อมต่อไปไฟโคไซยาโนบิลินเข้ากับอะโป-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (Tooley *et al.*, 2001; Guan *et al.*, 2009; Alvey *et al.* 2011) ด้วยหลักการเดียวกันนี้ การผลิตโฮโล-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบต้า (holo-C-phycoyanin beta subunit) ใน *Escherichia coli* สามารถผลิตได้โดยแสดงออกยีน *hox1* และ *pcyA* เพื่อผลิตไฟโคไซยาโนบิลิน และแสดงออกยีน *cpcS* *cpcU* และ *cpcT* ที่กำหนดการสร้างเฮนไซม์บิลินไลเอส CpcS CpcU และ CpcT เพื่อเชื่อมต่อไปไฟโคไซยาโนบิลินเข้ากับอะโป-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบต้า (Yi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016)

Thermosynechococcus sp. TUBT-T01 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophile) แยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อนในจังหวัดสุราษฎร์ธานี และสามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส (Suwanmanee *et al.*, 2015) จากผลการศึกษาพบว่าซีไฟโคไซยานินที่สกัดได้จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01



คงเสถียรภาพในอุณหภูมิสูง เมื่อเทียบกับซีไฟโคไซยานินที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) (Suwanmanee, 2016) ประกอบกับผลการวิเคราะห์ยีน *cpcA* และ *cpcB* ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 พบกรดอะมิโนบางตำแหน่งเป็นลำดับอนุรักษ์ที่พบเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูง และคาดว่า มีผลต่อกรรมเสถียรภาพที่สูงขึ้นของโปรตีนซีไฟโคไซยานิน (Dedvisitsakul *et al.*, 2017; Huadraksasat *et al.*, 2017) ซึ่งสมบัตินี้ จะช่วยเพิ่มศักยภาพในการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและวิเคราะห์ยีนที่คาดว่าจำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์ ไฮโล-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (holo-CpcA) ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยใช้ระบบการแสดงออกของยีนใน *Escherichia coli* ได้แก่ ยีน *cpcE* และ *cpcF* จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 และ ยีน *hox1* และ *pcyA* จาก *Nostoc* sp. TUBT04 และ *Nostoc* sp. TUBT01 (Chittapun & Charoenrat, 2015) ตามลำดับ ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง เพื่อให้ทราบข้อมูลของยีนเหล่านี้ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน โครงสร้างและสมบัติของโปรตีน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำยีนเหล่านี้ไปแสดงออกเป็นโปรตีนและใช้ในขั้นตอนการผลิต ไฮโล-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาในระบบ *Escherichia coli* ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงและสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 (Suwanmanee *et al.*, 2015) ในอาหาร BG11 (Rippka *et al.*, 1979) ที่เติม NaNO_3 3 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc* sp. TUBT04 และ *Nostoc* sp. TUBT01 ในอาหาร BG11 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที จากนั้นนำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc* sp. TUBT04 และ *Nostoc* sp. TUBT01 มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยปรับจากวิธีของ Doyle & Doyle (1990) โดยบดเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม CTAB extraction buffer บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม ฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25: 24: 1) ปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาสารละลายส่วนใส (aqueous phase) เติม คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24: 1) ปริมาตร 1.5 เท่าของตัวอย่าง ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส แล้วเติมโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันแล้วเติม เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของตัวอย่าง แช่ว้อย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วเก็บรักษาจีโนมิกดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การออกแบบไพรเมอร์ และการเพิ่มปริมาณยีน *hox1* *pcyA* *cpcE* และ *cpcF*

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน โดยรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hox1* *pcyA* *cpcE* และ *cpcF* ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกันจากฐานข้อมูล Nucleotide databases ของ NCBI นำมาทำการเปรียบเทียบกัน



(alignment) ด้วยโปรแกรม MEGA 10 (Kumar *et al.*, 2018) คัดเลือกบริเวณที่มีลำดับอนุรักษ์ (conserved sequences) มาเป็นลำดับของไพรเมอร์โดยออกแบบให้ forward primer และ reverse primer ครอบคลุมความยาวตลอดทั้งสายของยีน ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Nostoc* sp. TUBT04 และ TUBT01 100 นาโนกรัมเป็นแม่แบบในการเพิ่ม ปริมาณยีน *hox1* และ *pcyA* ตามลำดับ และใช้ตัวเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ปริมาตร 1 ไมโครลิตรเป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณยีน *cpcE* และ *cpcF* ส่วนองค์ประกอบอื่น ๆ ในปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส มีดังต่อไปนี้ 10X PCR buffer (ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์) 1 เท่า dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ forward primer 0.2 ไมโครโมลาร์ reverse primer 0.2 ไมโครโมลาร์ และ *TaKaRa Ex Taq*TM DNA polymerase 1.25 ยูนิท ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ใช้สภาวะปฏิกิริยาดังนี้ (1) Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 3 นาที (2) Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (3) Annealing 44-50 องศาเซลเซียส 1 นาที (4) Extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที (5) Final extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที วนรอบซ้ำขั้นตอน (2) - (4) จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร

การโคลนยีน *hox1 pcyA cpcE* และ *cpcF*

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส ได้แก่ ยีน *hox1 pcyA cpcE* และ *cpcF* ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) จากนั้นเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy cloning vector (Promega, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วทรานสฟอร์มโดยวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α ที่ผ่านการทำให้เป็นคอมพิเทนต์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ คัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยการคัดเลือก blue-white colony (Sambrook & Russell, 2001) บนอาหาร แข็ง LB (ทริปโตน 1 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร) และเติม แอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คัดเลือกโคโลนีสีขาวและนำไปตรวจสอบด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ (Colony PCR) โดยใช้ คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนทั้ง 4 ดังแสดงในตารางที่ 1 และคู่ไพรเมอร์ M13-F (5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3') และ M13-R (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') (Messing, 1983) ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนเวกเตอร์ pGEM-T Easy ที่ ขนาบทั้งสองด้านของตำแหน่งแทรกของยีน เพื่อยืนยันการแทรกของยีนทั้ง 4 ในตำแหน่งที่ถูกต้อง จากนั้นสกัด รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคโลนีที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีชิ้นยีนแทรกอยู่ด้วย QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) และส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen (Korea)

**ตารางที่ 1** ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน โดย ATG คือ รหัสเริ่มต้น และ GAAGGAG คือ ตำแหน่งจับของไรโบโซม

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (3'→5')	ยีนเป้าหมาย
<i>hox1</i> -F1	5'-ATGAGCAGCAATTTAGCAA-3'	<i>hox1</i>
<i>hox1</i> -R1	5'-TTACTCAGCAGTAGCTAGTTC-3'	(<i>Nostoc</i> sp. TUBT04)
<i>pcyA</i> -F1	5'-ATGTCATTTACTTCCATTCCTC-3'	<i>pcyA</i>
<i>pcyA</i> -R1	5'-TTATTCTGGCAAGTCAAATAACAC-3'	(<i>Nostoc</i> sp. TUBT01)
RBS- <i>cpcE</i> -Fw	5'-TAAGAAGGAGATATACATATGTCAGGAGAGGGAATGAC-3'	<i>cpcE</i> (<i>Thermosynechococcus</i>
<i>cpcE</i> -Rv	5'-TCACAGCAGTTGATCCAATCC-3'	sp. TUBT-T01)
RBS- <i>cpcF</i> -Fw	5'-TAAGAAGGAGATATACATATGAGTGATCTCGGTGCCTA-3'	<i>cpcF</i> (<i>Thermosynechococcus</i>
<i>cpcF</i> -Rv	5'-TTAGGTGTGCATGGACAGAG-3'	sp. TUBT-T01)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนรีคอมมิแนนท์ดีเอ็นเอของยีน *hox1* *pcyA* *cpcE* และ *cpcF* โดยใช้ไพรเมอร์ M13-F และ M13-R จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ไปเปรียบเทียบกับความเหมือน (sequence identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล Nucleotide databases ของ NCBI ด้วยวิธี BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hox1* *pcyA* *cpcE* และ *cpcF* ของไซยาโนแบคทีเรีย 26 สายพันธุ์จากฐานข้อมูล แปลเป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA10 (Kumar *et al.*, 2018) โดยใช้หลักการ Maximum Likelihood วิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน (physicochemical properties) ได้แก่ มวลโมเลกุล (molecular weight) ค่า isoelectric point (pI) ค่า instability index และ hydropathicity index ด้วยโปรแกรม ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005) และวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิด้วยโปรแกรม GOR4 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html) (Garnier *et al.*, 1996)

ผลการวิจัย**การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนและโคลนยีน**

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน ได้ออกแบบคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 4 คู่แสดงดังตารางที่ 1 โดยรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *hox1* และ *pcyA* ของไซยาโนแบคทีเรียจีนัส *Nostoc* 10 สายพันธุ์ จากฐานข้อมูล Nucleotide databases ของ NCBI และใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *cpcE* และ *cpcF* ของไซยาโนแบคทีเรียจีนัส *Thermosynechococcus* 4 สายพันธุ์ นำมาเปรียบเทียบกันและเลือกบริเวณที่มีลำดับอนุรักษ์โดยครอบคลุมความยาวตลอดทั้งสายของยีน และได้เพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งจับของไรโบโซม (RBS: ribosome binding site) เข้าไปบริเวณปลาย 5' ก่อนถึงยีน *cpcE* และ *cpcF* เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ผลิตโปรตีนในอนาคต ซึ่งผลการเพิ่มปริมาณยีนพบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูซิเฟอเรสที่มีขนาดเป็นไปตามที่คาดการณ์ ได้แก่ ยีน *hox1* *pcyA* *cpcE* และ *cpcF* มีขนาด



ประมาณ 700 740 800 และ 650 คู่เบสตามลำดับ (ไม่ได้แสดงภาพ) จากนั้นเชื่อมต่อยีนเข้าไปในเวกเตอร์ pGEM-T easy แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α และสกัดพลาสมิดจากโคลนที่ผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยืนยันว่ายีนเป้าหมายทั้ง 4 ยีนเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำเร็จเป็นพลาสมิด 4 วง ได้แก่ pGEM-T-*hox1*, pGEM-T-*pcyA*, pGEM-T-RBS-*cpcE* และ pGEM-T-RBS-*cpcF* โดยมีขนาดของยีน *hox1* *pcyA* *cpcE* และ *cpcF* เท่ากับ 717, 738, 831, และ 642 คู่เบสตามลำดับ และได้รับการระบุหมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) เป็น MT264949.1 MT264950.1 MT264947.1 และ MT264948.1 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล Nucleotide databases ของ NCBI พบว่ายีน *hox1* จาก *Nostoc* sp. TUBT04 มีความเหมือนกับยีน *hox1* ของ *Nostoc* sp. NIES-4103 (AP018288.1) ที่ 97 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ จาก 6 จินัส ได้แก่ *Nostoc*, *Cylindrospermum*, *Calothrix*, *Anabaenopsis*, *Nodularia* และ *Fremyella* ที่ประมาณ 83-85 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าคาดหวัง (Expected value หรือ E-value) เข้าใกล้ 0 แสดงถึงค่านัยสำคัญของความเชื่อมั่นในระดับสูงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hox1* ของผู้วิจัยมีความเหมือนกันมากกับยีน *hox1* ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นดังกล่าวข้างต้น มากกว่าจะเกิดขึ้นจากความผิดพลาดของการสุ่มข้อมูลในช่วงระหว่างทำการเปรียบเทียบ และมีขนาดความยาวของยีน *hox1* ครอบคลุมความยาวของยีนที่ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ (Query coverage) อยู่ในช่วงระหว่าง 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ ในทำนองเดียวกันยีน *pcyA* จาก *Nostoc* sp. TUBT01 มีความเหมือนกับยีน *pcyA* ของ *Nostoc* sp. NIES-4103 (AP018288) ที่ 96 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ในจินัส *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Cylindrospermum*, *Nodularia* และ *Calothrix* อยู่ที่ประมาณ 81-83 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า E-value เข้าใกล้ 0 และ Query coverage 99-100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบยีน *hox1* ของ *Nostoc* sp. TUBT04 และ *pcyA* ของ *Nostoc* sp. TUBT04 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซยาโนแบคทีเรียจินัส *Thermosynechococcus* ในฐานข้อมูลพบว่า ยีน *hox1* มีความเหมือนประมาณ 68-70 เปอร์เซ็นต์ Query coverage 88-98 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า E-value เข้าใกล้ 0 และยีน *pcyA* มีความเหมือนประมาณ 64-66 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า E-value เข้าใกล้ 0 และ Query coverage 67-94 เปอร์เซ็นต์

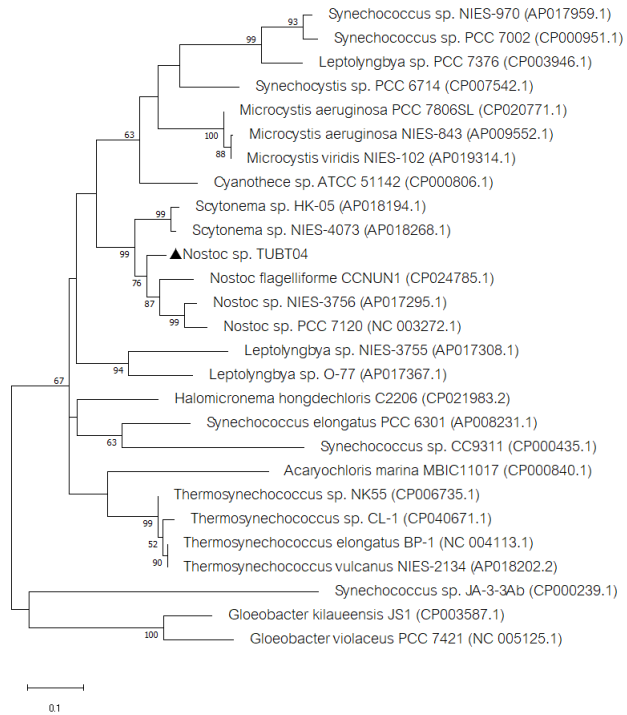
ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcE* และ *cpcF* ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 พบไซยาโนแบคทีเรียเพียง 2 จินัส คือ *Thermosynechococcus* และ *Synechococcus* จำนวน 6 สายพันธุ์ที่ให้ค่า E-value เข้าใกล้ 0 และค่า Query coverage 99-100 เปอร์เซ็นต์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *cpcE* ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีความเหมือนกับ *Thermosynechococcus* sp. CL-1 (CP040671.1) และ *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 (CP032152.1) 90 เปอร์เซ็นต์ เหมือนกับ *Thermosynechococcus vulcanus* NIES-2134 (AP018202.2) *Thermosynechococcus elongatus* BP- 1 (BA000039. 2) *Synechococcus elongatus* (D13173. 1) และ *Thermosynechococcus* sp. NK55 (CP006735.1) 89 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีความเหมือนกับ *Synechococcus lividus* PCC 6715 (CP018092.1) 72.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า Query coverage 74 เปอร์เซ็นต์ เหมือนกับ *Synechococcus* sp. PCC 6312 (CP003558.1) 69 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า Query coverage 61 เปอร์เซ็นต์ ยีน *cpcF* ของ *Thermosynechococcus* sp.



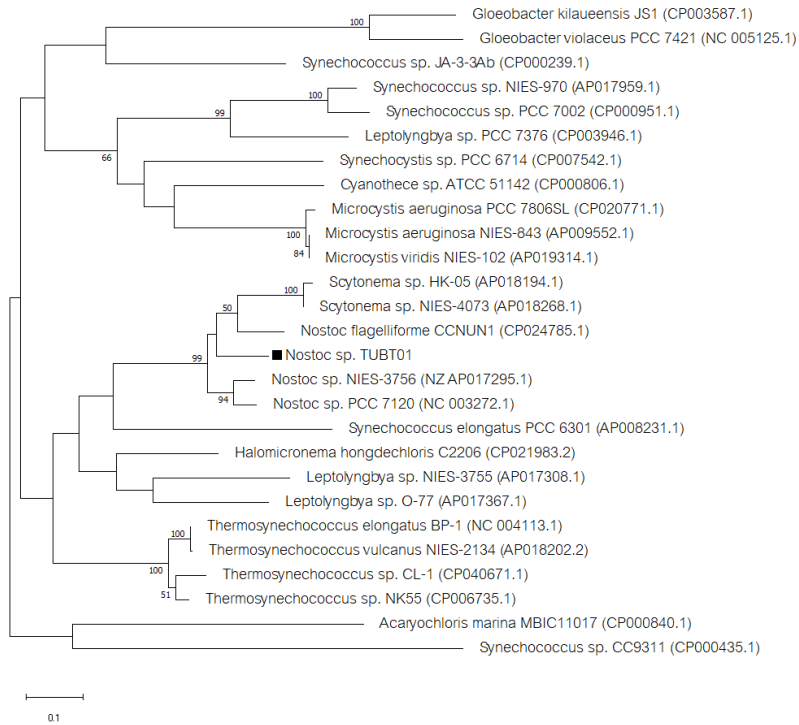
TUBT-T01 มีความเหมือนกับ *Thermosynechococcus* sp. CL-1 (CP040671.1) *Thermosynechococcus vulcanus* NIES-2134 (AP018202.2) *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (BA000039.2) และ *Synechococcus elongatus* (D13173.1) 92 เปอร์เซ็นต์ เหมือนกับ *Thermosynechococcus* sp. NK55 (CP006735.1) 91 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 (CP032152.1) 90 เปอร์เซ็นต์ ไชยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ นอกเหนือไปจากจีนัส *Thermosynechococcus* ที่แสดงผลเกือบทั้งหมดให้ค่า Query coverage ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เช่น *Nostoc Anabaena Nodularia* ที่ให้ค่า Query coverage 22-24 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

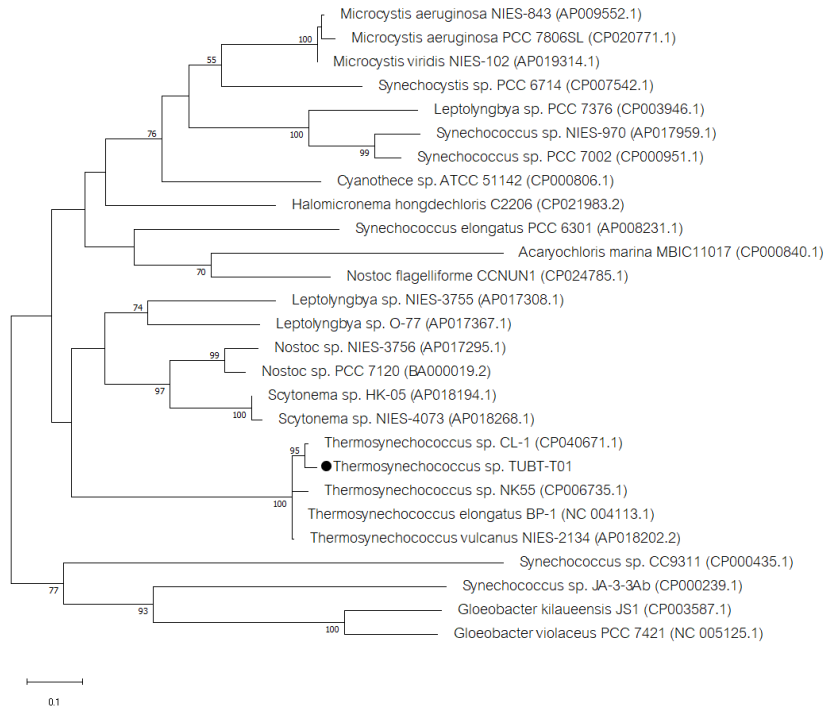
เมื่อเปรียบเทียบกับไชยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ จากฐานข้อมูล Nucleotide databases ของ NCBI พบว่าโปรตีน Hox1 ของ *Nostoc* sp. TUBT04 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความสัมพันธ์เดียวกับ *Nostoc flagelliforme* CCNUN1 (CP024785.1), *Nostoc* sp. NIES-3756 (AP017295.1) และ *Nostoc* sp. PCC 7120 (NC 003272.1) ด้วยค่าความเชื่อมั่นของการทดสอบซ้ำ (bootstrap) เท่ากับ 76 เปอร์เซ็นต์ ที่จัดกลุ่มให้ทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังภาพที่ 1 โปรตีน PcyA ของ *Nostoc* sp. TUBT01 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความสัมพันธ์เดียวกับ *Nostoc flagelliforme* CCNUN1 (CP024785.1), *Nostoc* sp. NIES-3756 (AP017295.1), *Nostoc* sp. PCC7120 (NC 003272.1) ร่วมกับ *Scytonema* sp. HK-05 (AP018268.1) และ *Scytonema* sp. NIES-4073 (AP018268.1) ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 2 โปรตีน CpcE และ CpcF ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความสัมพันธ์เดียวกับ *Thermosynechococcus* sp. CL-1 (CP040671.1), *Thermosynechococcus* sp. NK55 (CP006735.1), *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (BA000039.2) และ *Thermosynechococcus vulcanus* NIES-2134 (AP018202.2) ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 3 และภาพที่ 4



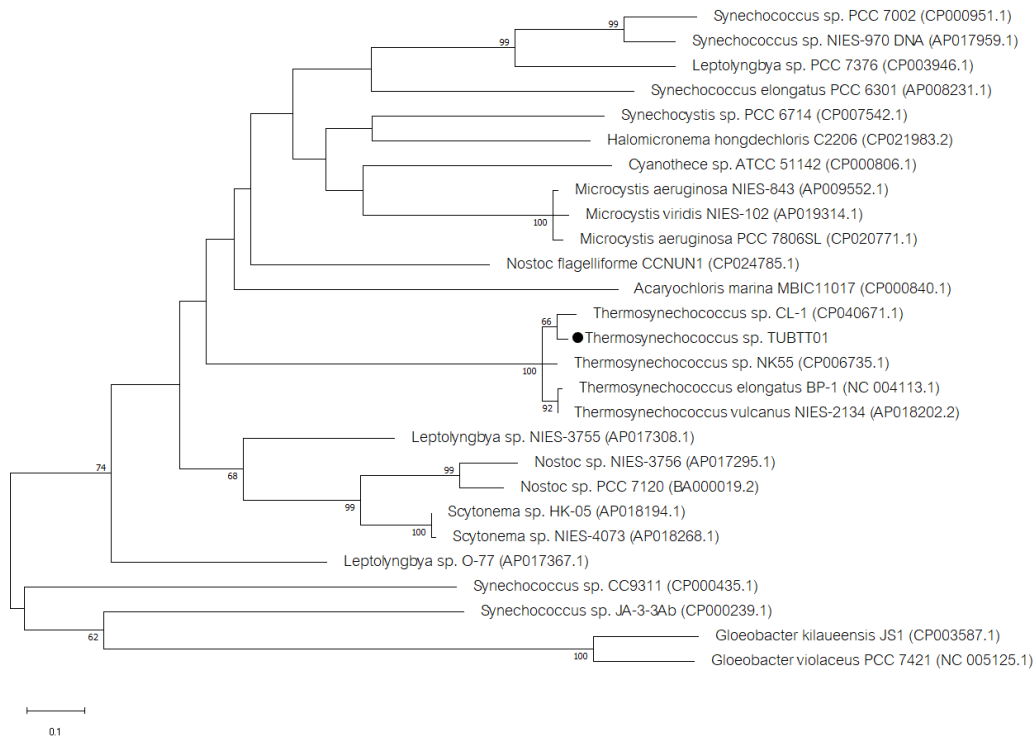
ภาพที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน Hox1 วิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum likelihood กำหนดค่าการทำ bootstrap เท่ากับ 1000 รอบ



ภาพที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน PcyA วิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum likelihood กำหนดค่าการทำ bootstrap เท่ากับ 1000 รอบ



ภาพที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน CpcE วิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum likelihood กำหนดค่าการทำ bootstrap เท่ากับ 1000 รอบ



ภาพที่ 4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน CpcF วิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum likelihood กำหนดค่าการทำ bootstrap เท่ากับ 1000 รอบ

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและโครงสร้างโปรตีน

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพโดยโปรแกรม ProtParam แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าโปรตีน Hox1 ของ *Nostoc* sp. TUBT04 มีมวลโมเลกุล 26.93 กิโลดาลตัน ค่า pH ที่ทำให้ประจุรวมของโปรตีนมีค่าเป็นศูนย์ (isoelectric point หรือ pI) เท่ากับ 7.80 ค่าตัวชี้วัดความเสถียรของโปรตีนในหลอดทดลอง (instability index) เท่ากับ 24.67 และค่าตัวชี้วัดความชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำของโปรตีน (hydropathicity index) เท่ากับ 0.442 ส่วนโปรตีน PcyA ของ *Nostoc* sp. TUBT01 มีมวลโมเลกุล 28.11 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 5.37 ค่า instability index เท่ากับ 67.89 และค่า hydropathicity index เท่ากับ -0.303 สำหรับโปรตีน CpcE และ CpcF ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีมวลโมเลกุล 29.52 และ 22.70 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 5.20 และ 6.05 ค่า instability index เท่ากับ 49.85 และ 35.58 และค่า hydropathicity index เท่ากับ 0.236 และ 0.176 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนด้วยโปรแกรม GOR4 แสดงดังภาพที่ 5 พบว่า โครงสร้างของโปรตีน Hox1 เป็น α -helix 55.04 เปอร์เซ็นต์, β -sheet 13.45 เปอร์เซ็นต์ และ random coil 31.51 เปอร์เซ็นต์ โครงสร้างของโปรตีน

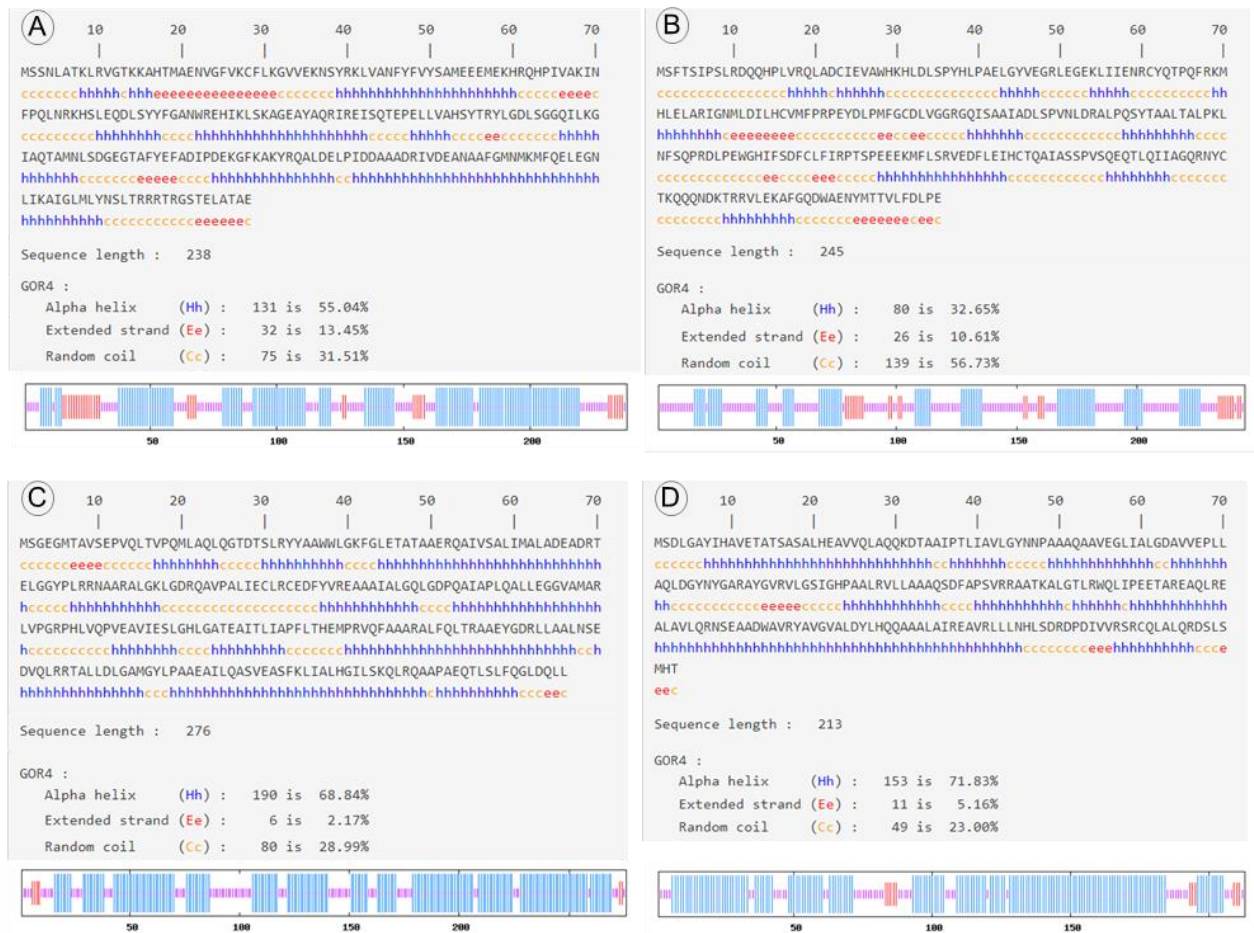


PcyA เป็น α -helix 32.65 เปอร์เซ็นต์, β -sheet 10.61 เปอร์เซ็นต์ และ random coil 56.73 เปอร์เซ็นต์ โครงสร้างของโปรตีน CpcE และ CpcF ประกอบไปด้วยโครงสร้าง α -helix, β -sheet และ random coil ในสัดส่วนใกล้เคียงกันโดยที่ CpcE มีโครงสร้างเป็น α -helix 68.84 เปอร์เซ็นต์, β -sheet 2.17 เปอร์เซ็นต์ และ random coil 28.99 เปอร์เซ็นต์ และ CpcF มีโครงสร้างเป็น α -helix 71.83 เปอร์เซ็นต์, β -sheet 5.16 เปอร์เซ็นต์ และ random coil 23.00 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 สมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน

สมบัติทางเคมีกายภาพ	ขนาด (กรดอะมิโน)	มวลโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	ค่า pI (Isoelectric point)	Instability index*	Hydropathicity index**
Hox1 (<i>Nostoc</i> sp. TUBT04)	238	26.93	7.80	24.67	-0.442
PcyA (<i>Nostoc</i> sp. TUBT01)	245	28.11	5.37	67.89	-0.303
CpcE (<i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01)	276	29.52	5.20	49.85	0.236
CpcF (<i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01)	213	22.70	6.05	35.58	0.176

หมายเหตุ *ค่า instability index หมายถึง ค่าการประมาณเสถียรภาพของโปรตีนในหลอดทดลอง ถ้าหากมีค่าต่ำกว่า 40 ทำนายว่าโปรตีนมีเสถียรภาพ หากมีค่าสูงกว่า 40 ทำนายว่าโปรตีนอาจมีเสถียรภาพต่ำ **ค่า hydropathicity index หมายถึง ค่าตัวชี้วัดความชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำของโปรตีนหากค่าเป็นบวกบ่งบอกว่าเป็น hydrophobic และค่าเป็นลบบ่งบอกว่าเป็น hydrophilic (Gasteiger *et al.*, 2005)



ภาพที่ 5 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Hox1 (A) PcyA (B) CpcE (C) CpcF (D) โดยเส้นตรงแนวตั้งสีน้ำเงินสีแดง และสีชมพู หมายถึง alpha helix, β -sheet และ random coil ตามลำดับ

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence alignment) ของยีน ด้วยวิธีการค้นหาคความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล และการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบประเด็นที่น่าสนใจดังนี้ โปรตีนที่เกี่ยวข้องของไนโรทีการสังเคราะห์ไฮโดร-ซีไฟโคไซยานิน ได้แก่ Hox1, PcyA, CpcE และ CpcF ของไซยาโนแบคทีเรียในจีนัส *Thermosynechococcus* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ค่อนข้างสูง ดังแสดงในแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีนทั้ง 4 ชนิด (ภาพที่ 1 2 3 และ 4) โดยจะพบว่าทุกสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและแยกจากกลุ่มอื่นด้วยค่า bootstrap ระหว่าง 99-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcE* และ *cpcF* ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 กับไซยาโนแบคทีเรียในฐานข้อมูล Nucleotide databases ของ NCBI ด้วยวิธี BLASTN ที่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและ



ค่า Query coverage ที่สูงเฉพาะในจีโนม *Thermosynechococcus* ส่วนในไซยาโนแบคทีเรียอื่น ๆ เช่น *Nostoc*, *Anabaena*, *Nodularia* ให้ค่า Query coverage ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcE* และ *cpcF* ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับนิวคลีโอไทด์จากทั้งสามจีโนมที่เป็นไซยาโนแบคทีเรียชอบอุณหภูมิปานกลางไม่ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ของความยาวยีนทั้งหมด

แนวทางการวิจัยขั้นถัดไปคือการผลิตโฮโล-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาในแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยคาดหวังจากสมบัติที่ร้อนของโปรตีนซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *cpcA* จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 และเนื่องจากในระบบการสร้างโฮโล-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา ต้องมีโปรตีนบิลินไลเอส CpcE และ CpcF ทำหน้าที่เชื่อมต่อไปไซยาโนบิลินเข้ากับอะโป-ซีไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (chromophorylation) ผู้วิจัยจึงได้เลือกโคลนยีน *cpcE* และ *cpcF* จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เช่นเดียวกัน โดย Yi *et al* 2014 ได้ตั้งข้อสังเกตว่าในระบบการผลิตโฮโล-ซีไฟโคไซยานินใน *Escherichia coli* นั้น แหล่งที่มาของยีนบิลินไลเอสกับโปรตีนอะโป-ซีไฟโคไซยานินมีความจำเพาะต่อกัน นอกจากนั้น จากผลการศึกษาของ Biswas *et al.* 2010 และ Yi *et al.* 2014 ยังพบว่าระบบที่ใช้ยีนบิลินไลเอสกับยีนซีไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กันจะให้ผล chromophorylation ต่ำกว่าการใช้ยีนทั้งสองจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcE* และ *cpcF* ในงานวิจัยชิ้นนี้ ก็พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcE* และ *cpcF* ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีความอนุรักษ์กันสูงภายในจีโนมเดียวกัน เมื่อเทียบกับต่างจีโนม จึงช่วยสนับสนุนสมมติฐานในการใช้ยีน *cpcA* *cpcE* และ *cpcF* ว่าควรมีแหล่งที่มาเดียวกัน

อย่างไรก็ตามสำหรับโปรตีน Hox1 และ PcyA ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในกระบวนการผลิตไฟโคไซยานินบิลิน ผู้วิจัยเลือกโคลนยีน *hox1* และ *pcyA* จากไซยาโนแบคทีเรียจีโนม *Nostoc* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง เนื่องจากการผลิตโปรตีนในระบบ *Escherichia coli* จะใช้อุณหภูมิประมาณ 20-37 องศาเซลเซียส แต่เนื่องจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่แยกมาจากบ่อน้ำพุร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเติบโตอยู่ในช่วงประมาณ 45-55 องศาเซลเซียส จึงอนุมานว่าโปรตีนของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 น่าจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่าช่วงอุณหภูมิที่ใช้ผลิตโปรตีนใน *Escherichia coli* และเมื่อพิจารณาในแง่แหล่งที่มาของยีน มีรายงานว่าเมื่อใช้ยีน *cpcA* และ *pcyA* จาก *Synechococcus* sp. strain PCC7002 และ *hox1* จาก *Synechocystis* sp. strain PCC6803 ร่วมกันสามารถผลิตไฟโคไซยานินบิลินได้ปริมาณมากใน *Escherichia coli* (Biswas *et al.*, 2010) ดังนั้นในกรณีนี้ชี้ให้เห็นว่าแหล่งที่มาของยีนที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โฮโล-ซีไฟโคไซยานินในระบบ *Escherichia coli* ไม่จำเป็นต้องมาจากแหล่งเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *hox1* ของ *Nostoc* sp. TUBT04 และยีน *pcyA* ของ *Nostoc* sp. TUBT01 ที่พบว่ามีความอนุรักษ์ภายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียจีโนม *Nostoc* (ภาพที่ 1 และ 2) ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อพิจารณาระหว่างจีโนม ยีน *hox1* และ *pcyA* ยังคงมีความอนุรักษ์กับไซยาโนแบคทีเรียอื่น เช่น *Calothrix* และ *Anabaenopsis* มีความเหมือนกัน 83 - 85 เปอร์เซ็นต์ และ 81 - 83 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ด้วย Query coverage 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับจีโนม *Thermosynechococcus* ในฐานข้อมูล ยีน *hox1* ของ *Nostoc* sp. TUBT04 มีความเหมือนประมาณ 68-70 เปอร์เซ็นต์ที่ Query coverage 88-98 เปอร์เซ็นต์ และยีน *pcyA* ของ *Nostoc* sp. TUBT01 มีความเหมือน



ประมาณ 64-66 เปอร์เซ็นต์ Query coverage 63-94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้คาดการณ์ได้ว่า โครงสร้างและหน้าที่ของทั้งโปรตีน Hox1 และ PcyA ในไซยาโนแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ยังคงความอนุรักษ์ไว้ และน่าจะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรซีไฟโคไซยานินร่วมกันได้

สรุปผลการวิจัย

ยีน *hox1* (*Nostoc* sp. TUBT04) *pcyA* (*Nostoc* sp. TUBT01) *cpcE* และ *cpcF* (*Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01) มีขนาด 717, 738, 831, และ 642 คู่เบสตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับไซยาโนแบคทีเรียในฐานข้อมูล Nucleotide databases ของ NCBI พบว่า ยีน *hox1* ของ *Nostoc* sp. TUBT04 และ *pcyA* ของ *Nostoc* sp. TUBT01 มีความเหมือนกับยีน *hox1* และยีน *pcyA* ของ *NIES-4103* ที่ระดับความเหมือนเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ยีน *cpcE* และ *cpcF* ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีความเหมือนกับยีน *cpcE* และ *cpcF* ของ *Thermosynechococcus* sp. CL-1 (CP040671.1), *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542 (CP032152.1), *Thermosynechococcus vulcanus* NIES-2134 (AP018202.2) และ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (BA000039.2) ที่ระดับความเหมือน 90-92 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยชิ้นนี้ช่วยเพิ่มความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับยีนที่มีบทบาทในวิถีการสังเคราะห์ไฮโดรซีไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยขั้นถัดไปคือ การผลิตไฮโดรซีไฟโคไซยานิน หน่วยย่อยแอลฟาของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ในระบบ *Escherichia coli* และจะนำไปสู่การทดสอบสมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีน เช่น การเกิดสีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงสมบัติที่สำคัญที่แตกต่างไปจากไฟโคไซยานินจากแหล่งอื่น ๆ คือการมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจะนำไปสู่การต่อยอดพัฒนาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool.

Journal of Molecular Biology, 215, 403-410.

Alvey, R., Biswas, A., Schluchter, W., & Bryant, D. (2011). Attachment of noncognate chromophores to

CpcA of *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Synechococcus* sp. PCC7002 by heterologous

expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 50(22), 4890-902.



Biswas, A., Vasquez, Y. M., Dragomani, T. M., Kronfel, M. L., Williams, S. R., Alvey, R. M., Bryant, D. A., & Schluchter, W. M. (2010). Biosynthesis of cyanobacterial phycobiliproteins in *Escherichia coli*: Chromophorylation efficiency and specificity of all bilin lyases from *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 2729–2739.

Chittapun, S., & Charoenrat, T. (2015). Isolation and Growth of N₂-fixing cyanobacteria from organic agricultural areas in Sanamchaikate, Chachoeng-Sao Province, Thailand. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 20(2), 27-32.

Dedvisitsakul, P., Huadraksasat, S., Chittapun, S., Charoenrat, T., & Piyapittayanun, C. (2017). Cloning of a C-phycocyanin alpha subunit from *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 and prediction of its properties. *Walailak Journal of Science and Technology*, 15, 857-867.

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.

Garnier, J., Gibrat, J.F., & Robson, B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in Enzymology*, 266, 540-553.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server*. In J.M. Walker. (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. (pp. 571-607). Humana Press.

Guan, X., Qin, S., Zhao, F., Zhang, X., & Tang, X. (2007). Phycobilisomes linker family in cyanobacterial genomes: Divergence and evolution. *International Journal of Biological Sciences*, 3(7), 434–445.

Guan, X. Y., Zhang, W. J., Zhang, X. W., Li, Y. X., Wang, J. F., Lin, H. Z., Tang, X. X., & Qin, S. (2009). A potent anti-oxidant property: Fluorescent recombinant α -phycocyanin of *Spirulina*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1093–1100.



- Huadraksasat, S., Chittapun, S., Charoenrat, T., Dedvisitsakul, P., & Piyapittayanun, C. (2017). Identification and analysis of a C-phycoyanin beta subunit gene from *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01. *Burapha Science Journal*, 22(3), 141-156.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. *BioMed Research International*, 2013, 742859.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology*, 101, 20-78.
- Rippka, R., Stanier, R. Y., Deruelles, J., Herdman, M., & Waterbury, J. B. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61.
- Sambrook, J., Russell, D., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, New York, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sidler, W. A. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In D. A. Bryant (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (pp. 139–216). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Suwanmanee, K., Charoenrat, T., & Chittapun, S. (2015). Isolation and cultivation of thermophilic blue green algae from hot springs in Surat Thani province. In *Proceeding the 7th National Conference on Algae and Plankton (NCAP) conference*. (pp. 1-12), Thailand: Bangkok.
- Suwanmanee, K. (2016). *Production and determination of thermotolerant properties of C-phycoyanin isolated from hot spring cyanobacterium* (Master's thesis). Thammasat University. Thailand. (in Thai)



- Tooley, A. J., Cai, Y. A., & Glazer, A. N. (2001). Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo- α subunit in a heterologous host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10560–10565.
- Wu, F., Zang, X., Zhang, X., Zhang, R., Huang, X., Hou, L., Jiang, M., Liu, C., Pang, C. (2016). Molecular cloning of *cpcU* and heterodimeric bilin lyase activity analysis of CpcU and CpcS for attachment of phycocyanobilin to Cys-82 on the β -Subunit of phycocyanin in *Arthrospira platensis* FACHB314. *Molecules*, 21(3), 357.
- Yi, J., Xu, D., Zang, X., Yuan, D., Zhao, B., Tang, L., Tan, Y., Zhang, X. (2014). Lyase activities of heterologous CpcS and CpcT for phycocyanin holo- β -subunit from *Arthrospira platensis* in *Escherichia coli*. *Journal of Ocean University of China*, 13(3), 497–502.
- Zhang, R., Feng, X. T., Wu, F., Ding, Y., Zang, X. N., Zhang, X. C., Yuan, D. Y., Zhao, B. R. (2014). Molecular cloning and expression analysis of a new bilin lyase: The *cpcT* gene encoding a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the β -subunit of phycocyanin in *Arthrospira platensis* FACHB314. *Gene*, 544(2), 191–197.
- Zhao, K. H., Su, P., Li, J., Tu, J. M., Zhou, M., Bubenzer, C., & Scheer, H. (2006). Chromophore attachment to phycobiliprotein β -subunits: Phycocyanobilin:cysteine- β 84 phycobiliprotein lyase activity of CpeS-like protein from *Anabaena* sp. PCC7120. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 857.