

การค้นหาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

Identification and Analysis of a C-Phycocyanin Beta Subunit Gene from *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

สิชล ฮวดรักษาสัตย์¹ สุเปญญา จิตตพันธ์¹ เทพปัญญา เจริญรัตน์¹ พลายพล เดชวิศิษฎ์สกุล² และ ชนิตโชต ปิยพิทยานันต์^{1*}

Sichon Huadraksasat¹, Supenya Chittapun¹, Theppanya Charoenrat¹,

Plaipol Dedvisitsakul² and Chanitchote Piyapittayanun^{1*}

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

² สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

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

² School of Science, Mae Fah Luang University

Received : 21 May 2017

Accepted : 21 July 2017

Published online : 15 September 2017

บทคัดย่อ

ซี-ไฟโคไซยานิน คือไฟโคบิลิโปรตีนชนิดหนึ่ง มีสีน้ำเงินและมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย ปัจจุบันมีการนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้เป็นสีผสมในอาหารและเครื่องสำอาง อีกทั้งมีการรายงานว่าซี-ไฟโคไซยานินมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา (*cpcB*) จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ผู้วิจัยได้ออกแบบคูโพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcB* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T easy เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ผลที่ได้พบว่ายีน *cpcB* มีขนาด 519 คู่เบส และมีความเหมือนสูงสุดกับยีน *cpcB* ของ *Thermosynechococcus* sp. NK55a, *T. elongatus* BP-1 และ *Synechococcus vulcanus* อยู่ 97% ซึ่งพบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้ดำรงชีพในแหล่งที่มีอุณหภูมิสูงเช่นกัน เมื่อพิจารณาที่ระดับโปรตีนพบว่าโปรตีน CpcB มีความยาว 172 กรดอะมิโน และพบกรดอะมิโนกลูตามีนตำแหน่งที่ 68 และแอสพาราจีนตำแหน่งที่ 21 ที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิสูง

คำสำคัญ : ไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน ซี-ไฟโคไซยานิน ยีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา

*Corresponding author. E-mail : chanitchote@gmail.com

Abstract

C-Phycocyanin, a blue-colored pigment, is a type of phycobiliproteins that has an important role in light-dependent photosynthetic reactions of cyanobacteria. It is used as a natural pigment in food and cosmetics and has also been shown to possess antioxidant properties. The aim of this study was to identify and analyze the nucleotide sequences of a gene encoding a C-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) belonging to *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01, a thermophilic cyanobacterium. Primers were designed to amplify *cpcB* gene by polymerase chain reaction and DNA fragment was ligated to pGEM-T easy vector for nucleotide sequencing. The sequencing results showed that the *cpcB* gene was 519 base pairs in length and its nucleotide sequences had 97% identity to those of thermophilic *Thermosynechococcus* sp. NK55, *T. elongatus* BP-1 and *Synechococcus vulcanus*. At the protein level, CpcB protein was made up of 172 amino acids. The presence of glutamine at position 68 and asparagine at position 21 were noticeable and their presence could involve in the stability of C-phycocyanin at high temperature.

Keywords : Hot spring cyanobacteria, C-phycocyanin, C-phycocyanin beta subunit gene

บทนำ

ไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliproteins) คือรงควัตถุประกอบ (accessory pigments) ซึ่งทำหน้าที่ในการดูดกลืนพลังงานแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีแดง (Govindjee & Shevela, 2011; Grossman *et al.*, 1993) ไฟโคบิลิโปรตีนโดยทั่วไปที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin) อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) และไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) (MacColl, 1998) โดยซี-ไฟโคไซยานินเป็นรงควัตถุที่มีสีน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และปลดปล่อยฟลูออเรสเซนส์ได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (Minkova *et al.*, 2003) โครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานินเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อย ได้แก่ หน่วยย่อยแอลฟาและเบตา โดยโปรตีนแต่ละหน่วยย่อยจะเชื่อมต่อกับไฟโคไซยาโนบิลิน (phycocyanobilin) 1 และ 2 โมเลกุล ตามลำดับ ด้วยพันธะโควาเลนต์ซึ่งกระตุ้นโดยเอนไซม์บิลินไลเอส ในธรรมชาติซี-ไฟโคไซยานินหน่วยแอลฟาและเบตาจะอยู่รวมกันเป็นโครงสร้างมอนอเมอร์ ($\alpha\beta$) ไตรเมอร์ ($\alpha\beta$)₃ และเฮกซะเมอร์ ($\alpha\beta$)₆ แต่ละเฮกซะเมอร์จะรวมกันเป็นแท่ง แต่ละแท่งของซี-ไฟโคไซยานินจะยึดจับกันด้วยโปรตีนเชื่อมต่อ และยึดจับกับไฟโคบิลิโปรตีนชนิดอื่น ๆ เพื่อทำหน้าที่ในการดูดกลืนแสงและส่งผ่านพลังงานไปยังศูนย์กลางปฏิกิริยาต่อไป (MacColl, 1998) โดยยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาและเบตาในไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ ยีน *cpcA* และ *cpcB* ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองยีนนี้จะอยู่ภายในไฟโคไซยานินโอเปอรอน (phycocyanin operon) โดยมีรายงานว่าไฟโคไซยานินโอเปอรอนของ *Synechococcus* sp. PCC7002 ประกอบด้วยยีน *cpcB*, *cpcA*, *cpcC*, *cpcD*, *cpcE* และ *cpcF* ตามลำดับ โดยยีน *cpcE* และ *cpcF* ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์บิลินไลเอส (bilin lyase) ซึ่งเชื่อมไฟโคไซยาโนบิลินเข้ากับโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟา (Zhou *et al.*, 1992) ส่วนยีน *cpcC* และยีน *cpcD* ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนเชื่อมต่อระหว่างแท่งซี-ไฟโคไซยานิน (phycocyanin-associated rod linker protein) (de Lorimier *et al.*, 1990a, 1990b)

นอกจากนี้ยังมียีนอื่น ๆ ที่อยู่นอกไฟโคไซยานินโอเปอรอนแต่เกี่ยวข้องกับทำหน้าที่ของซี-ไฟโคไซยานิน เช่น ยีน *cpcS*, *cpcU* และ *cpcT* เป็นต้น ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์บิลินโดเอสเชื่อมไฟโคไซยานินเข้ากับโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา (Shen *et al.*, 2006, 2008)

โดยทั่วไปสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม รวมไปถึงในน้ำพุร้อน และหิมะ เป็นต้น (Yuwadee, 2006) สำหรับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถทนความร้อนได้ดีมักจะมีโปรตีนซึ่งมีกรดอะมิโนที่มีประจุ (Asp, Glu, Arg, Lys) และมีซิว (Asn, Gln, Ser, Thr) จำนวนมากกว่ากรดอะมิโนที่ไม่มีซิว ซึ่งสมบัติของกรดอะมิโนที่มีประจุและมีซิวเหล่านี้สามารถทำให้เกิดแรงวาดเดอวาลส์ พันธะไฮโดรเจน พันธะไดซัลไฟด์ และพันธะไฮโดรเจน ภายในโครงสร้างโปรตีนมากยิ่งขึ้นส่งผลให้โปรตีนจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงสามารถทนความร้อนได้ดี (Prabha *et al.*, 2012) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะศึกษาซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในแหล่งที่มีอุณหภูมิสูง โดยคาดว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สร้างขึ้นโดยไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีลำดับกรดอะมิโนที่ส่งผลให้ซี-ไฟโคไซยานินมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงด้วย

ปัจจุบันมีการศึกษาและการนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย อาทิ ใช้เป็นสารสีผสมในอาหารและเครื่องสำอาง ใช้เป็นสารฟลูออเรสเซนต์ (Richa *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2013) และใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางเภสัชกรรม อาทิ สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Estrada *et al.*, 2001; Romay *et al.*, 2003) สารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory agent) (Shih *et al.*, 2009) และสารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) (Muthulakshmi *et al.*, 2012) เป็นต้น อย่างไรก็ตามกระบวนการทางอุตสาหกรรมมักจะมีขั้นตอนที่มีการใช้อุณหภูมิสูงเข้ามาเกี่ยวข้องซึ่งอาจส่งผลต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน มีการศึกษาซี-ไฟโคไซยานินจาก *Spirulina* sp. ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง พบว่าเมื่ออบซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 59 และ 64 องศาเซลเซียส ที่ pH 7 เป็นเวลา 30 นาที ซี-ไฟโคไซยานินคงสภาพการทำงานไว้ได้เพียง 52% และ 33% ตามลำดับ (Chaiklahan *et al.*, 2012) ในขณะที่ *T. elongatus* TA-1 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง เมื่ออบซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ที่ pH 7 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าซี-ไฟโคไซยานินสามารถคงสภาพการทำงานได้ถึง 80.26% และ 65.65% ตามลำดับ (Leu *et al.*, 2013) ดังนั้นซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในแหล่งที่มีอุณหภูมิสูงจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่มีกระบวนการให้ความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการโคลนยีนและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระบบ *E. coli* เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากและรวดเร็ว อีกทั้งยังสามารถออกแบบการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีที่ไม่ซับซ้อน ที่ผ่านมามีการศึกษาซี-ไฟโคไซยานินทางด้านชีวโมเลกุลส่วนใหญ่เป็นการศึกษาจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง แต่การศึกษาซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงยังมีไม่มากนัก ยกตัวอย่างเช่น Cherdkiatikul & Suwanwong (2014) ได้โคลนยีนและผลิตโปรตีน CpcA และ CpcB จาก *Spirulina platensis* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง ในระบบ *E. coli* แล้วนำโปรตีนที่ได้มาศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน CpcA และ CpcB สามารถต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซีและเปอร์ออกซีได้ดี แสดงให้เห็นว่าโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินทั้งหน่วยย่อยแอลฟาและเบตาที่ปราศจากไฟโคไซยานินบิลินก็มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Wang *et al.* (2007) ซึ่งได้โคลนยีนและผลิตโปรตีน CpcB จาก *Anabaena* sp. PCC 7120 ในระบบ *E. coli* พบว่าโปรตีน CpcB ที่ได้มีสมบัติที่ช่วยยับยั้งการแพร่กระจาย และกระตุ้นให้เกิดการตาย (apoptosis) ในเซลล์มะเร็งอีกด้วยดังนั้นการศึกษาโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินแต่ละหน่วยย่อยจึงเป็นที่น่าสนใจเช่นกัน

งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหา และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อนในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี (Suwanmanee *et al.*, 2015) โดยการศึกษาในครั้งนี้จะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจในยีนซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงมากขึ้น และยังสามารถคาดการณ์ถึงลำดับกรดอะมิโนที่เป็นตัวกำหนดโครงสร้างของโปรตีนและสมบัติการทนความร้อนของซี-ไฟโคไซยานินด้วย ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้น่าจะเป็นการรายงานครั้งแรกของการโคลนยีนและการคาดการณ์โครงสร้างโปรตีนของซี-ไฟโคไซยานินจาก *Thermosynechococcus* sp. ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงที่แยกได้ในประเทศไทย โดยการศึกษาในขั้นตอนต่อไปผู้วิจัยวางแผนจะนำยีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาที่ได้นี้โคลนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับผลิตโปรตีน และผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาในระบบ *E. coli* เพื่อนำโปรตีนที่ผลิตได้มาศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระต่อไป หากโปรตีน-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีและยังมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงด้วย จักเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาที่มีการใช้อนุมูลสูงเข้ามาเกี่ยวข้อง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนและการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ในอาหารสูตร BG-11 ซึ่งประกอบด้วย NaNO_3 3 กรัม/ลิตร K_2HPO_4 40 มิลลิกรัม/ลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75 มิลลิกรัม/ลิตร $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36 มิลลิกรัม/ลิตร Citric acid monohydrate 6.56 มิลลิกรัม/ลิตร Ferric ammonium citrate 6 มิลลิกรัม/ลิตร EDTA disodium salt 1.04 มิลลิกรัม/ลิตร Na_2CO_3 20 มิลลิกรัม/ลิตร และสารละลายโลหะผสม (H_3BO_3 2.86 กรัม/ลิตร $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 กรัม/ลิตร $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 กรัม/ลิตร $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39 กรัม/ลิตร $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 79 มิลลิกรัม/ลิตร และ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 49.4 มิลลิกรัม/ลิตร) 1 มิลลิกรัม/ลิตร (Rippka *et al.*, 1979) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 100 รอบ/นาที และให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน บั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แบ่งเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย TIANamp Bacteria DNA Kit (TIANGEN, China)

การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณยีน *cpcB*

ตรวจสอบและค้นหายีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตา (*cpcB*) ของไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงจากฐานข้อมูล GenBank นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับเพื่อค้นหาบริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้ของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม CLC sequence viewer 7 (CLC Bio, QIAGEN, USA) จากนั้นนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการออกแบบมาคำนวณค่าต่าง ๆ ได้แก่ ค่า Tm (Melting Temperature), %GC และ primer dimer โดยใช้โปรแกรม Primer3plus (Untergasser *et al.*, 2012) นำคูไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบมาใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *cpcB* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยมีส่วนผสมในปฏิกิริยาดังนี้ 1X บัฟเฟอร์ MgCl_2 2 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ คูไพรเมอร์ 0.2 ไมโครโมลาร์ จีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 100 นาโนกรัม และ TaKaRa Ex Taq™ DNA polymerase (TaKaRa Bio, Japan) 0.5 ยูนิต ปรับปริมาตรเป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ

ปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน คือ denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ในบัฟเฟอร์ 1X TAE โดยใช้ความต่างศักย์เท่ากับ 100 โวลต์ จากนั้นนำเจลอะกาโรสมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 15 นาที แล้วถ่ายรูปลงฟิล์มภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation

การโคลนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

ทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pGEM-T Easy โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas, Canada) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทรานสฟอร์มผลิตภัณฑ์จากการเชื่อมด้วยวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* DH5 α ที่ผ่านการทำให้เป็นคอมพีเทนต์ ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธี Blue-White Screening (Sambrook & Russell, 2001) บนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วยแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีการเติมสารละลาย IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) ความเข้มข้น 20% โดยมวล/ปริมาตร ปริมาตร 7 ไมโครลิตร และสารละลาย X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galactopyranoside) ความเข้มข้น 2% โดยมวล/ปริมาตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บนผิวหน้าของอาหาร และตรวจสอบเซลล์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีน *cpcB* แทรกอยู่ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ (Colony PCR: Colony Polymerase Chain Reaction) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M13-F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') และ M13-R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') จากนั้นสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ด้วย TIANpure Midi Plasmid Kit (TIANGEN, China) แล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่บริษัท Macrogen (Korea)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล Genbank จากนั้นแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม CLC sequence viewer 7 แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอื่น ๆ ในฐานข้อมูล Genbank เช่นกัน โดยใช้โปรแกรม BLASTn และ BLASTp (Altschul *et al.*, 1990, 1997) ตามลำดับ เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่มีความใกล้เคียงกัน สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogentic tree) จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB ที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB จากไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยหลักการ Maximum Likelihood โดยใช้โปรแกรม Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016) คำนวณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) โดยใช้โปรแกรม ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) ทำนายโครงสร้างของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม GOR4 (Garnier *et al.*, 1996), SWISS-MODEL (Guex *et al.*, 2009) และ PyMOL Molecular Graphics System 1.8 (Schrödinger, 2015) และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB ที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB จากไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ทั้งที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลางและอุณหภูมิสูงด้วยโปรแกรม CLUSTAL OMEGA (Sievers *et al.*, 2011)

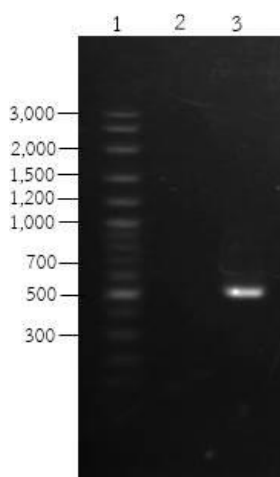
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การเพิ่มปริมาณและการโคลนยีน *cpcB*

ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cpcB* ได้ออกแบบจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูง *T. elongates* BP-1 (BA000039), *Thermosynechococcus* sp. NK55 (CP006735) และ *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab (CP000239) มาเปรียบเทียบกันเพื่อหาบริเวณที่มีการอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยได้เลือกออกแบบไพรเมอร์จากส่วนปลาย 5' และส่วนปลาย 3' ของยีนซึ่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูงและเป็นส่วนที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ครอบคลุมทั้งยีน โดยไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบแสดงดังตารางที่ 1 ต่อมาเมื่อเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันพบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส แสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของยีน *cpcB* จากไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ทั้งที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลางและอุณหภูมิสูงในฐานข้อมูล GenBank เช่น *T. elongates* BP-1(BA000039), *Arthrospira platensis* (BA189626) และ *Tolypothrix* sp. PCC 7601 (CAA30064) เป็นต้น

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน *cpcB*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	ขนาดของไพรเมอร์	Tm (°C)	%CG
<i>cpcB</i> -F	5'-ATGCTAGATGCATTTGCCAAAGTTG-3'	25 นิวคลีโอไทด์	65.4 °C	40.0%
<i>cpcB</i> -R	5'-TTAGGCAACAGCGGCAGCGGC-3'	21 นิวคลีโอไทด์	73.5 °C	66.7%

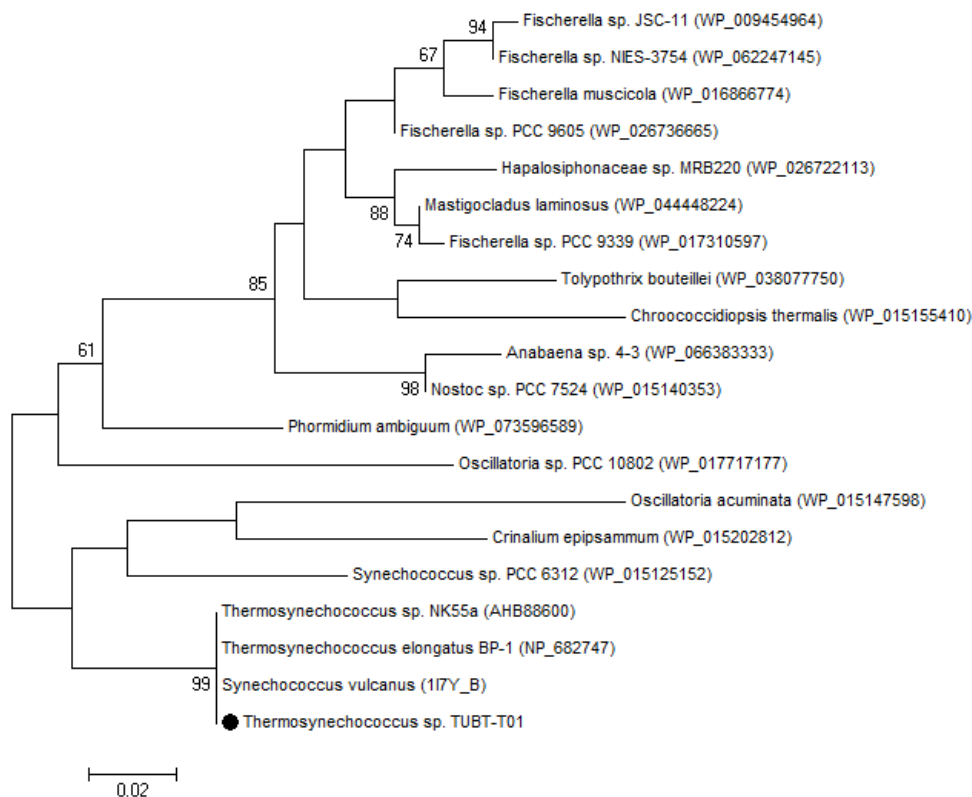


ภาพที่ 1 ผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน หมายเลข 1 คือ VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia) หมายเลข 2 คือ ผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมเชิงลบ) และหมายเลข 3 คือ ผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่เติมจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่บริสุทธิ์มาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T easy และทรานสฟอร์มผลิตภัณฑ์ที่ได้เข้าสู่ *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลลิน IPTG และ X-gal โดยโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่จะมีสีน้ำเงิน ส่วนโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่จะมีสีขาว สุ่มโคโลนีสีขาวมาทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M13-F กับ M13-R ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนหนึ่งของเวกเตอร์ pGEM-T easy และจะสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ผ่านส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ โดยโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน *cpcB* แทรกอยู่ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จะมีขนาดประมาณ 700 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน *cpcB* ประมาณ 500 คู่เบส รวมกับส่วนของเวกเตอร์ขนาดประมาณ 200 คู่เบส และนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คัดเลือกได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *cpcB* จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีขนาด 519 คู่เบส และมีความเหมือนสูงสุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcB* จาก *Thermosynechococcus* sp. NK55a (CP006735), *T. elongatus* BP-1 (BA000039) และ *S. vulcanus* (AF333174) อยู่ 97% เมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cpcB* ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มีความยาว 172 กรดอะมิโน และมีความเหมือนสูงสุดกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. NK55a (AHB88600), *T. elongatus* BP-1 (NP_682747) และ *S. vulcanus* (117Y_B) อยู่ 100% จากการนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB จากไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ทั้งที่อาศัยในอุณหภูมิต่ำปานกลางและอุณหภูมิสูงในฐานข้อมูล GenBank ด้วยหลักการ Maximum Likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ดังภาพที่ 2 พบว่าโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความสัมพันธ์เดียวกับโปรตีน CpcB จาก *T. elongatus* BP-1, *Thermosynechococcus* sp. NK55 และ *S. vulcanus* ด้วยค่า bootstrap 99% โดยไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงเช่นกัน (Adir *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002; Stolyar *et al.*, 2014)



ภาพที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน CpcB วิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยกำหนดค่าการทำ bootstrap เท่ากับ 1,000 รอบ

การวิเคราะห์สมบัติและการทำนายโครงสร้างของโปรตีน CpcB

การคำนวณสมบัติทางเคมีกายภาพ

การคำนวณสมบัติทางเคมีกายภาพทำให้สามารถทำนายถึงสมบัติของโปรตีนและช่วยในการออกแบบสภาวะที่ใช้ในการทดลองให้เหมาะสมกับสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ จากการคำนวณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ด้วยโปรแกรม ProtParam พบว่าโปรตีน CpcB มีมวลโมเลกุล 18.19 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 5.12 ค่า Instability index เท่ากับ 35.55 และค่า Hydropathicity index เท่ากับ 0.071 ดังตารางที่ 2 โดยการทราบค่า pI จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับโปรตีนและการเลือกใช้คอลัมน์ในขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ สำหรับค่า Instability index พบว่าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า 40 สามารถคาดการณ์ได้ว่าโปรตีน CpcB น่าจะมีเสถียรภาพดีในสารละลาย (Guruprasad *et al.*, 1990) และค่า Hydropathicity index พบว่ามีค่าที่ค่อนข้างต่ำ แสดงให้เห็นว่าโปรตีน CpcB อาจมีความเป็น hydrophilic สูง และสามารถละลายน้ำได้ดี (Kyte & Doolittle, 1982) ซึ่งสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ที่คำนวณได้นี้มีความเหมือนกันกับของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. NK55a *T. elongatus* BP-1 และ *S. vulcanus* เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 100% แต่จะมีค่าต่างจากสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน CpcB จาก *Arthrospira platensis* (BAI89626) ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง (Fujisawa *et al.*, 2010) โดยมีค่า Instability index เกิน 40 และมีค่า Hydropathicity index สูงกว่าโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 อยู่มาก แสดง

ให้เห็นว่าโปรตีน CpcB จาก *A. platensis* อาจมีเสถียรภาพและการละลายน้ำที่ต่ำกว่าโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

ตารางที่ 2 การทำนายสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

สมบัติทางเคมีกายภาพ	CpcB (<i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01)	CpcB (<i>A. platensis</i>) (Fujisawa <i>et al.</i> , 2010)
ขนาด (กรดอะมิโน)	172	172
มวลโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	18.19	18.05
ค่า pI (Isoelectric point)	5.12	4.96
Instability index	35.55	40.90
Hydropathicity index	0.071	0.141

การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิ

การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และตติยภูมิ (tertiary structure) ของโปรตีนเป็นวิธีทางชีวสารสนเทศที่นิยมใช้ในการศึกษาและคาดการณ์โครงสร้าง สมบัติ และหน้าที่ของกรดอะมิโนหรือโปรตีน ในการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ด้วยโปรแกรม GOR4 ได้ผลดังภาพที่ 3 พบว่าโครงสร้างโปรตีนประกอบด้วย α -helix 8 โครงสร้าง ซึ่งมีสัดส่วนเป็น 64.53% ของโครงสร้างโปรตีนทั้งหมด ที่เหลือเป็นโครงสร้าง loop และ turn 35.47% ซึ่งพบกระจายอยู่ทั่วไปภายในโปรตีน เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB ที่ได้พบว่ามีกรดอะมิโนซิสเทอีนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในตำแหน่งที่ 82 และ 153 โดยกรดอะมิโนซิสเทอีนตำแหน่งที่ 82 พบในโครงสร้าง α -helix ส่วนกรดอะมิโนซิสเทอีนตำแหน่งที่ 153 พบในโครงสร้าง loop หรือ turn ของโปรตีน มีการศึกษาโครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. vulcanus* ซึ่งรายงานว่ากรดอะมิโนซิสเทอีนในทั้ง 2 ตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งจับกับไฟโคไซยานินซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของซี-ไฟโคไซยานิน (Adir *et al.*, 2001) สำหรับการทำนายโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL พบว่าโปรแกรมได้สร้างโครงสร้างสามมิติโดยใช้โครงสร้างซี-ไฟโคไซยานินจาก *T. vulcanus* (1on7.1.B) (Adir *et al.*, 2003) เป็นต้นแบบ ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เท่ากับ 100% จากนั้นได้นำผลจากการทำนายด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL มาจำลองโครงสร้างโปรตีนโดยใช้โปรแกรม PyMOL Molecular Graphics System 1.8 ได้ผลดังภาพที่ 4 พบว่าโครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วย α -helix 9 โครงสร้าง ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยโครงสร้าง loop และ turn ในขณะที่ผลจากการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิพบว่ามี α -helix เพียง 8 โครงสร้าง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิมีหลักการวิเคราะห์ผลที่แตกต่างกันโดยการทำนายโครงสร้างโปรตีนในระดับทุติยภูมิเป็นการทำนายโดยการจัดจํารูปแบบของกรดอะมิโนและลักษณะต่าง ๆ ภายในโปรตีนด้วยวิธีทางสถิติ ในขณะที่การทำนายโครงสร้างโปรตีนในระดับตติยภูมิเป็นการทำนายโดยอาศัยความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน ซึ่งต้นแบบในฐานข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบมาจากการทดลองทาง X-ray crystallography หรือ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ที่ทราบโครงสร้างสามมิติแล้ว สำหรับการทดลองนี้คาดว่าผลจากการทำนายโครงสร้างตติยภูมิน่าจะมีความถูกต้องมากกว่าผลการ

การศึกษาความเกี่ยวข้องกับเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง

การที่โปรตีนมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่าง ๆ เช่น จำนวนพันธะไฮโดรเจน ปริมาตรตัวบริเวณพื้นผิว องค์ประกอบของกรดอะมิโน และการสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างกรดอะมิโน เป็นต้น ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาและเปรียบเทียบโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลางและอุณหภูมิสูง ซึ่งพบว่าปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของโปรตีนที่อุณหภูมิสูงอย่างมีนัยสำคัญ คือ ปริมาณการสร้างปฏิสัมพันธ์เชิงประจวบและขั้วของกรดอะมิโนภายในโปรตีน ในขณะที่ปัจจัยอื่น ๆ มีแนวโน้มที่ไม่ชัดเจนในการเพิ่มเสถียรภาพของโปรตีนที่อุณหภูมิสูง (Szilágyi & Závodszy, 2000; Adir *et al.*, 2001) โดยในการศึกษานี้ได้วิเคราะห์ความเกี่ยวข้องของโครงสร้างโปรตีนกับเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงโดยการนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB จากไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ทั้งที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลางและอุณหภูมิสูง ซึ่งได้เลือกมา 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CpcB จากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูง *T. elongatus* BP-1 (NP_682747) และ *S. vulcanus* (117Y_B) (Adir *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002) และไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง *Synechococcus* sp. PCC 7003 (ANV84890), *Tolypothrix* sp. PCC 7601 (CAA30064) และ *A. platensis* (BAI89626) (Conley *et al.*, 1988; Fujisawa *et al.*, 2010) ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 5 พบว่ามีกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่มีการอนุรักษ์ไว้ในไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูง *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01, *T. elongatus* BP-1 และ *S. vulcanus* แต่ไม่พบในไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง *Synechococcus* sp. PCC 7003, *Tolypothrix* sp. PCC 7601 และ *A. platensis* ได้แก่ กรดอะมิโนอะลานีนตำแหน่งที่ 10 กรดอะมิโนทรีโอนีนตำแหน่งที่ 20 กรดอะมิโนแอสพาราจีนตำแหน่งที่ 21 กรดอะมิโนแอสพาราจีนตำแหน่งที่ 29 กรดอะมิโนอะลานีนตำแหน่งที่ 58 กรดอะมิโนกลูตามีนตำแหน่งที่ 68 กรดอะมิโนลิวซีนตำแหน่งที่ 98 กรดอะมิโนเซอรีนตำแหน่งที่ 102 กรดอะมิโนกลูตามีนตำแหน่งที่ 118 กรดอะมิโนอะลานีนตำแหน่งที่ 130 และกรดอะมิโนไอโซลิวซีนตำแหน่งที่ 131 จากความแตกต่างของกรดอะมิโนดังกล่าวอาจส่งผลให้โปรตีน CpcB จากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงมีสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงแตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิปานกลาง โดยก่อนหน้านี้ Adir *et al.* (2001) ได้ศึกษาโครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. vulcanus* และรายงานว่ากรดอะมิโนกลูตามีนตำแหน่งที่ 68 ของโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาสามารถสร้างปฏิสัมพันธ์ได้กับกรดอะมิโนอาร์จินีนตำแหน่งที่ 86 ของโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาในมอนอเมอร์ถัดไปได้ และกรดอะมิโนแอสพาราจีนตำแหน่งที่ 21 ของโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยเบตาสามารถสร้างปฏิสัมพันธ์ได้กับกรดอะมิโนกลูตามีนตำแหน่งที่ 161 ของโปรตีนซี-ไฟโคไซยานินหน่วยย่อยแอลฟาในมอนอเมอร์ใกล้เคียงได้ ซึ่งช่วยส่งเสริมความเสถียรของโครงสร้างซี-ไฟโคไซยานินในระดับไตรเมอร์และเฮกซะเมอร์ และสมบัตินี้อาจเกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิสูงด้วย แสดงให้เห็นว่าโปรตีน CpcB จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 อาจมีการสร้างปฏิสัมพันธ์ของกรดอะมิโนเช่นเดียวกับใน *S. vulcanus* ซึ่งอาจส่งผลให้ซี-ไฟโคไซยานินจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 สามารถทำงานได้ดีและมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

- Adir, N., Dobrovetsky, Y., & Lerner, N. (2001). Structure of C-phycoyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 angstrom: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. *Journal of Molecular Biology*, 313, 71-81.
- Adir, N. & Lerner, N. (2003). The Crystal Structure of a Novel Unmethylated Form of C-phycoyanin, a Possible Connector Between Cores and Rods in Phycobilisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 25926–25932.
- 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.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47, 659-664.
- Cherdkiatikul, T. & Suwanwong, Y. (2014). Production of the α and β subunits of *Spirulina* allophycocyanin and C-phycoyanin in *Escherichia coli*: a comparative study of their antioxidant activities. *Journal of Biomolecular Screening*, 19, 959-965.
- Conley, P.B., Lemaux, P.G., & Grossman, A. (1988). Molecular characterization and evolution of sequences encoding light-harvesting components in the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *Journal of Molecular Biology*, 199, 447-465.
- de Lorimier, R., Guglielmi, G., Bryant, D.A., & Stevens, S.E., Jr. (1990a). Structure and mutation of a gene encoding a Mr 33,000 phycocyanin-associated linker polypeptide. *Archives of Microbiology*, 153, 541-549.
- de Lorimier, R., Bryant, D.A., & Stevens, S.E., Jr. (1990b). Genetic analysis of a 9 kDa phycocyanin-associated linker polypeptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1019, 29-41.
- Duerring, M., Schmidt, G.B., & Huber, R. (1991). Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycoyanin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 217, 577-92.
- Estrada, P., Bescos, B.P., & Villar del Fresno, A.M. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*, 56, 497–500.

- Fujisawa, T., Narikawa, R., Okamoto, S., Ehira, S., Yoshimura, H., Suzuki, I., Masuda, T., Mochimaru, M., Takaichi, S., Awai, K., Sekine, M., Horikawa, H., Yashiro, I., Omata, S., Takarada, H., Katano, Y., Kosugi, H., Tanikawa, S., Ohmori, K., Sato, N., Ikeuchi, M., Fujita, N., & Ohmori, M. (2010). Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA research*, 17, 85-103.
- 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.
- Govindjee & Shevela, D. (2011). Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. *Frontiers in Plant Science*, 2, 28: 1-17.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., & Collier, J.L. (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews*, 57, 725-749.
- Guruprasad, K., Reddy, B.V., & Pandit, M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering*, 4, 155-161.
- Guex, N., Peitsch, M.C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*, 30, S162-S173.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132.
- Leu, J.Y., Lin, T.H., Selvamani, M.J.P., Chen, H.C., Liang, J.Z., & Pan, K.M. (2013). Characterization of a novel thermophilic cyanobacterial strain from Taian hot springs in Taiwan for high CO₂ mitigation and C-phycocyanin extraction. *Process Biochemistry*. 48, 41-48.
- MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, 124, 311-334.
- Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E., & Busheva, M.C. (2003). Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, 102, 55-59.
- Muthulakshmi, M., Saranya, A., Sudha, M., & Selvakumar, G. (2012). Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from *Spirulina* isolated from fresh water body against various human pathogens. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3, 7-11.

- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kiyokawa C., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., & Tabata, S. (2002). Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Research*, 9, 123-130.
- Prabha, R., Singh, D.P., Gupta, S.K., de Farias, S.T., & Rai, A. (2013). Comparative analysis to identify determinants of changing life style in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, a thermophilic cyanobacterium. *Bioinformatics*, 9, 299-308.
- Pandey, V.D., Pandey, A., & Sharma, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2, 89-97.
- Richa, Kannaujiya, V.K., Kesheri, M., Sihgh, G., & Sinha, R.P. (2011). Biotechnological potentials of phycobiliproteins. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 446-454.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., & Stanier, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61.
- Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D., & Rimbau, V. (2003). C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*, 4, 207-216.
- Sambrook, J.F. & Russell, D.W. (2001). Screening bacterial colonies using X-gal and IPTG: α -complementation. *Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. vol.1.* (pp. 1.123-1.125). In J. Argentine, N. Irwin, K.A. Janssen, S. Curtis, M. Zierler, M. Dickerson, I. Sialiano, N. McInerny, D. Brown, S. Schaefer, D. deBurin, E. Atkeson, D. Weiss, & M.D. Curtis. (Eds.), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schrödinger, L.L.C., (2015). The PyMOL Molecular Graphics System version 1.8. New York.
- Shen, G., Saunée, N.A., Williams, S.R., Gallo, E.F., Schluchter, W.M., & Bryant, D.A. (2006). Identification and characterization of a new class of bilin lyase: the *cpcT* gene encodes a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the beta-subunit of phycocyanin in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 17768-177678.
- Shen, G., Schluchter, W. M., & Bryant, D.A. (2008). Biogenesis of phycobiliproteins I. *cpcS-I* and *cpcU* mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for β -phycocyanin and allophycocyanin subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7503–7512.
- Shih, C.M., Cheng, S.N., Wong, C.S., Kuo, Y.L., & Chou, T.C. (2009). Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin. *Anesthesia and Analgesia*, 108, 1303-1310.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D.G., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., & Higgins, D. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539: 1-6.
- Stolyar, S., Liu, Z., Thiel, V., Tomsho, L.P., Pinel, N., Nelson, W.C., Lindemann, S.R., Romine, M.F., Haruta, S., Schuster, S.C., Bryant, D.A., & Fredrickson, J.K. (2014). Genome sequence of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus* sp. strain NK55a. *Genome Announcements*, 2, e01060-e01013.
- 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.
- Szilágyi, A. & Závodszy, P. (2000). Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure*, 8, 493-504.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., & Rozen, S.G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40, e115: 1-12.
- Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, C.L., & Liu, Z.R. (2007). The recombinant beta subunit of C-phycoyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Letters*, 247, 150-158.
- Yuwadee, P. (2006). *Phycology*. (2nd edition). Chiang Mai: Chotana Print. (Book In Thai).
- Zhou, J., Gasparich, G.E., Stirewalt, V.L., de Lorimier, R., & Bryant, D.A. (1992). The *cpcE* and *cpcF* genes of *Synechococcus* sp. PCC 7002. Construction and phenotypic characterization of interposon mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 16138-16145.