

Abstract

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้าน HIV-1 ของโปรตีนพลาสโตไซยานินที่อยู่ในสิ่งมีชีวิต 3 ชนิด คือ พืชชั้นสูง:ปวยเล้ง (*Spinacia oleracea* L.), พืชชั้นต่ำ:เฟิร์น (*Dryopteris crassirhizoma*) และ ไซยาโนแบคทีเรีย (*Anabaena variabilis*) โดยเลือกข้อมูลลำดับ DNA base และ amino acids จาก database เพื่อทำการสังเคราะห์ยีนขึ้นมาแล้ว express โปรตีนพลาสโตไซยานินขึ้นมาเป็น recombinant protein ใน pET28a(+) *E.coli*.DE3(BL21) แล้วตรวจสอบ recombinant protein ที่ได้ด้วย SDS-PAGE, LC/MS-MS และ EXPASY tool พบว่าเป็น plastocyanin recombinant protein จากนั้นทำการ purify โดยใช้เทคนิค column affinity chromatography อาศัยการ binding ส่วนของ 6xHis-tagged ที่ปลายด้าน N-terminal และ C-terminal ของโปรตีนกับ Nickel ion (Ni^{2+}) จากนั้นได้ทดสอบฤทธิ์ Anti-HIV ด้วย syncytium reduction assay เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบผลกระทบต่อการต้านเชื้อเอชไอวี โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็น Tat/Rev transfected 1A2 cell line กับไวรัสที่เป็นชนิดที่มียีนบกพร่อง ($\Delta^{\text{Tat/Rev}}$ MC99 virus) และตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase HIV1 พบว่าโปรตีนทั้ง 3 ตัวดังกล่าวไม่สามารถหาค่าการทดสอบได้ ที่ ความเข้มข้น 1 mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงสุดเท่าที่เตรียมได้ เนื่องจากกระบวนการที่ทำให้โปรตีนเข้มข้นมีปัญหา soluble protein aggregate

ต่อมาทำการศึกษาโปรตีนพลาสโตไซยานินจากใบพุทธรักษา (*Canna indica* L.) โดยได้ plastocyanin recombinant protein โดยการ clone gene จาก cDNA ที่สกัดได้จากใบพืชโดยตรงแล้วนำโปรตีนที่ได้มาทดสอบ syncytium reduction assay แสดงผลการทดสอบของ EC_{50} ในช่วง 38.54 $\mu\text{g/ml}$ $\text{IC}_{50} > 250 \mu\text{g/ml}$ และค่า TI เท่ากับ $> 6.49 \mu\text{g/ml}$ และ แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase HIV1 ที่ IC_{50} เท่ากับ 6.55 $\mu\text{g/ml}$

Keywords / Plastocyanin, Anti-HIV, Cyanobacterium

Research area / Biotechnology, Pharmaceutical science.

The objective of this study is to compare the anti-HIV activities of plastocyanin: Pc from three groups of organisms including higher plant: *Spinacia oleracea* L.(spinach), lower plant : *Dryopteris crassirhizoma* (fern), and cyanobacterium : *Anabaena variabilis* by synthesizing the encoding gene, cloning, and expression of plastocyanin recombinant proteins in pET28(+);*E.coli*.DE3(BL21). Three encoding genes were chosen from the published sequences in GENE BANK and PDB databases. Pc:spinach, Pc:fern and Pc:cyanobacterium were characterized by SDS-PAGE and LC/MS-MS and further purified by 6xHis-tagged fusion at N-terminal and C-terminal binding on column affinity chromatography. The Pc recombinant proteins were evaluated for their cytotoxic activity and anti-HIV-1 activity using the syncytium reduction assay (a defective $\Delta_{Tat/Rev}$ MC99 virus and Tat/Rev transfected 1A2 cell line) and anti-HIV reverse transcriptase assay. The results of EC50 and IC50 have not been interpreted because soluble protein aggregation occurred during the concentrate processes.

Plastocyanin protein of *Canna indica* L. was cloned using the cDNA from plant and expressed in pET28(+);*E.coli*.DE3(BL21), then characterized by SDS-PAGE, DNA sequencing, and LC/MS-MS. It exhibited the anti-HIV activity by syncytium reduction assay with an EC50 of 38.54 μ g/ml, an IC50 of >250 μ g/ml and TI of >6.49 μ g/ml. It also showed the anti-HIV reverse transcriptase inhibitory activity with an IC50 of 6.55 μ g/ml.

Project Code : TRG5780156

Project Title : Comparison of anti-HIV activity of plastocyanin protein from plants and cyanobacterium

ชื่อโครงการ : เปรียบเทียบฤทธิ์แอนติเอชไอวีโปรตีนพลาสโตไซยานินจากพืชและไซยาโนแบคทีเรีย

Investigator: Dr. Apanchanid Thepouyporn

Department of Tropical Nutrition and Food Science / Faculty of Tropical Medicine / Mahidol University

E-mail Address: apanchanid.the@mahidol.ac.th

Project Period: 5 years (2557-2563)

1. วัตถุประสงค์ เดิม

- เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้าน HIV-1 ของโปรตีนพลาสโตไซยานินที่สกัดจากพืชและไซยาโนแบคทีเรีย

- To compares the anti-HIV activity of purify plastocyanin proteins from plants and cyanobacterium

- เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนพลาสโตไซยานินที่สกัดจากพืชและไซยาโนแบคทีเรีย

- To characterizes plastocyanin proteins of plants and cyanobacterium

แต่หลังจากเริ่มทำการทดลองพยายามที่จะ purify โปรตีนจากพืชธรรมชาติโดยตรงไม่ประสบความสำเร็จ เพราะ ปริมาณที่ได้้น้อยมาก และไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ จึง เปลี่ยนมาเป็นการผลิตโปรตีนโดย recombinant protein จาก *E.coli* แทน

บทที่ 1

บทนำ

โรคเอดส์เป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องชนิดหนึ่ง ที่ส่งผลให้ผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันต่ำจนไม่สามารถต่อสู้กับเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายได้ ทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสและอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับเอดส์ (AIDS-related malignancies) ได้ โดยโรคเอดส์มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส HIV (Human Immunodeficiency Virus) ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่มรีโทรไวรัส (retrovirus) การดูแลรักษาเอชไอวีนั้นประกอบไปด้วย 2 ส่วนใหญ่ คือ การรักษาด้วยยาต้าน เอชไอวีและการดูแลด้านอื่นๆ ซึ่งทั้งสองส่วนนี้จำเป็นต้องทำควบคู่กันเพื่อให้เกิดผลดีที่สุดต่อผู้ติดเชื้อเป้าหมายของการรักษาด้วยยาต้านเอชไอวี คือ เพื่อลดปริมาณเชื้อ ไวรัสในกระแสเลือดให้ต่ำที่สุด (<50copies/mL) และนานที่สุดรวมถึงให้จำนวน CD4 กลับสู่ระดับปกติมากที่สุด ทำให้ผู้ป่วยไม่เสี่ยงต่อโรคแทรกซ้อนต่างๆ ที่สัมพันธ์ต่อการ ติดเชื้อเอชไอวี (AIDS-related illness) และลดโรคแทรกซ้อนที่ไม่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี (Non AIDS-related illness) การรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์จำเป็นต้องใช้ปริมาณเป็นจำนวนมากจากการที่ต้องใช้ยาต้านไวรัสซึ่งมีราคาแพง อีกทั้งการรักษาในโรงพยาบาลหรือการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่ค่อนข้างสูง ยาต้านไวรัส HIV ที่ได้ผลส่วนใหญ่จัดอยู่ในคลาสใดคลาสหนึ่งจาก 10 คลาส ของสารยับยั้งไวรัส HIV ตามขั้นตอนที่เข้าขัดขวางในการเพิ่มจำนวนของไวรัส ได้แก่ ขั้นตอนการเกาะจับกับเซลล์โฮสต์ (attachment หรือ adsorption) การเข้าสู่เซลล์โฮสต์ (fusion) การสลายแคปซิด (uncoating) การสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์และส่วนประกอบของไวรัส (reverse transcription, integration, DNA replication, transcription, translation) ระบุเป็นไวรัสโดยสมบูรณ์ (maturation) ไปจนถึงระยะปลดปล่อยออกจากเซลล์ (assembly/release) ในปัจจุบันยาต้านไวรัส HIV ที่ได้รับอนุญาตให้ใช้นั้น มีกลุ่มใหญ่ 3 กลุ่ม คือ 1. ยากลุ่ม nucleoside analogs และ 2. non-nucleoside analogs reverse transcriptase inhibitors ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase และ 3. ยากลุ่ม protease inhibitors ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protease นอกจากนี้ยังมีกลุ่ม Integrase inhibitor เป็นยาทางเลือก แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาเหล่านี้ในระยะเวลาอันยาวนานมีข้อจำกัดในเรื่องความเป็นพิษ ผลข้างเคียงจากการใช้ยา และเกิดการดื้อต่อยาของเชื้อไวรัส ซึ่งเกิดจากอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงของไวรัส

HIV ส่งผลให้เกิดการพัฒนาของการดื้อยาที่ใช้อย่างรวดเร็ว (Tantillo et al.,1994, Jakobsen et al., 2010)

จากจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเอดส์ทั่วโลก การค้นคว้าหาาใหม่ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัส HIV เพื่อรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์ จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างเร่งด่วน นักวิจัยจากทั่วโลกได้พยายามศึกษาวิจัยค้นคว้าหาการรักษาผู้ป่วยเอดส์ โดยมุ่งไปที่การหาต้านไวรัส ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส HIV จากสารออกฤทธิ์ทางยาต่างๆ ทั้งสารเคมีสังเคราะห์ รวมทั้งสารสกัดจากธรรมชาติ ซึ่งมีความหลากหลายทางโครงสร้างและเป็นแหล่งที่น่าสนใจในการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ เพื่อต่อต้านไวรัส HIV มีการศึกษาพบสารจากธรรมชาติหลายชนิดที่มีศักยภาพในการยับยั้งการติดเชื้อ HIV และมีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 reverse transcriptase เช่น Pokeweed antiviral protein (PAP) ที่ได้จาก *Phytolacca Americana* L. และ trichosanthin จาก *Trichosanthes kirilowii* Maxim พบว่ายับยั้งการจำลองแบบเอชไอวีในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงและเรื้อรังและขนาดใหญ่ (Ng et al.,1997) Woradulayapinij และคณะ (2005) พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์ขนาด 31 kDa และ 14 kDa จากเหง้าของ *Canna indica* L. มีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลอง Huskens และคณะ (2010) รายงานว่าโปรตีน cyanovirin-N จาก *Nostoc ellipsosporum* สามารถยับยั้งการติดเชื้อโดย HIV-1 ที่ถูกดัดแปลงจากห้องปฏิบัติการหลายสายพันธุ์

จากวิจัยก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยและคณะ (Thepouyporn et al.,2012) พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์ขนาด 10 kDa ของพลาสโตไซยานินจากสารสกัดน้ำจากใบพุทธรักษา (*Canna indica* L.) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 9.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการทดสอบด้วยวิธี colorimetric method และมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเกิด syncytium จากการทดสอบ Syncytium inhibition assay โดยใช้ defective Δ Tat/Rev MC99 virus เพาะเลี้ยงใน Tat/Rev transfected 1A2 cell line

นอกจากนี้งานวิจัยดังกล่าวยังเป็นการพบฟังก์ชันใหม่ของ plastocyanin (Pc) จาก *C. indica* L. ซึ่งเป็นการค้นพบสารต้านไวรัส HIV จากธรรมชาติชนิดใหม่ที่น่าสนใจในการศึกษาพัฒนาต่อยอด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจเป็นความหวังใหม่ในการค้นหายาต้านไวรัส HIV ที่ดีวยาและลดต้นทุนการผลิตยาอีกด้วย มีข้อมูลว่าพลาสโตไซยานินจากแหล่งที่มาต่างกันจะมีคุณสมบัติโครงสร้างที่ต่างกัน (Sato et al.2003,

De Rienzo et al., 2004) จึงมีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านไวรัส HIV ของ plastocyanin จาก photosynthesis organisms ชนิดอื่นๆ เช่น พืชชั้นสูง พืชชั้นต่ำ และไซยาโนแบคทีเรีย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้เลือกทำการศึกษาในเฟิร์นข้าหลวง (*Asplenium nidus* L.) เป็นตัวแทนพืชชั้นต่ำ ปวยเล้ง หรือ spinach (*Spinacia oleracea* L.) เป็นตัวแทนพืชชั้นสูง และสาหร่ายสไปรูลีนา (*Spilurina platensis*) เป็นตัวแทนกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย โดยทำการเตรียมโปรตีนพลาสโตไซยานินบริสุทธิ์จากทั้งสามแหล่งให้เพียงพอเพื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการต้านไวรัส HIV และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนพลาสโตไซยานินที่สกัดจากพืชและไซยาโนแบคทีเรีย

พลาสโตไซยานิน Plastocyanin เป็นโปรตีนขนาดเล็กประมาณ 11 kDa, 91-105 amino acids ที่มีทองแดงซึ่งทำหน้าที่เป็น shuttles electrons ถ่ายโอนอิเล็กตรอน จาก cytochrome F (Cyt) และ cytochrome b6f complex to P700+ ในขบวนการ photosystem I (PSI) in oxygenic photosynthesis พบได้ในพืชหลากหลายชนิดซึ่งมีการสังเคราะห์แสง โปรตีนนี้เป็นต้นแบบของโปรตีนทองแดงสีฟ้าซึ่งเป็นครอบครัวของ metalloproteins (Ubbink, 2004)

Keywords : Plastocyanin, Anti-HIV, Cyanobacterium

บทที่ 2

การทดลอง

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

- พืชชั้นสูง คือ ปวยเล้ง Spinach (*Spinacia oleracea* L.) ซื้อจากร้านโครงการหลวงดอยคำ
- พืชชั้นต่ำ คือ เฟิร์นข้าหลวง Fern (*Asplenium nidus* L.)
- ไซยาโนแบคทีเรีย คือ สาหร่าย spirulina (*Spirulina platensis*)
ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการหลวงสวนจิตรลดา

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

EnzChek® Reverse Transcriptase Assay Kit, (E-22064)	USA
HIV-1 reverstranscriptase	Calbiochem
Plastocyanin secondary Antibody	Agrisenra AB, Sweden
Dialysis bag MWCO 6-8000 Da,	Spectrum Medical
Amicon Centrifugal Filter 3K	Merck, Ireland
Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane	Millipore, USA
Pink Plus Prestained Protein Ladder	GeneDirecX
SeaKem® GTG® Agarose powder	FMC, USA
GeneRuler™ 1 kb DNA ladder	Fermentas, USA
GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus	Fermentas, USA
<i>Bam</i> HI	Invitrogen, USA
<i>Hind</i> III	Invitrogen, USA
Column DEAETrap™	GE Healthcare, USA
Column HisTrap™ FF5ml	GE Healthcare, USA
GeneArt Gene Synthesis	Invitrogen, Germany
Thrombin protease	ChemEX

3. วิธีการทดลอง

โดยเบื้องต้นได้ทำการสกัดโปรตีนพลาโตไซยานินจาก 3 ตัวอย่างดังนี้ คือ

3.1 การสกัดโปรตีนพลาโตไซยานินจากจากปวยเล้ง (*Spinacia oleracea* L.)

ทำดังต่อไปนี้ (Navarro JA, 2011)

- 1 นำต้นปวยเล้งมาล้างด้วยน้ำเย็น แล้วตัดเอาเฉพาะใบ 500 กรัม มาปั่นกับ buffer A 700 ml (0.4M Sucrose, 15mM NaCL in 20mM Tricine-KOH pH8.0)
- 2 กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนของเหลวไป centrifuge 300xg 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่เป็นตะกอน
- 3 นำส่วนของเหลวไป centrifuge 4,000xg 10 นาที เพื่อตกเฉพาะ chloroplasts
- 4 นำส่วนตะกอนที่เป็น chloroplasts suspend ใน Buffer B แล้วนำสารละลายไป homogenize
- 5 นำสารละลายข้างต้นไป stir ต่อ ในที่มืด 10 นาที แล้วนำไป centrifuge 30,000xg 20 นาที
- 6 นำตะกอนที่ได้ ละลาย distill water 200 ml แล้วนำไป homogenize
- 7 ขั้นตอนการวัด ปริมาณคลอโรฟิลล์ ที่ได้จากข้อ 6
 - *100 μ l สารละลายในข้อ 6 ละลายใน 20 ml ของ 80% acetone in water
 - *vigorous mixing แล้ว centrifuge 13,000xg 5 นาที ที่ซึ่งตะกอน
 - *เอาส่วน supernatant วัด spectrometer ที่ Abs 652 nm ค่าที่ได้หารด้วย extinction coefficient of 34.5 mg chlorophyll/ml.cm คูณ 1000
 $(OD \times 1000) / 34.5 =$ จำนวน chlorophyll mg
- 8 ละลายปริมาณ chlorophyll ที่วัดได้จากข้อ 7 อัตราส่วน 1.5 mg /ml (10mM Tris-HCl pH8)
- 9 เติม pyridine อัตราส่วน 0.7ml ต่อ 100ml of chlorophyll solution (ข้อ 8) แล้วนำไป stir 30 นาที
- 10 จากนั้นนำไป sonicate (on ice bath)
- 11 เติม polyethyleneimine (0.1M) 1 ml or Streptomycin sulfate(0.1M) : solution จาก ข้อ 10 5 ml แล้ว stir ต่อ อีก 15 นาที พัก 30 นาที แล้วเติม solid $MgCl_2$ ต่อเนื่องจนได้ final conc ที่ 5 mM
- 12 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 14,000xg 15 นาที
- 13 ที่ซึ่งตะกอน แล้วนำ สารละลายไป lyophilize

- 14 ละลาย ตัวอย่าง lyophilize ข้อ 13 ใน 10 mM Tris-HCl pH8 แล้ว dialysis ใน 10 mM Tris-HCl pH8
- 15 นำ solution ที่ dialysis แล้วไป ผ่าน DEAE column ต่อไป
- 3.2 การสกัดโปรตีนพลาสโตไซยานินจากเฟิร์นข้าหลวง (*Asplenium nidus* L.)
นำต้นเฟิร์นข้าหลวงมาล้างแล้วตัดเอาเฉพาะใบ 500 กรัม มาปั่นกับ buffer A 700 ml (0.4M Sucrose, 15mM NaCl in 20mM Tricine-KOH pH8.0) โดยใช้ขั้นตอนเดียวกับการสกัด ผักปวยเล้ง
- 3.3 การสกัดโปรตีนพลาสโตไซยานินจาก Spirulina
ทำดังต่อไปนี้
 - 1 นำ Spirulina สดทำ lyophilize ให้แห้ง 5 กรัม (น้ำหนักสด 500g จะได้ น้ำหนักแห้ง 50g) มาปั่นกับ buffer C 100 ml (1 mM PMSF, 1 mM EDTA in 20mM Sodium phosphate pH7.0)
 - 2 stir ในที่มืด 1 ชั่วโมง แล้วนำไป sonicate power 50% เพื่อให้ cell break
 - 3 นำไป centrifuge 5,000 rpm 3 นาที
 - 4 นำส่วน solution ไป sonicate power 50% จากนั้นเติม NaCl 0.29 g / 100 ml solution ให้ได้ final conc 50 mM
 - 5 นำสารละลายข้างต้นไป stir ต่อ ในที่มืด 10 นาที แล้วนำไป centrifuge 12,000xg 20 นาที ทิ้งตะกอน
 - 6 นำส่วน solution ที่ได้ เติม streptomycin 0.1M (7ml/100 ml) แล้วนำ solution ไป stir อย่างแรง หลังจากนั้น ลดความแรงลง stir ต่อไปเบาๆ อีก 1 ชม. แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 ชม.
 - 7 นำสารละลายข้อ 6 มา centrifuge 12000 rpm 20 นาที ทิ้งส่วนตะกอน
 - 8 นำสารละลายจากข้อ 7 มาตกตะกอนด้วย 60% ammonium sulfate (36.1g/100ml) ปรับ pH 7 ด้วย 4N NaOH
 - 9 stir solution 1 ชม. แล้วนำไป centrifuge 12000 rpm 20 นาที
 - 10 นำส่วนใสจากข้อ 9 มา ตกตะกอนต่อที่ 98% ammonium sulfate (27.5g/100ml) stir solution ต่อจน ammonium sulfate ละลายหมด
 - 11 นำ solution จากข้อ 10 centrifuge 12000 rpm 20 นาที
 - 12 นำ ตะกอนจากข้อ 11 มา ละลายใน 10mM Tris-HCl buffer pH 7 แล้ว dialyzed ต่อ อีกใน buffer เดิม

13 นำ solution ที่ dialyzed แล้วไปทำให้บริสุทธิ์โดย ผ่าน Hitrap DEAE Sepharose ในขั้นตอนต่อไป

3.4 การตกตะกอนโดยใช้วิธี ammonium sulfate precipitation ที่ 30%, 60%, 90% (Harris, 1989)

นำส่วนของตัวอย่างที่ต้องการสกัดโปรตีนมาทำให้เซลล์แตก ถ้าเป็นพืชก็นำมาหั่นแล้ว blend กับ distilled water เย็น ถ้าเป็น spirulina ก็นำมา sonicate กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นเติม ammonium sulfate ลงไปละลายตามเปอร์เซ็นต์ที่ต้องการ แล้วนำไป centrifuge เพื่อเอาตะกอนที่ได้จาก ammonium sulfate precipitation มาละลาย 1mM EDTA phosphate buffer แล้วนำไป dialyzed เอา ammonium sulfate ออก แล้ว aliquot เก็บไว้ -20 °C และบางส่วนนำไป lyophilized เพื่อเตรียมความเข้มข้น แล้วละลายกับเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการก่อนนำไปทดสอบ

3.5 การ purify protein ด้วย Hitrap DEAE Sepharose column

Protein solution ที่ผ่านการ dialyzed แล้วที่อยู่ใน Tris-HCl buffer แล้วนำมาผ่าน Hitrap DEAE Sepharose column ปริมาณโปรตีนที่ load 15 mg total protein monitored at 280 nm, Buffer A: 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. Buffer B: 10mM Tris-HCl buffer buffer, pH 7.0, 1M NaCl. Protein elutes with stepwise ionic strength gradients at 25, 50, 75, 100% of buffer B

3.6 การตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยการวัด Bradford (Bradford, 1976)

วัดปริมาณโปรตีนด้วย Bradford โดยเทียบกับ standard curve ของ BSA ที่ ความเข้มข้นต่างๆ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/ml

3.7 การตรวจสอบคุณภาพโปรตีนด้วย

* SDS-PAGE

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) coomassie blue R250 ตามวิธีของ Laemmli (1970) ใช้ Mini Protein II

apparatus (Bio-Rad, USA). The slab gel (6 cm x 8 cm x 0.75 mm) 15% acrylamide ในส่วนของ separating gel and 5% acrylamide ในส่วนของ stacking gel, protein bands ย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue (0.1% Coomassie brilliant blue R250, 40% methanol and 10% glacial acetic acid), แล้ว destained ด้วย destaining solution (15% methanol and 7% glacial acetic acid).

* Western blot and immunodetection

ทำการตรวจสอบพลาสติกไธยานีนโปรตีนโดยใช้วิธี western blot นำโปรตีนที่ต้องการทดสอบ run 15%SDS-PAGE แล้ว transfer blot ลง nitrocellulose membrane จากนั้นจึงนำมาทำขบวนการ immunodetection โดยใช้ anti-plastocyanin polyclonal antibody ของ *Spinacia oleracea* (Agrisera AS06141: <https://www.agrisera.com>) เป็น probe

* Mass spectrometry

นำโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบมา run SDS-PAGE เพื่อแยก ขนาดตาม Molecular weight เจลจะถูกย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 จากนั้น band โปรตีนที่สนใจถูกตัดออกมาแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยขบวนการของ LC-MS/MS แล้วนำข้อมูลที่ได้ซึ่งประกอบด้วยมวลต่อประจุของไอออนตั้งต้น, มวลต่อประจุของไอออนย่อย, ความเข้มของสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากไอออนแต่ละตัว (signal intensities) และจำนวนประจุเหล่านี้จะถูกส่งไปสืบค้นใน Mascot version โดยใช้ฐานข้อมูล Swiss-Prot database

3.8 การ clone plastocyanin gene

1 Spinach (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/21266>) *Spinacia oleracea*

PCSPN

Gene: PC spinach

5'BamHI

GTTGAGGTGTTGCTCGGAGGGGGTGACGGATCATTGGCATTCTTC
CAGGAGACTTCAGCGTAGCCTCGGGCGAGGAGATCGTATTCAAGAA
CAATGCCGGATTCCCCACAACGTAGTGTGTTGACGAGGACGAGATT

CCCTCCGGTGTGACGCCGCGAAGATTTGATGTCCGAGGAGGATT
 TGCTGAATGCACCAGGGGAACTTACAAAGTTACCCTTACTGAGAAA
 GGAAGTTACAAGTTCTACTGCTCACCCACCAGGGTGCTGGTATGGT
 GGGAAAAGTAACTGTCAAC HindIII3'

Frame amino acid : PC spinach

5'BamHI

VEVLLGGGDGSLAFLPGDFSVASGEEIVFKNNAGFPHNVVFEDEDEIPSG
 VDAAKISMSEEDLLNAPGETYKVTLTEKGTYKFYCSPHQGAGMVGKVT
 VN HindIII3'

2 Fern (<https://pdj.org/mine/summary/2bzc>) *Dryopteris Crassirhizoma*

5'BamHI

AKVEVGDEVGNFKFYPSITVSAGEAVEFTLVGETGHNIVFDIPAGAPGT
 VASELKAASMDENDLLSEDEPSFKAKVSTPGTYTFYCTPHKSANMKGT
 LTVK HindIII3'102 aa

3 Cyanobacterium (<https://pdj.org/mine/summary/2gim>) *Anabaena variabilis*

5'BamHI

METYTVKLGSDKGLLVFEPKLTIKPGDTVEFLNNKVPPHNVVFDAALNPAKSAD
 LAKSLSHKQLLMSPGQSTSTTFPADAPAGEYTFYCEPHRGAGMVGKITVAG
 HindIII3'106 aa

Organism	Species	MW(Da)	Amino acid	pI
Spinach	<i>Spinacia oleracea</i>	10470.65	99	4.29
Fern	<i>Dryopteris Crassirhizoma</i>	10776.02	102	4.61
Cyanobacterium	<i>Anabaena variabilis</i>	11234.87	106	6.8

ตารางที่ 2.1 แสดงข้อมูลของยีนที่เลือกมาเปรียบเทียบ MW, จำนวน amino acid และ pI ซึ่งได้จาก การคำนวณของ www.expasy.com

gene spinach นำ sequence DNA มา clone จาก NCBI แต่ gene fern กับ cyanobacterium ไม่มี DNA sequence ใน NCBI เลยเอา sequence amino acid จาก PDB มา synthesize DNA gene โดยให้ใช้ codon usage ของ E.coli แล้วนำมา clone เข้า expression vector pET28a(+) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.1

ยีนของ เฟิร์นข้าหลวง (*Asplenium nidus* L.) ยังไม่มี report ใน data จึง
ต้องเปลี่ยนมาเป็น (*Dryopteris crassirhizoma*)

ยีนของ Cyanobacterium ซึ่ง spirulina ไม่มีใน database จึงเปลี่ยนมา
ใช้ *Anabaena variabilis*.

pET-28a-c(+) Vector s

TI3074 12/98

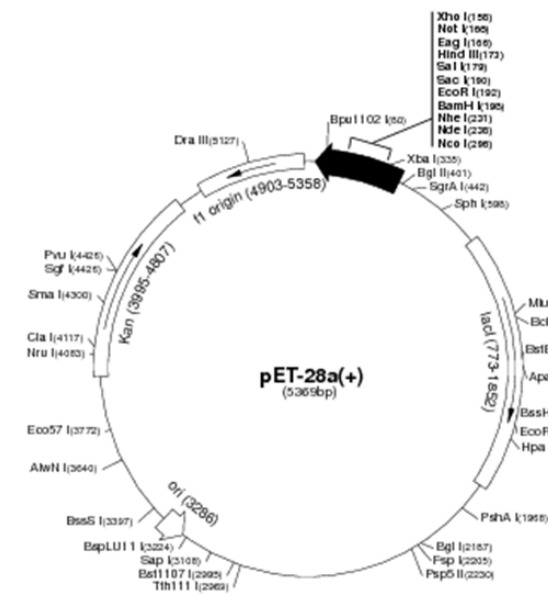
	Cat. No.
pET-28a DNA	03954-3
pET-28b DNA	03955-3
pET-28c DNA	03956-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His•Tag[®]/thrombin/T7•Tag[®] configuration plus an optional C-terminal His•Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The fl origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 03937-3).

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	393
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	297-239
Multiple cloning sites (BamHI-XhoI)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacZ coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
fl origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond BamHI at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond BamHI at 198.



รูปที่ 2.1 แสดง expression vector pET28a(+) ที่ใช้ผลิต recombinant
plastocyanin protein site ที่ใช้ insert gene คือ HindIII และ BamHI

3.9 การศึกษา plastocyanin gene expression

เลี้ยงเชื้อ *E.coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pET-28a:gene plastocyanin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Terrific Broth (100 mL: 1.2 g tryptone, 2.4 g yeast extract, 230 mg KH_2PO_4 , 125 mg K_2HPO_4 , 0.4 ml glycerol) ที่มี 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm จนเชื้อมีความขุ่นที่ OD600 เท่ากับ 0.4-0.6 จึงทำการ induce ด้วย 1 mM IPTG บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ cell แล้วนำมา sonicate ใน binding buffers (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1.5 mM PMSF) บั่นแยกกากเซลล์ ที่ 14,000 rpm 20 นาทีและเก็บส่วนใสกรองผ่าน filter membrane 2 μM ไว้สำหรับ purify ต่อไป

3.10 การศึกษาการ plastocyanin protein Purification ด้วย Hisrap™FF column 5 ml

การแยกโปรตีน recombinant (His)6-tagged protein plastocyanin โดยใช้เทคนิค column affinity chromatography อาศัยการ binding ส่วนของ 6xHis-tagged ที่ปลายด้าน N-terminal และ C-terminal ของโปรตีนกับ Nickel ion (Ni^{2+}) ใน Hisrap Chelating HP affinity colum ขนาด 5 ml (GE Healthcare) เริ่มด้วยการ equilibrate column ด้วย binding buffers (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4) (1 ml/min) ทำการ load โปรตีน 1 ml ล้าง column ด้วย binding buffers ปริมาณ 10 column volume (CV) จากนั้นทำการ elute โปรตีนด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ imidazole โดยใช้ 5 CV ของ elution buffers (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4) เก็บ fraction โปรตีนที่ออกมา fraction ละ 3 mL และนำไปตรวจเช็คโปรตีนด้วย SDS-PAGE จะได้โปรตีน plastocyanin ที่บริสุทธิ์ขึ้น รวม fraction ของโปรตีน plastocyanin นำไป dialyzed แล้วทำให้เข้มข้นตามที่ต้องการ โดยใช้ Amicon Centrifugal Filter 3K และพร้อมที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV ต่อไป

3.11 การทดสอบฤทธิ์ anti-HIV-1

3.11.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ชุด

ทดสอบ EnzChek® Reverse Transcriptase Assay Kit

* การเตรียม reaction mixture

เตรียม template-primer โดยดูดสารละลาย poly(A) ribonucleotide template และ oligo d(T)₁₆ primer อย่างละ 5 ไมโครลิตร ผสมลงในหลอด microtube จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.เจือจางสารละลาย template-primer mixture ลง 200 เท่า โดยดูดสารละลาย template-primer 10 ไมโครลิตร เจือจางใน polymerization buffer ปริมาณ 2 มิลลิลิตร

2.เตรียม reaction สำหรับทดสอบ โดยดูดแบ่งสารละลาย template-primer mixture ที่เจือจางแล้ว 20 ไมโครลิตร ลงในหลอด microtube ขนาด 200 ไมโครลิตร

3.เตรียมเอนไซม์ Reverse transcriptase โดยการเจือจางใน enzyme dilution buffer

4.ดูดสารสกัดตัวอย่างลงในหลอด reaction 2.5 ไมโครลิตร

5.จากนั้นดูดสารละลายเอนไซม์ 2.5 ไมโครลิตร ลงในหลอด reaction ผสมสารให้เข้ากันโดยเขย่าเบาๆ แล้วปั่น spin down ด้วยเครื่อง microcentrifuge ให้ reaction รวมอยู่ที่ก้นหลอด

(เตรียมหลอด control (no enzyme) sample โดยเติม enzyme dilution buffer 5 ไมโครลิตร แทนสารสกัดและสารละลายเอนไซม์)

6.นำหลอด reaction samples ทั้งหมดไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 200 mM EDTA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ลงใน reaction tube และเก็บ reaction tube ไว้ที่ 4°C จนกว่าจะนำไปอ่านค่า

* การวัดค่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ Reverse Transcriptase

1. เตรียมสารละลาย 1x TE buffer โดยการเจือจาง 20 เท่าของสารละลาย 20x TE buffer 1 มิลลิลิตรด้วย nuclease free-water 19 มิลลิลิตร

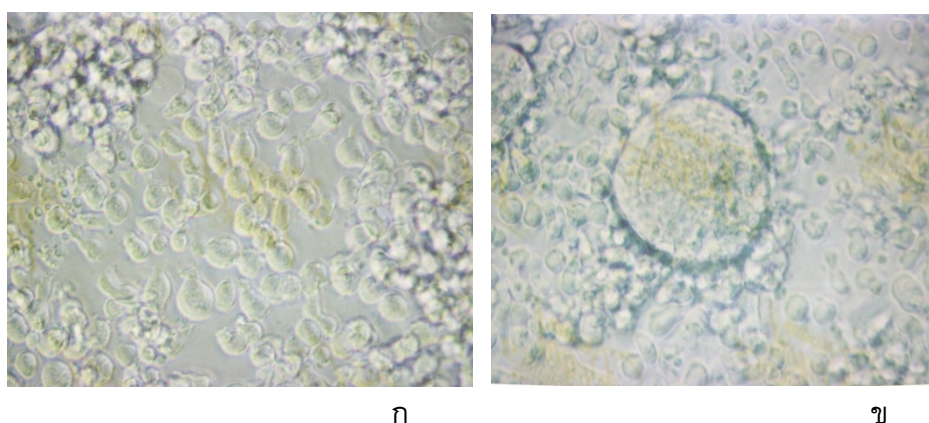
2. เตรียมสารละลาย PicoGreen working solution โดยการเจือจาง PicoGreen reagent 50 ไมโครลิตร ใน 1x TE buffer 17.2 มิลลิลิตร (345-fold dilution) (เตรียมสารละลาย PicoGreen working solution ในภาชนะที่เป็นพลาสติกและปิดมิดชิดป้องกันสารละลายจากแสง)
3. ดูด reaction samples ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสารละลาย PicoGreen Working Solution 173 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well
4. Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที โดยระหว่าง incubate ให้ใช้ foil หุ้มเพื่อป้องกันตัวอย่างจากแสง
5. นำไปวัดปริมาณแสง fluorescence ที่ความยาวคลื่น excitation ~480 nm และ emission ~520 nm
6. คำนวณหาค่า % Inhibition ratio ของสารสกัดตัวอย่างต่อเอนไซม์ reverse transcriptase เปรียบเทียบกับ 1 mM Doxorubicin และ Efanrenz 100 μ M

$$(\%) \text{ IR} = \left[1 - \frac{\text{CPM}(\text{complete system} + \text{protein, drug}) - \text{CPM}(\text{complete system} - \text{RT})}{\text{CPM}(\text{complete system} + \text{RT}) - \text{CPM}(\text{complete system} - \text{RT})} \right] \times 100$$

3.11.2 syncytium reduction assay cell culture

ด้วย syncytium reduction assay เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบผลกระทบต่อการต้านเชื้อเอชไอวี โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็น Δ Tat/Rev transfected 1A2 cell line กับไวรัสที่เป็นชนิดที่มียื่นบกพร่อง (Δ Tat/Rev MC99 virus) แล้วดูการยับยั้งการเกิด syncytium ของโปรตีนที่เราสนใจ ต่อเซลล์ที่ถูก infected ด้วย virus และการจากการคำนวณจะได้ค่าของ EC50 และค่า TI (Therapeutic index) การทดลอง ใช้ 1A2 cell treat ด้วย polybrene แล้ว incubate กับ Δ Tat/Rev MC99 virus ให้ได้ cell ที่ถูก infected ที่ titer ประมาณ 100-200 SFU/50 μ l of virus หลังจากนั้นการทดลอง ใช้ 1A2 cells suspended to 5×10^5 cells/ml แล้ว seed ลง 5×10^4 cells/100 μ l/well into 96-well tissue culture plate ผสมกับ 50 μ l medium and 50 μ l ของ 2-fold dilutions ของโปรตีน โดยมี Azidothymidin เป็น positive control และหลุม control ที่ไม่ใส่ตัวอย่าง และ virus บ่ม 37°C, 5% CO₂ 3 วัน นับ syncytium cell เพื่อให้ได้ค่า 50% of the

infected cell control (EC_{50}) ทำเช่นเดียวกันอีก plate โดยใช้ โปรตีน dilution เดียวกัน incubate กับ cell 1A2 batch เดียวกัน หลังจาก incubate added 50 μ l of XTT (1 mg/ml) tetrazolium salt (Boehringer Mannheim) and 1% phenazine methosulfate (Sigma). ปุ่ม 3 ชม, cell ที่มีชีวิตจะผลิต a yellow-brown color of formazan . The optical densities (OD) วัดที่ A_{450} with a reference at A_{650} Results of the average OD from test (T) and control (C) wells จะ recorded as percent cell viability, $T/C\% [(OD \text{ test} - OD \text{ extract control}) / (OD \text{ cell control} - OD \text{ medium control})] \times 100$, or expressed as the concentration that inhibited metabolic activities of 50% of the cells (IC_{50}) โดยลักษณะการเกิด syncytium ของ cell แสดงไว้ในรูปที่ 2.2



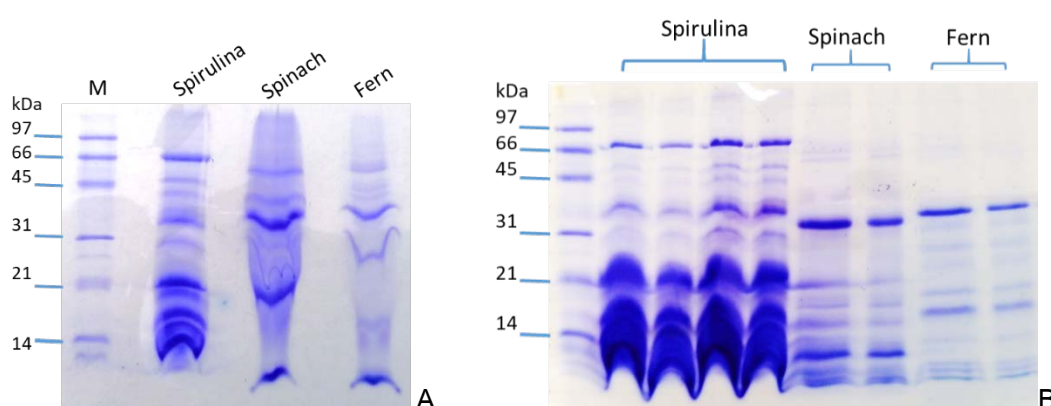
รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะ syncytium forming ของเซลล์ที่ infected โดย HIV ไวรัส ($\Delta_{Tat/Rev}$ MC99) (ข) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (ก)

บทที่ 3

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

1. การสกัดโปรตีนพลาสโตไซยานิน

จากการสกัดโปรตีนพลาสโตไซยานินของแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกัน โดยใช้ขบวนการของ (Navarro JA, 2011) ก่อนผ่าน column DEAE และเทียบกับการสกัดโดยใช้ ammonium sulfate precipitation จะมีความแตกต่างกันของ yield ที่ได้ และ ความบริสุทธิ์ อย่างเห็นได้ชัด ปริมาณของ crude protein ที่ได้จากการสกัดของ Navarro จะได้น้อยกว่ามากและ มีสารตกค้างจากขบวนการสกัดมากกว่าซึ่งจะเห็นได้จาก SDS-PAGE gel ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.1

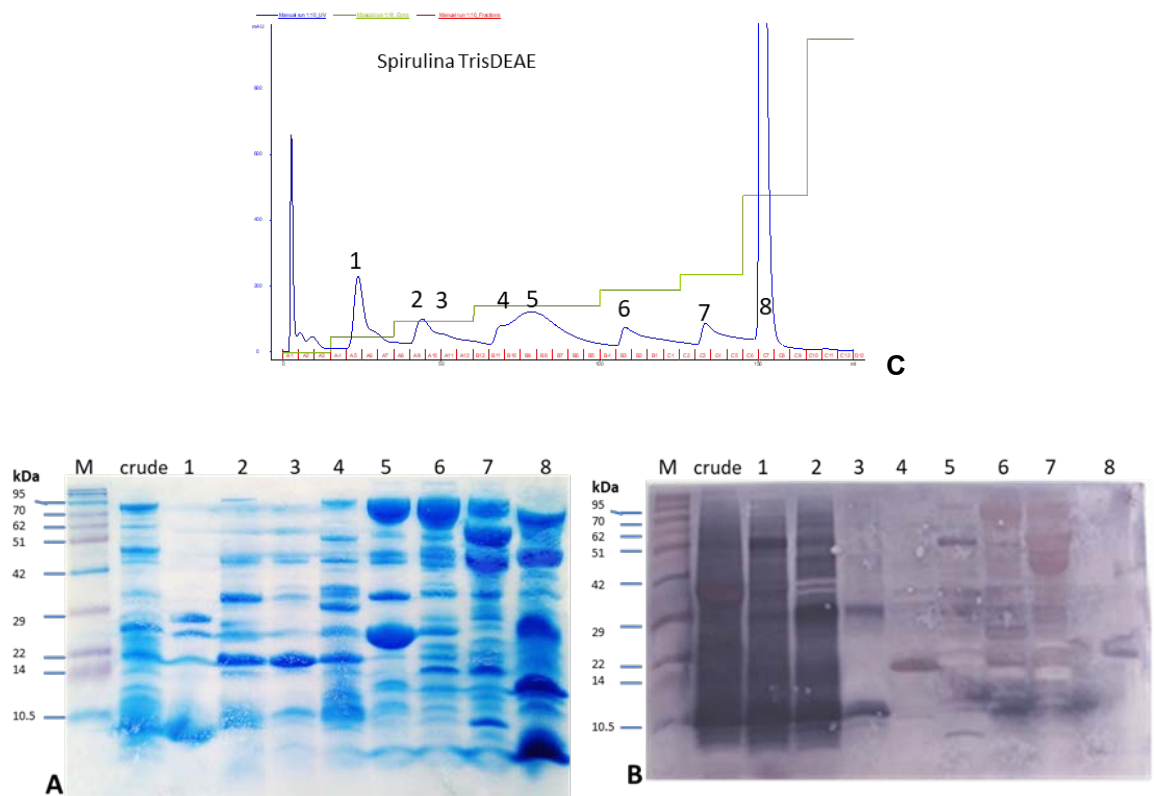


รูปที่ 3.1 แสดง pattern ของ crude protein ที่ run 15%SDS-PAGE

รูป A extract โดยใช้ protocol ของ Navarro ก่อนลง DEAE column

รูป B extract โดยใช้ protocol ของ ammonium sulfate precipitation

โปรตีนสกัดจาก รูปที่ 3.1 A จะนำไปผ่าน column DEAE ต่อไปดังแสดงไว้ในรูป 3.2 ซึ่งแสดงตัวอย่างของ spirulina ที่ load ผ่าน DEAE column แล้วนำแต่ละ fraction ที่ elute ได้มา run gel SDS-PAGE และทำ western blot เพื่อหาตำแหน่งของ plastocyaninว่า อยู่ตรง fraction ไหน โดยใช้ anti-plastocyanin polyclonal antibody ของ spinach เป็น probe ซึ่งผลของ western blot ค่อนข้าง nonspecific ส่วนรูปที่ 3.3 เป็นตัวอย่างของ spinach fraction ที่ผ่านขบวนการเดียวกับ spirulina



รูปที่ 3.2 แสดง fraction ของ spirulina หลังจาก ผ่าน Hitrap DEAE Sepharose

column Anion exchange chromatography with 15 mg of total protein crude extracted was loaded. Buffer A: 20mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. Buffer B: 20mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1M NaCl. Protein elutes with stepwise ionic strength gradients at 5-50% of buffer B.

A: fraction แต่ละ step ที่ผ่าน Hitrap DEAE Sepharose column

B: western blot โดยใช้ anti-plastocyanin polyclonal antibody เป็น probe

C: fraction กราฟที่ elute โดย monitored at 280 nm.

Lane1: Protein stepwise ionic strength gradients at 5% of buffer B

Lane2: Protein stepwise ionic strength gradients at 10% of buffer B

Lane3: Protein stepwise ionic strength gradients at 10% of buffer B

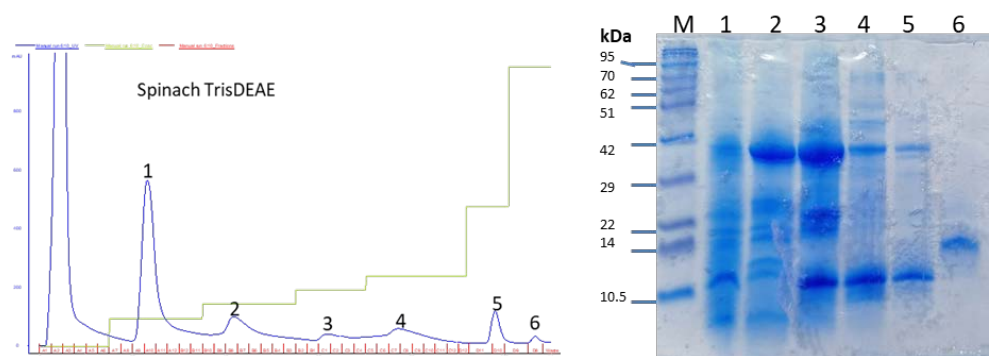
Lane4: Protein stepwise ionic strength gradients at 15% of buffer B

Lane5: Protein stepwise ionic strength gradients at 15% of buffer B

Lane6: Protein stepwise ionic strength gradients at 20% of buffer B

Lane7: Protein stepwise ionic strength gradients at 25% of buffer B

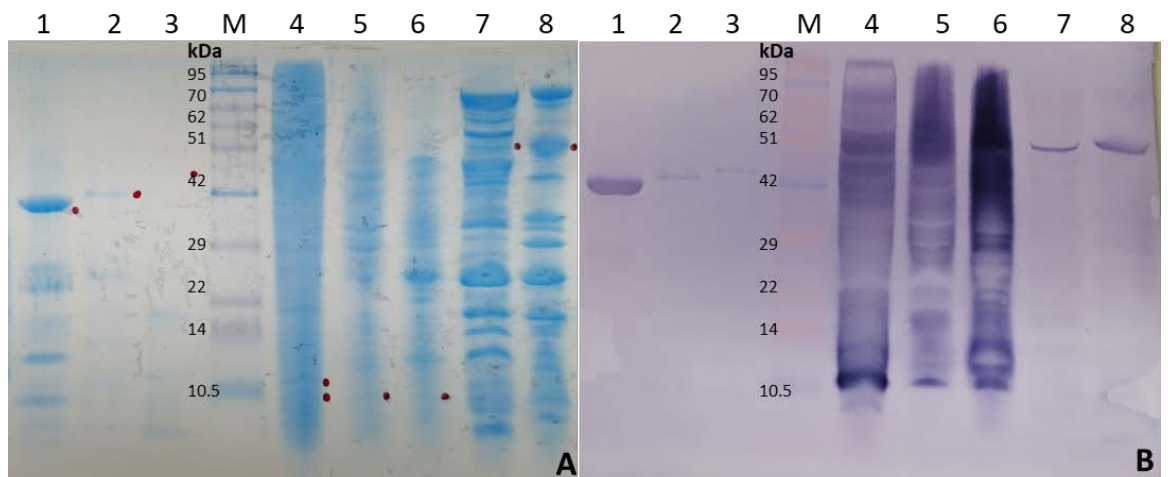
Lane8: Protein stepwise ionic strength gradients at 50% of buffer B



รูปที่ 3.3 แสดง fraction ของ spinach หลังจาก ผ่าน Hitrap DEAE Sepharose column Anion exchange chromatography purification of Spinach plastocyanin with 15 mg of total protein crude extracted was loaded. Monitored at 280 nm. Buffer A: 20mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. Buffer B: 20mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1M NaCl. Protein elutes with stepwise ionic strength gradients at 5-50% of buffer B.

Lane1: Protein stepwise ionic strength gradients at 5% of buffer B
 Lane2: Protein stepwise ionic strength gradients at 10% of buffer B
 Lane3: Protein stepwise ionic strength gradients at 15% of buffer B
 Lane4: Protein stepwise ionic strength gradients at 20% of buffer B
 Lane5: Protein stepwise ionic strength gradients at 25% of buffer B
 Lane6: Protein stepwise ionic strength gradients at 50% of buffer B

ตัวอย่าง crude protein สกัดของ fern ด้วยขบวนการของ Navarro ได้ ผ่าน DEAE column yield ต่ำมาก แต่ใช้วิธีการสกัดด้วย ammonium sulfate precipitation แล้ว conc ด้วย lyophilize จะได้ปริมาณโปรตีนมากกว่าดังรูปที่ 3.4 lane 1



รูปที่ 3.4 แสดง A: SDS-PAGE และ B: western blot โดยใช้ anti-plastocyanin polyclonal antibody เป็น probe

1: crude Fern 60-90% ammonium sulfate precipitate

2: fraction Fern ผ่าน DEAE column

3: fraction Fern ผ่าน DEAE column

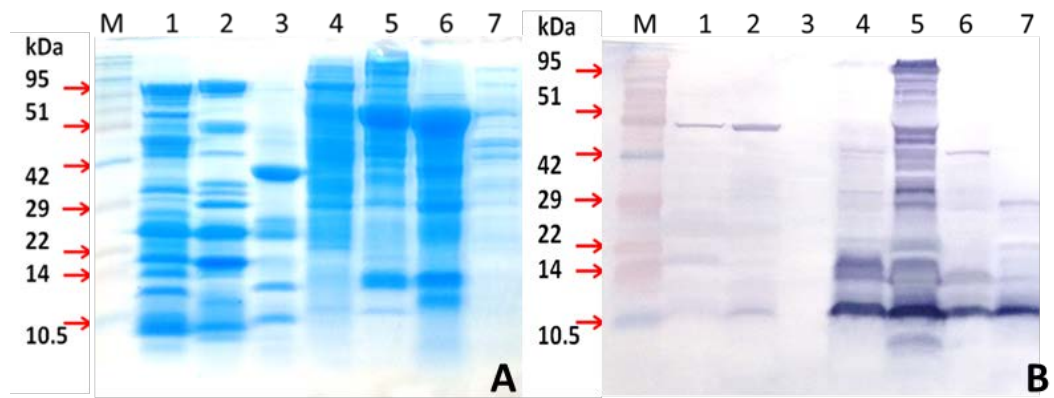
4: crude spinach สกัดด้วย Ammonium sulfate 60-90% precipitate

5: sample spinach extract

6: sample spinach

7: crude spirulina

8: fraction spirulina 15% elute จาก sample lane 7



รูปที่ 3.5 แสดง A: 15%SDS-PAGE และ B: western blot โดยใช้ polyclonal plastocyanin antibody เป็น probe

1: crude spirulina

2: fraction spirulina 15% elute

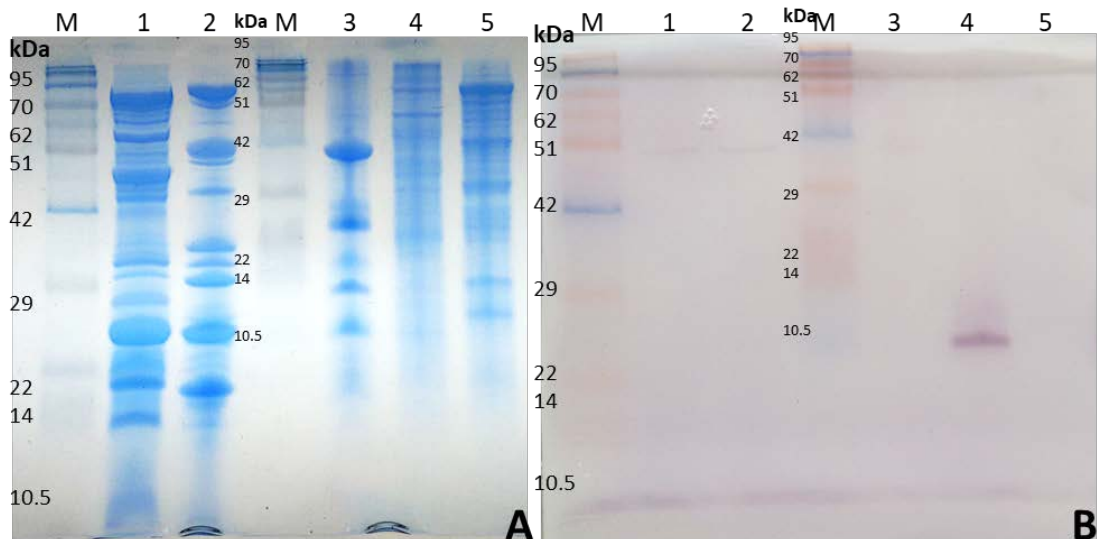
3: crude Fern ammonium sulfate precipitation

4: crude spinach1 60-90%ammonium sulfate precipitation

5: crude spinach1 30-60%ammonium sulfate precipitation

6: crude spinach2 30-60%ammonium sulfate precipitation

7: crude spinach2 60-90%ammonium sulfate precipitation



รูปที่ 3.6 แสดง A: SDS-PAGE และ B: western blot โดยใช้ polyclonal plastocyanin antibody เป็น probe

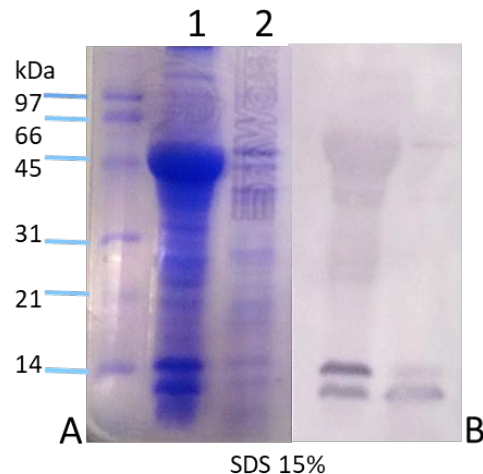
1: crude spilurina

2: fraction spilurina 15%

3: crude Fern

4: crude spinach1 60-90% ammonium sulfate precipitation

5: crude spinach2 30-60% ammonium sulfate precipitation



รูปที่ 3.7 แสดง pattern ของ spinach crude protein ที่ run 15%SDS-PAGE

A: extract โดยใช้ protocol ของ ammonium sulfate precipitation

B: western blot โดยใช้ polyclonal plastocyanin antibody เป็น probe

Lane:1 spinach fraction ammonium sulfate 30-60% precipitate

Lane:2 spinach fraction ammonium sulfate 60-90% precipitate

หลังจากที่ได้ทำการสกัดหลายรอบก็เลยนำตัวอย่างต่าง ๆ มาทำ western blot confirm อีกหลายครั้งเพื่อหาข้อสรุปวิธีการสกัดที่แสดงไว้ในรูปด้านบน ซึ่งการทำ western blot ในแต่ละครั้งก็มีการปรับ condition ในการ blot อยู่ เช่น ปรับปริมาณ antibody ที่เหมาะสม, เวลาที่ใช้ในการ prob, ปริมาณโปรตีนและการสกัดแต่ละ lot ที่ได้คุณภาพของโปรตีนที่ไม่เหมือนและไม่เท่ากัน ซึ่งผลที่ได้มีความแปรปรวนอยู่พอสมควร เช่น

ตัวอย่าง spirulina การสกัดได้ yield ของ crude protein เยอะมากแต่พอไปผ่าน column DEAE แล้วไม่สามารถ แยกโปรตีน plastocyanin ให้บริสุทธิ์ได้ และจากการทำ western blot ก็มี nonspecific เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3.2 แต่จากรูปที่ 3.4 และ 3.5 ซึ่งเป็นการทำ blot คนละครั้งกลับพบว่า มี band positive ที่ติด blot ชัดเจนตรงขนาดประมาณที่ 50 kDa ซึ่งมันไม่ใช่ขนาดของ โปรตีน plastocyanin

ตัวอย่าง spinach การใช้วิธีสกัด crude protein ด้วย ammonium sulfate precipitate จะได้ yield โปรตีนที่มากกว่า การสกัดด้วยวิธีของ Navarro และจากการทำ western blot ผลแสดงในรูปที่ 3.5 และ 3.6 lane 4 ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันไม่ค่อยมีปริมาณโปรตีนตรงด้านล่างที่ 10.5 kDa แต่เป็นตำแหน่งที่ติด probe ชัดเจน

มาก และในรูปที่ 3.7 ก็แสดงให้เห็นว่าติด probe โปรตีน plastocyanin ที่ บริเวณ 14 kDa แต่ก็ยังหาวิธี pure plastocyanin ออกมาได้

ตัวอย่าง fern การใช้วิธีสกัด ด้วย ammonium sulfate precipitate จะได้ yeild โปรตีนที่มากกว่า การสกัดด้วยวิธีของ Navarro และจากการทำ western blot ผลแสดงในรูปที่ 3.4 lane 1 และรูปที่ 3.5 lane 3 และรูปที่ 3.6 lane 3 เป็น ตัวอย่าง ที่สกัดด้วย ammonium sulfate precipitate เหมือนกันแต่สกัดกันคนละ lot แต่ได้ pattern ของ crude โปรตีนที่ใกล้เคียงกันมาก แต่ผลการติด blot ต่างกันคือ รูปที่ 3.4 lane 1 ติด probe แต่ รูปที่ 3.5 และ 3.6 lane 3 กับไม่ติด probe เลย

ลองเลือกโปรตีน fraction ที่มี โปรตีน plastocyanin อยู่แต่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ ลองนำมาทดสอบ HIV-1-RT inhibit activity ดูก็ได้ผลเทียบเท่า Efavirenz 20 µg และทดสอบ syncytium inhibition assay ผลการทดสอบ ก็มีฤทธิ์ยับยั้ง enzyme HIV-1-RT และ active ในการทดลอง syncytium inhibition assay ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1 นอกจากนี้

Sample	HIV-1-RT inhibition ^b		Syncytium reduction assay			
	Conc (µg/ml)	%IR	IC50 (µg/ml)	EC50 (µg/ml)	TI	ฤทธิ์
Spirulina crude	100	-	>500 ^a	7.22 ^a	>69.22 ^a	active ^a
Spirulina fraction 15% DEAE	100	99	>500 ^a	68.07 ^a	>7.34 ^a	active ^a
Fern crude	100	96	16.04 ^a	1.89 ^a	8.49 ^a	active ^a
Spinach crude	100	98	ND	ND	ND	ND
Spinach fraction 60-90% NH4SO2	100	-	83.67 ^a	19.69 ^a	4.25 ^a	active ^a
AZT	ND	ND	>10 ⁻⁸ µM	5.88x10 ⁻⁹ µM	>1.7	active
Efavirenz	100 µM	95	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของ HIV-1-RT inhibit activity และ การทดสอบฤทธิ์ inhibit syncytium formation ของ sample crude protein extract
a Range of doses assayed was 0.24-500 µg/ml; results are mean ± S.E.M. (n = 3),
b results are mean ± S.E.M. (n = 2), ND: not done.

แต่ถึงกระนั้นในการสกัดขั้นตอนสุดท้ายของทุกตัวอย่างยังมี yield ที่ลดลงแทบจะหายไปเลย จึงเปลี่ยนวิธีการใหม่มาเป็นการ clone gene แล้ว express ใน E.coli

2. การ synthesize gene plastocyanin

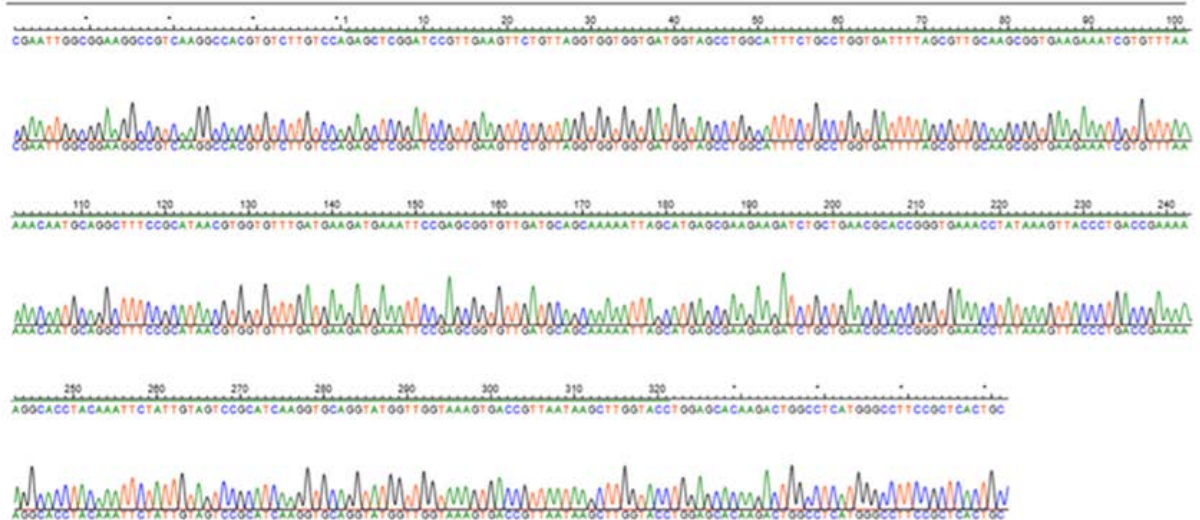
ทำการ synthesize gene โดย บริษัท Invitrogen ใช้ codone usage ของ E.coli หลังจากที่ได้ gene มาจะอยู่ใน vector backbone : pmA-T จากนั้นจึง subclone เข้า plasmid vector pET28a(+) ด้วย restriction enzyme BamHI และ HindIII แล้ว transform เข้า E.coli DH5 α แล้วตรวจสอบ transformant clone ที่ได้ โดย sequence ด้วย primer T7 เมื่อได้ clone ที่ต้องการแล้วจึงย้าย host จาก E.coli DH5 α ไปสู่ expression host คือ E.coli BL21(DE3) เพื่อเข้าสู่ขบวนการศึกษา expression gene ต่อไป

เลือก gene จาก GENE BANK และ PDB ดังนี้ Gene plastocyanin ของ *Spinacia oleracea* จะเป็น base DNA sequence ที่ได้จาก GENE BANK โดยตรง แต่ gene plastocyanin ของ *Dryopteris crassirhizoma* และ *Anabaena variabilis* จะเป็น amino sequence ที่นำมาจาก PDB แล้ว translate เป็น DNA sequence

The synthetic gene PC was assembled from synthetic oligonucleotides and/or PCR products. The fragment was inserted into pMA-T. The plasmid DNA was purified from transformed bacteria and concentration determined by UV spectroscopy. The final construct was verified by sequencing. The sequence congruence within the insertion sites was 100%. See the accompanying data sheets for sequences and find the original ABI trace files as well as the assembled sequences electronically on disk.

5 µg of the plasmid preparation were hypochlorized for shipping.

BamHI
 GGATCGGTGAAGTTCTGTTAGGTGGTGGTATGGTAGCCTGGCATTCTCGCTGGTGAT
 1 CCTAGGCGCAACTTCAAGACAATCCACCACCACTACCATCGGACCGTAAAGACGGACCACTA
 V E V L L G G G D G S L A F L P G D
 1 3 5 7 9 11 13 15 17
 TTTAGCGTTGCAAGCGGTGAAGAAATCGTGTTTAAAAACAATGCAGGCGTTTCCGCATAAC
 61 AAATCGCAACGTTGCGCCACTTCTTTAGCACAAAATTTTGTACGTCGGAAAGGCGTATTG
 F S V A S G E E I V F K N N A G F P H N
 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37
 GTGGTGTTTGATGAAGATGAAATTCGAGCGGTGTTGATGCAGCAAAAATTAGCATGAGC
 21 CACCACAAACTACTTCTACTTTAAGGCTGCCACAACTACGTCGTTTTTAATCGTACTCG
 V V F D E D E I F S G V D A A K I S M S
 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57
 BglII
 GAAGAAGATCTGCTGAAACGCACCGGGTGAAACCTATAAAGTTACCGTGACCGAAAAAGGC
 81 CTCCTCTAGACGACTTCGCTGGGCCACTTTGGATAITTCATGGGACTGGCTTTTTCG
 E E D F L L N A P G E T Y K V T L T E K G
 59 61 63 65 67 69 71 73 75 77
 BspMI
 ACCTACAAATCTTATTGTAGTCGCATCAAGGTGCAGGTATGGTTGGTAAAGTGACCGTT
 41 TGGATGTTTAAGATAACATCAGGCGTAGTTCACCATCCATCAACCAATTCCTACTGGCAA
 T Y K F Y C S P H Q G A G M V G K V T V
 79 81 83 85 87 89 91 93 95 97
 HindIII
 AATAAGCTT
 01 TTAATCGAA
 N
 99

Page: 1 invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

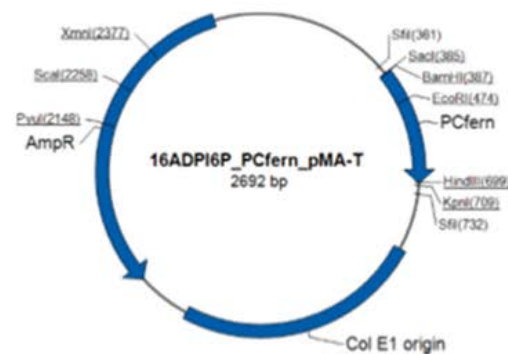
28

Plasmid DNA Description:

The synthetic gene PCfern was assembled from synthetic oligonucleotides and/or PCR products. The fragment was inserted into pMA-T. The plasmid DNA was purified from transformed bacteria and concentration determined by UV spectroscopy. The final construct was verified by sequencing. The sequence congruence within the insertion sites was 100%. See the accompanying data sheets for sequences and find the original ABI trace files as well as the assembled sequences electronically on disk.

5 µg of the plasmid preparation were lyophilized for shipping.

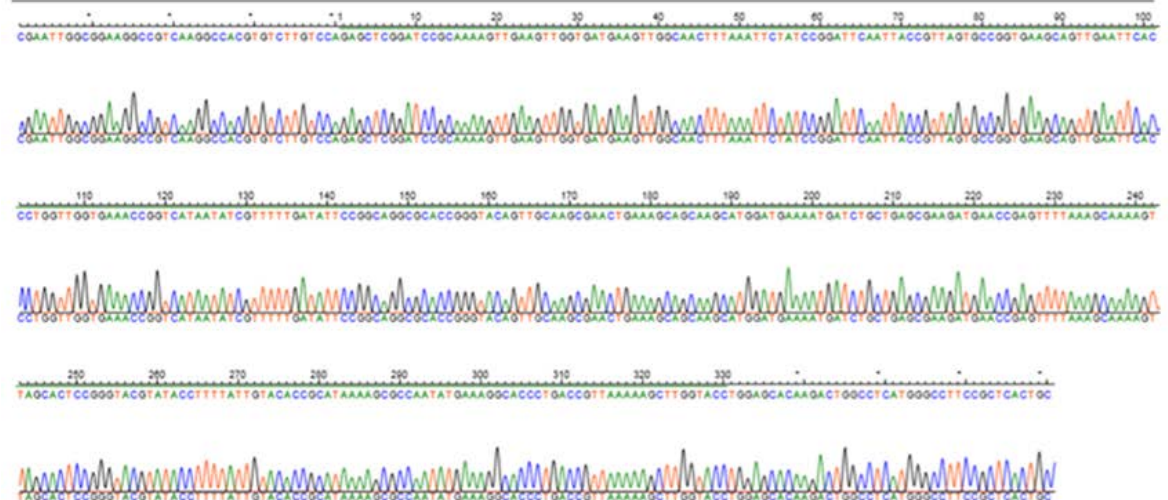
Plasmid Map:



Construct No: 16ADP16P Lot. No: 2052453 Gene Name: PCfern
Customer: LIFE TECHNOLOGIES HOLDINGS PTE LTD, Life Technologies Singapore

ID Construct: 16ADP16P Map
Customer: LIFE TECHNOLOGIES HOLDINGS PTE LTD, Life Technologies Singapore
Name of the gene: PCfern
optimized for: Escherichia coli

Seq1 Seq2
CGAATTGGCGGAAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCGGATCCGCAAAAGT
1
GCTTAACCGCCTTCCGGCAGTTCGGTGCCAGAACAGGTCTCGAGCCTAGGCGTTTCA
A_K_V
TGAAGTTGGTGAAGTTGGCACTTTAAATCTATCCGATTCAATTACCGTTAGTGC
41
ACTTCAACCACTACTTCAACCGTTGAATTTAAGATAGGCTAAGTTAATGGCAATCAG
E_V_G_D_E_V_G_H_F_F_V_P_D_S_I_T_V_S_A
CGGTGAAGCACTTGAATTCACCTCGGTGGTGAAGCCGGTCAATATCGTTTTGATAT
121
GCCACTTCGTCACTAAGTGGGACCAACCACTTTGGCCAGTATTATAGCAAAACTATA
G_E_A_V_E_F_T_I_V_G_E_T_G_H_N_I_V_F_D_I
TCCGGCAGGCGCAGCGGTACATTTGCAAGCGAACTGAAGCAGCAGCATGATGAAAA
181
AGGCCGTCCGCGTGGCCATGTCAACGTTGCTTGAATTCGTCTGCTACCTACTTTT
P_A_G_A_P_O_T_V_A_S_E_L_K_A_A_S_M_D_E_N
TGATCTGCTGAGCGAAGATGAACCGAGTTTAAAGCAAAAGTTAGCACTCCGGTACGTA
241
ACTAGACACTCGCTTCTACTTGGCTCAAAATTCGTTTCAATCGTGAAGCCCATGCAT
D_L_L_S_E_D_E_P_S_F_K_A_K_V_S_T_P_G_T_Y
TACCTTTTATTGTACACCGCATAAAAGCGCCATATGAAGGCAACCTGACCGTTAAAAA
301
ATGAAAAATAATGTGGGTATTTTGGGTTATCTTTCGCTGGGACTGGCAATTTT
T_F_Y_C_T_P_H_K_S_A_N_M_K_G_T_L_T_V_K
KpnI
GCTTGGTACCTGGAGCAGAGCTGGCTCATGGGCTTCGGTCACTGC
361
CGAACCTGACCTGTGTTCTGACCGAGTACCGGAGGCGAGTGAAGC

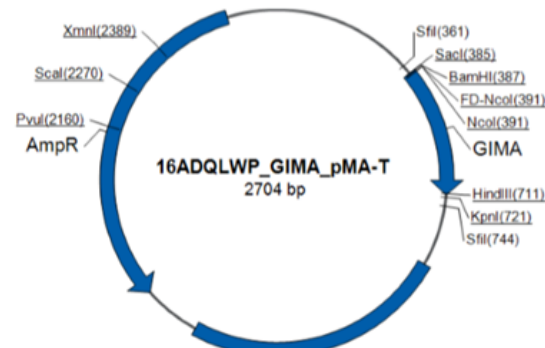


รูปที่ 3.9 แสดง sequence base และ amino acid ของ plastocyanin gene ของ fern; *Dryopteris crassirhizoma* ที่ synthesize

Plasmid DNA Description:

The synthetic gene GIMA was assembled from synthetic oligonucleotides and/or PCR products. The fragment was inserted into pMA-T. The plasmid DNA was purified from transformed bacteria and concentration determined by UV spectroscopy. The final construct was verified by sequencing. The sequence congruence within the insertion sites was 100%. See the accompanying data sheets for sequences and find the original ABI trace files as well as the assembled sequences electronically on disk. 5 µg of the plasmid preparation were lyophilized for shipping.

Plasmid Map:

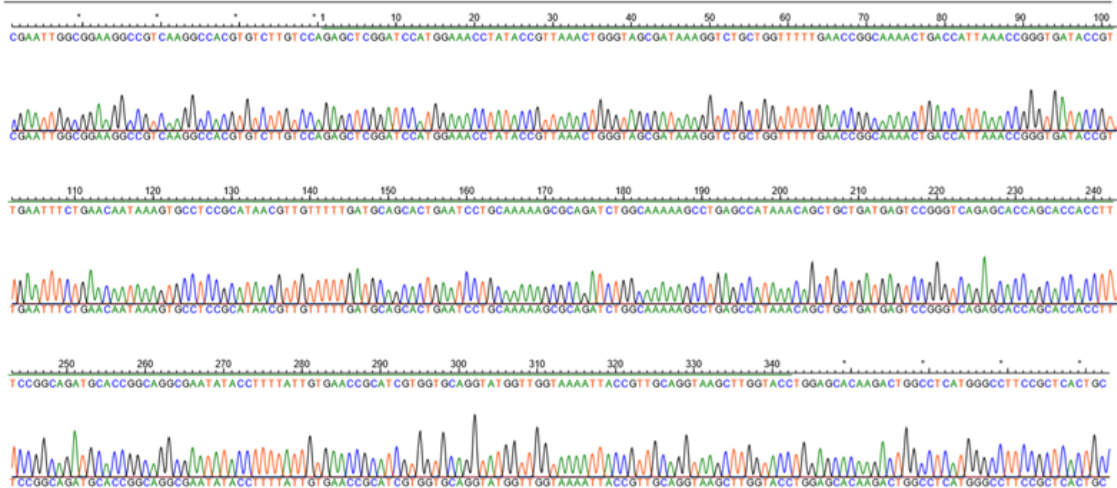


ORF	Protected sites	Protected areas	Motifs to avoid
1-330 [GGA...CTT]	1-6 BamHI [GGATCC] 325-330 HindIII [AAGCTT]		BamHI [GGATCC] HindIII [AAGCTT]

1.	G S M E T Y T V K L G S D K G L L V F E P A K
70.	GGATCCATGGAAACCTATACCGTTAAACTGGGTAGCGATAAAGGTCTGCTGGTTTTGAACCGGCAAAA
139.	L T I K P G D T V E F L N N K V P P H N V V F
208.	CTGACCATTAACCGGGTGATACCGTTGAATTTCTGAACAATAAAGTGCCTCCGCATAACGTTGTTTT
277.	D A A L N P A K S A D L A K S L S H K Q L L M
	GATGCAGCACTGAATCCTGCAAAAAGCGCAGATCTGGCAAAAAGCCTGAGCCATAAACAGCTGCTGATG
	S P G Q S T S T T F P A D A P A G E Y T F Y C
	AGTCCGGGTCAGAGCACCAACACCTTTCCGGCAGATGCACCGGCAGGCGAATATACCTTTTATTGT
	E P H R G A G M V G K I T V A G K L
	GAACCGCATCGTGGTGCAGGTATGGTTGGTAAAATTACCGTTGCAGGTAAAGCTT

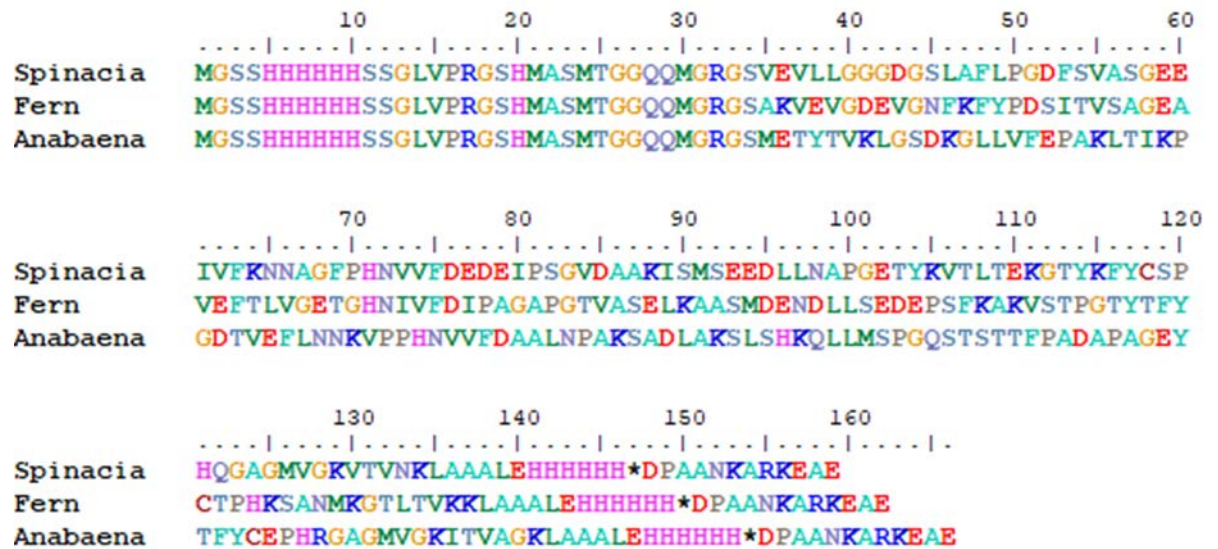
Construct No: 16ADQLWP Lot No: 2053093 Gene Name: GIMA
Customer: LIFE TECHNOLOGIES HOLDINGS PTE LTD, Life Technologies Singapore

Page: 1 invitrogen
by Thermo Fisher Scientific



รูปที่ 3.10 แสดง sequence และ frame ของ plastocyanin gene ของ cyanobacterium ; *Anabaena variabilis* ที่สังเคราะห์

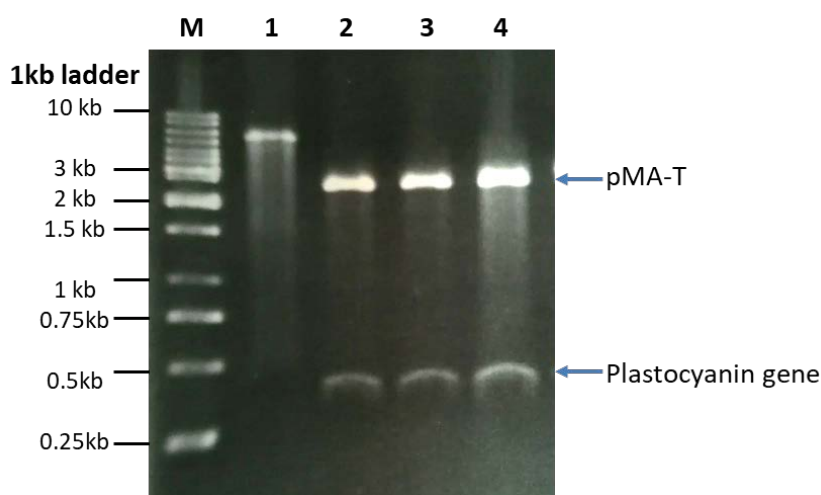
หลังจากที่คัดเลือก gene ได้แล้วจึงเปรียบเทียบ amino acid ของ gene ทั้ง 3 โดยใช้ Bioedit ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.11 แสดง amino acids alignment ของ plastocyanin ที่อยู่ใน frame ของ pET28a(+) โดย Bioedit program

ทำการ synthesis gene แล้ว clone เข้า vector pET28a(+)

หลังจากขบวนการสังเคราะห์ยีนเสร็จเรียบร้อยแล้วจากบริษัท ยีนพลาสมิดไทย ยานินจะอยู่ใน vector backbone : pMA-T จากนั้นนำ plasmid vector มา cut ด้วย HindIII และ BamHI เพื่อแยกส่วนของ plastocyanin gene ออก จะเห็น fragment ของ gene Pc: spinach lane 2, Pc:fern lane 3, Pc:cyanobacterium lane 4 ซึ่งมีขนาด ประมาณ 300 bp แต่ละยีนดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.12 agarosegel electrophoresis แสดง platocyanin gene ที่ตัดด้วย HindIII and BamHI ทำให้แยก fragment ของ plastocyanin ออกมาจาก vector backbone pMA-T

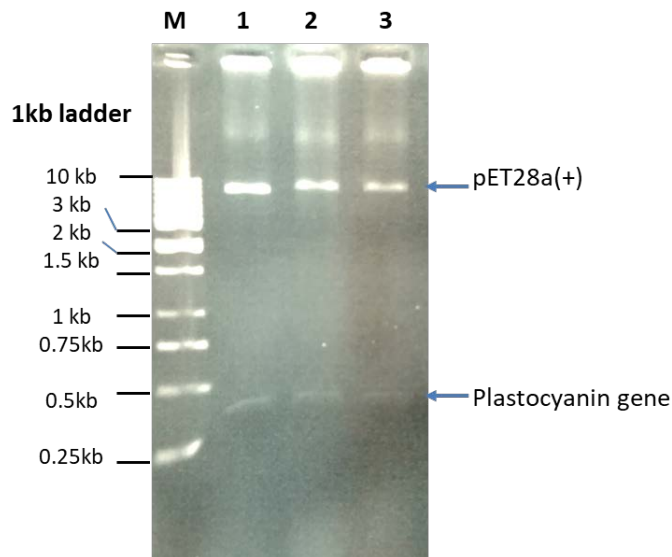
M : GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

Lane1: vector pET28a(+)/HindIII, BamHI

Lane2: pMA-T:PCgene,spinach/HindIII, BamHI ขนาด 309 bp

Lane3: pMA-T:Pcgene,fern/HindIII, BamHI ขนาด 318 bp

Lane4: pMA-T:Pcgene,cyanobacterium/HindIII, BamHI ขนาด 330 bp



รูปที่ 3.13 agarosegel electrophoresis แสดง platocyanin gene ที่ตัดด้วย HindIII and BamHI ทำให้แยก fragment ของ plastocyanin ออกมาจาก vector pET28a ซึ่งใช้เป็น expression vector

M : GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

Lane1: pET28(+):Pcgene,spinach/HindIII, BamHI

Lane2: pET28(+):Pcgene,fern/HindIII, BamHI

Lane3: pET28(+):Pcgene,cyanobacterium/HindIII, BamHI

หลังจากที่ subclone plastocyanin gene จาก pMA-T vector มาไว้ใน expression vector pET28(+) ได้ส่ง recheck sequencing โดยใช้ T7 promotor ได้ผลตรงตามที่ clone ดังนี้ ส่วนที่เป็น capital letter ขีดเส้นใต้ คือ ส่วนของ plastocyanin ส่วนที่ไม่ขีดเส้นคือส่วนของ vector pET28(+)

Spinach (*Spinacia oleracea*)

Gene:

atgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctgggtgccgcgcggcagccatat
 ggctagcatgactgggtggacagcaaattgggtcgcGGATCCGTTGAAGTTCTGTTAG
GTGGTGGTGATGGTAGCCTGGCATTCTGCCTGGTGATTTTAGCGTTG
CAAGCGGTGAAGAAATCGTGTTTAAAAACAATGCAGGCTTTCCGCAT
AACGTGGTGTGTTGATGAAGATGAAATTCCGAGCGGTGTTGATGCAGC

AAAAATTAGCATGAGCGAAGAAGATCTGCTGAACGCACCGGGTGAA
ACCTATAAAGTTACCCTGACCGAAAAAGGCACCTACAAATTCTATTGT
AGTCCGCATCAAGGTGCAGGTATGGTTGGTAAAGTGACCGTTAATAA
GCTTgcggccgcactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaagc
ccgaaaggaagctgag

Amino:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSVEVLLGGGDGSL
AFLPGDFSVASGEEIVFKNNAGFPHNVVFEDEDEIPSGVDAAKISMSEEDL
LNAPGETYKVTLTEKGYKFYCSPHQGAGMVGKVTVNKLAAALEHHHH
HH*DPAANKARKEAE

Fern (*Dryopteris Crassirhizoma*)

Gene:

atgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctgggtgccgcgcggcagccatat
ggctagcatgactgggtggacagcaaagggtcgcGGATCCGCAAAAGTTGAAGTT
GGTGATGAAGTTGGCAACTTTAAATTCTATCCGGATTCAATTACCGTT
AGTGCCGGTGAAGCAGTTGAATTCACCCTGGTTGGTGAAACCGGTCA
TAATATCGTTTTTGATATTCCGGCAGGCGCACCGGGTACAGTTGCAA
GCGAACTGAAAGCAGCAAGCATGGATGAAAATGATCTGCTGAGCGA
AGATGAACCGAGTTTTAAAGCAAAAGTTAGCACTCCGGGTACGTATA
CCTTTTATTGTACACCGCATAAAAGCGCCAATATGAAAGGCACCCTG
ACCGTTAAAAAGCTTgcggccgcactcgagcaccaccaccaccactgagatccg
gctgctaacaagcccgaaggaagctgag

Amino:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSAKVEVGDE
VGNFKFYPDSITVSAGEAVEFTLVGETGHNIVFDIPAGAPGTVASE
LKAASMDENDLLSEDEPSFKAKVSTPGTYTFYCTPHKSANMKG
LTVKKLAAALEHHHHHHH*DPAANKARKEAE

Cyanobacterium (*Anabaena variabilis*)

Gene:

ggatccATGGAAACCTATACCGTTAAACTGGGTAGCGATAAAGGTCTG
CTGGTTTTTTGAACCGGCAAACTGACCATTAAACCGGGTGATACCGT
TGAATTTCTGAACAATAAAGTGCCTCCGCATAACGTTGTTTTTGATGC
AGCACTGAATCCTGCAAAAAGCGCAGATCTGGCAAAAAGCCTGAGC
CATAAACAGCTGCTGATGAGTCCGGGTCAGAGCACCAGCACCACCTT
TCCGGCAGATGCACCGGCAGGCGAATATACCTTTTATTGTGAACCGC
ATCGTGGTGCAGGTATGGTTGGTAAAATTACCGTTGCAGGTaagcttgg
acctggagcacaagactggcctcatgggccttccgctcactgc

Amino:

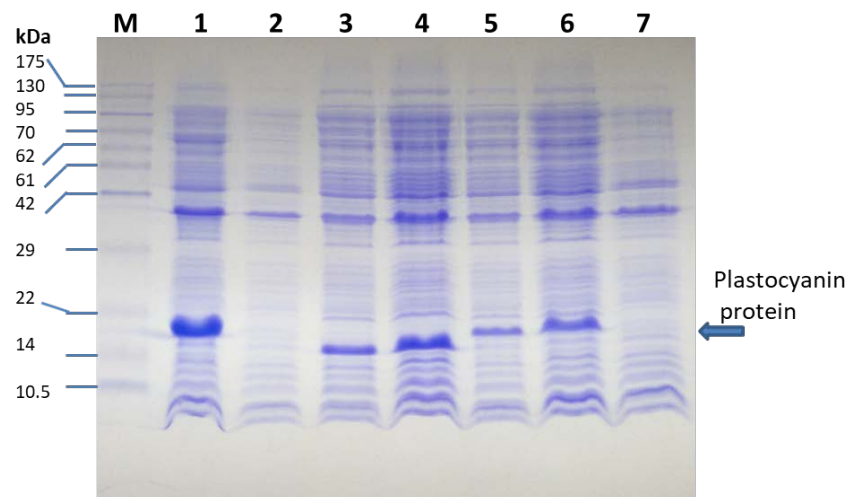
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSMETYTVKLGSDK
GLLVFEPAKLTIKPGDTVEFLNNKVPPHNVVFDAALNPAKSADLAKSLSH
KQLLMSPGQSTSTTFPADAPAGEYTFYCEPHRGAGMVGKITVAGKLAA
ALEHHHHHH**DPAANKARKEAE*

Sample name	Ref.No.	Gene length base	MW(Da)	pI	aa in pET28a
<i>Spinacia oleracea</i> (spinach)	X04693.1	309	15476.20	6.06	146
<i>Dryopteris crassirhizoma</i> (fern)	2BZc	318	15476.20	6.28	149
<i>Anabaena variabilis</i> (cyanobacterium)	2GIMA	330	16298.46	8.75	153

ตารางที่ 3.2 แสดงข้อมูลที่มาของยีนที่เลือกมาศึกษาและสังเคราะห์และจำนวน
amino acids ที่เพิ่มขึ้นใน frame ของ pET28a(+)

3. การศึกษา gene expression

เลี้ยงเชื้อ *E.coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pET-28a(+):gene plastocyanin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Terrific Broth (100 mL: 1.2 g tryptone, 2.4 g yeast extract, 230 mg KH_2PO_4 , 125 mg K_2HPO_4 , 0.4 ml glycerol) ที่มี 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm จนเชื้อมีความขุ่นที่ OD600 เท่ากับ 0.4-0.6 จึงทำการ induce ด้วย 0.5-1 mM IPTG บ่มเชื้อต่อที่ อุณหภูมิ 20-30 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150-200 rpm เป็นเวลา 7-20 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ cell แล้วนำมา sonicate ใน lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1.5mM PMSF) บั่นแยกกากเซลล์ และเก็บส่วนใสไว้ สำหรับ purify ต่อไป และแบ่งตัวอย่างที่ได้ทำการ vary ต่างๆ มา run SDS-PAGE โดยแสดงผลไว้ในรูปดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.14 SDS-PAGE ของ crude protein ที่ลองปรับ condition ในการ expresss

M: Pink Plus Prestained Protein Ladder

Lane1: PC Anabaena:pET28:BL21, growth 30°C

Lane2: PC Spinach:pET28:BL21, 0.25mM IPTG

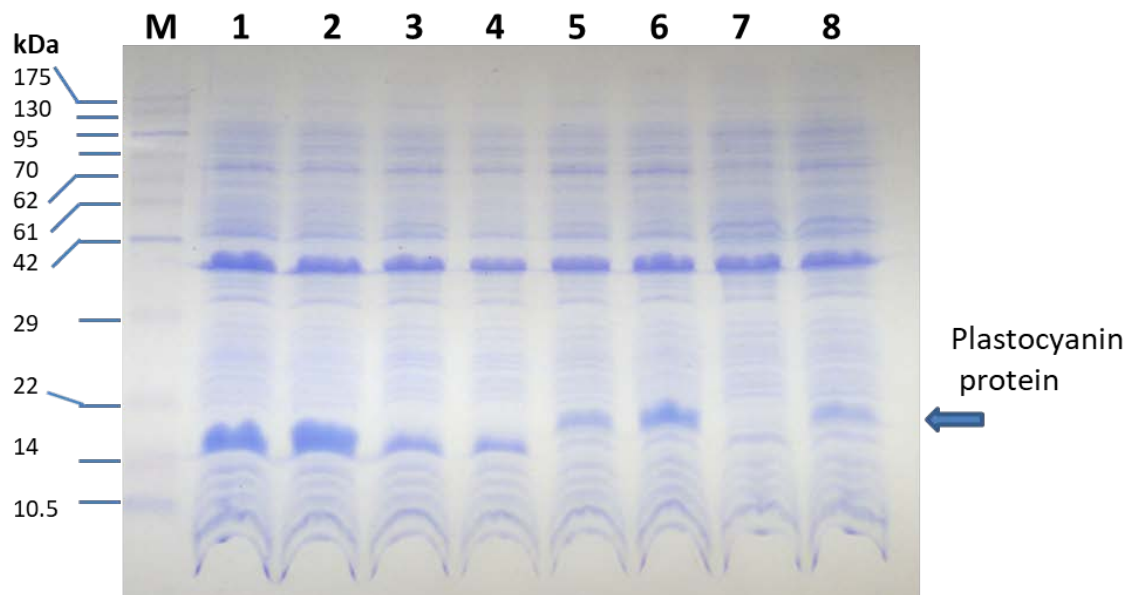
Lane3: PC Fern:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, growth 30°C

Lane4: PC Fern:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, growth 30°C

Lane5: PC Anabaena:pET28:BL21, growth 20°C, 0.5mM IPTG

Lane6: PC Anabaena:pET28:BL21, growth 20°C, 0.5mM IPTG

Lane7: PC Spinach:pET28:BL21, 0.5mM IPTG



รูปที่ 3.15 SDS-PAGE ของ crude protein ที่ลอง condition ในการ expresss

M: Pink Plus Prestianed Protein Ladder

Lane1: PC Canna:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, growth 30°C, 3hr

Lane2: PC Canna:pET28:BL21, 5mM IPTG, growth 30°C, 3hr

Lane3: PC Fern:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, growth 30°C, 3hr

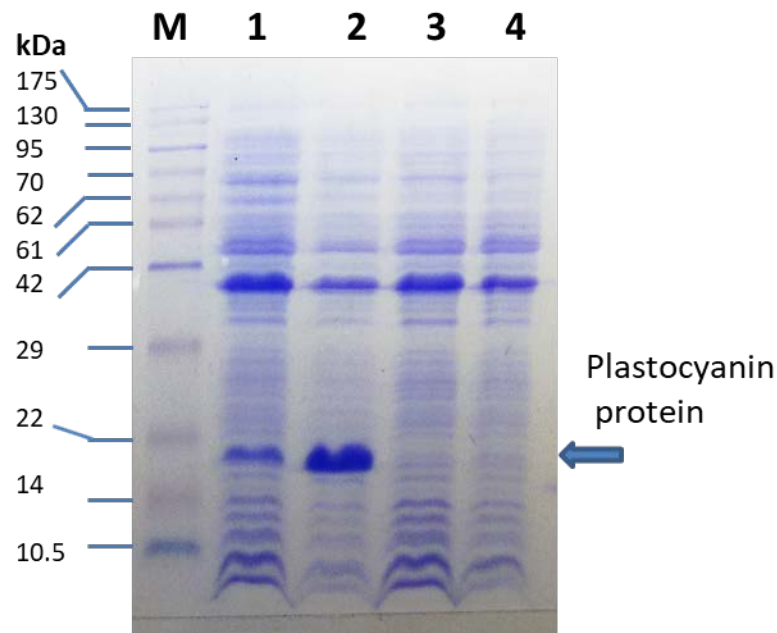
Lane4: PC Fern:pET28:BL21, 5mM IPTG, growth 30°C, 3 hr

Lane5: PC Anabaena:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, growth 30°C, 3hr

Lane6: PC Anabaena:pET28:BL21, 5mM IPTG, growth 30°C, 3hr

Lane7: PC Fern:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, growth 30°C, 4hr

Lane8: PC Anabaena:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, growth 30°C, 4hr



รูปที่ 3.16 SDS-PAGE ของ crude protein ที่ลอง condition ในการ express

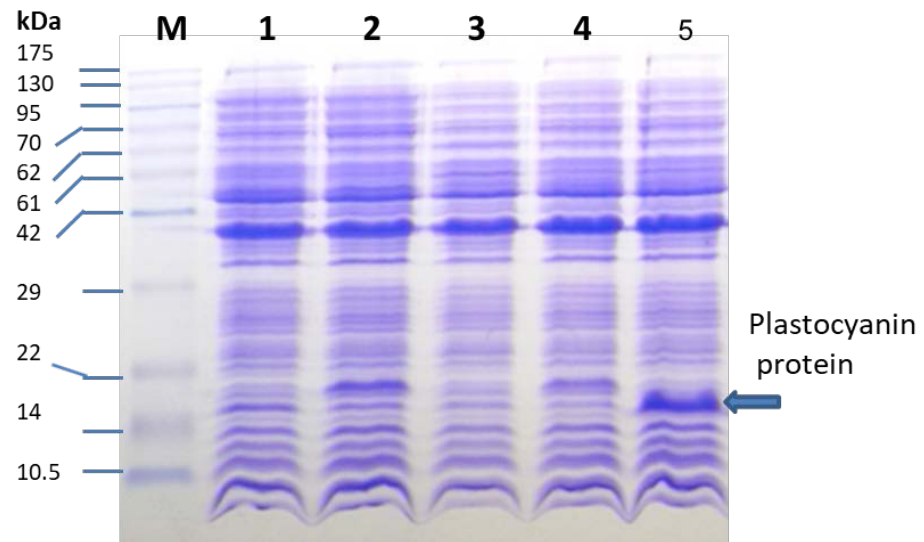
M: Pink Plus Prestained Protein Ladder

Lane1: PC Anabaena:pET28:BL21, 0.1mM IPTG, growth 25°C, 16hr

Lane2: PC Anabaena:pET28:BL21, 0.1mM IPTG, growth 30°C, 16hr

Lane3: PC Spinach:pET28:BL21, 0.1mM IPTG, growth 25°C, 16hr

Lane4: PC Spinach:pET28:BL21, 0.1mM IPTG, growth 30°C, 16hr



รูปที่ 3.17 SDS-PAGE ของ crude protein ที่ลอง condition ในการ expresss

M: Pink Plus Prestained Protein Ladder

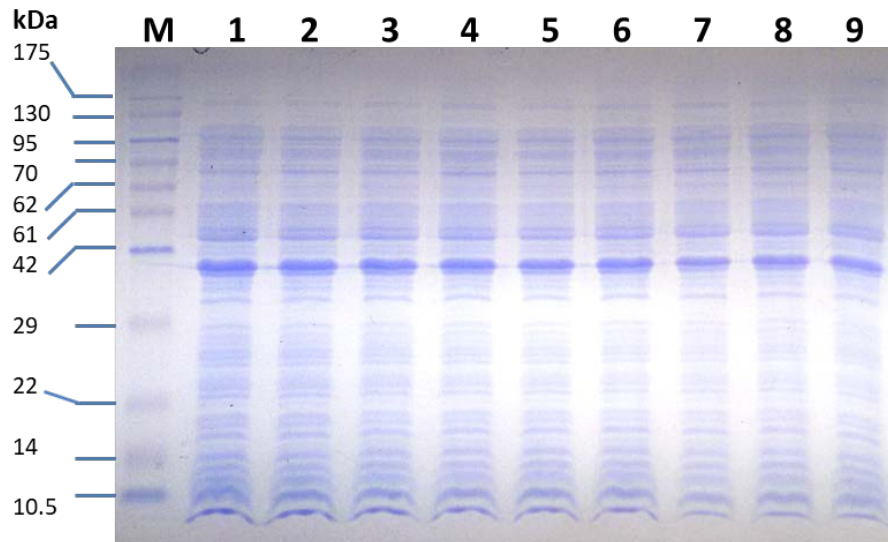
Lane1: PC Fern:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, TB broth

Lane2: PC Anabaena:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, TB broth

Lane3: PC Fern:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, LB broth

Lane4: PC Anabaena:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, LB broth

Lane5: PC Spinach:pET28:BL21, 0.5mM IPTG, LB broth



รูปที่ 3.18 15%SDS-PAGE ของ crude protein PC Spinach:pET28:BL21, 0.1mM

IPTG, LB broth ที่ลอง condition ในการ expresss

M: Pink Plus Prestianed Protein Ladder

Lane1: 0.5% glycerol, 0.1 mM CuSO_4 , 16°C หลัง induce IPTG

Lane2: 0.5% glycerol, 16°C หลัง induce IPTG

Lane3: เลี้ยง 16°C หลัง induce IPTG

Lane4: 0.5% glycerol, 0.1 mM CuSO_4 , 20°C หลัง induce IPTG

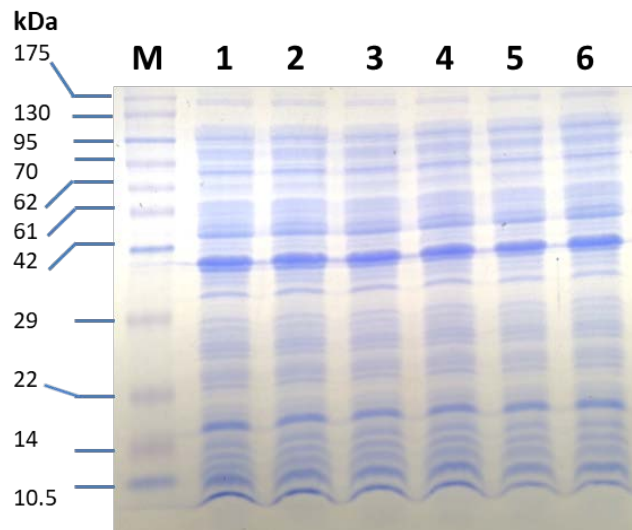
Lane5: 0.5% glycerol, 20°C หลัง induce IPTG

Lane6: เลี้ยง 20°C หลัง induce IPTG

Lane7: 0.5% glycerol, 0.1 mM CuSO_4 , 30°C หลัง induce IPTG

Lane8: 0.5% glycerol, 30°C หลัง induce IPTG

Lane9: เลี้ยง 30°C หลัง induce IPTG



รูปที่ 3.19 15%SDS-PAGE ของ crude protein PC Fern:pET28:BL21, 0.1mM

IPTG, LB broth ที่ลอง condition ในการ expresss

M: Pink Plus Prestained Protein Ladder

Lane1: 0.5% glycerol, 0.1 mM CuSO_4 , 16°C หลัง induce IPTG

Lane2: 0.5% glycerol, 16°C หลัง induce IPTG

Lane3: 0.5% glycerol, 0.1 mM CuSO_4 , 20°C หลัง induce IPTG

Lane4: 0.5% glycerol, 20°C หลัง induce IPTG

Lane5: 0.5% glycerol, 0.1 mM CuSO_4 , 30°C หลัง induce IPTG

Lane6: 0.5% glycerol, 30°C หลัง induce IPTG

0.5 mM CuSO_4 และ 0.5% glycerol ไม่มีผลต่อการ express ของ PC

spinach และ PC Fern ที่อุณหภูมิ 16 °C, 20°C, 30°C ที่ 37 °C

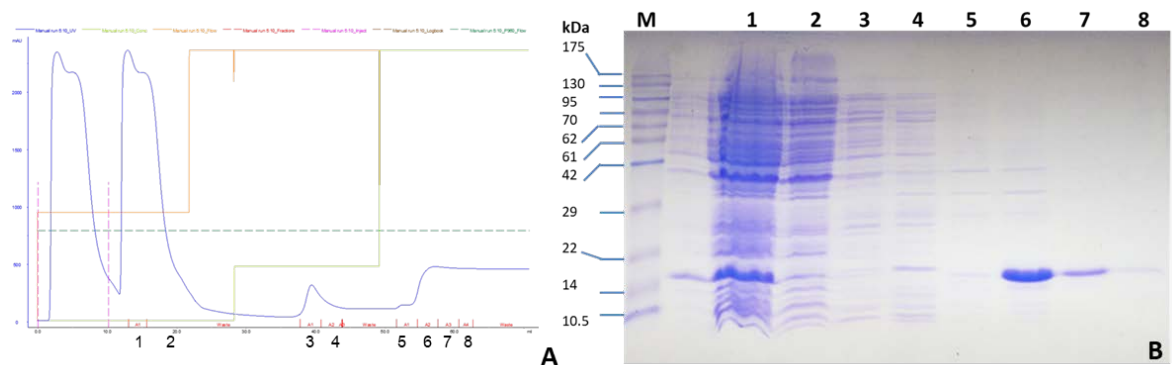
PC:spinach ก็ไม่ express เลย

สรุปจากรูปที่ 3.17 การใช้ IPTG ที่ 0.5 mM หรือ 5 mM ให้ yield ของโปรตีน plastocyanin ไม่แตกต่างกันและได้ลองเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงหลังจากที่ induce IPTG จาก 3-4 hr เป็น 20 hr ก็ทำให้ปริมาณ cell ได้น้ำหนักมากขึ้นก็จะทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่มากขึ้นด้วย จากรูปที่ 3.18 จากใช้ 0.1 mM IPTG ก็สามารถ induceการสร้างโปรตีนได้ดี ส่วนการใช้อุณหภูมิเลี้ยงหลังการ induce ที่ 25 และ 30

องศาจะไม่แตกต่างกันใน แต่สำหรับ PC *Anabaena*:pET28 การใช้ อุณหภูมิที่ 30 องศาจะได้ปริมาณพลาสโตไซยานินที่มากกว่า

4. การแยกโปรตีน recombinant plastocyanin ให้บริสุทธิ์

การแยกโปรตีน recombinant (His)₆-tagged protein plastocyanin โดยใช้เทคนิค column affinity chromatography อาศัยการ binding ส่วนของ 6xHis-tagged ที่ปลายด้าน N-terminal และ C-terminal ของโปรตีนกับ Nickel ion (Ni²⁺) ใน Hitrap Chelating HP affinity column ขนาด 5 ml (GE Healthcare และนำไปตรวจเช็คโปรตีนด้วย SDS-PAGE ผลแสดงไว้ในรูปที่ 13.22 จะได้โปรตีน plastocyanin ที่บริสุทธิ์ขึ้น และพร้อมที่จะนำไป ทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV ต่อไป



รูปที่ 3.20 แสดง fraction ของ PC:Fern หลังจาก ผ่าน Hitrap His column Anion.

Monitored at 280 nm. Buffer A: 20 mM NaPO₄ buffer, 0.5M NaCl, 10mM imidazole pH 7.4 Buffer B: 20 mM NaPO₄ buffer, 0.5M NaCl, 0.5M imidazole pH 7.4 . Protein elutes with stepwise ionic strength gradients at 20, 100% of buffer B.

Lane1: Unbound protein

Lane2: Unbound protein

Lane3: Protein stepwise ionic strength gradients at 20% of buffer B

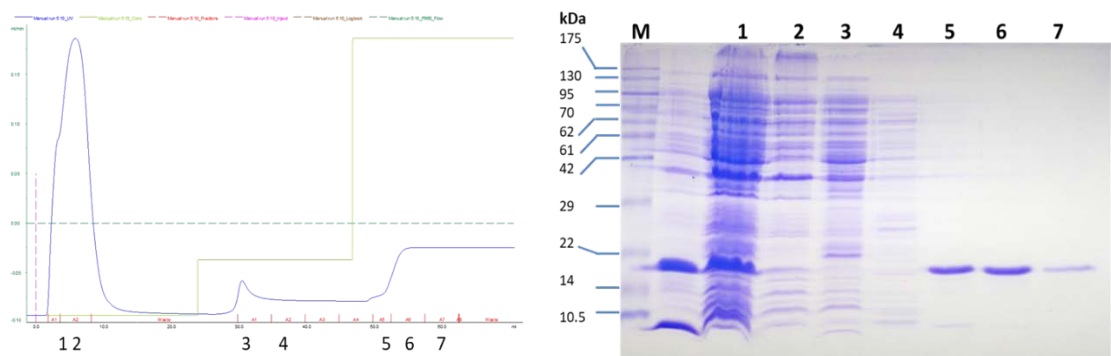
Lane4: Protein stepwise ionic strength gradients at 20% of buffer B

Lane5: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

Lane6: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

Lane7: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

Lane8: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B



รูปที่ 3.21 แสดง fraction ของ PC:Anabaena หลังจาก ผ่าน Hitrap His column Anion. Monitored at 280 nm. Buffer A: 20 mM NaPO₄ buffer, 0.5M NaCl, 10mM 43midazole pH 7.4 Buffer B: 20 mM NaPO₄ buffer, 0.5M NaCl, 0.5M 43midazole pH 7.4 . Protein elutes with stepwise ionic strength gradients at 20, 100% of buffer B.

Lane1: Unbound protein

Lane2: Unbound protein

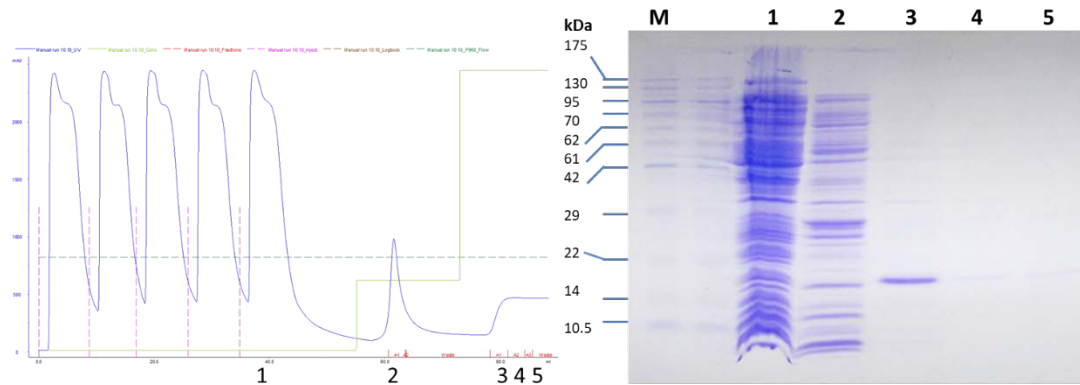
Lane3: Protein stepwise ionic strength gradients at 20% of buffer B

Lane4: Protein stepwise ionic strength gradients at 25% of buffer B

Lane5: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

Lane6: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

Lane7: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B



รูปที่ 3.22 แสดง fraction ของ PC:Spinach หลังจาก ผ่าน Hitrap His column Anion. Monitored at 280 nm. Buffer A: 20 mM NaPO₄ buffer, 0.5M NaCl, 10mM 44midazole pH 7.4 Buffer B: 20 mM NaPO₄ buffer, 0.5M NaCl, 0.5M 44midazole pH 7.4 . Protein elutes with stepwise ionic strength gradients at 20, 100% of buffer B.

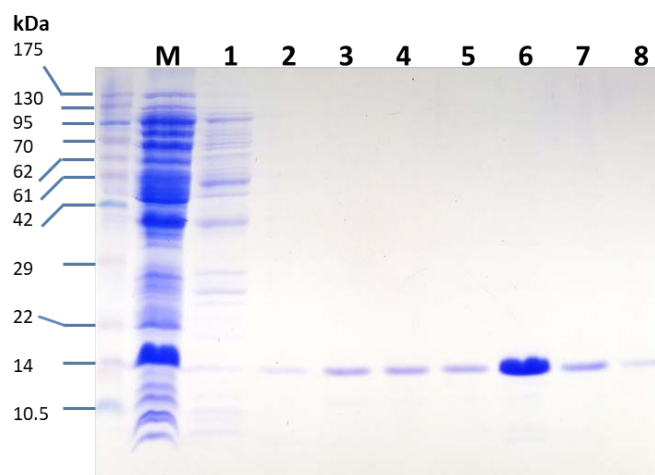
Lane1: Unbound protein

Lane2: Protein stepwise ionic strength gradients at 25% of buffer B

Lane3: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

Lane4: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

Lane5: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B



รูปที่ 3.23 แสดง fraction ของ PC:Canna indica หลังจาก ผ่าน Hitrap His column Anion. Monitored at 280 nm. Buffer A: 20 mM NaPO₄ buffer, 0.5M NaCl, 10mM 45midazole pH 7.4 Buffer B: 20 mM NaPO₄ buffer, 0.5M NaCl, 0.5M 45midazole pH 7.4 . Protein elutes with stepwise ionic strength gradients at 20, 100% of buffer B.

Lane1: Crude recombinant protein

Lane2: Protein stepwise ionic strength gradients at 15% of buffer B

Lane3: Protein stepwise ionic strength gradients at 20% of buffer B

Lane4: Protein stepwise ionic strength gradients at 20% of buffer B

Lane5: Protein stepwise ionic strength gradients at 20% of buffer B

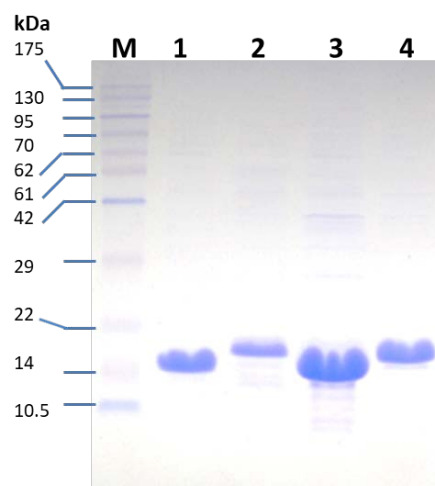
Lane6: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

Lane7: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

Lane8: Protein stepwise ionic strength gradients at 100% of buffer B

5. การตรวจสอบโปรตีนพลาสโตไซยานินที่ express ได้โดย LC-MS/MS

นำ fraction ที่มีโปรตีนเหมือนกันมา pool รวมกัน และทำการ dialyse โปรตีนด้วยบัฟเฟอร์ (20 mM sodium phosphate) จากนั้น concentrate โปรตีนด้วย Amicon ultrafiltration จนได้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการ ผลแสดงดังในรูปที่ 3.24



รูปที่ 3.24 15%SDS-PAGE ของ plastocyanin recombinant protein ที่ผ่าน Histrap affinity chromatography column

M: Pink Plus Prestained Protein Ladder

Lane1: plastocyanin recombinant protein *Canna indica* L (PC:Canna)

Lane2: plastocyanin recombinant protein *Spinacia oleracea* (PC:Spinach)

Lane3: plastocyanin recombinant protein *Dryopteris crassirhizoma* (PC:Fern)

Lane4: plastocyanin recombinant protein *Anabaena variabilis* (PC:Cyanobacterium)

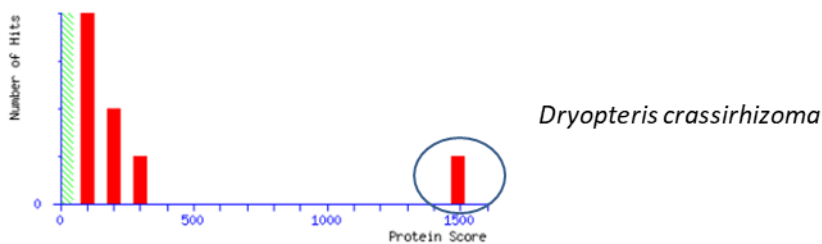
เพื่อ identify ว่า protein ที่ express ได้มีขบวนการ translation ของโปรตีน ยังคงได้เป็น plastocyanin อยู่ใน reading frame หรือไม่ จึงตัด band protein ที่ pure ได้จาก FPLC-HistrapTMFF 5ml fraction ที่ pure ได้เฉพาะ band ของ plastocyanin มา run SDS-PAGE แล้วตัด band จาก gel ในรูปที่ 3.26 ไปเข้า ขบวนการ trypsinize แล้ว ตรวจด้วย LC/MS-MS ก็ได้ผลว่าทุกband เป็น plastocyanin protein ดังแสดงผลวิเคราะห์จาก Mascot program ดังรูปที่ 3.25 แสดง plastocyanin ของ *Dryopteris crassirhizoma* , รูปที่ 3.26 แสดง plastocyanin ของ *Anabaena variabilis* , รูปที่ 3.27 แสดง plastocyanin ของ *Spinacia oleracea* , รูปที่ 3.28 แสดง plastocyanin peptide ของ plastocyanin *Lactuca sativa* ซึ่งตรงกับ plastocyanin peptide ส่วนของ *Canna indica*.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
 Email :
 Search title :
 MS data file : Fern1_RB5_01_12626.mgf
 Database : SwissProt 2018_05 (557491 sequences; 199978344 residues)
 Timestamp : 17 Jun 2018 at 06:21:47 GMT
 Protein hits : [PLAS_DRYCA](#) Plastocyanin OS=*Dryopteris crassirhizoma* OX=97234 GN=PETE PE=1 SV=1
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT9 PE=1 SV=3
[K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT1 PE=1 SV=6
[TRYP_PIG](#) Trypsin OS=Sus scrofa OX=9823 PE=1 SV=1
[TPX_ECOLI](#) Thiols peroxidase OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=tpx PE=1 SV=2
[K22F_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT2 PE=1 SV=1
[K1C9_CANLF](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=KRT9 PE=3 SV=1
[K1C10_BOVIN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Bos taurus OX=9913 GN=KRT10 PE=3 SV=1

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 46 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	Help
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
Standard scoring	☐ MudPIT scoring ☒	Display non-significant matches ☐
Show pop-ups	☒ Suppress pop-ups ☐	Sort unassigned
Preferred taxonomy	All entries	Require bold red ☐

Select All Select None Search Selected ☐ Error tolerant

1. [PLAS_DRYCA](#) Mass: 10769 Score: 1490 Matches: 33(33) Sequences: 6(6) emPAI: 7.62
 Plastocyanin OS=*Dryopteris crassirhizoma* OX=97234 GN=PETE PE=1 SV=1
☐ Check to include this hit in error tolerant search

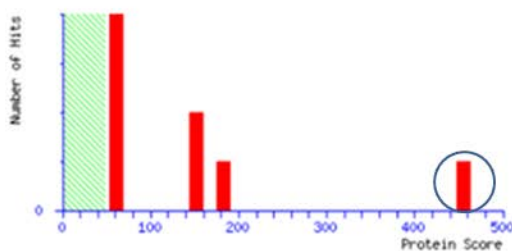
รูปที่ 3.25 ผล Histogram จาก Mascot search database recombinant
 plastocyanin protein ของ PC:Fern (*Dryopteris crassirhizoma*) score hit
 ที่ 1490

MASCOT Search Results

User :
 Email :
 Search title :
 MS data file : GIM2_RB8_01_12630.mgf
 Database : SwissProt 2018_05 (557491 sequences; 199978344 residues)
 Timestamp : 17 Jun 2018 at 06:27:59 GMT
 Protein hits : [PLAS_ANAVA](#) Plastocyanin OS=*Anabaena variabilis* OX=264691 GN=petE PE=1 SV=1
[K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT1 PE=1 SV=6
[TRYP_PIG](#) Trypsin OS=Sus scrofa OX=9823 PE=1 SV=1
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT9 PE=1 SV=3
[BL7_ECO24](#) 50S ribosomal protein L7/L12 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) OX=513333 GN=blsA
[HINT_ECOLI](#) Purine nucleoside phosphoramidase OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=hint
[K1C9_CANLF](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=KRT9 PE=3 SV=1
[UP03_PINHA](#) Unknown protein 3 (Fragment) OS=Pinus halepensis OX=71633 PE=1 SV=1

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 47 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Anabaena variabilis

Peptide Summary Report

Format As: [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Standard scoring ☐ MudPIT scoring ☒ Display non-significant matches ☐ Show sub-sets

Show pop-ups ☒ Suppress pop-ups ☐ Sort unassigned Require bold red ☐

Preferred taxonomy

☐ Error tolerant

1. [PLAS_ANAVA](#) Mass: 11097 Score: 455 Matches: 12(12) Sequences: 4(4) emPAI: 1.89
 Plastocyanin OS=*Anabaena variabilis* OX=264691 GN=petE PE=1 SV=1
☐ Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
☒ 202	487.2921	972.5697	972.5644	0.0053	0	54	0.015	1	U	K.GLLVFEPAK.L

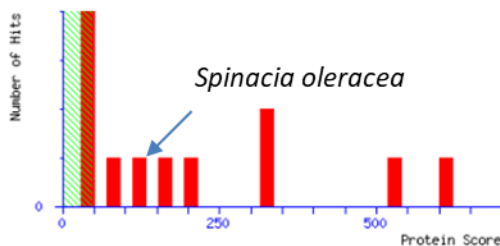
รูปที่ 3.26 ผล Histogram จาก Mascot search database recombinant
 plastocyanin protein ของ PC:cyanobacterium (*Anabaena variabilis*)
 score hit ที่ 455

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
 Email :
 Search title :
 MS data file : SPN1_RC1_01_12631.mgf
 Database : SwissProt 2018_05 (557491 sequences; 199978344 residues)
 Timestamp : 17 Jun 2018 at 06:32:00 GMT
 Protein hits : [K1C10_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT10 PE=1 SV=6
[K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT1 PE=1 SV=6
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT9 PE=1 SV=3
[K1C10_BOVIN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Bos taurus OX=9913 GN=KRT10 PE=3 SV=1
[K22E_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 **epidermal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT2 PE=1 SV=2**
[PLAS_SPIOL](#) Plastocyanin, chloroplastic OS=**Spinacia oleracea** OX=3562 GN=PETE PE=1 SV=2
[TRYP_PIG](#) Trypsin OS=Sus scrofa OX=9823 PE=1 SV=1
[UP01_PINHA](#) Unknown protein 1 (Fragment) OS=Pinus halepensis OX=71633 PE=1 SV=1
[UP03_PINHA](#) Unknown protein 3 (Fragment) OS=Pinus halepensis OX=71633 PE=1 SV=1
[K1C9_CANLF](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=KRT9 PE=3 SV=1
[PEX1_HUMAN](#) Peroxisome biogenesis factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PEX1 PE=1 SV=1
[K2C4_MOUSE](#) Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Krt4 PE=1 SV=2

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 47 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits:

Standard scoring ☒ MudPIT scoring ☐ Display non-significant matches ☐ Show sub-sets

Show pop-ups ☒ Suppress pop-ups ☐ Sort unassigned: Require bold red ☐

Preferred taxonomy:

Select All Select None Search Selected ☐ Error tolerant

6. [PLAS_SPIOL](#) Mass: 16907 Score: 148 Matches: 5(5) Sequences: 2(2) emPAI: 0.72
 Plastocyanin, chloroplastic OS=Spinacia oleracea OX=3562 GN=PETE PE=1 SV=2

☐ Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
☒ 397	948.9524	1895.8903	1895.8822	0.0081	0	86	5.8e-06	1	U	K.ISHSEEDLLNAPGETYK.V
☒ 399	632.9730	1895.8971	1895.8822	0.0149	0	(61)	0.0017	1	U	K.ISHSEEDLLNAPGETYK.V
☒ 403	638.3043	1911.8912	1911.8771	0.0140	0	(51)	0.016	1	U	K.ISHSEEDLLNAPGETYK.V + Oxidation (M)
☒ 404	638.3093	1911.9060	1911.8771	0.0288	0	(49)	0.031	1	U	K.ISHSEEDLLNAPGETYK.V + Oxidation (M)
☒ 429	848.0743	2541.2010	2541.1772	0.0238	0	62	0.0012	1	U	K.NNAGFPHNVVFEDEIPSGVDAK.I

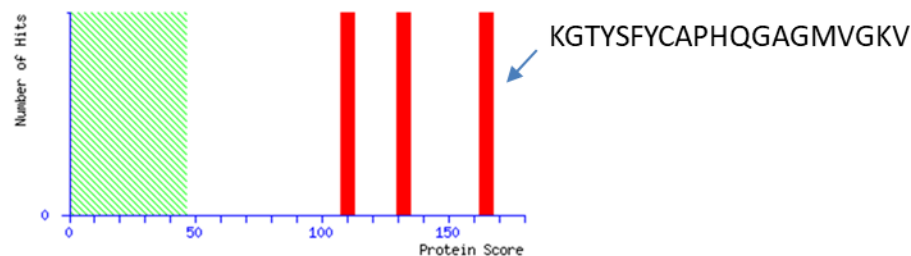
รูปที่ 3.27 ผล Histogram จาก Mascot search database recombinant
 plastocyanin protein ของ PC:spinach (Spinacia oleracea) score hit ที่
 146

Mascot Search Results

User :
 Email :
 Search title :
 MS data file : PC1_RC2_01_12632.mgf
 Database : SwissProt 2018_05 (557491 sequences; 199978344 residues)
 Timestamp : 17 Jun 2018 at 06:30:13 GMT
 Protein hits : [PLAS_LACSA](#) Plastocyanin OS=Lactuca sativa OX=4236 GN=PETE PE=1 SV=1
 [TRYP_PIG](#) Trypsin OS=Sus scrofa OX=9823 PE=1 SV=1
 [PLAS_SOLLC](#) Plastocyanin, chloroplastic OS=Solanum lycopersicum OX=4081 GN=PETE PE=2 SV=1

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 46 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	Help	
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits	AUTO
Standard scoring	☒ MudPIT scoring	Display non-significant matches	☐
Show pop-ups	☒ Suppress pop-ups	Sort unassigned	Decreasing Score
Preferred taxonomy	All entries	Require bold red	☐

☐ Error tolerant

1. [PLAS_LACSA](#) Mass: 10353 Score: 165 Matches: 11(11) Sequences: 2(2) emPAI: 1.34
 Plastocyanin OS=Lactuca sativa OX=4236 GN=PETE PE=1 SV=1
☐ Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
☒ 320	643.9634	1928.8684	1929.8502	-0.9818	0	(72) 0.00014	1	U	K.GTYSFYCAPHQGAGMVGK.V + Ca

รูปที่ 3.28 ผล Histogram จาก Mascot search database recombinant plastocyanin protein ของ PC:Canna (Canna indica) score hit ที่ 165

6. การทดสอบฤทธิ์ Anti-HIV-1 reverse transcriptase

6.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ชุดทดสอบ EnzChek® Reverse Transcriptase Assay Kit

นำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 reverse transcriptase โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปใช้หลักการ ELISA โดยใช้หลักการเข้า inhibited การทำงานของ enzyme reverse transcriptase HIV1 ซึ่งจะวัดผลการทดสอบที่ปริมาณของ non-

radioactive-labeled nucleotides ที่มีเหลืออยู่ใน reaction โดยมียา doxorubicin hydrochloride เป็น positive control และคำนวณประสิทธิภาพออกมาเป็นผล %IR ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งไม่สามารถหาค่าได้ ณ ความเข้มข้นที่ 100 µg/ml ดังตารางที่ 3.3

6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV โดยวิธี syncytium reduction assay

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ recombinant protein ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ไม่สามารถหาค่าได้ ต้องเตรียมความเข้มข้นให้มากกว่านี้ ดังแสดงผลในตารางที่ 3.3

Protein sample	HIV-1-RT inhibition ^b		syncytium reduction assay ^a			
	Conc (µg/ml)	%IR	IC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	TI	ฤทธิ์
PC:Spinach ^b	100	-	>250	>250	-	inactive
PC:Fern ^b	100	-	14.32	66	0.22	inactive
PC:Cyanobacterium ^b	80	-	>200	>200	-	inactive
AZT	ND	ND	>10 ⁻⁸ µM	4.66x10 ⁻⁹ µM	2.15	active
Efavirenz	20 µM	59	ND	ND	ND	ND
Doxorubicin	0.5 mM	82	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ 3.3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของ HIV-1-RT inhibit activity และ การทดสอบฤทธิ์ inhibit syncytium formation ของ sample crude protein extract

a Range of doses assayed was 0.12-250 µg/ml; ผลแสดง mean ± S.E.M. (n = 3), b results are mean ± S.E.M. (n = 3), ND: not done, - : ผลไม่สามารถประมวลได้ IC₅₀ was the dose of extract, fraction that inhibited 50% metabolic activity of uninfected 1A2 cells.

EC₅₀ was the dose of extract, fraction that reduced 50% syncytium formation by ^{ΔTat/Rev}MC99 virus in 1A2 cells.

TI (therapeutic index) = IC₅₀/EC₅₀

จากการเตรียมตัวอย่างโปรตีนด้วย recombinant technique พบว่า โปรตีน plastocyanin ที่ expressed ได้มีปัญหาเรื่อง soluble protein aggregate or precipitate ระหว่างขบวนการ concentration ไม่สามารถที่จะเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นถึงระดับที่สามารถนำไปทดสอบ activity ได้ ซึ่งทางผู้ทดลองได้ลองพยายามปรับเปลี่ยน buffer ที่ใช้ในการ suspend ตัวอย่างโปรตีน เช่น 5-20 mM Tris-HCl pH6-8, 5-20 mM Phosphate buffer pH6-8 และลองใช้การ vary glycerol ที่ 5-20% ใช้ผสมกับ buffer ซึ่งพบว่า ต้องใช้ 20% glycerol (Rariy RV, 1997) (Boonyuen U, et al 2015) ในการเตรียมตัวอย่างแต่ก็ทำได้ conc ที่สูงสุดได้แค่ ประมาณ 1 mg/ml PC:fern และ PC:spinach แต่กับ PC:cyanobacterium ได้แค่ 800 µg/ml พอนำไป test activity ความเข้นดังกล่าวไม่พอที่จะประมวลผล

ต่อมาทางผู้ทำวิจัยมีผลการทดลองของ plastocyanin ที่ clone gene ได้จาก ต้นพุทธรักษา (*Canna indica* L.) โดยได้รับทุนวิจัยจากแหล่งอื่นร่วมด้วยดังจะขอเพิ่มส่วนของการทำวิจัย ของ PC:Canna เข้ามาในการ report ผลในครั้งนี้ด้วย เพราะเห็นว่า เป็น โปรตีนชนิดเดียวกันและได้ใช้ supply ในส่วนของสารเคมีในห้องแลปด้วยกัน

```

1  GCGTTCGACGTGCTGCTGGGCGGCGACGGCGGGGTGCTGGCATTCTGCGGAGCGAGTTC 60
   A F D V L L G G D G G V L A F V P S E F
61  TCGGTGCCCCGCCGAGAGACCATCGTGTTCAGAACAAACGCCGGGTCCCCCACAACGTG 120
   S V P A G E T I V F K N N A G F P (H) N V
121 GTGTTGACGAGGACGAGATACCGTCGGGGGTGGACGTGGGGTCGATCTCCATGTCTGAG 180
   V F D E D E I P S G V D V G S I S M S E
181 GAGGACTTGTGAACGCGCCCGGGGAGATCTACAAGGTGACCTTGAAAGAGAAGGGCACC 240
   E D L L N A P G E I Y K V T L K E K G T
241 TACAGCTTCTACTGCGCGCCGCACCAGGGAGCCGGCATGGTCGGCAAAGTCACTGTTAAC 300
   Y S F Y (C) A P (H) Q G A G (M) V G K V T V N
301 TAGGTGCATGGACGTGCTCTAATTCCCTGCGCTTTTGTATGATCTCTTTTGAGTCAAGT 360
   *
361 TCGTGATGGATGTAGTCTTCTTGATCATCTCGAAATTAAAGGAAATGATGAGTTGAAGA 420
421 TTAATTAGCGGCATATAATATTACAGTGATGTAAATTC TTGTAATTGGAAGGTTAGTGC 480
481 TGTTGTTGTTATCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 514

```

รูปที่ 3.29 แสดงลำดับ Nucleotide 514 bases และ open reading frame 101

amino acids ของ plastocyanin gene ที่ได้จากใบต้นพุทธรักษา ส่วนที่ขีดเส้นใต้ แสดง N-terminal sequence * แสดง stop codon ตัวอักษรที่วงกลม แสดง conserve Cu ligand binding ของ plastocyanin protein

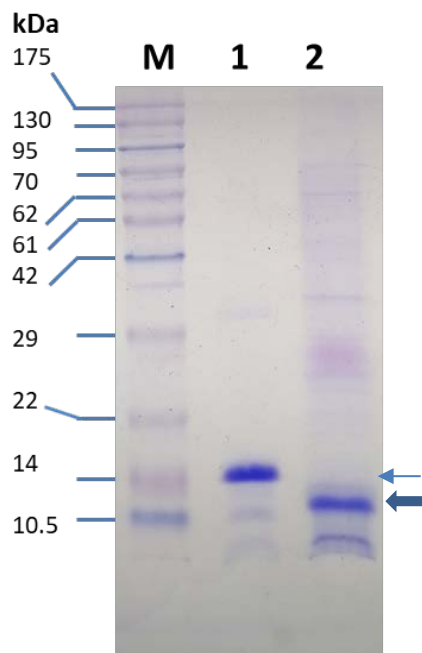
การ clone plastocyanin gene ที่ amplify ด้วย primers ที่ออกแบบไว้ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้สภาวะการขยายยีนจาก cDNA ใช้ pGEM®-T Easy เป็น DNA vector คัดเลือก clone ที่มีขนาดของยีนที่ถูกต้อง แล้วนำไปหาลำดับเบสของยีน พบว่าได้ 514 bp มีลำดับเบสดังแสดงในรูปที่ 3.29 เมื่อได้ยีนของโปรตีนที่สมบูรณ์แล้ว ต่อมาจึง subclone gene โดยการใช้ PCR fragment ที่ added restriction enzyme HindIII และ BamHI เข้าไปใน primer ที่ใช้ amplify หัวท้ายของ gene เข้า pET28a(+) expression vector แล้วศึกษาการ express gene ใน E.coli BL21(DE3) เหมือน gene PC ที่ clone ก่อนหน้านี้ขบวนการ purify protein ใช้ Histrap ดังแสดง fraction ไว้ในรูปที่ 3.23 และผลการ detection protein ว่า frame ที่อ่านได้เป็น plastocyanin protein ด้วย LC/MS-MS ดังแสดงไว้ในรูป 3.28 นำ fraction ที่มีโปรตีนเหมือนกันมา pool รวมกัน และทำการ dialyse กับบัฟเฟอร์ (20 mM sodium phosphate, 1mM EDTA) เพื่อกำจัด NaCl และ imidazole ออกไป

จากนั้น concentrate โปรตีนโดยการทำให้ ultrafiltration ด้วย Amicon® Ultra-15 centrifugal filter devices (Amicon (Molecular weight cutoff 5,000 kDa) จนได้ความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 mg/ml จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบ activity โดยใช้ชุดทดสอบ Reverse Transcriptase Assay, colorimetric (Roche applied science) ที่ความเข้มข้น 100 – 6.25 µg/ml ได้ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ดังตารางที่ 3.4

การตัดส่วนของ Fusion protein ด้วย Thrombin protease

นำโปรตีน recombinant (His)6-tagged protein plastocyanin ที่แยกได้มาทำการตัดส่วน (His)6-tagged fusion protein ออกด้วยเอนไซม์ Thrombin protease ใน reaction 200 µL ที่ประกอบด้วย 200 ug recombinant (His)6-tagged protein plastocyanin, 1x Thrombin cleavage buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂), 0.2 unit Thrombin ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบการตัดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE ผลแสดงดังในรูปที่ 3.30

ทำการ purify โปรตีน recombinant plastocyanin ที่ถูกตัดด้วย Thrombin protease อีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนของ (His)6-tagged fusion protein ที่ถูกตัดออก และ fusion protein ที่ไม่ถูกตัด ด้วย Hitrap Chelating HP affinity column, 1 ml โดยเก็บ fraction ของโปรตีนที่ไม่จับกับ Ni²⁺ ของ column ตรวจสอบโปรตีน fraction ด้วย SDS-PAGE ผลแสดงดังในรูปที่ 3.30



รูปที่ 3.30 แสดงการ purify โปรตีน recombinant plastocyanin Canna ที่ถูกตัดด้วย thrombin protease โดยใช้ Hitrap Chelating HP affinity column

ลูกศร ← แสดงตำแหน่งของ fusion โปรตีน

ลูกศร ← แสดงตำแหน่งของโปรตีน plastocyanin

lane 1 : โปรตีน recombinant plastocyanin ที่ผ่านการแยกด้วย Hitrap Chelating HP affinity column

lane 2 : โปรตีน recombinant plastocyanin ที่ถูกตัดด้วย thrombin protease หลังจากนั้นนำไป purify อีกครั้งด้วย Hitrap Chelating HP affinity column

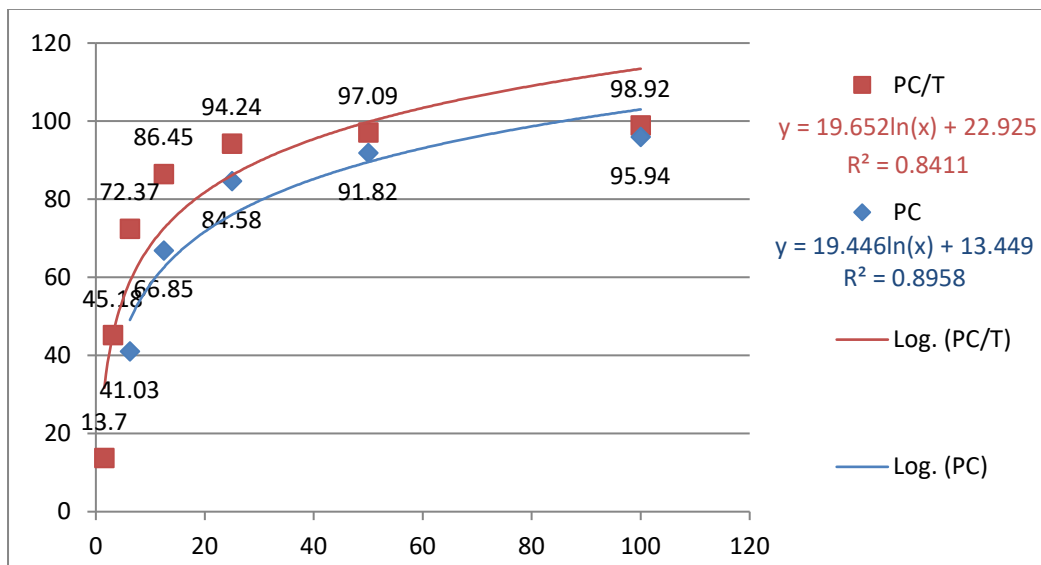
นำ fraction ที่มีโปรตีนเหมือนกันมา pool รวมกัน และทำการ dialyse โปรตีนด้วยบัฟเฟอร์ (20 mM sodium phosphate, 1mM EDTA) จากนั้น concentrate โปรตีนด้วย Amicon ultrafiltration จนได้ความเข้มข้นของโปรตีน ประมาณ 1 mg/ml ผลแสดงดังในรูปที่ 3.30 (lane 2)
นำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 reverse transcriptase โดยใช้ชุดทดสอบ Reverse Transcriptase Assay, colorimetric (Roche applied science) ที่ความเข้มข้น 100 – 1.5625 µg/ml ได้ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ที่ %IR ระหว่าง 95.94 - 13.70 ดังตารางที่ 3.4

sample	Concentration(µg/ml)	%IR
recombinant protein plastocyanin (PC)	100	95.94
	50	91.97
	25	84.58
	12.5	66.85
	6.25	41.03
recombinant protein plastocyanin cleaved with thrombin protease (PC/T)	100	98.92
	50	97.09
	25	94.24
	12.5	86.45
	6.25	72.37
	3.125	45.18
	1.5625	13.70
doxorubicin	1 mM	98.92

ตารางที่ 3.4 ผลทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 Reverse Transcriptase ของ recombinant plastocyanin PC:Canna

ทำการหาค่า EC_{50} โดยการ plot กราฟระหว่าง ความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการยับยั้ง %IR ของโปรตีน recombinant plastocyanin fusion protein และ recombinant plastocyanin ที่ตัดด้วย Thrombin ได้เท่ากับ 6.55 µg/ml และ

3.97 µg/ml ตามลำดับจากการคำนวณ กราฟที่แสดงในรูปที่ 3.31 ทั้งนี้ได้ทำการทดสอบเพื่อพิสูจน์ว่าการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ HIV-1 reverse transcriptase เป็นผลมาจากโปรตีน plastocyanin จึงได้นำโปรตีน plastocyanin ไปทำให้เสียสภาพโดยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปทดสอบฤทธิ์ พบว่าให้ค่าการยับยั้งน้อยลงมาก คือ โปรตีน recombinant fusion plastocyanin (PC) inactivated ที่ 50 µg/ml ได้เสียคุณสมบัติในการยับยั้ง HIV-1 reverse transcriptase โดยให้ค่ายับยั้งเท่ากับ 7.39 %IR และ recombinant plastocyanin ที่ตัดด้วย thrombin protease (PC/T) แล้ว inactivated ที่ 25 µg/ml ให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 14.79 %IR ดังนั้น แสดงว่า โปรตีน plastocyanin สามารถยับยั้ง HIV-1 reverse transcriptase ได้ดีดังกล่าวแล้ว



รูปที่ 3.31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-RT (%IR) ของ recombinant plastocyanin fusion protein และ recombinant plastocyanin ที่ตัดด้วย Thrombin protease

นอกจากนี้ PC:canna และ PC:canna/T recombinant plastocyanin ยังแสดงฤทธิ์ active ด้วยการทดสอบ syncytium reduction assay ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.5 อีกด้วย

Protein sample	syncytium reduction assay			
	IC50 (µg/ml)	EC50 (µg/ml)	TI	ฤทธิ์
PC:canna	>250	38.54	>6.49	active
PC:canna/T	>250	128.84	>1.92	active
AZT	$>10^{-8}$ µM	4.66×10^{-9} µM	2.15	active

ตารางที่ 3.5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ inhibit syncytium formation ของ PC:canna และ PC:canna/T

Range of doses assayed was 0.12-250 µg/ml; ผลแสดง mean ± S.E.M. (n = 3)

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การ clone gene ของ plastocyanin recombinant protein ของ PC:spinach, PC:fern, PC:cyanobacterium จะมี (His)6-tagged protein ทั้งหัวและท้ายยื่นซึ่งได้จากการ synthesize เพื่อการศึกษา expression ในขั้นตอนของการ purify ด้วย Histrap column affinity แต่ในขบวนการทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยการใช้ concentrator filter เมื่อโปรตีนเข้มข้นก็จะเกิดการตกตะกอน ถึงแม้ว่าจะพยายามปรับ buffer และ condition ต่างๆ เช่น การเติม 5-20 %glycerol ลงไปใน solution ระหว่างการ concentrate แล้ว แต่ความเข้มข้นก็ยังไม่พอที่จะทดสอบ สามารถเตรียมความเข้มข้นได้แค่ 1 mg/ml ซึ่งเมื่อนำทดสอบฤทธิ์ด้วย cell base assay ของ syncytium reduction assay ผลคือ inactive และ เมื่อนำไป ทดสอบ ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase HIV-1 โดย assay kit ก็ไม่สามารถหาค่าได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.3 เมื่อเทียบกับยาที่ใช้เป็น control

ต่อมามีข้อมูลการศึกษา plastocyanin ที่เป็น recombinant จาก Canna indica โดย PC:canna ได้จากการ clone gene จาก cDNA ของพืชโดยตรง ใช้ stop codon ของตัว gene เองไม่ได้ใช้ stop codon ของ vector pET28a ตัวโปรตีนที่ได้จะมี (His)6-tagged protein เพียงข้างเดียวดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.32 เลยไม่แน่ใจว่าการมี his6-tagged fusion ทั้งหัวและท้ายจะมีผลต่อการ aggregation ในขั้นตอนการ concentrate ของโปรตีน PC:spinach PC:fern PC:cyanobacterium หรือไม่ ทำให้ไม่สามารถเตรียมโปรตีนได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ซึ่งแตกต่างจาก PC:canna มี his6-tagged fusion เพียงข้างเดียว ดังแสดงผลการ alignment ของ amino acids ในรูปที่ 3.32 และเมื่อนำ recombinant Pc: Canna และ recombinant Pc: Canna /T (โดยการตัดเอา Thrombin peptide ออกแล้ว) มาทดสอบฤทธิ์ด้วย cell base assay ของ syncytium reduction assay ผลคือ active ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.5 และ เมื่อนำไป ทดสอบ ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase HIV-1 โดย assay kit ที่ความเข้มข้น 100-1.56µg/ml ได้ผลการยับยั้งที่ %IR ระหว่าง 95.94-13.7 ก็ สามารถหาค่าได้เท่า ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.4

จึงไม่สามารถทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ anti-HIV ของ โปรตีนพลาสโตไซยานิน ระหว่างพืชและไซยาโนแบคทีเรียได้

	10	20	30	40	50
PC spinach	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGSGSV	EVLLGGDGS	LAFLP		
PC Fern	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGSGSAKVE	GVGDEVGNFKFYP			
PC cyanobacterium	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGSGSMET	YTVKLGSDKGLLV			
PC canna	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGSGMAFD	VLLGGDGGVLAF			

	60	70	80	90	100
PC spinach	GDPSVASGEEIVFKNNAGFP	HNVVFEDEEIPSGVDA	AKISMSEEDLLNAP		
PC Fern	DSITVSAGEAVEFTLVGETGHNIVFDIPAGAPGT	VASELKAASMDENDLL			
PC cyanobacterium	FEPAKLTIKPGDTEFLNNKVPPHN	VVFDAALNPAKSADLAKSLSHKQLL			
PC canna	VPSEFSVPAGETIVFKNNAGFP	HNVVFEDEEIPSGVDVGSISMSEEDLLN			

	110	120	130	140	150
PC spinach	GETYKVTLT	EKGTYKFCSPHQAGMVGKVT	VNKLAAALEHHHHHH*	DPA	
PC Fern	SEDEPSFKAKVSTPGTYTFYCTPHKSANMKG	TLTVKKLAAALEHHHHHH*			
PC cyanobacterium	MSPGQSTSTTFPADAPAGEYTFYCEPHRGAGMVG	KITVAGKLAAALEHHH			
PC canna	APGEIYKVTLT	EKGTYSFYCAPHQAGMVGKVTN*	VHGRRSNSLRFCMI		

	160	170	180	190
PC spinach	ANKARKEAE			
PC Fern	DPAANKARKEAE			
PC cyanobacterium	HHH*DPAANKARKEAE			
PC canna	SFESSS*WM*SSCIISKLEACGRTRAPPPPPLRSGC*QSPKGS*			

รูปที่ 3.32 แสดงการ alignment ของ open reading frame ของ recombinant plastocyanin protein * แสดง stop codon
 PCcanna ใช้ stop codon ของ gene , PCspinach PCfern
 PCcyanobacterium ใช้ stop codon ของ vector

References

Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH, et al Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol.* 1994;243(3):369-87.

Jakobsen MR, Tolstrup M, S gaard OS, et al. Transmission of HIV-1 drugresistant variants: Prevalence and effect on treatment outcome. *Clin Inf Dis.* 2010;50(4):566–73.

Ng TB, Huang B, Fong WP, Yeung HW. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life sci.* 1997;61:933-4.

Woradulayapinij W, Soonthornchareonnon N, Wiwat C. In vitro HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. *J Ethnopharmacol.* 2005;101:84-9.

Huskens D, Ferir G, Vermeire K, Kehr JC, Balzarini J, et al. Microvirin, a novel alpha(1,2)-mannose-specific lectin isolated from *Microcystis aeruginosa*, has anti-HIV-1 activity comparable with that of cyanovirin-N but a much higher safety profile. *J Biol Chem.* 2010;285:24845–54.

Thepouyporn A, Yoosook C, Chuakul W, Thirapanmethee K, Napaswad C andWiwat C. Purification and characterization of anti-HIV-1 protein from *Canna indica* L. leaves. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* 2012;43(5):1153-59.

Sato K., Kohzuma T. and Dennison C. Active-site structure and electrontransfer reactivity of plastocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 2003;125:2101–12, De Rienzo F, Gabdouline RR, Wade RC, Sola M and Menziani MC Computational approaches to structural and functional analysis of plastocyanin and other blue copper proteins. Review. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2004;61:1123-42.

Ubbink M. Complexes of photosynthetic redox proteins studied by NMR. *Photosynth Res.* 2004;81(3):277-87.

Navarro JA, Hervás M, De la Rosa MA. Purification of plastocyanin and cytochrome c6 from plants, green algae, and cyanobacteria. *Methods Mol Biol.* 2011;684:79-94.

Harris ELV. Concentration of the extract. In: Harris ELV and Angals, eds. *Protein purification methods: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1988: 125-74.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 1970;227:680–5.

Rary RV, Klibanov AM. Correct protein folding in glycerol, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 9;94(25):13520-3.

Boonyuen U, Promnares K, Junkree S, Day PJ N, Imwong M. Efficient in vitro refolding and functional characterization of recombinant human liver carboxylesterase (CES1) expressed in E.coli , *Protein Expression and Purification.* 2015;107:68-75

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) อยู่ระหว่างการรอตีพิมพ์วารสารนานาชาติ
2. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือการจดสิทธิบัตร) นำเสนอโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The 11th International Symposium of the Protein Society of Thailand 3-5 August 2016 Convention Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok (PST)

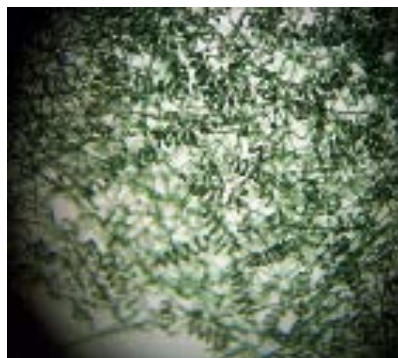
ภาคผนวก



รูปที่ ผ1 ปวยเล้ง Spinach (*Spinacia oleracea* L.)



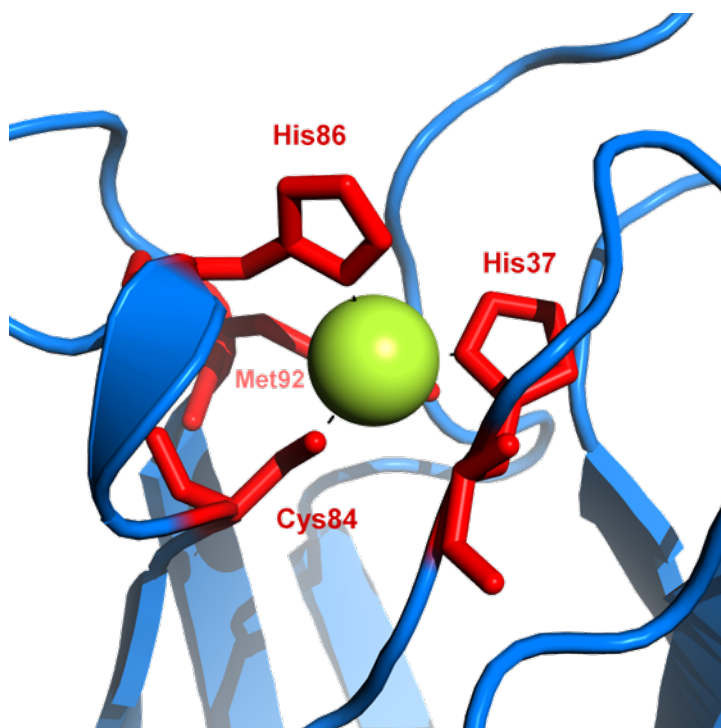
รูปที่ ผ2 เฟิร์นข้าหลวง Fern (*Asplenium nidus* L.)



รูปที่ ผ3 ไชยาโนแบคทีเรีย คือ สาหร่าย spirulina (*Spirulina platensis*)



รูปที่ ผ4 พุทธรักษาพันธุ์พื้นเมือง (*Canna indica* L.)



รูปที่ ผ5 แสดง The copper site in plastocyanin, with the four amino acids that bind the metal labeled.

(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Plastocyanin_copper_binding.png)

sample	ul/react	mea1	mea2	mea3	average	%IR
PC:cyanobacterium						
8µg/100µlreaction	2.5	2038	2628	2273	2313	-6.4919
PC:Spinach						
10µg/100µlreaction	2.5	1909	1885	1921	1905	-4.2865
PC:Fern						
10µg/100µlreaction	2.5	1881	2060	1892	1944	-4.4991
Doxo 0.5 mM/reaction	2	937	958	985	960	0.82162
Enfa 20 uM/reaction	2.5	1013	1005	988	1002	0.59459
Plus RT		1104	1120	1090	1112	
minus RT		936	918	1017	927	

triplicate

exc 480

emis 520

ตารางที่ ผ1 แสดงผลการคำนวณของ %IR ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์

reverse transcriptase HIV-1 โดย EnzChek Reverse Transcriptase Assay Kit

ของ recombinant protein

จากผลการทดลองการวัดค่า %IR ของ recombinant protein PC:cyanobacterium

ได้ค่า -649, PC:spinach ได้ค่า -428 PC:fern ได้ค่า -449 ไม่สามารถหาค่าได้

ในขณะที่ Doxorubicin hydrochloride 0.5mM ได้ค่า 82%IR และ Efavirenz 20µM

ได้ค่า 59 %IR

IC50		Crude spirulina													
dose (ug/ml)	x=log(dose)	T/C%	control	fa/fu=(D-C)/Cy	log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	IC ₅₀ SPR						
500	2.69897	90.61	100	0.10357425	-0.984748204				>500						
250	2.39794	99.23	100	0.007754035	-2.110472254										
125	2.09691	106.77	100	-0.06343221	#NUM!										
62.5	1.79588	111.47	100	-0.102897504	#NUM!										
31.25	1.49485	111.42	100	-0.102465269	#NUM!										
15.6	1.193124598	109.00	100	-0.082574079	#NUM!										
7.8	0.892094603	106.91	100	-0.064607917	#NUM!										
3.9	0.591064607	112.01	100	-0.10719706	#NUM!										
1.95	0.290034611	102.13	100	-0.020849759	#NUM!										
0.975	-0.01099538	108.62	100	-0.079400379	#NUM!										
0.4975	-0.30320691	93.78	100	0.06630414	-1.178459351										
0.24375	-0.61305538	88.20	100	0.133799959	-0.873544018										
EC50		Crude spirulina													
dose (ug/ml)	x=log(dose)	% inh	control	fa/fu=(D-C)/Cy	log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	EC ₅₀ SPR						
500	2.698970004	95.15	100	0.050955414	-1.292809665	-0.5343	-0.622	0.85873	7.223157711						
250	2.397940009	89.56	100	0.116605934	-0.933279347										
125	2.096910013	84.90	100	0.177924217	-0.749764936			TI =>	69.22180298						
62.5	1.795880017	78.18	100	0.279069767	-0.55428721				ACTIVE						
31.25	1.494850022	69.42	100	0.440564137	-0.355990858										
15.6	1.193124598	55.24	100	0.810126582	-0.091447117										
7.8	0.892094603	46.01	100	1.17325228	0.069391407										
3.9	0.591064607	39.95	100	1.502917153	0.176935041										
1.95	0.290034611	32.49	100	2.077474892	0.317535784										
0.975	-0.01099538	28.95	100	2.45410628	0.389893367										
0.4975	-0.30320691	19.07	100	4.244498778	0.627826413										
0.24375	-0.61305538	8.81	100	10.34920635	1.014907046										
AT								CT		1.86283					
Crude spirulina	well1	well2	well3	ผลรวม	เฉลี่ย	ค่า syn	ค่า inh	Crude spirulina	well C	well D	ผลรวม	เฉลี่ย	OD drug	T-D	ค่า viability
500	3	11	12	26	8.67	0.04848	0.95152	500	1.81	1.656	3.466	1.733	0.045	1.688	0.9061
250	19	14	23	56	18.67	0.10443	0.89557	250	1.893	1.908	3.801	1.901	0.052	1.8485	0.9923
125	21	26	34	81	27.00	0.15105	0.84895	125	2.031	2.071	4.102	2.051	0.062	1.989	1.0677
62.5	34	46	37	117	39.00	0.21818	0.78182	62.5	2.107	2.19	4.297	2.149	0.072	2.0765	1.1147
31.25	64	55	45	164	54.67	0.30583	0.69417	31.25	2.416	1.901	4.317	2.159	0.083	2.0755	1.1142
15.6	0	88	72	160	80.00	0.44755	0.55245	15.6	2.159	2.082	4.241	2.121	0.09	2.0305	1.0900
7.8	112	81	0	193	96.50	0.53986	0.46014	7.8	1.963	2.204	4.167	2.084	0.092	1.9915	1.0691
3.9	122	101	99	322	107.33	0.60047	0.39953	3.9	2.223	2.142	4.365	2.183	0.096	2.0865	1.1201
1.95	111	130	121	362	120.67	0.67506	0.32494	1.95	1.959	2.036	3.995	1.998	0.095	1.9025	1.0213
0.975	138	125	118	381	127.00	0.71049	0.28951	0.975	2.019	2.214	4.233	2.117	0.093	2.0235	1.0862
0.4975	144	151	139	434	144.67	0.80932	0.19068	0.4975	1.943	1.745	3.688	1.844	0.097	1.747	0.9378
0.24375	156	176	157	489	163.00	0.91189	0.08811	0.24375	1.799	1.687	3.486	1.743	0.1	1.643	0.8820

Scatter plot showing the relationship between log Dm and log Dm. The equation is $y = -0.6222x + 0.5343$ and $R^2 = 0.9823$.

AT		Crude spirulina								CT		Crude spirulina							
well1	well2	well3	ผลรวม	เฉลี่ย	ค่า syn	ค่า inh	well C	well D	ผลรวม	เฉลี่ย	OD drug	T-D	ค่า viability						
3	11	12	26	8.67	0.04848	0.95152	1.81	1.656	3.466	1.733	0.045	1.688	0.9061						
19	14	23	56	18.67	0.10443	0.89557	1.893	1.908	3.801	1.901	0.052	1.8485	0.9923						
21	26	34	81	27.00	0.15105	0.84895	2.031	2.071	4.102	2.051	0.062	1.989	1.0677						
34	46	37	117	39.00	0.21818	0.78182	2.107	2.19	4.297	2.149	0.072	2.0765	1.1147						
64	55	45	164	54.67	0.30583	0.69417	2.416	1.901	4.317	2.159	0.083	2.0755	1.1142						
0	88	72	160	80.00	0.44755	0.55245	2.159	2.082	4.241	2.121	0.09	2.0305	1.0900						
112	81	0	193	96.50	0.53986	0.46014	1.963	2.204	4.167	2.084	0.092	1.9915	1.0691						
122	101	99	322	107.33	0.60047	0.39953	2.223	2.142	4.365	2.183	0.096	2.0865	1.1201						
111	130	121	362	120.67	0.67506	0.32494	1.959	2.036	3.995	1.998	0.095	1.9025	1.0213						
138	125	118	381	127.00	0.71049	0.28951	2.019	2.214	4.233	2.117	0.093	2.0235	1.0862						
144	151	139	434	144.67	0.80932	0.19068	1.943	1.745	3.688	1.844	0.097	1.747	0.9378						
156	176	157	489	163.00	0.91189	0.08811	1.799	1.687	3.486	1.743	0.1	1.643	0.8820						

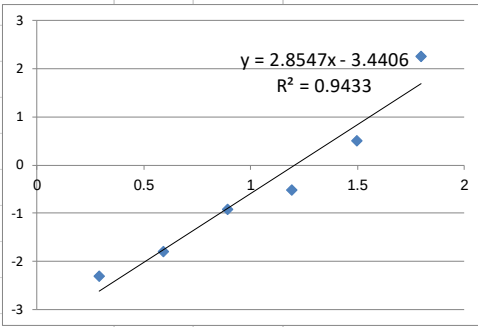
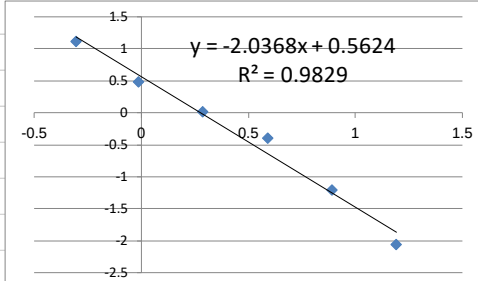
ตารางที่ ๒๒ แสดงผลของการทดลองฤทธิ์ syncytium reduction assay ของ crude spirulina protien

IC50	fraction spirulina 15% DEAE									
dose (ug/ml)	x=log(dose)	T/C%	control	fa/fu=(D-C)/Cy	log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	IC ₅₀ SPR	
500	2.69897	87.90	100	0.137608142	-0.861355867				>500	
250	2.39794	95.15	100	0.050963799	-1.292738208					
125	2.09691	106.88	100	-0.064373012	#NUM!					
62.5	1.79588	98.88	100	0.01131017	-1.946530863					
31.25	1.49485	99.10	100	0.009118815	-2.040061573					
15.6	1.193124598	104.01	100	-0.038537634	#NUM!					
7.8	0.892094603	107.69	100	-0.071369226	#NUM!					
3.9	0.591064607	83.18	100	0.202215769	-0.694184982					
1.95	0.290034611	91.45	100	0.093532922	-1.029035496					
0.975	-0.01099538	85.19	100	0.173808024	-0.759930179					
0.4975	-0.30320691	84.20	100	0.187652747	-0.726645074					
0.24375	-0.61305538	87.61	100	0.141441993	-0.849421631					
EC50	fraction spirulina 15% DEAE									
dose (ug/ml)	x=log(dose)	% inh	control	fa/fu=(D-C)/Cy	log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	EC ₅₀ SPR	
500	2.69897	73.71	100	0.356736243	-0.447652766	-0.8791	-0.48	1.83299	68.07471339	
250	2.39794	63.08	100	0.585365854	-0.232572615					
125	2.09691	55.24	100	0.810126582	-0.091447117			TI =>	7.344871174	
62.5	1.79588	50.21	100	0.991643454	-0.003644451				ACTIVE	
31.25	1.49485	41.26	100	1.423728814	0.153427274					
15.6	1.1931246	34.27	100	1.918367347	0.282931774					
7.8	0.8920946	26.99	100	2.704663212	0.432113194					
3.9	0.5910646	19.07	100	4.244498778	0.627826413					
1.95	0.290034611	18.69	100	4.349127182	0.638402108					
0.975	-0.01099538	7.69	100	12	1.079181246					
0.4975	-0.30320691	8.81	100	10.34920635	1.014907046					
0.24375	-0.61305538	-0.89	100	-113.8947368	#NUM!					

$y = -0.4796x + 0.8791$
 $R^2 = 0.9929$

AT								CT									
fraction spirulina		well1	well2	well3	ผลรวม	เฉลี่ย	ค่า syn	ค่า inh	fraction spirulina		well E	well F	ผลรวม	เฉลี่ย	OD drug	T-D	ค่า viability
500		52	43	46	141	47.00	0.26294	0.73706	500		1.587	1.768	3.355	1.678	0.04	1.638	0.87904
250		71	58	69	198	66.00	0.36923	0.63077	250		1.838	1.815	3.653	1.827	0.054	1.773	0.95151
125		79	84	77	240	80.00	0.44755	0.55245	125		1.985	2.129	4.114	2.057	0.066	1.991	1.06880
62.5		98	88	81	267	89.00	0.4979	0.5021	62.5		2.149	1.691	3.84	1.920	0.078	1.842	0.98882
31.25		114	99	102	315	105.00	0.58741	0.41259	31.25		1.957	1.911	3.868	1.934	0.088	1.846	0.99096
15.6		0	122	113	235	117.50	0.65734	0.34266	15.6		2.005	2.054	4.059	2.030	0.092	1.938	1.04008
7.8		0	139	122	261	130.50	0.73007	0.26993	7.8		1.847	2.361	4.208	2.104	0.098	2.006	1.07685
3.9		158	135	141	434	144.67	0.80932	0.19068	3.9		1.575	1.728	3.303	1.652	0.102	1.550	0.83180
1.95		145	151	140	436	145.33	0.81305	0.18695	1.95		1.65	1.965	3.615	1.808	0.104	1.704	0.91447
0.975		168	169	158	495	165.00	0.92308	0.07692	0.975		1.636	1.744	3.38	1.690	0.103	1.587	0.85193
0.4975		160	172	157	489	163.00	0.91189	0.08811	0.4975		1.661	1.672	3.333	1.667	0.098	1.569	0.84200
0.24375		188	163	190	541	180.33	1.00886	-0.0089	0.24375		1.708	1.762	3.47	1.735	0.103	1.632	0.87608

ตารางที่ ผ3 แสดงผลของการทดลองฤทธิ์ syncytium reduction assay ของ fraction spirulina
 15% DEAE protien

IC50	Fern Crude														
dose (ug/ml)	x=log(dose)	T/C%	control	fa/fu=(D-C)/Cy	log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	IC ₅₀ Fern Crude						
500	2.698970004	-0.89	100	-112.8655914	#NUM!	3.4406	2.8547	1.20524	16.04133397						
250	2.397940009	-1.18	100	-85.58130081	#NUM!										
125	2.096910013	-0.81	100	-124.8511905	#NUM!										
62.5	1.79588	0.55	100	181.5175439	2.258918606										
31.25	1.49485	23.91	100	3.183152392	0.502857431										
15.6	1.1931246	77.11	100	0.296871104	-0.527432072										
7.8	0.8920946	89.16	100	0.121550237	-0.915244189										
3.9	0.5910646	98.45	100	0.015768405	-1.802212245										
1.95	0.2900346	99.50	100	0.005025126	-2.298853076										
0.975	-0.01099538	103.21	100	-0.031060818	#NUM!										
0.4975	-0.30320691	99.75	100	0.002553725	-2.592825943										
0.24375	-0.61305538	100.87	100	-0.008623976	#NUM!										
EC50	Fern Crude														
dose (ug/ml)	x=log(dose)	% inh	control	fa/fu=(D-C)/Cy	log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	EC ₅₀ Fern Crude						
500	2.698970004	100.00	100	0	#NUM!	-0.5624	-2.037	0.27612	1.888510496						
250	2.397940009	100.00	100	0	#NUM!										
125	2.096910013	100.00	100	0	#NUM!										
62.5	1.795880017	100.00	100	0	#NUM!										
31.25	1.494850022	100.00	100	0	#NUM!										
15.6	1.1931246	99.12	100	0.008849558	-2.053078443										
7.8	0.8920946	94.15	100	0.062111801	-1.206825876										
3.9	0.5910646	71.15	100	0.405479452	-0.392031149										
1.95	0.2900346	49.12	100	1.035714286	0.015239967										
0.975	-0.010995	24.56	100	3.071428571	0.48734042										
0.4975	-0.303207	7.02	100	13.25	1.122215878										
0.24375	-0.61305538	-11.11	100	-10	#NUM!										
AT									1.73392						
Fern Crude	well1	well2	well3	ผลรวม	เฉลี่ย	ค่า syn	ค่า inh	Fern Crude	well C	well D	ผลรวม	เฉลี่ย	OD drug	T-D	ค่า viability
500	0	0	0	0	0.0000	0.0000	1.0000	500	0.176	0.171	0.347	0.1735	0.189	-0.0155	-0.00894
250	0	0	0	0	0.0000	0.0000	1.0000	250	0.141	0.138	0.279	0.1395	0.16	-0.0205	-0.01182
125	0	0	0	0	0.0000	0.0000	1.0000	125	0.118	0.124	0.242	0.121	0.135	-0.014	-0.00807
62.5	0	0	0	0	0.0000	0.0000	1.0000	62.5	0.135	0.128	0.263	0.1315	0.122	0.0095	0.00548
31.25	0	0	0	0	0.0000	0.0000	1.0000	31.25	0.41	0.657	1.067	0.5335	0.119	0.4145	0.23905
15.6	0	1	2	3	1.5000	0.0088	0.9912	15.6	1.407	1.487	2.894	1.447	0.11	1.337	0.77109
7.8	7	13	0	20	10.0000	0.0585	0.9415	7.8	1.6	1.69	3.29	1.645	0.099	1.546	0.89162
3.9	42	52	54	148	49.3333	0.2885	0.7115	3.9	1.815	1.781	3.596	1.798	0.091	1.707	0.98448
1.95	85	90	86	261	87.0000	0.5088	0.4912	1.95	1.701	1.708	3.409	1.7045	0.085	1.6195	0.93401
0.975	140	121	126	387	129.0000	0.7544	0.2456	0.975	1.781	1.978	3.759	1.8795	0.09	1.7895	1.03206
0.4975	151	179	147	477	159.0000	0.9298	0.0702	0.4975	1.722	1.921	3.643	1.8215	0.092	1.7295	0.99745
0.24375	209	184	177	570	190.0000	1.1111	-0.1111	0.24375	1.952	1.746	3.698	1.849	0.1	1.749	1.00870

ตารางที่ ๗4 แสดงผลของการทดลองฤทธิ์ syncytium reduction assay ของ Fern crude protien

IC50	Spinach 60-90 % NH4SO2								
dose (ug/ml)	x=log(dose)	T/C %	control	fa/fu=(D-C)/Cy	log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	IC ₅₀ SPNA 69
500	2.698970004	-4.76	100	-22.01717172	#NUM!	11.028	5.7361	1.92256	83.66823833
250	2.39794	0.05	100	1999	3.300812794				
125	2.09691	33.02	100	2.0286754	0.307212563				
62.5	1.79588	88.33	100	0.132168898	-0.878870732				
31.25	1.49485	99.57	100	0.004295781	-2.366957822				
15.6	1.1931246	99.99	100	0.00010001	-3.999956568				
7.8	0.892094603	107.56	100	-0.07028597	#NUM!				
3.9	0.591064607	104.94	100	-0.047036732	#NUM!				
1.95	0.290034611	94.87	100	0.054052685	-1.267182729				
0.975	-0.01099538	92.36	100	0.082682901	-1.082584292				
0.4975	-0.30320691	103.44	100	-0.03322182	#NUM!				
0.24375	-0.61305538	96.89	100	0.032093254	-1.493586247				
EC50	Spinach 60-90 % NH4SO2								
dose (ug/ml)	x=log(dose)	% inh	control	fa/fu=(D-C)/Cy	log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	EC ₅₀ SPNA 69
500	2.698970004	100.00	100	0	#NUM!	-2.3032	-1.78	1.29422	19.68898921
250	2.397940009	100.00	100	0	#NUM!				
125	2.09691	97.86	100	0.021912351	-1.659311032			TI =	4.249493838
62.5	1.79588	82.85	100	0.207058824	-0.683906258				ACTIVE
31.25	1.49485	50.68	100	0.973076923	-0.011852827				
15.6	1.1931246	38.60	100	1.590909091	0.201645364				
7.8	0.8920946	25.44	100	2.931034483	0.467020928				
3.9	0.5910646	18.52	100	4.4	0.643452676				
1.95	0.2900346	0.50	100	199	2.298853076				
0.975	-0.01099538	-3.31	100	-31.17647059	#NUM!				
0.4975	-0.30320691	-12.09	100	-9.274193548	#NUM!				
0.24375	-0.61305538	-19.30	100	-6.181818182	#NUM!				

$y = 5.7361x - 11.028$
 $R^2 = 0.9715$

$y = -1.7796x + 2.3032$
 $R^2 = 0.8984$

AT									CT								
Spinach 60-90 % NH4S	well1	well2	well3	ผลรวม	เฉลี่ย	ค่า syn	ค่า inh		Spinach 60-90 % Ni	well E	well F	ผลรวม	เฉลี่ย	OD drug	T-D	ค่า viability	
500	0	0	0	0	0.0000	0.0000	1.0000		500	0.095	0.094	0.189	0.0945	0.177	-0.0825	-0.0476	
250	0	0	0	0	0.0000	0.0000	1.0000		250	0.076	0.082	0.158	0.079	0.134	-0.0550	-0.0317	
125	2	2	7	11	3.6667	0.0214	0.9786		125	0.655	0.724	1.379	0.6895	0.117	0.5725	0.3302	
62.5	28	30	30	88	29.3333	0.1715	0.8285		62.5	1.624	1.631	3.255	1.6275	0.096	1.5315	0.8833	
31.25	88	86	79	253	84.3333	0.4932	0.5068		31.25	1.841	1.798	3.639	1.8195	0.093	1.7265	0.9957	
15.6	0	89	121	210	105.0000	0.6140	0.3860		15.6	1.838	1.864	3.702	1.851	0.09	1.7610	1.0156	
7.8	0	117	138	255	127.5000	0.7456	0.2544		7.8	2.085	1.825	3.91	1.955	0.09	1.8650	1.0756	
3.9	127	144	147	418	139.3333	0.8148	0.1852		3.9	2.095	1.72	3.815	1.9075	0.088	1.8195	1.0494	
1.95	141	156	159	456	152.0000	0.8889	0.1111		1.95	1.744	1.714	3.458	1.729	0.084	1.6450	0.9487	
0.975	170	183	177	530	176.6667	1.0331	-0.0331		0.975	1.749	1.638	3.387	1.6935	0.092	1.6015	0.9236	
0.4975	188	195	192	575	191.6667	1.1209	-0.1209		0.4975	1.921	1.85	3.771	1.8855	0.092	1.7935	1.0344	
0.24375	211	203	198	612	204.0000	1.1930	-0.1930		0.24375	1.771	1.775	3.546	1.773	0.093	1.6800	0.9689	

ตารางที่ ผ5 แสดงผลของการทดลองฤทธิ์ syncytium reduction assay ของ Spinach 60-90%

ammonium sulfate precipitation protein

Plate No.1						Inoculum (SFU/50ul) = 212.50			
ค่า IC50	PC:Fern								
dose (ug/ml)	x=log(dose)	T/C%	control	fa/fu=(D-C)/C	y=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	IC50
250	2.397940009	-250.27976076	100	-1.399552883	#NUM!	3.4307	2.96816	1.15583392	14.32
125	2.096910013	-166.82744871	100	-1.599421742	#NUM!				
62.5	1.795880017	0.50000000	100	199	2.298853076				
31.25	1.494850022	22.96825091	100	3.353836102	0.525541835				
15.63	1.193820026	58.54610157	100	0.708055657	-0.149932603				
7.81	0.89279003	61.79175510	100	0.618338884	-0.208773442				
3.91	0.591760035	99.50000000	101	0.015075377	-1.821731822				
1.95	0.290730039	126.80772611	102	-0.195632608	#NUM!				
0.98	-0.010299957	135.53283169	103	-0.240036538	#NUM!				
0.49	-0.311329952	125.51718224	104	-0.171428181	#NUM!				
0.24	-0.612359948	99.32900294	105	0.057093063	-1.243416654				
0.12	-0.913389944	116.58627564	106	-0.090802074	#NUM!				

ค่า EC50	PC:Fern								
dose (ug/ml)	x=log(dose)	% inh	control	fa/fu=(D-C)/C	y=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	EC50
250	2.397940009	99.999	100	1.00001E-05	-4.999995657	15.567	8.5655	1.8174	66
125	2.096910013	99.84313725	100	0.001571092	-2.803798408				
62.5	1.795880017	7.607843137	100	12.1443299	1.084373556			TI	0.22
31.25	1.494850022	0.5	100	199	2.298853076				Inactive
15.63	1.193820026	-26.2745098	100	-4.8059701	#NUM!				
7.81	0.89279003	-23.29411765	100	-5.2929293	#NUM!				
3.91	0.591760035	-9.647058824	101	-11.4695122	#NUM!				
1.95	0.290730039	-37.41176471	102	-3.7264151	#NUM!				
0.98	-0.010299957	-31.76470588	103	-4.2425926	#NUM!				
0.49	-0.311329952	-23.29411765	104	-5.4646465	#NUM!				
0.24	-0.612359948	-27.84313725	105	-4.7711268	#NUM!				
0.12	-0.913389944	-42.2745098	106	-3.5074212	#NUM!				

AT plate								CT plate							
PC:Fern	well 1	well 2	well 3	ผลรวม	เฉลี่ย	ค่า syn	ค่า inh	PC:Fern	well C	well D	ผลรวม	เฉลี่ย	OD drug	T-D	ค่า viability
250	0	0	0	0	0	0	1.0000	250	0.100	0.250	0.350	0.175	3.094	-2.919	-2.503
125	0	1	0	1	0.33333333	0.001568627	0.9984	125.00	0.899	0.750	1.649	0.825	2.770	-1.946	-1.668
62.5	186	188	215	589	196.3333333	0.923921569	0.0761	62.50	1.274	1.120	2.394	1.197	2.330	-1.132	-0.971
31.25	222	241	230	693	231	1.087058824	-0.0871	31.25	1.430	3.251	4.680	2.340	2.072	0.268	0.230
15.63	269	281	255	805	268.3333333	1.262745098	-0.2627	15.63	2.402	2.188	4.589	2.295	1.612	0.683	0.585
7.81		281	243	524	262	1.232941176	-0.2329	7.81	2.506	2.365	4.871	2.436	1.715	0.721	0.618
3.91		245	221	466	233	1.096470588	-0.0965	3.91	1.608	1.588	3.196	1.598	0.063	1.535	1.316
1.95	292	308	276	876	292	1.374117647	-0.3741	1.95	1.396	1.639	3.035	1.517	0.039	1.479	1.268
0.98	248	333	259	840	280	1.317647059	-0.3176	0.98	1.925	1.355	3.280	1.640	0.059	1.581	1.355
0.49	274	267	245	786	262	1.232941176	-0.2329	0.49	1.669	1.376	3.045	1.522	0.059	1.464	1.255
0.24	266	291	258	815	271.6666667	1.278431373	-0.2784	0.24	1.303	1.151	2.453	1.227	0.068	1.158	0.993
0.12	311	294	302	907	302.3333333	1.422745098	-0.4227	0.12	1.346	1.487	2.833	1.417	0.057	1.360	1.166

ตารางที่ ๘6 แสดงผลของการทดลองฤทธิ์ syncytium reduction assay ของ PC:Fern recombinant protein

ค่า IC50 PC:Cyanobacterium															
dose (ug/ml)	x=log(dose)	T/C%	control	fa/fu=(D-C)/C	y=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	IC50						
250	2.397940009	108.4271229	100	-0.077721539	#NUM!			#DIV/0!	#DIV/0!						
125	2.096910013	113.5850108	100	-0.119602144	#NUM!				> 250						
62.5	1.795880017	150.2390293	100	-0.334393996	#NUM!										
31.25	1.494850022	129.5045769	100	-0.227826519	#NUM!										
15.63	1.193820026	149.9603404	100	-0.333157022	#NUM!										
7.81	0.89279003	146.3716852	100	-0.316807757	#NUM!										
3.91	0.591760035	127.3822539	101	-0.207110905	#NUM!										
1.95	0.290730039	121.9628272	102	-0.163679603	#NUM!										
0.98	-0.010299957	110.8452848	103	-0.070776892	#NUM!										
0.49	-0.311329952	129.1444252	104	-0.194700043	#NUM!										
0.24	-0.612359948	93.0477844	105	0.128452447	-0.891257619										
0.12	-0.913389944	98.0341715	106	0.081255631	-1.090146533										
ค่า EC50 PC:Cyanobacterium															
dose (ug/ml)	x=log(dose)	% inh	control	fa/fu=(D-C)/C	y=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	EC50						
250	2.397940009	30.19607843	100	2.311688312	0.363929277			#DIV/0!	>250						
125	2.096910013	-6.196078431	100	-17.13924051	#NUM!										
62.5	1.795880017	-13.41176471	100	-8.456140351	#NUM!			TI	-						
31.25	1.494850022	-25.33333333	100	-4.947368421	#NUM!				Inactive						
15.63	1.193820026	-32.23529412	100	-4.102189781	#NUM!										
7.81	0.89279003	-40.23529412	100	-3.485380117	#NUM!										
3.91	0.591760035	-41.17647059	101	-3.452857143	#NUM!										
1.95	0.290730039	-37.88235294	102	-3.692546584	#NUM!										
0.98	-0.010299957	-31.1372549	103	-4.307934509	#NUM!										
0.49	-0.311329952	-21.7254902	104	-5.787003610	#NUM!										
0.24	-0.612359948	-30.98039216	105	-4.389240506	#NUM!										
0.12	-0.913389944	-32.23529412	106	-4.288321168	#NUM!										
PC:Cyanobacter	well 1	well 2	well 3	ผลรวม	เฉลี่ย	ค่า syn	ค่า inh	PC:Cyanobacter	well E	well F	ผลรวม	เฉลี่ย	OD drug	T-D	ค่า viability
250	143	131	171	445	148.333333	0.698039216	0.3020	250	1.143	1.495	2.6381	1.319	0.055	1.264	1.084
125	283	184	210	677	225.666667	1.061960784	-0.0620	125.00	1.334	1.507	2.8408	1.420	0.096	1.325	1.136
62.5	245	250	228	723	241	1.134117647	-0.1341	62.50	1.890	1.738	3.6285	1.814	0.062	1.752	1.502
31.25	288	272	239	799	266.333333	1.253333333	-0.2533	31.25	1.662	1.488	3.1493	1.575	0.064	1.510	1.295
15.63	312	283	248	843	281	1.322352941	-0.3224	15.63	1.605	2.017	3.6216	1.811	0.062	1.749	1.500
7.81	305	291		596	298	1.402352941	-0.4024	7.81	1.439	1.988	3.427	1.713	0.007	1.707	1.464
3.91	294	306		600	300	1.411764706	-0.4118	3.91	1.644	1.715	3.359	1.680	0.194	1.486	1.274
1.95	283	312	284	879	293	1.378823529	-0.3788	1.95	1.469	1.526	2.995	1.497	0.075	1.422	1.220
0.98	271	264	301	836	278.666667	1.311372549	-0.3114	0.98	1.198	1.508	2.706	1.353	0.060	1.293	1.108
0.49	222	251	303	776	258.666667	1.217254902	-0.2173	0.49	1.674	1.457	3.131	1.565	0.059	1.506	1.291
0.24	267	273	295	835	278.333333	1.309803922	-0.3098	0.24	1.152	1.137	2.288	1.144	0.059	1.085	0.930
0.12	291	288	264	843	281	1.322352941	-0.3224	0.12	1.134	1.268	2.403	1.201	0.058	1.143	0.980

ตารางที่ ๗7 แสดงผลของการทดลองฤทธิ์ syncytium reduction assay ของ
PC:cyanobacterium recombinant protein

Plate No.2				Inoculum (SFU/50ul) = 230.00						
ค่า IC50	PC:Spinach									
dose (ug/ml)	x=log(dose)	T/C%	control	fa/fu=(D-C)/C	y=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	IC50	
250	2.397940009	166.08553040	100	-0.397900589	#NUM!			#DIV/0!	#DIV/0!	
125	2.096910013	105.22057911	100	-0.049615571	#NUM!				> 250	
62.5	1.795880017	112.39405174	100	-0.1102732	#NUM!					
31.25	1.494850022	98.89055803	100	0.011218887	-1.950050236					
15.63	1.193820026	133.09996003	100	-0.248684973	#NUM!					
7.81	0.89279003	112.36097521	100	-0.110011284	#NUM!					
3.91	0.591760035	135.09695558	101	-0.252388778	#NUM!					
1.95	0.290730039	112.22039995	102	-0.09107435	#NUM!					
0.98	-0.010299957	134.67936438	103	-0.235220626	#NUM!					
0.49	-0.311329952	126.28206012	104	-0.176446758	#NUM!					
0.24	-0.612359948	97.84451274	105	0.073131206	-1.135897262					
0.12	-0.913389944	95.62011604	106	0.10855335	-0.964356768					
ค่า EC50	PC:Spinach									
dose (ug/ml)	x=log(dose)	% inh	control	fa/fu=(D-C)/C	y=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	EC50	
250	2.397940009	36.37681159	100	1.749003984	0.242790799			#DIV/0!	>250	
125	2.096910013	1.15942029	100	85.25	1.930694388					
62.5	1.795880017	1.594202899	100	61.72727273	1.790477089			TI	-	
31.25	1.494850022	-6.956521739	100	-15.375	#NUM!				หาค่าไม่ได้	
15.63	1.193820026	-5.507246377	100	-19.1578947	#NUM!				Inactive	
7.81	0.89279003	-15.86956522	100	-7.3013699	#NUM!					
3.91	0.591760035	-28.26086957	101	-4.5738462	#NUM!					
1.95	0.290730039	-24.34782609	102	-5.1892857	#NUM!					
0.98	-0.010299957	-23.76811594	103	-5.335366	#NUM!					
0.49	-0.311329952	0	104	#DIV/0!	#DIV/0!					
0.24	-0.612359948	-7.391304348	105	-15.2058824	#NUM!					
0.12	-0.913389944	-13.76811594	106	-8.6989474	#NUM!					
	AT plate									
PC:Spinach	well 1	well 2	well 3	ผลรวม	เฉลี่ย	ค่า syn	ค่า inh		CT plate	
250	140	148	151	439	146.333333	0.636231884	0.363768116		250	well C
125	249	226	207	682	227.333333	0.988405797	0.011594203		125	well D
62.5	169	260	250	679	226.333333	0.984057971	0.0159420		62.5	ผลรวม
31.25	195	277	266	738	246	1.069565217	-0.0695652		31.25	เฉลี่ย
15.63	193	281	254	728	242.666667	1.055072464	-0.0550725		15.63	OD drug
7.81		295	238	533	266.5	1.158695652	-0.1586957		7.81	T-D
3.91		299	291	590	295	1.282608696	-0.2826087		3.91	ค่า viability
1.95	274	301	283	858	286	1.243478261	-0.2434783		1.95	
0.98	295	287	272	854	284.666667	1.237681159	-0.2376812		0.98	
0.49	248	222	220	690	230	1	0.0000000		0.49	
0.24	261	256	224	741	247	1.073913043	-0.0739130		0.24	
0.12	277	258	250	785	261.666667	1.137681159	-0.1376812		0.12	

ตารางที่ ผ8 แสดงผลของการทดลองฤทธิ์ syncytium reduction assay ของ PC:Spinach recombinant protein

IC50	PC:Canna	1 mg/ml							
dose (ug/ml)	x=log(dose)	T/C%	control	fa/fu=(D-C)/Cy=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	IC ₅₀ PC	
250	2.39794	84.70	100	0.180670168	-0.743113553			>250	
125	2.09691	103.85	100	-0.037116345	#NUM!				
62.5	1.79588	99.99	100	0.00010001	-3.999956568				
31.25	1.494850022	119.83	100	-0.165517851	#NUM!				
15.6	1.193124598	116.85	100	-0.144190683	#NUM!				
7.8	0.892094603	124.63	100	-0.197637862	#NUM!				
3.9	0.591064607	116.94	100	-0.144888164	#NUM!				
1.95	0.290034611	117.58	100	-0.149509142	#NUM!				
0.975	-0.01099538	117.48	100	-0.148819182	#NUM!				
0.4975	-0.30320691	111.48	100	-0.102973307	#NUM!				
0.24375	-0.61305538	111.54	100	-0.103484287	#NUM!				
0.121875	-0.91408537	115.67	100	-0.135493912	#NUM!				
EC50	PC:Canna								
dose (ug/ml)	x=log(dose)	% inh	control	fa/fu=(D-C)/Cy=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	EC ₅₀ PC	
250	2.39794	99.25	100	0.00754717	-2.122215878	-3.7675	-2.376	1.58592	38.54
125	2.09691	88.01	100	0.136170213	-0.865917884				
62.5	1.79588	60.49	100	0.653250774	-0.184920067		TI =>	6.49	
31.25	1.49485	36.70	100	1.724489796	0.236660629			ACTIVE	
15.6	1.1931246	25.66	100	2.897810219	0.46206994				
7.8	0.8920946	16.85	100	4.933333333	0.693140461				
3.9	0.5910646	0.05	100	1999	3.300812794				
1.95	0.290034611	-28.84	100	-4.467532468	#NUM!				
0.975	-0.01099538	-54.49	100	-2.835051546	#NUM!				
0.4975	-0.30320691	-68.54	100	-2.459016393	#NUM!				
0.24375	-0.61305538	-68.54	100	-2.459016393	#NUM!				
0.121875	-0.91408537	-68.54	100	-2.459016393	#NUM!				

$y = -2.3756x + 3.7675$
 $R^2 = 0.8633$

AT								CT				1.57383			
PC:Canna	well1	well2	well3	ผลรวม	เฉลี่ย	ค่า syn	ค่า inh	PC:Canna	well C	well D	ผลรวม	เฉลี่ย	OD drug	T-D	ค่า viability
250		1	2	1	4	1.3333	0.0075	250	1.325	1.599	2.924	1.4620	0.1290	1.3330	0.8470
125		17	24	23	64	21.3333	0.1199	125	1.649	1.81	3.459	1.7295	0.0950	1.6345	1.0385
62.5		77	55	79	211	70.3333	0.3951	62.5	1.845	1.729	3.574	1.7870	0.0940	1.6930	1.0757
31.25		116	118	104	338	112.6667	0.6330	31.25	1.94	2.004	3.944	1.9720	0.0860	1.8860	1.1983
15.6		130	140	127	397	132.3333	0.7434	15.6	2.029	1.841	3.87	1.9350	0.0960	1.8390	1.1685
7.8		144	152	0	296	148.0000	0.8315	7.8	2.289	1.796	4.085	2.0425	0.0810	1.9615	1.2463
3.9		182	208	0	390	195.0000	1.0955	3.9	1.986	1.871	3.857	1.9285	0.0880	1.8405	1.1694
1.95		225	222	241	688	229.3333	1.2884	1.95	1.916	1.975	3.891	1.9455	0.0950	1.8505	1.1758
0.975		281	273	271	825	275.0000	1.5449	0.975	1.894	1.994	3.888	1.9440	0.0950	1.8490	1.1748
0.4975		300	300	300	900	300.0000	1.6854	0.4975	1.827	1.864	3.691	1.8455	0.0910	1.7545	1.1148
0.24375		300	300	300	900	300.0000	1.6854	0.24375	1.802	1.893	3.695	1.8475	0.0920	1.7555	1.1154
0.121875		300	300	300	900	300.0000	1.6854	0.121875	1.887	1.954	3.841	1.9205	0.1000	1.8205	1.1567

ตารางที่ ๙๑ แสดงผลของการทดลองฤทธิ์ syncytium reduction assay ของ PC:Canna recombinant protein

ค่า IC50	PC:Canna/T								
dose (ug/ml)	x=log(dose)	T/C%	control	fa/fu=(D-C)/C	y=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	IC50
250	2.397940009	78.6782329	100	0.270999568	-0.567031401				>250
125	2.096910013	94.9686997	100	0.052978511	-1.275900252				
62.5	1.795880017	90.6599893	100	0.103022412	-0.987068288				
31.25	1.494850022	100.2217850	100	-0.002212942	#NUM!				
15.625	1.193820026	100.3398319	100	-0.003386809	#NUM!				
7.813	0.89279003	94.3784654	100	0.059563742	-1.225018023				
3.906	0.591760035	102.8778394	100	-0.027973365	#NUM!				
1.953	0.290730039	96.4442855	100	0.036868069	-1.433349612				
0.977	-0.010299957	95.9720980	100	0.041969511	-1.377066095				
0.488	-0.311329952	93.6406725	100	0.067912023	-1.168053333				
0.244	-0.612359948	100.4283670	100	-0.004265399	#NUM!				
0.1221	-0.913389944	99.9266679	100	0.00073386	-3.134387041				
ค่า EC50	PC:Canna/T								
dose (ug/ml)	x=log(dose)	% inh	control	fa/fu=(D-C)/C	y=log[fa/(1-fa)]	(-) Intercept	m	log Dm	EC50
250	2.397940009	75.97597598	100	0.316205534	-0.500030534	-2.9011	-1.3749	2.110044367	128.84
125	2.096910013	37.23723724	100	1.685483871	0.226724601				Active
62.5	1.795880017	31.98198198	100	2.126760563	0.327718599			TI	>1.94
31.25	1.494850022	30.33033033	100	2.297029703	0.361166611				
15.625	1.193820026	28.52852853	100	2.5052632	0.398853352			AZT	EC ₅₀ = 1.27 x 10 ⁻⁹
7.813	0.89279003	21.17117117	100	3.7234043	0.570940191				
3.906	0.591760035	20.72072072	100	3.8260870	0.582754836				
1.953	0.290730039	23.12312312	100	3.3246753	0.52174924				
0.977	-0.010299957	30.33033033	100	2.2970297	0.361166611				
0.488	-0.311329952	20.42042042	100	3.8970588	0.590736961				
0.244	-0.612359948	46.24624625	100	1.1623377	0.06533231				
0.1221	-0.913389944	39.93993994	100	1.5037594	0.177178355				