Thesis Title Isolation of Phycoerythrin and Phycocyanin from Red Algae and Cyanobacteria for Using as Potential Marker Dyes in Immunofluorescence Assay

Author Mr. Somchai Awakairt

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul Chairperson

Assoc. Prof. Nitaya Thammapalerd Member

Lect. Dr. Dararat Tongkao Member

ABSTRACT

Phycobiliproteins are groups of light-harvesting antenna pigments of cyanobacteria and eukaryotic algae. They reside in phycobilisomes which are complex protein structures located on the surface of the photosynthetic membrane. Phycobiliproteins have three major classes depending on their spectral properties including allophycocyanin (AP), phycocyanin (PC) and phycoerythrin (PE). They have similar subunit organization that is based on a heterodimer, composed of α- and β- subunits. According to their properties, phycobiliproteins have been used in a variety of immunological assay and as fluorescent labels for cell-sorting. Upon the presence of high applicational value and a diversity of algae and cyanobacteria

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

harboring these pigments in many locations of Thailand, especially in the northern part, it is interesting to investigate for biological properties of the pigments in this group and also to search for more efficient means of their usages.

In this study, C-phycocyanin (C-PC) was isolated, from Cyanobateria, *Spirulina platensis* was collected from Bangpra, Chonburi province and R-phycoerythrin (R-PE) from *Glacilaria sp*. in Songkha province. Purification of C-PC and R-PE were carried out by using ammonium sulfate precipitation, Ion exchange chromatography and Size exclusion chromatography. Characterization of phycobiliprotein molecular weight of R-PE was 240 kDa and 210 kDa for C-PC , the subunit molecular weights of R-PE in α-, β- and γ- subunits were 20, 20 and 30 kDa respectively and 17 and 21 kDa, corresponding to the α- and β-subunit from C-PC. The conjugated Eh208C2-2 MAb lable R-PE and C-PC were diagnosis stained trophozoites with red colour whereas for C-PC-labled probe and R-PE –labled MAb probe showed golden-orange trophozoites under ther blue irradiation of the fluorescent microscope. *Thermosynechococcus* sp. collected from northern Thailand hot spring Purification of C-PC was carried out by using ammonium sulfate precipitation, non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and sodiumdodecyl polyacrylamide gel electrophoresis. The C-PC α subunit showed molecular weight of approximately 19.5 kDa. The purified C-PC was stable up to 60°C for 30 min and pH 6-8.5 as determined by disappearance of color and the fluorescence of pigment. N-terminal analysis of C-PC α- subunit revealed a considerable sequence conservation comparing with the closely related cyanobacteria. In order to investigate for more useful

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

information such as that for pigment quality evaluation and their proper application , *cpcA* gene of this cyanobacteria from Thailand source, was amplified by PCR and successfully cloned into cloning vector. Gene expression was done in *Escherichia coli* DH5α and JM109 strains. Optimization of expression condition was done in order to find the condition that *cpcA* gene can be well expressed . The cloned C-PC α subunit from the expression showed molecular weight band at same position as the native C-PC α subunit purified from this cyanobacteria when analysed by SDS-PAGE. The protein band also showed fluorescence property under UV transilluminator after Zn^{2+} staining.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแยกไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสีแดงและไซยาโนแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบที่มีศักยภาพทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์

ผู้เขียน นายสมชัย อวเกียรติ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล ประธานกรรมการ

รองศาสตราจารย์นิตยา ธรรมพาเลิศ กรรมการ

อาจารย์ ดร.ดารารัตน์ ทองขาว กรรมการ

บทคัดย่อ

ไฟโคบิลิโปรตีนเป็นกลุ่มรงควัตถุแอนเทนนาที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายยูคาริโอท ไฟโคบิลิโปรตีนอยู่ในไฟโคบิลิโซม ซึ่งเป็นโปรตีนเชิงซ้อนอยู่บนผิวเมมเบรนที่มีการสังเคราะห์แสง ไฟโคบิลิโปรตีนมีรูปร่างสำคัญ 3 แบบ ซึ่งแบ่งตามคุณสมบัติของการกระจายแสง ได้แก่ อัลโลไฟโคไซยานิน (AP), ไฟโคไซยานิน (PC) และไฟโคอิรีทริน (PE) ไฟโคบิลิโปรตีนประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกันแบบเฮทเทอโรไดเมอร์ ซึ่งประกอบด้วย หน่วยย่อยแอลฟา (α-) และบีตา (β-) จากคุณสมบัติของไฟโคบิลิโปรตีนนี้ จึงนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางอิมมูโนและใช้เป็นฉลากเรืองแสงติดตามเซลล์ จากการที่นำมาประยุกต์ใช้ได้มากมาย และประเทศไทยมีแหล่งของสาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรียจำนวนมาก โดยเฉพาะทางแถบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคเหนือ ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะหาคุณสมบัติทางชีววิทยา และแนวทางการนำไปใช้ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นของกลุ่มรงควัตถุนี้

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยก ซี-ไฟโคไซยานิน (C-PC) จากสาหร่ายเกรียวทองจากชลบุรี และสารอาร์-ไฟโคอิริทรินจากสาหร่ายทะเลสีแดง *Glarcilaria sp*. จากสงขลา การสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโทรกราฟี แบบแลกเปลี่ยนประจุและแยกตามขนาด ขนาดโมเลกุล ของสาร R-PE เท่ากับ 240 กิโลดาลตัน และ 210 กิโลดาลตัน สำหรับ C-PC หน่วยย่อยของ R-PE มีขาดโมเลกุลของ α-, β- และ γ- มีขนาด 20, 20 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ส่วนสาร C-PC มีขนาดโมเลกุล 17 และ 21 กิโลดาลตัน ของหน่วยย่อย α- และ β- เมื่อนำไปเชื่อมต่อกับสารภูมิคุ้มกัน Eh208C2-2 MAb เป็นฉลาก R-PE และฉลาก C-PC และนำไปตรวจวิเคราะห์เชื้อในน้ำเหลืองให้สีแดง ส่วน ฉลากR-PE ให้สีส้มทอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง นำมาเชื่อมต่อกับสารภูมิคุ้มกัน ผลิตเป็นสารเรืองแสงติดตาม ของ C-PC *Thermosynechococcus sp.* จากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศ ทำโดยการใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซีส แบบนอน-ดีเนเทอริงโพลีอะคริลาไมด์เจล และอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบโซเดียมโดดีซิลโพลีอะคริลาไมด์เจล หน่วยย่อยแอลฟาของ C-PC มีน้ำหนักโมเลกุล 19.5 กิโลดัลตัน (kDa) สาร R-PE มีน้ำหนักโมเลกุล 24 กิโลดัลตัน (kDa) C-PC ที่ทำให้บริสุทธิ์มีความเสถียรที่ 60 $^{\circ}$C เป็นเวลา 30 นาที และที่ pH 6-8.5 โดยการตรวจดูสี และการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์ที่หายไป จากการวิเคราะห์ N- terminal ของหน่วยย่อยแอลฟาของ C-PC พบว่ามีลำดับกรดอะโมที่เหมือนกันเมื่อเปรียบเทียบกับไซยาโนแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน จากการศึกษาข้อมูลให้มีประโยชน์มากขึ้น เช่น การประเมินคุณภาพของรงควัตถุ และการประยุกต์ใช้ ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีนของ *cpcA* ของไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากประเทศไทย และทำการโคลน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยีน โดยมีการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α และ JM 109 จากการปรับสภาวะของการแสดงออกของยีนพบว่า *cpcA* มีการแสดงออกได้ดี โดยหน่วยย่อยแอลฟาของ C-PC ที่ได้จากการโคลนยีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับหน่วยย่อยแอลฟาของ native C-PC ที่สกัดมาจากไซยาโนแบคทีเรีย และจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่ามีการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตหลังจากย้อมแถบโปรตีนด้วย Zn^{2+}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved