การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีโดยอาศัย Ligand Binding Domain ของเอสโตรเจนรีเซพเตอร์แอลฟา

Development of Estrogenic Activity Assay Based on Ligand Binding Domain of Estrogen Receptor Alpha

พิมพ์ชนก ศรีสุข[1*] และ สินีนาฏ ศิริ[2]

Pimchanok Srisuk and Sineenat Siri

[1]นักศึกษาปริญญาเอก สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น

[2] รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

This research is aimed to develop the easy and fast estrogenic activity assay, based on a specific competitive binding to ligand binding domain of estrogen receptor alpha (LBD-ERα) between the tested estrogenic activity compounds and the standard estradiol labeled with fluorescent dye. LBD-ERα DNA of 1,035 bp was synthesized from extracted RNA of MCF-7 cells in a reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). Amplified DNA was ligated to pPP-30 UA plasmid vector using TA cloning technique, prior to a transformation into *Escherichia coli* M13 (pREP4) and positive clone selection. Recombinant plasmid DNA sequence was confirmed before used for protein induction. Purified LBD-ERα recombinant protein was approximately 40 kDa. For estrogenic activity assay, LBD-ERα recombinant protein was immobilized on each well of 96well Immuno Plate Surface Maxibindig (1.23 µmol/well). Efficacy of the assay was performed by incubating with fixed amount of the standard estradiol labeled with fluorescent dye and subsequently competing with various concentrations of standard estradiol. Results showed that the developed assay was sensitive to the standard estradiol as low as 10^{-9} M.

Keyword: *estrogenic activity, estrogen receptor alpha, detection assay*

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีที่ง่ายและรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการของการแย่งจับอย่างจำเพาะต่อโปรตีนเอสโตรเจนรีเซพเตอร์แอลฟาในบริเวณ ligand binding domain (LBD-ERα) ระหว่างสารทดสอบที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีและสาร เอสตราไดออลมาตรฐานที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง โดยได้สังเคราะห์ดีเอ็นเอ LBD-ERα ขนาด 1,035 คู่เบส จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ MCF-7 ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแบบผันกลับ (reverse transcription – polymerase chain reaction, RT-PCR) และเชื่อมดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้กับพลาสมิดพาหะ pPP-30 UA ด้วยเทคนิค TA cloning ก่อนนำเข้าแบคทีเรีย *Escherichia coli* M13 (pREP4) และคัดเลือกแบคทีเรียโคลนที่ได้รับพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ ซึ่งได้ตรวจสอบความถูกต้องลำดับเบส เมื่อกระตุ้นการผลิตและแยกบริสุทธิ์โปรตีน พบว่าได้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ในการทำชุดตรวจวิเคราะห์แอคติวิตี

ของสารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตี ได้ตรึงโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ปริมาณ 1.23 ไมโครโมลต่อช่องของ 96well Immuno Plate Surface Maxibindig จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจวิเคราะห์โดยบ่มกับสารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงในปริมาณที่เท่ากัน และทำการแข่งขันด้วยสารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าชุดตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ 10^{-9} โมลาร์

คำสำคัญ: *เอสโตรเจนิกแอคติวิตี, เอสโตรเจนรีเซพเตอร์แอลฟา, การตรวจวิเคราะห์*

บทนำ

นอกจากฮอร์โมนเอสโตรเจนแล้ว ยังพบว่ามีสารสังเคราะห์โดยมนุษย์และพืชอีกหลายชนิดที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตี ซึ่งสารเหล่านี้เรียกว่า ซีโนเอสโตรเจน (xenoestrogens) และไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens) ตามลำดับ สารไฟโตเอสโตรเจนเหล่านี้มีโครงสร้างบางส่วนคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้สามารถจับกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ (estrogen receptor, ER) มีกลไกการทำงานและออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Hartman et al., 2009) ในประเทศไทยเนื่องจากพืชสมุนไพรหลายชนิดมีสรรพคุณที่อาจเกี่ยวข้องกับสารไฟโตเอสโตรเจน จึงได้รับความสนใจในการศึกษา และนำไปพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่า เช่น การใช้เป็นส่วนประกอบในเวชสำอางและอาหารเสริม นอกจากนี้ยัง พบว่าสารไฟโตเอสโตรเจนจากสมุนไพรบางชนิด เช่น กวาวเครือขาว มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ตลอดจนสามารถช่วยเพิ่มมวลกระดูกและป้องกันภาวะกระดูกพรุนในหนูทดลองเพศเมียได้ (Cherdshewasart et al., 2007) ดังนั้นสารไฟโตเอสโตรจึงได้รับความสนใจในการพัฒนาเป็นยาอีกด้วย เนื่องจากพืชและพืชสมุนไพรมีความหลากหลายอย่างมากในประเทศ จึงมีความต้องการชุดตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีที่ง่ายและรวดเร็วเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น

วิธีตรวจวิเคราะห์สารไฟโตเอสโตรเจนมีหลายวิธี เช่น การใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) (Rybak et al., 2008) เพื่อแยกองค์ ประกอบของสารตัวอย่างและเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง แต่มีวิธีการที่ซับซ้อนและสามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะสารที่สารมาตรฐานเปรียบเทียบเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีการใช้เซลล์ทดสอบ ได้แก่ การใช้ yeast estrogen screen assay (Xu et al., 2010) ซึ่งเป็นการใช้เซลล์ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตี และการวัดการเจริญของเซลล์ (Cherdshewasart et al., 2008) ซึ่งเป็นการวัดจำนวนของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารที่มีเอสโตรเจนิก แอคติวิตี ทั้งสองวิธีนี้ทำได้ง่าย แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้เวลาหลายวันในการวิเคราะห์ผล จากข้อจำกัดของแต่ละวิธี จึงมีความต้องการวิธีวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีที่ง่ายและให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีที่ง่ายและรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการของการแย่งจับอย่างจำเพาะต่อโปรตีนเอสโตรเจนรีเซพเตอร์แอลฟาในบริเวณ ligand binding domain (LBD-ERα) ระหว่างสารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และสารทดสอบที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตี

วิธีวิจัย

การโคลนยีนและผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα

สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ MCF-7 ด้วยสาร Trizol® reagent (Invitrogen, USA) นำมาทำปฏิกิริยาถอดรหัสแบบผันกลับ (reverse transcription) เพื่อสังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยาประกอบอาร์เอ็นเอ1 ไมโครกรัม, oligo(dT) 200 นาโนกรัม และ dNTP 0.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1x First-Stand

Buffer, DTT 5 ไมโครโมลาร์ และ SuperScriptTM III Reverse transcriptase 10 ยูนิต บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาเป็นต้นแบบเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ LBD-ERα ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA 0.5 ไมโครกรัม, 1x PCR buffer, แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ hER1-U (5′-AAA GGT GGG ATA CGA AAA GAC-3′) 0.2 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ hER1-L (5′-TCA GAC TGT GGC AGG GAA AC-3′) 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase 0.25 หน่วย โดยให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส ขั้นตอนที่ 3 ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ศึกษาแบบแผนของดีเอ็นเอบนที่สังเคราะห์ได้บน 0.8 % อะกาโรสเจล

ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pPP-30 UA ด้วยเทคนิค TA cloning เพื่อให้ได้พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pPP-LBD-ERα และนำเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* M13 (pREP4) แบคทีเรียโคลนถูกคัดเลือกบนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกานาไมซิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากตรวจสอบลำดับเบสของพลาสมิดรีคอมบิแนนท์แล้ว กระตุ้นการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ด้วย isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วแยกบริสุทธิ์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ดังกล่าวโดยวิธีของ Singh และ Panda (Singh and Panda, 2005) และศึกษาแบบแผนของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ได้บน 15% SDS-PAGE

การตรึงโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ลงบน 96 well Immuno plate

ตรึงโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ปริมาณ 1.23 ไมโครโมล ลงใน 96 well Immuno plate surface maxibindig (SPL life sciences, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นป้องกันการจับของลิแกนด์กับพื้นผิวของเพลทด้วย 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของโปรตีนมาตรฐาน ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างโปรตีนที่เหลือจากการตรึงด้วย 1x phosphate buffered saline (PBS) 3 ครั้ง

การทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีโดยอาศัย LBD-ERα

นำเพลทที่ตรึงด้วย LBD-ERα มาทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สารเอสตราไดออลมาตรฐาน โดยบ่มเพลทกับสารละลายเอสตราไดออลที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (β-Estradiol 6-(O-carboxymethyl)oxime: BSA fluorescein isothiocyanate conjugate; E2-FITC) ปริมาณ 100 นาโนโมล ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ล้าง E2-FITC ที่เหลือจับด้วย 1x PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 10^{-15}-10^{1} โมลาร์ จากนั้นวัดปริมาณของ E2-FITC ที่เหลือจับกับ LBD-ERα ด้วยเครื่อง fluorescent microplate reader (Gemini™ EM Fluorescence Microplate Reader, US)

ผลการวิจัย

การโคลนยีนและผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα

ในการโคลนยีนและผลิตรีโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ได้สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ MCF-7 เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA จากนั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอของ LBD-ERα ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ผลการศึกษาพบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอ LBD-ERα ขนาด 1,035 คู่เบสซึ่งสอดคล้องกับขนาดที่คำนวณได้ (รูปที่ 1ก) จากนั้นนำดีเอ็นเอ LBD-ERα ไปเชื่อมกับ pPP-30 UA เพื่อให้ได้พลาสมิดให้ได้พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pPP-LBD-ERα และนำเข้าเซลล์แบคทีเรีย เมื่อทำการกระตุ้นแบคทีเรีย เป้าหมายด้วย IPTG พบว่าสามารถกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ที่ขนาดประมาณ 40 kDa (รูปที่ 1ข) แม้ว่าโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ที่ผลิตได้จะละลายน้ำได้ต่ำ แต่สามารถแยกบริสุทธิ์จากโปรตีนดังกล่าวได้โดยอาศัยวิธีการแยกบริสุทธิ์ที่ใช้สารละลายที่มียูเรียเป็นองค์ประกอบ

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pPP-LBD-ERα ด้วยเทคนิค DNA sequencing แสดงในรูปที่ 2 พบว่าลำดับเบสของ LBD-ERα มีความถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบฐานข้อมูล Genbank และดีเอ็นเอ LBD-ERα เชื่อมต่อกับ pPP-30 UA ในตำแหน่งและทิศทางที่ถูกต้อง ทั้งนี้ดีเอ็นเอ LBD-ERα จำนวน 1,035 คู่เบส สามารถแปลรหัสได้ 345 กรดอะมิโน คำนวณขนาดของโปรตีนได้ 38.68 กิโลดาลตัน และมีค่าการละลาย 61.9%

การทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีโดยอาศัย LBD-ERα

วิธีตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีโดยอาศัย LBD-ERα มีหลักการดังแสดงใน รูปที่ 3 คือ ทำการตรึงโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ในแต่ละหลุม 96 well plate แล้วบ่มด้วยสารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ติดฉลากเรืองแสง หลังจากล้างสารส่วนเกินออก ทำการแย่งจับโดยใช้สารมาตรฐานเอส ตราไดออลเพื่อทำกราฟมาตรฐาน หรือทำการแย่งจับโดยใช้สารทดสอบเพื่อวิเคราะห์เอสโตรเจนิกแอคติวิตีของสารทดสอบเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ในการศึกษานี้ได้ตรึงโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ที่แยกบริสุทธิ์ได้ 1.23 ไมโครโมล ลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate ใช้สารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ติดฉลากเรืองแสง (E2-FITC) ปริมาณ 100นาโนโมล และใช้สารเอสตราไดออลมาตรฐานเป็นสารทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยใช้สารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10^{-15}-10^{-1} โมลาร์ และวัดผลจากค่าจากสารเอสตราไดออลมาตรฐานติดฉลากเรืองแสงที่ถูกแย่งจับ ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อสารเอส ตราไดออล เนื่องจากสารเอสตราไดออลมาตรฐานติดฉลากเรืองแสงและเอสตราไดออลมาตรฐานไม่สามารถจับกับโปรตีนซีรัมอัลบูมินที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบอย่างแปรผันตามปริมาณที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สารเอสตราไดออลที่ 10^{-9} โมลาร์ (รูปที่ 4) สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย และรวดเร็ว

การอภิปรายผล

แม้ว่าในโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ที่ผลิตจากเซลล์แบคทีเรียจะมีปริมาณสูง แต่โปรตีนดังกล่าวละลายน้ำได้ต่ำจึงได้ใช้วิธีการแยกบริสุทธิ์โปรตีนด้วยสารละลายที่มียูเรียเป็นองค์ประกอบตาม วิธีของ Singh และ Panda (Singh and Panda, 2005) ซึ่งทำให้โปรตีนมีการคืนโครงรูปได้ต่ำลงและมีแอคติวิตีต่ำลงด้วย ดังนั้นหาก

สามารถผลิตโปรตีนที่มีแอคติวิตีที่สูงขึ้นได้ น่าจะทำให้วิธีนี้มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีได้สูงขึ้น

การทดสอบประสิทธิภาพวิธีตรวจวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตี โดยตรึงโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ที่แยกบริสุทธิ์ได้ลงในแต่ละช่องหลุม 96 well plate ใช้สารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ติดฉลากเรืองแสง (E2-FITC) ที่ทราบปริมาณ และใช้สารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10^{-15}-10^{1} โมลาร์ เป็นสารทดสอบ จากนั้นวัดผลจากค่าสารเอสตราไดออลมาตรฐานติดฉลากเรืองแสงที่ถูกแย่งจับกับ LBD-ERα ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อสารเอสตราไดออล เนื่องจากสาร เอสตราไดออลมาตรฐานติดฉลากเรืองแสงและเอสตราไดออลมาตรฐานไม่สามารถจับกับโปรตีนซีรัมอัลบูมินที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบอย่างแปรผันตามปริมาณที่ใช้ทดสอบ (Li et al., 2012) นอกจากนี้พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สารเอสตราไดออลที่ 10^{-9} โมลาร์ ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวใกล้เคียงกับวิธีของ Kwon และคณะ (7.7×10^{-9} โมลาร์) แต่เนื่องจากวิธีที่ Kwon และคณะพัฒนาขึ้นเป็นการใช้เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ทั้งโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ และการตรวจวัดใช้สารกัมมันตรังสี ทำให้ไม่สะดวกในการใช้งาน และมีอันตรายมากกว่า (Kwon et al., 2007)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

Cherdshewasart, W., Panriansaen, R., and Picha, P. 2007. Pretreatment with phytoestrogen-rich plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ERα and ERβ. Maturitas 58(2): 174-181.

Cherdshewasart, W., Traisup, V., and Picha, P. 2008. Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich Pueraria mirifica by MCF-7 proliferation assay. Journal of Reproduction and Development 54(1): 63-67.

Hartman, J., Strom, A., and Gustafsson, J.A.l. 2009. Estrogen receptor beta in breast cancer-diagnostic and therapeutic implications. Steroids 74(8): 635-641.

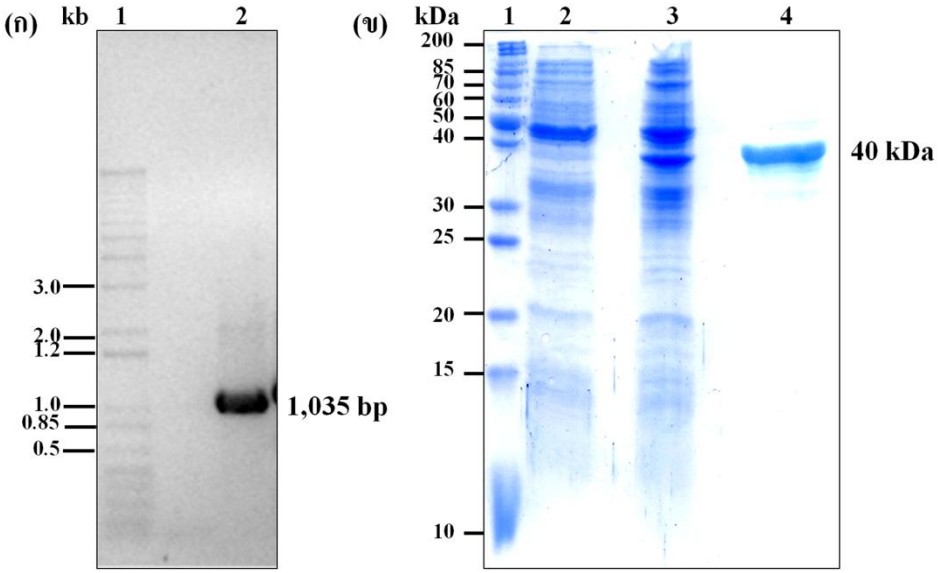
Kwon, J.H., Katz, L.E., and Liljestrand, H.M. 2007. Modeling binding equilibrium in a competitive estrogen receptor binding assay. Chemosphere 69(7):1025-1031.

Li, Z., Vuki, M., Wu, D., Liu, F., Zhong, W., Zhang, L., and Xu, D. 2012. A multiplexed screening method for ag onists and antagonists of the estrogen receptor protein. Analytical and Bioanalytical Chemistry 403(5): 1 373-1384.

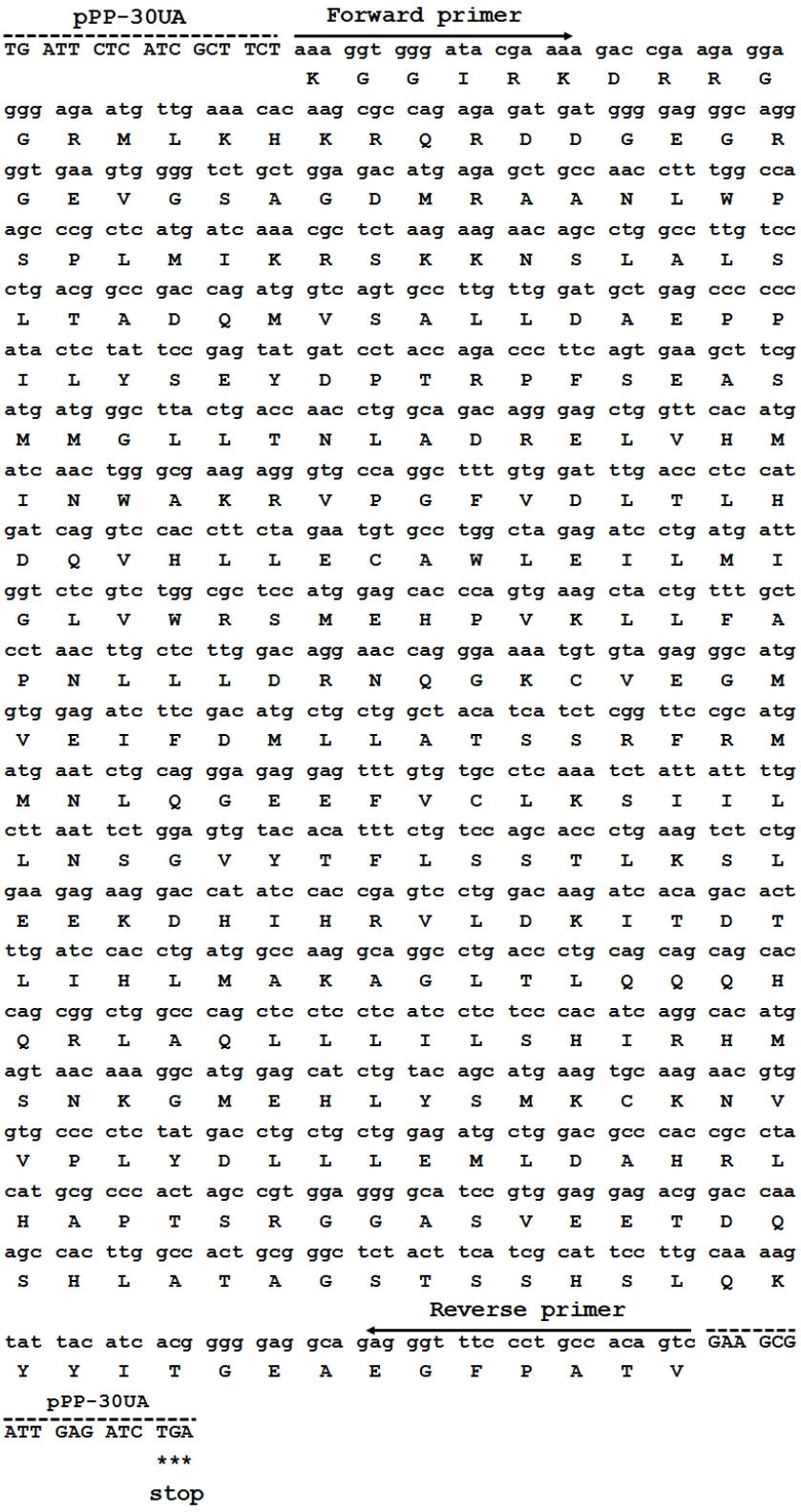
Rybak, M.E., Parker, D.L., and Pfeiffer, C.M. 2008. Determination of urinary phytoestrogens by HPLC–MS/MS: A comparison of atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI). Journal of Chromatography B 861(1): 145-150.

Singh, S. M. and Panda, A. K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. Journal of Bioscience and Bioengineering 99(4): 303-310.

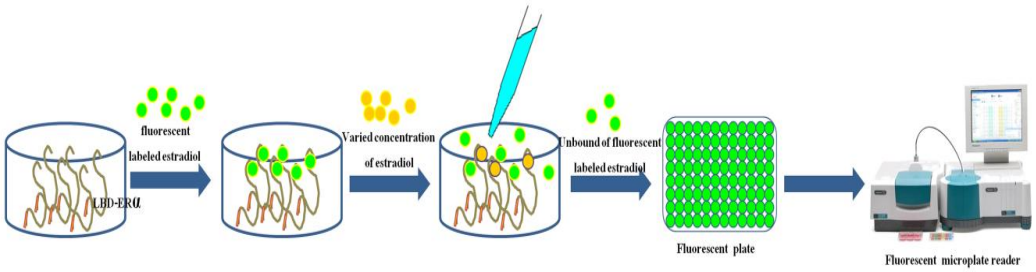
Xu, H., Luo, F., Zhang, J., Jia, P., Zhang, W., and Li, X. 2010. Development of a rapid screening and surveillance for estrogenic chemicals in environment based on recombinant yEGFP yeast cell. Toxicology in Vitro 24(4):1285-1291.



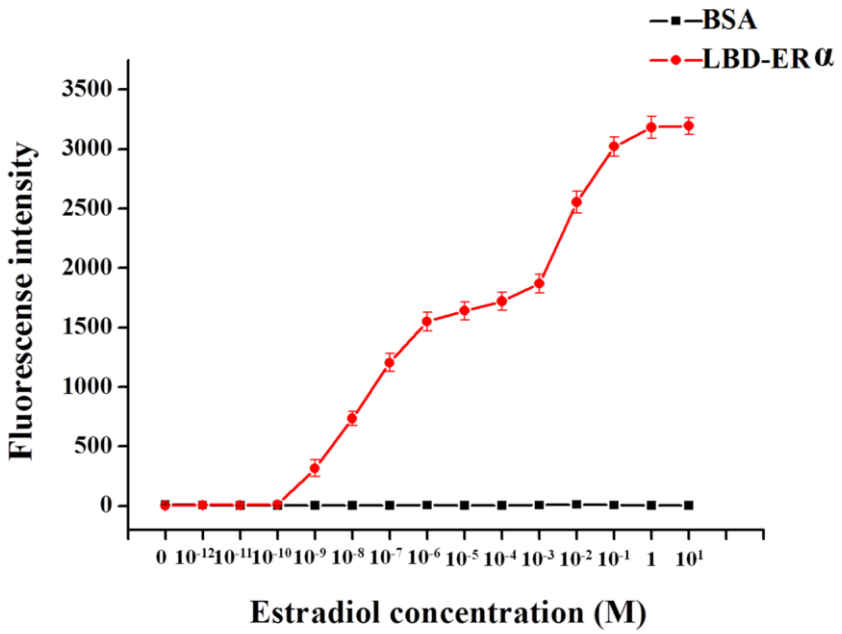
รูปที่ 1. ขนาดดีเอ็นเอและโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα โดย (ก) ดีเอ็นเอ LBD-ERα บนอะกาโรสเจลมีขนาด 1,035 คู่เบส และ (ข) การกระตุ้นการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα ซึ่งช่องที่ 1 คือ โปรตีนเครื่องหมายโมเลกุลมาตรฐาน ช่องที่ 2 คือโปรตีน LBD-ERα ก่อนถูกกระตุ้นด้วย IPTG ช่องที่ 3 คือโปรตีน LBD-ERα หลังถูกกระตุ้นด้วย IPTG และ ช่องที่ 4 คือ โปรตีน LBD-ER-α ที่แยกบริสุทธิ์ได้



รูปที่ 2. ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LBD-ERα โดยบริเวณเส้นประคือลำดับเบสและกรดอะมิโนที่อยู่บนพลาสมิดพาหะ pPP-30 UA



รูปที่ 3. หลักการของวิธีวิเคราะห์สารที่มีเอสโตรเจนิกแอคติวิตีที่พัฒนาขึ้น



รูปที่ 4. การตรวจวัดสารเอสตราไดออลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10^{-15}-10^{1} โมลาร์ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งใช้โปรตีนซีรัมอัลบูมินเป็นตัวควบคุมเชิงลบ