การโคลนและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไฟโบรอินของ มด *Oecophylla smaragdina*

Cloning and Production of Recombinant Fibroin Protein of *Oecophylla smaragdina*

อรุณรัตน์ คำแหงพล[1*] และสินีนาฏ ศิริ[2]

Arunrat Khamhaengpol and Sineenat Siri

[1]นักศึกษาบัณฑิตภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2]รองศาสตราจารย์สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Fibroin is one of the most studied proteins as biopolymers for medical applications. The most studied fibroin is derived from *Bombyx mori* silkworm. In addition to silkworm, *Oecophylla smaragdina* ant is another insect species that can produce fibroin, however, very few are studied for its potential applications. This work, thus, is aimed to clone and produce recombinant fibroin protein of *O. smaragdina*. Extracted total RNA from ant larvae revealed 3 RNA bands; 28S rRNA, 18S rRNAand 5.8S rRNA. After total RNA was amplified in a reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) by using the designed primers specific to F4_WA gene retrieved from the Genbank database, PCR product of approximately 1,200 bp was obtained. DNA was amplified again with the primers containing the restriction enzyme site. Amplified DNA was digested with the restriction enzyme and ligated to pET15b plasmid vector, prior to a cloning into *Escherichia coli* Rosetta™ 2(DE3). After positive clone was selected, its DNA was sequenced and analyzed. Result showed that its inserted DNA sequence was 100% identical to F4_WA gene. After induction and purification steps, single recombinant fibroin F4 protein of approximately 47 kDa was obtained.

Keyword: *Ant fibroin*, *Recombinant protein, Cloning*

บทคัดย่อ

ไฟโบรอินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างมากเพื่อใช้เป็นชีวพอลิเมอร์สำหรับประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ โดยไฟโบรอินที่มีการศึกษามากที่สุดคือไฟโบรอินของไหม (*Bombyx mori*) นอกจากไหมแล้ว มด *Oecophylla smaragdina* ก็เป็นแมลงอีกชนิดที่สามารถผลิตไฟโบรอินได้ แต่มีการศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์ค่อนข้างน้อย ในงานวิจัยนี้จึงต้องการโคลนและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไฟโบรอินของมด *O. smaragdina* จากการสกัด total RNA จากตัวอ่อนของมด ได้แถบอาร์เอ็นเอจำนวน 3 แถบ คือ 28S rRNA, 18S rRNA และ 5.8S rRNA เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแบบย้อนกลับ (reverse transcription–polymerase chain reaction, RT-PCR) โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากลำดับยีน F4-WA จากฐานข้อมูล Genbank พบว่าได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส หลังจากเพิ่มจำนวนดีเอ็นเออีก

ครั้งโดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ (pET15b) เพื่อให้ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET15b_F4 และนำเข้าแบคทีเรีย *Escherichia coli* Rosetta™ 2(DE3) หลังจากการคัดเลือกแบคทีเรียโคลนที่ได้รับพลาสมิด pET15b_F4 ได้วิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ พบว่ามีลำดับดีเอ็นเอเหมือนกับยีน F4_WA มีค่า identity เท่ากับ 100% จากนั้นนำมากระตุ้นการผลิตและแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน F4 พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน F4 ซึ่งมีขนาดประมาณ 47 กิโลดาลตัน

คำสำคัญ: *ไฟโบรอินของมด, รีคอมบิแนนท์โปรตีน, โคลนนิง*

บทนำ

ไฟโบรอินเป็นโปรตีนที่มีการนำมาใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งไฟโบรอินที่ได้จากหนอนไหม *B. mori* ซึ่งมีการนำมาใช้ด้านชีววัสดุทางการแพทย์และเวชสำอาง เช่น ระบบนำส่งยาชีววัสดุเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด ตัวตรวจวัดทางชีวภาพ เอ็นเทียม ผิวหนังเทียม วัสดุปิดแผลและครีมบำรุงผิว เป็นต้น (Zhang et al., 2009) ทั้งนี้เนื่องจากไฟโบรอินมีสมบัติทางกายภาพและชีวภาพที่เหมาะสม คือ มีความแข็งแรงทนทาน เหนียว ยืดหยุ่นมีสมบัติเชิงกลที่ดี (Mandal and Kundu, 2009) สามารถเข้ากันได้ดีกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Numata and Kaplan, 2010)

นอกจากหนอนไหมแล้ว มด *O. smaragdina* เป็นแมลงอีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตโปรตีนไฟโบรอินได้ ซึ่งไฟโบรอินของมดเป็นองค์ประกอบหลักของเส้นใยที่ใช้ในการสร้างรัง โดยตัวอ่อนของมด *O. smaragdina* ในระยะสุดท้ายของ instar larvae ผลิตไฟโบรอินใน labial glands (salivary gland หรือ silk gland) (Holldobler and Wilson, 1990) ซึ่งมดงานจะใช้กรามบีบตัวอ่อนเพื่อพ่นเส้นใยเชื่อมรอยต่อระหว่างใบไม้ในการสร้างรัง (Crozier et al., 2010) แม้ว่าไฟโบรอินของมดจะมีสมบัติบางประการคล้ายกับไฟโบรอินของหนอนไหม เช่น ความเหนียว และความยืดหยุ่น แต่เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างกัน โดยพบว่ามด *O. smaragdina* ในประเทศออสเตรเลีย มีรายงานว่ามีไฟโบรอิน4 ชนิด คือ WAF1, WAF2, WAF3 และ WAF4 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 391 400 395 และ 443 ตัว ตามลำดับ (Sutherland et al., 2007) ในขณะที่ไฟโบรอินของหนอนไหมมี 2 ชนิด คือ heavy chain fibroin และ light chain fibroin ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 5,263 และ 262 ตัวตามลำดับ (Wadbua et al., 2012) ซึ่งความแตกต่างนี้น่าจะมีผลโดยตรงต่อสมบัติที่แตกต่างกันของโปรตีนไฟโบรอินของแมลงทั้งสองชนิด กอปรกับยังมีการศึกษาและใช้ประโยชน์จากไฟโบรอินของมดค่อนข้างต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการโคลนยีนไฟโบรอินของมด *O. smaragdina* ในประเทศไทย ตลอดจนผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนดังกล่าวจากเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการศึกษาสมบัติของโปรตีน ตลอดจนการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

วิธีการวิจัย

การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอ่อนของมด

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอ่อนของมด บ่มในสารละลาย tri-reagent (Invitrogen, USA) 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที และสารละลายชั้นบนมาเติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร บ่ม 5 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 15 นาที

นำสารละลายชั้นบนมาตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยสารละลายไอโซโพรพานอล 0.5 มิลลิลิตรบ่ม 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x g อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% เอทานอลและทิ้งให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนกลับด้วยน้ำกลั่น วัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง UV-110 spectrophotometer (MADAPA, China) และตรวจสอบรูปแบบของอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอไฟโบรอิน

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาถอดรหัสแบบผันกลับที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม Oligo dT 0.5 ไมโครโมลาร์ dNTP 0.5 มิลลิโมลาร์ DTT 50 1X buffer และ 200 U reverse transcriptase III จากนั้นนำ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้นมาสังเคราะห์ดีเอ็นเอไฟโบรอิน ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 1x PCR buffer, RBC high fidelity Taq DNA polymerase 2.5 U และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 ไมโครโมลาร์ (จำเพาะต่อ F4_WA; Accession number: EU169221) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยขั้นตอนที่ 1 เป็นการ pre-denaturation ที่ 94 °ซ เวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนย่อย คือ การ denaturation ที่ 94°ซ เวลา 30 วินาที การ annealing ที่ 52 °ซเวลา 30 วินาที และการ extension ที่ 72 °ซ เวลา 1.5นาที โดยทำเป็นลำดับเช่นนี้จำนวน 30 รอบและขั้นตอนที่ 3 เป็น final extension ที่ 72 °ซ เวลา 5 นาทีจากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ 0.8% อะกาโรสเจล

ในการนำชิ้นดีเอ็นเอไฟโบรอินไปใช้ในการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ ได้ทำการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอไฟโบรอินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ปลายทั้งสองด้านมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ NdeI โดยใช้สภาวะในการทำพีซีอาร์เช่นเดียวกับข้างต้นแต่ใช้ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ NdeI

การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอไฟโบรอินแล้ว นำมาแยกบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยสารละลาย 3 โมลาร์ NaOAc pH 5.2 และเอทานอล จากนั้นนำไฟโบรอินดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ T&A cloning vector (RBC, Taiwan) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5α ทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และตรวจสอบลำดับเบสของไฟโบรอินด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากนั้นตัดพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ด้วยเอนไซม์ NdeI เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอไฟโบรอินเข้าเชื่อมกับ พลาสมิดพาหะ pET15b ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase จากนั้นนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5α และคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pET15b_F4 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และตรวจสอบลำดับเบสของไฟโบรอินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นนำพลาสมิด รีคอมบิแนนท์ pET15b_F4 ไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ ก่อนที่จะนำพลาสมิดรีคอมบิแนดังกล่าวเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) เพื่อทำการศึกษาการกระตุ้นการผลิตโปรตีนจากแบคทีเรียด้วย 1 mM isopropyl-ß-D- 1-thiogalactopyranoside (IPTG) และการทำแยกบริสุทธิ์โปรตีนรีคอมบิแนนท์

การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ไฟโบรอิน

การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ไฟโบรอินจากโคลนแบคทีเรียที่ได้ ทำได้โดยนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบเหลวที่มีแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.6 จากนั้นเติมสารละลาย IPTG ให้มีความเข้มข้นสุทธิ 1 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มต่อที่ 37°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง แล้วละลายตะกอนเซลล์ใน binding buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมไลโซไซม 200 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเติม 1 มิลลิโมลาร์ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) บ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยการใช้คลื่นความถี่สูง เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 × g เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไปแยกบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ His GraviTrap (GE Healthcare, UK) นำโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์มาไดอะไลซ์ในน้ำกลั่นเพื่อกำจัดเกลือของ Imidazole และทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นมากขึ้นโดยใช้ polyethylene glycol (MW = 6,000 ดาลตัน) จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะและรูปแบบของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

ผลการวิจัย

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอไฟโบรอินของมด

จากการศึกษาการโคลนยีนไฟโบรอินจากมด *O. smaragdina* โดยในขั้นตอนแรกได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอ่อนของมดด้วยสาร tri-reagent พบว่าได้แถบอาร์เอ็นเอจำนวน 3 แถบ คือ 28S rRNA, 18S rRNA และ 5.8S rRNA (รูปที่ 1)

เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาถอดรหัสแบบผันกลับ เพื่อผลิต cDNA และนำ cDNA ที่ได้ไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไฟโบรอินด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีนไฟโบรอิน F4_WA ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอไฟโบรอินได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่2)

การสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์

เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอไฟโบรอินแล้ว ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอไฟโบรอินกับพลาสมิดพาหะ (T&A cloning vector) แล้วนำเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5α จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียเป้าหมายบนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียดังกล่าว ผลการคัดเลือกพบว่าแบคทีเรียโคลนมีชิ้นส่วนยีนไฟโบรอิน F4_WA (ให้ชื่อพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ว่า pTA_F4C3) ต่อมาสับโคลน (subclone) ชิ้นดีเอ็นเอไฟโบรอินเข้าพลาสมิดพาหะ pET15b (ได้พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pET-15b_F4) และนำเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) เพื่อลดปัญหาการผลิตโปรตีนเนื่องจากการเกิด codon bias ใน *E. coli*

ผลการศึกษาพบว่าได้แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pET-15b_F4 เมื่อตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ พบว่ามีลำดับเบสที่ถูกต้องและมีทิศทางการเชื่อมกับพลาสมิดพาหะที่ถูกต้อง ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยชิ้นดีเอ็นเอไฟโบรอิน F4_WA มีขนาด 1,305 คู่เบส สามารถแปลรหัสได้ 435 กรดอะมิโน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่ามีลำดับดีเอ็นเอมีค่า identity 100% กับยีน F4_WA

การผลิตรีโปรตีนคอมบิแนนท์ไฟโบรอินของมด

จากนั้นนำแบคทีเรียมาผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ไฟโบรอินโดยการกระตุ้นด้วย IPTG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าไม่มีแถบของโปรตีนที่เข้มขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วย IPTG เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของแบคทีเรียก่อนถูกกระตุ้นด้วย IPTG แต่เมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ His GraviTrap พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ไฟโบรอินจากแบคทีเรียได้ ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 47 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4)

อภิปรายผล

จากการโคลนยีนไฟโบรอินจากมด *O. smaragdina* ตลอดจนผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนดังกล่าวจากเซลล์แบคทีเรีย พบว่าสามารถโคลนยีนไฟโบรอิน F4 ได้ โดยเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฟโบรอินไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าไฟโบรอิน F4 จากมด *O. smaragdina* ในประเทศไทย มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน F4_WA ของมด *O. smaragdina* ในประเทศออสเตรเลีย โดยมีค่า identity เท่ากับ 100% ชี้ให้เห็นว่ายีนไฟโบรอินดังกล่าวมีความอนุรักษ์สูงแม้ว่าจะมาจากมด *O. smaragdina* ต่างทวีป ทั้งนี้ Sutherland และคณะ (Sutherland et al., 2007) ได้รายงานถึงยีนไฟโบรอินถึง 4 ชนิด ได้แก่ F1_WA F2_WA F3_WA และ F4_WA ของมด *O. smaragdina* ในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 391, 400, 395 และ 443 ตัว ตามลำดับ ซึ่งโครงงานวิจัยนี้กำลังโคลนยีนอีก 3 ชนิดเพื่อเปรียบเทียบข้อมูลกับมด *O. smaragdina* ในประเทศออสเตรเลีย

สำหรับโครงสร้างโปรตีนไฟโบรอิน F4 จากมด *O. smaragdina* ในประเทศไทยเมื่อนำไปทำนายโครงสร้างโปรตีนโดยใช้โปรแกรม MARCOIL (http://toolkit.tuebingen.mpg.de/marcoil/results/ 2904094) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sutherland และคณะ ที่พบว่าโครงสร้างของโปรตีนไฟโบรอินส่วนใหญ่เป็นแบบ coiled coil และพบลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกันเจ็ดตัว คือ $[(abcdefg)_n]$ โดยตำแหน่ง a และ d แทนลำดับกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ส่วนตำแหน่งอื่นๆ แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ

เมื่อนำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ได้ไปทำนายค่า pI ของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool) พบว่าไฟโบรอินของมด *O. smaragdina* มีค่า pI เท่ากับ 6.27 ผลการวิจัยนี้จะทำให้สามารถผลิตไฟโบรอินได้ในปริมาณสูงเพียงพอสำหรับการนำโปรตีนไปศึกษาสมบัติ และใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการพัฒนากำลังคนวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

Crozier, R.H., Newey, P.S., Schlüns, E.A., and Robson, S.K.A. 2010. A masterpiece of evolution – *Oecophylla* weaver ants (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News 13: 57-71.

Holldobler, B., and Wilson, E.O. 1990. The ants. Cambridge, Bel Knap Press of Harvard University Press.

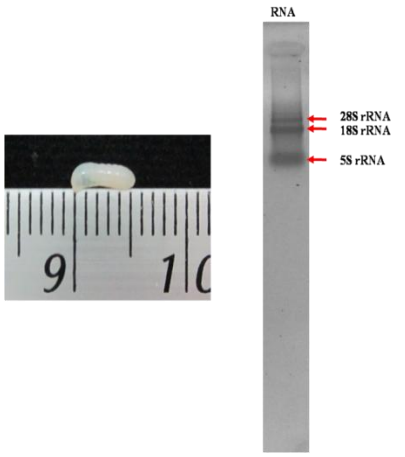
Mandal, B.B., and Kundu, S.C. 2009. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. Biomaterials 30(15): 2956-2965.

Numata, K., and Kaplan, D.L. 2010. Silk-based delivery systems of bioactive molecules. Advanced Drug Delivery Reviews 62(15): 1497-1508.

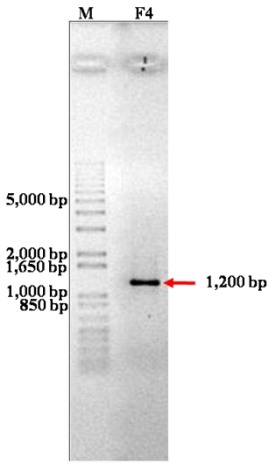
Sutherland, T.D., Weisman, S., Trueman, H.E., Sriskantha, A., Trueman, J.W.H., and Haritos, V.S. 2007. Conservation of essential design features in coiled coil silks. Molecular Biology and Evolution 24(11): 2424-2432.

Wadbua P., Promdonkoy B., Maensiri S., and Siri S. 2010. Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of *Bombyx mori*. International Journal of Biological Macromolecules 46(5): 493-501.

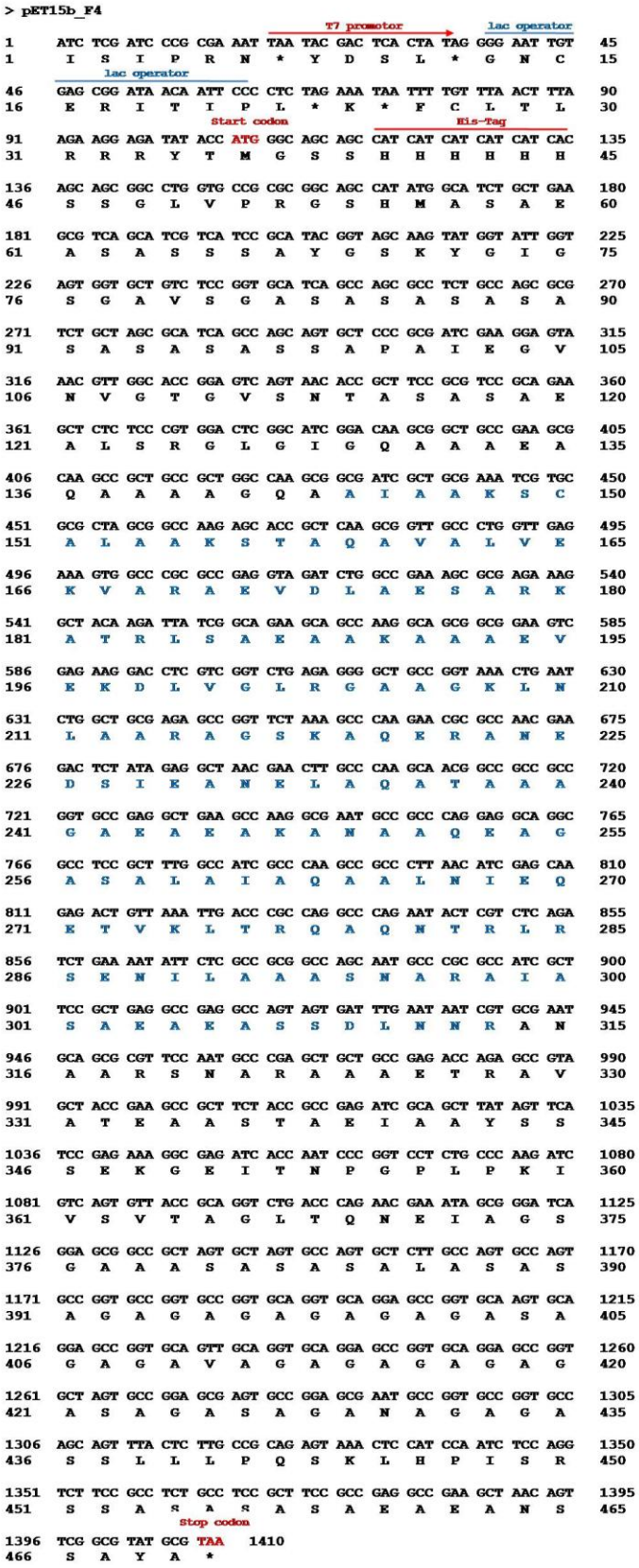
Zhang, Q., Yan, S., and Li, M. 2009. Silk fibroin based porous materials. Materials 2(4): 2276-2295.



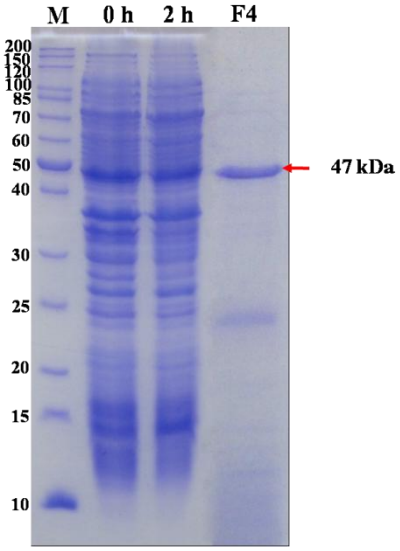
รูปที่ 1. ตัวอ่อนของมด *O. smaragdina* และอาร์เอ็นเอที่สกัดได้



รูปที่ 2. ดีเอ็นเอไฟโบรอิน F4 ที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส



รูปที่ 3. ลำดับเบสของไฟโบรอิน F4 และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสได้



รูปที่ 4. ลักษณะของโปรตีนที่แบคทีเรียผลิตได้ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย IPTG (0 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ) และรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ His GraviTrap