MASSALIN NAKPHAICHIT : CHARACTERIZATION OF β-GLUCOSIDASE FROM THE RICE *SFR2* GENE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 100 PP.

RICE/FREEZING SENSITIVE/PROTEIN LOCALIZATION

The rice *sensitive to freezing2* or rice *SFR2* gene was cloned and expressed. The SFR2 protein encoding an enzyme in the group of glycosyl hydrolase family 1. It's amino acid sequence was more similar to β-glycosidases from thermophilic and halophilic archea and bacteria than any other non-SFR2 enzymes in plants. Several strains of *Escherichia coli*, vectors (pET32a, pSY5 and pGEX-4T-3), induction times and induction temperatures (4, 20, 37 and 45°C) were investigated. No condition tried was able to produce SFR2 protein in *E. coli*. *Pichia pastoris* was also used to express *SFR2*. The mRNA of *SFR2* was detected in methanol induction but no protein was detected by activity nor SDS-PAGE technique. Therefore, plant cells were used to investigate the expression and protein localization. The detection of GFP and GUS protein indicated that the *SFR2* gene could express in plant cells under control of the 35S promoter. The constructs containing *SFR2* transit peptide at the N-terminal showed GFP fluorescence or GUS staining in the chloroplast.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2006 Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

มัสลิน นาคไพจิตร : การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจากยีน *SFR2* ในข้าว (CHARACTERIZATION OF β-GLUCOSIDASE FROM THE RICE *SFR2* GENE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 100 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจากยีน *SFR2* ในพืชตระกูลข้าว โดยทำการศึกษาผ่านระบบรีคอมบิแนนท์โปรตีน ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *SFR2* กับโปรตีนในฐานข้อมูล พบว่าโปรตีน SFR2 อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลสที่ 1 (GH1) และลำดับเบสคล้ายคลึงกับ (GH1) จากแบคทีเรีย Thermophilic และ Halophilic มากกว่ากลุ่มของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจากพืชต่างๆ จากผลการศึกษาพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน SFR2 ไม่สามารถผลิตได้ใน *Escherichia coli* ทั้งในสายพันธุ์และระบบเวคเตอร์ต่างๆ (pET32a, pSY5 และ pGEX-4T-3) ซึ่งการศึกษานี้ยังได้มีการทดลองหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม (4, 20, 37 และ 45°C) ต่อการผลิตและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้มีการผลิตโปรตีนด้วย แต่ทุกสภาวะที่ศึกษาไม่สามารถผลิตโปรตีน SFR2 ใน *E. coli* ได้ จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน SFR2 มาผลิตในยีสต์ *Pichia pastoris* ซึ่งจากการทดลองพบ mRNA ของยีน *SFR2* แต่ไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์และโปรตีนได้ ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน SFR2 จึงถูกนำมาผลิตในเซลล์พืช โดยโปรตีน SFR2 ถูกเชื่อมกับโปรตีนติดตาม GFP และ GUS ทางด้านปลาย N หรือ C เพื่อถ่ายเข้าเซลล์สาหร่ายหางกระรอกและเซลล์หัวหอม จากผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน SFR2 ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ 35S ในเซลล์พืช และพบโปรตีน SFR2 ในคลอโรพลาสต์ของเซลล์สาหร่ายหางกระรอก

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____