



รายงานการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกและการตรวจสอบโปรตีน SFR2 จากข้าวใน

Escherichia coli และ *Pichia pastoris*

(The Expression and Detection of Rice SFR2 in *Escherichia coli* and

Pichia pastoris)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกและการตรวจสอบโปรตีน SFR2 จากข้าวใน

Escherichia coli และ *Pichia pastoris*

(The Expression and Detection of Rice SFR2 in *Escherichia coli* and
Pichia pastoris)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.มารีนา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวศศิประภา กาญจนวัฒนา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551-2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้ออำนวยสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณ นส. มัสลิน นาคไพจิตร สำหรับข้อมูลในด้านการติดตามตำแหน่งของโปรตีนในรายงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ คุณปรานค์ขาว ปรุเขตต์ เลขานุการสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่อำนวยความสะดวกเรื่องเอกสารการขอใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือต่างๆ และการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551-2552



บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SFR2 ของข้าวใน *E. coli* และ *P. pastoris* ส่วนทางด้านปลายเอ็นและปลายซีของโปรตีน SFR2 ถูกสร้างใน *E. coli* ด้วยระบบของ pET32a ผลการทดลองพบว่า มีเพียงกรดอะมิโน 260 ตัวทางด้านปลายซีและกรดอะมิโน 174 ตัวทางด้านปลายเอ็นเท่านั้นสามารถแสดงออกใน *E. coli* ได้ส่วนของ PEST sequence ที่พบในโปรตีน SFR2 ซึ่งเป็นลำดับของกรดอะมิโนที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนโดยโปรติเอสถูกทำให้เปลี่ยนแปลงโดยเปลี่ยนกรดอะมิโนกลูตามิกเป็นกลูตามีน โดยวิธีพีซีอาร์มีวตาเจนเนสซิส อย่างไรก็ตามเมื่อทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนพบว่า SFR2 ที่มีการมิวเทดไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ ดังนั้นจึงเปลี่ยนระบบจาก pET32a ไปเป็น pCold I และทำให้มีการแสดงออกใน *E. coli* เช่นเดิม ผลการทดลองพบว่าโปรตีน SFR2 ไม่สามารถแสดงออกได้โดยใช้ pCold I เช่นกัน เนื่องจากข้อจำกัดของการย้อมสี Coomassie blue ในการตรวจสอบโปรตีนบน SDS-PAGE จึงได้ทำการตรวจสอบโปรตีนโดยเทคนิคเวสเทิร์นบลอตเพื่อตรวจสอบหาโปรตีน SFR2 โดยการใช้โปรตีนส่วนปลายซีของ SFR2 เป็นแอนติเจนเพื่อสร้างแอนติเซรัม ผลการทดลองพบการแสดงออกของโปรตีน SFR2 แต่มีในปริมาณเพียงเล็กน้อย ดังนั้นระดับอาร์เอ็นเอของ SFR2 จึงถูกตรวจสอบโดยใช้เทคนิคนอร์เทิร์นบลอตพบว่า ระดับอาร์เอ็นเอของส่วนทางด้านปลาย 5' (ปลายเอ็นของโปรตีน) แสดงความสัมพันธ์กับผลการทดลองที่แสดงบนแผ่นเมมเบรนคือระดับอาร์เอ็นเอน้อยจึงส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่น้อยด้วย อย่างไรก็ตามผลการทดลองของระดับอาร์เอ็นเอทางปลาย 3' (ปลายซีของโปรตีน) ไม่ได้แสดงออกในทิศทางเดียวกัน โปรตีน SFR2 ถูกนำมาผลิตใน *P. pastoris* อย่างไรก็ตามผลการทดลองใน SDS-PAGE ไม่ได้บ่งบอกอย่างชัดเจนว่ามีการแสดงออกของ SFR2 หรือไม่ ในส่วนของการติดตามตำแหน่งของโปรตีนพบว่า โปรตีน SFR2 มีการเคลื่อนที่ไปที่คลอโรพลาสต์ของเซลล์หัวหอมและสาหร่ายหางกระรอก

Abstract

The rice sensitive to freezing2 (*SFR2*) gene was cloned and expressed in *E. coli* and *P. pastoris*. The *SFR2* proteins with N-terminal and C-terminal deletions were expressed in *E. coli* with the pET32a system. Results indicated that only 260 amino acids of the C-terminal and 174 amino acids of the N-terminal regions could be produced in *E. coli*. A PEST sequence, a region known to target its protein to proteolysis was found in the rice *SFR2* protein. The PEST sequence in *SFR2* was mutated by changing glutamic acids to glutamine. Then the mutated gene was expressed in *E. coli*. However, Coomassie blue stained SDS-PAGE could not detect any expressed *SFR2* protein. The expression vector was changed to pCold I and again the *SFR2* gene deletion were expressed in *E. coli*. The results still showed no detectable protein on SDS-PAGE. Because of the limitation of Coomassie blue staining, western blot analysis was done. The C-terminal region of *SFR2* protein (28_*SFR2*) was used as antigen to produced rabbit antisera. With this antisera, it was shown that the *SFR2* protein could be expressed in *E. coli*, but only in very small amounts which were not detected by Coomassie blue stained SDS-PAGE. To determine the reasons, the RNA levels were investigated. The amount of RNA of the 5's region, encoding the N-terminal region, correlated with the western blot results that the lower RNA levels showed low protein levels. In contrast, the RNA encoding the C-terminal region did not show the same correlation.

P. pastoris was also used as expression host but no detectable protein can be found on SDS-PAGE even with the *SFR2* with codons optimized for *P. pastoris* expression. For protein localization using GFP and GUS protein as reporter protein indicated that *SFR2* protein localized to chloroplast of hydrilla and onion cells.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1	
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
ขอบเขตของงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 2	
วิธีดำเนินการวิจัย	11
2.1 การโคลนยีน SFR2	11
2.1.1 การเพิ่มจำนวนยีน SFR2 ด้วยวิธีพีซีอาร์	11
2.1.2 การโคลนยีน SFR2 เข้าเวกเตอร์ pColdI	12
2.1.3 การโคลนยีน 26_SFR2_syn เข้าเวกเตอร์ pPICZαBNH8 และ pET32a	13
2.2 การมิวเทต PEST sequence ภายใน SFR2 โดยวิธีพีซีอาร์มิวตาจีนซิส	16
2.3 การแสดงออกของโปรตีน	17
2.3.1 การแสดงออกของโปรตีน โดยใช้เวกเตอร์ pET32a ใน <i>E.coli</i>	17
2.3.2 การแสดงออกของโปรตีน โดยใช้เวกเตอร์ pColdI ใน <i>E.coli</i>	18
2.3.3 การแสดงออกของโปรตีน 26_SFR2_syn โดยใช้เวกเตอร์	19
2.4 การตรวจสอบโปรตีน	19
2.4.1 การผลิตโพลีโคลนอนแอนติบอดี	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 การตรวจสอบโปรตีน โดยเวสเทิร์นบลอต	21
2.5 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยนอร์เทิร์นบลอต	21
2.6 การติดตามตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์ในเซลล์สำหรับหาคะรอกและเซลล์หัวหอม	22
บทที่ 3	
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
3.1 การโคลนนิ่ง	24
3.1.1 การโคลนชิ้นส่วนยีน SFR2 เข้า pET32a	24
3.1.2 การโคลนชิ้นส่วนยีน SFR2 เข้า pColdI	29
3.1.3 การโคลนยีน 26_SFR2_syn เข้า pPICZαBNH8	32
3.2 การแสดงออกของโปรตีน	34
3.2.1 การแสดงออกของโปรตีนใน <i>E. coli</i>	34
3.2.2 การตรวจสอบโปรตีน โคนใช้เวสเทิร์นบลอต	42
3.2.3 การแสดงออกของโปรตีนใน <i>P. pastoris</i>	43
3.3 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยใช้วิธีนอร์เทิร์นบลอต	44
3.4 การติดตามตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์สำหรับหาคะรอกและเซลล์หัวหอม	45
บทที่ 4	
บทสรุป	50
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก	57
ประวัติผู้วิจัย	59

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 โปรโมเตอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนและหาลำดับเบสยีน <i>SFR2</i>	14
ตารางที่ 2.2 สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>SFR2</i>	15
ตารางที่ 2.3 สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>SFR2</i> ที่มีการมีวเขตบริเวณ PEST sequence	17
ตารางที่ 2.4 การกระตุ้นแอนติเจนและการผลิตแอนติเซรัม	20
ตารางที่ 3.1 โครงสร้างพลาสมิดที่ใช้ในการติดตามตำแหน่งของโปรตีน	46
ตารางที่ 4.1 สรุปรูปการแสดงออกและการตรวจสอบโปรตีน <i>SFR2</i> บน SDS-PAGE และ เวสเทิร์นบลอต และการตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยวิธีนอร์เทิร์นบลอต	52



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 แผนภูมิรูปต้นไม้เปรียบเทียบโปรตีนไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 ในข้าว และพืชอื่น	6
รูปที่ 3.1 ผลิตรหัสพีซีอาร์เพื่อใช้ในการโคลนยีน	24
รูปที่ 3.2 พลาสมิด pENTR-D/TOPO ที่มีชิ้นส่วนของยีน SFR2 อยู่ ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	25
รูปที่ 3.3 ผลิตรหัสพีซีอาร์เพื่อใช้ในการโคลนยีน	26
รูปที่ 3.4 พลาสมิด pENTR-D/TOPO ที่มีชิ้นส่วนของยีน SFR2 อยู่ ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	27
รูปที่ 3.5 ผลิตรหัสพีซีอาร์ที่ทำการมีวเขตบริเวณ PEST sequence	28
รูปที่ 3.6 พลาสมิด TOPO_26mutPEST_SFR2 ที่ตัดและไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i>	28
รูปที่ 3.7 การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนระหว่าง AK_SFR2 และ 26_mutPEST_SFR2	29
รูปที่ 3.8 ผลิตรหัสพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์	30
รูปที่ 3.9 ผลิตรหัสพีซีอาร์ 37_SFR2, 37_mutPEST_SFR2 และเวกเตอร์ pCold I หลังจากตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ	30
รูปที่ 3.10 พลาสมิด pCold_37_SFR2 และ pCold_37_mutPEST_SFR2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>PstI</i>	31
รูปที่ 3.11 การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนระหว่าง AK_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2	31
รูปที่ 3.12 ลำดับกรดอะมิโนของพลาสมิด pPICZ_26_SFR2_syn	32
รูปที่ 3.13 โคลนพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบยีน 26_SFR2_syn โดยใช้ไพรเมอร์ 5' AOX และ 3' AOX ใน <i>P. pastoris</i>	33
รูปที่ 3.14 ชิ้นส่วนยีน SFR2 ทั้งหมดที่ใช้ในการโคลนและผลิตโปรตีนในระบบเวกเตอร์ pET32a และ pCold I	33
รูปที่ 3.15 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม SFR2 บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) <i>plysS</i>	34
รูปที่ 3.16 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 26_SFR2 และ 26_SFR2_syn โดยใช้ ArcticExpress(DE3) RIL	35
รูปที่ 3.17 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม SFR2 ที่มีการมีวเขตบริเวณ PEST sequence บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) <i>plysS</i> , Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3)	37

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.18 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 31_SFR2_delC(mP) โดยใช้ Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3)	38
รูปที่ 3.19 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 32_SFR2_delC(mP) โดยใช้ Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3)	39
รูปที่ 3.20 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 33_SFR2_delC โดยใช้ Origami(DE3) และ BL21(DE3) <i>plysS</i>	39
รูปที่ 3.21 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 34_SFR2_delC โดยใช้ Origami(DE3) และ BL21(DE3) <i>plysS</i>	40
รูปที่ 3.22 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 โดยใช้ BL21(DE3) <i>plysS</i>	41
รูปที่ 3.23 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 โดยใช้ Rosetta-gami(DE3) และ Origami(DE3)	41
รูปที่ 3.24 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน SFR2 โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต บนแผ่นเมมเบรน PVDF	42
รูปที่ 3.25 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน 26_SFR2_syn โดยใช้ <i>P. pastoris</i> SMD1168H	44
รูปที่ 3.26 ตรวจสอบระดับของอาร์เอ็นเอของ SFR2 โดยวิธีการนอร์เทิร์นบลอต	45
รูปที่ 3.27 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2 โดยใช้โปรตีนติดตาม GFP ในเซลล์สำหรับ หางกระรอก โดยใช้พลาสมิด pMDC43 และ pSM43	47
รูปที่ 3.28 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2 โดยใช้โปรตีนติดตาม GFP ในเซลล์สำหรับ หางกระรอก โดยใช้พลาสมิด pSM83 และ pRM83	48
รูปที่ 3.29 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2 โดยใช้โปรตีนติดตาม GUS ในเซลล์หัวหอม และเซลล์สำหรับหางกระรอกโดยใช้พลาสมิด pMDC140 และ pSM140	59

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

ข้าวจัดเป็นพืชอาหารที่สำคัญที่สุดสำหรับมนุษย์ ทั่วโลกมีการเพาะปลูกข้าวมากกว่า 500 ล้านตัน (Goff และคณะ, 2002) นอกจากนี้ข้าวยังจัดเป็นพืชตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและฐานข้อมูลจีโนมของข้าวมีความก้าวหน้าไปถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (Jung และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงเป็นระบบที่เหมาะสมในการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองต่อความเครียดต่อสภาพธรรมชาติ เอนไซม์กลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส (glycosyl hydrolase) เป็นโปรตีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการตอบสนองต่อความเครียดต่อธรรมชาติของข้าวซึ่งมีหน้าที่ทั้งในด้านกายภาพและชีวภาพ การกระตุ้นฮอร์โมน การต้านทานศัตรูพืช การสร้างความแข็งแรงของผนังเซลล์และการสร้างสารตัวกลาง ซึ่งสามารถพบได้ในไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 1 และ 3 (Esen, 1993)

ยีน *Sensitive to freezing2* หรือ *SFR2* เป็นยีนที่ถูกค้นพบใหม่ในอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*) โดย Thorlby และคณะในปี 2004 ยีนนี้จัดอยู่ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 1 ผลผลิตของยีนนี้ช่วยเกี่ยวกับความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิของพืช ในปี 2008 Fourrier และคณะพบว่า โปรตีน SFR2 มีการเคลื่อนที่ไปที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของคลอโรพลาสต์และมีหน้าที่ปกป้องการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเย็น/เยือกแข็ง ในปี 2010 Mollering และคณะได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของโปรตีน พบว่า ยีน SFR2 แปลรหัสให้โปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม galactolipid remodeling enzyme โดยทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายหมู่กาแลคโตซิล (galactosyl) จากโมโนกาแลคโตลิปิด (monogalactolipid) เพื่อนำไปที่ตัวรับ (galactolipid acceptors) เพื่อสร้างโอลิโกกาแลคโตลิปิด (oligogalactolipids) และไดอะซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) และเปลี่ยนเป็นไตรอะซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างไบเลเยอร์ (bilayer) และนอน-ไบเลเยอร์ (non-bilayer) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเสถียรมากขึ้น นอกจากนี้ *SFR2* ยังถูกพบในพืชหลายชนิด ได้แก่ พืชจำพวกข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ พืชตระกูลถั่ว (*Glycine Max*) และพืชตระกูลสน (*Pinus taeda*) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน *SFR2* พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับโปรตีนของแบคทีเรียจำพวกทนร้อน (Thermophilic) และทนเกลือ (Halophilic) มากกว่าโปรตีนในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 1 จากพืชชนิดอื่น

ในงานวิจัยนี้ได้นำข้อมูลเกี่ยวกับยีน *SFR2* ในอะราบิโดปซิสมาใช้ศึกษายีน *SFR2* ของข้าว โดยนำซีดีเอ็นเอของยีน *SFR2* ที่ได้จากธนาคารดีเอ็นเอ (DNA Data Bank of Japan (DDBJ)) ของข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* มาผลิตโปรตีนในระบบรีคอมบิแนนท์ เพื่อใช้ศึกษาหน้าที่ทางชีวเคมีและทำการศึกษาคำแหน่งของ

โปรตีน SFR2 ในเซลล์ (protein localization) โดยคาดว่าจะงานวิจัยนี้จะนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับหน้าที่ของ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวต่อภาวะเครียดในสภาพธรรมชาติซึ่งบทบาทเหล่านี้อาจจะนำไปสู่การพัฒนา เพื่อผลิตข้าวซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศไทยต่อไป อย่างไรก็ตามเมื่อมีการศึกษาโปรตีน SFR2 โดยผ่าน ระบบรีคอมบิแนนท์ โดยใช้ *Escherichia coli* และ *Pichia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อทำการผลิตโปรตีน พบว่าไม่สามารถผลิตโปรตีนชนิดนี้ได้เมื่อมีการตรวจสอบโดยใช้วิธี SDS-PAGE จึงได้ทำการตัดยีนทั้งทางด้าน ปลาย 5' และ 3' ออกเป็นส่วนๆ เพื่อวิเคราะห์หาสาเหตุ รวมถึงตรวจสอบความสามารถในการผลิตอาร์เอ็นเอ และโปรตีนในเซลล์ *E. coli* และ *P. pastoris*

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีน *SFR2* จากข้าว กับกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 1 จาก ข้าว และ แบคทีเรียอื่น ๆ
2. ศึกษาหน้าที่ทางชีวเคมีของเอนไซม์ *SFR2* โดยศึกษาถึงตำแหน่งของโปรตีน *SFR2* ในเซลล์ เพื่อใช้ในการทำ หน้าที่ของยีน *SFR2* ในข้าว
3. ศึกษาส่วนต่างๆ ของยีน *SFR2* ที่ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli*
4. ทำการผลิตโปรตีน *SFR2* ใน *P. pastoris*
5. ศึกษาระดับการทรานสคริปชันของยีน *SFR2* ใน *E. coli* และ *P. pastoris* โดยวิธีนอร์เทิร์นบลอต

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ใช้ซีดีเอ็นเอของยีน *SFR2* จากข้าว (DDBJ Accession AK119461) ซึ่งได้รับมาจากศูนย์รวบรวม พันธุกรรม ข้าว (Rice Genome Resource Center) มาเป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้วิธีพีซีอาร์
2. ใช้ pET32a และ pCOLD I เป็นเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีน (expression vector) ใน *E. coli*
3. ใช้เทคนิค SDS-PAGE และเวสเทิร์นบลอตในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน *SFR2*
4. ใช้เทคนิคนอร์เทิร์นบลอตในการตรวจสอบระดับอาร์เอ็นเอของยีน *SFR2*
5. ใช้ pPICZ α BNH8/DEST เป็นเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีนใน *P. pastoris*
6. ใช้ pMDC43, pMDC83 และ pMDC140 เป็นเวกเตอร์ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชสำหรับการแสดงออกของ โปรตีนเพื่อติดตามตำแหน่งของโปรตีน *SFR2* ในเซลล์หัวหอมและสาหร่ายหางกระรอก

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงบทบาทหน้าที่ของโปรตีน SFR2 ในข้าว

เนื่องจากในปัจจุบันนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับยีน *SFR2* ที่พบใน *Arabidopsis* เพียงอย่างเดียวยังไม่มีการศึกษาในส่วนของข้าว ดังนั้นในการศึกษานี้มุ่งเน้นไปที่หน้าที่ และตำแหน่งของโปรตีน SFR2

2. แก้ปัญหาในการดำเนินงานของหน่วยงานที่ทำการวิจัย

ใช้ความรู้ที่ได้จากการวิจัยทั้งด้านเทคนิคและวิธีการเพื่อปรับปรุงแก้ไขและพัฒนาการวิจัยในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งในขณะนี้การวิจัยด้านการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารียังประสบปัญหาอยู่บ้าง โดยสามารถผลิตโปรตีนจากยีนที่มีอยู่ได้เพียงประมาณ 50% การศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน SFR2 จะช่วยพัฒนาข้อมูลและความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

สามารถเริ่มต้นการเป็นส่วนหนึ่งของการสร้างระบบเทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และการศึกษาหาหน้าที่ของโปรตีน SFR2 จะเพิ่มความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสให้กับกลุ่มวิจัยเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำวิจัยต่อไป

4. เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

นักวิจัยและนักวิชาการสามารถได้รับประโยชน์จากผลการวิจัยสามารถเอาความรู้พื้นฐานมาปรับปรุงสายพันธุ์ข้าว เพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไปในอนาคตได้

การทบทวนวรรณกรรม (Literature reviews)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย เช่น ในสัตว์พืช เชื้อรา ยูแบคทีเรียและอาร์เคีย (Archaea) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการสลายพันธะกลูโคซิดิกซึ่งเชื่อมระหว่างกลูโคสและอาคิล (akly) อาร์ล (aryl) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) เพื่อปลดปล่อยกลูโคสและอโกลโคน (Opassiri และคณะ, 2003) ในปี 1998 มีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Clavibacter michiganense* ว่าสามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ใน steviol glycosides อย่างไรก็ตามความเร็วในการย่อยสลายเกิดขึ้นได้ช้ากว่าการย่อยสลายพันธะกลูโคซิดิก (Nakano และคณะ, 1998)

ส่วนมากแล้วเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะอยู่ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 1, 3, 5, 9, 30 และ 116 (Ketudat-Cairns และ Esen, 2010) ส่วนเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่พบในพืชมักจัดอยู่ในกลุ่ม ไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 1 (Opassiri และคณะ, 2006) เอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่หลากหลายในพืชเกี่ยวกับกระบวนการจัดการทางชีวภาพ ได้แก่ การควบคุมฮอร์โมน เช่น เมตาบอลิซึมของแอบซิซิกเอซิด (ABA metabolism) การ

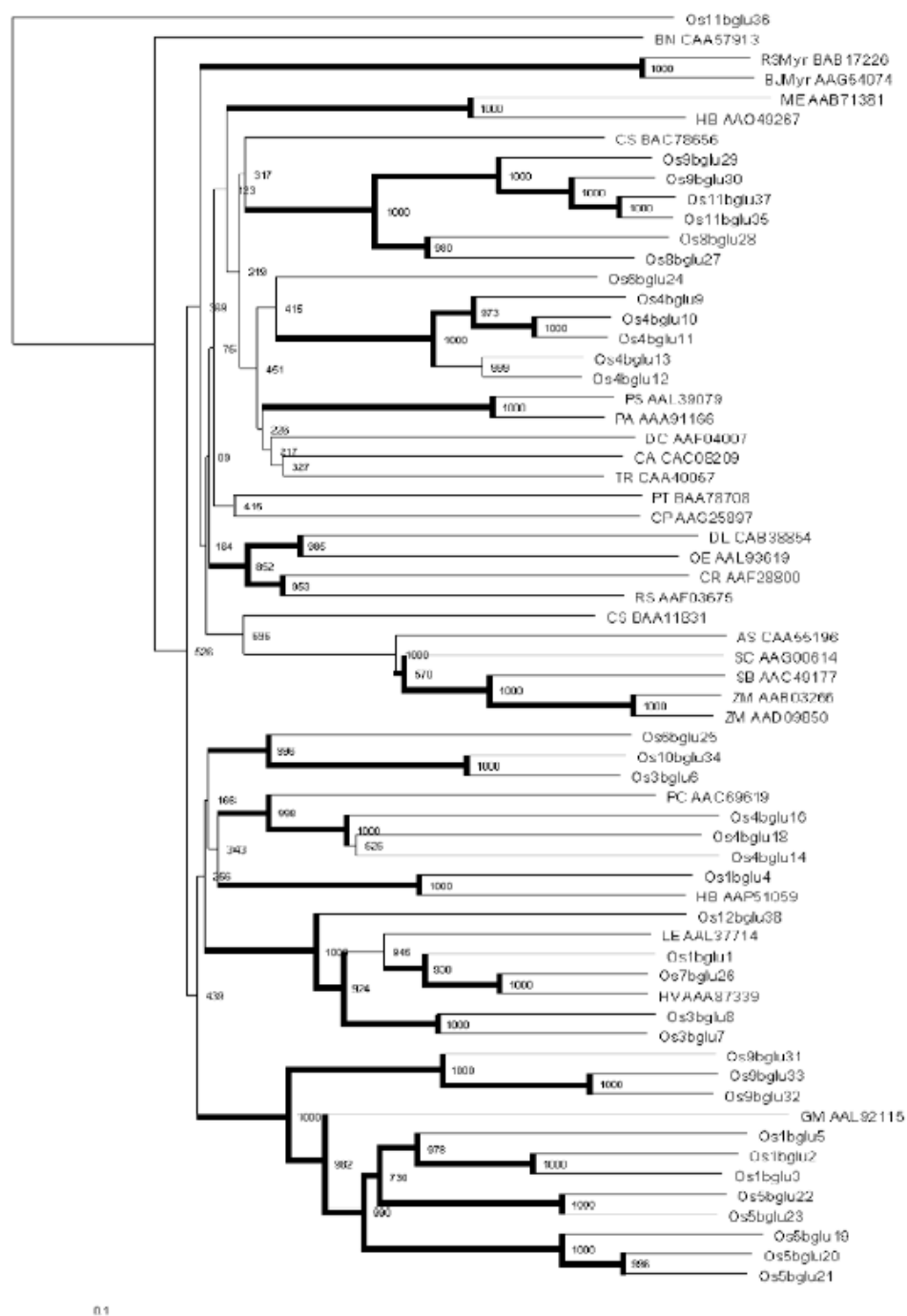
ย่อยสลายคอนจูเกตของจิบเบอเรลลินและการเปลี่ยนไซโตไคนินจาก storage form ไปเป็น active form (Dietz และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านทานความเครียดของพืช และกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชจากจุลินทรีย์ แมลงและปรสิต (Esen, 1992) รวมถึงการลิกนิฟิเคชัน (Escamilla-Trevino และคณะ, 2006) รายงานเกี่ยวกับยีนเบต้า-กลูโคซิเดส *BGLU45* และ *BGLU46* จากอะราบิโดปซิสระบุว่ายีนชนิดนี้แปลรหัสให้โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโมโนลิกนอลกลูโคไซด์ (monolignol glucoside) เพื่อปลดปล่อยโมโนลิกนอล (monolignol) เพื่อไปรวมกับสารอื่นและสร้างเป็นลิกนิน ส่วนหน้าที่อื่นๆ ของเบต้า-กลูโคซิเดสได้แก่ การปลดปล่อยสารระเหย, การปลดปล่อยกลูโคสเพื่อกระตุ้นในเกิดการทำงานของของไกลโคโคน (Opassiri และคณะ, 2006) การเจริญเติบโตของดอกและการสร้างเมล็ด (Hsieh และ Graham, 2001) เพื่อให้มีหน้าที่ต่างๆกันดังนั้นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจึงต้องมีความสามารถในการจับกับไกลโคโคนได้หลากหลาย (Opassiri และคณะ, 2006)

พืชบางชนิดมีความสามารถต้านทานต่อความเย็นเมื่ออยู่ในสภาพอุณหภูมิต่ำปรากฏการณ์นี้เป็นการปรับตัวต่อความเย็น เรียกว่า Cold acclimation (Thomashow, 1999) ปรากฏการณ์นี้ไม่ได้เกิดขึ้นตลอดเวลา (constitutive) แต่เป็นการเหนี่ยวนำ (induce) ให้เกิดขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ (Thomashow, 1998) อย่างไรก็ตามกลไกการเกิดการต้านทานต่อความเย็นของพืชยังไม่ทราบแน่ชัด อาจมีหลายกระบวนการเกิดขึ้นเกี่ยวกับการต้านทานความเย็นของพืช เช่น การเพิ่มความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ การรวบรวมสารประเภทน้ำตาลและโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการป้องกันความเย็น และการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (Buchanan และคณะ, 2000)

ยีน *Sentitive to freezing2* หรือ *SFR2* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มของไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 1 ซึ่งมีลำดับเบสที่แอกทิฟไซต์ที่ถูกอนุรักษ์ไว้ของกลุ่มนี้คือ TFNEP และ IVTENG จากแผนภูมิรูปต้นไม้นี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *SFR2* จากยีน *Os11bglu36* ของ *Oryza sativa* มีความแตกต่างจากเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสอื่นๆในไกลโคซิลไฮโดรเลสแฟมิลีเดียวกัน (รูปที่ 1) โปรตีน *SFR2* ถูกพบครั้งแรกในอะราบิโดปซิส ในปี 2004 โดย Thorlby และคณะ ในการทดลองนั้นผู้ทดลองได้ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์และในระดับอนุระหว่างพืชปกติที่มียีน *SFR2* อยู่ และพืชที่มีการมิวเตชันของยีนชนิดนี้ (*sfr2-1*) พบว่าในระดับอนุระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (transcription) ของต้นพืชปกติและพืชกลายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อพืชอยู่ในสภาวะอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงสรุปว่ายีนชนิดนี้มีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอตลอดเวลา ส่วนลักษณะทางฟีโนไทป์พบว่าต้นพืชกลายพันธุ์เกิดความเสียหายเนื่องจากความเย็นเมื่อพืชอยู่ที่อุณหภูมิ -6°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน *SFR2* เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการปกป้องพืชเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเย็นโดยมีการแสดงออกของยีนตลอดเวลา ต่อมาในปี 2008 Fourrier และคณะ ได้ทำการศึกษาคำแหน่งของโปรตีนในเซลล์ในอะราบิโดปซิส โดยใช้ GFP เป็นโปรตีนติดตามพบว่าโปรตีน

SFR2 มีการ เคลื่อนที่ไปที่เยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์ชั้นนอก (chloroplast outer envelope) นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีน SFR2 มีหน้าที่ในการปกป้องคลอโรพลาสต์ โดยผู้ทดลองได้ทำการเปรียบเทียบคลอโรพลาสต์ระหว่าง พืชปกติและพืชกลายพันธุ์พบว่า คลอโรพลาสต์ของพืชกลายพันธุ์เกิดความเสียหายอย่างรวดเร็วเมื่อนำออกมา จากสภาวะเย็นแล้วเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในปี 2010 Mollering และคณะได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของ โปรตีน พบว่า ยีน *SFR2* แปลรหัสให้โปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม galactolipid remodeling enzyme โดยทำหน้าที่ในการ เคลื่อนย้ายหมู่ galactosyl จาก monogalactolipid เพื่อนำไปที่ galactolipic acceptors เพื่อสร้าง oligogalactolipids และ diacylglycerol และเปลี่ยนเป็น triacylglycerol การทำหน้าที่ร่วมกันระหว่าง SFR2 และเอนไซม์ซึ่งทำ หน้าที่ในการสังเคราะห์ triacylglycerol ทำให้ monogalactolipid ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์หลุดออกไป ซึ่งทำให้ เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง bilayer และ non-bilayer ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเสถียรมากขึ้น





รูปที่ 1.1 แผนภูมิต้นไม้เปรียบเทียบโปรตีนไคโลไซลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 ในข้าว และพืชอื่น (ปรับปรุง จาก Opassiri และคณะ, 2006)

ในการผลิตโปรตีนโดยผ่านระบบรีคอมบิแนนท์ เซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้มากคือ *E. coli* เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาไม่แพง มีลำดับสารพันธุกรรมที่รู้แน่นอนและมีเวกเตอร์และสายพันธุ์ของ *E. coli* ให้เลือกหลากหลาย (Baneyx, 1999) โดยปกติแล้วโปรตีนของ *E. coli* ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ แต่มีบางโปรตีนถูกส่งไปที่ periplasmic space หรือถูกส่งออกนอกเซลล์ ดังนั้น heterologous protein ส่วนใหญ่ถูกสะสมอยู่ที่บริเวณไซโตพลาสซึม อย่างไรก็ตามการผลิตโปรตีนโดยใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านก็มีข้อเสีย เนื่องจาก *E. coli* ไม่มีกระบวนการ post-translational modification ของโปรตีนเหมือนเซลล์ยูคาริโอต (Walsh, 2000) การขาดหายไปของกระบวนการนี้อาจส่งผลหรือไม่ส่งผลต่อโปรตีนในทางชีวภาพก็ได้ ยิ่งไปกว่านั้นการผลิตโปรตีนจากยูคาริโอตในเซลล์ *E. coli* อาจประสบปัญหาบางประการ ได้แก่

1. Codon usage

ความแตกต่างของโคดอนระหว่างเซลล์โพรคาริโอตและยูคาริโอตมีผลอย่างมากต่อการผลิต heterologous protein โดยยีนที่มีโคดอนแตกต่างจากเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้อาจส่งผลทำให้เกิดการผลิตโปรตีนได้น้อย (Kurland และ Gallant, 1996) และการมีอยู่ของ rare codon ที่มากเกินไปในยีนอาจนำไปสู่กระบวนการแปลรหัสที่ผิดพลาดเนื่องจากไรโบโซมติดอยู่บริเวณตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ต้องจับคู่กับ tRNA ที่มีปริมาณน้อยในเซลล์ ปริมาณของกรดอะมิโนที่มีน้อยใน *E. coli* ส่วนใหญ่คือ อาร์จินีน (AGG, AGA, CGG และ CGA), ลิวซีน (CUA), ไอโซลิวซีน (AUA) และโพรลีน (CCC) ซึ่งส่วนใหญ่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเฟรมในการแปลรหัสและนำไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ (Wu และคณะ, 2004)

2. โครงสร้างทุติยภูมิของอาร์เอ็นเอ (mRNA secondary structure)

ประสิทธิภาพในการแปลรหัสเป็นโปรตีนของ *E. coli* ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของโครงสร้างทุติยภูมิของอาร์เอ็นเอบริเวณ ribosome binding site และโคดอนเริ่มต้น (Seo และคณะ, 2009) การม้วนพับของ mRNA ภายในเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับบริเวณ Shine-Delgarno (SD) sequence และโคดอนเริ่มต้น ถ้าบริเวณนี้มีความเสถียรมากอาจทำให้เกิดการขัดขวางการเข้าไปของไรโบโซมทำให้ไม่สามารถเกิดการเริ่มต้นการแปลรหัส ดังนั้นการมีอยู่ของโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของอาร์เอ็นเอทำให้ประสิทธิภาพในการเริ่มต้นการแปลรหัสลดลง (Spirin และคณะ, 1999)

3. PEST sequence

PEST sequence เป็นลำดับกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของโปรตีน โดยการเหนี่ยวนำให้โปรตีนเกิดการย่อยสลายโดยโปรติเอส (Chen และ Clarke, 2002) ในปี 1986 Roger และคณะได้คัดเลือกโปรตีนที่มีครึ่งชีวิตภายในเซลล์น้อยกว่า 2 ชั่วโมงมาทำการศึกษา ซึ่งพบว่าโปรตีนเหล่านี้ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยลำดับของกรดอะมิโนที่มีโพรลีน (P), กรดกลูตามิก (E), เซอรีน (S) และทรีโอนีน (T) อยู่ด้วยกันใน

ปริมาณมากกว่า 1 หรือ 2 ตำแหน่ง และในบริเวณนี้จะขนานข้างด้วยกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเป็นส่วนใหญ่ ตำแหน่งของ PEST sequence ในโปรตีนสามารถทำนายได้โดยใช้โปรแกรม PEST-find ซึ่งโปรแกรมนี้จะแสดงผลออกมาเป็นลำดับกรดอะมิโนและคะแนนที่อยู่ระหว่าง -50 ถึง +50 โดยทำนายมาแล้วถ้าคะแนนมีค่ามากกว่า 0 ถือว่ามีความเป็นไปได้ที่ลำดับกรดอะมิโนที่ทำนายมีคุณสมบัติเป็น PEST sequence และถ้าคะแนนมากกว่า +5 ลำดับกรดอะมิโนนั้นยังมีความน่าจะเป็น PEST sequence ที่จะกระตุ้นให้โปรตีนนี้ถูกทำลายหรือมีเวลาครึ่งชีวิตที่สั้น อย่างไรก็ตาม PEST sequence ไม่ใช่ปัจจัยหลักเพียงอย่างเดียวที่ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์อย่างรวดเร็วต้องใช้ประกอบกับปัจจัยอื่นๆ เช่น ขนาดของโปรตีน โดยโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าถูกย่อยสลายได้เร็วกว่า, ประจุของโปรตีน โดยโปรตีนที่มีประจุลบถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าโปรตีนที่มีประจุบวก เป็นต้น

ชนิดของเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SFR2

1. BL21(DE3) *plysS*

BL21(DE3) *plysS* จัดเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิตโปรตีนใน *E. coli* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ T7 โดยที่เซลล์ชนิดนี้มียีน T7 bacteriophage I ซึ่งสามารถแปลรหัสให้โปรตีน T7 RNA polymerase ภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ *lac UV5* เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ นอกจากนี้ BL21(DE3) *plysS* มีพลาสมิด *plysS* ซึ่งมียีนที่แปลรหัสให้ T7 lysozyme ซึ่งมีหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนที่สร้าง (leak) ออกมาก่อนการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนด้วย IPTG

2. Origami(DE3)

เซลล์เจ้าบ้านชนิดนี้ดัดแปลงมาจากเซลล์ *E. coli* ชนิด K-12 ซึ่ง Origami มีการมิวเทตยีนสองชนิด คือ *trxB* และ *gor* ซึ่งแปลรหัสให้โปรตีน thioredoxin reductase และ glutathione reductase ซึ่งช่วยให้โปรตีนที่ผลิตใน Origami(DE3) มีการฟอร์มพันธะไดซัลไฟด์ในไซโตพลาสซึม ช่วยให้โปรตีนมีการละลายได้ดีขึ้น เซลล์เจ้าบ้านชนิดนี้เหมาะกับพลาสมิดที่มีความต้านทานต่อแอนติไบโอติกแอมพิซิซิลินและเหมาะกับการใช้กับเวกเตอร์ pET32 นอกจากนี้พลาสมิดที่มียีนมิวเทต *trxB* และ *gor* อยู่มีความต้านทานต่อคานามัยซินและเตตราไซคลิน ตามลำดับ ดังนั้น Origami(DE3) จึงไม่สามารถใช้พลาสมิดที่มีความต้านทานต่อแอนติไบโอติกทั้งสองชนิดนี้ได้

3. Origami B(DE3)

สายพันธุ์ชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ Origami โดยมีการมิวเทตยีน *trxB* และ *gor* นอกจากนี้ยังมีการมิวเทตยีน *lacZY* จาก BL21 ซึ่งช่วยให้การควบคุมระดับการแสดงออกของโปรตีนมีประสิทธิภาพมากขึ้น

โดยการควบคุมความเข้มข้นของ IPTG ดังนั้นสายพันธุ์ Origami B จึงมีการผสมผสานคุณสมบัติของเซลล์ *E. coli* หลายสายพันธุ์ ได้แก่ BL21, Tuner™ และ Origami ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้มีการขาดหายไปของยีน *lon* และ *ompT* ซึ่งช่วยให้โปรตีนที่ได้มีความเสถียรมากขึ้น ดังนั้นสายพันธุ์ชนิดนี้เหมาะกับการผลิตโปรตีนโดยใช้เวกเตอร์ pET32 และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG

4. Rosetta-gami(DE3)

เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์นี้ดัดแปลงมาจากสายพันธุ์ Origami โดยโปรตีนที่ได้มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์เนื่องจากการมีเวกเตอร์ไปของยีน *trxB/gor* และยังมีการเพิ่มทีอาร์เอ็นเอที่จดจำโคดอนที่พบได้ยากใน *E. coli* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนที่มีจากยูคาริโอต ได้แก่ทีอาร์เอ็นเอที่จดจำโคดอน AGG, AGA, AUA, CUA, CCC และ GGA

5. ArcticExpress(DE3) RIL

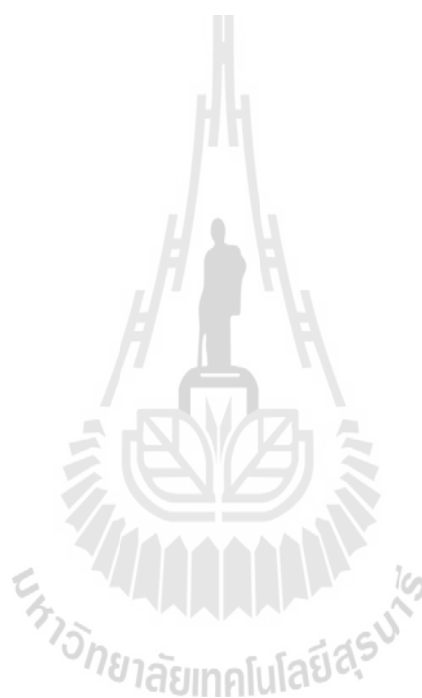
เซลล์เจ้าบ้านชนิดนี้ดัดแปลงมาจากสายพันธุ์ BL21-Gold (Stratagene) โดยที่ ArcticExpress(DE3) RIL มีการใส่พลาสมิดที่มียีนที่แปลรหัสให้ชาไปโรนิน (Chaperonin) 2 ชนิด คือ Cpn60 และ Cpn10 จาก *Oleispira antarctica* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้านทานต่อความเย็น ซึ่งมีส่วนช่วยส่งเสริมให้โปรตีนที่ได้มีการละลายและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้มีการเพิ่มทีอาร์เอ็นเอที่จดจำโคดอนที่พบได้ยากใน *E. coli* ได้แก่ ทีอาร์เอ็นเอที่จดจำโคดอนอาร์จินิน AGA และ AGG, โคดอนไอโซลิวซีน AUA และโคดอนลิวซีน CUA

การผลิตโปรตีนโดยใช้ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

เนื่องจากการผลิตโปรตีนโดยใช้ *E. coli* ซึ่งเป็นเซลล์โพรคาริโอตประสบปัญหาเมื่อนำมาใช้ผลิตโปรตีนจากยูคาริโอต การใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง โดยในการศึกษานี้เลือกใช้ *P. pastoris* ซึ่งยีสต์ชนิดนี้สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (methylotrophic yeast) ข้อดีของ *P. pastoris* คือสามารถเลี้ยงและจัดการได้ง่ายกว่าการเลี้ยง mammalian cells นอกจากนี้ *P. pastoris* ยังสามารถเจริญและให้ปริมาณเซลล์สูง และอีกเหตุผลประการหนึ่งที่สำคัญคือ *P. pastoris* เป็นเซลล์ยูคาริโอต ดังนั้นจึงมีความสามารถที่จะผลิต soluble protein ที่ทำให้เกิดการม้วนพับของโปรตีนลูกผสมที่ถูกต้องกว่าเซลล์ *E. coli* อีกทั้งมีกระบวนการ post-translation modification ทำให้ได้โปรตีนมีการทำหน้าที่ได้อย่างเหมาะสม (Daly และ Hearn, 2005) ระบบการผลิตโปรตีนของ *P. pastoris* เกี่ยวข้องกับการใช้เมทานอลในกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (AOX) เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายเมทานอล โดยการออกซิเดชันเปลี่ยนจากเมทานอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยส่วนหนึ่งของฟอร์มัลดีไฮด์ถูกส่งออกจากเพอร์ออกซิโซม

(peroxisome) ซึ่งต่อมาถูกออกซิไดซ์ไปเป็นฟอเมตและคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส 2 ตัวที่อยู่ในไซโทพลาสซึม ซึ่งพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายเมธานอลมาจาก 2 ปฏิกิริยานี้

ในปัจจุบันนี้มี *P. pastoris* หลายสายพันธุ์ โดยบางสายพันธุ์มีการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้เหมาะแก่การใช้งาน เช่น SMD1168 และ SMD1168H ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ไม่มียีน *pep4* ซึ่งแปลรหัสให้เอนไซม์ peptidase A โดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการกระตุ้น carboxypeptidase Y และ Protease B1 ดังนั้นยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นี้จึงไม่พบการทำงานของโปรติเอส เพื่อให้เหมาะกับโปรตีนที่ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยโปรติเอส อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ทั้งสองก็มีข้อเสียคือ โตช้าและยากแก่การทรานสฟอร์ม (Cereghino และ Cregg, 2000)



บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การโคลนยีน SFR2

2.1.1 การเพิ่มจำนวนยีน SFR2 ด้วยวิธีพีซีอาร์

ซีดีเอ็นเอของ *SFR2* (DDBJ Acession AK119461) ถูกใช้เป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ที่ออกแบบจากซีดีเอ็นเอ AK119461 ซึ่งจับที่ตำแหน่งต่างๆ กันในยีน *SFR2* เพื่อสร้างยีนที่มีขนาดต่างๆ กัน คู่ไพรเมอร์ AK_SFR2_F - 30_SFR2_R, 26_SFR2_F - 30_SFR2_R, 27_SFR2_F - 30_SFR2_R, 28_SFR2 - 30_SFR2_R และ 29_SFR2_F - 30_SFR2_R ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ซึ่งภายหลังใช้ชื่อว่า AK_SFR2, 26_SFR2, 27_SFR2, 28_SFR2 และ 29_SFR2 ตามลำดับ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย ซีดีเอ็นเอแม่แบบความเข้มข้น 10 นาโนกรัม, 1X Taq buffer (Promega), MgCl₂ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTP เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Taq polymerase (Homemade) 1 ไมโครลิตร โดยสภาวะ พีซีอาร์ แสดงในตารางที่ 2.2

สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ที่ทำการตัดปลายทางด้าน 3' ใช้คู่ไพรเมอร์ 4 คู่คือ 26_SFR2_F - 34_mutPEST_SFR2_R, 27_SFR2_F - 34_mutPEST_SFR2_R, 26_SFR2_F - 28_SFR2_R และ 27_SFR2 - 28_SFR2_R โดยให้ชื่อว่า 31_SFR2_delC(mP), 32_SFR2_delC(mP), 33_SFR2_delC และ 34_SFR2_delC ตามลำดับโดยสภาวะพีซีอาร์ที่ใช้แสดงในตารางที่ 2.2

หลังจากชิ้นส่วนของยีน *SFR2* ทั้งหมดถูกเพิ่มจำนวนได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel extraction kit (QIAGEN) แล้วนำโคลนเข้าไปในโคลนนิ่งเวกเตอร์ pENTR-D/TOPO (Invitrogen) โดยแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 µl ของเวกเตอร์ความเข้มข้น 15- 20 นาโนกรัม, Salt solution 1 ไมโครลิตรและผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 20 นาโนกรัมและส่วนผสมทั้งหมดถูกบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* TOP10 โดยวิธีการ heat shock โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของคานามัยซินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดอยู่ หลังจากนั้น pENTR-D/TOPO ที่มีชิ้นส่วนของยีน *SFR2* อยู่ถูกสกัดออกจากเซลล์โดยใช้ plasmid extraction kit (QIAGEN) และนำไปตรวจสอบหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ M13

ชิ้นส่วนของ *SFR2* ที่อยู่ในโคลนนิ่งเวกเตอร์ถูกย้ายไปสู่ pET32a/DEST โดยใช้เอนไซม์ LR clonase โดยแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 µl ของ pENTR-D/TOPO ที่มีชิ้นส่วน *SFR2* ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม, 2 ไมโครลิตรของ pET32a/DEST ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม และเอนไซม์ LR clonase 2 ไมโครลิตรส่วนผสม

ทั้งหมดถูกบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* DH α โดยวิธีการ electroporation โดยเซลล์ *E. coli* ถูก สเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้น pET32a ที่มีชิ้น *SFR2* อยู่ถูกสกัดออกมาจากเซลล์โดยใช้ plasmid extraction kit (QIAGEN)

2.1.2 การโคลนยีน *SFR2* เข้าเวกเตอร์ pCold I

ซีดีเอ็นเอของยีน *SFR2* แบบปกติและแบบที่มีการมีวเทต PEST sequence ถูกโคลนเข้าไปในเอ็กเพรสชันเวกเตอร์ pCold I โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตัวคือ *KpnI* และ *SalI* และใช้ไพรเมอร์ 37_SFR2_KpnI_F และ 32_SFR2_SalI_R สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ทั้งสองแบบโดยใช้ 26_SFR2 และ 26_mutPEST_SFR2 (จากหัวข้อที่ 2.2) เป็นแม่แบบ โดยตั้งชื่อให้ภายหลังว่า 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย TOPO_26_SFR2 และ TOPO_26_mutPEST_SFR2 ซึ่งใช้เป็นแม่แบบความเข้มข้น 10 นาโนกรัม, 1X Taq buffer (Promega), MgCl₂ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTP เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Taq polymerase (Homemade) 1 ไมโครลิตร สภาวะพีซีอาร์ประกอบด้วย Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 2 นาที Denature 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ถูกนำมาผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel extraction kit (QIAGEN) แล้วถูกโคลนเข้าไปในโคลนนิ่งเวกเตอร์ pGEM-T easy ในปฏิกิริยาไลเกชันประกอบด้วยเวกเตอร์ pGEM-T easy ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม, ชิ้นส่วนยีน *SFR2* ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม, 1X ligation buffer และเอนไซม์ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร ส่วนผสมทั้งหมดถูกบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและ ทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* DH5 α โดยวิธีการ electroporation โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, X-Gal และ IPTG หลังจากนั้น pGEM-T easy ที่มีชิ้น *SFR2* อยู่ถูกสกัดออกมาจากเซลล์โดยใช้ plasmid extraction kit (QIAGEN) และตั้งชื่อว่า pGEM_37_SFR2 และ pGEM_37_mutPEST_SFR2 เวกเตอร์ pCold I, pGEM_37_SFR2 และ pGEM_37_mutPEST_SFR2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนั้นตัดด้วย *SalI* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel extraction kit (QIAGEN) หลังจากนั้นเวกเตอร์ pCold I ที่เป็นเส้นตรงและชิ้นส่วนยีน 37_SFR2 หรือ 37_mutPEST_SFR2 ถูกเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (NEB) ที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* DH5 α โดยวิธีการ electroporation โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้น pCold I ที่มีชิ้น *SFR2* อยู่ถูกสกัดออกมาจากเซลล์โดยใช้ plasmid extraction kit (QIAGEN)

2.1.3 การโคลนยีน 26_SFR2_syn เข้าเวกเตอร์ pPICZ α BNH8 และ pET32a

ยีน 26_SFR2_syn เป็นยีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อให้โคดอนที่อยู่ภายในยีนมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนโดยใช้ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ยีน 26_SFR2_syn ถูกทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธีการพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 26_SFR2_Syn_F และ 30_SFR2_Syn_R โดยใช้สภาวะพีซีอาร์ดังนี้ ขั้นที่ 1 Initial denature 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, ขั้นที่ 2 พีซีอาร์ 35 รอบ (Denature 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที), ขั้นที่ 3 Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel extraction kit (QIAGEN) และโคลนเข้าไปในโคลนนิ่งเวกเตอร์ pENTR-D/TOPO และย้ายชิ้นส่วนยีน 26_SFR2_syn จากเวกเตอร์นี้ไปสู่ pPICZ α BNH8 และ pET32a โดยใช้เอนไซม์ LR clonase โดยแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 ไมโครลิตร ของ pENTR_26_SFR2_syn ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม, 2 ไมโครลิตรของ pET32a/DEST หรือ pPICZ α BNH8 /DEST ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมและเอนไซม์ LR clonase 2 ไมโครลิตร ส่วนผสมทั้งหมดถูกบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* DH α โดยวิธีการ electroporation โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับคัดเลือกพลาสมิด pET32a หรือ ซีไอซินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับคัดเลือกพลาสมิด pPICZ α BNH8 หลังจากนั้น pET26_SFR2_syn และ pPICZ_26_SFR2_syn ถูกสกัดออกมาจากเซลล์โดยใช้ plasmid extraction kit (QIAGEN)



ตารางที่ 2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนและหาลำดับเบสยีน *SFR2*

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')
AK_SFR2_F	CACCATGCCACTACCGCGTTC
26_SFR2_F	CACCGACTTCCGCGCCTTTCC
28_SFR2_F	CACCGTGAGGCTTGTTGTTGATTGT
29_SFR2_F	CACCCCTGGTCTAAAGCTTGTG
30_SFR2_R	GGAGAATAAAAAGTATGAAGGCCGAGG
33_mutPEST_SFR2_F	TGGGCAAGGTTAATGCCTCAGCAACCAACCAACAATTGAAG TGAGTT
34_mutPEST_SFR2_R	GCAAAAATAACTGAGCTCTTCAATTGTTGGGTTGGTTGCTGA GGCATTAAACCTTGCCCA
28_SFR2_R	ACAATCAACAACAAGCCTCAC
37_SFR2_KpnI_F	GCCGGGTACCCTAGCAACAGCGCCTGCGCAT
32_SFR2_SalI_R	GCCGGTCGACGGAGAATAAAAAGTATGAAGGCCGAGG
26_SFR2_Syn_F	CACCGATTTTCAGAGCTTTTCCTTC
30_SFR2_Syn_R	AAGACCTTCATATTTCTTGTTTTCT
pET393_seq_F	GAAAGAGTTCCTCGACGC
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
35_pCold_seq_F	ACGCCATATCGCCGAAAGA
36_pCold_seq_R	CCAAATGGCAGGGATCTTAGATTC
M13_F	GTAAAACGACGGCCAG
M13_pUC_R	CAGGAAACAGCTATGAC

ตารางที่ 2.2 สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *SFR2*

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	คู่ไพรเมอร์	อุณหภูมิแอนนีลิ่ง (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาในการต่อสาย
AK_SFR2	AK_SFR2_F 30_SFR2_R	55	2 นาที
26_SFR2	26_SFR2_F 30_SFR2_R	55	2 นาที
27_SFR2	27_SFR2_F 30_SFR2_R	55	1.5 นาที
28_SFR2	28_SFR2_F 30_SFR2_R	55	1 นาที
29_SFR2	29_SFR2_F 30_SFR2_R	50	30 วินาที
31_SFR2_delC(mP)	26_SFR2_F 34_mutPEST_SFR2_R	58	30 วินาที
32_SFR2_delC(mP)	27_SFR2_F 34_mutPEST_SFR2_R	55	30 วินาที
33_SFR2_delC	26_SFR_F 28_SFR2_R	50	30 วินาที
34_SFR2_delC	27_SFR2_F 28_SFR2_R	50	30 วินาที
หมายเหตุ สภาวะ พีซีอาร์ ทั้งหมดเริ่มที่			
Initial denaturation	94°C เป็นเวลา 2 นาที		1 รอบ
Denature	94°C เป็นเวลา 30 วินาที	}	35 รอบ
Annealing	อุณหภูมิดังในตาราง เป็นเวลา 30 วินาที		
Extension	72°C เวลาแสดงดังตาราง		
Final extension	72°C เป็นเวลา 10 นาที		1 รอบ

2.2 การมีวเขต PEST sequence ภายในยีน *SFR2* โดยวิธีพีซีอาร์มีวตาเจเนซิส

โคดอนที่แปลรหัสเป็นกรดกลูตามิก (E) ที่มีอยู่ภายใน PEST sequence ถูกมีวเขตไปเป็นโคดอนที่แปลรหัสเป็นกลูตามีน (Q) โดยวิธีพีซีอาร์มีวตาเจเนซิส ไพร์เมอร์ 2 คู่ถูกใช้เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ซึ่งถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนด้านปลาย 5' และ ปลาย 3' ไพร์เมอร์คู่แรกคือ 26_SFR2_F และ 34_mutPEST_SFR2_R (ตารางที่ 2.1) ใช้เพิ่มจำนวนยีน *SFR2* เฉพาะส่วนปลายด้าน 5' และไพร์เมอร์คู่ที่สองคือ 33_mutPEST_SFR2_F และ 30_SFR2_R (ตารางที่ 2.1) ใช้เพิ่มจำนวนยีน *SFR2* เฉพาะส่วนปลายด้าน 3' ซึ่งไพร์เมอร์ 33_mutPEST_SFR2_F และ 34_mutPEST_SFR2_R ถูกออกแบบมาให้เป็นคู่สมซึ่งกันและกันและมีการมีวเขตโคดอนของกรดกลูตามิกอยู่ที่ไพร์เมอร์นี้ สภาวะของ พีซีอาร์ ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ทั้ง 2 ส่วนแสดงดังตารางที่ 2.2 และยีน *SFR2* ทั้งสองส่วนถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel extraction kit (QIAGEN) หลังจากนั้นทั้งสองส่วนถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบเพื่อสร้างยีน *SFR2* สายเต็มที่มีการมีวเขตโคดอนของกรดกลูตามิกไปเป็นกลูตามีนโดยใช้พีซีอาร์สองขั้นตอน และใช้ไพร์เมอร์ 26_SFR2_F และ 30_SFR2_R ในปฏิกิริยาประกอบด้วยชิ้นส่วนของยีน *SFR2* ทั้งสองส่วนความเข้มข้น 10 นาโนกรัมเพื่อใช้เป็นแม่แบบ, 1X Taq buffer (Promega), MgCl₂ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTP เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, ไพร์เมอร์เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Taq polymerase (Homemade) 1 ไมโครลิตร โดยมีสภาวะพีซีอาร์ที่ใช้แสดงในตารางที่ 2.3 พีซีอาร์ในขั้นตอนที่ 1 ใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้ยีน *SFR2* ทั้งสองสายมาเข้าคู่กันบริเวณคู่สมของไพร์เมอร์ที่มีการออกแบบไว้ ส่วนในขั้นตอนที่ 2 ใช้เพื่อให้ไพร์เมอร์ 26_SFR2_F และ 30_SFR2_R ทำการเพิ่มจำนวนยีนให้เต็มสาย

หลังจากทำ พีซีอาร์ แล้วยีน *SFR2* ถูกตรวจสอบบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% และถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel extraction kit (QIAGEN) และตั้งชื่อยีนที่มีการมีวเขตบริเวณ PEST sequence ว่า 26_mutPEST_SFR2 ซึ่งชิ้นส่วน พีซีอาร์ นี้ถูกโคลนเข้าไปใน pENTR-D/TOPO และ pET32a/DEST ตามลำดับดังวิธีการในหัวข้อที่ 2.1.1

ตารางที่ 2.3 สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ที่มีการมีวเขตบริเวณ PEST sequence

ขั้นตอนที่	สภาวะพีซีอาร์	
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	Initial denaturation	94 2 นาที
	Denature	94 30 วินาที
	Annealing	69 10 นาที
	Extension	72 5 นาที
2	Denature	94 30 วินาที
	Annealing	55 30 วินาที
	Extension	72 2 นาที
	Final extension	72 10 นาที

} 20 รอบ

2.3 การแสดงออกของโปรตีน

2.3.1 การแสดงออกของโปรตีน *SFR2* โดยใช้เวกเตอร์ pET32a ใน *E. coli*

พลาสมิด pET ที่มีชิ้นส่วนของยีน *SFR2* ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) *plysS*, Origami(DE3), Origami B(DE3), Rosetta-gami(DE3) โดยวิธีการ electroporation โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแอนติไบโอติกที่เหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้าน หลังจากนั้นเซลล์ที่มีพลาสมิดของแต่ละโคลนอยู่ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอนติไบโอติกแอมพิซิลินที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเซลล์ *E. coli* ประมาณ 200 ไมโครลิตรถูกใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 10 มิลลิลิตร ที่มีแอนติไบโอติกแอมพิซิลิน และเลี้ยง

ต่อไปจนมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ OD_{600} ประมาณ 0.5 - 0.8 จากนั้นเซลล์ถูกนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 มิลลิโมลาร์ และปล่อยให้มีการแสดงออกของโปรตีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังสิ้นสุดกระบวนการแสดงออกของโปรตีน โปรตีนทั้งหมดถูกตรวจสอบโดยใช้ SDS-PAGE และย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250

นอกจากนี้พลาสมิด pET ที่มีชิ้นส่วนของยีน 26_SFR2 และ 26_SFR2_syn ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* ArcticExpress(DE3) RIL โดยวิธีการ heat shock โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินและเจนตามัยซิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ที่มีพลาสมิดของแต่ละโคลนอยู่ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอนติไบโอติกแอมพิซิลินและเจนตามัยซินที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเซลล์ *E. coli* ประมาณ 200 ไมโครลิตร ถูกใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 10 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินและเจนตามัยซิน และเลี้ยงต่อไปจนมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ OD_{600} ประมาณ 0.5 - 0.8 จากนั้นเซลล์ถูกนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ และปล่อยให้มีการแสดงออกของโปรตีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังสิ้นสุดกระบวนการแสดงออกของโปรตีน โปรตีนทั้งหมดถูกตรวจสอบโดยใช้ SDS-PAGE และย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250

2.3.2 การแสดงออกของโปรตีน SFR2 โดยใช้เวกเตอร์ pCold I ใน *E. coli*

พลาสมิด pCold_37_SFR2 และ pCold_37_mutPEST_SFR2 ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) *plysS*, Origami(DE3), Origami B(DE3), Rosetta-gami(DE3) โดยวิธีการ electroporation โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแอนติไบโอติกที่เหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้าน หลังจากนั้นเซลล์ที่มีพลาสมิดของแต่ละโคลนอยู่ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอนติไบโอติกที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเซลล์ *E. coli* ประมาณ 200 ไมโครลิตร ถูกใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 10 มิลลิลิตร ที่มีแอนติไบโอติก และเลี้ยงต่อไปจนมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ OD_{600} ประมาณ 0.5 - 0.8 จากนั้นเซลล์ถูกนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีและใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 มิลลิโมลาร์ และปล่อยให้มีการแสดงออกของโปรตีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังสิ้นสุดกระบวนการแสดงออกของโปรตีน โปรตีนทั้งหมดถูกตรวจสอบโดยใช้ SDS-PAGE และย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250

2.3.3 การแสดงออกของโปรตีน 26_SFR2_syn โดยใช้เวกเตอร์ pPICZQBNH8 ใน *P. pastoris*

พลาสมิด pPICZ_26_SFR2_syn ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้พลาสมิดที่ได้กลายเป็นเส้นตรง จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าไปใน *P. pastoris* SMD1168H โดยวิธีการ electroporation ที่ 1500 โวลต์ เซลล์ทั้งหมดถูกสเปรดบนอาหารแข็ง YPD ที่มีซีโอสินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โคลนินี้ที่ได้ถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว BMGY 50 มิลลิลิตร ที่ 28 องศาเซลเซียส, 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่เมทานอล 3% ทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง เซลล์และส่วนใสที่ได้ถูกแยกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้ถูกละลายในบัฟเฟอร์ (โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.4, PMSF เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และกลีเซอรอลเข้มข้น 5%) 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้เม็ดแก้ว (glass beads) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ปั่นแยกเซลล์และเม็ดแก้วออกจากกันที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใส และโหลดลงบน SDS-PAGE เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกในตอนต้น

2.4 การตรวจสอบโปรตีน

2.4.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

2.4.1.1 การเตรียมแอนติเจน

พลาสมิด pET28_SFR2 ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีน SFR2 ที่สามารถผลิตได้ใน *E. coli* ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* Origami(DE3) โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินและเตตราไซคลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นเซลล์ที่มีพลาสมิดของแต่ละโคลนอยู่ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอนติไบโอติกที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเซลล์ *E. coli* ประมาณ 200 ไมโครลิตร ถูกใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 10 มิลลิลิตร ที่มีแอนติไบโอติกและเลี้ยงต่อไปจนมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ OD₆₀₀ ประมาณ 0.5 - 0.8 จากนั้นเซลล์ถูกนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 มิลลิโมลาร์ และปล่อยให้มีการแสดงออกของโปรตีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเซลล์ถูกเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เซลล์ถูกละลายด้วยบัฟเฟอร์ (Tris-HCl pH 7.0) ที่มี 0.5 มิลลิโมลาร์ PMSF อยู่และทำให้เซลล์แตกโดยวิธีการ Sonication หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำและ

ไม่ละลายน้ำออกจากกัน ละลายโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายน้ำด้วยบัฟเฟอร์ (Tris-HCl pH 7.0) จากนั้นโปรตีนทั้งสองส่วนถูกนำมาตรวจสอบโดยใช้ SDS-PAGE

แบนของโปรตีนถูกผสม 28_SFR2 ที่อยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำถูกตัดออกมาจากเจลโพลีอะครีลาไมด์ และถูกนำไปแช่ในบัฟเฟอร์ (Tris-HCl, pH 7.0 เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ SDS เข้มข้น 0.1%) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นกำจัด SDS และโซเดียมคลอไรด์โดยวิธีการไดอะไลซิสกับบัฟเฟอร์ (Tris-HCl pH 7.0) สารละลายที่เหลืออยู่ในถุงไดอะไลซิสถูกนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีเบรดฟอร์ด (1976) และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการนำไปผลิตแอนติเซรัม

2.4.1.2 การผลิตแอนติเซรัม

แอนติเซรัมถูกผลิตในกระต่ายขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ 2 ตัว โดยช่วงเวลาในการกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนแสดงดังตารางที่ 2.4 กระต่ายแต่ละตัวถูกฉีดสารละลายโปรตีนที่บริเวณใต้ผิวหนัง (subcutaneously) ที่หลัง 4 จุด หลังจากนั้นเซรัมที่ได้จากเลือดในวันสุดท้ายถูกนำมาทดสอบความจำเพาะเจาะจงโดยวิธีอีไลซ่า (ELISA)

ตารางที่ 2.4 การกระตุ้นแอนติเจนและการผลิตแอนติเซรัม

วัน	กิจกรรม
0	เก็บเลือดก่อนการกระตุ้นและกระตุ้นด้วยแอนติเจนความเข้มข้น 100 - 200 ไมโครกรัม/กระต่าย 1 ตัว (แอนติเจนอยู่ใน Complete Freund's Adjuvant (CFA))
14	กระตุ้นด้วยแอนติเจนความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม/กระต่าย 1 ตัว (แอนติเจนอยู่ใน Incomplete Freund's Adjuvant (IFA))
28	กระตุ้นด้วยแอนติเจนความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม/กระต่าย 1 ตัว (แอนติเจนอยู่ใน Incomplete Freund's Adjuvant (IFA))
35	นำเซรัมมาทดสอบด้วยวิธีอีไลซ่า
42	กระตุ้นด้วยแอนติเจนความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม/กระต่าย 1 ตัว (แอนติเจนอยู่ใน Incomplete Freund's Adjuvant (IFA))
49	นำเซรัมมาทดสอบด้วยวิธีอีไลซ่า
52	เก็บเลือดครั้งสุดท้าย

แอนติเซรัมที่ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบโปรตีน SFR2 โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต (western blot) ดังนั้นก่อนนำมาใช้จึงผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยการเอาส่วนของโปรตีนฟิวชั่นไทโอรีดอกซิน (thioredoxin fusion tag) ออก เวกเตอร์เปล่า pET32a ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน Origami(DE3) และให้มีการแสดงออกของโปรตีนฟิวชั่นไทโอรีดอกซิน จากนั้นเก็บโปรตีนเฉพาะส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ใส่แอนติเซรัม 20 μ l ลงในไทโอรีดอกซินและโปรตีน *E. coli* 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ส่วนของแอนติเซรัม SFR2 ถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีและเก็บเฉพาะส่วนใสมาใช้ในการตรวจสอบโปรตีนโดยเวสเทิร์นบลอต

2.4.2 การตรวจสอบโปรตีนโดยเวสเทิร์นบลอต

โปรตีน SFR2 ถูกผลิตใน Origami(DE3) และโหลดโปรตีนทั้งหมดในเจลโพลีอะคริลาไมด์ จากนั้นโปรตีนบนเจลถูกส่งผ่านไปที่เมมเบรน PVDF โดยใช้ Semi-Phor (Hofer Science) ที่ 400 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมมเบรนถูกบล็อกด้วย BSA เข้มข้น 3% ใน PBST (Tween-20 เข้มข้น 0.05%) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่แอนติเซรัม SFR2 (ที่ได้จาก 2.4.1) 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 – 3 ชั่วโมงและล้างเมมเบรนด้วย PBST 3 ครั้ง และใส่ Secondary antibody (anti-rabbit IgG) ที่เจือจางลง 1:20,000 ใน PBST ลงในเมมเบรน ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง เมมเบรนถูกล้างด้วย PBST 3 ครั้ง และใส่สับสเตรท (NBT/BCIP) 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้เกิดสี เมมเบรนถูกล้างด้วยน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยาและทิ้งไว้ให้แห้ง สังเกตการเกิดสี

2.5 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยนอร์เทิร์นบลอต (Northern blot)

โปรตีน SFR2 ถูกผลิตใน Origami(DE3) และอาร์เอ็นเอถูกสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RNeasy Mini Kit (QIAGEN) โดยทำตามขั้นตอนของบริษัท อาร์เอ็นเอทั้งหมด 20 ไมโครกรัม ถูกโหลดบนเจลอะกาโรส-ฟอรั่มอลดีไฮด์ความเข้มข้น 1% โดยใช้ 1X FA เป็นบัฟเฟอร์ (MOPS เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, โซเดียมอะซิเตต เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และ EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์) ที่ 50 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและล้างเจลด้วย 20X SSC 2 ครั้งเพื่อกำจัดฟอรั่มอลดีไฮด์ หลังจากนั้นทำการส่งผ่านอาร์เอ็นเอไปที่แผ่นไนลอนเมมเบรนโดยใช้วิธี capillary transfer (Streit และคณะ, 2008)

ในกระบวนการเตรียมโพรบ (probe) ซีดีเอ็นเอของยีน 28_SFR2 และ 34_SFR2_delC ถูกใช้เป็นแม่แบบเพื่อใช้ในการสังเคราะห์โพรบซึ่งทำตามขั้นตอนที่แนบมากับชุดคิท (DIG High Prime DNA labeling and Detection Starter Kit I (Roche)) โดยโพรบ 28_SFR2 และ 34_SFR2_delC ใช้สำหรับติดตามอาร์เอ็นเอในส่วนด้านปลาย 5' และ 3' ตามลำดับ การสังเคราะห์โพรบเริ่มจากการเพิ่มจำนวนยีน 28_SFR2 และ 34_SFR2_delC ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำยีน 28_SFR2 และ 34_SFR2_delC ความเข้มข้น 100

นาโนกรัมใส่น้ำเพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 8 μ l และทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยการต้มเป็นเวลา 10 นาทีและทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว เมื่อตัวอย่างเย็นแล้วใส่ Dig-High Prime 2 ไมโครลิตร จากนั้นปฏิกิริยาถูกบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ซึ่งโพรบที่สังเคราะห์ได้พร้อมสำหรับใช้ในกระบวนการไฮบริดเซชัน

ในกระบวนการไฮบริดเซชันเริ่มจากการพรีไฮบริดรีแมมเบรนและ DIG easy hyb ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ส่วนโพรบที่เตรียมไว้ถูกทำให้เสียสภาพโดยการต้มเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โพรบ 10 ไมโครลิตรถูกใส่ลงใน DIG easy hyb 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและใส่ลงในหลอดที่มีแมมเบรนอยู่ จากนั้นนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

หลังจากผ่านกระบวนการไฮบริดเซชัน ล้างแมมเบรนด้วย 2X SSC ที่มี SDS เข้มข้น 0.1% 2 ครั้ง ที่ 25 องศาเซลเซียส ตามด้วย 0.5X SSC ที่มี SDS เข้มข้น 0.1% 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ที่ 60 องศาเซลเซียส แมมเบรนถูกนำออกมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและล้างแมมเบรนด้วย 1X washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที จากนั้นอาร์เอ็นเอบนแมมเบรนถูกบล็อกด้วย 1X blocking solution เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำแมมเบรนไปแช่ในสารละลายที่มีแอนติบอดีผสมอยู่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแมมเบรนด้วย 1X washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ขั้นตอนสุดท้ายใส่ 1X color substrate solution และปล่อยให้มีการเกิดสีที่มีคเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและล้างแมมเบรนด้วยน้ำ MQ เพื่อหยุดปฏิกิริยา สังเกตการเกิดสี

2.6 การติดตามตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์

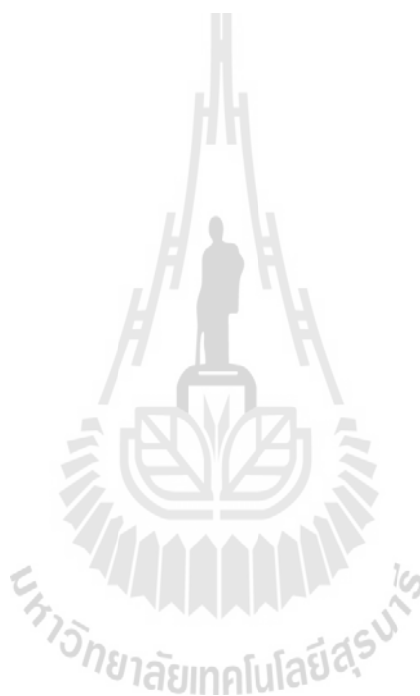
เวกเตอร์ pMDC43, pMDC83 และ pMDC140 เป็นเวกเตอร์ที่ใช้เพื่อศึกษาคำแหน่งของโปรตีน SFR2 ในเซลล์หัวหอม (*Allium cepa* L.) และเซลล์สาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle) ซึ่งเวกเตอร์ pMDC43 และ pMDC83 มีโปรตีนติดตาม GFP ที่ทั้งด้านปลาย N และ ปลาย C ส่วน pMDC140 มีโปรตีนติดตาม GUS ทางด้านปลาย C โดยพลาสมิดที่ได้สามารถทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์พืชด้วยวิธีการบอมบาร์ดเมน (Bombardment)

ไพรเมอร์ SFR2B1_f และ SFR2B2_r ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนยีน SFR2 ผ่านการทำหีบรีซูทซ์และโคลนเข้าไปในเวกเตอร์ pDONR/Zeo (Invitrogen) ซึ่งเป็นเวกเตอร์ตัวให้ (entry clone) โดยใช้เอนไซม์ BP clonase เนื่องจากที่ปลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้นั้นมีส่วนของ attB อยู่ จากนั้นทำการส่งผ่านชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปสู่เวกเตอร์ตัวรับ (destination vector) pMDC43, pMDC83 และ pMDC140 โดยใช้เอนไซม์ LR clonase นำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับเบสบริเวณจุดเชื่อมระหว่างยีน SFR2 และพลาสมิด

ในกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อหัวหอม หัวหอมถูกนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้งและแช่ลงในสารละลายไฮเปอร์คลอไรด์เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 2 ครั้ง จากนั้นแช่ลงในเอทานอลเข้มข้น

70% อีก 5 นาที เปลือกหัวหอมถูกล้างอีก 2 ครั้งด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากผ่านขั้นตอนการล้างทั้งหมดแล้วหัวหอมถูกตัดออกเป็นหนึ่งส่วนสี่และสไลด์ออกตามแนวยาว และส่วนเปลือกเอพิเดอมิสถูกวางบนอาหารแข็ง MS ในการเตรียมสาหร่ายหางกระรอก เริ่มจากตัดใบของสาหร่ายให้มีขนาด 0.2 x 2 ตารางเซนติเมตร และล้างด้วยน้ำสะอาด 5 ครั้ง ลอกใบให้เป็นเนื้อเยื่อต่างๆแล้ววางใบบนวุ้นความเข้มข้น 2%

พลาสติกทั้งสามที่ถูกสร้างไว้แล้วถูกยิงเข้าไปในเนื้อเยื่อหัวหอมและใบสาหร่ายหางกระรอกด้วยวิธีบอมบาร์ดเมนต์ (PDA-1000/He, Bio-Rad) ที่ 1,100 psi ต่อการยิง 1 ครั้ง ที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร หลังจากนั้นบ่มเนื้อเยื่อที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในที่มืด แล้วทำการตรวจสอบตำแหน่งของโปรตีนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนเพื่อติดตาม GFP หรือการตรวจสอบโปรตีน GUS



บทที่ 3

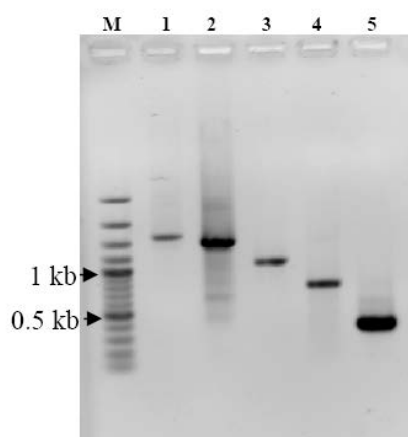
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การโคลนนิ่ง

3.1.1 การโคลนชิ้นส่วนยีน *SFR2* เข้าเวกเตอร์ pET32a

3.1.1.1 การโคลนยีน *SFR2* ที่ทำการตัดปลายทางด้าน 5'

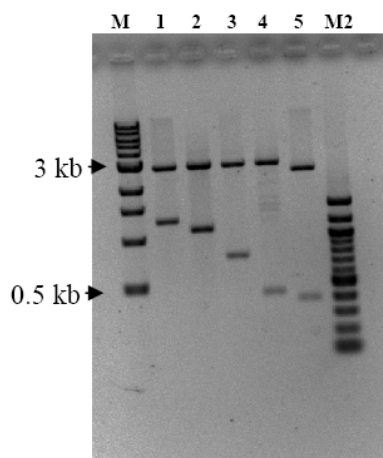
ไพรเมอร์ 5 คู่ถูกใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *SFR2* ที่ตำแหน่งต่างๆ กัน ได้แก่ AK_SFR2, 26_SFR2, 27_SFR2, 28_SFR2 และ 29_SFR2 ซึ่งมีขนาด 1.6 kb, 1.4 kb, 1.1 kb, 780 bp, 360 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) โดยชิ้นส่วน AK_SFR2, 26_SFR2 และ 27_SFR2 มีส่วนของแอกทิฟไซต์ที่ถูกอนุรักษ์ไว้คือ TFNEP และ I/VTENG (Thorlby และคณะ, 2004) และส่วน PEST sequence ชิ้นส่วนยีน 28_SFR2 มีส่วนของแอกทิฟไซต์ที่ถูกอนุรักษ์ แต่ไม่มีส่วนของ PEST sequence ชิ้นส่วนยีน 29_SFR2 มีส่วนของแอกทิฟไซต์ที่ถูกอนุรักษ์ 1 ตำแหน่งคือ I/VTENG แต่ไม่มีส่วนของ PEST sequence



รูปที่ 3.1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพื่อใช้ในการโคลนยีน เลขที่ 1: AK_SFR2, เลขที่ 2: 26_SFR2, เลขที่ 3: 27_SFR2, เลขที่ 4: 28_SFR2, เลขที่ 5: 29_SFR2 และ เลข M: 100 bp marker

หลังจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกทำให้บริสุทธิ์ได้ถูกโคลนเข้าไปใน pENTR-D/TOPO และทรานสฟอร์มเข้าไปใน *E. coli* TOP10 พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการอยู่ถูกสกัดออกมาโดยใช้ Plasmid extraction kit (QIAGEN) หลังจากนั้นทำการตัดพลาสมิด TOPO_AK_SFR2, TOPO_26_SFR2, TOPO27_SFR2 และ

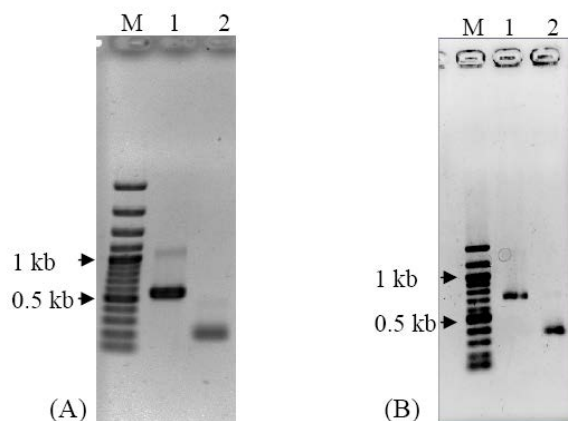
TOPO_28_SFR2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตัวคือ *NotI* และ *HindIII* ยกเว้น TOPO_29_SFR2 ทำการตัดด้วย *NotI* และ *AscI* ซึ่งทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นที่มีขนาดแตกต่างกัน ได้แก่ 2936/1273 bp, 2927/1117 bp, 2924/820 bp, 2936/424 bp และ 2580/360 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.2) จากนั้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ใน pENTR-D/TOPO ถูกย้ายเข้าไปใน pET32a/DEST โดยใช้เอนไซม์ LR clonase และทำโคลนนิ่งพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการและทำการหาลำดับสารพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ M13



รูปที่ 3.2 พลาสมิด pENTR-D/TOPO ที่มีชิ้นส่วนของยีน SFR2 อยู่ ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *HindIII* (เลนที่ 1-4) และ *NotI* และ *AscI* (เลนที่ 5) เลนที่ 1: TOPO_AK_SFR2, เลนที่ 2: TOPO_26_SFR2, เลนที่ 3: TOPO_27_SFR2, เลนที่ 4: TOPO_28_SFR2, เลนที่ 5: TOPO_29_SFR2 เลน M: 1 bp marker และ เลน M2: 100 bp marker

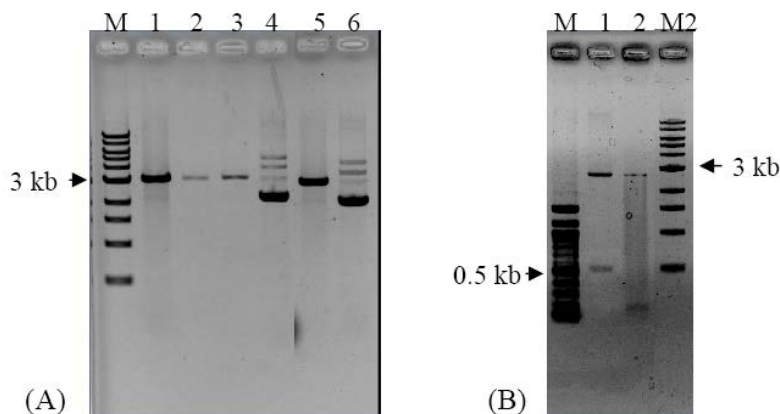
3.1.1.2 การโคลนยีน *SFR2* ที่ทำการตัดปลายทางด้าน 3'

ไพรเมอร์ 4 คู่ถูกใช้เพื่อเพิ่มจำนวนซีดีเอ็นเอทางด้านปลาย 5' ที่ตำแหน่งต่างๆกันซึ่งมีทั้งหมด 4 ชิ้น ได้แก่ 31_SFR2_delC(mP), 32_SFR2_delC(mP), 33_SFR2_delC and 34_SFR2_delC โดย 31_SFR2_delC(mP), 32_SFR2_delC(mP) มีการมีวเขตของ PEST sequence บริเวณปลายด้าน 3' ซึ่งมีขนาด 552 bp, 165 bp, 714 bp และ 357 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 ผลิตกัณฑ์พีซีอาร์เพื่อใช้ในการโคลนยีน (A) เลนที่ 1: 31_SFR2_delC(mP), เลนที่ 2: 32_SFR2_delC(mP) (B) เลนที่ 1: 33_SFR2_delC, เลนที่ 2: 34_SFR2_delC และ เลน M: 100 bp marker

หลังจากผลิตกัณฑ์พีซีอาร์ถูกทำให้บริสุทธิ์ได้ถูกโคลนเข้าไปใน pENTR-D/TOPO และทรานสฟอร์มเข้าไปใน *E. coli* TOP10 พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการอยู่ถูกสกัดออกมาโดยใช้ Plasmid extraction kit (QIAGEN) หลังจากนั้นทำการตัดพลาสมิด TOPO_31_SFR2_delC(mP) และ TOPO_32_SFR2_delC(mP) ด้วย *Pst*I เพื่อทำให้พลาสมิดมีลักษณะเป็นเส้นตรงซึ่งมีขนาดที่ต้องการคือ 3102 bp และ 2745 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.4A) ส่วน TOPO_33_SFR2_delC และ TOPO_34_SFR2_delC ตัดด้วย *Nco*I และ *Sac*I ซึ่งมีขนาด 2765/529 bp และ 2765/172 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.4B) จากผลการทดลองสรุปได้ว่ายีน *SFR2* ถูกโคลนเข้าไปใน pENTR-D/TOPO ได้ จากนั้นจึงนำพลาสมิดที่ได้ย้ายไปสู่เอ็กเพรสชันเวกเตอร์ pET32a



รูปที่ 3.4 พลาสมิด pENTR-D/TOPO ที่มีชิ้นส่วนของยีน *SFR2* อยู่ ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* (รูป A) และ *NcoI* และ *SacI* (รูป B) (A) เลนที่ 1-3: TOPO_31_SFR2_delC(mP) ที่ตัดด้วย *PstI*, เลนที่ 4: TOPO_31_SFR2_delC(mP) ที่ไม่ได้ตัดด้วย *PstI*, เลนที่ 5: TOPO_31_SFR2_delC(mP) ที่ตัดด้วย *PstI*, เลนที่ 6: TOPO_31_SFR2_delC(mP) ที่ไม่ได้ตัดด้วย *PstI* และ เลน M: 1 kb marker (B) เลนที่ 1: TOPO_33_SFR2_delC ที่ตัดด้วย *NcoI* และ *SacI*, เลนที่ 2: TOPO_34_SFR2_delC ที่ตัดด้วย *NcoI* และ *SacI*, เลน M: 100 bp marker และ เลน M2: 1 kb marker

3.1.1.3 การโคลน 26_mutPEST_SFR2

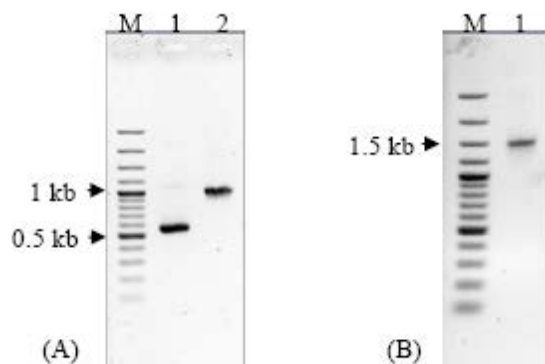
3.1.1.3.1 คุณสมบัติของ PEST sequence ที่พบในโปรตีน SFR2

PEST sequence ที่พบใน SFR2 ถูกทำนายโดยใช้โปรแกรม PESTfind ซึ่งพบบริเวณที่มีกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) รวมตัวกันอยู่ โดยมีคะแนนของ PEST sequence +5.01 ซึ่งถือว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเป็น PEST sequence ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุ 5 ตัว (อาร์จินีน 1 ตัว และกรดกลูตามิก 4 ตัว) กรดอะมิโนที่มีขั้ว 1 ตัว (ทรีโอนีน) และกรดอะมิโนไม่มีขั้ว 5 ตัว (ลิวซีน 2 ตัว เมทไทโอนีน 1 ตัว และโพรลีน 2 ตัว) นอกจากนี้ PEST sequence ที่พบในโปรตีน SFR2 มีค่าดัชนีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity index) 35.57 ซึ่งถือว่ามีความน้อยอาจทำให้บริเวณนี้สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยโปรติเอส (Chen และคณะ, 2002)

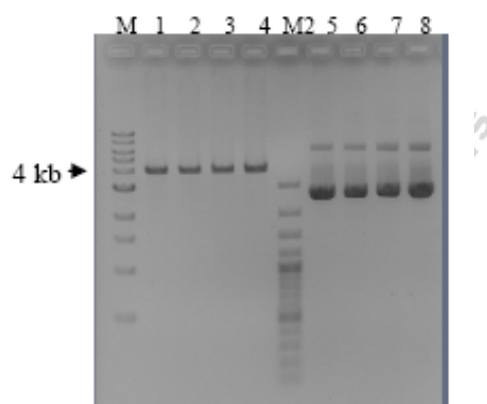
3.1.1.3.2 การโคลน 26_mutPEST_SFR2

กรดกลูตามิก 4 ตัวที่พบบริเวณ PEST sequence ถูกมิวเตตไปเป็นกลูตามีนโดยวิธีพีซีอาร์มีวตาเจเนซิส หลังจากนั้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ถูกโคลนเข้าไปใน pENTR-D/TOPO และชื่อว่า TOPO_26_mutPEST_SFR2 พลาสมิดที่ได้ถูกตัดด้วย *HindIII* เพื่อทำให้พลาสมิดเป็นเส้นตรงซึ่งมีขนาด 4044 bp (รูปที่ 3.6) เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ากรดกลูตามิกตำแหน่งที่ 220 และ 221 มีการมิวเตต

เปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นกลูตามีนได้ อย่างไรก็ตามพบว่าโคดอนที่แปลรหัสให้กรดกลูตามิกตำแหน่งที่ 224, 225 และ 226 (นับจาก ATG โคดอนเริ่มต้น) หายไปแต่โปรตีนที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเฟรมในการแปลรหัส (รูปที่ 3.7)



รูปที่ 3.5 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำการมีวเทตบริเวณ PEST sequence โดยเปลี่ยนกรดกลูตามิกไปเป็นกลูตามีน (A) เลนที่ 1: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณด้านปลาย 5' ถึงบริเวณ PEST sequence (ชิ้นที่ 1) และ เลนที่ 2: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ PEST sequence ถึงด้านปลาย 3' (ชิ้นที่ 2) (B) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำการมีวเทตบริเวณ PEST sequence สายเดิม 26_mutPEST_SFR2 และเลน M: 100 bp marker



รูปที่ 3.6 เลนที่ 1-4: พลาสมิด TOPO_26mutPEST_SFR2 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*, เลนที่ 5-8: พลาสมิด TOPO_26mutPEST_SFR2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*, เลน M: 1 kb marker และ เลน M2: 100 bp marker

```

AK_SFR2          MPLPAFVAAAARLAVLVAAAATAANAASYARYRRRHLRRI P S P I D E S A D P L A D F R A F P S S 60
26_mutPEST_SFR2 -----DFRAFPSS 8
                    *****

AK_SFR2          DADDSEEDNFFFGLATAPAHVEDRLEDAWLQFATETS C D D N G N V R D Q R P V D A L M A S A A G D 120
26_mutPEST_SFR2 DADDSEEDNFFFGLATAPAHVEDRLEDAWLQFATETS C D D N G N V R D Q R P V D A L M A S A A G D 68
                    *****

AK_SFR2          GGSQQSWRSTGGENIGDREQRKPLRVAMEAMLRGFEILAESGESAGGDNC SHNVA A W H N V 180
26_mutPEST_SFR2 GGSQQSWRSTGGENIGDREQRKPLRVAMEAMLRGFEILAESGESAGGDNC SHNVA A W H N V 128
                    *****

AK_SFR2          PCPQERLRFWSDPDAELKLAKETGISVFRMGVDWARLMPPEPTTEELKSSVNFAALERYRW 240
26_mutPEST_SFR2 PCPQERLRFWSDPDAELKLAKETGISVFRMGVDWARLMPQQPT--KSSVNFAALERYRW 185
                    *****: * *****

AK_SFR2          I I Q R V R E Y G M K V M L T L F H H S L P P W A G K Y G G W K M E K T V T Y F M D F V R L V V D C V S N L V D Y W V I 300
26_mutPEST_SFR2 I I Q R V R E Y G M K V M L T L F H H S L P P W A G K Y G G W K M E K T V T Y F M D F V R L V V D C V S N L V D Y W V I 245
                    *****

AK_SFR2          F N E P H V F V M L T Y C A G A W P G G D P N A I E V A T S T L P T G V Y N Q A L H W M A I A H S E A Y D Y I H S K S K 360
26_mutPEST_SFR2 F N E P H V F V M L T Y C A G A W P G G D P N A I E V A T S T L P T G V Y N Q A L H W M A I A H S E A Y D Y I H S K S K 305
                    *****

AK_SFR2          N E R K P I V G V A H H V S F T R P Y G L F D V A A V A L A N S L T L F P Y V D S I C D K L D F I G I N Y Y G Q E V I S 420
26_mutPEST_SFR2 N E R K P I V G V A H H V S F T R P Y G L F D V A A V A L A N S L T L F P Y V D S I C D K L D F I G I N Y Y G Q E V I S 365
                    *****

AK_SFR2          G P G L K L V D N D E Y S E S G R G V Y P D G L F R I L I Q F N E R Y K R L N I P F V I T E N G V S D E T D L I R K P Y 480
26_mutPEST_SFR2 G P G L K L V D N D E Y S E S G R G V Y P D G L F R I L I Q F N E R Y K R L N I P F V I T E N G V S D E T D L I R K P Y 425
                    *****

AK_SFR2          I L E H L L A T Y A A I I M G V R V L G Y L F W T T S D N W E W A D G Y G P K F G L V A V D R A N N L A R K P R P S Y F 540
26_mutPEST_SFR2 I L E H L L A T Y A A I I M G V R V L G Y L F W T T S D N W E W A D G Y G P K F G L V A V D R A N N L A R K P R P S Y F 485
                    *****

AK_SFR2          LFS 543
26_mutPEST_SFR2 LFS 488
                    ***

```

รูปที่ 3.7 การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนระหว่าง AK_SFR2 และ 26_mutPEST_SFR2 โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 บริเวณ PEST sequence แสดงด้วยแถบสีเทา กรดอะมิโนที่มีการมิวเทตแสดงด้วยตัวอักษรตัวหนา บริเวณลำดับโปรตีนที่มีการอนุรักษ์ไว้ของโปรตีน SFR2 แสดงด้วยการขีดเส้นใต้

3.1.2 การโคลนชิ้นส่วนยีน SFR2 เข้า pCold I

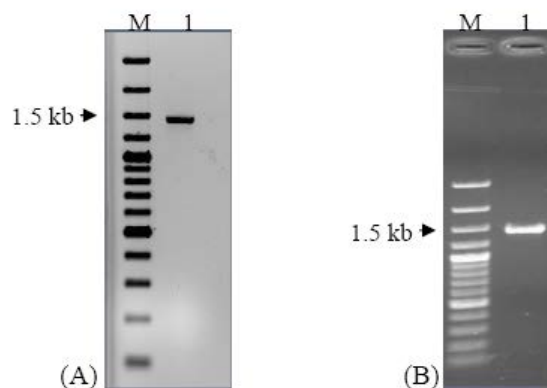
3.1.2.1 การโคลน 37_SFR2

ซีดีเอ็นเอ 37_SFR2 ถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ 37_SFR2_KpnI และ 32_SFR2_SalI_R ซึ่งมีขนาดประมาณ 1410 bp (รูปที่ 3.8A) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกทำให้บริสุทธิ์และตัดด้วยเอนไซม์ 2 ตัวคือ *KpnI* และ *SalI* รวมทั้งเวกเตอร์ pCold I ด้วย หลังจากนั้น 37_SFR2 ถูกโคลนเข้าไปใน pCold I และพลาสมิดที่ได้ตั้งชื่อว่า pCold_37_SFR2 จากนั้นพลาสมิดถูกตัดด้วย *PstI* เพื่อตัดพลาสมิดออกเป็น 2 ชิ้นซึ่งมีขนาด 4691 bp และ 1149 bp (รูปที่ 3.10) เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่พบการมิวเทตหรือการเปลี่ยนแปลง

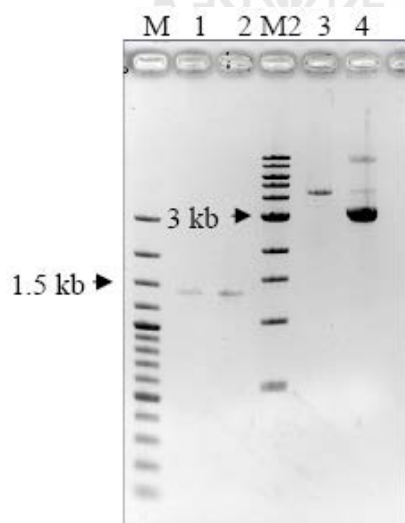
3.1.2.2 การโคลน 37_mutPEST_SFR2

ซีดีเอ็นเอ 37_mutPEST_SFR2 ถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ 37_SFR2_KpnI และ 32_SFR2_SalI_R ซึ่งใช้ TOPO_26_mutPEST_SFR2 เป็นแม่แบบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 1410 bp (รูปที่ 3.8B) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกทำให้

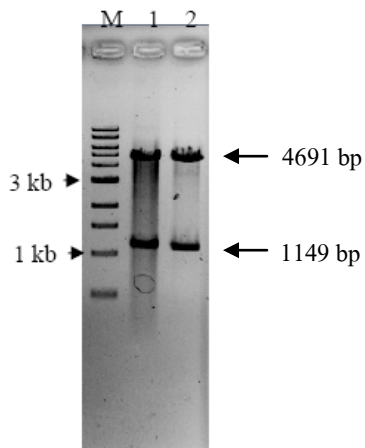
บริสุทธิ์และตัดด้วยเอนไซม์ 2 ตัวคือ *KpnI* และ *SalI* รวมทั้งเวกเตอร์ pCold I ด้วย หลังจากนั้น 37_mutPEST_SFR2 ถูกโคลนเข้าไปใน pCold I และพลาสมิดที่ได้ตั้งชื่อว่า pCold_37_mutPEST_SFR2 จากนั้นพลาสมิดถูกตัดด้วย *PstI* เพื่อตัดพลาสมิดออกเป็น 2 ชิ้นซึ่งมีขนาด 4691 bp และ 1149 bp (รูปที่ 3.10) เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ากรดกลูตามิกที่ตำแหน่ง 220, 221 และ 224 ถูกมิวเทตไปเป็นกลูตามีน ส่วนตำแหน่งที่ 225 ไม่พบการมิวเทต (รูปที่ 3.11)



รูปที่ 3.8 ผลตัดกันซ์พีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (A) 37_SFR2 (B) 37_mutPEST_SFR2 และ เลน M: 100 bp marker



รูปที่ 3.9 ผลตัดกันซ์พีซีอาร์ 37_SFR2, 37_mutPEST_SFR2 และเวกเตอร์ pCold I หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตัว คือ *KpnI* และ *SalI* เลนที่ 1: 37_SFR2, เลนที่ 2: 37_mutPEST_SFR2, เลนที่ 3: pCold I ที่ตัดด้วย *KpnI* และ *SalI*, เลนที่ 4: pCold I ที่ไม่ได้ตัดด้วย *KpnI* และ *SalI*, เลน M: 100 bp marker และ เลน M2: 1 kb marke



รูปที่ 3.10 พลาสมิด pCold_37_SFR2 และ pCold_37_mutPEST_SFR2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I เลนที่ 1: pCold_37_SFR2, เลนที่ 2: pCold_37_mutPEST_SFR2 และ เลน M: 1 kb marker

AK_SFR2	MPLPAFVAAAARLAVLVAAAATAANAASYARYRRRHLRRIPSPIDESADPLADFRAFPSS	60
37_mutPEST_SFR2	-----	
AK_SFR2	DADDSEEDNFFFLATAPAHVEDRLEDAWLQFATETSDDNGNVDRQRPVDALMASAAGD	120
37_mutPEST_SFR2	-----LATAPAHVEDRLEDAWLQFATETSDDNGNVDRQRPVDALMASAAGD	47

AK_SFR2	GGSQQSWRSTGGENIGDREQRKPLRVAMEAMLRGFEILAESGESAGGDNCSHNVAAWHNV	180
37_mutPEST_SFR2	GGSQQSWRSTGGENIGDREQRKPLRVAMEAMLRGFEILAESGESAGGDNCSHNVAAWHNV	107

AK_SFR2	PCPQERLRFWSDPDAELKLAKETGISVFRMGVDWARLMPEEPTTEELKSSVNFAALERYRW	240
37_mutPEST_SFR2	PCPQERLRFWSDPDAELKLAKETGISVFRMGVDWARLMPEEPTTEELKSSVNFAALERYRW	167
	*****:***	
AK_SFR2	IIQRVREYGMKVMLTLFHHS LPPWAGKYGGWKMEKTVTYFMDFVRLVVDVCSNLVDYWVI	300
37_mutPEST_SFR2	IIQRVREYGMKVMLTLFHHS LPPWAGKYGGWKMEKTVTYFMDFVRLVVDVCSNLVDYWVI	227

AK_SFR2	FNEPHVFMVLTTCAGAWPGGDPNAIEVATSTLPTGVYNQALHWMAIAHSEAYDYIHSKSK	360
37_mutPEST_SFR2	FNEPHVFMVLTTCAGAWPGGDPNAIEVATSTLPTGVYNQALHWMAIAHSEAYDYIHSKSK	287

AK_SFR2	NERKPIVGVAAHHVSFTRPYGLFDVAVALANSLTLFPYVDSICDKLDFIGINYYGQEVIS	420
37_mutPEST_SFR2	NERKPIVGVAAHHVSFTRPYGLFDVAVALANSLTLFPYVDSICDKLDFIGINYYGQEVIS	347

AK_SFR2	GPGLKLVNDDEYSESGRGVYDPDGLFRILIQFNERYKRLNIPFVITENGVSDETDLIRKPY	480
37_mutPEST_SFR2	GPGLKLVNDDEYSESGRGVYDPDGLFRILIQFNERYKRLNIPFVITENGVSDETDLIRKPY	407

AK_SFR2	ILEHLLATYAAIIMGVRLGYLFWTTSDNWEWADGYGPKFGLVAVDRANLARKPRPSYF	540
37_mutPEST_SFR2	ILEHLLATYAAIIMGVRLGYLFWTTSDNWEWADGYGPKFGLVAVDRANLARKPRPSYF	467

AK_SFR2	LFS	543
37_mutPEST_SFR2	LFS	470

รูปที่ 3.11 การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนระหว่าง AK_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 บริเวณ PEST sequence แสดงด้วยแถบสีเทา กรดอะมิโนที่มีการมิวเทตแสดงด้วยตัวอักษรตัวหนา บริเวณลำดับโปรตีนที่มีการอนุรักษ์ไว้ของโปรตีน SFR2 แสดงด้วยการขีดเส้นใต้

3.1.3 การโคลนยีน 26_SFR2_syn เข้า pPICZαBNH8

พลาสมิด TOPO_26_SFR2_syn ถูกใช้เป็นเอนทรีโคลนเพื่อส่งผ่านยีน 26_SFR2_syn ไปสู่ pPICZαBNH8 (Luang และคณะ, 2010) โดยใช้ LR clonase พลาสมิดที่ได้ให้ชื่อว่า pPICZ_26_SFR2_syn ทำการสกัดและนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าซีดีเอ็นเอ 26_SFR2_syn ถูกใส่เข้าไปในเฟรมที่ถูกต้องและไม่เกิดการมิวเทต (รูปที่ 3.12) จากนั้น pPICZ_26_SFR2_syn ถูกตัดด้วย *SacI* และ ทรานสฟอร์มเข้าไปใน *P. pastoris* SMD1168H และตรวจสอบโดยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 5' AOX และ 3' AOX ซึ่งพบแบนขนาด 2044 bp และ 500 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีน AOX1 ภายในเซลล์ (รูปที่ 3.13)

```

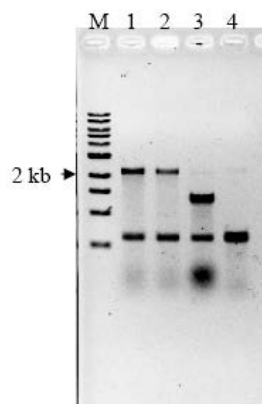
α-factor →
atgagatttccttcaatttttactgctggtttattcgcagcatcctccgcattagctgct
M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A
ccagtcaacactacaacagaagatgaaacggcacaattccggctgaaagctgtcatcgggt
P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G
tactcagatttagaaggggatttccgatggtgctggttttgcattttccaacagcacaaat
Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N
aacgggttattgtttataaataactactattggccagcattgctgctaaagaagaaggggta
N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V

His-tag
tctctcgagaaaagagaggctgaaagctgcacatcaccatcaccatcaccatcaccatgctgca
S L E K R E A E A A H H H H H H H A A

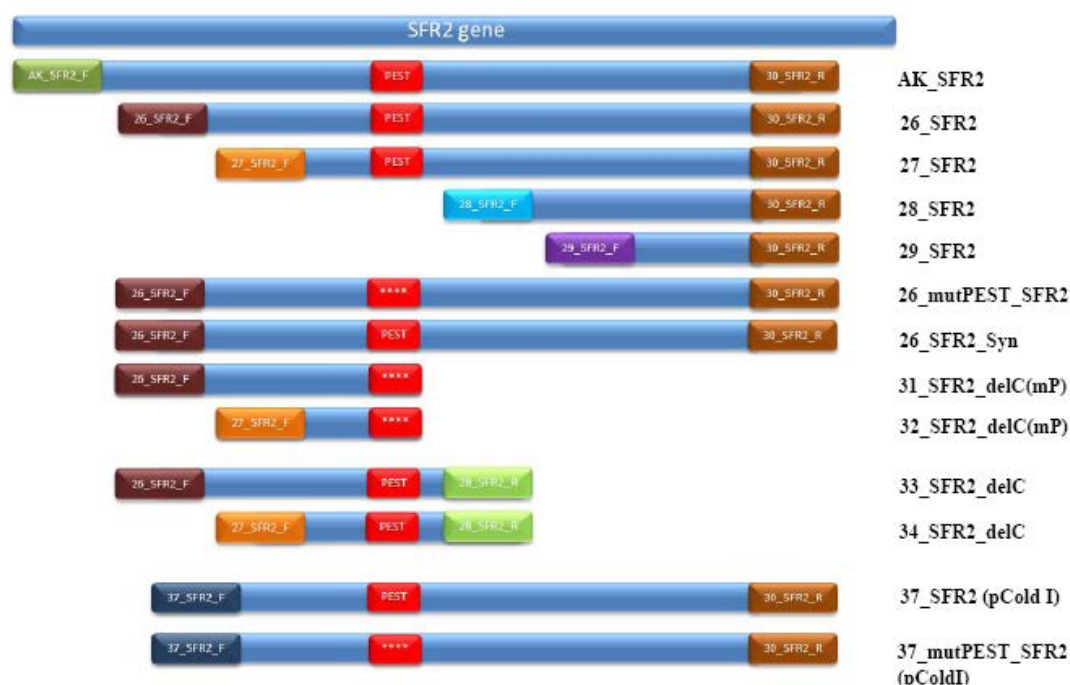
26_SFR2_syn →
gtacatcaaaacaagtttgtacaaaaaagcaggctcccgcgccgcccccttcaaccgatttc
V H Q T S L Y K K A G S A A A P F T D F
agagcttttcccttcttccgacgctgatgactcagaagaggataacttttctttggtttg
R A F P S S D A D D S E E D N F F F G L
gctactgctccagctcacgttgaagacagattggaggatgcttgggttgcaattcgtact
A T A P A H V E D R L E D A W L Q F A T
gaaacatcctgtgatgacaacggtaacgttagagaccagagacctgttgatgctttgatg
E T S C D D N G N V R D Q R P V D A L M
gcttcagctgctggagacgggtggatcccaacagtcattggagatctactggtggagaaaac
A S A A G D G G S Q Q S W R S T G G E N

```

รูปที่ 3.12 ลำดับกรดอะมิโนของพลาสมิด pPICZ_26_SFR2_syn



รูปที่ 3.13 โคลนนิ่งเพื่อตรวจสอบยีน 26_SFR2_syn โดยใช้ไพรเมอร์ 5' AOX และ 3' AOX ใน *P. pastoris* เลนที่ 1 และ 2: ยีน 26_SFR2_syn ภายในเซลล์ยีสต์, เลนที่ 3: ยีน E_K ภายในเซลล์ยีสต์ (positive control) และเลนที่ 4: *P. pastoris* ที่ไม่ได้ทรานสฟอร์มยีน 26_SFR2_syn เข้าไป (negative control)



รูปที่ 3.14 ชิ้นส่วนยีน SFR2 ทั้งหมดที่ใช้ในการโคลนและผลิตโปรตีนในระบบเวกเตอร์ pET32a และ pCold I

3.2 การแสดงออกของโปรตีน

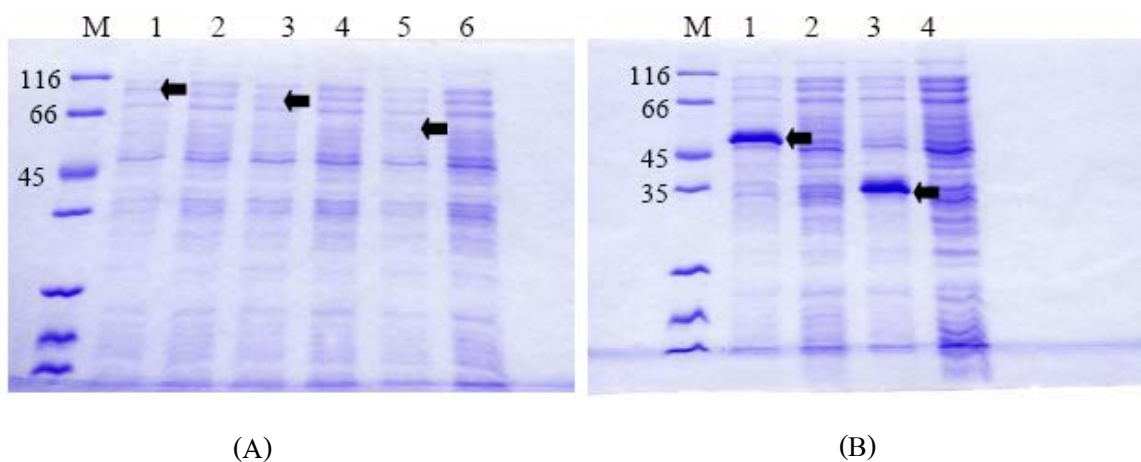
3.2.1 การแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli*

3.2.1.1 การผลิตโปรตีนโดยใช้เวกเตอร์ pET32a

การผลิตโปรตีนทางด้านปลายซี (C-terminal)

พลาสมิด pETAK_SFR2, pET26_SFR2, pET27_SFR2, pET28_SFR2 และ pET29_SFR2 ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน BL21(DE3) *p_{lysS}* และให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 20 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นโปรตีนทั้งหมด (Total protein) ถูกโหลดบน SDS-PAGE ผลการทดลองพบว่าโปรตีนลูกผสม AK_SFR2, 26_SFR2 และ 27_SFR2 ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE เมื่อย้อมสีด้วยโคแมสซึบรู-250 ซึ่งควรมีน้ำหนักโมเลกุล 83 kDa, 78 kDa และ 65 kDa (รวมน้ำหนักโมเลกุลของไทโอรีดอกซิน) ตามลำดับ ในขณะที่โปรตีนลูกผสม 28_SFR2 และ 29_SFR2 พบแบนของโปรตีนลูกผสมบน SDS-PAGE ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 55 kDa และ 40 kDa (รวมน้ำหนักโมเลกุลของไทโอรีดอกซิน) ตามลำดับ (รูปที่ 3.15)

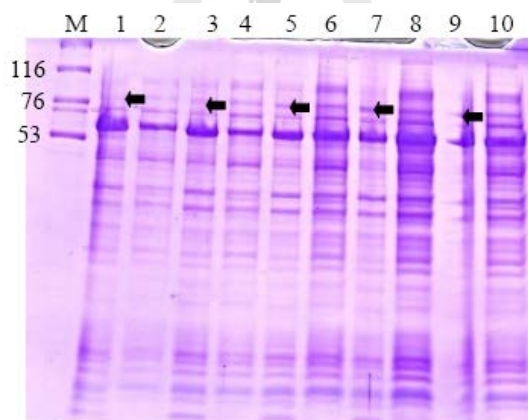
จากผลการทดลองสรุปว่ามีเพียงกรดอะมิโน 260 ตัวทางด้านปลายซี (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 284-544) สามารถผลิตโปรตีนใน *E. coli* โดยการใช้ระบบของเวกเตอร์ pET32a อย่างไม่ก็ตามโปรตีนลูกผสมทั้งสองตัวอยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ



รูปที่ 3.15 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม SFR2 บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) *p_{lysS}* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (A) เลนที่ 1: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม AK_SFR2, เลนที่ 2: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม AK_SFR2, เลนที่ 3: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 26_SFR2, เลนที่ 4: เซลล์ที่ไม่มีการ

เหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 26_SFR2, เลนที่ 5: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 27_SFR2 และ เลนที่ 6: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 27_SFR2 (B) เลนที่ 1: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 28_SFR2, เลนที่ 2: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 28_SFR2, เลนที่ 3: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 29_SFR2, เลนที่ 4: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 29_SFR2 และเลน M: protein marker, ลูกศรแสดงน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของโปรตีนลูกผสม SFR2 ที่ควรพบบน SDS-PAGE ถ้าโปรตีนมีการแสดงออกใน *E. coli*

พลาสมิด pET26_SFR2 และ pET26_SFR2_syn ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน ArcticExpress(DE3) RIL และให้มีการแสดงออกที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โปรตีนทั้งหมดถูกโหลดบน SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน ผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 26_SFR2 และ 26_SFR2_syn ซึ่งควรมีขนาดประมาณ 78 kDa บน SDS-PAGE และพบเพียงการแสดงออกของโปรตีนชาเปอโรนิน (Chaperonin), Cpn60 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลาในเซลล์เจ้าบ้านชนิดนี้ (รูปที่ 3.16)



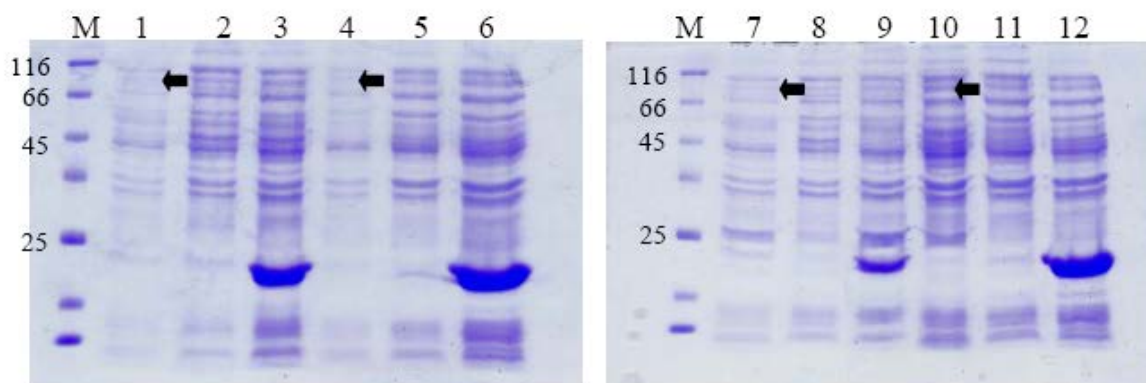
รูปที่ 3.16 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 26_SFR2 และ 26_SFR2_syn บน SDS-PAGE โดยใช้ ArcticExpress(DE3) RIL เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลนที่ 1,3 และ 5: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิต 26_SFR2, เลนที่ 2 ,4 และ 6: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิต 26_SFR2, เลนที่ 7 และ 9: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิต 26_SFR2_syn, เลนที่ 8 และ10: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิต 26_SFR2_syn ลูกศรแสดงน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของโปรตีนลูกผสม 26_SFR2 และ 26_SFR2_syn ที่ควรพบบน SDS-PAGE ถ้าโปรตีนมีการแสดงออกใน *E. coli*

การผลิตโปรตีนลูกผสม 26_mutPEST_SFR2

จากผลการทดลองการผลิตโปรตีน SFR2 เฉพาะทางด้านปลายซี พบว่ามีเพียงกรดอะมิโนเพียง 260 ตัวที่สามารถผลิตโปรตีนได้ ซึ่งไม่มีบริเวณของ PEST sequence อยู่ ดังนั้นสมมติฐานในการทดลองส่วนนี้คือ บริเวณ PEST sequence อาจมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน SFR2 เนื่องจาก PEST sequence สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนด้วยโปรติเอสได้

เพื่อศึกษาผลกระทบของ PEST sequence ที่มีต่อการผลิตโปรตีน SFR2 จึงทำการมิมูเทตบริเวณนี้ให้สูญเสียความสามารถในการเหนี่ยวนำโปรติเอส จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตโปรตีน 4 ชนิดคือ BL21(DE3) *plysS*, Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami(DE3) และให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 20 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นโปรตีนทั้งหมด (Total proteins) ถูกโหลดบน SDS-PAGE ผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE ในเซลล์เจ้าบ้านทั้งสี่ชนิดซึ่งควรมีขนาดโมเลกุลประมาณ 78 kDa (รวมน้ำหนักโมเลกุลของไทโอรีดอกซิน) (รูปที่ 3.17)

จากผลการทดลองพบว่าไม่สามารถผลิตโปรตีน SFR2 ใน *E. coli* ได้แม้ว่าได้ทำการมิมูเทตบริเวณ PEST sequence แล้วก็ตาม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าบริเวณนี้ไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน SFR2 ถึงแม้ว่า PEST sequence มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสัญญาณให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามยังมีโปรตีนที่มีความเสถียรแม้มี PEST sequence อยู่ ซึ่งการย่อยสลายของโปรตีนนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยอย่างอื่นด้วย เช่น ขนาดของโปรตีน โดยโปรตีนที่มีขนาดใหญ่สามารถถูกย่อยสลายได้รวดเร็วกว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็ก หรือโปรตีนที่มีประจุเป็นลบถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีประจุบวก เป็นต้น (Roger และคณะ, 1986) อย่างไรก็ตามในปี 1984 Ferguson และคณะ ได้ทำการผลิตโปรตีน 2 ชนิด คือ E1A และ myc ซึ่งมีตำแหน่งของ PEST sequence อยู่ภายในโปรตีนหลายตำแหน่ง ซึ่งผลการทดลองพบว่าโปรตีนทั้งสองสามารถผลิตได้โดยใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า PEST sequence ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณให้เกิดการย่อยสลายโดยโปรติเอสในเซลล์แบคทีเรีย (Roger และคณะ, 1986)



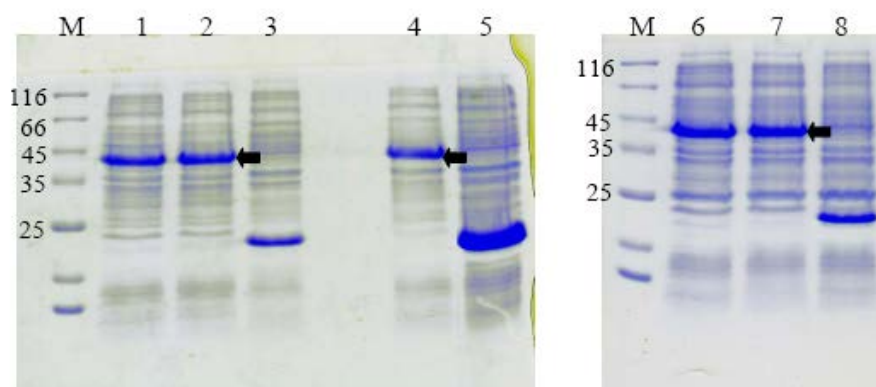
รูปที่ 3.17 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม SFR2 ที่มีการมีวเขตบริเวณ PEST sequence บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) *plysS*, Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เลนที่ 1, 4, 7 และ 10: เซลล์ Origami(DE3), Origami B(DE3), Rosetta-gami(DE3) และ BL21(DE3) *plysS* ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 2, 5, 8 และ 11: เซลล์ Origami(DE3), Origami B(DE3), Rosetta-gami(DE3) และ BL21(DE3) *plysS* ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 3, 6, 9 และ 12: พิ่วชั้นโปรตีนไทโอรีดอกซินที่มีการเหนี่ยวนำให้แสดงออกโดยใช้ Origami(DE3), Origami B(DE3), Rosetta-gami(DE3) และ BL21(DE3) *plysS* เป็นเซลล์เจ้าบ้านตามลำดับ ลูกศรแสดงน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของโปรตีนลูกผสม 26_mutPEST_SFR2 ที่ควรพบบน SDS-PAGE ถ้ามีการแสดงออกใน *E. coli*

การผลิตโปรตีนทางด้านปลายเอ็น (N-terminal)

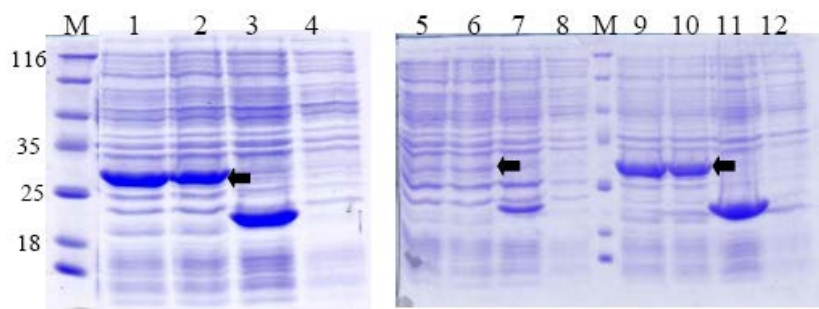
พลาสมิด pET31_SFR2_delC(mP) และ pET32_SFR2_delC(mP) ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน Origami(DE3), Origami B(DE3) และ Rosetta-gami(DE3) ส่วน pET33_SFR2_delC และ pET34_SFR2_delC ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน Origami(DE3) และ BL21(DE3) *plysS* และให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 20 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นโปรตีนทั้งหมด (Total proteins) ถูกโหลดบน SDS-PAGE ผลการทดลองพบว่ามีเพียงโปรตีนลูกผสม 31_SFR2_delC(mP) และ 32_SFR2_delC(mP) เท่านั้นที่มีการแสดงออกของโปรตีนโดยมีขนาดโมเลกุลประมาณ 42 kDa และ 29 kDa (รวมน้ำหนักโมเลกุลของไทโอรีดอกซิน) ตามลำดับ ซึ่งระดับการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 32_SFR2_delC(mP) ใน Rosetta-gami(DE3) อยู่ในระดับต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์เจ้าบ้านอื่น (รูปที่ 3.18 – 3.19)

ส่วนโปรตีนลูกผสม 33_SFR2_delC และ 34_SFR2_delC เมื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีนและตรวจสอบบน SDS-PAGE ผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของโปรตีนทั้งใน BL21(DE3) plysS และ Origami(DE3) โดยโปรตีนลูกผสมทั้งสองชนิดควรมีขนาดโมเลกุลประมาณ 50 และ 37 kDa (รวมน้ำหนักโมเลกุลของไทโอรีดอกซิน) ตามลำดับ (รูปที่ 3.20 – 3.21)

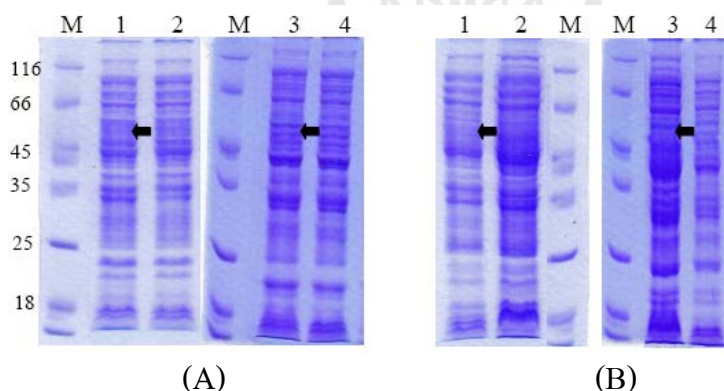
จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ามีเพียงกรดอะมิโน 174 ตัวจากทางด้านปลายเอ็น (กรดอะมิโนลำดับที่ 59-232) ที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli* บน SDS-PAGE ได้ในระบบของ pET32a



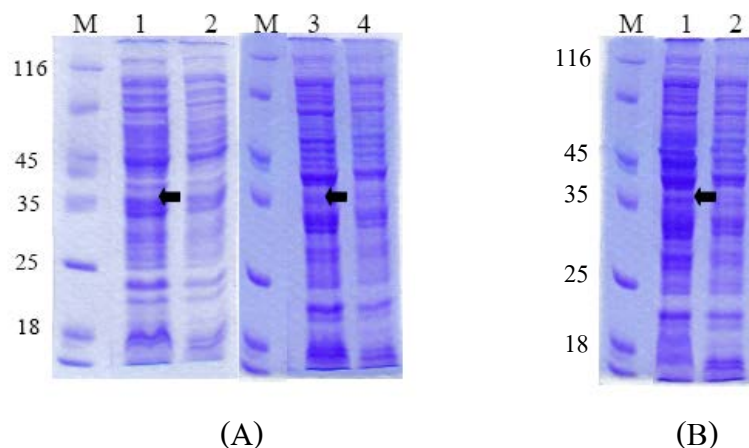
รูปที่ 3.18 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 31_SFR2_delC(mP) บน SDS-PAGE โดยใช้ Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เลนที่ 1 และ 2: เซลล์ Origami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 4: เซลล์ Origami B(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 6 และ 7: เซลล์ Rosetta-gami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 3, 5 และ 8: ฟิวชั่นโปรตีนไทโอรีดอกซิน ที่มีการเหนี่ยวนำให้แสดงออกโดยใช้ Origami(DE3), Origami B(DE3), Rosetta-gami(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ตามลำดับ ลูกศรแสดงขนาดของโปรตีนลูกผสม 31_SFR2_delC(mP)



รูปที่ 3.19 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 32_SFR2_delC(mP) บน SDS-PAGE โดยใช้ Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เลนที่ 1 และ 2: เซลล์ Origami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 5 และ 6: เซลล์ Rosetta-gami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 9 และ 10: เซลล์ Origami B(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 3, 7 และ 11: พิวชั่นโปรตีนไทโอรีดอกซินที่มีการเหนี่ยวนำให้แสดงออกโดยใช้ Origami(DE3), Origami B(DE3), Rosetta-gami(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้านตามลำดับ เลนที่ 4, 8 และ 12: เซลล์ Origami(DE3), Rosetta-gami(DE3) และ Origami(DE3) ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม ลูกศรแสดงขนาดของโปรตีนลูกผสม 32_SFR2_delC(mP)



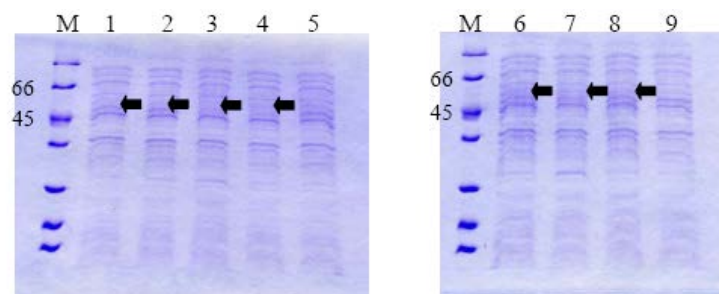
รูปที่ 3.20 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 33_SFR2_delC บน SDS-PAGE โดยใช้ Origami(DE3) และ BL21(DE3) pLysS เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (A) เลนที่ 1 และ 3: เซลล์ Origami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 2 และ 4: เซลล์ Origami(DE3) ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม (B) เลนที่ 1 และ 3: เซลล์ BL21(DE3) pLysS ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 2 และ 4: เซลล์ BL21(DE3) pLysS ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม ลูกศรแสดงน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของโปรตีนลูกผสม 33_SFR2_delC ที่ตรวจพบบน SDS-PAGE ถ้ามีการแสดงออกใน *E. coli*



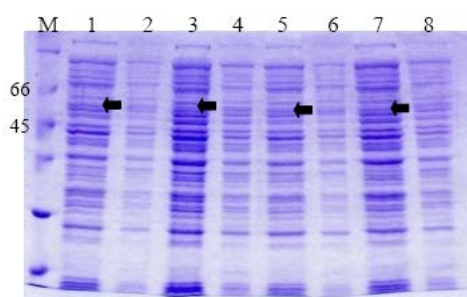
รูปที่ 3.21 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 34_SFR2_delC บน SDS-PAGE โดยใช้ Origami(DE3) และ BL21(DE3) *plysS* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (A) เลนที่ 1 และ 3: เซลล์ Origami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 2 และ 4: เซลล์ Origami(DE3) ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม (B) เลนที่ 1: เซลล์ BL21(DE3) *plysS* ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 2 และ 4: เซลล์ BL21(DE3) *plysS* ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม ลูกศรแสดงน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของโปรตีนลูกผสม 34_SFR2_delC ที่ควรพบบน SDS-PAGE ถ้ามีการแสดงออกใน *E. coli*

3.2.1.2 การผลิตโปรตีนโดยใช้เวกเตอร์ pCold I

พลาสมิด pCold_37_SFR2 และ pCold_37_mutPEST_SFR2 ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน BL21(DE3) *plysS*, Origami(DE3) และ Rosetta-gami และให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 20 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นโปรตีนทั้งหมดถูกโหลดบน SDS-PAGE ผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมทั้งสองชนิดบน SDS-PAGE ซึ่งควรมีขนาดประมาณ 53 kDa (รูปที่ 3.22 – 3.23) ซึ่งผลการทดลองการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 37_mutPEST_SFR2 เป็นไปในทิศทางเดียวกับการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 26_mutPEST_SFR2 คือไม่มีการผลิตโปรตีนลูกผสมถึงแม้จะมีการมีเวกเตอร์บริเวณ PEST sequence ไปแล้ว



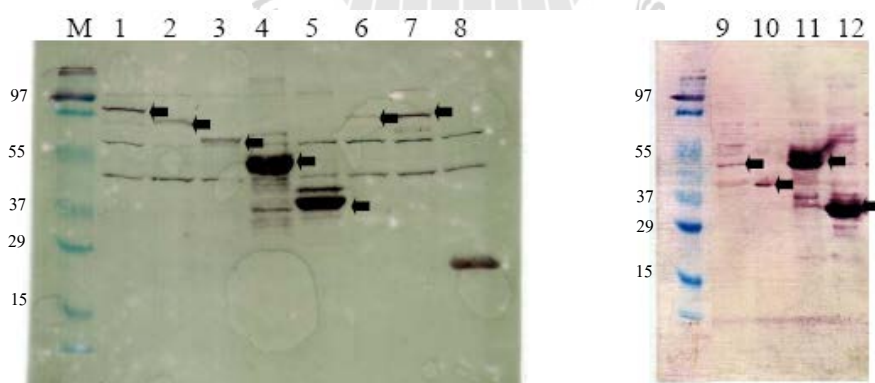
รูปที่ 3.22 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) *plysS* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลนที่ 1-4: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 37_SFR2, เลนที่ 5: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 37_SFR2, เลนที่ 6-8: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 37_mutPEST_SFR2, เลนที่ 9: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 37_mutPEST_SFR2 ลูกศรแสดงน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 ที่ตรวจพบบน SDS-PAGE ถ้ามีการแสดงออกใน *E. coli*



รูปที่ 3.23 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 บน SDS-PAGE โดยใช้ Rosetta-gami(DE3) และ Origami(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลนที่ 1 และ 5: เซลล์ Rosetta-gami(DE3) และ Origami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 ตามลำดับ, เลนที่ 2 และ 6: เซลล์ Rosetta-gami(DE3) และ Origami(DE3) ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 ตามลำดับ, เลนที่ 3 และ 7: เซลล์ Rosetta-gami(DE3) และ Origami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 37_mutPEST_SFR2 ตามลำดับ, เลนที่ 4 และ 8: เซลล์ Rosetta-gami(DE3) และ Origami(DE3) ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 37_mutPEST_SFR2 ตามลำดับ ลูกศรแสดงน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 ที่ตรวจพบบน SDS-PAGE ถ้ามีการแสดงออกใน *E. coli*

3.2.2 การตรวจสอบโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์นบลอต (Western blot)

เนื่องจากข้อจำกัดของสีโคแมสซีในการตรวจสอบโปรตีนบน SDS-PAGE จึงเปลี่ยนวิธีการตรวจสอบโปรตีนไปเป็นวิธีเวสเทิร์นบลอต โดยใช้ 28_SFR2 เป็นแอนติเซรัม พลาสมิด pETAK_SFR2, 26_SFR2, 27_SFR2, 28_SFR2, 29_SFR2, 26mutPEST_SFR2, 26_SFR2_syn, 31_SFR2_delC(mP), 32_SFR2_delC(mP), 33_SFR2_delC และ 34_SFR2_delC ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน Origami(DE3) และให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใส่ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 มิลลิโมลาร์ โปรตีนทั้งหมด (Total proteins) ถูกโหลดบน SDS-PAGE และส่งผ่านโปรตีนไปที่แผ่นเมมเบรน PVDF เพื่อตรวจสอบโปรตีนโดยเวสเทิร์นบลอต ผลการทดลองพบว่าโปรตีนที่ไม่พบการแสดงออกบน SDS-PAGE (AK_SFR2, 26_SFR2, 27_SFR2, 26mutPEST_SFR2, 26_SFR2_syn, 33_SFR2_delC และ 34_SFR2_delC) สามารถตรวจพบปริมาณโปรตีนเพียงเล็กน้อยบนเมมเบรน PVDF (รูปที่ 3.24) ส่วนโปรตีนที่พบการแสดงออกบน SDS-PAGE (28_SFR2, 29_SFR2, 31_SFR2_delC(mP) และ 32_SFR2_delC(mP)) ตรวจพบแบนโปรตีนขนาดใหญ่บนแผ่นเมมเบรน (รูปที่ 3.24) จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าโปรตีน SFR2 สามารถผลิตโปรตีนใน *E. coli* ได้แต่โปรตีนอาจเกิดการย่อยสลายหลังการแปลรหัส (translation) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทำการตรวจสอบโปรตีนบนเมมเบรนโดยใช้ anti-6-His ไม่พบแบนของโปรตีน SFR2 ดังนั้นแบนของโปรตีน SFR2 ที่พบบนเมมเบรนในการทำเวสเทิร์นบลอตสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ anti-28_SFR2 เท่านั้น ส่วนแบนโปรตีนบางๆ ที่อยู่ด้านล่างแบนของโปรตีน SFR2 อาจเป็นโปรตีนบางส่วนของ SFR2 ที่เกิดการย่อยสลายหรือเกิดการปนเปื้อนข้ามของโปรตีนในเซลล์ *E. coli*



รูปที่ 3.24 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน SFR2 โดยวิธีเวสเทิร์นบลอตบนแผ่นเมมเบรน PVDF ซึ่งโปรตีนทั้งหมดถูกผลิตในเซลล์ Origami(DE3) และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และใช้ anti-28_SFR2 สำหรับตรวจสอบโปรตีน SFR2 เลนที่ 1: โปรตีนลูกผสม AK_SFR2, เลนที่ 2:

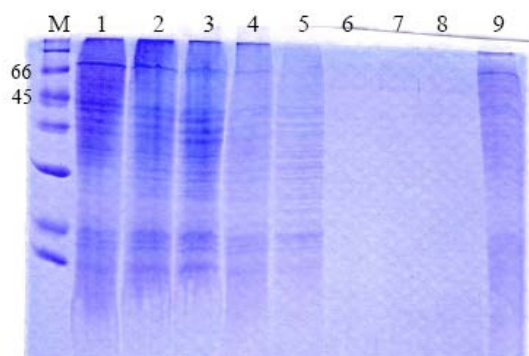
โปรตีนลูกผสม 26_SFR2, เลนที่ 3: โปรตีนลูกผสม 27_SFR2, เลนที่ 4: โปรตีนลูกผสม 28_SFR2, เลนที่ 5: โปรตีนลูกผสม 29_SFR2, เลนที่ 6: โปรตีนลูกผสม 26_mutPEST_SFR2, เลนที่ 7: โปรตีนลูกผสม 26_SFR2_syn, เลนที่ 8: ฟิวชั่นโปรตีนไทโอรีดอกซิน, เลนที่ 9: โปรตีนลูกผสม 33_SFR2_delC, เลนที่ 10: โปรตีนลูกผสม 34_SFR2_delC, เลนที่ 11: โปรตีนลูกผสม 31_SFR2_delC(mP) และ เลนที่ 12: โปรตีนลูกผสม 32_SFR2_delC(mP) ลูกศรแสดงขนาดของโปรตีนลูกผสม SFR2

3.2.3 การแสดงออกของโปรตีนใน *P. pastoris*

เซลล์ *P. pastoris* SMD1168H ที่มียีน 26_SFR2_syn อยู่ถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว BMGY 50 มิลลิลิตร และมีการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนโดยการเติมเมทานอล 3% ลงไปทุกๆ 12 ชั่วโมงจนครบ 72 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกส่วนที่เป็นส่วนใสและเซลล์ออกจากกัน และนำส่วนใสไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ pNP- β -galactosidase เป็นสารตั้งต้น (Moellering และคณะ, 2010) อย่างไรก็ตามผลการทดสอบไม่พบความแตกต่างการเกิดสีของปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างทดลองและตัวควบคุม (negative control)

เมื่อทำการโหลดโปรตีนลงบน SDS-PAGE (เซลล์ที่แตกแล้ว, ส่วนใส และ โปรตีนทั้งหมด) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนใน *P. pastoris* อย่างไรก็ตาม ไม่พบการแสดงของโปรตีนทั้งสามส่วนบน SDS-PAGE (รูปที่ 3.2)

ในปี 2006, Nakphajit ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน SFR2 ที่เป็นไวด์ไทป์ใน *P. pastoris* Y11430 พบว่า ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์หรือการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE หรือเวสเทิร์นบลอตโดยใช้ anti-6-His เป็นแอนติบอดี แต่สามารถตรวจพบระดับอาร์เอ็นเอของยีน SFR2 ได้

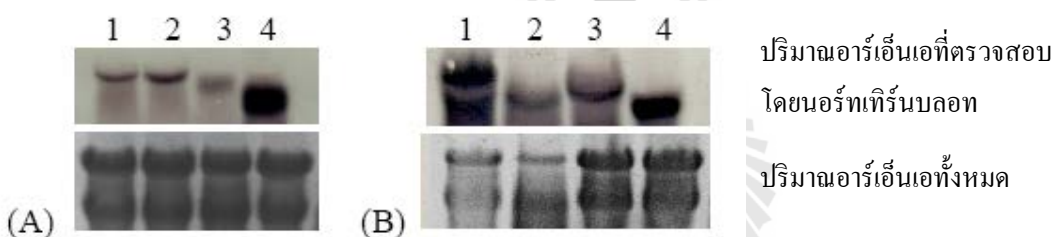


รูปที่ 3.25 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน 26_SFR2_syn บน SDS-PAGE โดยใช้ *P. pastoris* SMD1168H เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เลนที่ 1 และ 2: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน 26_SFR2_syn, เลนที่ 3: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน EK_L เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม, เลนที่ 4 และ 5: โปรตีนทั้งหมด (total protein), เลนที่ 6 และ 7: ส่วนใสของโปรตีน 26_SFR2_syn, เลนที่ 8: ส่วนใสของโปรตีน EK_L และ เลนที่ 9: โปรตีนทั้งหมดที่ไม่ได้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีน 26_SFR2_syn

3.3 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยวิธีนอร์เทิร์นบลอต

ปริมาณอาร์เอ็นเอของ *SFR2* ถูกตรวจสอบโดยวิธีนอร์เทิร์นบลอต โดยใช้การไฮบริดระหว่างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ พลาสมิด pET ที่มีชิ้นส่วนของยีน *SFR2* ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน Origami(DE3) และให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นทำการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ RNA easy mini kit (QIAGEN) อาร์เอ็นเอความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม ถูกโหลดลงบนเจล FA ความเข้มข้น 1% และส่งผ่านอาร์เอ็นเอไปที่เมมเบรน ผลการทดลองพบว่า ปริมาณอาร์เอ็นเอทางด้านปลาย 3' ที่ใช้ 28_SFR2 เป็นโพรบ พบว่าระดับอาร์เอ็นเอของ AK_SFR2, 26_SFR2 และ 27_SFR2 มีปริมาณเพียงเล็กน้อย ส่วนระดับอาร์เอ็นเอของ 28_SFR2 มีปริมาณที่มากกว่าเมื่อเทียบกับระดับอาร์เอ็นเอของ AK_SFR2, 26_SFR2 และ 27_SFR2 จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าระดับการทรานสคริปชันของ AK_SFR2, 26_SFR2 และ 27_SFR2 ต่ำจึงทำให้มีปริมาณของโปรตีนที่ได้ น้อยลงตามไปด้วย (Wu และคณะ, 2004) หรืออาจเกิดจากการที่ปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้ไม่มีความเสถียรทำให้มีปริมาณอาร์เอ็นเอน้อย จากผลการทดลองนี้มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองที่ได้จาก SDS-PAGE และเวสเทิร์นบลอต (รูปที่ 3.26)

อย่างไรก็ตามระดับอาร์เอ็นเอของยีนทางด้านปลาย 5' ผลการทดลองที่ได้มีความขัดแย้งกับระดับอาร์เอ็นเอทางด้านปลาย 3' โดยการทำนอร์เทิร์นบลอตทางด้านปลาย 5' ใช้ 34_SFR2_delC เป็นโพรบในการตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอ ผลการทดลองพบแบนเข้มของ 32_SFR2_delC(mP) และ 33_SFR2_delC บนเมมเบรน ซึ่งยีนทั้งสองนี้พบและไม่พบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE ตามลำดับ ส่วน 31_SFR2_delC(mP) และ 34_SFR2_delC พบเพียงแบนบาง ๆ ซึ่งพบและไม่พบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE ตามลำดับ (รูปที่ 3.25B) ซึ่งผลการทดลองนี้ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองที่ได้จาก SDS-PAGE และเวสเทิร์นบลอต แสดงให้เห็นว่าระดับอาร์เอ็นเอไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่ได้ มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างอาร์เอ็นเอและโปรตีนของยีสต์และ *E. coli* ว่ามากกว่า 70% ของยีสต์ และประมาณ 50 % ของ *E. coli* ระดับโปรตีนของยีนขึ้นอยู่กับระดับของการทรานสคริปชัน (Lu และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามมีการบ่งชี้ว่าจำนวนของ mRNA และจำนวนของโปรตีนไม่มีความสัมพันธ์กันเนื่องจาก mRNA มีอายุสั้นโดยเฉพาะในแบคทีเรีย ในขณะที่โปรตีนสามารถอยู่ในเซลล์ได้เป็นเวลานาน ในขณะที่มีการแสดงออกของยีน mRNA ปรากฏเพียงชั่วระยะเวลาสั้นๆ และมีอายุสั้นเมื่อเทียบกับโปรตีน เช่นระดับของโปรตีนอาจสูงหลังจากที่ mRNA เกิดการย่อยสลายไปแล้ว (Taniguchi และคณะ, 2010)



รูปที่ 3.26 ตรวจสอบระดับของอาร์เอ็นเอของ SFR2 โดยวิธีการนอร์เทิร์นบลอต โดยใช้ ยีน 28_SFR2 และ 34_SFR2_delC เป็นโพรบ (A) เลนที่ 1: อาร์เอ็นเอ AK_SFR2, เลนที่ 2: อาร์เอ็นเอ 26_SFR2, เลนที่ 3: อาร์เอ็นเอ 27_SFR2, เลนที่ 4: อาร์เอ็นเอ 28_SFR2 (B) เลนที่ 1: อาร์เอ็นเอ 33_SFR2_delC, เลนที่ 2: อาร์เอ็นเอ 34_SFR2_delC, เลนที่ 3: อาร์เอ็นเอ 31_SFR2_delC(mP), เลนที่ 4: อาร์เอ็นเอ 32_SFR2_delC(mP)

3.4 การติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีน

ยีน SFR2 ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SFR2B1_f และ SFR2B2_r และโคลนเข้าไปในเวกเตอร์ pDONR/Zeo โดยใช้เอนไซม์ BP clonase และทรานสฟอร์มเข้าไปใน *E. coli* TOP10 สกัดพลาสมิดโดยใช้ plasmid extraction kit (QIAGEN) เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วไม่พบการมิวเทตหรือผิดเฟรม จากนั้น ยีน SFR2 ใน pDONR/Zeo ถูกส่งผ่านไปที่เวกเตอร์ 3 ชนิด คือ pMDC43, pMDC83 และ pMDC140 พลาสมิด

สุดท้ายที่มีขึ้นขึ้น SFR2 อยู่ให้ชื่อว่า pSM43, pSM83 และ pSM140 ตามลำดับ โครงสร้างพลาสมิดแสดงดังตารางที่ 3.1

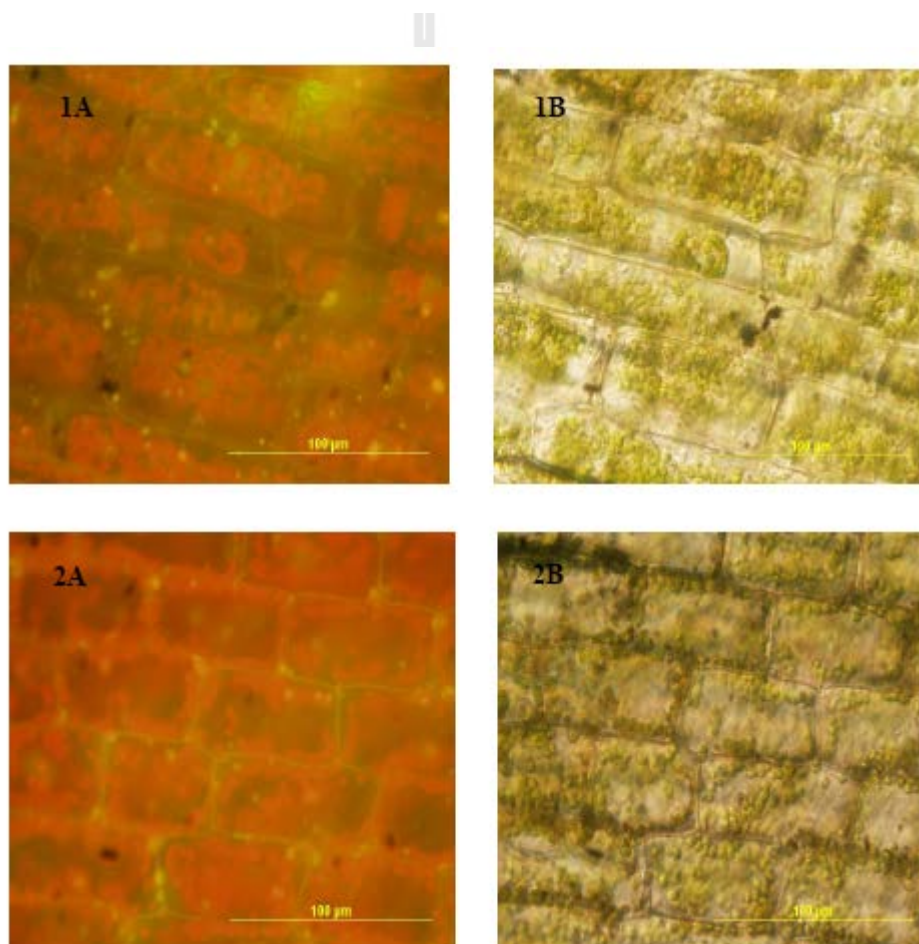
ตารางที่ 3.1 โครงสร้างพลาสมิดที่ใช้ในการติดตามตำแหน่งของโปรตีน

พลาสมิด	ลักษณะ	เนื้อเยื่อที่ใช้สำหรับการทรานสฟอร์ม
pMDC43 (-control)	2x 35S – GFP – <i>ccdB</i> – <i>nos</i> T	เซลล์สาหร่ายหางกระรอก
pSM43	2x 35S – GFP – <i>SFR2</i> – <i>nos</i> T	เซลล์สาหร่ายหางกระรอก
pRM83 (+control)	2x 35S – AAM08614 – GFP – <i>nos</i> T	เซลล์สาหร่ายหางกระรอก
pSM83	2x 35S – <i>SFR2</i> – GFP – <i>nos</i> T	เซลล์สาหร่ายหางกระรอก
pMDC140 (-control)	2x 35S – <i>ccdB</i> – GUS – <i>nos</i> T	เซลล์สาหร่ายหางกระรอก, เซลล์หัวหอม
pSM140	2x 35S – <i>SFR2</i> – GUS – <i>nos</i> T	เซลล์สาหร่ายหางกระรอก, เซลล์หัวหอม
pRM140 (+control)	2x 35S – AAM08614 – GUS – <i>nos</i> T	เซลล์สาหร่ายหางกระรอก, เซลล์หัวหอม

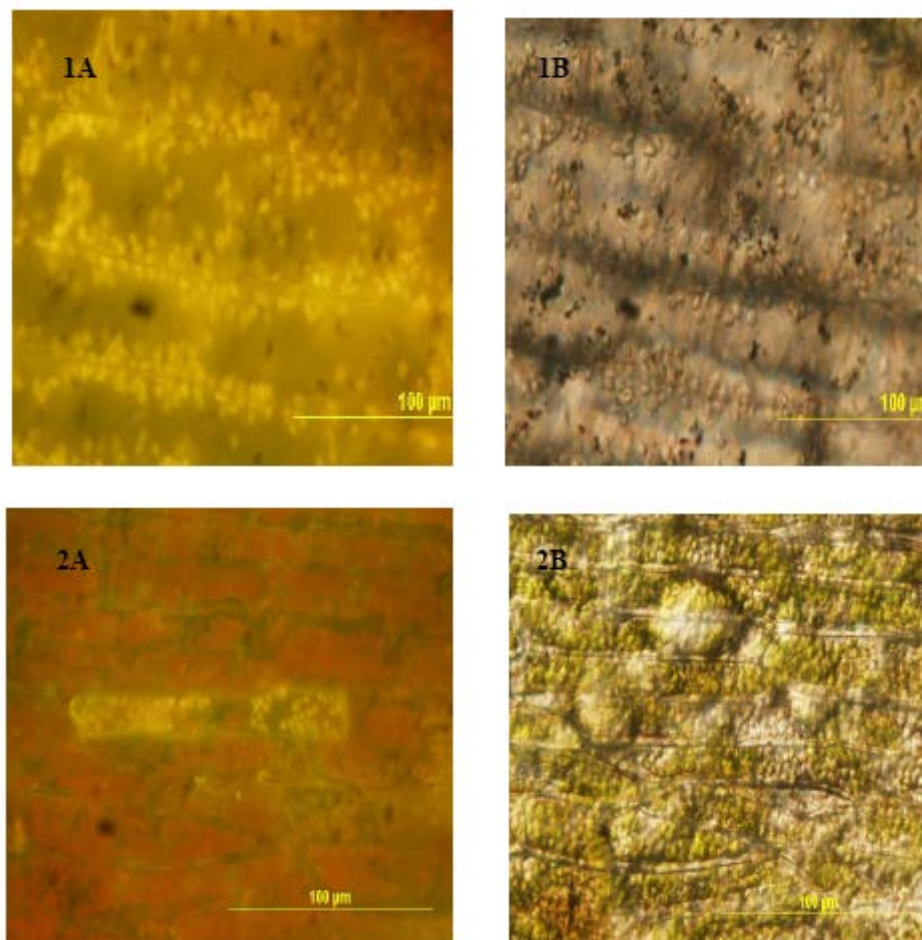
พลาสมิด pSM43 และ pSM83 ที่มี GFP เป็นโปรตีนติดตามถูกยิงเข้าไปในเซลล์สาหร่ายหางกระรอก โดยวางใบสาหร่ายหางกระรอกบนฐานแรงความเข้มข้น 2% และบอมบาร์ดที่ความดัน 1,100 psi ต่อการยิง 1 ครั้งทีละระยะห่าง 6 เซนติเมตร หลังจากนั้นปั๊มใบสาหร่ายหางกระรอกที่ทรานสฟอร์มแล้วที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีแสง (Noji, 1998) จากนั้นนำใบสาหร่ายหางกระรอกที่ ทรานสฟอร์มแล้วไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 520-590 นาโนเมตร กำลังขยาย 40X

ผลการทดลองพบว่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์เซลล์ที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pMDC43 ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม และ pSM43 ให้ผลการทดลองที่คล้ายคลึงกัน คือมีการกระจายตัวของโปรตีน GFP ไปทั่วทั้งเซลล์เนื่องจากการใช้สัญญาณเปปไทด์ (signal peptide) ของโปรตีน GFP (รูปที่ 3.27)

ส่วนเซลล์สาหร่ายทางกระบอกที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pSM83 พบว่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์มีการกระจายตัวของโปรตีน GFP ในคลอโรพลาสต์ ในขณะที่ เซลล์สาหร่ายทางกระบอกที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pRM83 ซึ่งมี AAMO88614, RM83 เป็นสัญญาณที่ส่งโปรตีนออกไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ มีโปรตีน GFP กระจายทั่วเซลล์ยกเว้นคลอโรพลาสต์ (รูปที่ 3.28) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า GFP ใช้สัญญาณเปปไทด์ที่อยู่ทางด้านปลายเอ็นของโปรตีน



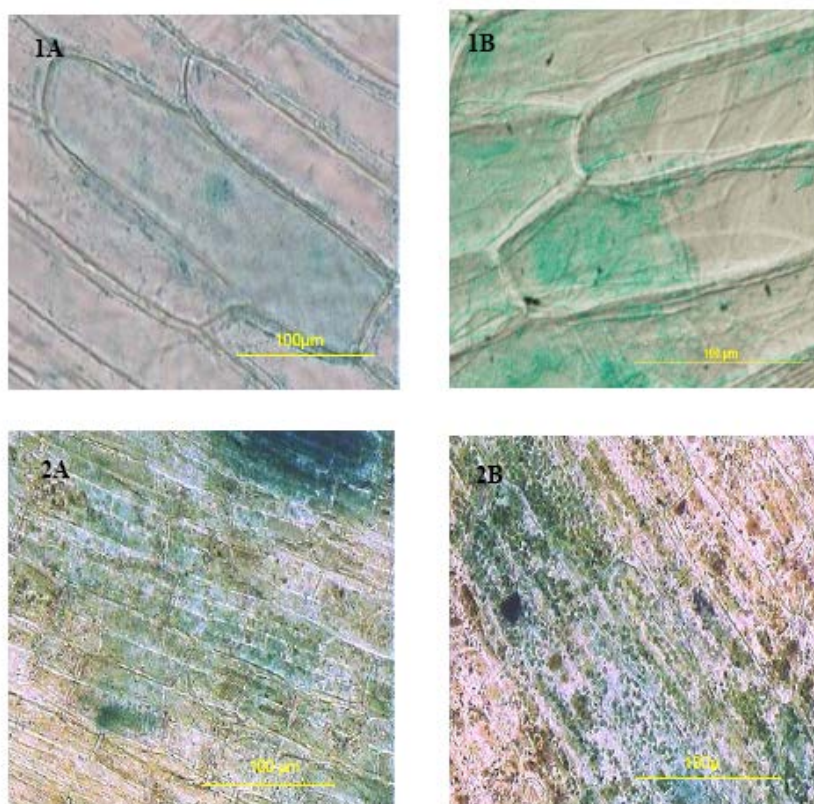
รูปที่ 3.27 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2 โดยใช้โปรตีนติดตาม GFP ในเซลล์สาหร่ายทางกระบอก โดยใช้พลาสมิด pMDC43 (1) และ pSM43 (2) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (A) และ แบบส่องกราด (B) โดยที่จุดสีแดง (A) และสีเขียว (B) แสดงตำแหน่งของคลอโรพลาสต์



รูปที่ 3.28 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2 โดยใช้โปรตีนติดตาม GFP ในเซลล์สำหรับทางกระรอก โดยใช้พลาสมิด pSM83 (1) และ pRM83 (2) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (A) และ แบบส่องกราด (B) โดยที่จุดสีแดง (A) และสีเขียว (B) แสดงตำแหน่งของคลอโรพลาสต์

พลาสมิด pMDC140 และ pSM140 ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์สำหรับทางกระรอกและเซลล์หัวหอมโดยวิธีการบอมบาร์ดเมนต์ จากนั้นทำการตรวจสอบโปรตีน GUS โดยการย้อมสีเซลล์และบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนในสถานะที่ไม่มีแสง ล้างเซลล์ด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% และตรวจสอบตำแหน่งของโปรตีนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

ผลการทดลองพบว่า เซลล์หัวหอมที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pMDC140 มีสีน้ำเงินกระจายไปทั่วทั้งเซลล์ รวมถึงนิวเคลียส, ผนังเซลล์ และไซโตพลาสซึม ในขณะที่เซลล์หัวหอมที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pSM140 เกิดสีน้ำเงินขึ้นเฉพาะในเซลล์ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถระบุตำแหน่งของอวกานเนลได้ เนื่องจากเซลล์หัวหอมไม่สามารถระบุตำแหน่งของคลอโรพลาสต์ได้ ดังนั้นจึงทรานสฟอร์มพลาสมิดทั้งสองชนิดเข้าไปในเซลล์สาหร่ายทางกระบอกด้วย ซึ่งผลการทดลองพบว่า พลาสมิดควบคุม pMDC140 มีสีน้ำเงินกระจายไปทั่วทั้งเซลล์ แต่เซลล์หัวหอมที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pSM140 เกิดสีน้ำเงินขึ้นเฉพาะในคลอโรพลาสต์ (รูปที่ 3.29) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน SFR2 มีการเคลื่อนที่ไปที่คลอโรพลาสต์



รูปที่ 3.29 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2 โดยใช้โปรตีนติดตาม GUS ในเซลล์หัวหอม (1) และเซลล์สาหร่ายทางกระบอก (2) โดยใช้พลาสมิด pMDC140 (A) และ pSM140 (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (A) และ แบบส่องกราด (B) โดยที่จุดสีแดง (A) และสีเขียว (B) แสดงตำแหน่งของคลอโรพลาสต์

บทที่ 4

บทสรุป

ยีน *SFR2* ได้ทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ซิดีเอ็นเอ AK119461 เป็นแม่แบบด้วยไพรเมอร์ที่ต่างกันเพื่อสร้างยีน *SFR2* ทางด้านปลาย 5' และ 3' นอกจากนี้ได้ทำการมีวเขตบริเวณ PEST sequence ของยีน *SFR2* เพื่อสร้าง 26_mutPEST_SFR2 ซึ่งยีนทั้งหมดถูกโคลนเข้าไปใน pET32a และให้มีการแสดงออกของโปรตีน ส่วน 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 ถูกโคลนเข้าไปใน pCold I

โปรตีนลูกผสมทั้งหมดถูกทำให้มีการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านต่างชนิดกัน 4 ชนิด คือ BL21(DE3) *p/lysS*, Origami(DE3), Origami B(DE3) และ Rosetta-gami(DE3) และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE ซึ่งผลการทดลองพบว่ามีเพียงกรดอะมิโนเพียง 260 ตัว ทางด้านปลายซี และกรดอะมิโน 174 ตัวทางด้านปลายเอ็นซึ่งสามารถผลิตโปรตีนใน *E. coli* ได้

PEST sequence ทำหน้าที่เป็นสัญญาณเหนี่ยวนำให้โปรตีนเข้ามาใกล้โปรตีนและเกิดการย่อยสลาย PEST sequence ที่พบในโปรตีน *SFR2* ถูกมีวเขตโดยใช้วิธีมีวตาเจเนซิส เพื่อเปลี่ยนกรดกลูตา มิกเป็นกลูตามีน เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็น PEST sequence โดยใช้ PESTfind ไม่พบ PEST sequence ปรากฏอยู่ในโปรตีน *SFR2* ดังนั้นยีน 26_mutPEST_SFR2 จึงถูกโคลนและทำการผลิตใน *E. coli* ซึ่งผลการทดลองพบว่า โปรตีน *SFR2* ที่ทำการมีวเขตบริเวณ PEST sequence ก็ไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE โดยใช้สีย้อมโคแมสซึบบลูได้

เนื่องด้วยการตรวจสอบโปรตีน *SFR2* ด้วย SDS-PAGE ไม่สามารถตรวจพบแบนของโปรตีนได้จึงเปลี่ยนวิธีการตรวจสอบโปรตีนไปใช้วิธีการตรวจสอบโดยเวสเทิร์นบลอตโดยใช้ anti-28_SFR2 ซึ่งผลการทดลองพบว่าโปรตีน *SFR2* ที่ไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE ได้สามารถตรวจพบแบนบางๆ ได้บนเมมเบรน PVDF ซึ่งอาจสรุปผลการทดลองนี้ได้สองประเด็นดังนี้ คือ 1. โปรตีนเกิดการย่อยสลายไปหลังจากการแปลรหัส 2. มีการสร้างอาร์เอ็นเอของยีน *SFR2* น้อยและอาร์เอ็นเอคงสภาพอยู่ภายในเซลล์ได้ไม่นาน จึงส่งผลให้มีการผลิตโปรตีน *SFR2* น้อยจนไม่สามารถตรวจสอบด้วย SDS_PAGE ได้

ระดับอาร์เอ็นเอของยีน *SFR2* ถูกตรวจสอบโดยใช้วิธีการนอร์เทิร์นบลอต โดยใช้ซิดีเอ็นเอ 28_SFR2 และ 34_SFR2_deIC เป็นโพรบดีเอ็นเอสำหรับตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยใช้การไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอบนเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส ผลการทดลองพบว่าความสัมพันธ์ของระดับอาร์เอ็นเอที่ได้จากนอร์เทิร์นบลอตและระดับโปรตีนจาก SDS-PAGE และเวสเทิร์นบลอตของยีนและโปรตีน *SFR2* ทางด้านปลาย 5' เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือปริมาณอาร์เอ็นเอที่ผลิตได้น้อยทำให้ผลิตโปรตีนได้น้อยตามลง

ไปด้วย ส่วนผลการทดลองทางด้านปลาย 3' พบว่าระดับอาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนไม่เข้าไปในทิศทางเดียวกันคือระดับของอาร์เอ็นเอไม่ได้เป็นตัวชี้วัดถึงการแสดงออกของโปรตีน

การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน 26_SFR2_syn ใน *P. pastoris* SMD1168H โดยใช้เวกเตอร์ pPICZ α BNH8 ไม่พบการทั้งกิจกรรมของเอนไซม์และแบนของโปรตีนบน SDS-PAGE ถึงแม้ว่าจะมีการปรับโคดอนยีน SFR2 ให้เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนใน *P. pastoris* แล้วก็ตาม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า codon usage ไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน SFR2 สามารถผลิตได้ในเซลล์ *E. coli* อย่างไรก็ตามสามารถผลิตได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อาจเนื่องมาจากปริมาณอาร์เอ็นเอหรือเกิดการย่อยสลายของโปรตีน นอกจากนี้โครงสร้างของทุติยภูมิของอาร์เอ็นเออาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเริ่มต้นการแปลรหัส ถ้าบริเวณนี้มีความเสถียรมากอาจทำให้เกิดการขัดขวางการเข้าไปของไรโบโซมทำให้ไม่สามารถเกิดการเริ่มต้นการแปลรหัส หรือทำให้ประสิทธิภาพในการเริ่มต้นการแปลรหัสลดลง (Spirin และคณะ, 1999)

การติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีน SFR2 โดยใช้โปรตีนติดตามสองชนิดคือ GFP และ GUS ในเซลล์หัวหอมและเซลล์สาหร่ายหางกระรอก พบว่าโปรตีน SFR2 มีการเคลื่อนที่ไปที่คลอโรพลาสต์

การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน SFR2 ไม่สามารถทำได้โดยการผลิตโปรตีนชนิดนี้ใน *E. coli* ดังนั้นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมควรเป็นเซลล์ของพืช เนื่องจากโปรตีนชนิดนี้สามารถแสดงออกได้ใน green tissue เท่านั้น (Thorlby และคณะ, 2004) เพื่อทำการศึกษาโปรตีน SFR2 ต่อไป

ตารางที่ 4.1 สรุปการแสดงผลและการตรวจสอบโปรตีน SFR2 บน SDS-PAGE และเวสต์เทิร์นบลอต และการตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยวิธีนอร์เทิร์นบลอต

รูป	ชื่อ	SDS-PAGE	WB	NB
	AK_SFR2	✗	✓	✓
	26_SFR2	✗	✓	✓
	27_SFR2	✗	✓	✓
	28_SFR2	✓✓	✓✓	✓✓
	29_SFR2	✓✓	✓✓	-
	26_mutPEST_SFR2	✗	✓	-
	26_SFR2_syn	✗	✓	-
	31_SFR2_delC (mP)	✓	✓✓	✓
	32_SFR2_delC (mP)	✓	✓✓	✓✓
	33_SFR2_delC	✗	✓	✓✓
	34_SFR2_delC	✗	✓	✓
	37_SFR2 (pCold)	✗	-	-
	37_mutPEST_SFR2 (pCold)	✗	-	-

หมายเหตุ: WB = western blot, NB = northern blot, ✓ = ตรวจสอบได้, ✓✓ = ตรวจสอบได้ในปริมาณมาก, ✗ = ไม่สามารถตรวจสอบได้, - = ไม่ใช้ในการทดลอง

จากการทำการศึกษาทั้งหมด ประโยชน์ที่ได้จากโครงการนี้คือ สามารถผลิตมหาบัณฑิตที่มีความสามารถและศักยภาพทั้งความรู้และความสามารถในการแก้ปัญหาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และการแสดงออกของโปรตีน และได้พัฒนาศักยภาพการวิจัยด้านการแสดงออกของโปรตีนของสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มทส

ภายใต้โครงการนี้ได้มีการนำเสนองานวิจัยต่างๆ ดังนี้

International Journal Publication

Opassiri R., Pomthong B., Akiyama T., Nakphaichit M., Onkoksoong T, Ketudat-Cairns M, and Ketudat Cairns JR. (2007) A stress-induced rice beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain Biochem. J. (408) 241-249

National and International Conference Presentations

Kajanawattana, S. and Ketudat-Cairns, M. The expression and detection of rice SFR2 in *Escherichia coli*. Proceeding of the 3rd Graduate conference Suranaree University of Technology 21-23 November 2010 (poster presentation)

Kajanawattana, S. and Ketudat-Cairns, M. The effect of PEST Sequence Region to the Expression of Rice *SFR2* Gene in *Escherichia Coli*. Proceeding of the 15th National Graduate Research Conference Nakhon Ratchasima Rajabhat university 14-15 December 2009 (poster presentation)

Kajanawattana, S. and Ketudat-Cairns, M. Expression of Rice *SFR2* Gene in *Escherichia Coli* Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology “Biotechnology for Global Care” Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand October 14-17, 2008. (poster presentation)

Nakphaichit, M., Ketudat-Cairns, J. and Ketudat-Cairns, M. Characterization of β -glucosidase from rice *SFR2* gene The annual meeting of science and technology master research grant Thailand Research Fund 20-22 April 2007 Chonburi Thailand (Oral presentation)

Nakphaichit, M., Opassiri, R., Akiyama, T. and Ketudat-Cairns, M. Expression of rice β -glucosidase in bacteria, yeast and plant cell. The KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (ICIST) “Biological Diversity, Food and Agricultural Technology” April, 26-27, 2007 Bangkok, Thailand (Oral presentation)

Nakphaichit, M. and Ketudat-Cairns, M Lack of Expression of Recombinant Rice *B*-Glucosidase *SFR2* in *Escherichia coli* The 6th National Symposium on Graduate Research, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand 23-24 Oct 2006 (Poster Presentation)

เอกสารอ้างอิง

- Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L. (2000). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, American Society of plant Physiologists Rockville Maryland.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. 10:(5), 411-421.
- Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**. 24:(1), 45-66.
- Chen, E., and Clarke, D. (2002). The PEST sequence does not contribute to the stability of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **BMC Biochemistry**. 3:(1), 29.
- Daly, R., and Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**. 18:(2), 119-138.
- Escamilla-Trevino, L. L., Chen, W., Card, M. L., Shih, M.-C., Cheng, C.-L., and Poulton, J. E. (2006). *Arabidopsis thaliana* β -Glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. **Phytochemistry**. 67:(15), 1651-1660.
- Esen, A. (1992). Purification and Partial Characterization of Maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. **Phytochemistry**. 98:(1), 174-182.
- Esen, A (1993). β - glucosidase. **Biochemical and molecular biology**. Washington DC : American chemical society.
- Fourrier, N., Bédard, J., Lopez-Juez, E., Barbrook, A., Bowyer, J., Jarvis, P., Warren, G., and Thorlby, G. (2008). A role for *SENSITIVE TO FREEZING2* in protecting chloroplasts against freeze-induced damage in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**. 55:(5), 734-745.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T.-H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B. M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.-l., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T. C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R. M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalima, T., Oliphant, A., and

- Briggs, S. (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**. 296:(5565), 92-100.
- Hsieh, M.-C., and Graham, T. L. (2001). Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**. 58:(7), 995-1005.
- Jung, K.-H., An, G., and Ronald, P. C. (2007). Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. **Nature Reviews Genetics** 9:(2), 91-101.
- Ketudat-Cairns, J. and Esen, A. β -glucosidase. A review. *Cellular and Molecular Life Science*. 67:(20), 3389-3405.
- Kurland, C., and Gallant, J. (1996). Errors of heterologous protein expression. **Current Opinion in Biotechnology**. 7:(5), 489-493.
- Moellering, E. R., Muthan, B., and Benning, C. (2010). Freezing Tolerance in Plants Requires Lipid Remodeling at the Outer Chloroplast Membrane. **Science**. 330:(6001), 226-228.
- Opassiri, R., Ketudat Cairns, J. R., Akiyama, T., Wara-Aswapati, O., Svasti, J., and Esen, A. (2003). Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. **Plant Science**. 165:(3), 627-638.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. **Science**. 234:(4774), 364-368.
- Seo, S. W., Yang, J., and Jung, G. Y. (2009). Quantitative correlation between mRNA secondary structure around the region downstream of the initiation codon and translational efficiency in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**. 104:(3), 611-616.
- Spirin., A. S. (1999). Translational control in Prokaryotes, in, **Ribosomes**, Volume. 1, page. 310, Kluwer academic/Plenum Publishers, New York.
- Streit, S., Michalski, C. W., Erkan, M., Kleeff, J., and Friess, H. (2008). Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. **Nature Protocols**. 4:(1), 37-43.
- Taniguchi, Y., Choi, P. J., Li, G.-W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A., and Xie, X. S. (2010). Quantifying *E. coli* Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells. **Science**. 329:(5991), 533-538.

- Thomashow, M. F. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 50:(1), 571-599.
- Thorlby, G., Fourrier, N., and Warren, G. (2004). The *SENSITIVE TO FREEZING2* Gene, Required for Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana*, Encodes a β -glucosidase. **Plant Cell**. 16:(8), 2192-2203.
- Walsh, G. (2000). **Proteins Biochemistry and Biotechnology**, John Wiley & Son, Inc., New York.
- Wu, X., Jörnvall, H., Berndt, K. D., and Oppermann, U. (2004). Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 313:(1), 89-96.



Prot. F N E P H V F V M L T Y C A G A W P G G 320
 AK_SFR2 TTCAATGAACCTCACGTTTTTGTGATGCTAACTTATGTGCGGGTCTGGCCTGGTGGA 960
 SFR2_Syn TTCAATGAACCACATGTTTTTGTGATGCTAACTTATGTGCTGGAGCTTGGCCAGGTGGA 896
 *****: ** ***** ** ** * .***** ** :*****:*****

Prot. D P N A I E V A T S T L P T G V Y N Q A 340
 AK_SFR2 GACCCTAATGCAATTGAAGTAGCAACATCTACTCTGCCAAGCTGGTGTATACAATCAGGCT 1020
 SFR2_Syn GATCCTAACGCTATCGAGTTGCTACTTCTACATTGGCTACAGGTGTTTACAACCAAGCT 956
 ** ***** **: ** * .** :** :*****: *****:*****:***** ** **

Prot. L H W M A I A H S E A Y D Y I H S K S K 360
 AK_SFR2 TTGCATTGGATGGCTATGTCACATTCTGAAGCCTATGACTACATACATTGCGAAAAGCAAG 1080
 SFR2_Syn TTGCATTGGATGGCTATCGCTACTCCGAAGCTTACGATTACATCCACTCCAAGCTAAG 1016
 *****:***** ** :** * .***** ** ** ***** .** ** * .: **

Prot. N E R K P I V G V A H H V S F T R P Y G 380
 AK_SFR2 AACGAAAGGAAGCCAATAGTTGGTGTGTCACACCATGTATCGTTTACAAGGCCATATGGG 1140
 SFR2_Syn AACGAGAAAGCCAATCGTTGGTGTGCTCATACGTTTCTTCACTAGACCTTACGGA 1076
 ***** .***** .*****: ** ** * :** ** * :** :** :** :**

Prot. L F D V A A V A L A N S L T L F P Y V D 400
 AK_SFR2 CTATTTGATGTGCTGCTGTCGCGCTAGCTAACTCATTGACCTTTTTTCTTACGTGGAT 1200
 SFR2_Syn TTGTTGACGTTGCTGCTGTTGCTTTGGCTAACTCCTTGACATTGTTCCATACGTTGAT 1136
 * .** * .***** ** * .***** .***** .** ** * :***** **

Prot. S I C D K L D F I G I N Y Y G Q E V I S 420
 AK_SFR2 AGCATATGTGATAAATGGACTTCATTGGAATCAACTACTATGGACAGGAGTTATATCA 1260
 SFR2_Syn TCAATCTGTGATAAGTTGGACTTTATTTGGTATCAACTACTACGGACAAGAAGTTATCTCT 1196
 : .** ***** .***** .*****:***** ***** .** .***** ** :

Prot. G P G L K L V D N D E Y S E S G R G V Y 440
 AK_SFR2 GGACCTGGTCTAAAGCTTGTGGATAATGATGAGTATAGTGAATCTGGCTGTTGGGTTTAT 1320
 SFR2_Syn GGTCCAGGATTGAAGTTGGTTGATAACGACGAATACTCTGAGTCCGGTAGAGGAGTTTAC 1256
 :*: ** : * .** * .***** ** * .** * : ** * .** * .** :** .*****

Prot. P D G L F R I L I Q F N E R Y K R L N I 460
 AK_SFR2 CCTGATGGGCTGTTCCGCATCCTGATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCAT 1380
 SFR2_Syn CCTGATGGATTGTTTCCGATCCTGATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCAT 1316
 ***** .***** * .** * .** * .** * .** * .** * .** * .** * .** * .** * .** *

Prot. P F V I T E N G V S D E T D L I R K P Y 480
 AK_SFR2 CCTTTTGTCTACTGAAAATGGAGTTTCTGATGAGACTGATCTGATGATGATGATGATGATGAT 1440
 SFR2_Syn CCATTCGTTTACTGAAAACGGTGTTCGATGAGACAGACTTGATCAGAAAAGCCTTAC 1376
 :*: ** * .** * .** * .** * .** * .** * .** * .** * .** * .** * .** *

Prot. I L E H L L A T Y A A I I M G V R V L G 500
 AK_SFR2 ATACTGGAACACTTGTAGCCACATACGCTGCCATCATTATGGGTGTCCTGACTTGGT 1500
 SFR2_Syn ATCTTGGAACATTTGTTGGCTACTTACGCTGCTATCATCATGGGTGTTAGAGTTTGGGA 1436
 ** .***** ***** .** * .***** ***** ***** ***** .** :** : * **

Prot. Y L F W T T S D N W E W A D G Y G P K F 520
 AK_SFR2 TATTTGTTTTGGACAACATCAGATAATTGGGAATGGGCGGATGGCTATGGTCCCAAGTTT 1560
 SFR2_Syn TACTTGTCTGGACTACATCTGACAACCTGGGAGTGGGCTGATGGTTATGGACCAAAGTTT 1496
 ** ***** *****:*****: ** * .***** ***** ***** ***** *****: ** .*****

Prot. G L V A V D R A N N L A R K P R P S Y F 540
 AK_SFR2 GGGCTTGTGCTGTTGACCGTCTAATAACCTAGCACGAAACCTCGCCCTCATACTTT 1620
 SFR2_Syn GGTTTGGTTGCTGTTGACAGACTAACAATTTGGCTAGAAAAGCCAAGACCTTCATATTT 1556
 ** * .***** ***** .** :***** ** * .** : * .** * .** : * .***** **

Prot. L F S R V V T T G K I T R Q D R M S A W 560
 AK_SFR2 TTATTCTCC----- 1629
 SFR2_Syn TTGTTTTCTAGAGTTGTTACTACAGGTAAAATTACTAGACAAGATAGAATGTCTGCTTGG 1616
 ** * .** *

Prot. R E L Q Q A A V Q K K T R P F F R A V D 580
 AK_SFR2 ----- 1676
 SFR2_Syn AGAGAATTGCAACAGGCTGCTGTTTCCAGAAAACAAGACCTTTCTTTAGAGCTGTTGAT

Prot. K H G R M Y A G G L D R P I Q R P F I L 600
 AK_SFR2 ----- 1736
 SFR2_Syn AAGCATGGTAGAATGTACGCTGGTGGATGGACAGACCAATCCAAGACCTTTCATCTTG

Prot. R D W R F G H Y K M E G L Q D P L S C F 620
 AK_SFR2 ----- 1796
 SFR2_Syn AGAGATTGGAGATTCCGGTCACTACAAGATGGAAGGATTGCAAGATCCATTGTCTTGTTC

Prot. I R C I F A P F S R Q K K I H Y I E D D 640
 AK_SFR2 ----- 1856
 SFR2_Syn ATCAGATGTATCTTCGCTCCTTTTTCCAGACGAAAGAAAATCACTACATCGAGGATGAC

Prot. V I S Y S I N 647
 AK_SFR2 -----
 SFR2_Syn GTTATTTCATATCTATCAATTAACCTCGAG 1886

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Mariena Ketudat-Cairns
2. รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี
อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150
e-mail: ketudat@sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) 3.24
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biology) 4.00
University of California, San Diego, USA
พ.ศ. 2538 ประกาศนียบัตร Industrial Biotechnology
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Germany
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
 - Molecular Biology & Genetic Engineering (Plant & Animal)
 - Recombinant Protein Production
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ: ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็น
ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี,
 - 7.2 ผู้ประสานงานชุดโครงการ การวิจัยโปรตีนแห่ง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
 - 7.3 หัวหน้าโครงการวิจัย : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้
 - โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อสูกิจ Y ของวัว
 - การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย
 - การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากยีส SFR2 ในข้าว รายงานฉบับนี้
 - การพัฒนาเครื่องหมายการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากมทส ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2554
 - การค้นหาและการแสดงออกของกลุ่มยีน Glycosyl Hydrolases ในจีโนมของข้าวหอมมะลิ ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2555
 - การโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรโคเนสสายสั้น ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2551

- การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเสนจากปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase จาก *Pyrococcus furiosus*
ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมัก ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2549
- การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคซิเดส โดย *Pichia pastoris* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2548
- การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม สรีระวิทยา และพฤติกรรมของไก่พื้นเมืองไทย
ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547
- การหาแผนที่ทางพันธุกรรมของไฟตง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2546
- การพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของโครโมโซมเพศปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Taq DNA polymerase ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2541

ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ แมว และสัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
 - Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions. (National Science and Technology Development Agency
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
 - Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2545
 - Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537
- 7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :
- คู่มือข้อ 7.3
- 7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ :
- โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิ Y ของวัว
 - สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2552 และได้ดำเนินการไปแล้ว 80%
 - การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย
 - สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2551 และได้ดำเนินการไปแล้ว 95%

Publications:

- Srirattana K, , Imsoonthornruksa S., Laowtammathron C, Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns M, Parnpai, R. (2012). Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of Trichostatin A treatment Cellular Reprogramming
- Imsoonthornruksa, S., A. Sangmalee, K. Srirattana, , R. Parnpai, M. Ketudat-Cairns (2011) Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring Cellular Reprogramming 14(1): 79-87
- Songwattana, P. and Ketudat-Cairns, M. (2011) Comparison between Serological and Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) Molecular Pathogens 2(3) 1-7 doi: 10.5376/mp.2011.02.0003
- Ruamkuson, D., Tongpim, S., and Ketudat-Cairns, M. (2011) A Model to develop biological probes from microflora to assure traceability of tilapia Food Control 22: 1742-1747
- Rattanasuk, S., Parnpai, R., and Ketudat-Cairns, M. (2011) Multiplex Polymerase Chain Reaction used for Bovine Embryo Sex Determination J of Reprod and Dev 57(4) 539-542

- Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, T. Nakai, R. Parnpai (2011) The effects of manipulation medium, culture system and recipient cytoplasm on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos J Reprod Dev 57(3) 385-392
- Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., Parnpai, R., **Ketudat-Cairns, M.** (2011) A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*, Journal of Biotechnology (151): 295-302
- Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, R. Parnpai (2010) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos Reprod Fert Dev 22(4): 613-24
- Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2010). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (*Bos taurus*) and Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos J Reprod Dev 56(1): 49-54.
- Ruamkusol, D., and Ketudat-Cairns, M. (2009) Optimum Conditions for DGGE of 16S rDNA from SUT Tilapia Intestinal Microflora Suranaree J. Aci Technol 16 (4)
- Rattanasuk, S., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Genetic Diversity of Felids' Cytochrome B Suranaree J. Aci Technol 16 (4)
- Kupradit, C., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) The extraction and purification of boar sperm surface protein Suranaree J. Aci Technol 16 (3) 245-251
- Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, R. Parnpai (2009) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos Reprod, Fert and Dev (accepted Oct 2009)
- Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2009). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (*Bos taurus*) and Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos J Reprod Dev doi:10.1262/jrd.09-135A
- Rattanasuk, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Chryseobacterium indologenes, novel mannanase producing bacteria, Songklanakarin Jo. of Sci and Tech 31(4) 395-399
- Kupradit, C., Charoenrat, T., and **Ketudat-Cairns, M.** (2008) Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain Production by *Pichia pastoris*: Effect of Induction Temperature Thai Journal of Biotechnology 8 (1) 99-105
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A. W. S., **Ketudat-Cairns, M.** and Parnpai, R. (2008) Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocyte J of Reprod and Dev accepted May 19th 2008
- Phetsom, J., Jung, K., **Ketudat-Cairns, M.**, and Ronald, P. (2007). Quality assessment of NSF Rice Oligonucleotide Array. Agricultural Sci. J. 38(6): 11-14.
- Opassiri R., Pomthong B., Akiyama T., Nakphaichit M., Onkoksoong T, **Ketudat-Cairns M**, and Ketudat Cairns JR. (2007) A stress-induced rice beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain Biochem. J. Immediate Publication, doi:10.1042/BJ20070734 16 August 2007
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya N. Laowtammathron, C., **Ketudat-Cairns, M.** and Parnpai, R. 2006. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. Reproduction, Fertility and Development 19(1) 141
- Lorthongpanich, C., K. Srirattana, S. Imsoonthornruksa, N. Sripunya, C. Laowtammathron, O. Kumpong, **M. Ketudat-Cairns** and R. Parnpai (2007) Expression and Distribution of Oct-4 in Interspecies-Cloned Long- Tailed Monkey (*Macaca fascicularis*) Embryo Reproduction, Fertility and Development 19(1) 149 doi:10.1071/RDv19n1Ab62

- Muenthaisong S, Laowtammathron C, **Ketudat-Cairns, M.**, Parnpai R, Hochi S. (2007) Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. *Theriogenology*. 67(4) 893-900
- Toonkool, P., Metheenukul, P., Sujiwattanasat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., **Ketudat-Cairns, M.**, Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J. (2006) Expression and purification of dalcocinase, a β -glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. *Protein Expression and Purification* (in press)
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Jahic M., Veide, A., and Enfors, S.-O., (2006) Increase total air pressure versus oxygen limitation for enhance oxygen transfer and production formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process *Biochemical Engineering Journal*. 30: 205-211.
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Enfors, S.-O., Jahic M., and Veide, A. (2006) Recovery of Recombinant β -glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high cell density culture broth. *Journal of Biotechnology* (122) 86-98
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns M.**, Stendahl-Andersen, H., Jahic M., and Enfors S.-O (2005) Oxygen limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess and Biosystems Engineering* (27) 399-406 ** *Received Best paper of the year award.*
**
- Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., **Ketudat-Cairns, M.**, Hochi, S., Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: the effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in culture medium, and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology* (64), 1185-1196
- Charoenrat, T., Vanichsrirattana, V., and **Ketudat-Cairns, M.** (2004) Recombinant β -glucosidase Production by *Pichia pastoris*: Influence of pH. *Thai Journal of Biotechnology* 5 (1) 51-55
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Likitdecharote, B. and Parnpai, R. (2004). *In vitro* development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Reprod. Fert. Dev.* (16): 149.
- Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and **Ketudat-Cairns, M.** (2000) Biotechnology Graduate Education in Thailand. *Thai J. of Biot* 2 (1): 55-62
- Carlini, L.E., **M. Ketudat**, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). *Plant Molec. Biol.*41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)
- Ketudat-Cairns, M.** (1998) *Biotechnology and Daily Life*. Suranaree J. Sci Technol 5:208-211
- Manakasem Y., Sornsuk P., and **Ketudat-Cairns M.** (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. *Suranaree J. Sci Technol* 5:95-100
- Schmidt, R. J., Pysh, L. D., **Ketudat, M.**, Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings
- Schmidt, R. J., **Ketudat, M.**, Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:689-700
- Ueda T, Wawerczak W, Ward K, Sher N, **Ketudat M**, Schmidt RJ, Messing J. (1992) Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* 4:701-709

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ: นางสาวศศิประภา กาญจนวัฒนา
ที่อยู่: 156 ซ. มิตรภาพ 15 ต. ในเมือง อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
วัน/เดือน/ปีเกิด: 26 เมษายน 2527
ศาสนา: พุทธ
สัญชาติ/เชื้อชาติ: ไทย

ประวัติการศึกษา

ระดับอุดมศึกษา (ปริญญาโท) วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
-ระดับอุดมศึกษา (ปริญญาตรี) วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ) สาขาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
-ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนมารีย์วิทยา จ. นครราชสีมา

ผลงาน

Kanjanawattana, S. and Ketudat-Cairns, M. (2010) The expression and detection of rice SFR2 in *Escherichia coli*.
In **Proceeding of 3rd SUT Graduate Conference 2010**. (pp. 216-217). Suranaree University of
Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. November 21-23, 2010.

Kanjanawattana, S. and Ketudat-Cairns, M. (2009) The effect of PEST sequence region to the expression of rice
SFR2 gene in *Escherichia coli*. In **Proceeding of 15th National Graduated Research Conference**. (pp.
76) Rajabhat University, Nakhon Ratchasima, Thailand. December 14-15, 2009.

Kanjanawattana, S. and Ketudat-Cairns, M. (2008) Expression of rice SFR2 gene in *Escherichia coli*. In
**Proceeding of 20th The Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for
Biotechnology (TSB2008)**. (pp. 45-53). Maha Sarakham University, Maha Sarakham, Thailand. October
14-17, 2008.