การศึกษาการแสดงออกและการตรวจสอบโปรตีน SFR2 จากข้าวใน *Escherichia coli* และ *Pichia pastoris* (THE EXPRESSION AND DETECTION OF RICE SFR2 IN *ESCHERICHIA COLI* AND *PICHIA PASTORIS*) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 126 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SFR2 ของข้าวใน *E. coli* และ *P. pastoris* ส่วนทางด้านปลายเอ็นและปลายซีของโปรตีน SFR2 ถูกสร้างใน *E. coli* ด้วยระบบของ pET32a ผลการทดลองพบว่ามีเพียงกรดอะมิโน 260 ตัวทางด้านปลายซีและกรดอะมิโน 174 ตัวทางด้านปลายเอ็นเท่านั้นสามารถแสดงออกใน *E. coli* ได้ส่วนของ PEST sequence ที่พบในโปรตีน SFR2 ซึ่งเป็นลำดับของกรดอะมิโนที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนโดยโปรติเอสถูกทำให้เปลี่ยนแปลงโดยเปลี่ยนกรดอะมิโนกลูตามิกเป็นกลูตามีนโดยวิธีพีซีอาร์มิวตาเจนเนซิส อย่างไรก็ตามเมื่อทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนพบว่า SFR2 ที่มีการมิวเทตไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ ดังนั้นจึงเปลี่ยนระบบจาก pET32a ไปเป็น pCold I และทำให้มีการแสดงออกใน *E. coli* เช่นเดิม ผลการทดลองพบว่าโปรตีน SFR2 ไม่สามารถแสดงออกได้โดยใช้ pCold I เช่นกัน เนื่องจากข้อจำกัดของการย้อมสี Coomassie blue ในการตรวจสอบโปรตีนบน SDS-PAGE จึงได้ทำการตรวจสอบโปรตีนโดยเทคนิค western blot เพื่อตรวจสอบหาโปรตีน SFR2 โดยการใช้โปรตีนส่วนปลายซีของ SFR2 เป็นแอนติเจนเพื่อสร้างแอนติเซรัม ผลการทดลองพบการแสดงออกของโปรตีน SFR2 แต่มีในปริมาณเพียงเล็กน้อย ดังนั้นระดับอาร์เอ็นเอของ SFR2 จึงถูกตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Northern blot พบว่า ระดับอาร์เอ็นเอของส่วนทางด้านปลาย 5' (ปลายเอ็นของโปรตีน) แสดงความสัมพันธ์กับผลการทดลองที่แสดงบน western blot คือ ระดับอาร์เอ็นเอน้อยจึงส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่น้อยด้วย อย่างไรก็ตามผลการทดลองของระดับอาร์เอ็นเอทางปลาย 3' (ปลายซีของโปรตีน) ไม่ได้แสดงออกในทิศทางเดียวกัน *P. pastoris* ถูกใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีน SFR2 อย่างไรก็ตามผลการทดลองใน SDS-PAGE ไม่ได้บ่งบอกอย่างชัดเจนว่ามีการแสดงออกของ SFR2 หรือไม่

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SASIPRAPA KANJANAWATTANA : THE EXPRESSION AND DETECTION OF RICE SFR2 IN *ESCHERICHIA COLI* AND *PICHIA PASTORIS*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 126 PP.

SFR2/PROTEIN EXPRESSION/PROTEIN DETECTION

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.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2010 Advisor's Signature_____