บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

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

ยีน *Sensitive to freezing2* หรือ *SFR2* เป็นยีนที่ถูกค้นพบใหม่ในอะราบิดอปซิส (*Arabidopsis*) โดย Thorlby และคณะในปี 2004 ยีนนี้จัดอยู่ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี่ 1 ผลผลิตของยีนนี้ช่วยเกี่ยวกับความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิของพืช ในปี 2008 Fourrier และคณะพบว่า โปรตีน SFR2 มีการเคลื่อนที่ไปที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของคลอโรพลาสและมีหน้าที่ปกป้องการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเย็น/เยือกแข็ง ในปี 2010 Mollering และคณะได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของโปรตีน พบว่า ยีน SFR2 แปลรหัสให้โปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม galactolipid remodeling enzyme โดยทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายหมู่กาแลคโตซิล (galactosyl) จากโมโนกาแลคโตลิปิด (monogalactolipid) เพื่อนำไปที่ตัวรับ (galactolipid acceptors) เพื่อสร้างโอลิโกกาแลคโตลิปิด (oligogalactolipids) และไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) และเปลี่ยนเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล (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 (Thermophillic) และทนเกลือ (Halophillic) มากกว่าโปรตีนในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี่ 1 จากพืชชนิดอื่น

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

โปรตีน SFR2 ในเซลล์ (protein localization) โดยคาดว่างานวิจัยนี้จะนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับหน้าที่ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวต่อสภาวะเครียดในสภาพธรรมชาติซึ่งบทบาทเหล่านี้อาจจะนำไปสู่การพัฒนาเพื่อผลผลิตข้าวซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศไทยต่อไป อย่างไรก็ตามเมื่อมีการศึกษาโปรตีน SFR2 โดยผ่านระบบรีคอมบิแนนท์ โดยใช้ *Escherichia coli* และ *Pichia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อทำการผลิตโปรตีน พบว่าไม่สามารถผลิตโปรตีนชนิดนี้ได้เมื่อมีการตรวจสอบโดยใช้วิธี SDS-PAGE จึงได้ทำการตัดยีนทั้งทางด้านปลาย 5' และ 3' ออกเป็นส่วนๆ เพื่อวิเคราะห์หาสาเหตุ รวมถึงตรวจสอบความสามารถในการผลิตอาร์เอ็นเอและโปรตีนในเซลล์ *E. coli* และ *P. pastoris*

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีน *SFR2* จากข้าว กับไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี่ 1 จาก ข้าว และ แบคทีเรียอื่น ๆ
2. ศึกษาหน้าที่ทางชีวเคมีของเอนไซม์ SFR2 โดยศึกษาถึงตำแหน่งของโปรตีน SFR2 ในเซลล์ เพื่อใช้ในการทำหน้าที่ของยีน *SFR2* ในข้าว
3. ศึกษาส่วนต่างๆ ของยีน *SFR2* ที่ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli*
4. ทำการผลิตโปรตีน SFR2 ใน *P. pastoris*
5. ศึกษาระดับการทรานสคริปชั่นของยีน *SFR2* ใน *E. coli* และ *P. pastoris* โดยวิธีนอร์ทเทิร์นบลอท

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ใช้ซีดีเอ็นเอของยีน *SFR2* จากข้าว (DDBJ Accession AK119461) ซึ่งได้รับมาจากศูนย์รวบรวม พันธุกรรมข้าว (Rice Genome Resource Center) มาเป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้วิธีพีซีอาร์
2. ใช้ pET32a และ pCOLD I เป็นเวคเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีน (expression vector) ใน *E. coli*
3. ใช้เทคนิค SDS-PAGE และเวสเทิร์นบลอทในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน SFR2
4. ใช้เทคนิคนอร์ทเทิร์นบลอทในการตรวจสอบระดับอาร์เอ็นเอของยีน *SFR2*
5. ใช้ pPICZαBNH8/DEST เป็นเวคเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีนใน *P. pastoris*
6. ใช้ pMDC43, pMDC83 และ pMDC140 เป็นเวคเตอร์ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชสำหรับการแสดงออกของโปรตีนเพื่อติดตามตำแหน่งของโปรตีน 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 ในสัตว์ พืช เชื้อรา ยูแบคทีเรียและอาเคีย (Archaea) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการสลายพันธะกลูโคซิดิกซึ่งเชื่อมระหว่างกลูโคสและอาคิล (akly) อาริล (aryl) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) เพื่อปลดปล่อยกลูโคสและอไกลโคน (Opassiri และคณะ, 2003) ในปี 1998 มีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Clavibacter michiganense* ว่าสามารถย่อยสลายพันธะเอสเตอร์ใน steviol glycosides อย่างไรก็ตามความเร็วในการย่อยสลายเกิดขึ้นได้ช้ากว่าการย่อยสลายพันธะกลูโคซิดิก (Nakano และคณะ, 1998)

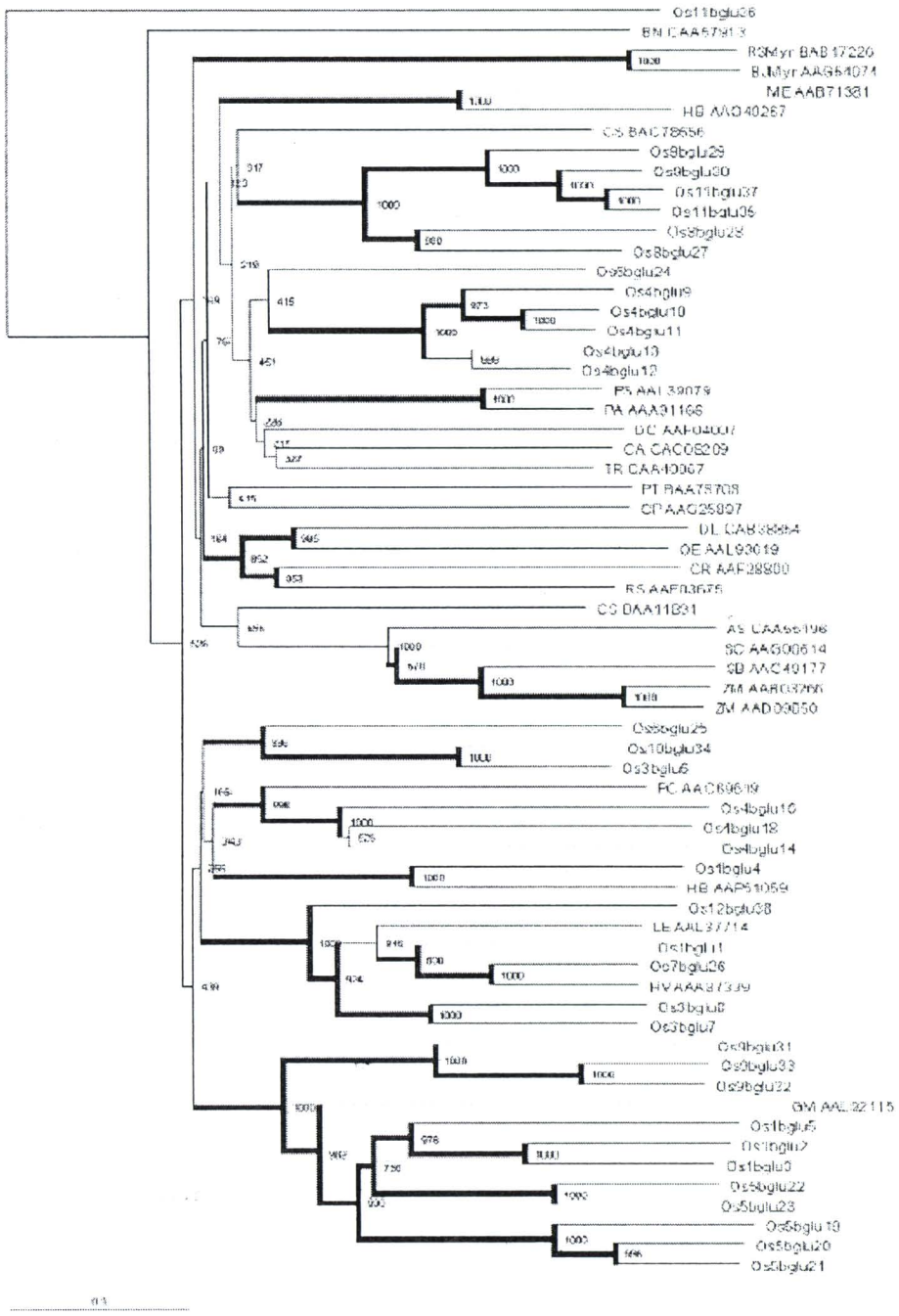
ส่วนมากแล้วเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะอยู่ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี่ 1, 3, 5, 9, 30 และ 116 (Ketudat-Cairns และ Esen, 2010) ส่วนเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่พบในพืชมักจัดอยู่ในกลุ่ม ไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี่ 1 (Opassiri และคณะ, 2006) เอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่หลากหลายในพืชเกี่ยวกับกระบวนการจัดการทางชีวภาพ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

ย่อยสลายคอนจูเกตของจิบเบอเรลลินและการเปลี่ยนไซโตไคนินจาก storage form ไปเป็น active form (Dietz และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านทานความเครียดของพืช และกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชจากจุลินทรีย์ แมลงและปรสิต (Esen, 1992) รวมถึงการลิกนิฟิเคชั่น (Escamilla-Trevino และคณะ, 2006) รายงานเกี่ยวกับยีนเบต้า-กลูโคซิเดส *BGLU45* และ *BGLU46* จากอะราบิดอปซิสระบุว่ายีนชนิดนี้แปลรหัสให้โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโมโนลิกนอลกลูโคไซด์ (monolignol glucoside) เพื่อปลดปล่อยโมโนลิกนอล (monolignol) เพื่อไปรวมกับสารอื่นและสร้างเป็นลิกนิน ส่วนหน้าที่อื่นๆ ของเบต้า-กลูโคซิเดสได้แก่ การปลดปล่อยสารระเหย, การปลดปล่อยกลูโคสเพื่อกระตุ้นในเกิดการทำงานของของออไกลโคน (Opassiri และคณะ, 2006) การเจริญเติบโตของดอกและการสร้างเม็ดสี (Hsieh และ Graham, 2001) เพื่อให้มีหน้าที่ต่างๆกันดังนั้นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจึงต้องมีความสามารถในการจับกับออไกลโคนได้หลากหลาย (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 แฟมิลี่ 1 ซึ่งมีลำดับเบสที่แอคทีฟไซต์ที่ถูกอนุรักษ์ไว้ของกลุ่มนี้คือ TFNEP และ I/VTENG จากแผนภูมิรูปต้นไม้พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SFR2 จากยีน *Os11bglu36* ของ *Oryza sativa* มีความแตกต่างจากเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสอื่นๆในไกลโคซิลไฮโดรเลสแฟมิลี่เดียวกัน (รูปที่ 1) โปรตีน SFR2 ถูกพบครั้งแรกในอะราบิดอปซิส ในปี 2004 โดย Thorlby และคณะ ในการทดลองนั้นผู้ทดลองได้ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์และในระดับอณูระหว่างพืชปกติที่มียีน *SFR2* อยู่ และพืชที่มีการมิวเทตของยีนชนิดนี้ (*sfr2-1*) พบว่าในระดับอณูระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (transcription) ของต้นพืชปกติและพืชกลายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อพืชอยู่ในสภาวะอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงสรุปว่ายีนชนิดนี้มีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอตลอดเวลา ส่วนลักษณะทางฟีโนไทป์พบว่าต้นพืชกลายพันธ์เกิดความเสียหายเนื่องจากความเย็นเมื่อพืชอยู่ที่อุณหภูมิ -6 ^{o}C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน SFR2 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการปกป้องพืชเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเย็นโดยมีการแสดงออกของยีนตลอดเวลา ต่อมาในปี 2008 Fourrier และคณะ ได้ทำการศึกษาตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์ในอะราบิดอปซิส โดยใช้ GFP เป็นโปรตีนติดตามพบว่าโปรตีน

SFR2 มีการ เคลื่อนที่ไปที่เยื่อหุ้มคลอโรพลาสชั้นนอก (chloroplast outer envelope) นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีน SFR2 มีหน้าที่ในการปกป้องคลอโรพลาส โดยผู้ทดลองได้ทำการเปรียบเทียบคลอโรพลาสระหว่าง พืชปกติและพืชกลายพันธุ์พบว่า คลอโรพลาสของพืชกลายพันธุ์เกิดความเสียหายอย่างรวดเร็วเมื่อมีนำออกมา จากสภาวะเย็นแล้วเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในปี 2010 Mollering และคณะได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของ โปรตีน พบว่า ยีน *SFR2* แปลรหัสให้โปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม galactolipid remodeling enzyme โดยทำหน้าที่ในการ เคลื่อนย้ายหมู่ galactosyl จาก monogalactolipid เพื่อนำไปที่ galactolipic acceptors เพื่อสร้างoligogalactolipids และ diacylglycerol และเปลี่ยนเป็น triacylglycerol การทำหน้าที่ร่วมกันระหว่าง SFR2 และเอนไซม์ซึ่งทำ หน้าที่ในการสังเคราะห์ triacylglycerol ทำให้ mologalactolipid ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์หลุดออกไป ซึ่งทำให้ เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง bilayer และ non-bilayer ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเสถียรมากขึ้น



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

ในการผลิตโปรตีนโดยผ่านระบบรีคอมบิแนนท์ เซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้มากคือ *E. coli* เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาไม่แพง มีลำดับสารพันธุกรรมที่รู้แน่นอนและมีเวคเตอร์และสายพันธุ์ของ *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) การขาดหายไปของกระบวนนี้อาจส่งผลหรือไม่ส่งผลต่อโปรตีนในทางชีวภาพก็ได้ ยิ่งไปกว่านั้นการผลิตโปรตีนจากยูคาริโอตในเซลล์ *E. coli* อาจประสบปัญหาบางประการ ได้แก่

1. Codon usage

ความแตกต่างของโคดอนระหว่างเซลล์โพรคาริโอตและยูคาริโอตมีผลอย่างมากต่อการผลิต heterologous protein โดยยีนที่มีโคดอนแตกต่างจากเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้อาจส่งผลทำให้เกิดการผลิตโปรตีนได้น้อย (Kurland และ Gallant, 1996) และการมีอยู่ของ rare codon ที่มากเกินในยีนอาจนำไปสู่กระบวนการแปลรหัสที่ผิดพลาดเนื่องจากไรโบโซมติดอยู่บริเวณตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ต้องจับคู่กับ tRNA ที่มีปริมาณน้อยในเซลล์ ปริมาณของกรดอะมิโนที่มีน้อยใน *E. coli* ส่วนใหญ่คือ อาร์จินีน (AGG, AGA, CGG และ CGA), ลิวซีน (CUA), ไอโซลิวซีน (AUA) และโพรลีน (CCC) ซึ่งส่วนใหญ่ทำให้เกิดการเปลี่ยนเฟรมในการแปลรหัสและนำไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ (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) และทรีโอนิน (T) อยู่ด้วยกันใน

ปริมาณมากกว่า 1 หรือ 2 ตำแหน่ง และในบริเวณนี้จะขนาบข้างด้วยกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเป็นส่วนใหญ่ ตำแหน่งของ PEST sequence ในโปรตีนสามารถทำนายได้โดยใช้โปรแกรม PEST-find ซึ่งโปรแกรมนี้จะแสดงผลออกมาเป็นลำดับกรดอะมิโนและคะแนนที่อยู่ระหว่าง -50 ถึง +50 โดยคำนิยามแล้วถ้าคะแนนมีค่ามากกว่า 0 ถือว่ามีความเป็นไปได้ที่ลำดับกรดอะมิโนที่ทำนายมีคุณสมบัติเป็น PEST sequence และถ้าคะแนนมากว่า +5 ลำดับกรดอะมิโนนั้นยิ่งมีความน่าจะเป็น PEST sequence ที่จะกระตุ้นให้โปรตีนนี้ถูกทำลายหรือมีเวลาครึ่งชีวิตที่สั้น อย่างไรก็ตาม PEST sequence ไม่ใช่ปัจจัยหลักเพียงอย่างเดียวที่ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์อย่างรวดเร็วต้องใช้ประกอบกับปัจจัยอื่นๆ เช่น ขนาดของโปรตีน โดยโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าถูกย่อยสลายได้เร็วกว่า, ประจุของโปรตีน โดยโปรตีนที่มีประจุลบถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าโปรตีนที่มีประจุบวก เป็นต้น

ชนิดของเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SFR2

1. BL21(DE3) p*lys*S

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

2. Origimi(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 เซลล์เจ้าบ้านชนิดนี้เหมาะกับพลาสมิดที่มีความต้านทานต่อแอนติไบโอติกแอมพิซิลินและเหมาะกับการใช้กับเวคเตอร์ pET32 นอกจากนี้พลาสมิดที่มียีนมิวเทต *trxB* และ *gor* อยู่มีความต้านทานต่อคานามัยซินและเทตราซัยคลิน ตามลำดับ ดังนั้น Origami(DE3) จึงไม่สามารถใช้พลาสมิดที่มีความต้านทานต่อแอนติไบโอติกทั้งสองชนิดนี้ได้

3. Origami B(DE3)

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

โดยการควบคุมความเข้มข้นของ IPTG ดังนั้นสายพันธุ์Origami B จึงมีการผสมผสานคุณสมบัติของเซลล์ *E. coli* หลายสายพันธุ์ ได้แก่ BL21, Tuner™ และ Origami ซึ่งสายพันธ์เหล่านี้มีการขาดหายไปของยีน *lon* และ *ompT* ซึ่งช่วยให้โปรตีนที่ได้มีความเสถียรมากขึ้น ดังนั้นสายพันธุ์ชนิดนี้เหมาะกับการผลิตโปรตีนโดยใช้เวคเตอร์ pET32 และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG

4. Rosetta-gami(DE3)

เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์นี้ดัดแปลงมาจากสายพันธุ์ Origami โดยโปรตีนที่ได้มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์เนื่องจากการมิวเทตไปของยีน *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 มีการใส่พลาสมิดที่มียีนที่แปลรหัสให้ชาโปโรนิน (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* ซึ่งเป็นเซลล์โปรคาริโอตประสบปัญหาเมื่อนำมาใช้ผลิตโปรตีนจากยูคาริโอต การใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง โดยในการศึกษานี้เลือกใช้ *P. pastoris* ซึ่งยีสต์ชนิดนี้สามารถใช้เมธานอลเป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (methylotrophic yeast) ข้อดีของ *P. pastoris* คือสามารถเลี้ยงและจัดการได้ง่ายกว่าการเลี้ยง ma มิลลิโมลาร์alian cells นอกจากนี้ *P. pastoris* ยังสามารถเจริญและให้ปริมาณเซลล์สูง และอีกเหตุผลประการหนึ่งที่สำคัญคือ *P. pastoris* เป็นเซลล์ยูคาริโอต ดังนั้นจึงมี ความสามารถที่จะผลิต soluble protein ที่ทำให้เกิดการม้วนพับของโปรตีนลูกผสมที่ถูกต้องกว่าเซลล์ *E. coli* อีกทั้งมีกระบวนการ post-translation modification ทำให้ได้โปรตีนมีการทำหน้าที่ได้อย่างเหมาะสม (Daly และ Hearn, 2005) ระบบการผลิตโปรตีนของ *P. pastoris* เกี่ยวข้องกับการใช้เมทานอลในกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยเอนไซม์แอลกฮอล์ออกซิเดส (AOX) เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายเมธานอล โดยการออกซิเดชั่นเปลี่ยนจากเมธานอลไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยส่วนหนึ่งของฟอร์มาลดีไฮด์ถูกส่งออกจากเพอร์อกซิโซม

(peroxisome) ซึ่งต่อมาถูกออกซิไดซ์ไปเป็นฟอเมตและคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส 2 ตัวที่อยู่ที่ไซโตพลาสซึม ซึ่งพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายเมธานอลมาจาก 2 ปฏิกิริยานี้

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