บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การโคลนยีน SFR2

2.1.1 การเพิ่มจำนวนยีน SFR2 ด้วยวิธีพีซีอาร์

ซีดีเอ็นเอของ *SFR2* (DDBJ Acession AK119461) ถูกใช้เป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* โดยใช้ไพร์เมอร์ 5 คู่ที่ออกแบบจากซีดีเอ็นเอ AK119461 ซึ่งจับที่ตำแหน่งต่างๆ กันในยีน *SFR2* เพื่อสร้างยีนที่มีขนาดต่างๆ กัน คู่ไพร์เมอร์ 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 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย ซีดีเอ็นเอแม่แบบความเข้มข้น 10 นาโนกรัม, 1X Taq buffer (Promega), $MgCl_2$ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTP เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, ไพร์เมอร์เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Taq polymerase (Homemade) 1 ไมโครลิตร โดยสภาวะ พีซีอาร์ แสดงในตารางที่ 2.2

สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ที่ทำการตัดปลายทางด้าน 3' ใช้คู่ไพร์เมอร์ 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) แล้วนำโคลนเข้าไปในโคลนนิ่งเวคเตอร์ pENTR-D/TOPO (Invitrogen) โดยแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 µl ของเวคเตอร์ความเข้มข้น 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 ที่มีชิ้นของยีน SFR2 อยู่ถูกสกัดออกมาจากเซลล์โดยใช้ plasmid extraction kit (QIAGEN) และนำไปตรวจสอบหาลำดับเบสโดยใช้ไพร์เมอร์ M13

ชิ้นส่วนของ SFR2 ที่อยู่ในโคลนนิ่งเวคเตอร์ถูกย้ายไปสู่ 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* DHα 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* เข้าเวคเตอร์ pCold I

ซีดีเอ็นเอของยีน SFR2 แบบปกติและแบบที่มีการมิวเทต PEST sequence ถูกโคลนเข้าไปในเอ็กเพรสชั่นเวคเตอร์ pCold I โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตัวคือ *Kpn*I และ *Sal*I และใช้ไพร์เมอร์ 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), $MgCl_2$ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTP เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, ไพร์เมอร์เข้มข้น 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) แล้วถูกโคลนเข้าไปในโคลนนิ่งเวคเตอร์ pGEM-T easy ในปฏิกิริยาไลเกชั่นประกอบด้วยเวคเตอร์ 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* DH5α โดยวิธี 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 เวคเตอร์ pCold I, pGEM_37_SFR2 และ pGEM_37_mutPEST_SFR2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนั้นตัดด้วย *Sal*I ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel extraction kit (QIAGEN) หลังจากนั้นเวคเตอร์ pCold I ที่เป็นเส้นตรงและชิ้นส่วนยีน 37_SFR2 หรือ 37_mutPEST_SFR2 ถูกเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (NEB) ที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* DH5α โดยวิธี electroporation โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้น pCold I ที่มีชิ้น *SFR2* อยู่ถูกสกัดออกมาจากเซลล์โดยใช้ plasmid extraction kit (QIAGEN)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.1.3 การโคลนยีน 26_SFR2_syn เข้าเวคเตอร์ pPICZαBNH8 และ pET32a

ยีน 26_SFR2_syn เป็นยีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อให้โคดอนที่อยู่ภายในยีนมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนโดยใช้ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ยีน 26_SFR2_syn ถูกทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธีการพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ 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) และโคลนเข้าไปในโคลนนิ่งเวคเตอร์ pENTR-D/TOPO และย้ายชิ้นส่วนยีน 26_SFR2_syn จากเวคเตอร์นี้ไปสู่ pPICZαBNH8 และ pET32a โดยใช้เอนไซม์ LR clonase โดยแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 ไมโครลิตร ของ pENTR_26_SFR2_syn ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม, 2 ไมโครลิตรของ pET32a/DEST หรือ pPICZαBNH8 /DEST ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมและเอนไซม์ LR clonase 2 ไมโครลิตร ส่วนผสมทั้งหมดถูกบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* DHα โดยวิธีการ electroporation โดยเซลล์ *E. coli* ถูกสเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับคัดเลือกพลาสมิด pET32a หรือ ซีโอซินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับคัดเลือกพลาสมิด pPICZαBNH8 หลังจากนั้น pET26_SFR2_syn และ pPICZ_26_SFR2_syn ถูกสกัดออกมาจากเซลล์โดยใช้ plasmid extraction kit (QIAGEN)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 05 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 249132
เลขเรียกหนังสือ

ตารางที่ 2.1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนและหาลำดับเบสยีน *SFR2*

ไพร์เมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')
AK_SFR2_F	CACCATGCCACTACCGGCGTTC
26_SFR2_F	CACCGACTTCCGCGCCTTTCC
28_SFR2_F	CACCGTGAGGCTTGTTGTTGATTGT
29_SFR2_F	CACCCCTGGTCTAAAGCTTGTG
30_SFR2_R	GGAGAATAAAAAGTATGAAGGCCGAGG
33_mutPEST_SFR2_F	TGGGCAAGGTTAATGCCTCAGCAACCAACCCAACAATTGAAG TGAGTT
34_mutPEST_SFR2_R	GCAAAAATAACTGAGCTCTTCAATTGTTGGGTTGGTTGCTGA GGCATTAACCTTGCCCA
28_SFR2_R	ACAATCAACAACAAGCCTCAC
37_SFR2_KpnI_F	GCCGGGTACCCTAGCAACAGCGCCTGCGCAT
32_SFR2_SalI_R	GCCGGTCGACGGAGAATAAAAAGTATGAAGGCCGAGG
26_SFR2_Syn_F	CACCGATTTCAGAGCTTTTCCTTC
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	คู่ไพร์เมอร์	อุณหภูมิแอนนีลลิ่ง (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 การมิวเทต PEST sequence ภายในยีน *SFR2* โดยวิธีพีซีอาร์มิวตาเจเนซิส

โคดอนที่แปลรหัสเป็นกรดกลูตามิก (E) ที่มีอยู่ภายใน PEST sequence ถูกมิวเทตไปเป็นโคดอนที่แปลรหัสเป็นกลูตามีน (Q) โดยวิธีพีซีอาร์มิวตาเจเนซิส 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 ถูกออกแบบมาให้เป็นคู่สมซึ่งกันและกันและมีการมิวเทตโคดอนของกรดกลูตามิกอยู่ที่ไพร์เมอร์นี้ สภาวะของ พีซีอาร์ ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ทั้ง 2 ส่วนแสดงดังตารางที่ 2.2 และยีน *SFR2* ทั้งสองส่วนถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel extraction kit (QIAGEN) หลังจากนั้นทั้งสองส่วนถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบเพื่อสร้างยีน *SFR2* สายเต็มที่มีการมิวเทตโคดอนของกรดกลูตามิกไปเป็นกลูตามีนโดยใช้พีซีอาร์สองขั้นตอน และใช้ไพร์เมอร์ 26_SFR2_F และ 30_SFR2_R ในปฏิกิริยาประกอบด้วยชิ้นส่วนของยีน *SFR2* ทั้งสองส่วนความเข้มข้น 10 นาโนกรัมเพื่อใช้เป็นแม่แบบ, 1X Taq buffer (Promega), $MgCl_2$ 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 ใช้เพื่อให้ไพร์เมอร์26_SFR2_F และ 30_SFR2_R ทำการเพิ่มจำนวนยีนให้เต็มสาย

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

ตารางที่ 2.3 สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ที่มีการมิวเทตบริเวณ PEST sequence

ขั้นตอนที่	สภาวะพีซีอาร์			
		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
1	Initial denaturation	94	2 นาที	
	Denature	94	30 วินาที	20 รอบ
	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	

2.3 การแสดงออกของโปรตีน

2.3.1 การแสดงออกของโปรตีน SFR2 โดยใช้เวคเตอร์ pET32a ใน *E. coli*

พลาสมิด pET ที่มีชิ้นส่วนของยีน *SFR2* ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) p*lys*S, 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 ที่มีแอนติไบโอติกแอมพิซิลินและเจนตามัยซิน ที่ 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 โดยใช้เวคเตอร์ pCold I ใน *E. coli*

พลาสมิด pCold_37_SFR2 และ pCold_37_mutPEST_SFR2 ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) p*lys*S, 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 โดยใช้เวคเตอร์ pPICZαBNH8 ใน *P. pastoris*

พลาสมิด pPICZ_26_SFR2_syn ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I ที่ 37 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้พลาสมิดที่ได้กลายเป็นเส้นตรง จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าไปใน *P. pastoris* SMD1168H โดยวิธีการ electroporation ที่ 1500 โวลต์ เซลล์ทั้งหมดถูกสเปรดบนอาหารแข็ง YPD ที่มีซีโอซินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โคโลนีที่ได้ถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว BMGY 50 มิลลิลิตร ที่ 28 องศาเซลเซียส, 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่เมธานอล 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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

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 ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินและเทตราไซคลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นเซลล์ที่มีพลาสมิดของแต่ละโคลนอยู่ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ที่มีแอนติไบโอติกที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเซลล์ *E. coli* ประมาณ 200 ไมโครลิตร ถูกใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 10 มิลลิลิตร ที่มีแอนติไบโอติกและเลี้ยงต่อไปจนมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ OD_{600} 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

แบนของโปรตีนลูกผสม 28_SFR2 ที่อยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำถูกตัดออกมาจากเจลโพลีอะคริลาไมด์และถูกนำไปแช่ในบัฟเฟอร์ (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) สารละลายที่เหลืออยู่ภายในถุงไดอะไลซิสถูกนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (1976) และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการนำไปผลิตแอนติเซรัม

2.4.1.2 การผลิตแอนติเซรัม

แอนติเซรัมถูกผลิตในกระต่ายขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ 2 ตัว โดยช่วงเวลาในการกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนแสดงดังตารางที่ 2.4 กระต่ายแต่ละตัวถูดฉีดสารละลายโปรตีนที่บริเวณใต้ผิวหนัง (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	นำเซรัมมาทดสอบด้วยวิธีการอีไลซ่า
42	กระตุ้นด้วยแอนติเจนความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม/กระต่าย 1 ตัว (แอนติเจนอยู่ใน Incomplete Freund's Adjuvant (IFA))
49	นำเซรัมมาทดสอบด้วยวิธีการอีไลซ่า
52	เก็บเลือดครั้งสุดท้าย

แอนติเซรัมที่ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบโปรตีน SFR2 โดยวิธีเวสเทิร์นบลอท (western blot) ดังนั้นก่อนนำมาใช้จึงผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยการเอาส่วนของโปรตีนฟิวชั่นไทโอรีดอกซิน (thioredoxsin fusion tag) ออก เวคเตอร์เปล่า pET32a ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน Origami(DE3) และให้มีการแสดงออกของโปรตีนฟิวชั่นไทโอรีดอกซิน จากนั้นเก็บโปรตีนเฉพาะส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ใส่แอนติเซรัม 20 µl ลงในไทโอรีดอกซินและโปรตีน *E. coli* 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ส่วนของแอนติเซรัม SFR2 ถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีและเก็บเฉพาะส่วนใสมาใช้ในการตรวจสอบโปรตีนโดยเวสเทิร์นบลอท

2.4.2 การตรวจสอบโปรตีนโดยเวสเทิร์นบลอท

โปรตีน SFR2 ถูกผลิตใน Origami(DE3) และโหลดโปรตีนทั้งหมดในเจลโพลีอะคริลาไมด์ จากนั้นโปรตีนบนเจลถูกส่งผ่านไปที่เมมเบรน PVDF โดยใช้ Semi-Phor (Hoefer 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 เมมเบรนถูฏล้างด้วยน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยาและทิ้งไว้ให้แห้ง สังเกตการเกิดสี

2.5 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยนอร์ทเทิร์นบลอท (Northern blot)

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

ในกระบวนการเตรียมโพรบ (probe) ซีดีเอ็นเอของยีน 28_SFR2 และ 34_SFR2_delC ถูกใช้เป็นแม่แบบเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โพรบซึ่งทำตามขั้นตอนที่แนบมากับชุดคิท (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 µl และทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยการต้มเป็นเวลา 10 นาทีและทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว เมื่อตัวอย่างเย็นแล้วใส่ Dig-High Prime 2 ไมโครลิตร จากนั้นปฏิกิริยาถูกบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ซึ่งโพรบที่สังเคราะห์ได้พร้อมสำหรับใช้ในกระบวนการไฮบริไดเซชั่น

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

หลังจากผ่านกระบวนการไฮบริไดเซชั่น ล้างเมมเบรนด้วย 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 เมมเบรนถูกนำออกมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและล้างเมมเบรนด้วย 1X washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที จากนั้นอาร์เอ็นเอบนเมมเบรนถูกบล๊อกด้วย 1X blocking solution เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเมมเบรนไปแช่ในสารละลายที่มีแอนติบอดีผสมอยู่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วย 1X washing buffer 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที ขั้นตอนสุดท้ายใส่ 1X color substrate solution และปล่อยให้มีการเกิดสีในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและล้างเมมเบรนด้วยน้ำ MQ เพื่อหยุดปฏิกิริยา สังเกตการเกิดสี

2.6 การติดตามตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์

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

ไพร์เมอร์ SFR2B1_f และ SFR2B2_r ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนยีน SFR2 ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และโคลนเข้าไปในเวคเตอร์ pDONR/Zeo (Invitrogen) ซึ่งเป็นเวคเตอร์ตัวให้ (entry clone) โดยใช้เอนไซม์ BP clonase เนื่องจากที่ปลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้นั้นมีส่วนของ attB อยู่ จากนั้นทำการส่งผ่านชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปสู่เวคเตอร์ตัวรับ (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 ลอกใบให้เป็นเนื้อเยื่อบางๆแล้ววางใบบนวุ้นความเข้มข้น 2%

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