

บทที่ 3

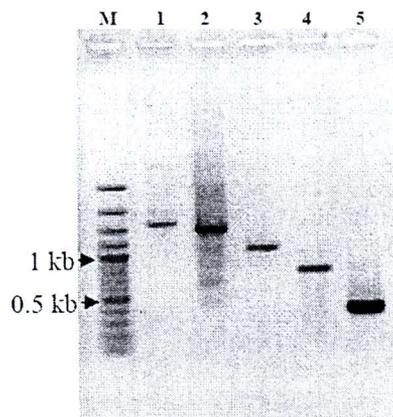
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การโคลนนิ่ง

3.1.1 การโคลนชิ้นส่วนยีน *SFR2* เข้าเวกเตอร์ pET32a

3.1.1.1 การโคลนยีน *SFR2* ที่ทำการตัดปลายทางด้าน 5'

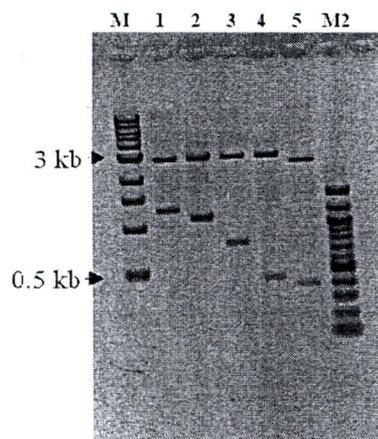
ไพรเมอร์ 5 ถูกใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *SFR2* ที่ตำแหน่งต่างๆ กัน ได้แก่ AK_SFR2, 26_SFR2, 27_SFR2, 28_SFR2 และ 29_SFR2 ซึ่งมีขนาด 1.6 kb, 1.4 kb, 1.1 kb, 780 bp, 360 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) โดยชิ้นส่วน AK_SFR2, 26_SFR2 และ 27_SFR2 มีส่วนของแอกทีฟไซต์ที่ถูกอนุรักษ์ไว้คือ TFNEP และ I/VTENG (Thorlby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



รูปที่ 3.1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพื่อใช้ในการ โคลนยีน 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 พลาสมิดที่มีชนิดเอ็นเอทีที่ต้องการอยู่ถูกสกัดออกมาโดยใช้ Plasmid extraction kit (QIAGEN) หลังจากนั้นทำการตัดพลาสมิด TOPO_AK_SFR2, TOPO_26_SFR2, TOPO27_SFR2 และ

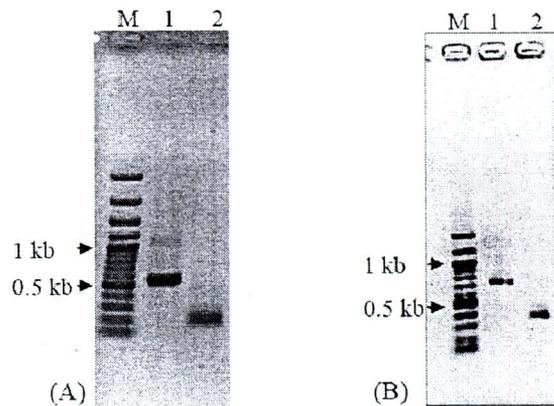
TOPO_28_SFR2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตัวคือ *NotI* และ *HindIII* ยกเว้น TOPO_29_SFR2 ทำการตัดด้วย *NotI* และ *AscI* ซึ่งทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นที่มีขนาดแตกต่างกัน ได้แก่ 2936/1273 bp, 2927/1117 bp, 2924/820 bp, 2936/424 bp และ 2580/360 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.2) จากนั้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ใน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

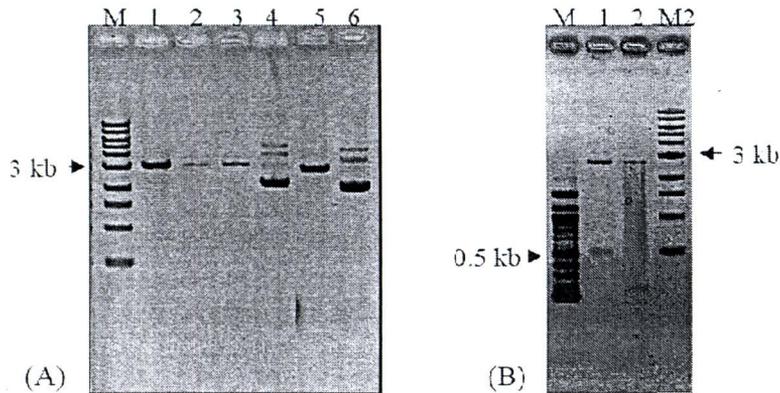
3.1.1.2 การโคลนยีน *SFR2* ที่ทำการตัดปลายทางด้าน 3'

ไพร์เมอร์ 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) มีการมีเวทของ PEST sequence บริเวณปลายด้าน 3' ซึ่งมีขนาด 552 bp, 165 bp, 714 bp และ 357 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 ผลิตรหัสพีซีอาร์เพื่อใช้ในการโคลนยีน (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

หลังจากผลิตรหัสพีซีอาร์ถูกทำให้บริสุทธิ์ได้ถูกโคลนเข้าไปใน 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

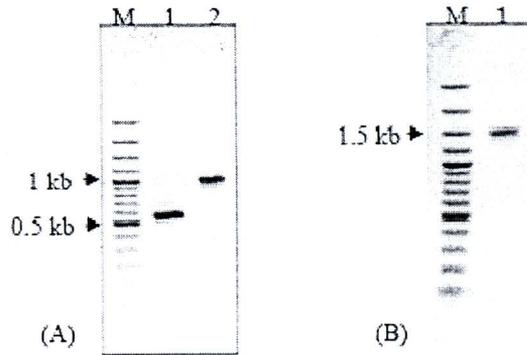
3.1.1.3.1 คุณสมบัติของ PEST sequence ที่พบในโปรตีน SFR2

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 ซึ่งถือว่ามีค่าน้อยอาจทำให้บริเวณนี้สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยโปรติเอส (Chen และคณะ, 2002)

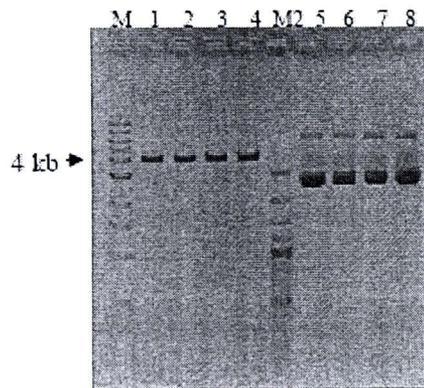
3.1.1.3.2 การโคลน 26_mutPEST_SFR2

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

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



รูปที่ 3.5 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำการมิวเทตบริเวณ PEST sequence โดยเปลี่ยนกรดกลูตามิกไปเป็นกลูตามีน (A) เลนที่ 1: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณด้านปลาย 5' ถึงบริเวณ PEST sequence (ชิ้นที่ 1) และ เลนที่ 2: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ PEST sequence ถึงด้านปลาย 3' (ชิ้นที่ 2) (B) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำการมิวเทตบริเวณ PEST sequence สายเต็ม 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	MPLPAFVAAAARLAVLVAAAAATAANAASYARYRRRLRRI P S P I D E S A D P L A D F R A P S S	60
26_mutPEST_SFR2	-----DFRAPSS	8

AK_SFR2	DADDSEEDNFFFGLATAPAHVEDRLEDAWLQFATETSCDDNGNVRDQRPVDALMASAAGD	120
26_mutPEST_SFR2	DADDSEEDNFFFGLATAPAHVEDRLEDAWLQFATETSCDDNGNVRDQRPVDALMASAAGD	68

AK_SFR2	GGSQQSWRSTGGENIGDREQRKPLRVAMEAMLRGFEILAESGESAGGDNC SHNVAAWHNV	180
26_mutPEST_SFR2	GGSQQSWRSTGGENIGDREQRKPLRVAMEAMLRGFEILAESGESAGGDNC SHNVAAWHNV	128

AK_SFR2	PCPQERLRFWSDPDAELKLAKETGISVFRMGVDWARLMPPEEPTTELKSSVNF AALERYRW	240
26_mutPEST_SFR2	PCPQERLRFWSDPDAELKLAKETGISVFRMGVDWARLMPPEEPTTELKSSVNF AALERYRW	185

AK_SFR2	IIQVRVREYGMKVMLTLFHHS LPPWAGKYGGWKMEKTVTYFMD FVRLVVDV CVSNLVDYVVI	300
26_mutPEST_SFR2	IIQVRVREYGMKVMLTLFHHS LPPWAGKYGGWKMEKTVTYFMD FVRLVVDV CVSNLVDYVVI	245

AK_SFR2	FNEPHV FVMLTYCAGAWGGDPNAIEVATSTLPTGVYNQALHWMIAHSEAYDIH S K S K	360
26_mutPEST_SFR2	FNEPHV FVMLTYCAGAWGGDPNAIEVATSTLPTGVYNQALHWMIAHSEAYDIH S K S K	305

AK_SFR2	NERKPIVGV AHVHSFTRPYGLFDVA AVALANSLTLFPYVDSICDKLDFIGIN YGQEVIS	420
26_mutPEST_SFR2	NERKPIVGV AHVHSFTRPYGLFDVA AVALANSLTLFPYVDSICDKLDFIGIN YGQEVIS	365

AK_SFR2	GPGLKLVND EYSESGRGVY PDGLFRILIQFNERYKRLNIPFVITENGVSDETDLIRKPY	480
26_mutPEST_SFR2	GPGLKLVND EYSESGRGVY PDGLFRILIQFNERYKRLNIPFVITENGVSDETDLIRKPY	425

AK_SFR2	ILEHLLATYAAIIMGV RVLGYLFWTTSDNWEWADGYGPKFGLVAVDRANNLARKPRPSYF	540
26_mutPEST_SFR2	ILEHLLATYAAIIMGV RVLGYLFWTTSDNWEWADGYGPKFGLVAVDRANNLARKPRPSYF	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

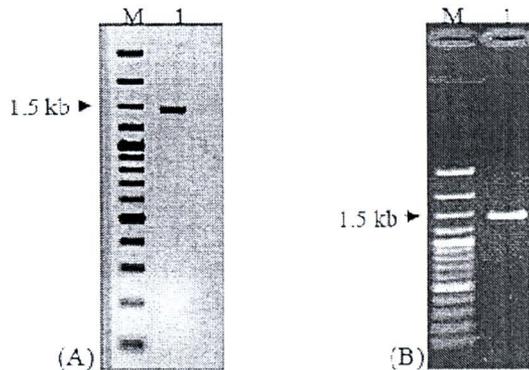
3.1.2.1 การโคลน 37_SFR2

ซีดีเอ็นเอ 37_SFR2 ถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ 37_SFR2_KpnI และ 32_SFR2_SaII_R ซึ่งมีขนาดประมาณ 1410 bp (รูปที่ 3.8A) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกทำให้บริสุทธิ์และตัดด้วยเอนไซม์ 2 ตัวคือ KpnI และ SaII 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) เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่พบการมิเทตหรือการเปลี่ยนแปลง

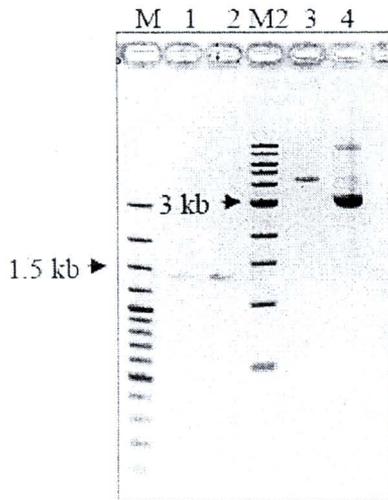
3.1.2.2 การโคลน 37_mutPEST_SFR2

ซีดีเอ็นเอ 37_mutPEST_SFR2 ถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ 37_SFR2_KpnI และ 32_SFR2_SaII_R ซึ่งใช้ TOPO_26_mutPEST_SFR2 เป็นแม่แบบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 1410 bp (รูปที่ 3.8B) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกทำให้

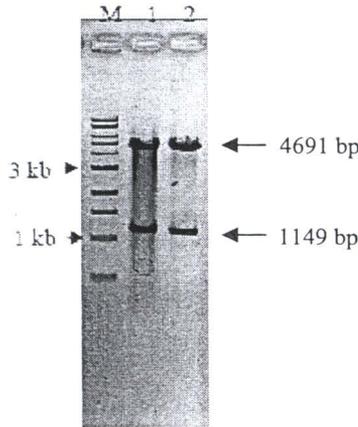
บริสุทธิ์และตัดด้วยเอนไซม์ 2 ตัวคือ *KpnI* และ *SalI* รวมทั้งเวกเตอร์ pCold I ด้วย หลังจากนั้น 37_mutPEST_SFR2 ถูกโคลนเข้าไปใน pCold I และพลาสมิดที่ได้ตั้งชื่อว่า pCold_37_mutPEST_SFR2 จากนั้นพลาสมิดถูกตัดด้วย *PstI* เพื่อตัดพลาสมิดออกเป็น 2 ชิ้นซึ่งมีขนาด 4691 bp และ 1149 bp (รูปที่ 3.10) เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ากรดกลูตามิกที่ตำแหน่ง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



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



รูปที่ 3.9 ผลึกษณ์พีซีอาร์ 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 เชนที่ 1: pCold_37_SFR2, เชนที่ 2: pCold_37_mutPEST_SFR2 และ เชน M: 1 kb marker

AK_SFR2	MPLPAFVAAAAARLAVLVAAAATAANAASYARYRRRHLRRI	PSPIDESADPLADFRAPSS	60
37_mutPEST_SFR2	-----	-----	
AK_SFR2	DADDSEEDNFFFLGATAPAHVEDRLEDAWLQFATETSCDDNGNVDRQRPVDALMASAAGD		120
37_mutPEST_SFR2	-----LATAPAHVEDRLEDAWLQFATETSCDDNGNVDRQRPVDALMASAAGD		47

AK_SFR2	GGSQQSWRSTGGENIGDREQRKPLRVAMEAMLRGFEILAESGESAGGDNCSHNVAAWHNV		180
37_mutPEST_SFR2	GGSQQSWRSTGGENIGDREQRKPLRVAMEAMLRGFEILAESGESAGGDNCSHNVAAWHNV		107

AK_SFR2	PCPQERLRFWSDPAELKLAKETGISVFRMGVDWARLMPPEEPTTEELKSSVNFALERYRW		240
37_mutPEST_SFR2	PCPQERLRFWSDPAELKLAKETGISVFRMGVDWARLMPQQPTQELKSSVNFALERYRW		167

AK_SFR2	IIQRVREYGMKVMLTLFHHSLLPPWAGKYGGWKMEKTVTYFMDFVRLVVDVSNLVDYWVI		300
37_mutPEST_SFR2	IIQRVREYGMKVMLTLFHHSLLPPWAGKYGGWKMEKTVTYFMDFVRLVVDVSNLVDYWVI		227

AK_SFR2	FNEPHVFVMLTYCAGAWPGGDPNAIEVATSTLPTGVYNQALHWMIAHSEAYDYIHSKSK		360
37_mutPEST_SFR2	FNEPHVFVMLTYCAGAWPGGDPNAIEVATSTLPTGVYNQALHWMIAHSEAYDYIHSKSK		287

AK_SFR2	NERKPIVGVAHHVSFTRPYGLFDVAVALANSLTLFPYVDSICDKLDFIGINYQGQEVIS		420
37_mutPEST_SFR2	NERKPIVGVAHHVSFTRPYGLFDVAVALANSLTLFPYVDSICDKLDFIGINYQGQEVIS		347

AK_SFR2	GPGLKLVNDNEYSESGRGVYPDGLFRILIQFNERYKRLNIPFVITENGVSDETDLIRKPY		480
37_mutPEST_SFR2	GPGLKLVNDNEYSESGRGVYPDGLFRILIQFNERYKRLNIPFVITENGVSDETDLIRKPY		407

AK_SFR2	ILEHLLATYAAIIMGVRLGYLFWTTSDNWEWADYGGPKFGLVAVDRANLARKPRPSYF		540
37_mutPEST_SFR2	ILEHLLATYAAIIMGVRLGYLFWTTSDNWEWADYGGPKFGLVAVDRANLARKPRPSYF		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 →
atgagatcttccctcaattcttactgctgcttttattccgcagcatccctccgcattagctgct
M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A
ccagctcaaacactacaacagaaagatgaaaacggccacaaaattccggctgaaagctgctcactcgggt
F V N T T T E E D E T A Q I P A E A V I G
tactcagatctcagaaggggatttccgatgcttggctgttttggccattttcccaacagccacaaat
Y S D L E G D F D V A V L F F S N S T N
aacggggttatctgcttataaaatactactattgcccagcatttggctgctaaagaagaaggggta
N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V

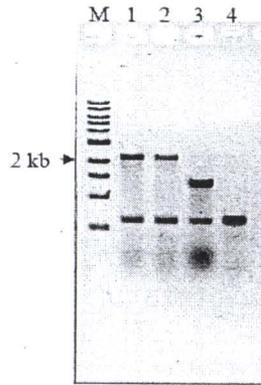
His-tag
tctctccgagaaaaagagaggctgaagctggcacatcaccatccaccatccaccatcctgctgca
S L I K R E A E A A H H H H H H H H A A

26_SFR2_syn →
gtacatcaaaacaagtcttgtaaaaaaagcaggtctcccgggccggcccccctccaccgatcttc
V H Q T S L Y K K A G S A A A P F T D F

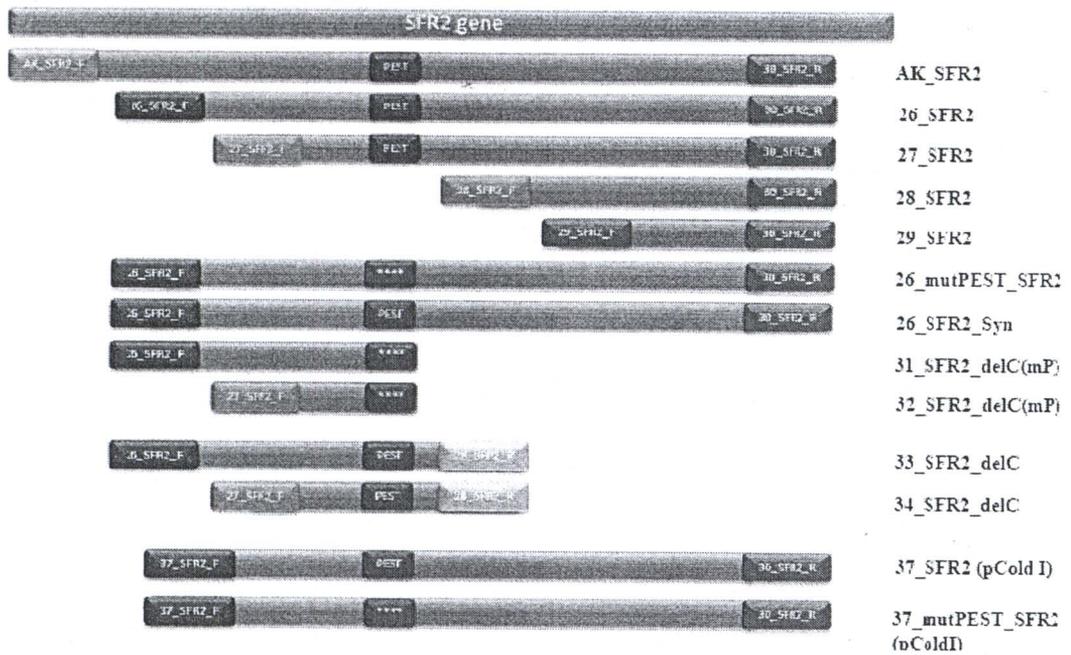
agagcttttccctctctcccgacgctgactcagaagaggataaacttttctcttgggttgy
R A F P S S D A D D S E E D N F F F G L
gctactgctccagctcacgcttgaaagacagattggaggatgctctgggtcggcaattccgctact
A T A F A H V E D R L E D A W L Q F A T
gaaacatccctgctgacgcaaacggtaaacgtttagagaccagagaccctgttggatgctctggatg
E T S C D D N G N V R D Q R P V D A L M
gcttccagctgctggagacgggtggatcccaaacagtcattggagatctactggtggagaaaaac
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 โคลนีนีพืชีอาร์เพื่อตรวจสอบยีน 26_SFR2_syn โดยใช้ไพรเมอร์ 5' AOX และ 3' AOX ใน *P. pastoris* เลนที่ 1 และ 2: ยีน 26_SFR2_syn ภายในเซลล์ยีสต์, เลนที่ 3: ยีน EK_L 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

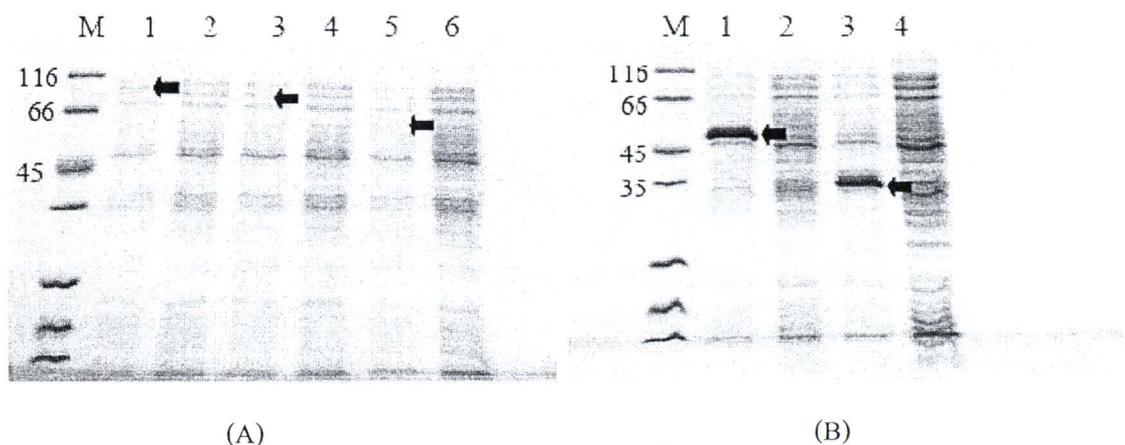
3.2.1 การแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli*

3.2.1.1 การผลิตโปรตีนโดยใช้เวกเตอร์ pET32a

การผลิตโปรตีนทางด้านปลายซี (C-terminal)

พลาสมิด pETAK_SFR2, pET26_SFR2, pET27_SFR2, pET28_SFR2 และ pET29_SFR2 ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน BL21(DE3) *plysS* 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 เมื่อย้อมสีด้วยโคแมสซึบลู-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)

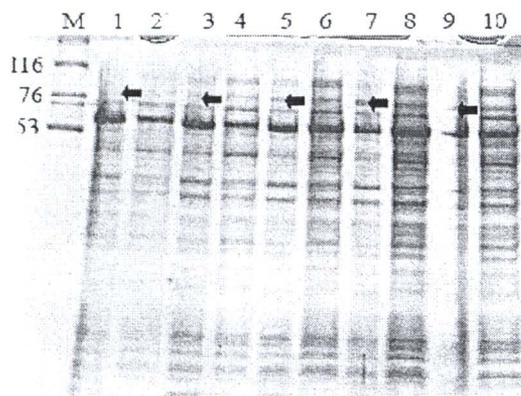
จากผลการทดลองสรุปว่ามีเพียงกรดอะมิโน 260 ตัวทางด้านปลายซี (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 284-544) สามารถผลิตโปรตีนใน *E. coli* โดยการใช้ระบบของเวกเตอร์ pET32a อย่างไรก็ดีตามโปรตีนลูกผสมทั้งสองตัวอยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ



รูปที่ 3.15 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม SFR2 บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) *plysS* 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)



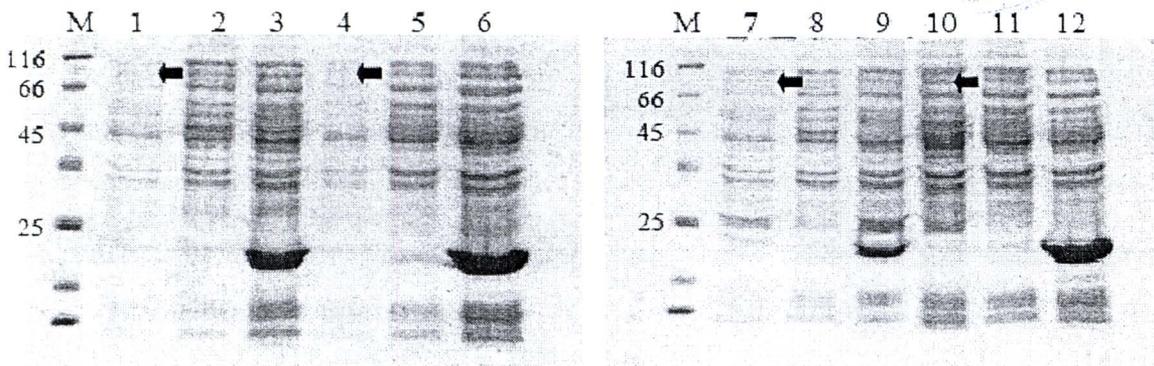
รูปที่ 3.16 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 26_SFR2 และ 26_SFR2_syn บน SDS-PAGE โดยใช้ ArcticExpress(DE3) RIL เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลนที่ 1,3 และ 5: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิต 26_SFR2, เลนที่ 2 ,4 และ 6: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิต 26_SFR2, เลนที่ 7 และ 9: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิต 26_SFR2_syn, เลนที่ 8 และ 10: 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 จึงทำการมีเวทบริเวนนีให้สูญเสียความสามารถในการเหนี่ยวนำโปรติเอส 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) ถูกโหลคบน SDS-PAGE ผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE ในเซลล์เจ้าบ้านทั้งสี่ชนิดซึ่งควรมีขนาดโมเลกุลประมาณ 78 kDa (รวมน้ำหนักโมเลกุลของไทโอรีดอกซิน) (รูปที่ 3.17)

จากผลการทดลองพบว่าไม่สามารถผลิตโปรตีน SFR2 ใน *E. coli* ได้แม้ว่าได้ทำการมีเวทบริเวนนี 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)



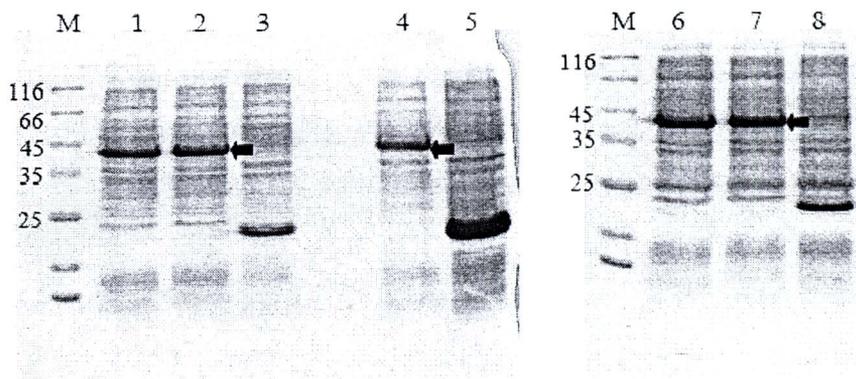
รูปที่ 3.17 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม SFR2 ที่มีการมีวเขตบริเวณ PEST sequence บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) *plysS*, Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เลนที่ 1, 4, 7 และ 10: เซลล์ Origami(DE3), Origami 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: พิวชันโปรตีนไทโอรีดอกซินที่มีการเหนี่ยวนำให้แสดงออกโดยใช้ 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)

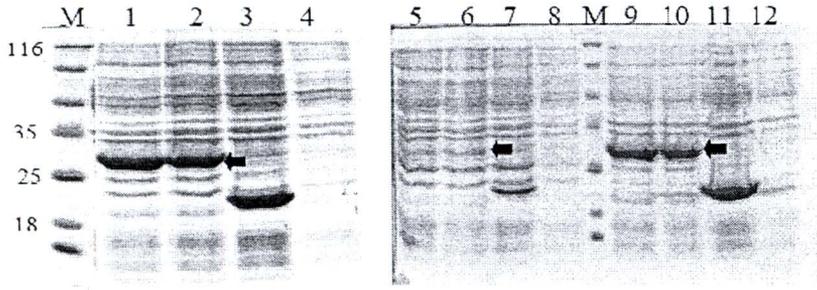
พลาสมิด pET31_SFR2_delC(mP) และ pET32_SFR2_delC(mP) ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน Origami(DE3), Origami B(DE3) และ Rosetta-gami(DE3) ส่วน pET33_SFR2_delC และ pET34_SFR2_delC ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน Origami(DE3) และ BL21(DE3) *plysS* และให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 20 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง 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)

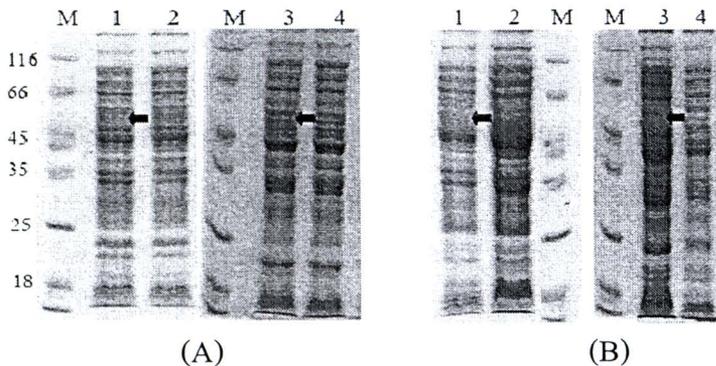
จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ามีเพียงกรดอะมิโน 174 ตัวจากทางด้านปลายเอ็น (กรดอะมิโนลำดับที่ 59-232) ที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli* บน SDS-PAGE ได้ในระบบของ pET32a



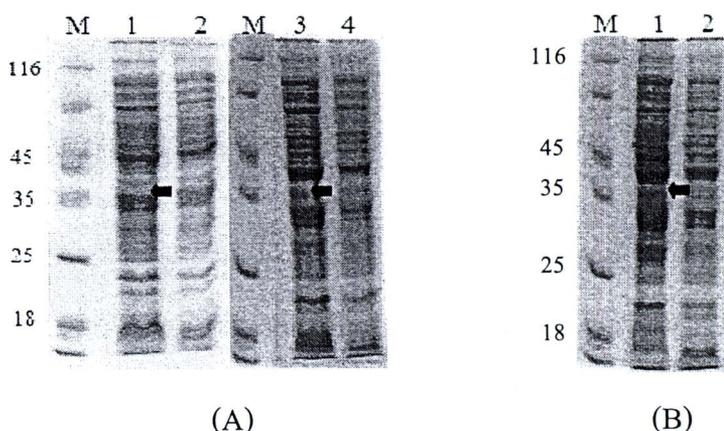
รูปที่ 3.18 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 31_SFR2_delC(mP) บน SDS-PAGE โดยใช้ Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เลนที่ 1 และ 2: เซลล์ Origami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 4: เซลล์ Origami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



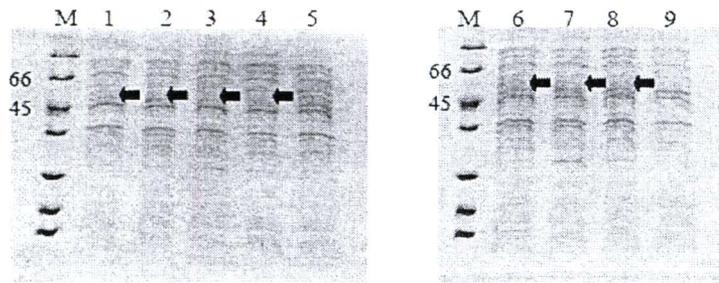
รูปที่ 3.20 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 33_SFR2_delC บน SDS-PAGE โดยใช้ Origami(DE3) และ BL21(DE3) *plysS* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (A) เลนที่ 1 และ 3: เซลล์ Origami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 2 และ 4: เซลล์ Origami(DE3)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



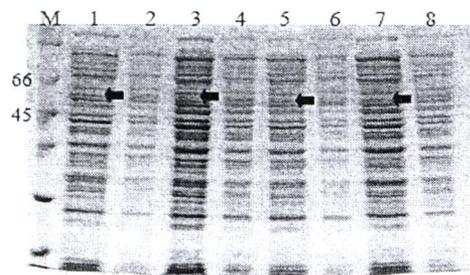
รูปที่ 3.21 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 34_SFR2_delC บน SDS-PAGE โดยใช้ Origami(DE3) และ BL21(DE3) plysS เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (A) เลนที่ 1 และ 3: เซลล์ Origami(DE3) ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 2 และ 4: เซลล์ Origami(DE3) ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม (B) เลนที่ 1: เซลล์ BL21(DE3) plysS ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม, เลนที่ 2 และ 4: เซลล์ BL21(DE3) plysS ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม ลูกผสม ถูกตรึงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยประมาณของโปรตีนลูกผสม 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 คือไม่มีการผลิตโปรตีนลูกผสมถึงแม้จะมีการมีเวกเตอร์ PEST sequence ไปแล้ว



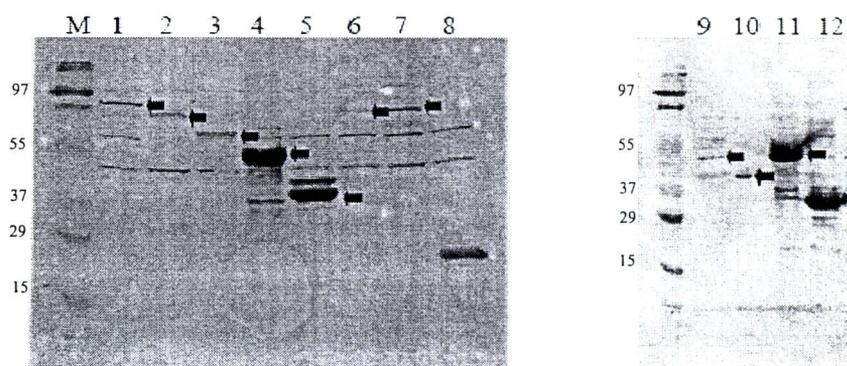
รูปที่ 3.22 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) *plysS* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลนที่ 1-4: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 37_SFR2, เลนที่ 5: เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนลูกผสม 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:

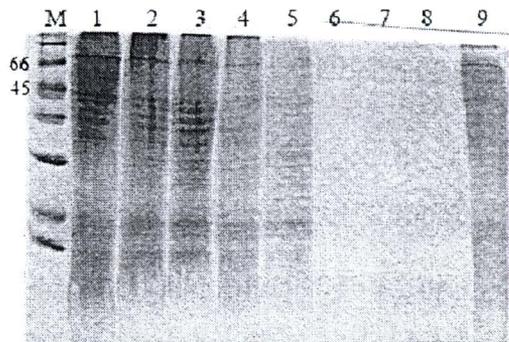
โปรตีนลูกผสม 26_SFR2, เลขที่ 3: โปรตีนลูกผสม 27_SFR2, เลขที่ 4: โปรตีนลูกผสม 28_SFR2, เลขที่ 5: โปรตีนลูกผสม 29_SFR2, เลขที่ 6: โปรตีนลูกผสม 26_mutPEST_SFR2, เลขที่ 7: โปรตีนลูกผสม 26_SFR2_syn, เลขที่ 8: พีวชั่นโปรตีนไทโอรีดอกซิน, เลขที่ 9: โปรตีนลูกผสม 33_SFR2_delC, เลขที่ 10: โปรตีนลูกผสม 34_SFR2_delC, เลขที่ 11: โปรตีนลูกผสม 31_SFR2_delC(mP) และ เลขที่ 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 และมีการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนโดยการเติมเมธานอล 3% ลงไปทุกๆ 12 ชั่วโมงจนครบ 72 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกส่วนที่เป็นส่วนใสและเซลล์ออกจากกัน และนำส่วนใสไปทดสอบกิจกรรมของ เอนไซม์โดยใช้ 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, Nakphaijit ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน SFR2 ที่เป็นไวด์ไทป์ใน *P. pastoris* Y11430 พบว่า ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์หรือการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE หรือเวสเทิร์นบลอตโดยใช้ anti-6-His เป็นแอนติบอดี แต่สามารถตรวจพบระดับอาร์เอ็นเอของยีน SFR2 ได้

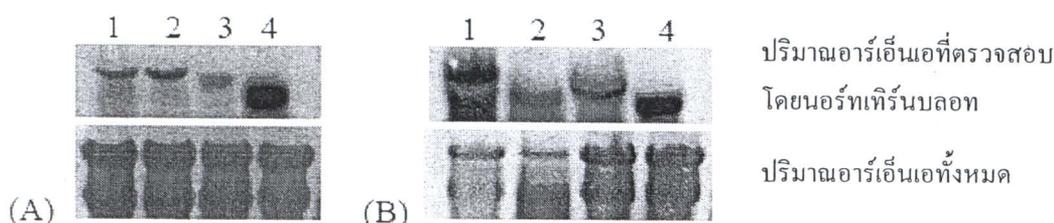


รูปที่ 3.25 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน 26_SFR2_syn บน SDS-PAGE โดยใช้ *P. pastoris* SMD1168H เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และให้มีการแสดงออกที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เลนที่ 1 และ 2: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน 26_SFR2_syn, เลนที่ 3: เซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีน EK_L เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม, 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 โดยใช้การไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ พลาสมิด pET ที่มีชิ้นส่วนของยีน *SFR2* ถูกทรานสฟอร์มเข้าไปใน Origami(DE3) และให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใส่ 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 ดำจึงทำให้มีปริมาณของโปรตีนที่ได้ น้อยลงตามไปด้วย (Wu และคณะ, 2004) หรืออาจเกิดจากการที่ปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้ไม่มีความเสถียรทำให้มีปริมาณอาร์เอ็นเอน้อย จากผลการทดลองนี้มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองที่ได้จาก SDS-PAGE และเวสเทิร์นบลอต (รูปที่ 3.26)

อย่างไรก็ตามระดับอาร์เอ็นเอของยีนทางด้านปลาย 5' ผลการทดลองที่ได้มีความขัดแย้งกับระดับอาร์เอ็นเอทางด้านปลาย 3' โดยการทำออร์ทเทิร์นบลอตทางด้านปลาย 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 และเวสต์เทิร์นบลอต แสดงให้เห็นว่าระดับอาร์เอ็นเอไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่ได้ มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างอาร์เอ็นเอและโปรตีนของยีสต์และ *E. coli* ว่ามากกว่า 70% ของยีสต์ และประมาณ 50 % ของ *E. coli* ระดับโปรตีนของขึ้นอยู่กับระดับของการทรานสคริปชัน (Lu และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามมีการบ่งชี้ว่าจำนวนของ mRNA และจำนวนของโปรตีนไม่มีความสัมพันธ์กันเนื่องจาก mRNA มีอายุสั้นโดยเฉพาะในแบคทีเรีย ในขณะที่โปรตีนสามารถอยู่ในเซลล์ได้เป็นเวลานาน ในขณะที่มีการแสดงออกของยีน mRNA ปรากฏเพียงชั่วระยะเวลาสั้นๆ และมีอายุสั้นเมื่อเทียบกับโปรตีน เช่นระดับของโปรตีนอาจสูงหลังจากที่ mRNA เกิดการย่อยสลายไปแล้ว (Taniguchi และคณะ, 2010)



รูปที่ 3.26 ตรวจสอบระดับของอาร์เอ็นเอของ SFR2 โดยวิธีการนอร์ทเทิร์นบลอต 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) เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วไม่พบการมิวเทดหรือผิดพลาด 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

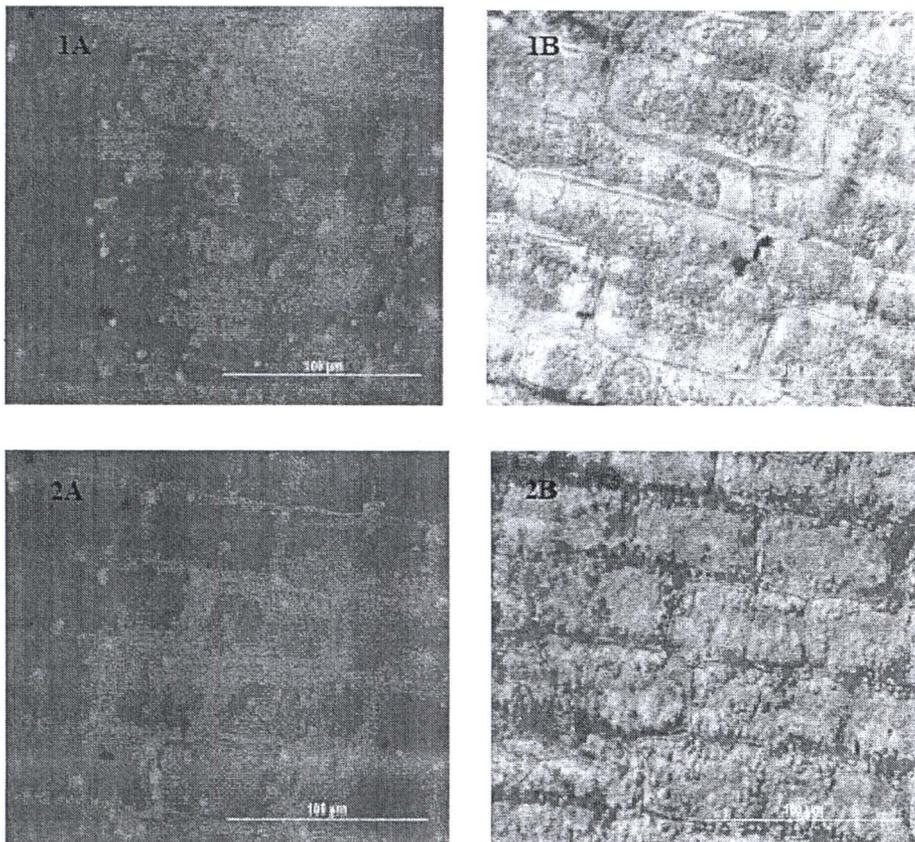
ตารางที่ 3.1 โครงสร้างพลาสมิดที่ใช้ในการติดตามตำแหน่งของโปรตีน

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

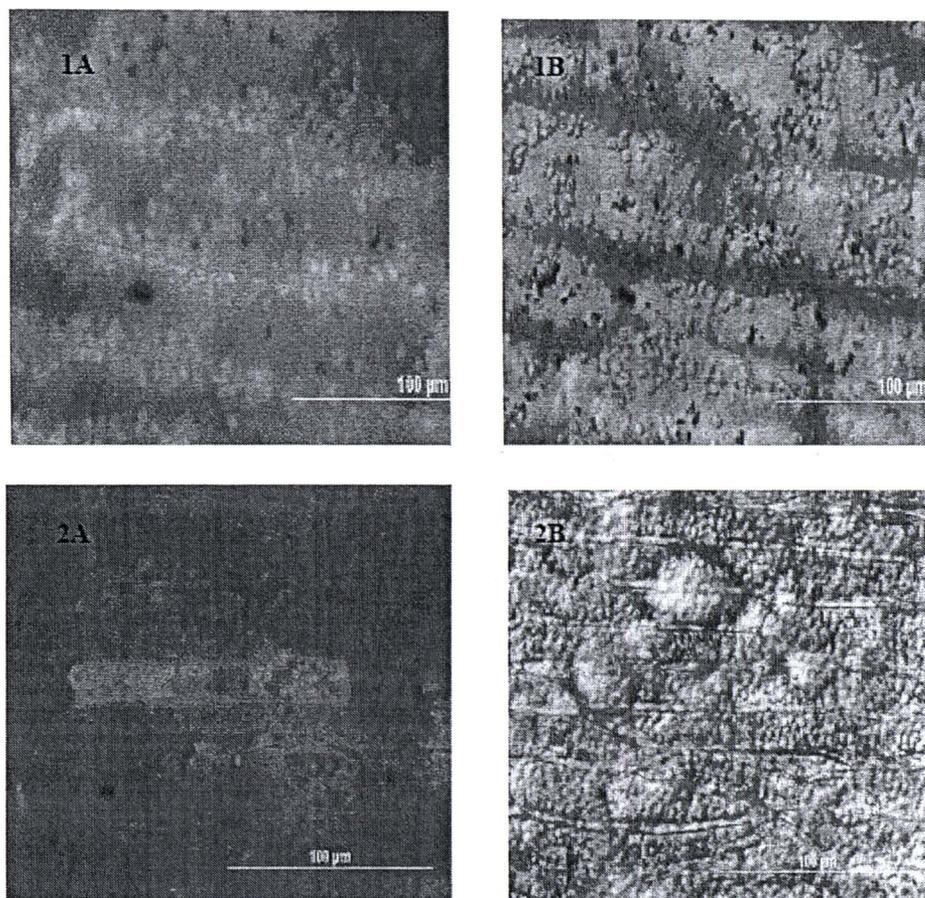
พลาสมิด pSM43 และ pSM83 ที่มี GFP เป็นโปรตีนติดตามถูกยิงเข้าไปในเซลล์สำหรับหายใจทางกระรอก โดยวางใบสำหรับหายใจทางกระรอกบนฐานแข็งความเข้มข้น 2% และบอมบาร์ดที่ความดัน 1,100 psi ต่อการยิง 1 ครั้งในระยะห่าง 6 เซนติเมตร หลังจากนั้นบ่มใบสำหรับหายใจทางกระรอกที่ทรานสฟอร์มแล้วที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีแสง (Noji, 1998) จากนั้นนำใบสำหรับหายใจทางกระรอกที่ ทรานสฟอร์มแล้วไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 520-590 นาโนเมตร กำลังขยาย 40X

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

ส่วนเซลล์สำหรับทางกระรอกที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pSM83 พบว่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์มีการกระจายตัวของโปรตีน GFP ในคลอโรพลาส ในขณะที่เซลล์สำหรับทางกระรอกที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pRM83 ซึ่งมี AAMO88614, RM83 เป็นสัญญาณที่ส่งโปรตีนออกไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ มีโปรตีน GFP กระจายทั่วเซลล์ยกเว้นคลอโรพลาส (รูปที่ 3.28) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า GFP ใช้สัญญาณเปปไทด์ที่อยู่ทางด้านปลายเอ็นของโปรตีน



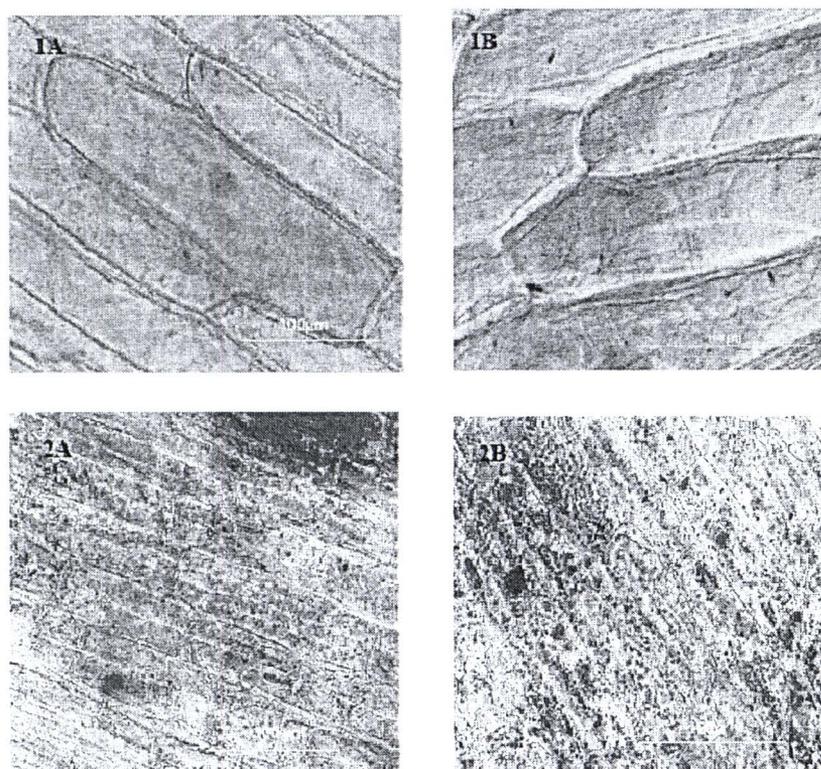
รูปที่ 3.27 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2 โดยใช้โปรตีนติดตาม GFP ในเซลล์สำหรับทางกระรอก โดยใช้พลาสมิด pMDC43 (1) และ pSM43 (2) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (A) และ แบบส่องกราด (B) โดยที่จุดสีแดง (A) และสีเขียว (B) แสดงตำแหน่งของคลอโรพลาส



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

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

ผลการทดลองพบว่า เซลล์หัวหอมที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pMDC140 มีสีน้ำเงินกระจายไปทั่วทั้งเซลล์ รวมถึงนิวเคลียส, ผนังเซลล์ และไซโทพลาสซึม ในขณะที่เซลล์หัวหอมที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pSM140 เกิดสีน้ำเงินขึ้นเฉพาะในเซลล์ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถระบุตำแหน่งของออกาเนลล์ได้ เนื่องจากเซลล์หัวหอมไม่สามารถระบุตำแหน่งของคลอโรพลาสต์ได้ ดังนั้นจึงทรานสฟอร์มพลาสมิดทั้งสองชนิดเข้าไปในเซลล์สาหร่ายหางกระรอกด้วย ซึ่งผลการทดลองพบว่า พลาสมิดควบคุม pMDC140 มีสีน้ำเงินกระจายไปทั่วทั้งเซลล์ แต่เซลล์หัวหอมที่มีการทรานสฟอร์มพลาสมิด pSM140 เกิดสีน้ำเงินขึ้นเฉพาะในคลอโรพลาสต์ (รูปที่ 3.29) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน SFR2 มีการเคลื่อนที่ไปที่คลอโรพลาสต์



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