บทที่ 4
บทสรุป

ยีน *SFR2* ได้ทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ซีดีเอ็นเอ AK119461 เป็นแม่แบบด้วยไพร์เมอร์ที่ต่างกันเพื่อสร้างยีน SFR2 ทางด้านปลาย 5' และ 3' นอกจากนี้ได้ทำการมิวเทตบริเวณ 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*lys*S, Origami(DE3), Origami B(DE3) และ Rosetta-gami(DE3) และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE ซึ่งผลการทดลองพบว่ามีเพียงกรดอะมิโนเพียง 260 ตัว ทางด้านปลายซี และกรดอะมิโน 174 ตัวทางด้านปลายเอ็นซึ่งสามารถผลิตโปรตีนใน *E. coli* ได้

PEST sequence ทำหน้าที่เป็นสัญญาณเหนี่ยวนำให้โปรติเอสเข้ามาใกล้โปรตีนและเกิดการย่อยสลาย PEST sequence ที่พบในโปรตีน SFR2 ถูกมิวเทตโดยใช้วิธีมิวตาเจเนซิส เพื่อเปลี่ยนกรดกลูตา มิกเป็นกลูตามีน เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็น PEST sequence โดยใช้ PESTfind ไม่พบ PEST sequence ปรากฏอยู่ในโปรตีน SFR2 ดังนั้นยีน 26_mutPEST_SFR2 จึงถูกโคลนและทำการผลิตใน *E. coli* ซึ่งผลการทดลองพบว่า โปรตีน SFR2 ที่ทำการมิวเทตบริเวณ PEST sequence ก็ไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบน SDS-PAGE โดยใช้สีย้อมโคแมสซีบลูได้

เนื่องด้วยการตรวจสอบโปรตีน SFR2 ด้วย SDS-PAGE ไม่สามารถตรวจพบแบนของโปรตีนได้จึงเปลี่ยนวิธีการตรวจสอบโปรตีนไปใช้วิธีการตรวจสอบโดยเวสเทิร์นบลอทโดยใช้ 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* ถูกตรวจสอบโดยใช้วิธีการนอร์ทเทิร์นบลอท โดยใช้ซีดีเอ็นเอ 28_SFR2 และ 34_SFR2_delC เป็นโพรบดีเอ็นเอสำหรับตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยใช้การไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอบนเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส ผลการทดลองพบว่าความสัมพันธ์ของระดับอาร์เอ็นเอที่ได้จากนอร์ทเทิร์นบลอทและระดับโปรตีนจาก SDS-PAGE และเวสเทิร์นบลอทของยีนและโปรตีน SFR2 ทางด้านปลาย 5' เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือปริมาณอาร์เอ็นเอที่ผลิตได้น้อยทำให้ผลิตโปรตีนได้น้อยตามลง

ไปด้วย ส่วนผลการทดลองทางด้านปลาย 3' พบว่าระดับอาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือระดับของอาร์เอ็นเอไม่ได้เป็นตัวชี้วัดถึงการแสดงออกของโปรตีน

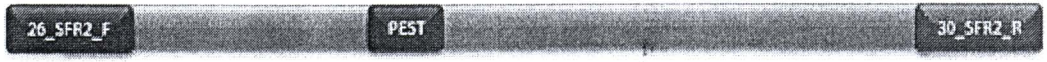
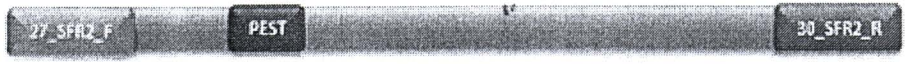
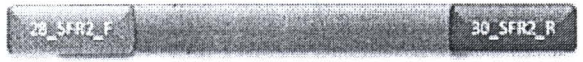
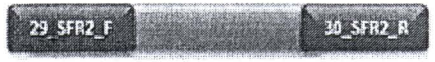
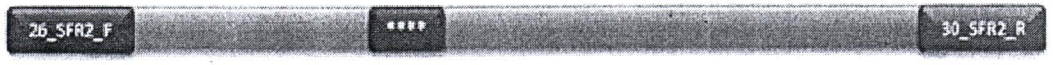
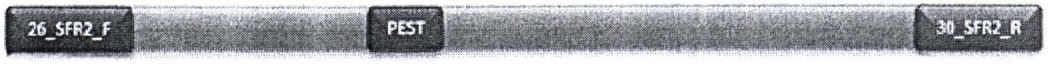
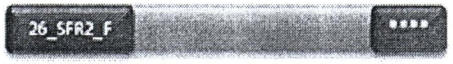
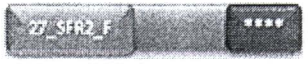
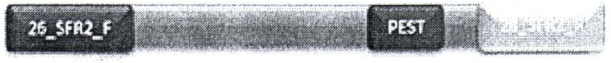
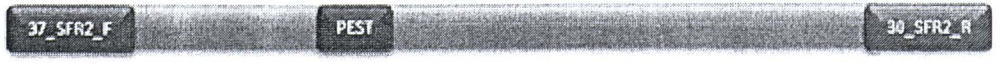
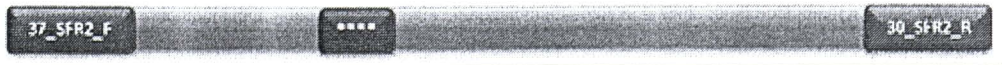
การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน 26_SFR2_syn ใน *P. pastoris* SMD1168H โดยใช้เวคเตอร์ pPICZαBNH8 ไม่พบการทั้งกิจกรรมของเอนไซม์และแบนของโปรตีนบน SDS-PAGE ถึงแม้ว่าจะมีการปรับโคดอนยีน SFR2 ให้เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนใน *P. pastoris* แล้วก็ตาม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า codon usage ไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้

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

การติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีน SFR2 โดยใช้โปรตีนติดตามสองชนิดคือ GFP และ GUS ในเซลล์หัวหอมและเซลล์สาหร่ายหางกระรอก **พบว่าโปรตีน SFR2 มีการเคลื่อนที่ไปที่คลอโรพลาส**

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

ตารางที่ 4.1 สรุปการแสดงออกและการตรวจสอบโปรตีน SFR2 บน SDS-PAGE และเวสเทิร์นบลอท และการตรวจสอบอาร์เอ็นโดยวิธีนอร์ทเทิร์นบลอท

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 สามารถผลิตมหาบัณฑิตที่มีความสามารถและศักยภาพทั้งความรู้และความสามารถในการแก้ปัญหางานวิจัยทางชีววิทยาระดับโมเลกุลและการแสดงออกของโปรตีน 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)