249192
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249192

รหัสโครงการ SUT3-304-51-24-10

รายงานการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกและการตรวจสอบโปรตีน SFR2 จากข้าวใน *Escherichia coli* และ *Pichia pastoris*

(The Expression and Detection of Rice SFR2 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

600251104

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249192

รหัสโครงการ SUT3-304-51-24-10

รายงานการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกและการตรวจสอบโปรตีน SFR2 จากข้าวใน *Escherichia coli* และ *Pichia pastoris*

(The Expression and Detection of Rice SFR2 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-51-24-10

รายงานการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกและการตรวจสอบโปรตีน SFR2 จากข้าวใน *Escherichia coli* และ *Pichia pastoris*

(The Expression and Detection of Rice SFR2 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวศศิประภา กาญจนวัฒนา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551-2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้ออำนวยสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณ นส. มัสลิน นาคไพจิตร สำหรับข้อมูลในส่วนการติดตามตำแหน่งของโปรตีนในรายงานวิจัยนี้ ขอบคุณ คุณปรางค์ขาว ปรุเขตต์ เลขานุการสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่อำนวยความสะดวกเรื่องเอกสารการขอใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือต่างๆ และการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551-2552

บทคัดย่อ

249192

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 จึงได้ทำการตรวจสอบโปรตีนโดยเทคนิคเวสเทิร์นบลอทเพื่อตรวจสอบหาโปรตีน SFR2 โดยการใช้โปรตีนส่วนปลายซีของ SFR2 เป็นแอนติเจนเพื่อสร้างแอนติเซรัม ผลการทดลองพบการแสดงออกของโปรตีน SFR2 แต่มีในปริมาณเพียงเล็กน้อย ดังนั้นระดับอาร์เอ็นเอของ SFR2 จึงถูกตรวจสอบโดยใช้เทคนิคนอร์ทเทิร์นบลอทพบว่า ระดับอาร์เอ็นเอของส่วนทางด้านปลาย 5' (ปลายเอ็นของโปรตีน) แสดงความสัมพันธ์กับผลการทดลองที่แสดงบนแผ่นเมมเบรนคือระดับอาร์เอ็นเอน้อยจึงส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่น้อยด้วย อย่างไรก็ตามผลการทดลองของระดับอาร์เอ็นเอทางปลาย 3' (ปลายซีของโปรตีน) ไม่ได้แสดงออกในทิศทางเดียวกัน โปรตีน SFR2 ถูกนำมาผลิตใน *P. pastoris* อย่างไรก็ตามผลการทดลองใน SDS-PAGE ไม่ได้บ่งบอกอย่างชัดเจนว่ามีการแสดงออกของ SFR2 หรือไม่ ในส่วนของการติดตามตำแหน่งของโปรตีนพบว่า โปรตีน SFR2 มีการเคลื่อนที่ไปที่คลอโรพลาสของเซลล์หัวหอมและสาหร่ายหางกระรอก

Abstract

249192

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. For protein localization using GFP and GUS protein as reporter protein indicated that SFR2 protein localized to chloroplast of hydrilla and onion cells.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1	
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
ขอบเขตของงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 2	
วิธีดำเนินการวิจัย	11
2.1 การโคลนยีน SFR2	11
2.1.1 การเพิ่มจำนวนยีน SFR2 ด้วยวิธีพีซีอาร์	11
2.1.2 การโคลนยีน SFR2 เข้าเวคเตอร์ pColdI	12
2.1.3 การโคลนยีน 26_SFR2_syn เข้าเวคเตอร์ pPICZαBNH8 และ pET32a	13
2.2 การมิวเทต PEST sequence ภายใน SFR2 โดยวิธีพีซีอาร์มิวตาจีเนซิส	16
2.3 การแสดงออกของโปรตีน	17
2.3.1 การแสดงออกของโปรตีนโดยใช้เวคเตอร์ pET32a ใน *E.coli*	17
2.3.2 การแสดงออกของโปรตีนโดยใช้เวคเตอร์ pColdI ใน *E.coli*	18
2.3.3 การแสดงออกของโปรตีน 26_SFR2_syn โดยใช้เวคเตอร์	19
2.4 การตรวจสอบโปรตีน	19
2.4.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 การตรวจสอบโปรตีนโดยเวสเทิร์นบลอท	21
2.5 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยนอร์ทเทิร์นบลอท	21
2.6 การติดตามตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์ในเซลล์สาหร่ายหางกระรอกและเซลล์หัวหอม	22
บทที่ 3	
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
3.1 การโคลนนิ่ง	24
3.1.1 การโคลนชิ้นส่วนยีน SFR2 เข้า pET32a	24
3.1.2 การโคลนชิ้นส่วนยีน SFR2 เข้า pColdI	29
3.1.3 การโคลนยีน 26_SFR2_syn เข้า pPICZαBNH8	32
3.2 การแสดงออกของโปรตีน	34
3.2.1 การแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli*	34
3.2.2 การตรวจสอบโปรตีนโดนใช้เวสเทิร์นบลอท	42
3.2.3 การแสดงออกของโปรตีนใน *P. pastoris*	43
3.3 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยใช้วิธีนอร์ทเทิร์นบลอท	44
3.4 การติดตามตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์สาหร่ายหางกระรอกและเซลล์หัวหอม	45
บทที่ 4	
บทสรุป	50
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก	57
ประวัติผู้วิจัย	59

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนและหาลำดับเบสยีน*SFR2* 14

ตารางที่ 2.2 สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* 15

ตารางที่ 2.3 สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *SFR2* ที่มีการมิวเทตบริเวณ PEST sequence 17

ตารางที่ 2.4 การกระตุ้นแอนติเจนและการผลิตแอนติเซรัม 20

ตารางที่ 3.1 โครงสร้างพลาสมิดที่ใช้ในการติดตามตำแหน่งของโปรตีน 46

ตารางที่ 4.1 สรุปการแสดงออกและการตรวจสอบโปรตีน SFR2 บน SDS-PAGE และ
เวสเทิร์นบลอท และการตรวจสอบอาร์เอ็นโดยวิธีนอร์ทเทิร์นบลอท 52

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 แผนภูมิรูปต้นไม้เปรียบเทียบโปรตีนไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 ในข้าว และพืชอื่น 6
รูปที่ 3.1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพื่อใช้ในการโคลนยีน 24
รูปที่ 3.2 พลาสมิด pENTR-D/TOPO ที่มีชิ้นส่วนของยีน SFR2 อยู่ ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 25
รูปที่ 3.3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพื่อใช้ในการโคลนยีน 26
รูปที่ 3.4 พลาสมิด pENTR-D/TOPO ที่มีชิ้นส่วนของยีน *SFR2* อยู่ ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 27
รูปที่ 3.5 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำการมิวเทตบริเวณ PEST sequence 28
รูปที่ 3.6 พลาสมิด TOPO_26mutPEST_SFR2 ที่ตัดและไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III 28
รูปที่ 3.7 การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนระหว่าง AK_SFR2 และ 26_mutPEST_SFR2 29
รูปที่ 3.8 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 30
รูปที่ 3.9 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 37_SFR2, 37_mutPEST_SFR2 และเวคเตอร์ pCold I หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 30
รูปที่ 3.10 พลาสมิด pCold_37_SFR2 และ pCold_37_mutPEST_SFR2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I 31
รูปที่ 3.11 การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนระหว่าง AK_SFR2 และ37_mutPEST_SFR2 31
รูปที่ 3.12 ลำดับกรดอะมิโนของพลาสมิด pPICZ_26_SFR2_syn 32
รูปที่ 3.13 โคโลนีพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบยีน 26_SFR2_syn โดยใช้ไพร์เมอร์ 5' AOX และ 3' AOX ใน *P. pastoris* 33
รูปที่ 3.14 ชิ้นส่วนยีน SFR2 ทั้งหมดที่ใช้ในการโคลนและผลิตโปรตีนในระบบเวคเตอร์ pET32a และ pCold I 33
รูปที่ 3.15 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม SFR2 บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) plysS 34
รูปที่ 3.16 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 26_SFR2 และ 26_SFR2_syn โดยใช้ ArcticExpress(DE3) RIL 35
รูปที่ 3.17 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม SFR2 ที่มีการมิวเทตบริเวณ PEST sequence บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21(DE3) p*lys*S, Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3) 37

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.18 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 31_SFR2_delC(mP) โดยใช้ Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3) 38

รูปที่ 3.19 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 32_SFR2_delC(mP) โดยใช้ Rosetta-gami(DE3), Origami(DE3) และ Origami B(DE3) 39

รูปที่ 3.20 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 33_SFR2_delC โดยใช้ Origami(DE3) และ BL21(DE3) p*lys*S 39

รูปที่ 3.21 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 34_SFR2_delC โดยใช้ Origami(DE3) และ BL21(DE3) p*lys*S 40

รูปที่ 3.22 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 โดยใช้ BL21(DE3) p*lys*S 41

รูปที่ 3.23 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม 37_SFR2 และ 37_mutPEST_SFR2 โดยใช้ Rosetta-gami(DE3) และ Origami(DE3) 41

รูปที่ 3.24 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน SFR2 โดยวิธีเวสเทิร์นบลอท บนแผ่นเมมเบรน PVDF 42

รูปที่ 3.25 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน 26_SFR2_syn โดยใช้ *P. pastoris* SMD1168H 44

รูปที่ 3.26 ตรวจสอบระดับของอาร์เอ็นเอของ SFR2 โดยวิธีการนอร์ทเทิร์นบลอท 45

รูปที่ 3.27 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2โดยใช้โปรตีนติดตาม GFP ในเซลล์สาหร่ายหางกระรอก โดยใช้พลาสมิดpMDC43 และ pSM43 47

รูปที่ 3.28 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2โดยใช้โปรตีนติดตาม GFP ในเซลล์สาหร่ายหางกระรอก โดยใช้พลาสมิด pSM83 และ pRM83 48

รูปที่ 3.29 การติดตามตำแหน่งของโปรตีน SFR2โดยใช้โปรตีนติดตาม GUS ในเซลล์หัวหอมและเซลล์สาหร่ายหางกระรอกโดยใช้พลาสมิด pMDC140 และ pSM140 59