

การศึกษาเปปไทด์ส่งสัญญาณ ที่มีผลต่อการหลั่งโปรตีนลูกผสม  
ออกนอกเซลล์ของเชื้อรา

Studying the signal peptide for recombinant protein  
secretion in fungi



สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร  
บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Studying the signal peptide for recombinant protein  
secretion in fungi



A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE  
REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDRUSTRIL MICROBIOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรณีฉุกเฉินหรือกรณีศึกษา และอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



|                  |   |
|------------------|---|
| หัวข้อสหกิจศึกษา | การศึกษาเปปไทด์ส่งสัญญาณ ที่มีผลต่อการหลังโปรตีนลูกผสม<br>ออกนอกเซลล์ของเชื้อรา |
| ชื่อนักศึกษา     | นายภูมिरวี อธิ 63050511   |
| ปริญญา           | วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  |
| ภาควิชา          | ชีววิทยา  |
| คณะ              | วิทยาศาสตร์   |
| มหาวิทยาลัย      | สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)                           |
| ปีการศึกษา       | 2566  |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์   |

### บทคัดย่อ

ปัจจุบัน จุลินทรีย์ได้รับความสนใจเป็นแหล่งในการผลิตโปรตีนลูกผสม (Recombinant proteins) อย่างมาก เนื่องจากสามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้แม่นยำกว่าการผลิตจากแหล่งผลิตดั้งเดิม ใช้ระยะเวลาที่รวดเร็ว ใช้พื้นที่น้อย ไม่ขึ้นกับฤดูกาล ใช้สับสเตรทได้หลากหลาย นอกจากนี้ระบบการส่งถ่ายยีน (Transformation system) และเครื่องมือทางพันธุวิศวกรรม (Genetic tool) สำหรับใช้ในการดัดแปลงพันธุกรรมที่แม่นยำด้วยเทคโนโลยีด้านชีววิทยาสังเคราะห์ (Synthetic biology) ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง สำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสมการชักนำให้โปรตีนหลังออกในน้ำเลี้ยงจะช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตโปรตีน ลดความซับซ้อนของกระบวนการผลิต โดยในการหลังโปรตีนออกมาภายนอกนั้นจำเป็นต้องมีเปปไทด์ส่งสัญญาณ (Signal sequence) ที่เหมาะสม เปปไทด์ส่งสัญญาณประกอบด้วยส่วนจดจำกับ Endoplasmic reticulum ที่มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการ Post-translationally modification จากความสำคัญของเปปไทด์ส่งสัญญาณ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อหาเปปไทด์ส่งสัญญาณเพิ่มเติมสำหรับรา *Aspergillus oryzae* โดยได้ทำการศึกษาเปปไทด์ส่งสัญญาณของรา *A. oryzae* ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Prop 1.0 ร่วมกับการใช้ยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีน Green fluorescent protein (GFP) เป็นยีนรายงานผล ซึ่งพบว่าตัวอย่างเปปไทด์ส่งสัญญาณ 5 ชนิดคือ amyB A1 A2 B1 และ B2 เป็นเปปไทด์ที่ใช้งานได้ โดยตัวอย่างเปปไทด์นี้สามารถชักนำการหลังโปรตีน GFP ออกสู่นอกเซลล์รา *A. oryzae* ได้ดีกว่าตัวอย่างที่ไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณ โดยค่า Fluorescent intensity ของ GFP ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่วัดจากราลูกผสมที่มี amyB (Positive control) มีค่ามากกว่าเซลล์ที่ไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณ 57.4% ตัวอย่างเปปไทด์ส่งสัญญาณชนิดใหม่ A1 มีประสิทธิภาพในการชักนำการหลังออกของ GFP เพิ่มขึ้น

45.7% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) ซึ่งเปปไทด์ส่งสัญญาณที่มีประสิทธิภาพ  
ไม่ต่ำกว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดใหม่นี้จะถูกนำไปใช้เป็นตัวเลือกสำหรับการผลิตโปรตีนหลั่งออกนอกเซลล์ ที่จะช่วยลดความซับซ้อนในกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ รวมทั้งลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตต่อไป

**คำสำคัญ :** เปปไทด์ส่งสัญญาณ (Signal sequence), *Aspergillus oryzae*, Green fluorescent protein (GFP), การหลั่งโปรตีน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>Title</b>         | Studying the signal peptide for recombinant protein secretion in fungi. |
| <b>Students</b>      | MR. Phumrawee Isi   |
| <b>Degree</b>        | Bachelor of Science (Industrial Microbiology)                           |
| <b>Department</b>    | Biology   |
| <b>School</b>        | Science   |
| <b>University</b>    | King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)               |
| <b>Academic Year</b> | 2023  |
| <b>Advisor</b>       | Assoc. Prof. Dr. Cherdasak maneeruttanarungroj                          |

### Abstract

Nowadays, microorganisms have been attracted as potential host cell for production of recombinant proteins, in which their production process could be precisely controlled over than conventional sources. Production by microbe requires less time and area, not depend on the seasons and able to utilize diverse substrates. In addition, the transformation system and appropriate genetic tools facilitating the strain improvement through synthetic biology approach have been extensively developed. In recombinant protein production, secretion of protein to culture broth will facilitate the high production of protein and simple production process. To secrete the protein into medium, appropriate signal sequence is necessary. The signal peptide generally contains a recognition motif with Endoplasmic reticulum and involving in post-translationally modification process. As the important of signal peptide, this study aim to identify the additional signal peptides for *A. oryzae*. Based on the the prop 1.0 program, ten putative signal peptides were investigated using the using the gene encoding the green fluorescent protein (GFP) as reporter gene. The results showed that five signal peptides are *amyB*, A1, A2, B1 and B2 could be function as signal peptide , in which these peptides were able to induce the secretion of GFP protein into the medium better than those without signal peptides. The highest fluorescent intensity (Fi) value of GFP in culture medium was observed in transformant containing *amyB* (positive control) which higher than cell without signal peptide upto 57.4%. Among the developed peptides, the A1 peptide showed potential as signal peptide.

Approximately 45.7% increase of extracellular GFP was detected in A1 transformant when compared with negative control. A new effective signal peptide (A1) develop in this study could be further used as an signal peptide of choice for production of extracellular proteins that probably allows simple product purification and reduce the production cost.

**Keywords** : Signal sequences, *Aspergillus oryzae*, Green fluorescent protein (GFP), Protein Secretion



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการศึกษาแปปไทด์สังเคราะห์ที่มีผลต่อการหลังโปรตีนลูกผสมออกนอกเซลล์ของเชื้อรา ได้สำเร็จลุล่วงโดยดีเนื่องจากได้รับการแนะนำจาก ผู้ให้คำปรึกษาในการทำงานสหกิจครั้งนี้ ได้แก่ ดร. สุกัญญา จินเหนาะ และ คุณสโรชา ปัญจนพร ทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวกระบวนการอุตสาหกรรม กลุ่มวิจัยส่วนผสมฟังก์ชันและนวัตกรรมอาหาร ศูนย์พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ภายใต้สังกัดสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ได้ให้คำแนะนำแก่ผู้จัดทำการวิจัย ตั้งแต่เริ่มการวางแผนในการทำงาน ตลอดจนภาคปฏิบัติ และภาคทฤษฎี รวมทั้งได้รับความช่วยเหลือในด้านต่างๆ รายงานการวิจัยเล่มนี้จะไม่สำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับการตรวจสอบและปรับปรุง ผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความตั้งใจของบุคลากรที่ได้ให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด โอกาสนี้จึงขอกราบขอบพระคุณไว้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ประจำภาคชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในการทำสหกิจศึกษาและเป็นผู้พิจารณาการนำเสนอผลงานชิ้นนี้

ผู้จัดทำหวังว่างานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์ต่อผู้ศึกษาไม่มากนักน้อย หากไม่ได้รับคำปรึกษาและคำแนะนำก็คงจะสำเร็จไม่ได้ จึงขอมอบส่วนดีนี้ให้กับบุคลากรทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวกระบวนการอุตสาหกรรมและคณาจารย์ สำหรับข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำขออภัยและยินดีจะรับฟังคำติชมจากทุกท่าน

ภูมिरวิ อธิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

|  | หน้า     |
|--|----------|
| บทคัดย่อ.....  | ก        |
| Abstract.....  | ค        |
| กิตติกรรมประกาศ .....  | ค        |
| สารบัญตาราง.....   | ฉ        |
| สารบัญรูป .....  | ช        |
| คำย่อ/สัญลักษณ์ .....  | ช        |
| <b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>   | <b>1</b> |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....                            | 1        |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....                                   | 1        |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....   | 1        |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....                                 | 1        |
| <b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>                  | <b>2</b> |
| 2.1 เชื้อรา <i>Aspergillus oryzae</i> .....                        | 2        |
| 2.3 กระบวนการหลังโปรตีนออกนอกเซลล์.....                            | 3        |
| 2.3.1 ขั้นตอนที่ 1 .....   | 3        |
| 2.3.2 ขั้นตอนที่ 2 .....   | 3        |
| 2.3.3 ขั้นตอนที่ 3 .....   | 4        |
| 2.3 GFP (Green fluorescent protein).....                           | 4        |
| 2.4 การสร้างพลาสมิดด้วยเทคนิค Yeast assembly.....                  | 5        |
| 2.6 การส่งถ่ายดีเอ็นเอสู่เชื้อรา และการคัดเลือก Transformants..... | 5        |
| <b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>                          | <b>7</b> |
| 3.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม .....                                    | 7        |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1.2 การรวมชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิค Yeast assembly .....                                | 8         |
| 3.2 การเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน <i>E. coli</i> .....                                      | 9         |
| 3.3 การเตรียมพลาสมิดลูกผสมเพื่อถ่ายโอนสู่รา.....                                      | 10        |
| 3.4 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสู่ราโดยวิธี PEG-mediated protoplast transformation (PMT) ..... | 11        |
| 3.5 การเตรียมตัวอย่างและการเก็บสปอร์เชื้อรา.....                                      | 11        |
| 3.6 การประเมินการหลังโปรตีนออกนอกเซลล์.....   | 11        |
| 3.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (Analysis of Variance (ANOVA)).....                       | 12        |
| <b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล .....</b>  | <b>13</b> |
| 4.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม .....   | 13        |
| 4.1.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดฐาน .....  | 13        |
| 4.1.2 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมจากกระบวนการ Yeast assembly .....                       | 13        |
| 4.1.3 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....                | 14        |
| 4.2 การคัดเลือกราลูกผสม.....  | 15        |
| 4.3 การประเมินกิจกรรมการหลังโปรตีน GFP ในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....                        | 16        |
| <b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>                                       | <b>18</b> |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย.....   | 18        |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ.....   | 18        |
| <b>ภาคผนวก.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>ภาคผนวก ก .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>การเตรียมอาหาร .....</b>   | <b>20</b> |
| <b>งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>   | <b>21</b> |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

| ตารางที่   | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาในการเปิดวงพลาสมิดฐาน BPO284.....   | 8    |
| ตารางที่ 3.2 แสดงองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในผลิตชิ้นดีเอ็นเอเปปไทด์สังเคราะห์<br>และ GFP .....                         | 8    |
| ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา Yeast colony PCR.....  | 9    |
| ตารางที่ 3.4 แสดงส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา Restriction enzyme ชนิด <i>NotI</i><br>และ <i>XbaI</i> .....                   | 10   |
| ตารางที่ 3.5 แสดงส่วนประกอบการทำปฏิกิริยาในการเปิดวงพลาสมิดลูกผสมด้วย <i>SgsI</i><br>เพื่อเตรียมถ่ายดีเอ็นเอสู่วุ้น..... | 10   |
| ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อรา <i>A. oryzae</i> .....   | 12   |
| <b>ภาคผนวก ก.</b>  |      |
| การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast assembly .....   | 20   |
| การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> .....   | 20   |
| การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา (PMT) .....  | 20   |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

| รูปที่  | หน้า |
|---|------|
| รูปภาพที่ 2.1 ภาพแสดงระบบการหลั่งออกของโปรตีนภายในเซลล์.....  | 4    |
| รูปภาพที่ 3.1 รูปพลาสติกฐาน BPO284 สำหรับใช้โคลนยีนเพื่อการแสดงออกของเปปไทด์สัง<br>สัญญาณและโปรตีน GFP..... | 7    |
| รูปภาพที่ 3.2 ยีสต์ INVsc1 ที่ใช้ในการสร้างพลาสติกผสมด้วยเทคนิค Yeast assembly.....                         | 9    |
| รูปภาพที่ 4.1 การวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงขึ้นดีเอ็นเอ .....   | 13   |
| รูปภาพที่ 4.2 ตัวอย่างการวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อคัดเลือกพลาสติกผสมด้วย<br>Yeast colony PCR.....   | 14   |
| รูปภาพที่ 4.3 ตัวอย่างการวิเคราะห์พลาสติกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NotI</i> และ <i>XbaI</i> .....             | 15   |
| รูปภาพที่ 4.4 แสดงการเจริญของโคโลนีราที่อยู่บนอาหารคัดเลือก.....  | 16   |
| รูปภาพที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบเซลล์ที่ถ่ายโอนพลาสติก.....   | 16   |
| รูปภาพที่ 4.6 กราฟแสดงการวัดปริมาณการหลั่งโปรตีน GFP วันที่ 1, 3 และ 5 .....                                | 17   |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อ/สัญลักษณ์

| คำย่อ/สัญลักษณ์ | คำอธิบาย                               |
|-----------------|--|
| GFP             | Green fluorescent protein              |
| Sp.             | Signal sequence / Signal peptide       |
| Amp             | Ampicillin                             |
| PCR             | Polymerase chain reaction              |
| RNA             | Ribonucleotide                         |
| GRAS            | General recognized as safe             |
| PMT             | PEG-mediated protoplast transformation |
| ER              | Endoplasmic reticulum                  |
| dNTP            | Deoxynucleotide triphosphate           |
| UPR             | Unfolded protein response              |
| DNA             | Deoxyribonucleotide                    |
| FI              | Fluorescent intensity                  |
| PDI             | Protein disulfide isomerase            |
| SRP             | Signal peptide recognition particle    |
| AMT             | Agrobacterium-mediated transformation  |
| WT              | Wild type                              |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันนี้มีอุตสาหกรรมที่ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง เช่น โปรตีนทางการแพทย์ หรือ เอมไซม์ต่างๆ โดยจุลินทรีย์ในงานวิจัยนี้คือเชื้อรา *A. oryzae* ซึ่งร่าดังกล่าวมีความปลอดภัยจัดเป็นสายพันธุ์ GRAS (Generally Recognized as Safe) (Nakajima et al., 2006) และมีจุดเด่นได้แก่ สามารถใช้สารอาหารได้หลากหลาย ทนต่อสภาวะการเลี้ยงที่รุนแรงได้อีกทั้ง มีกระบวนการ Glycosylation ที่เหมาะสม ในการศึกษานี้จะทำการศึกษาเปปไทด์ส่งสัญญาณ (Signal sequence) ที่เกี่ยวกับการชักนำการหลั่งของโปรตีนออกนอกเซลล์ ซึ่งการศึกษานี้ได้เลือกใช้โปรตีนรายงานผลคือ GFP ที่มีคุณสมบัติในการรายงานผลที่ดีเพราะลักษณะของโปรตีนนี้สามารถที่จะเรืองแสงได้โดยไม่ต้องมีสารตั้งต้น (ชาติชาย แจ่มเสน, 2546) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสำคัญเพื่อคัดเลือกเปปไทด์ส่งสัญญาณที่มีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อส่งเสริมการหลั่งโปรตีนหรือผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงเหล่านี้และช่วยลดต้นทุนการเก็บเกี่ยวที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

### 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) การสร้างสายพันธุ์ราที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณในการหลั่งโปรตีน GFP จำนวน 8 สายพันธุ์ และราชุดควบคุมอีก 3 สายพันธุ์
- 2) การประเมินและคัดเลือกเปปไทด์ส่งสัญญาณที่มีประสิทธิภาพ

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) การสร้างพลาสมิดลูกผสม จำนวน 11 ชนิด
- 2) การสร้างสายพันธุ์ราลูกผสม ที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณจำนวน 8 สายพันธุ์ และราชุดควบคุมอีก 3 สายพันธุ์
- 3) การตรวจสอบการหลั่งโปรตีน GFP ในน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 11 สายพันธุ์
- 4) การจัดทำรายงานพร้อมทั้งการนำเสนอผลงาน

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้รับความรู้ภาคทฤษฎีและปฏิบัติทางด้าน Synthetic biology

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 2) สามารถคัดเลือกเปปไทด์ส่งสัญญาณ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงได้  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแบบสงวนเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพในจุลินทรีย์ได้รับความนิยม ได้แก่ เอ็มไซม์ หรือโปรตีนทางการแพทย์ต่างๆ เช่น อินซูลิน สำหรับบราซิงเป็นยูคาริโอตอย่าง *A. oryzae* มีคุณสมบัติเป็น GRAS ที่มีความปลอดภัยและสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางด้านอาหาร (Nakajima et al., 2006) ทนต่อสภาวะการเลี้ยงที่รุนแรงได้ดี สามารถใช้อาหารได้หลากหลายและมีกระบวนการ Post translation ที่สำคัญอย่างเช่น Glycosylation ที่มีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังกล่าวว่ามีกระบวนการตัดแต่งทางพันธุวิศวกรรมได้ดี และงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า เปปไทด์ส่งสัญญาณ (Signal sequence) ขนาด 20-30 กรดอะมิโนอยู่ในตำแหน่ง N-terminal (Xu et al., 2021) ของลำดับโปรตีนหรือเปปไทด์ สามารถจดจำตำแหน่งเกาะกับ Endoplasmic reticulum เพื่อทำให้โปรตีนเกิดการพับ (Folding) และหลั่งออกนอกเซลล์ได้ (wang et al., 2020) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาเปปไทด์ส่งสัญญาณ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งโปรตีนเป้าหมายออกนอกเซลล์ โดยจะใช้โปรตีนรายงานผลได้แก่ GFP ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณลักษณะเรืองแสงสามารถติดตามได้สะดวก

(<https://www.photometrics.com/learn/microscopy-basics/what-is-gfp>, n.d.)

ซึ่งคาดว่าเปปไทด์ส่งสัญญาณจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งออกของโปรตีนเป้าหมาย ช่วยลดปัญหาในด้านเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์สำหรับการผลิตในลำดับต่อไป

#### 2.1 เชื้อรา *Aspergillus oryzae*

เชื้อรานั้นเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ยูคาริโอตที่มีความซับซ้อนสูง ซึ่งอาณาจักรเชื้อราแบ่งออกได้ 5 ไฟลัม Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota และ Glomeromycota (Noguera, 2023) โดยประโยชน์ของเชื้อรานี้มักนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์โปรตีนสำหรับการนำไปใช้ด้าน เทคโนโลยีชีวภาพ การแพทย์และวิทยาศาสตร์วัสดุ (Material sciences) ซึ่งราชนิดต่าง ๆ นั้นได้มีการผลิตโปรตีนที่สามารถหลั่งออกมานอกเซลล์ได้เช่น การผลิต Glucoamylase ของ *Aspergillus niger*, การผลิต Cellulose ของ *Trichoderma* (Ward, 2012) ซึ่งการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ของเชื้อรานี้จึงเป็นประโยชน์ที่จะลดต้นทุนในการเก็บเกี่ยวได้ด้วย เหตุนี้งานวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเปปไทด์ส่งสัญญาณที่จะทำให้เกิดการชักนำการหลั่งออก โดยในระบบการหลั่งออกนั้นจำเป็นต้องมี Glycosylation ซึ่งเป็นระบบที่สำคัญทำให้โปรตีนสามารถทำงานและเกิดกิจกรรมได้ ซึ่งพบได้ในเซลล์เซลล์ Eukaryote เมื่อเปรียบเทียบกับ Prokaryotes แล้ว

นั้นจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อราจะมีกระบวนการ Post translation ที่สมบูรณ์ (Karnaukhova et al., 2007)

เชื้อราจึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ งานวิจัยนี้จึงสนใจใช้เชื้อรา *A. oryzae* มา

ศึกษาเนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความปลอดภัยที่ได้รับการรับรองความปลอดภัย ที่มาจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา FDA ว่ามีความปลอดภัยต่ออาหาร (Generally Recognized as Safe (GRAS)., 2023) และเชือรานั้นมีการใช้เมทาบอลิต์ได้หลากหลายเช่น โมโนแซคคาไรด์รวมถึง Xylose, Arabinose และ Galactose ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับยีสต์ที่สามารถใช้ได้เพียง Glucose และ Mannose (Cavka and Jönsson, 2014) อีกทั้งเชื้อ *A. oryzae* นั้นมีประโยชน์ที่หลากหลายในการนำมาใช้งานด้านพันธุวิศวกรรมและมีการกำหนดสายจีโนมทำให้เชื้อจุลินทรีย์นี้มีความเหมาะสมในการเป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อในการผลิตโปรตีน (Kitamoto, 2002; Machida et al. 2005)

## 2.3 กระบวนการหลังโปรตีนออกนอกเซลล์

ระบบการหลังโปรตีนในเส้นใยรา (รูปภาพที่ 2.1) จะสามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

### 2.3.1 ขั้นตอนที่ 1

Co- หรือ Post- translation ระบบขนส่งนั้นเป็นระบบที่ทำหน้าที่ในการส่งสาย Polypeptide จาก Ribosome สู่ Endoplasmic reticulum (ER) ในระบบส่ง Co-translation จะมีส่วนจดจำสัญญาณเปปไทด์ (Signal recognized protein, SRP) เข้าจับกับเปปไทด์ส่งสัญญาณเพื่อปิดกั้นการแปลรหัส (Halic et al., 2006) หลังจากนั้นส่วน SRP จะเข้าสู่ ribosome mRNA-nascent peptide complex ให้เข้าเกาะกับส่วนของ ER เป้าหมาย ถัดมา SRP จะถูกปลดจากส่วนประกอบ เพื่อทำให้เกิดการแปลรหัสต่อและจากนั้น Nascent polypeptide จะเข้าไปยัง ER lumen ผ่านทาง Sec 61p (Conesa et al., 2001) ในส่วนของระบบ Post-translation นั้น Nascent polypeptide จะถูกแปลรหัสใน Cytosol แต่จะยังไม่ถูกพับโปรตีนด้วย HSP70 chaperone และ Co- chaperones (Conesa et al., 2001) ตัวประกอบนี้จะสามารถผ่านไปยัง ER เป้าหมาย โดย ER luminal chaperone ที่จับโปรตีนอิมมูโนโกลบูลิน (Bip) และมี Sec63p เป็นตัวเสริมนั้นจะเป็นตัวนำให้โปรตีนเข้ามาไปยัง ER ได้ (Haßdenteufel et al., 2018)

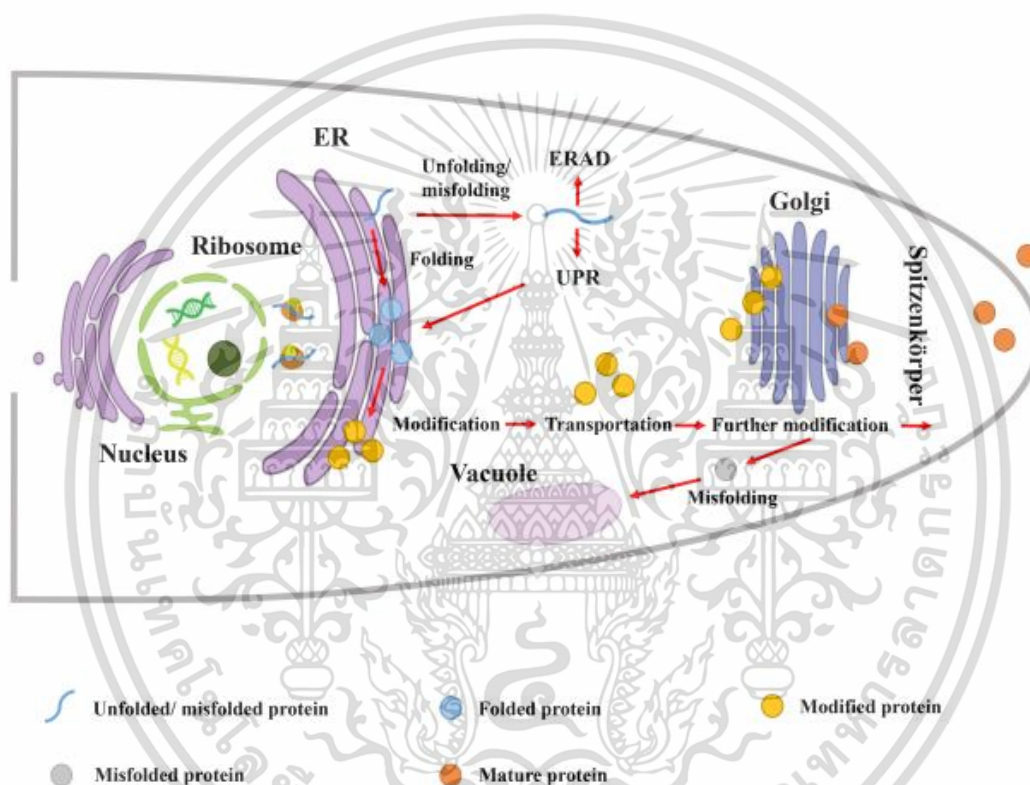
### 2.3.2 ขั้นตอนที่ 2

โปรตีนจะเกิดการพับและถูกปรับเปลี่ยนใน ER โดยเอนไซม์ CLx, BIP และ Protein disulfide isomerase (PDI) (Saloheimo and Pakula, 2012) ซึ่งจะทำให้การปรับเปลี่ยนโปรตีนด้วยกระบวนการ Glycosylation ขั้นตอนนี้เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้โปรตีนนั้นมีความเสถียร, จดจำตำแหน่งได้ และเกิดการหลั่งออก (Mitra et al., 2006) หลังจากเกิดกระบวนการเหล่านี้แล้วจะมีส่วน Unfolded protein response (UPR) และ ER-associated protein degradation (ERAD) ที่มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้าที่ทำลาย Nascent peptides ที่พับผิด (Bernasconi and Molinari, 2011; Wang et al., 2014)

### 2.3.3 ขั้นตอนที่ 3

ขั้นนี้จะเป็นกระบวนการส่งออกของโปรตีนที่พับไปยัง Golgi apparatus ด้วยการรวมกับ Membrane เป้าหมาย และจะทำการหลั่งออกสู่นอกเซลล์ (Spang, 2008) ในเส้นใยานั้นส่วนที่ทำหน้าที่การหลั่ง นั้นจะถูกส่งไปยังเยื่อหุ้มพลาสมาปลายยอดด้วยการผ่านส่วนที่เรียกว่า Spitzenkörper (Virag and Harris, 2006)



รูปภาพที่ 2.1 ภาพแสดงระบบการหลั่งออกของโปรตีนภายในเซลล์

ที่มา <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00293>

## 2.3 GFP (Green fluorescent protein)

GFP นั้นเป็นโปรตีนที่ถูกค้นพบโดย Shimomura ในปี 1962 ซึ่งเป็นโปรตีนเรืองแสงที่ได้มาจาก *Aequorea Victoria* (แมงกะพรุน) ในรายงานการพบนั้นได้ตั้งข้อสังเกตถึงโปรตีนชนิดนี้ไว้ว่า โปรตีนนี้ให้แสงสีเขียวเล็กน้อยผ่านแสงสีเหลืองได้ทั้งสแตนด์ แต่ให้สีเขียวที่สว่างได้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ซึ่งได้มีรายงานข้อมูลการปล่อยแสงของ GFP ว่ามีค่าอยู่ที่ 508 นาโนเมตรมีข้อสังเกตว่าโปรตีนที่อยู่ในไม่ว่างกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อของ *Aequorea* นั้นก็มีช่วงคลื่นแสงที่ใกล้เคียงกันนี้ (Tsien, 1998) ด้วยคุณสมบัติในการเรืองแสงนี้เองทำให้โปรตีนตัวนี้ถูกนำมาใช้ในด้านของชีวเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการพบโปรตีนที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ GFP จะประกอบด้วยโปรตีนเรืองแสง (FPs) และโครโมโปรตีน (CPs) ประมาณ 200 ชนิดจากสิ่งมีชีวิตในคลาส Anthozoa และ Hydrozoa โปรตีน GFP ถูกใช้เป็นตัว reporter เนื่องจากความสามารถที่จะสร้างโครโมฟอร์ภายในเซลล์โดยไม่ต้องใช้โคแฟกเตอร์เสริม อีกทั้งยังสามารถสร้างโครโมฟอร์ได้ในสิ่งมีชีวิต เนื้อเยื่อและเซลล์ ซึ่งมักใช้เป็นการศึกษาเพื่อติดตามโปรตีน (Stepanenko, 2008) ข้อดีของการใช้โปรตีน GFP 1. สามารถถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมได้ ซึ่งการส่งต่อทางพันธุกรรมนั้นจะส่งผ่านกันได้โดยไม่รบกวนกระบวนการทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตอื่นและสิ่งมีชีวิตที่ได้รับ GFP นั้นก็สามารถส่งพันธุกรรมนี้ต่อไปได้ 2. มีคุณสมบัติในการรวมกับโปรตีนชนิดอื่นได้ โดยไม่ทำให้เกิดผลกระทบต่อโปรตีนและสามารถที่จะติดผ่านกับเซลล์ต่างๆ เพื่อใช้ในการติดตามโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษาได้ 3. ใช้ทดลองในสิ่งมีชีวิตได้ ในวิธีการแบบเก่า นั้นมักใช้ฟลูออเรสเซินไอโซไซโทไซยานีน (FITC) แต่หากทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์จึงไม่สามารถใช้ได้ แต่สำหรับโปรตีน GFP นั้นมีความอันตรายน้อยกว่ามากเพราะเป็นโปรตีนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติและสามารถที่จะส่งต่อลักษณะทางพันธุกรรมในกับรุ่นต่อไปโดยไม่เกิดความเสียหายขึ้น

(<https://www.photometrics.com/learn/microscopy-basics/what-is-gfp>, n.d.)

## 2.4 การสร้างพลาสมิดด้วยเทคนิค Yeast assembly

เป็นการอาศัยยีสต์เพื่อรวมองค์ประกอบชิ้นดีเอ็นเอต่างๆ ให้เกิดเป็นพลาสมิดโดยคุณลักษณะของยีสต์เอง เนื่องจากมีกระบวนการ Homologous recombination ซึ่งเป็นกลไกตามธรรมชาติของตัวยีสต์ จึงนำองค์ความรู้นี้มาใช้ในการซ่อมแซมการแตกหักของดีเอ็นเอซึ่งเรียกว่า Homologous recombinational repair (HRR) (Thompson and Schild, 2001) ทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีความถูกต้อง นอกจากนี้การใช้ยีสต์นั้นมีความเชื่อถือได้ ต้นทุนน้อย และมีประสิทธิภาพที่ดี (Ip, et al., 2020) ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้กล่าวไว้ว่า การใช้ส่วน Homology ที่สั้น 20-30 เบส ก็สามารถที่จะใช้ยีสต์เพื่อประกอบชิ้นส่วนต่างๆ ที่ไม่ซ้ำกันได้เป็นเวกเตอร์ที่หลากหลาย ด้วยเหตุนี้ทำให้การใช้ยีสต์เพื่อใช้ Assembly ถูกเลือกมาใช้งานในห้องปฏิบัติการนอกจากเทคนิค Yeast assembly ยังมีการโคลนยีนหรือเกิดการรวมกันของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น Ligation หรือ Gibson assembly ซึ่งสามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสม

## 2.6 การส่งถ่ายดีเอ็นเอสู่เชื้อรา และการคัดเลือก Transformants

การเลือกเทคนิคการถ่ายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แต่ละชนิด สำหรับรา *A. oryzae* นิยมใช้กระบวนการนี้เรียกว่า PEG-mediated protoplast transformation (PMT) ซึ่งจะมี 3 ขั้นตอนหลัก เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ การคัดลอกหรือการนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

คือ 1. การแยกเซลล์โปรโตพลาสต์ (Protoplast isolation) โดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์รา 2. การ

รวมเซลล์โปรโตพลาสต์ (Protoplast fusion) โดยใช้สารละลาย Polyethylene glycol (PEG) และการเลี้ยงเซลล์โปรโตพลาสต์ (Protoplast culture) บนอาหารคัดเลือก (จันทร์วิภา รัตนอนันต์, ม.ป.ป.) ซึ่งการคัดเลือกเชื้อราที่มีการถ่ายโอนพลาสมิด (Transformant) ในงานวิจัยนี้จะใช้คุณสมบัติของ Gene maker ที่ช่วยสร้างอาหารให้กับเชื้อราเพื่อเจริญบนเพลทอาหาร Czapek dox (CD) และใช้การส่องกล้อง Fluorescent คัดเลือกเชื้อราที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ นอกจากนี้การถ่ายดีเอ็นเอในราด้วยเทคนิคอื่นๆ ได้แก่ Agrobacterium-mediated transformation (AMT) ซึ่งต้องอาศัยแบคทีเรียช่วยในการถ่ายดีเอ็นเอ ซึ่งมีความยุ่งยากซับซ้อนจึงไม่ค่อยนิยมใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

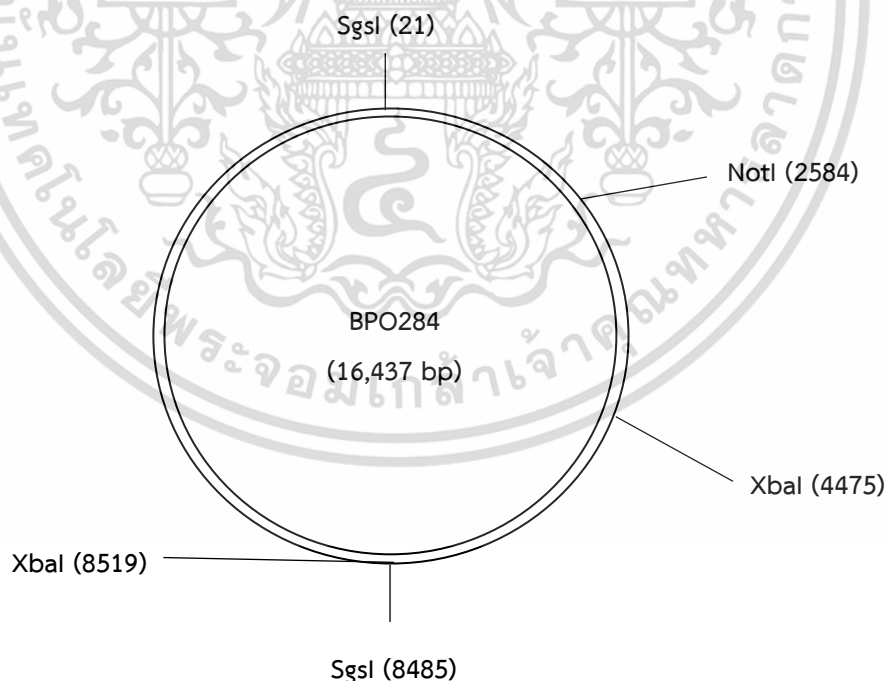
#### 3.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม

##### 3.1.1 การสร้างส่วนประกอบของพลาสมิดลูกผสม

พลาสมิดลูกผสมประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอส่วนต่างๆ ดังนี้

1. พลาสมิดฐาน (Backbone plasmid) ชื่อ BPO284 ประกอบด้วยยีนคัดเลือกในแบคทีเรีย ยีสต์ และราเส้นใย ได้แก่ ยีนต้านยาแอมพิซิลินและยีนสร้างสารอาหารที่จำเป็น พร้อมทั้งมีเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ดังแสดงในรูปภาพที่ 3.1 ซึ่งเปิดวงพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *NotI* โดยมีปฏิกิริยาดังแสดงใน ตารางที่ 3.1 และปมที่ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที
2. ยีน GFP และเปปไทด์ส่งสัญญาณ ชนิด A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 และ D2 เตรียมโดยการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.2

ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด DNA clean & concentrator™-4 (Zymo research, Cat. No. D4014) และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์รุ่น BioPhometer 30D (Eppendorf, serial No.6133DH100540) โดยแต่ละชิ้นดีเอ็นเอจะมีปริมาณ 300-500 นาโนกรัม



**รูปภาพที่ 3.1** รูปพลาสมิดฐาน BPO284 สำหรับใช้โคลนยีนเพื่อการแสดงออกของเปปไทด์ส่ง

สัญญาณและโปรตีน GFP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาในการเปิดวงพลาสมิดฐาน BPO284

| องค์ประกอบ       | หน่วย (ไมโครลิตร) |
|------------------|-------------------|
| H <sub>2</sub> O | 34                |
| 10X buffer       | 5                 |
| NotI             | 9                 |
| DNA (3ug)        | 2                 |
| Total volume     | 50                |

ตารางที่ 3.2 แสดงองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในผลิตชิ้นดีเอ็นเอเปปไทด์ส่งสัญญาณ และ GFP

| องค์ประกอบ       | หน่วย (ไมโครลิตร) |
|------------------|-------------------|
| H <sub>2</sub> O | 36.75             |
| 5X Buffer        | 10                |
| dNTP             | 1                 |
| Forward primer   | 1                 |
| Reverse primer   | 1                 |
| Enzymes Superfi  | 0.25              |
| Template         | 1                 |
| Total volume     | 50                |

### 3.1.2 การรวมชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิค Yeast assembly

การเตรียมเชื้อยีสต์ให้พร้อมรับชิ้นดีเอ็นเอ ทำโดยนำเอายีสต์ INVsc1 (รูปภาพที่ 3.2) 1-3 โคลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาณ 10 มล. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำยีสต์มาวัด OD600 และใช้เป็นหัวเชื้อโดยให้มีค่า OD เริ่มต้น 0.6 ในอาหารเหลว YPD ปริมาณ 50 เลี้ยงต่ออีก 3 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดมารวมกันกับเซลล์ยีสต์ที่ล้างแล้วด้วยบัฟเฟอร์ TE และแซนนิสสารละลาย 1X LiAc / 0.5X TE ซึ่งดีเอ็นเอจะถูกถ่ายโอนโดยใช้ 1X LiAc/ 40%PEG-3350/1X TE ตามวิธีการของ Invitrogen (Catalog no. V8251-20) โดยจะมีชุดส่วนประกอบชิ้นดีเอ็นเอ ดังนี้

3.1.1.1 ชุดควบคุมปัจจัยลบ (Negative control) ประกอบด้วย พลาสมิดฐานและยีน GFP

3.1.1.2 ชุดควบคุมปัจจัยบวก (Positive control) ประกอบด้วย พลาสมิดฐาน เปปไทด์ส่งสัญญาณ ชนิด *amyB* และ *glaA* และยีน *GFP*

3.1.1.3 ชุดทดลอง ประกอบด้วย พลาสมิดฐาน เปปไทด์ส่งสัญญาณ ชนิด A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2 และยีน *GFP*

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากไม่มีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำยีสต์ที่ได้รับดีเอ็นเอเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก SD ที่เติม Histidine, Tryptophan และ Leucine บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงทำการคัดเลือกโคโลนียีสต์ที่มีพลาสมิดตามเป้าหมายด้วยเทคนิค Yeast colony PCR ตามตารางที่ 3.3 และนำโคโลนียีสต์ที่มีพลาสมิดตรงเป้าหมายนั้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD 10 มล. 30 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดในลำดับต่อไป



รูปภาพที่ 3.2 ยีสต์ INVsc1 ที่ใช้ในการสร้างพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิค Yeast assembly

ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา Yeast colony PCR

| องค์ประกอบ        | หน่วย (ไมโครลิตร) |
|-------------------|-------------------|
| H <sub>2</sub> O  | 4.5               |
| 2X Phire green MM | 5                 |
| Forward primer    | 0.25              |
| Reverse primer    | 0.25              |
| Template          | 1                 |
| Total volume      | 10                |

### 3.2 การเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli*

การเพิ่มปริมาณพลาสมิดให้มีปริมาณมากเพียงพอ ทำโดยการนำพลาสมิดที่สกัดจากยีสต์ในข้อที่ 3.1 มาถ่ายเข้าสู่ *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) ด้วยวิธีการ Heat shock ตามวิธีของ Invitrogen (Cat. No. 18265-017) ซึ่งคัดเลือกบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่เติมยาแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมล. บ่ม 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง และคัดเลือกโคโลนีอย่างสุ่มไว้ในอาหารเหลว Luria-Bertani 10 มล. ที่เติม ยาแอมพิซิลิน 100 ไมโครลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายได้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร  
ชุด QIAprep spin Miniprep kit (Cat. No. 163043149) เพื่อนำมาวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ แล้วจึง  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบพลาสมิดด้วยการวิเคราะห์ Restriction enzyme (ตารางที่ 3.4) ชนิด *NotI* และ *XbaI* โดยมีความเข้มข้นดีเอ็นเออยู่ที่ 300-500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ 90 นาที 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงวิเคราะห์รูปแบบและขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพร้อมทั้งยืนยันระดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการวิเคราะห์ Sequencing ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 3.4 แสดงส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา Restriction enzyme ชนิด *NotI* และ *XbaI*

| องค์ประกอบ         | หน่วย (ไมโครลิตร) |
|--------------------|-------------------|
| H <sub>2</sub> O   | 13.1              |
| 10X buffer         | 1.5               |
| <i>NotI</i>        | 0.2               |
| <i>XbaI</i>        | 0.2               |
| DNA (300 นาโนกรัม) | X                 |
| Total volume       | 15                |

### 3.3 การเตรียมพลาสมิดลูกผสมเพื่อถ่ายโอนสู่รา

การเตรียมพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *SgsI* สามารถเตรียมได้ตามตารางที่ 3.5 และนำไปทำการไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60-90 นาที จากนั้นจึงทำการตรวจสอบขนาดพลาสมิดลูกผสมที่ตัดได้โดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและทำให้สายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย DNA cleaning & Concentration<sup>TM</sup>-5

ตารางที่ 3.5 แสดงส่วนประกอบการทำปฏิกิริยาในการเปิดวงพลาสมิดลูกผสมด้วย *SgsI* เพื่อเตรียมถ่ายดีเอ็นเอสู่รา

| องค์ประกอบ          | หน่วย (ไมโครลิตร) |
|---------------------|-------------------|
| H <sub>2</sub> O    | 43                |
| 10X buffer          | 5                 |
| <i>SgsI</i>         | 1                 |
| DNA (400 ไมโครกรัม) | X                 |
| Total               | 50                |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสู่ราโดยวิธี PEG-mediated protoplast transformation (PMT)

การเตรียมเชื้อรา *A. oryzae* เป็นเซลล์ Protoplast ด้วยวิธีการของ Protoplast transformation Version IV form Chutakul C. et.al., 2007 โดยย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่  $\beta$  glucuronidase, Drisilase และ Lysing enzyme และนำพลาสมิดลูกผสมที่เตรียมได้เข้าสู่ราด้วยสารละลาย Polyethylene glycol (PEG) แล้วจึงนำมาคัดเลือกบนเพลทอาหารแข็ง Czapek Dox (CD) ที่ไม่มีการเติมสารอาหารจำเป็นชนิดยูราซิล สำหรับเชื้อรา ชุดควบคุมปัจจัยลบทดสอบบนอาหาร CD ที่เติมและไม่เติมสารอาหารยูราซิล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นคัดเลือกเชื้อราโดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GFP* ด้วยกล้อง Fluorescent (Invented Microscope Model IX71) เมื่อคัดเลือกได้โคลนแล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณสปอร์ในลำดับถัดไป

### 3.5 การเตรียมตัวอย่างและการเก็บสปอร์เชื้อรา

นำราที่มีพลาสมิดลูกผสม จำนวน 11 ชนิด ที่คัดเลือกได้ ชนิดละ 5 โคลนมาเพิ่มปริมาณสปอร์ ในพลาสติกอาหารแข็งข้าว ประกอบด้วยข้าวขัดขาวต่อน้ำกลั่น (1 ต่อ 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน จากนั้นเก็บสปอร์โดยการชะด้วย 0.05% Tween 50 มล. เขย่าจนสปอร์ละลาย ออกและกรองสปอร์ด้วยกระดาษ Miracloth (Cat. No. 3845698) แล้วทำการนับสปอร์ด้วย Hemacytometer จากนั้นจึงนำมาคำนวณความเข้มข้นสปอร์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในลำดับถัดไป

### 3.6 การประเมินการหลังโปรตีนออกนอกเซลล์

การเพาะเลี้ยงทำโดยลงสปอร์  $2 \times 10^6$  สปอร์ต่อมล. ในอาหารเหลว 4% SM (ตารางที่ 3.6) ปริมาตร 50 มล.ต่อพลาสติก ในพลาสติกขนาด 250 มล. ทำการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน เก็บเชื้อ 1- 2 มล. ในวันที่ 1, 3 และ 5 และกรอกแยกเซลล์โดยกรองผ่านกระดาษ Miracloth (Cat. No. 3845698) และปั่นเหวี่ยงได้ส่วนใสหรือ Cell free supernatant เติมส่วนใสปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate นำไปวัดค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น Excitation และ Emission เท่ากับ 485 และ 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader รุ่น BioTek synergy H1 แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้ออกสร้างกราฟเป็นค่าเฉลี่ย  $FI \pm SD$  (จำนวน 4-5 ซ้ำ ต่อชนิดเปปไทด์ส่งสัญญาณ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* (ปรับ pH 5.5 ด้วย 2M KOH)

| องค์ประกอบ                            | กรัมต่อลิตร |
|---------------------------------------|-------------|
| Glucose                               | 40 กรัม     |
| Yeast extract                         | 5 กรัม      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 2.4 กรัม    |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.1 กรัม    |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0.5 กรัม    |
| NH <sub>3</sub> Cl                    | 0.2 กรัม    |
| Element source                        | 1 มล.       |

### 3.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (Analysis of Variance (ANOVA))

ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 11.5 สำหรับ windows ด้วยการใช้เครื่องมือการวิเคราะห์แบบ Compare Means ชนิด One-way ANOVA โดยทดสอบแบบ Duncan test ที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ  $p$ -value < 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

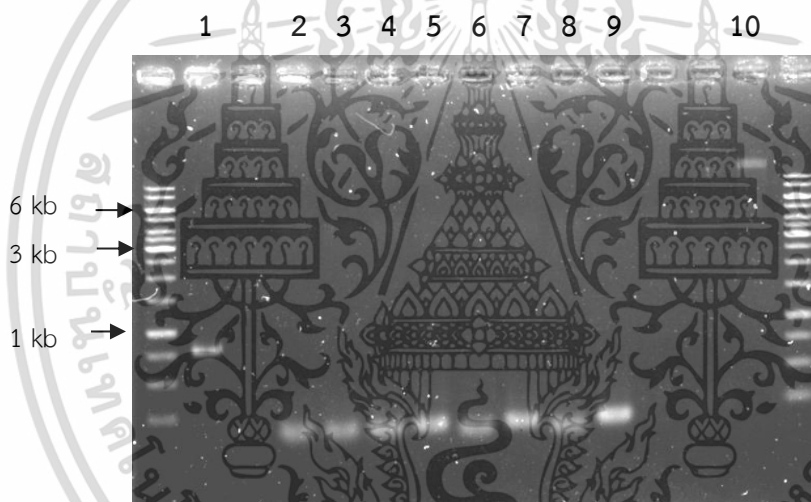
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม

##### 4.1.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดฐาน

พลาสมิดลูกผสมที่สร้างประกอบไปด้วย 3 ส่วน ได้แก่ 1. ยีนรายงานผล *GFP* 2. เปปไทด์ส่งสัญญาณ และ 3. พลาสมิดฐาน BPO284 โดยยีน *GFP* และเปปไทด์ส่งสัญญาณ มีขนาด 0.7 และ 0.10-0.16 kb ตามลำดับ (รูปภาพที่ 4.1) ได้จากการกระบวนการ PCR กับไพรเมอร์ที่จำเพาะและมีส่วน overlap 20-30 เบส และเปิดวงพลาสมิดฐานโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NotI* ได้ขนาด 16.0 kb (รูปภาพที่ 4.1) โดยแต่ละชิ้นดีเอ็นเอทำให้บริสุทธิ์และมีปริมาณ 300-500 นาโนกรัม เพื่อให้เพียงพอสำหรับการสร้างพลาสมิดลูกผสมโดยเทคนิค Yeast assembly



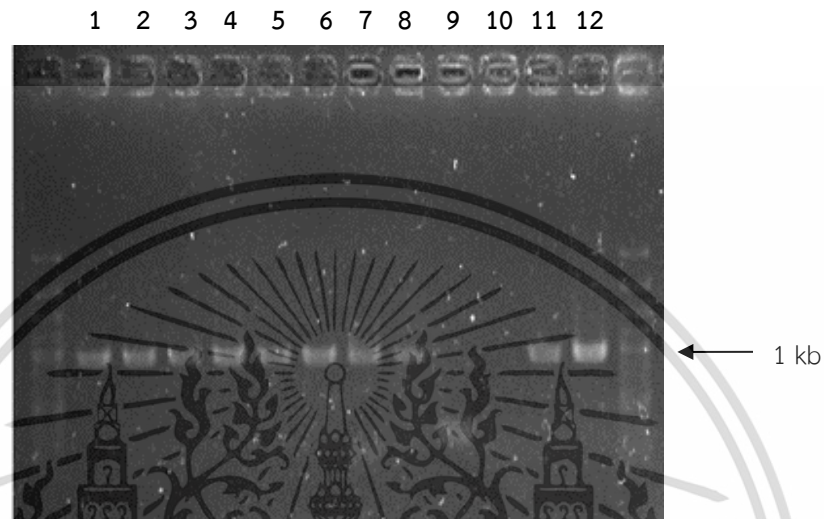
รูปภาพที่ 4.1 การวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงชิ้นดีเอ็นเอ ดังนี้

1. เลนที่ 1 ยีนรายงานผล *GFP*
2. เลนที่ 2-9 คือ เปปไทด์ส่งสัญญาณ ชนิด A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 และ D2
3. เลนที่ 10 คือพลาสมิดฐาน BPO284 ที่ถูกเปิดวง

##### 4.1.2 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมจากกระบวนการ Yeast assembly

เซลล์ยีสต์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมถูกคัดเลือกบนอาหารแข็งที่ขาดสารอาหาร Uracil ที่เป็นยีนคัดเลือก และทำการคัดเลือกยีสต์ที่ได้ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณแตกต่างกันทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ ชุดควบคุมปัจจัยบวก (Positive control) 2 ชนิด ได้แก่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณชนิด *amyB* และ *glaA* และ ชุดทดลอง 8 ชนิด ได้แก่ A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 และ D2 นอกจากนี้ยังมีพลาสมิดลูกผสมที่ไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณซึ่งเป็นชุดควบคุมปัจจัยลบ (Negative control) อีก 1 ชนิด การคัดเลือกยีสต์แต่ละ 8-12 โคลน ด้วยวิธีการ Yeast colony PCR โดยมีไพรเมอร์จำเพาะ และวิเคราะห์ใช้

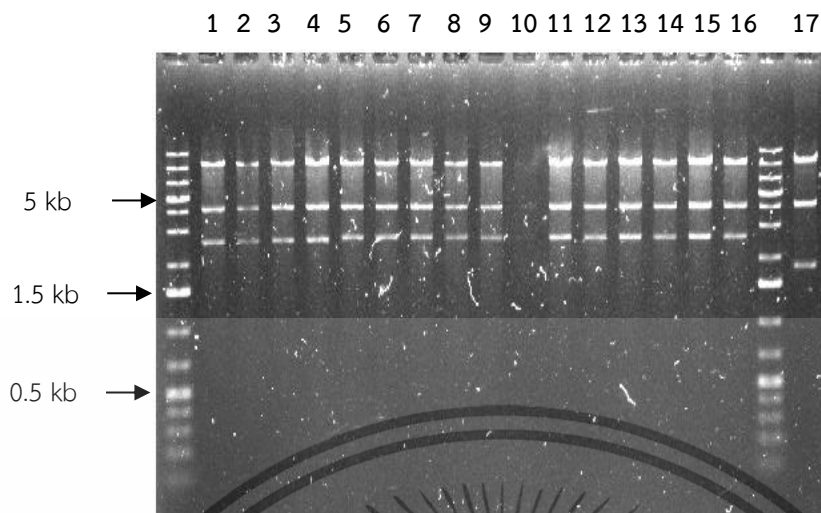
ขนาดของแบนดิเอ็นเอเป้าหมาย เท่ากับ 0.9-1.0 kb ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปภาพที่ 4.2) เป็นตัวอย่าง ซึ่งพบว่า สามารถคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมแต่ละชนิดได้อย่างน้อย 5-10 โคลน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 40-90 จากนั้นทำเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสมจากยีสต์โดยการถ่ายโอนสู่ *E. coli* ในลำดับต่อไป



รูปภาพที่ 4.2 ตัวอย่างการวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยการทำ Yeast colony PCR เลขที่ 1-8, 11-12 ได้ขนาดตามเป้าหมาย และเลขที่ 9-10 ไม่ได้ขนาดตามเป้าหมาย

#### 4.1.3 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

พลาสมิดลูกผสมทั้ง 10 ชนิด จะถูกเพิ่มปริมาณโดยการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* และวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้แก่ *NotI* และ *XbaI* โดยพลาสมิดลูกผสมมีขนาดแบนเป้าหมาย 2.5-2.7, 4.0 และ 10.7 kb. ในขณะที่พลาสมิดฐานได้ขนาดแบน 1.8, 4.0, 10.7 kb. (ภาพที่ 4.3) ซึ่งพบว่า พลาสมิด ลูกผสมทั้งหมดได้ขนาดแบนตามต้องการอย่างน้อย 3 ใน 4 โคลน จากนั้นจึงยืนยันความถูกต้องของพลาสมิดลูกผสมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในลำดับต่อไป

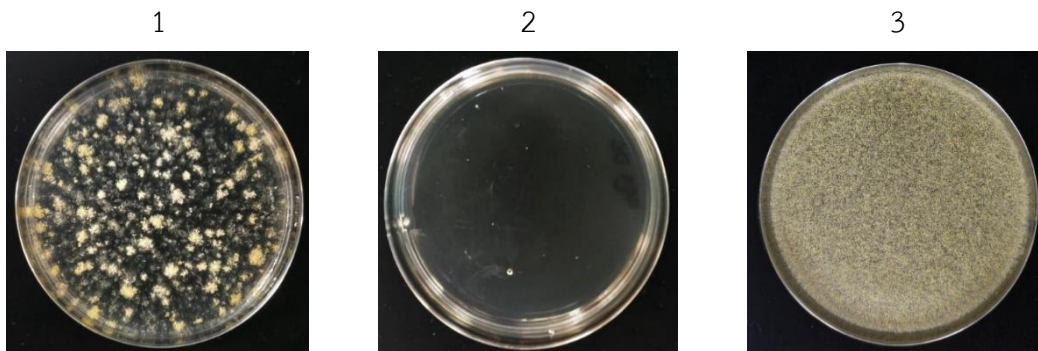


รูปภาพที่ 4.3 ตัวอย่างการวิเคราะห์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *XbaI* เลขที่ 1-4, 5-8, 9-12 และ 13-16 คือพลาสมิดลูกผสมที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณชนิด A1, A2, B1 และ B2 เลขที่ 17 คือพลาสมิดฐาน

#### 4.2 การคัดเลือกรากผสม

พลาสมิดลูกผสมที่มีลำดับเบสถูกต้อง จะเตรียมเพื่อถ่ายโอนสู่รากโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SgsI* และถ่ายโอนสู่รากบ้านที่เป็นสายพันธุ์กลายยีนสร้างสารอาหารยูรีดิน แล้วจึงคัดเลือกบนอาหารแข็งที่ไม่เติมสารอาหารยูรีดิน ดังแสดงในภาพที่ 4.4 โดยเชื้อราที่ได้พลาสมิดนั้นจะสามารถโตได้เนื่องจากการสร้างอาหารตัวเอง ในขณะที่ราที่ไม่ได้รับพลาสมิดจะไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่ไม่เติมสารอาหารยูรีดิน

จากนั้นนำเพลทเชื้อราไปคัดเลือกโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้แสง Florescent เพื่อส่องดูโคโลนีของเชื้อราที่ได้รับพลาสมิดซึ่งจะมีการเรืองแสงจากการแสดงออกของยีน *GFP* (รูปภาพที่ 4.5)



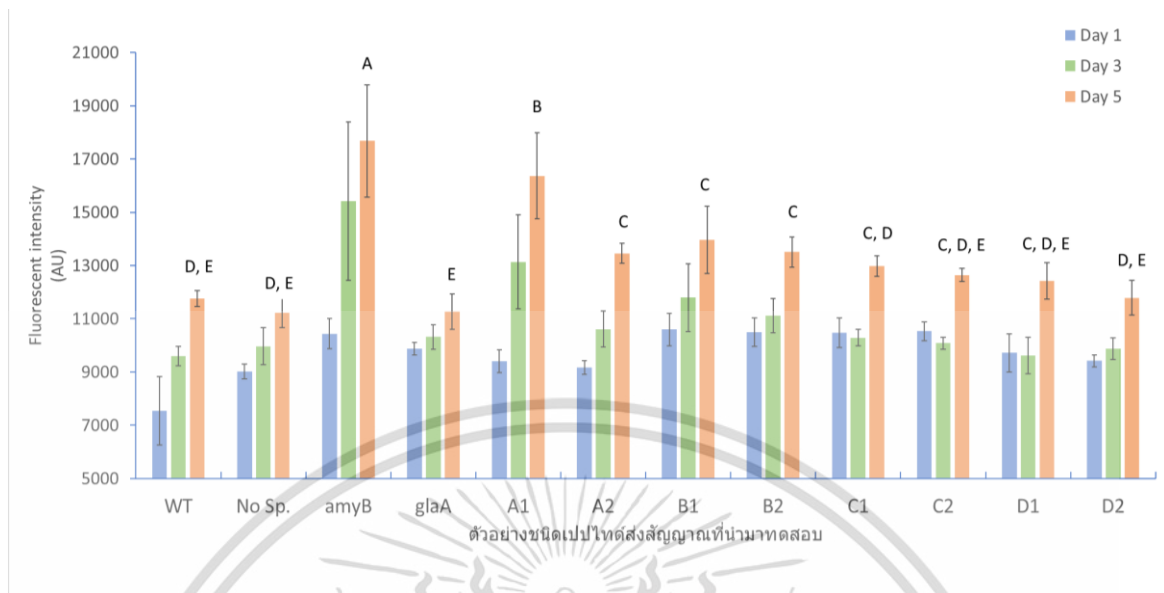
รูปภาพที่ 4.4 แสดงการเจริญของโคโลนีราที่อยู่บนอาหารคัดเลือก 1. ชุดทดลองราที่ถ่ายโอนด้วยพลาสมิดลูกผสมและเจริญบนอาหารที่ไม่เติมยูริดีน 2. ชุดควบคุมราที่ถ่ายโอนด้วยน้ำและเจริญบนอาหารที่ไม่เติมยูริดีน 3. ชุดควบคุมราที่ถ่ายโอนด้วยน้ำและเจริญบนอาหารที่เติมยูริดีน



รูปภาพที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบ 1. เชื้อรา *A. oryzae* ที่รับพลาสมิดเข้าไปในเซลล์เกิดการเรืองแสงของยีน GFP และ 2. เชื้อราที่ไม่ได้รับพลาสมิด

#### 4.3 การประเมินกิจกรรมการหลังโปรตีน GFP ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดลองการประเมินการหลังโปรตีน GFP ในรากลูผสมทั้งหมด 11 สายพันธุ์ๆ ละ 5 โคลน โดยเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อวันที่ 1, 3 และ 5 พบว่าในวันที่ 5 ให้ค่า Fluorescent intensity (FI, AU) สูงที่สุด โดยในชุดควบคุมปัจจัยบวกที่มีเบปไทด์ส่งสัญญาณชนิด *amyB* ให้ค่า FI สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4.6) โดยสูงกว่าชุดควบคุมปัจจัยลบที่ไม่มีเบปไทด์ส่งสัญญาณ 57.4% อย่างไรก็ตามชุดควบคุมปัจจัยบวกอีกตัวที่มีเบปไทด์ส่งสัญญาณ *glaA* ไม่พบการส่งเสริมการหลัง GFP สำหรับเบปไทด์ส่งสัญญาณชนิด A1 ให้ค่า Fluorescent intensity สูงเป็นลำดับที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4.6) โดยสูงกว่าชุดที่ไม่มีเบปไทด์ส่งสัญญาณ 45.7% และเบปไทด์ส่งสัญญาณชนิด A2 B1 และ B2 มีการหลัง GFP ในระดับใกล้เคียงกันและสูงกว่าชุดที่ไม่มีเบปไทด์ส่งสัญญาณเฉลี่ย 21.5% นอกจากนี้สายพันธุ์ Wild type (WT) และชุดควบคุมปัจจัยลบที่ไม่มีเบปไทด์ส่งสัญญาณนั้น มีการตรวจพบค่าการเรืองแสงในอาหารระดับฐาน (base line) ซึ่งอาจเกิดจากการที่มีโปรตีนที่มีคุณลักษณะเรืองแสงตัวอื่นๆ ที่ไม่ใช่ GFP (Auto fluorescent) (Mannelli et al., 2016) อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาพที่ 4.6 กราฟแสดงการวัดปริมาณการหลังโปรตีน GFP ในน้ำเลี้ยงเชื้อวันที่ 1, 3 และ 5 โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากจำนวน 5 โคโลนีต่อชนิดของเปปไทด์สังเคราะห์ (Duncan test p-value < 0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองสามารถสร้างราที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณในการชักนำการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ได้เป็นราลูกผสม 8 ชนิด ที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณ ชนิด A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 และ D2 และราชุดควบคุม 3 ชนิด ชุดควบคุมที่ไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณ ชุดควบคุมที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณชนิด *amyB* และ *glaA* ซึ่งจากวัดค่า FI ในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าเปปไทด์ส่งสัญญาณ *amyB* มีผลการหลั่ง GFP ออกนอกเซลล์มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญและมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณ 57.4% และนอกจากนี้เปปไทด์ส่งสัญญาณชนิดใหม่ A1 มีค่า FI ที่มากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณ 47.5% ดังนั้นในงานศึกษานี้สามารถคัดเลือกเปปไทด์สัญญาณที่มีประสิทธิภาพชักนำการหลั่งออกได้ 2 ชนิดคือ *amyB* และ A1

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเปปไทด์ส่งสัญญาณโดยการวัดการหลั่งโปรตีน GFP ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าสามารถประเมินผลและคัดเลือกเปปไทด์ส่งสัญญาณที่มีประสิทธิภาพได้ แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดลองเพื่อยืนยันความสอดคล้องของการสะสมโปรตีน GFP ภายในเซลล์ในแต่ละสายพันธุ์เพื่อให้เห็นความเชื่อมโยงระหว่างสายพันธุ์ที่มีหรือไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณ และให้มีข้อสรุปที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาคผนวก ก**  
**การเตรียมอาหาร**

**1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast assembly**

| อาหาร      | ปริมาณ        |
|------------|---------------|
| YPD        | 50 มล.        |
| Supplement | ปริมาณ / YPD  |
| Histidine  | 200 ไมโครลิตร |
| Tryptophan | 200 ไมโครลิตร |
| Leucine    | 1 มล.         |

**2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ E. coli**

| อาหาร            | ปริมาณ          |
|------------------|-----------------|
| Luria-Bertani    | 50 มล.          |
| ยา               | ปริมาณ / 50 มล. |
| Ampicillin (Amp) | 100 ไมโครลิตร   |

**3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา (PMT)**

| อาหาร      | ปริมาณ / 400 มล. |
|------------|------------------|
| Czapek Dok | 14 กรัม          |
| Sorbitol   | 87.6 กรัม        |
| Agar       | 1.6 กรัม         |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จันทร์วิภา รัตนอนันต์. (ม.ป.ป.). การแยกโปรโตพลาสต์จากใบพืช. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. ม.เกษตรศาสตร์. [protoplast.pdf \(ku.ac.th\)](http://protoplast.pdf(ku.ac.th))

ชาติชาย แจ้จแสน. (2546). การตรวจกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ที่เรีย ด้วยวิธี GFP MICROPLATEASSAY. [วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยมหิดล]. ฐานข้อมูล วิทยานิพนธ์ไทย. [รายละเอียด - ระบบฐานข้อมูลวิทยานิพนธ์ไทย : ศูนย์บริการความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี \(STKS\) \(thaitheis.org\)](http://รายละเอียด-ระบบฐานข้อมูลวิทยานิพนธ์ไทย:ศูนย์บริการความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี(STKS)(thaitheis.org))

Bernasconi, R., and Molinari, M. (2011). ERAD and ERAD tuning: disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER. *Current Opinion in Cell Biology*. 23, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.10.002>

Conesa, A., Punt, P. J., van Luijk, N., and van den Hondel, C. A. (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology*. 33(3):155-71. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1276>

Cavka, A., and Jönsson, L. J. (2014). Comparison of the growth of filamentous fungi and yeasts in lignocellulose-derived media. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.04.003>

Halic, M., Blau, M., Backer, T., Mielke, T., Pool, M. R., Wild, K., Sinning, I., and Beckmann, R. (2006). Following the signal sequence from ribosomal tunnel exit to signal recognition particle. *Nature*. 444. 507-511. <https://doi.org/10.1038/nature05326>

Haßdenteufel, S., Johnson, N., Paton, A. W., Paton, J. C., High, S., and Zimmermann, R. (2018). Chaperone-mediated Sec61 channel gating during ER import of small precursor proteins overcomes Sec61 inhibitor-reinforced energy barrier. *Cell Reports*. 23(5), 1373-1386. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.122>

Ip, K., Yadin, R., and George, K.W. (2020). High-throughput DNA assembly using yeast homologous recombination. *DNA cloning and Assembly*. 2205, P.79-89. [10.1007/978-1-0716-0908-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0908-8_5)

Kitamoto, K. (2002). Molecular biology of the Koji molds. *Adv. Appl. Microbiol.* 51:129–153. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(02\)51004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(02)51004-2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Karnaukhova, E., Ophir, Y., Trinh, L., Dalal, N., Punt, P. J., Golding, B., et al. (2007). Expression of human  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor in *Aspergillus niger*. *Microb. Cell Fact.* 6:34. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-34>

Machida, M., K. Asai, M. Sano, T. Tanaka, T. Kumagai, G. Terai, K. Kusumoto, T. Arima, O. Akita, Y. Kashiwagi, K. Abe, K. Gomi, H. Horiuchi, K. Kitamoto, T. Kobayashi, M. Takeuchi, D. W. Denning, J. E. Galagan, W. C. Nierman, J. Yu, D. B. Archer, J. W. Bennett, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, N. D. Fedorova, O. Gotoh, H. Horikawa, A. Hosoyama, M. Ichinomiya, R. Igarashi, K. Iwashita, P. R. Juvvadi, M. Kato, Y. Kato, T. Kin, A. Kokubun, H. Maeda, N. Maeyama, J. Maruyama, H. Nagasaki, T. Nakajima, K. Oda, K. Okada, I. Paulsen, K. Sakamoto, T. Sawano, M. Takahashi, K. Takase, Y. Terabayashi, J. R. Wortman, O. Yamada, Y. Yamagata, H. Anazawa, Y. Hata, Y. Koide, T. Komori, Y. Koyama, T. Minetoki, S. Suharnan, A. Tanaka, K. Isono, S. Kuhara, N. Ogasawara, and H. Kikuchi. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438:1157–1161. [10.1038/nature04300](https://doi.org/10.1038/nature04300) <https://doi.org/10.1038/nature04300>

Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N.C., and Surolia, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in Biochemical Sciences*. 31, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.003>

Mannelli, G., Cecconi, L., and Gallo, O. (2016). Laryngeal preneoplastic lesions and cancer: challenging diagnosis. Qualitative literature review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 106, P. 64-90. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.07.004>

Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, Y., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Kitamoto, K., and Abe, K. (2006). Extracellular Production of Neoculin, a Sweet-Tasting Heterodimeric Protein with Taste-Modifying Activity, by *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, P. 3716-3723. [10.1128/AEM.72.5.3716-3723.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3716-3723.2006)

Noguera N.T. and Lima, D.C. (2023). Chapter 7 - Plant life-associated natural products: Algae and mushrooms. *Natural Plant Products in Inflammatory Bowel Diseases*. 173-213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99111-7.00003-9>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spang, A. (2008). Membrane traffic in the secretory pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65, 2781-2789. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8349-y>

Stepanenko, O.V., Verkhusha, V. V., Kuznetsova. I.M., Uversky, V.N., and Turoverov, K.K. (2008). Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Current Protein & Peptide Science*. 9(4) : 338-69. [doi:10.2174/138920308785132668](https://doi.org/10.2174/138920308785132668)

Saloheimo, M., and Pakula, T. M. (2012). The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology* 158(Pt 1), 46–57. DOI 10.1099/mic.0.053132-0

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-44. [doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509)

Thompson, L.H., and Schild, D. (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 477(1-2), P. 131-153. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00115-4)

Teledyne Photometrics. (n.d.). *What is GFP?*. Retrieved October 27, 2023, from <https://www.photometrics.com/learn/microscopy-basics/what-is-gfp#:~:text=Chemistry%20in%202008.,Green%20Fluorescent%20Protein,of%20just%20three%20amino%20acids.>

U.S. food & drug administration. (2023). *Generally Recognized as Safe (GRAS)*. Retrieved October 27, 2023, from <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>

Virag, A., and Harris, S. D. (2006). The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycol. Res.* 110, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.09.005>

Ward, O. P. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 30, 1119-1139. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>

Wang, G., Zhang, D., and Chen, S. (2014). Effect of earlier unfolded protein response and efficient protein disposal system on cellulase production in *Rut C30*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 2587–2595. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1682-4>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang, Q., Zhong C., and Xiao, H. (2020). “Genetic Engineering of Filamentous Fungi for Efficient Protein Expression and Secretion”. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(293). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00293>

Xu, Z., Zhang, R., Wang, T., and Kong, J. (2021). The N-terminus of *Lactobacillus amylovorus* feruloyl esterase plays an important role in its secretion by *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 20, 152. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01645-9>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 27 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นาย ภูมิรวี อีสี่ รหัสประจำตัว 63050511

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงการ  
สหกิจศึกษาเรื่อง การศึกษาการเปปไทด์ส่งสัญญาณที่มีผลต่อการหลั่งโปรตีนหลุมสมออกนอกเซลล์ของเชื้อรา

Studying the signal peptide for recombinant protein secretion in fungi.

ปีการศึกษา 1/2566

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้  
แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้วด้วย  
โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.59 %

ลงชื่อ.....*ภูมิรวี อีสี่*.....

(นายภูมิรวี อีสี่)

ข้าพเจ้า รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น  
แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....*รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์*.....

(รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้