



## รายงานฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีการผลิตโปรตีน beta-cryptogein เพื่อใช้กระตุ้นการ  
เจริญเติบโตและสังเคราะห์สารสาโปนิน ในพรมมิ  
(โครงการ R2560B013)

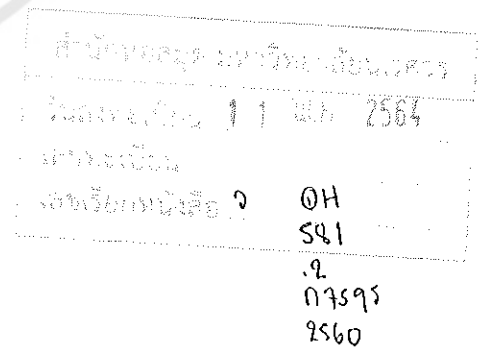
คณะวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กวี สุจิปูลิ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริรัตน์ แสนยงค์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คำรพ รัตนสุต

ดร.เนริสา คุณประทุม



แหล่งทุนสนับสนุน

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยธนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

## Abstract

*Bacopa monnieri* (brahmi) is considered as one of the semi-aquatic medicinal plants, containing high bacoside saponins, and has been extensively used for centuries to enhance human-memory systems in Thailand. However, their biosynthesis were regulated by many enzymes and affected by many elicitors and pathogens. Therefore, the aim of this research was to optimize method for a beta-cryptogein production using expression systems in bacterium and yeast. Moreover it was to evaluate the influence of beta-cryptogein application on resistance to pathogen and expression of genes (*BmAAC*T and *BmOSC*) associated with bacoside-saponin biosynthesis of brahmi. The results revealed that the small scale of beta-cryptogein was the highest production under culture condition either at 25°C with using 2% D-glucose or 30°C with 0.5% methanol in *Escherichia coli* (strain BL21) and *Pichia pastoris* (strain Y11430), respectively. Moreover, two novel fungi, isolated from disease in brahmi explants, were identified as *Phoma* sp. and *Colletotrichum* sp., which caused both stem and leaf rot in brahmi seedlings. However, the results also found that the beta-cryptogein application by spraying brahmi seeding did not affect to enhance resistance to pathogen and expression of both studied genes.

## สารบัญ

Chapter		page
	content	a
	Acknowledgment	b
1	Introduction	1
1.1	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3	ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4	ทฤษฎีและสมมุติฐานของโครงการวิจัย	2
2	การทบทวนวรรณกรรม	4
2.1	beta-cryptogein protein	4
2.2	ระบบการโคลนและการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย	7
2.3	Transformation of a plasmid into yeast	11
3	Materials and method	15
3.1	Chemicals and Research instruments	15
3.2	Beta-cryptogein gene transformation in bacterium	16
3.3	Beta-cryptogein gene transformation in Yeast	20
3.4	การศึกษาโรคพรมมิและการพิสูจน์การเกิดโรค	26
3.5	การศึกษาสาร beta-cryptogein protein กับความต้านทานโรคพรมมิ	26
3.6	ศึกษาผลของการใช้ beta-cryptogein หรือ/และ capsicien protein ต่อการแสดงออกของยีน OSC และ AACT โดยเทคนิค qrt-PCR	27
3.7	Statistical analysis	28
3.8	สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	28
4	ผลการทดลอง และวิจารณ์	29
4.1	Production of cryptogein in <i>Escherichia coli</i> strain BL21 Star™(DE3)	29
4.2	Production of the beta-cryptogein gene for <i>Pichia pastoris</i> (yeast)	39
4.3	ผลการศึกษาโรคพรมมิและการพิสูจน์การเกิดโรค	52
4.4	ผลการศึกษาสาร beta-cryptogein protein กับความต้านทานโรคพรมมิ	56
4.5	Effect of cryptogein elicitation on expression pattern of <i>BmAAC</i> T and <i>BmOSC</i> genes	57
5	Conclusions and Recommendation	57
6	references	59
7	Appendix	65
7.1	Certificate for Publication	66
7.2	IJB International Journal of Biosciences	67
7.2	Publication paper	68

## Acknowledgment

This study was financially supported by Naresuan University, Thailand (Project number R2560B013).



## บทที่ 1

### คำนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โปรตีน cryptogein เป็น fungal elicitor ชนิดหนึ่งที่ผลิตจากเชื้อรา *Phytophthora cryptogea* โดยมีขนาดโมเลกุลประมาณ 10-kDa (ประกอบด้วยกรดอะมิโน 98 ตัว และน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 10,329) (Huet et al., 1989) cryptogein มีคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับกระตุ้นการเจริญเติบโต และส่งเสริมการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืช (Ghosh et al., 2006; Majumdar et al., 2012) ทำให้พืชสามารถปกป้องตัวเองภายใต้สภาพเครียด (Amleot et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุล signal transduction ที่ช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนกลุ่ม transcription factors (Guo et al., 2004) และเอนไซม์กลุ่ม Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Ren et al., 2006) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเครือข่ายควบคุมการสังเคราะห์สารทุติยภูมิหลายชนิดในเซลล์พืช

โดยทั่วไปวิธีการที่ใช้สำหรับกระตุ้นให้พืชสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ อาจทำได้ 2 วิธี คือ (1) วิธีการถ่าย crypt gene เข้าสู่พืช เพื่อเพิ่มการสังเคราะห์ bacoside-A saponin ในพรมมิ (*Bacopa monnieri*) (Mathew et al., 2010), และ phenolic compounds ในถั่วเขียว (Coles blumei) (Vukovic et al., 2013) หรือในโสมอินเดีย (*Withania somnifera*) (Sil et al., 2014) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัด คือกฎหมายของประเทศไทยยังไม่อนุญาตให้ใช้ประโยชน์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified (GM) plants) และ (2) วิธีการใช้สารสกัด beta-cryptogein ที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เชื้อรา เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่ควบคุมวิถีการสังเคราะห์ phenylpropanoid pathway ในยาสูบ ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (Zhao et al., 2005) และในแปลงปลูก (Amelot et al., 2011) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัด คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เชื้อราต้องใช้เวลาาน (6 วัน) (Baldi et al., 2009) โปรตีนที่ผลิตได้มีปริมาณน้อย และวิธีการสกัดที่มีขั้นตอนที่ซับซ้อน ตลอดจนการสกัดโปรตีนบริสุทธิ์ทำได้ยาก (Farakya et al., 2005)

ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจมาใช้ในการแก้ปัญหาข้อจำกัดของทั้งสองดังกล่าวได้ คือใช้เทคโนโลยี gene cloning และ expression system เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต beta-cryptogein ให้ได้ปริมาณสูงในหลอดทดลอง ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีขั้นตอนอย่างง่ายดังนี้ (1) สืบค้นข้อมูลของยีนที่สนใจ (favorite gene, FG), (2) นำลำดับเบสของ FG มาติด tag) six-histidine (6xHis) เพื่อง่ายต่อการสกัดแยกโปรตีน (3) แล้ว clone เข้าสู่ expression vector (เช่น pET151/D-TOPO; Invitrogen), (4) จากนั้นถ่าย vector เข้าสู่ *Escherichia coli* (strain BL21

Star™(DE3); Invitrogen), (5) เพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนที่ต้องการโดยใช้ IPTG และ glucose, และ (6) สกัดโปรตีนบริสุทธิ์ออกจากเซลล์แบคทีเรีย เพื่อนำไปใช้ประโยชน์สำหรับกระตุ้นให้พืชสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นเฉพาะการสังเคราะห์ bacoside-A saponin ในพรมมิ (*Bacopa monnieri*) ทั้งนี้เนื่องจากปัจจุบันประเทศไทยได้นำสมุนไพรพรมมิมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดในรูปแบบยาเม็ดเคลือบ เพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ (Uabundit et al., 2010; Kamkaew et al., 2013) ซึ่งหากสามารถเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์และการสะสมสาร bacoside-A saponin ก็น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตยา

การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อ (1) พัฒนาวิธีการผลิต beta-cryptogein protein ที่มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูง โดยใช้ระบบ gene- cloning and expression systems (2) ศึกษาผลของการใช้ beta-cryptogein protein ต่อการเจริญเติบโต และ (3) ศึกษาผลของการใช้ beta-cryptogein protein ต่อการแสดงออกของยีน oxidosqualene cyclase (OSC) และ acetyl-coA C-acetyltransferase (AACT) และการสะสมของสาร bacoside ในพรมมิ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) พัฒนาวิธีการผลิต beta-cryptogein protein ที่มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูง โดยใช้ระบบ gene-cloning and expression systems
- 2) ศึกษาผลของการใช้ beta-cryptogein protein ต่อการเจริญเติบโตและการต้านทานโรคในพรมมิ
- 3) ศึกษาผลของการใช้ beta-cryptogein protein ต่อการแสดงออกของยีน oxidosqualene cyclase (OSC) และ acetyl-coA C-acetyltransferase (AACT) และการสะสมของสาร bacoside-A saponin ในพรมมิ

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) ศึกษาผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของ glucose ในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ต่อการสังเคราะห์ beta-cryptogein protein
- 2) ศึกษาผลของความเข้มข้นของสาร beta-cryptogein protein ต่อการเจริญเติบโต และการต้านทานโรค

3) ศึกษาผลของสาร beta-cryptogein protein ต่อการแสดงออกของยีน *Bacopa monnieri* oxidosqualene cyclase (*BmOSC*) และ acetyl-coA C-acetyltransferase (*BmAAC*T) ในส่วนราก ลำต้น และ ใบของพรมมิ โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR

#### 1.4 ทฤษฎีและสมมุติฐานของโครงการวิจัย

มีรายงานว่าสาร elicitor (เช่นโปรตีน beta-cryptogein ถูกสังเคราะห์จาก *crypt gene*) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Phytophthora cryptogea* (Huet et al., 1989) มีคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับกระตุ้นการเจริญเติบโตและส่งเสริมการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืชได้ (Majumdar et al., 2012) อย่างไรก็ตามในธรรมชาติโปรตีน beta-cryptogein ถูกผลิตในปริมาณที่ต่ำและถูกสกัดให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก เนื่องจากมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องมากมาย เช่น ความแข็งแรงและสายพันธุ์ของเชื้อรา สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ดังนั้นเทคโนโลยีหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวโดยสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากและรวดเร็ว คือ การใช้เทคโนโลยี gene cloning และ expression system โดยสร้าง gene construct ของ T7 lac promoter :: *crypt gene* :: T7 terminator ใน expression vector และ lacUV5 promoter :: T7-RNA polymerase gene ใน *Escherichia coli* จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว LB ที่เติม IPTG และ/หรือ glucose ความเข้มข้นที่เหมาะสม ก็สามารถผลิตโปรตีน beta-cryptogein ได้ในปริมาณมาก รวดเร็ว และสกัดโปรตีนบริสุทธิ์ทำได้ง่าย ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำไปใช้สำหรับผลิตโปรตีน elicitor อื่นๆ ตลอดจนอาจนำไปประยุกต์ใช้ในระบบการผลิตเชิงอุตสาหกรรม เช่น bioreactor ต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

### การทบทวนวรรณกรรม

เพื่อผลิต beta-cryptogein ปริมาณมากและรวดเร็ว โดยวิธี cloning และ expression system ได้ค้นคว้าหาข้อมูลเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยแบ่งเนื้อหาเป็น 2 หัวข้อ คือ beta-cryptogein protein และ cloning และ expression system ดังมีรายละเอียดดังนี้

#### 2.1 beta-cryptogein protein

##### 2.1.1 ยีนควบคุมการสังเคราะห์ beta-cryptogein protein

จากฐานข้อมูล NCBI รายงานว่าโปรตีน beta-cryptogein มีขนาด 10-kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโน 98 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 10,329) ประกอบด้วยพันธะ disulfide 3 ตำแหน่ง (Ricci et al., 1989) โดย beta-cryptogein ถูกสังเคราะห์ จากยีน *crypt* gene (accession number X83001.1) ที่มีลำดับเบสของยีนจำนวน 329bp (Figure 2.1) ซึ่งประกอบด้วย ส่วนของ intron (ตำแหน่งที่ 1-15), ส่วนของ exon (ตำแหน่งที่ 16-312bp) ทำหน้าที่กำหนดสายโพลีเปปไทด์ของกรดอะมิโน 98 ตัว (Figure 2.2)

GTAGCGGCCGCAACCATGGCTTGCACTGCTACTCAGCAGACTGCTGCTTACAAGACTTTGGTTTCTATCT  
TGTCTGACGCGTCTTTCAACCAGTGCTCTACTGACTCTGGTTACTCTATGTTGACTGCCAAGGCCTTGCC  
AACTACTGCTCAGTACAAGTTGATGTGCGCTTCTACTGCATGCAACACTATGATCAAGAAGATCGTTACT  
TTGAACCCACCAAAGTGCGACTTGACCGTTCCAACCTCCGGATTGGTTTTGAACGTTTACTCTTACGCTA  
ACGGATTCTCTAACAAGTGCTCTTCCCTGTAGCTAGATAGCTGCAGGTG

**Figure 2.1:** complete nucleotide sequences of *crypt* gene

Legend: Transcription start site (1<sup>st</sup> amino acid) shows in green-highlight, transcriptions stop site shows in red-highlight, and the last amino acid shows in pink-highlight.

MACTATQQTAAYKTLVSILSDASFNQCSTDSGYSLTAKALPTTAQYKLMCASTACNTMIKKIVTLNPPNCDLTV  
PTSGLVLNVSYANGFSNKCSS

**Figure 2.2:** complete amino acid sequences of cryptogein protein

Legend: An each capital letter indicates specific amino acid; the 'M' letter represents the first amino acid (named methionine), shown in green-highlight, and the 'L' letter represents the first amino acid (named leucine), shown in pink-highlight.

##### 2.1.2 คุณสมบัติของโปรตีน beta-cryptogein

โปรตีน beta-cryptogein ที่ผลิตจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Phytophthora cryptogea* (Huet et al., 1989 และ O'Donohue et al., 1995) มีคุณสมบัติเป็น extracellular elicitor โดยสามารถปลดปล่อยเข้าสู่เซลล์พืชได้ จากนั้นโปรตีนมีการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่งโดยผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืช (apoplastic transport) (van't Slot et al., 2002) แล้วเข้ารวมกับ sterol molecules เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ dehydroergosterol (DHE) และยังสามารถรวมกับโมเลกุลของสารอินทรีย์ ligand ในเซลล์พืช (Boissy et al., 1999) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต (Majumdar et al., 2012) และกระตุ้นระบบการป้องกัน



ตัวเองและระบบการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืช (Osman et al., 2001; Amleot et al., 2011) โดยส่งเสริมการสังเคราะห์และสะสมสารทุติยภูมิในพืชได้ (Ghosh et al., 2006) นอกจากนี้โปรตีน cryptogein ยังมีคุณสมบัติเป็นสาร signal transduction ที่ช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ transcription factor (Guo et al., 2004) และ Mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Ren et al., 2006) เพื่อทำหน้าที่เป็นเครือข่ายควบคุมการทำงานที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิหลายชนิดในเซลล์พืช โดยกระตุ้นการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่ควบคุมวิถีการสังเคราะห์ phenylpropanoid pathway และ lignin ตัวอย่างเช่น หลังจากที่ใช้เซลล์ยาสูบที่ได้รับสาร cryptogien นาน 3-8 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ *PAL*, *C4H*, *4CL*, *HCT*, *C3H*, *COMT*, *CCoAOMT*, *F5H*, *CCR* และ *CAD* (Amelot et al., 2011) และมีรายงานว่า cryptogein ที่เคลื่อนย้ายมาสะสมในส่วน of plasma membrane สามารถกระตุ้น  $Ca^{2+}$  influx และส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ protein kinases และ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) และกระตุ้นการผลิต Reactive oxygen species (ROS) และ nitric oxide (Lecourieux et al., 2000) ในเซลล์พืช ทำให้มีการส่งผ่านสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองของพืชในสภาวะเครียดของพืชได้ (Ashtamker et al., 2007)

### Beta-cryptogein

The beta-cryptogein which is a sterol scavenging protein produced from the phytopathogenic pseudo-fungus *P. cryptogea* (Ricci et al., 1989; Mikes et al., 1997). The beta-cryptogein gene (with accession number X83001.1) encodes a 297 bp nucleotide sequence as presented in the report of (O'Donohue et al., 1995). This gene translates 98 amino acids which are 10kDa hydrophilic protein containing a hydrophobic pocket with three disulfide bridges (Amelot et al., 2011). Some elicitors such as beta-cryptogein are able to improve the immune system in tobacco plants (Dokladal et al., 2012). One of the tobacco defence reactions elicitor is a beta-cryptogein protein known as a protein elicitor (Bourque et al., 1999). It is fungal antagonism, the strain of *P. parasitica* (Lascombe et al., 2002; O'Donohue et al. (1996) worked on tobacco plant leaves and infiltrated the protein in it then the protein exhibited defence response and join the necrotic activity.

*P. cryptogea* is a one of the most resistance opposing tobacco pathogens and exhibited leaf necrosis in tobacco plant (Edreva et al., 2002). Its protein functions are likely a sterol transfer action or a carrier protein using the fluorescent sterol, dihydro ergosterol (Mikes et al., 1997). As shown in Figure 2.3, this protein has one binding site with strong bond for dihydro ergosterol, additional phospholipidic artificial membranes transfer sterols among protein catalyses, and a molecular activity of beta-cryptogein and for the existence of an extracellular sterol (Amelot et al., 2011).

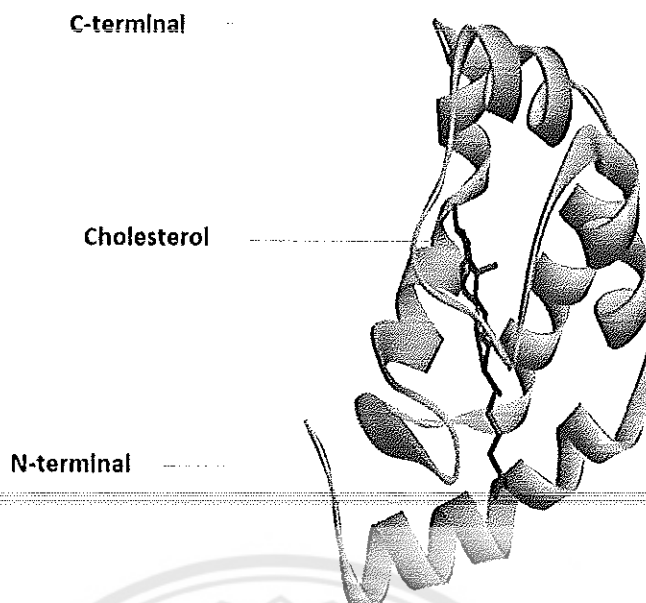


Figure 2.3 Structure of beta-cryptogein  
Source: European Bioinformatics Institute UK

### 2.1.3 การใช้ประโยชน์จาก โปรตีน beta-cryptogein

เนื่องจากโปรตีน beta-cryptogein มีขนาดเล็ก (10kDa) และถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียวที่มีขนาดเล็ก (297bp) ทำให้ง่ายต่อการสกัดโปรตีนและง่ายต่อการถ่ายยีน นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติของโปรตีน beta-cryptogein ที่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืช ทำให้นักวิจัยได้นำโปรตีนดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ใน 2 รูปแบบคือ

1) การถ่าย *crypt gene* เข้าสู่พืช เพื่อเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืช โดยมีตัวอย่างงานวิจัยดังนี้

Chaudhuri et al (2009) รายงานการถ่าย *crypt gene* เข้า *Convolvulus arvensis* แล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ เมื่อต้นกล้ามีอายุ 3 เดือน ทำการวิเคราะห์สาร calystegine ผลการทดลองพบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสะสมของสาร calystegine ในรากและลำต้นสูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เท่ากับ 35 และ 42% ตามลำดับ

Majumdar et al (2012) รายงานการถ่าย *crypt gene* (ภายใต้การควบคุมของ *CaMV35S promoter*) เข้าสู่เนื้อเยื่อพรหมี โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* transformation technique จากนั้นนำเนื้อเยื่อพรหมีไปเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog medium (MS) (Murashige and Skoog 1962) นาน 12 สัปดาห์ ทำการวิเคราะห์สาร Bacoside A3 ซึ่งผลการทดลองพบว่าต้นพรหมีที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถสังเคราะห์สาร Bacoside A3 สูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 4-6 เท่า

Sil et al (2014) ทำการถ่าย *crypt gene* เข้าสู่โสมอินเดีย (*Withania somnifera*) จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนราก ในอาหารเหลว MS (Murashige and Skoog 1962) นาน 21 วัน จึงทำการตรวจวัด pyruvate kinase activity และ PAL พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น 3 เท่า (เทียบกับพืชตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน) ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าอาจมีแนวโน้มในการสังเคราะห์สาร phenylpropanoid เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ phenolic content และ guaiacol peroxidase activity เพิ่มขึ้น 2 เท่า ซึ่งบ่งชี้ว่าพืชอาจสามารถป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของโรคและความเครียดได้ดีขึ้น

2) การเติมสาร cryptogein ที่สกัดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราลงในพืช ทั้งในสภาพหลอดทดลองและสภาพแปลงปลูก โดยมีตัวอย่างงานวิจัยดังนี้

Edreva et al (2004) ทำการทดลอง treat สาร cryptogein ที่รอยตัดบริเวณใบของยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ที่มีอายุ 40-50 วัน หลังจากนั้น 3-10 วัน พบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตัวเองของยาสูบ เช่น peroxidase, beta-1,3-glucanase และ acidic PR-proteins เพิ่มขึ้นอย่างมาก ทำให้ยาสูบต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค *Botrytis cinerea*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Rhizoctonia solani* และ *Erysiphe cichoracearum* ได้

Amelot et al (2011) พบว่าหลังจาก treat สาร cryptogein ให้กับ tobacco BY-2 cells นาน 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ยาสูบมีการเพิ่มการแสดงออกของยีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ เช่น phenylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamate 4-hydroxylase (C4H), 4-coumarate-CoA ligase (4CL), p-coumarate 3-hydroxylase (C3H), hydroxycinnamoyl CoA:quinate/shikimate hydroxycinnamoyltransferase (HCT), caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (CCoAOMT), caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (COMT), ferulate 5-hydroxylase (F5H), cinnamoyl CoA reductase (CCR), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), reduced epidermal fluorescence1 (REF1) โดยเฉพาะ CCoAOMT และ F5H มีการแสดงออกเพิ่มมากถึง 200 เท่า (เทียบกับกลุ่มควบคุมไม่เติมสาร cryptogein)

Vukovic et al (2013) ทำการทดลอง 2 วิธี คือ (1) เลี้ยงแบคทีเรียที่มี expression vector ของ crypt gene ในอาหารเหลว เพื่อให้แบคทีเรียผลิต cryptogein แล้วนำไปเติมในอาหารแข็ง MS ที่ใช้เลี้ยงรากของถั่วฝักยาว (*Coleus blumei*) หลังจากนั้น 14 วัน จึงบันทึกค่า phenolic content ในเนื้อเยื่อรากและ (2) ถ่าย crypt gene เข้าสู่เนื้อเยื่อของถั่วฝักยาว เพื่อสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรม โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากถั่วฝักยาวในอาหารเหลว MS จากนั้นเติมสาร ethanol เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ crypt gene (ถูกควบคุมภายใต้ alcohol-inducible promoter; alcA promoter) ซึ่งทั้งสองผลการทดลองบ่งชี้ว่า cryptogein มีบทบาทในการเพิ่มการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล กลุ่ม rosmarinic acid (RA) และ caffeic acid (CAF) ในเนื้อเยื่อรากของถั่วฝักยาว

## 2.2 ระบบการโคลนและการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย (cloning and expression system)

เวกเตอร์ที่นิยมใช้สำหรับผลิตโปรตีนที่ต้องการ (favourite protein, FP) ให้ได้ปริมาณมาก ได้แก่ Expression vector เช่น Expresso system vectors (Lucigen) และ pET TOPO® expression vectors (Invitrogen) เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว และง่ายสำหรับการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ต้องการ (favourite gene, FG) สำหรับหลักการของ cloning and expression system มีดังนี้ (1) นำยีนที่ต้องการ (FG) สำหรับผลิตโปรตีนที่ต้องการ (FP) มาทำการดัดแปลงให้มีเฉพาะส่วนของ genetic coding (หรือ exon) เท่านั้น และมีส่วนของ start codon ที่ปลาย 5'-DNA (หรือ N-terminal end ของโปรตีน) และ stop codon ที่ปลาย 3'-DNA (หรือ C-terminal end ของโปรตีน) (2) ทำการ clone FG เข้าสู่ expression vector ที่ตำแหน่งปลาย 3' ของ strong promoter (ในกรณีนี้นิยมใช้ lambda bacteriophage T7 promoter) ซึ่งภายในประกอบด้วยตำแหน่ง ribosome binding site (RBS) (Purves et al., 2001) หรือเรียกว่าตำแหน่ง Shine-Dalgarno sequence สำหรับให้ 16sRNA (เป็นองค์ประกอบของ 30s ribosome) เข้าเกาะ เพื่อส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่ต้องการ (FP) (Invitrogen, 2010) (3) ถ่ายเวกเตอร์ดังกล่าวเข้าสู่ *Escherichia coli* (4) เพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนที่ต้องการโดยใช้ IPTG และ glucose และ (5) สกัดโปรตีนที่ต้องการออกจากเซลล์แบคทีเรีย

สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ pET TOPO<sup>®</sup> expression vectors (Invitrogen) (Figure 2.4) ร่วมกับ *Escherichia coli* (strain BL21 Star<sup>™</sup>(DE3); Invitrogen) ซึ่งมีรายละเอียดของกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน ดังนี้

### 2.2.1 pET TOPO<sup>®</sup> expression vectors (Invitrogen) มียีนที่ควบคุมการแสดงออกของ FG ดังนี้

1) *lacI* gene ทำหน้าที่สังเคราะห์ *lac* repressor protein ซึ่งสามารถเข้าเกาะกับตำแหน่ง *lac* operator ได้เพื่อป้องกันไม่ให้ T7 RNA polymerase เข้าเกาะกับตำแหน่ง T7 promoter ทำให้ไม่เกิดกระบวนการลอกรหัส (block transcription)

2) T7 promoter เป็นตำแหน่งที่มีความจำเพาะสำหรับการเข้าเกาะของ T7 RNA polymerase เท่านั้น (แต่ bacterial RNA polymerase ไม่สามารถเข้าเกาะและทำการลอกรหัสได้) และมีประสิทธิภาพสูงสำหรับการเพิ่มการแสดงออกของ FG ในเซลล์แบคทีเรีย โดยส่วนของ T7 promoter ประกอบด้วย ribosome binding site (RBS) หรือ Shine-Dalgarno sequence (SDS) เป็นตำแหน่งจดจำของ 16S RNA ที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซม ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการสังเคราะห์โปรตีน

3) *lac* operator (*lacO*) เป็นหน่วยที่ใช้สำหรับควบคุมการทำงานของ T7 promoter โดยมีตำแหน่งที่อยู่ด้านหลัง (downstream) ของ T7 promoter และเป็นตำแหน่งจดจำของ *lac* repressor protein

4) ตำแหน่งถัดไปคือเป็นจุดเริ่มต้นแปลรหัส (ATG start site) โดยตำแหน่งปลาย 5' DNA หรือ N-terminal protein ประกอบด้วยยีนโครงสร้างดังนี้ T7 promoter—ATG—6xHis—V5—TEV—favourite gene (FG) —T7 terminator

เมื่อ 6xHis tag ถูก tag ไว้ที่ปลาย N-terminal FP เพื่อง่ายต่อการ purified FP จากโปรตีนอื่นๆ ที่ผลิตในเซลล์แบคทีเรีย โดย 6xHis tag สามารถเข้าเกาะกับ ProBond<sup>™</sup> หรือ Ni-NTA column หรือเข้าเกาะกับ Anti-HisG Antibodies

เมื่อ V5 epitope คือ antigen molecule สามารถเข้าเกาะกับ Anti-V5 Antibodies ทำให้ง่ายในการตรวจสอบปริมาณของ FP ที่ผลิตได้

เมื่อ TEV protease cleavage site ถูก tag ไว้เพื่อใช้สำหรับการขจัด 6xHis—V5 epitope ออกจาก FP

5) T7 transcription termination region เป็นตำแหน่งสิ้นสุดกระบวนการลอกรหัส ที่นำมาจาก bacteriophage T7

6) Ampicillin resistance gene (beta-lactamase) เป็นยีนที่ใช้สำหรับการคัดเลือก expression vector ในเซลล์ *E. coli* โดยการแสดงออกของยีนนี้อยู่ภายใต้การควบคุมของ *bla* promoter

7) pBR322 origin of replication (*ori*) เป็นตำแหน่งควบคุมให้มีการจำลองตัวเองของเวกเตอร์ ที่อยู่ในเซลล์ *E. coli*

8) *rop* เป็นตัวควบคุม pBR322 origin มีการจำลองเวกเตอร์ในระดับต่ำเมื่ออยู่ในเซลล์ *E. coli*

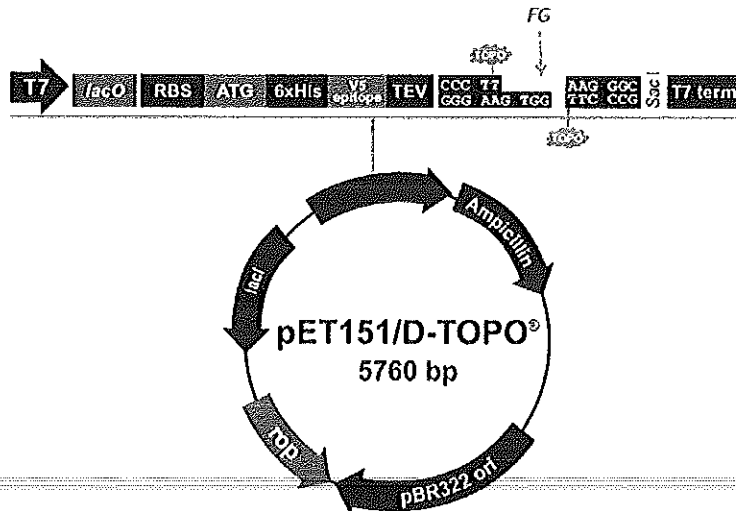


Figure 2.4 : Map and features of the pET151/D-TOPO® System Vectors

### 2.2.2 host cell (*Escherichia coli*, strain BL21 Star™; DE3) (Invitrogen)

อย่างไรก็ตาม expression vector ที่อยู่อิสระไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีน FP ได้ เนื่องจากไม่มี T7 RNA polymerase (แต่ถูก transcription and translation ใน host cell) ดังนั้นจำเป็นต้องทำการถ่ายเวกเตอร์ดังกล่าว เข้าไป host cell (*E. coli*, strain BL21 Star™; DE3) ซึ่งใน genomic DNA ประกอบด้วยยีน (elements) ที่สำคัญ (Figure 2.4) ดังนี้

- 1) T7 RNA polymerase gene การแสดงออกของยีนถูกควบคุม โดย *lacUV5* promoter และ *lac* operator
- 2) *lacUV5* promoter เป็นตำแหน่งสำหรับการเข้าเกาะของ *E. coli* RNA polymerase เพื่อเริ่มต้นกระบวนการแสดงออกของยีน T7 RNA polymerase gene ทำให้ผลิตเอนไซม์ T7 RNA polymerase เพื่อใช้ในการแสดงออกของ FG ใน pET-expression vector
- 3) *lac* operator อยู่ส่วนหลังของ *lacUV5* promoter ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ *lacUV5* promoter โดยเป็นตำแหน่งจดจำของโปรตีน *lac* repressor ถ้า *lac* repressor เกาะกับ *lac* operator พบว่าไม่มีการแสดงออกของ T7 RNA polymerase gene (ในสภาพที่ไม่มี inducer)
- 4) *lacI* gene ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์ *lac* repressor เพื่อควบคุมการทำงานของ *lac* operator

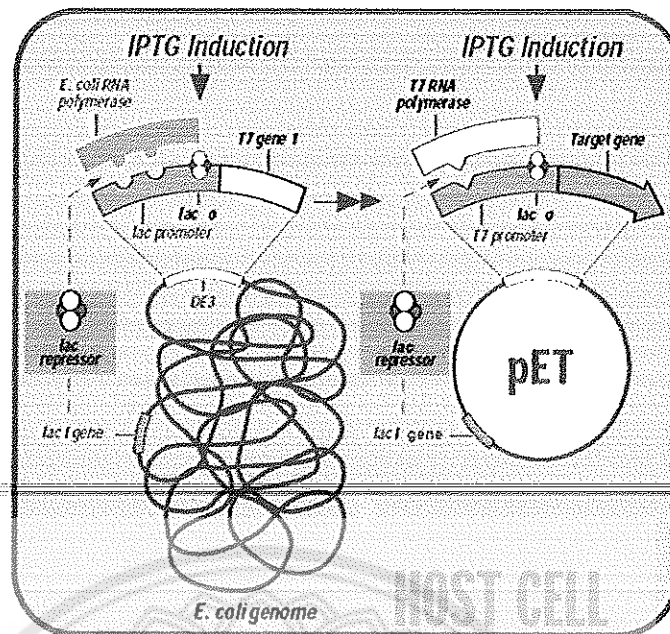


Figure 2.4 : Control elements of host cell (BL21-Star™(DE3)-One-Shot®-competent *E. coli*) containing the pET vector

### 2.2.3 ระบบการควบคุมการแสดงออกของยีน

ระบบการควบคุมการแสดงออกของ T7 RNA polymerase gene เป็นไวรัสโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงทำให้เกิดกระบวนการ transcription ได้ mRNA ของ FG อย่างรวดเร็วและมากมาย และส่งผลให้เกิด translation ผลิต FP ได้จำนวนมากด้วย โดยกลไกการแสดงออกของ FG ใน pET expression vector ภายใต้การควบคุมของ T7 RNA polymerase ใน host cell แบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ

#### 1) กระตุ้นการสังเคราะห์ T7 RNA polymerase ใน host cell

กลไกการควบคุมการสังเคราะห์ T7 RNA polymerase ใน host cell มี 2 สถานะ คือ

##### 1.1) ในสถานะปกติที่ไม่มี inducer

ในสถานะปกติ lac repressor (อยู่ในสภาพ active form) สามารถเข้าเกาะกับตำแหน่ง lac operator ทำให้เอนไซม์ *E. coli* RNA polymerase ไม่สามารถเข้าเกาะที่ lacUV5 promoter ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ T7 RNA polymerase

ซึ่งในกรณีนี้พบว่ายีนอื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตสามารถแสดงออกได้ตามปกติ ทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ แต่ไม่มีการสังเคราะห์ FG

##### 1.2) ในสถานะที่มี inducer

Inducer ที่ใช้สำหรับกระตุ้นการแสดงออกของ T7 RNA polymerase gene คือ isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) เมื่อเติม inducer (IPTG) ลงในอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรีย พบว่า IPTG เข้าทำปฏิกิริยากับ lac repressor เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (อยู่ในสภาพ inactive form) ทำให้ไม่สามารถเข้าเกาะกับตำแหน่ง lac operator ได้ ส่งผลทำให้เอนไซม์ *E. coli* RNA polymerase สามารถเข้าเกาะที่ lacUV5 promoter แล้วเกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ T7 RNA polymerase ซึ่งถูกนำไปใช้ในการแสดงออกของ FG ใน pET ต่อไป

## 2) การควบคุมการแสดงออกของ FG ใน pET expression vector

ยีนที่ต้องการ (FG) ใน pET expression vector สามารถแสดงออกได้ โดยต้องมี (1) T7 RNA polymerase ที่ผลิตจาก host cell ในสภาวะที่มี IPTG และ (2) ตำแหน่งของ *lac* operator (ในส่วนของ T7 promoter :: FG) ต้องเป็นอิสระจาก *lac* repressor protein ทำให้ T7 RNA polymerase สามารถเข้าเกาะ แล้วเกิดกระบวนการ transcription และ translation ได้ ซึ่งกลไกการควบคุมที่ตำแหน่ง *lac* operator มี 2 สภาวะ คือ

### 2.1) ในสภาวะที่มี inducer

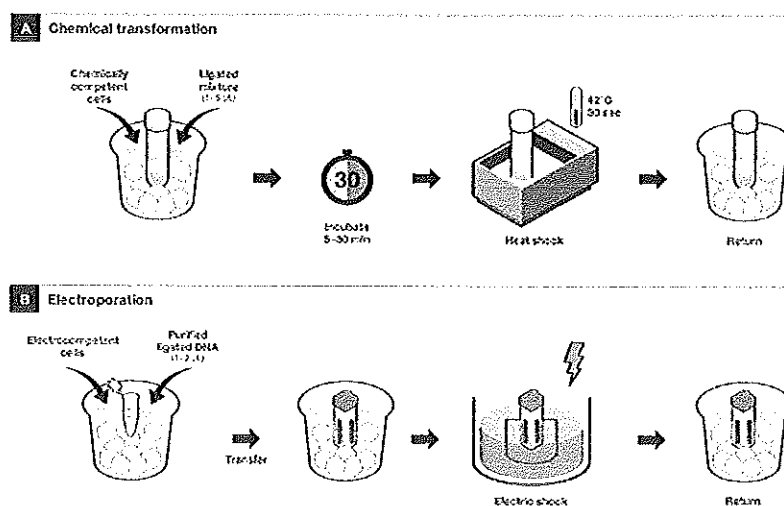
กรณีที่เติม inducer (IPTG) ลงในอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรีย พบว่า IPTG เข้าทำปฏิกิริยากับ *lac* repressor เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (อยู่ในสภาพ inactive form) ทำให้ไม่สามารถเข้าเกาะกับตำแหน่ง *lac* operator ได้ ส่งผลทำให้เอนไซม์ T7 RNA polymerase สามารถเข้าเกาะกับ T7 promoter แล้วเกิดการสังเคราะห์ FG

### 2.2) ในสภาวะปกติที่ไม่มี inducer

ในสภาวะปกติ *lac* repressor (อยู่ในสภาพ active form) สามารถเข้าเกาะกับตำแหน่ง *lac* operator ที่อยู่ใน T7 promoter ทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีน FG

## 2.3 Transformation of a plasmid into yeast

There are a lot of Transformation method by which the DNA is transformed into a cell. Transformation systems in the eukaryotic cell, like that in yeast, have two commonly main methods chemical and electroporation (Figure 2.5). In the chemical method, the competent cells are prepared by using calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) whose ions have two main functions for generating temporary pores at the membrane and binding foreign DNA which is able to transfer into the competent cell (Oswald, 2007). However, the disadvantage of the method is that its process requires a high amount of plasmid DNA, it's time-consuming and has low transformation efficiency (DePalma, 2014). On the other hand, Electroporation has been used widely to transfer DNA into yeast, mammalian, and bacteria in culture for the previous 30 years. Transformation efficiency using the electroporation method relies on electric pulses, which have high potential to create many temporary pores in the cell membrane, resulting in that the foreign DNA is easily transferred into the cell Wu & Letchworth (2004), it was reported that electric pulses 1.5 KV and 2.0 KV transformation efficiency in yeast.



**Figure 2.5** Transformation systems using chemical and electroporation methods

Source: Bacterial transformation Workflow (Thermo Fisher Scientific, America).

### 2.3.1 Plasmid for the expression system

Plasmids are a small DNA molecule in a cell, which is physically separated from a chromosomal DNA and it can replicate itself freely. Mostly they are in small circular form, double-stranded DNA molecule and they are present in bacteria and in other organisms. There are two most popular form of plasmid forms (circular and linear) which are mostly using for plasmid in an expression system, and these were affected in transformation efficiency. The linearized pPICZαA-*crypt* plasmid was prepared by using *SacI* and other restriction enzymes according to manufacturer's instruction (Invitrogen, Germany) as reflected in the research works of (Calmels et al., 1991; Ahmad et al., 2014) stating that using a linearized plasmid in gene transformation highly increased its efficiency up to 2-3 folds as compared to the circular plasmid.

### 2.3.2 pPICZαA Expression system

The pPICZαA vectors were designed for simple cloning and selection because of their ability of high-level expression, and rapid detection and purification of the recombinant protein. Increasing the number of copies of the gene of interest in a *Pichia pastoris* strain can result in higher expression levels (Weidner et al., 2010).

The pPICZαA contains the AOX1 promoter for tightly regulated and its site allows over-expression of the recombinant gene when placed behind the alcohol oxidase gene promoter (Higgins, & Cregg, 1998). This plasmid confers Zeocin™ resistance as a selective marker and adds N-terminal alpha-factor signal sequence and C-terminal myc epitope and a polyhistidine (6xHis) tag for detection and purification of a recombinant protein inserted into multi cloning site (MCS), many identical copies pPICZαA vector were inserted into yeast genome (Arnau et al., 2006). The pPICZαA vector was used for inducible protein expression in the yeast *P. pastoris*. For smoother



downstream production it is important that the proteins produced should be secreted in the culture medium. When proteins are secreted naturally in the extracellular space no modifications are required because it is released naturally by the natural signal. In contrast, those proteins which are produced in the intercellular space require modification. Two most common signals are used for the secretion of proteins in *P. pastoris* expression system. *S. cerevisiae* and alpha mating factor (Macauley-Patrick et al., 2005). This factor is proven to be so fruitful that sometimes it produces more heterologous proteins than the natural system (Cregg et al., 2000). The last few years have been productive, due to designing of *P. pastoris* as host for protein expression. This report refers to well-established tools by *P. pastoris* for high-level of expression vector design, screening commercial applications and engineering host strain of *P. pastoris* derived proteins discussed alongside for numerous protein expression of the membrane (Ahmad et al., 2014).

### 2.3.3 Preparation of recombinant plasmid

The sequence of beta-cryptogin was predicted from NCBI gene bank. The nucleotides of beta-cryptogin gene sequence are modified and after confirmation, it was inserted into pPICZαA through cloning with 6 nucleotide sequences recognizing the site of *EcoRI* and *XbaI* added at the 5' and 3' end of the gene, respectively. As the wobble hypothesis that the standard base pairs (between codon of mRNA and anticodon of tRNA) may be rather strict in the first and the second than the third positions of the triplet mRNA codon (Crick, 1966). This was called degenerated codons meaning some tRNA molecules can recognize more than one codon with different nucleotides at the third position of mRNA codon, and it can be encoded the same protein (Alberts et al., 2008). The degenerated codons were preferred for different expression in each organism (Fath et al., 2011). In the present study, the triplet mRNA codons of the original *crypt*-gene (297bp) was modified bases at the third position of each codon by using GeneArt™ and Gene Optimizer™ software to maximize expression of synthetic genes in *P. pastoris* system (developed by Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 2009). Nucleotide sequences between modified and original sequence of the *crypt*-gene were compared by using the CLUSTAL online program (European Molecular Biology Laboratory (EMBL UK). In this case, this software enabled to optimize and modify codons for maximum gene expression, and it was able to deal with a large number of sequence-related multi parameters involved in different aspects of protein expression in yeast cell such as codon usage, ribosomal entry sites, RNA instability motifs, secondary structure formations (Raab et al., 2010; Fath et al., 2011).

### 2.3.4 Protein expression in yeast

The increasing demands of plants defense system against pesticides have put scientists and researchers to explore the methods and mechanism to improve plants immune system (Blein, 2002). In yeast, the protein expression is familiar and has a different role in eukaryotic. There are a lot of yeast species and one of them is *P. pastoris* which has the probability to create a high number of recombinant protein in a fast and easy to use expression method (Weidner et

al., 2010). Previous research have established tools for *P. pastoris* in high-level of expression vector design, and host strain engineering. Screening commercial applications of *P. pastoris* derived proteins have been used alongside for numerous protein expression of the membrane (Ahmad et al., 2014). Yeast has the capability to produce higher protein production in heterologous expression system (Lin-Cereghino and Cregg, 2000). The heterologous proteins produced by the *P. pastoris* show homology between the artificial and genomic DNA. It removes the issue of plasmid stability and increases the genetic stability of the desired heterologous genes (Romanos, 1995). At the early time for the production of heterologous proteins, *E. coli* was used as it has the most suitability and also the genome of this bacteria species was well characterized. However, at the same time, it also has limitations such that the prokaryotic cell of *E. coli* does not have membrane-bounded organelles which also include those organelles which are responsible for the production of required proteins after the required modifications (O'Donohue et al., 1995). Cregg et al. (1993) defined and gave some suggestions for selecting good production of foreign proteins hosted in methylotrophic yeast *P. pastoris* and has two main advantages over *S. cerevisiae*. The first advantage is that the promoter used for transcribing the foreign protein is extracted from *P. pastoris* the AOX1 gene which is used for the purpose of foreign protein expression (Vries et al., 1997). The second advantage is that *S. cerevisiae* is a strong fermenter but in the case of *P. pastoris*, it is not a strong fermenter, so during the yeast fermentation process, ethanol is produced in a large amount which goes up to a high toxic level resulting in lower production of desired proteins (Siegel, & Brierley, 1989).

Many publications have successfully used this technique. For medical and industrial purpose, yeast are broadly used for the production of recombinant proteins (Çelik, & Çalık, 2012). Heterologous protein production using host organism's expression system heterologous proteins are produced. Normally for the production of heterologous proteins the species of fungi, mammalian cells and bacteria are used. At a larger scale, they are produced from the species of vertebrates, viruses, fungi, bacteria and plants. There are a lot of yeast expression benefits also tight regulated and efficient promoter (James et al., 2009). The alcohol oxidase1 (AOX1) is a promoter gene of *P. pastoris*, commonly used for the expression of foreign genes (Higgins, & Cregg, 1998). Moreover, this is rapid growth on inexpensive minimal medium and its ability to secrete the target protein which simplifies purification (Celik, & Calik, 2012).

## บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการ

### 3.1 Chemicals and Research instruments

Among the instruments used in performing all experiments in this study include incubator, autoclave, water bath, vortex, shaker machine, electroporation, micro pulser cuvettes (0.2 cm) and PCR machine and reaction tubes, gel documentation system (gel tank, casting tray, UV trans-illuminator and viewing monitor), sterile glasswares, pasteur pipettes, micro and big, centrifugation machine, microplate reader, Plates, 250 ml flask, baffled flask, autoclaved, 200 ml beaker. PCR reaction tubes, sterile glass and Pasteur pipette.

Chemicals used were yeast extract, peptone powder, dextrose, agar for solid medium, 1 M sorbitol, YPD plates containing Zeocin™, Luria –Bertani broth powder, primers AOX1 and *crypt*, ampicillin, ethidium bromide, TAE buffer, Acetone, acetic acid, methanol, ethanol and isopropyl alcohol restriction enzyme *SacI* and *XbaI*, and Agar, agarose, glycerol, yeast extract, 100 bp DNA ladder, 1kb DNA ladder, *XbaI*, *SacI*, PCR Master Mix. Zeocin™ and YNB were purchased from Invitrogen.

### 3.2 Beta-cryptogein gene transformation in bacterium

#### 3.2.1 การเตรียมยีน (*crypt* gene) สำหรับการโคลนยีน

- 1) ทำการสืบค้นข้อมูลของยีน (*crypt* gene) จากฐานข้อมูล NCBI เพื่อทำให้ทราบ gene accession number คือ X83001.1
- 2) จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มชิ้นส่วนของ *crypt* gene และเพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของ *crypt* gene
- 3) สร้าง construct (Figure 13.1) ของยีนเพื่อใช้ clone เข้าสู่ expression vector
- 4) clone ยีนเข้าสู่ expression vector ชนิด pET TOPO® expression vectors (Invitrogen) โดยใช้วิธีการตามคู่มือการใช้งานของบริษัท

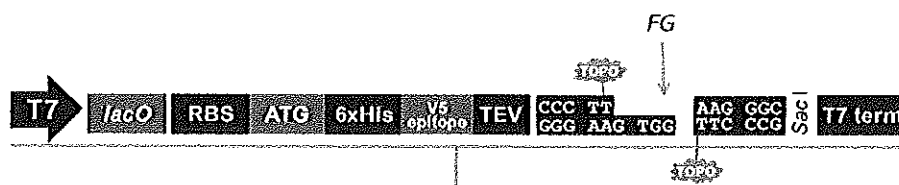


Figure 13.1 : Map of favourite gene construction for cloning into expression vector

Legend: T7 indicates bacteriophage T7 promoter.

*lacO* indicates *lac* operator.

RBS indicates ribosome binding site.

ATC indicates first start codon.

6xHis indicates six histidines tag.

V5 epitope indicates a antigen molecule is bound to an anti-V5-antibody.

TEV indicates a protease cleavage site.

TOPO indicates a recognition site of topoisomerase I, where is the insertion site of FG.

FG indicates a favorite gene.

*SacI* indicates a recognition site of restriction enzyme.

T7-term indicates bacteriophage T7 terminator.

### 3.2.2 Transforming the recombinant vector in to *Escherichia coli* (strain BL21 Star™(DE3) (Invitrogen)

1) นำ recombinant vector ถ่ายเข้าสู่ *Escherichia coli* (strain BL21 Star™(DE3) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.1) ละลาย One Shot® TOP10 competent cells บนน้ำแข็ง จากนั้นดูด 100-200 µl ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml

1.2) เติม TOPO® cloning reaction (ที่มี recombinant vector) ปริมาตร 3 µl แล้วนำไปปั่นในน้ำแข็ง นาน 5-30 นาที

1.3) ทำ heat-shock ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 30 วินาที (ข้ามเขย่า) แล้วนำไปปั่นในน้ำแข็ง นาน 5 นาที

1.4) เติม Super optimal broth with catabolite repression (SOC) medium ปริมาตร 250 µl ปั่นที่อุณหภูมิห้อง

1.5) ปิดฝาหลอดให้สนิท แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm นาน 1 ชั่วโมง

1.6) ทำ spread plate โดยดูดสารละลาย 100, 150 หรือ 200 µl จาก SOC medium ใส่บนอาหารแข็ง Luria Broth (LB) medium ที่เติม 50-100 µg/ml ampicillin หรือ 50-100 µg/ml kanamycin (ควร warm ที่อุณหภูมิ 37°C นานอย่างน้อย 30 นาที) จากนั้นทำการ spread โดยใช้แท่งแก้ว

1.7) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

2) analysis transformant cells

2.1) คัดเลือก 5 colonies แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว LB medium ที่เติม 50-100 µg/ml ampicillin หรือ 50-100 µg/ml kanamycin (ขณะเดียวกันควรทำ master plate)

2.2) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm นาน 12 ชั่วโมง

2.3) สกัดแยก plasmid DNA โดยใช้ชุดสกัด PureLink™ HQ Mini Plasmid Purification Kit (catalog no. K2100-01) (Invitrogen)

2.4) ตรวจสอบ *crypt* gene โดยใช้เทคนิค restriction enzyme analysis, colony PCR หรือ DNA sequencing

### 3.2.3 Optimization of culture media on bacteria growth

- 1) เตรียม first (1<sup>st</sup>) culture โดยนำ selective colony มาเลี้ยงในอาหารเหลว 10 ml LB medium ที่เติม 50-100 µg/ml ampicillin หรือ 50-100 µg/ml kanamycin
- 2) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm นาน 12 ชั่วโมง (overnight culture)
- 3) เตรียม secondary (2<sup>nd</sup>) culture จากนั้นดูด 500-1000 µl จาก 1<sup>st</sup> culture ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ 10 ml LB medium (ที่เติม 50-100 µg/ml ampicillin หรือ 50-100 µg/ml kanamycin) และใช้ glucose ความเข้มข้น 0, 1, และ 2% โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ
- 4) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm นาน 12 ชั่วโมง
- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm (OD<sub>600</sub>) ~ 0.5-0.8 (midlog phase)
- 6) บันทึกผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติและวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### 3.2.4 Optimization of glucose concentration

- 1) เตรียม 1<sup>st</sup> culture เช่นเดียวกับวิธีการทดลองข้อ (3)
- 2) เตรียม 2<sup>nd</sup> culture โดยดูด 500-1000 µl 1<sup>st</sup> culture ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ 10 ml LB medium (ที่เติม 50-100 µg/ml ampicillin หรือ 50-100 µg/ml kanamycin) และใช้ glucose ความเข้มข้นที่ดีที่สุด จากวิธีการทดลองข้อ (3) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm นาน 12 ชั่วโมง
- 3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600nm (OD<sub>600</sub>) ~ 0.5-0.8 (midlog phase)
- 4) แบ่ง 5ml ของ 2<sup>nd</sup> culture ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม IPTG ที่ final concentration เท่ากับ 0, และ 0.5 mM โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 5) ดูด 1000µl ของแต่ละ 3<sup>rd</sup> culture (ทำ 3 ซ้ำ) จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 rpm นาน 30-60 วินาที เก็บตะกอนของเซลล์ -20 (สำหรับ zero time point samples)
- 6) นำหลอดที่เหลือไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200rpm จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 4, 6 และ 8 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD<sub>600</sub> วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 7) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000rpm นาน 30-60 วินาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ -20
- 8) บันทึกผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติและวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การเตรียม Lysis buffer

สารเคมี

Tris HCl	10	ml
1M EDTA	50	ml
NaCl	1.16	g

วิธีการเตรียม

ผสมสารละลาย Tris HCl 10 ml, 1M EDTA 50 ml และ NaCl 1.16 g ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

### 3.2.5 Optimization of culture media on bacteria growth

- 1) เตรียม first (1<sup>st</sup>) culture โดยนำ colony มาเลี้ยงในอาหาร LB medium เหลว 10 มิลลิลิตร ที่เติม ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 2) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 12 ชั่วโมง หรือข้ามคืน
- 3) เตรียม secondary (2<sup>nd</sup>) culture จากนั้นดูด 1000 ไมโครลิตร จาก 1<sup>st</sup> culture ใส่ลงในหลอดอาหาร เหลว LB medium 10 มิลลิลิตร ที่เติม ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 4) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที
- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm (OD<sub>600</sub>) ~ 0.5-0.8 (midlog phase) ทุกๆ 3 ชั่วโมง คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง
- 6) บันทึกผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล

### 3.2.6 การเตรียม Cryptogein protein จาก *E. coli*

- 1) นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มี Crypt Gene จาก Stock -80 องศาเซลเซียส มา Steak Plate บนอาหาร LB Medium ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง
- 2) จากนั้นเตรียมเลี้ยงเชื้อ First Culture โดยการเตรียมอาหารเหลว LB Broth ใส่หลอดทดลอง 5 มิลลิลิตร จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวจาก (ข้อ 1) ย้ายเชื้อลงหลอดทดลองที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 12 ชั่วโมงหรือข้ามคืน
- 3) เตรียมเลี้ยง Secondary Culture โดยการเตรียมอาหารเหลว LB Broth ใส่ขวดรูปชมพู่ (Flask) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายเชื้อจาก (ข้อ 2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง
- 4) จากนั้นเติมสาร Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 0 และ 0.5 มิลลิโมล (เพื่อชักนำการสร้างโปรตีน) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 14 ชั่วโมง
- 5) จากนั้นนำเชื้อ *E. coli* จากข้อ 3 มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (หรือเก็บเพื่อทดสอบต่อไป ส่วนตะกอนเซลล์สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ได้)
- 6) เติมด้วย Lysis Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ (5) แล้วนำไป Sonication โดยตั้งค่า แอมแปร์ที่ 30% นาน 15 นาที (เพื่อให้เซลล์แตกและปลดปล่อยโปรตีนออกมา) จนสารละลายมีลักษณะเริ่มใสขึ้น และเป็นเนื้อเดียวกัน
- 7) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกตะกอนเซลล์และสารละลาย เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโปรตีนด้วย วิธี SDS-PAGE ต่อไป

### 3.2.7 วิธีการเตรียม SDS-PAGE

1) นำกระจกสำหรับทำ SDS-PAGE มาทำความสะอาดและเช็ดให้แห้ง จากนั้นนำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกบกันโดยนำกระจกแผ่นสั้น (Short Plate) วางบนกระจกแผ่นใหญ่ (Spacer Plate) นำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นวางลงใน Casting Frame โดยวางแผ่นสั้น (Short Plate) ไว้ด้านหน้า

2) Casting Frame ให้ปลายแผ่นกระจกทั้งสองเสมอกันเพื่อป้องกันการรั่ว จากนั้นกดล็อก (ควรระวังกระจกอาจแตกจากการประกบไม่เข้ารูปได้)

3) นำ gel cassette assembly ที่ประกอบใน casting frame วางบน casting stand ที่มี gray casting stand gasket รองอยู่ที่ด้านล่างเพื่อป้องกันการรั่วออกนอกแผ่นกระจก

4) เตรียมสารละลายเพื่อทำ polyacrylamide gel ดังนี้

เตรียม Separating gel 12% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

- H <sub>2</sub> O	3.3	มิลลิลิตร
- 30% Acrylamide	4.0	มิลลิลิตร
- Tris-Cl (1.5 M pH 8.8)	2.5	มิลลิลิตร
- SDS (10%)	0.1	มิลลิลิตร
- 10% APS (Ammonium Per sulfate)	0.1	มิลลิลิตร
- TEMED	0.004	มิลลิลิตร (ควรเติมหลังสุดเพราะเจลจะแข็งทันที)

เตรียม Stacking gel 5% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

- H <sub>2</sub> O	3.4	มิลลิลิตร
- 30% Acrylamide	0.83	มิลลิลิตร
- Tris-Cl (1.0 M pH 6.8)	0.63	มิลลิลิตร
- SDS (10%)	0.05	มิลลิลิตร
- 10% APS (Ammonium Per sulfate)	0.05	มิลลิลิตร
- TEMED	0.005	มิลลิลิตร (ควรเติมหลังสุดเพราะเจลจะแข็งทันที)

6) ดูดสารละลาย ส่วนของ Separating gel ลงในช่องของแผ่นกระจกที่เตรียมไว้โดยเว้นระยะห่างจากขอบบนประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้เต็มถึงขอบแผ่นกระจก (เติมน้ำกลั่นเพื่อให้เจลเรียบและเซตตัว) โดยตั้งทิ้งไว้ 30-45 นาที จนเจลเซตตัว แล้วเทน้ำกลั่นที่อยู่ในกระจกออก จะเห็นว่าเจลที่เตรียมจะเรียบ

7) ดูดสารละลาย ส่วนของ Stacking gel ลงในช่องของแผ่นกระจกโดยดูดไว้บน Separating gel เติมจนถึงขอบแผ่นกระจก จากนั้นนำหวี (comb) มาวางบนเจลให้ตรง อย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้จนเจลเซตตัวประมาณ 30-45 นาที

8) เมื่อเจลแข็งตัวนำหวีออกจากเจลโดยดึงออกช้าๆ นำ Gel Cassette Assemblies ออกจาก Casting Stand แล้วนำไปต่อเข้ากับ Electrode Assembly โดยหันด้านกระจกแผ่นสั้น (Short Plate) ของ Gel Cassette Sandwich เข้าด้านใน แล้วเลื่อนใส่เข้าไปใน clamping frame

9) กด electrode assembly ลงใน clamping frame พร้อมทั้งกดล็อกด้วย cam levers เพื่อประกอบเป็นส่วน inner chamber แล้วนำเข้าไปยังในส่วน Mini Tank

10) เท running buffer ลงใน mini tank โดยเติมด้านนอกให้อยู่บริเวณกึ่งกลางกระจก ส่วนด้านในระหว่างแผ่นกระจก เติมจนเต็ม แล้วสังเกตว่า มีการรั่วของ running buffer หรือไม่

11) เตรียมตัวอย่างที่จะทดสอบ ในอัตราส่วน ตัวอย่าง: loading dye เท่ากับ 5:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### 3.3 Beta-cryptogein gene transformation in Yeast

#### 3.3.1 Preparation of *E. coli* competent cell

A single colony of *E. coli* strain DH5 $\alpha$  was inoculated into 5 ml of LB broth without antibiotic (Pronadisa, Spain). Bacterial cells were cultured at 37°C for 10 hours at 250 rpm. One milliliter of the cell culture was then transferred into 50 ml fresh LB broth and incubated at 37°C for 3 hours at 250 rpm. The Optical Density (OD) was checked at 600nm using a UV visible spectrophotometer (DR04000, Milton Roy Company) and was found to be in the range 0.3-0.4. The culture was then transferred into pre-autoclaved centrifuges tube and placed on ice for 10 minutes and then was spanned at 4000 rpm for 10 minutes and discarded the supernatant. Pellets were washed with 10 ml (chilled) of 0.1 M calcium chloride was added in the centrifuged mixture and incubated in ice for 10 minutes and was then centrifuged at 4000 rpm at 4°C for 10 minutes and the supernatant was thrown away and only the pallet was left behind. The pellets were then re-suspended using 2 ml of 0.1M CaCl<sub>2</sub> and sterile glycerol was added in the mixture of 30 % glycerol and was then incubated for 15 minutes on the ice after mixing it gently. Finally, the solution was transferred in 1.5 ml microcentrifuge 200  $\mu$ l each and was stored at -80°C until further used.

#### 3.3.2 Beta-cryptogein transformation in *E. coli*

Tubes containing 100  $\mu$ l of competent cells were thawed on ice. In determining the transformation efficiency, 5  $\mu$ l of beta-cryptogein was transferred into 100  $\mu$ l of competent cells tube, was mixed gently and incubated in ice for 15 minutes. After incubation, heat shock was applied to the cells for 45 seconds at 42°C in a water bath without shaking and was then immediately incubated on ice for 2 minutes. One milliliter of LB medium was added to the transformed cell mixture and was spread in different volumes (10  $\mu$ l, 70  $\mu$ l, and 100  $\mu$ l, respectively) on LB media with 100  $\mu$ g/ml Zeocin<sup>TM</sup>. Finally, the plates were incubated at 37°C for 14 -16 hours.

#### 3.3.3 Selection of positive single colonies and colony PCR

Colony PCR was done taking single colony from the transformants as DNA templates. PCR products were loaded in 1 % agarose gel and run through electrophoresis at 100 V for 40 minutes to detect the positive colonies carrying the inserted beta-cryptogein gene.

#### 3.3.4 Plasmid extraction

A single colony was prepared and cultured (in culture tube) by inoculating 5 ml of Luria-broth medium containing Zeocin<sup>TM</sup> into the medium at 37°C while shaking at 200 rpm overnight. The next day, the culture was transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube and centrifuged at 14000 x g for 1 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in 200  $\mu$ l of buffer S1 (RNA added). Afterwards, 200  $\mu$ l of buffer S2 was added to the mixture and mixed thoroughly by inverting the tube 10 times and left it for some time so that the lysate becomes



homologous. After that, 300  $\mu$ l of C3 buffer was added and mixed immediately by inverting the tube 10 times and then centrifuged at 16000 x g for 10 minutes. The mixture was placed in PM filter column kit and the supernatant obtained from the previous centrifugation was added into the PM column using a pipette and centrifuged again at 14000 x g for 30 seconds. The liquid flow was discarded from the collection tube and was put back to the column. After that, 400  $\mu$ l of W1 buffer was added to PM column and centrifuged again at 14000 x g for 30 seconds and the flow-through was discarded. W2 buffer (ethanol added) at 600  $\mu$ l was added into the PM column and centrifuged at 14000 x g for 30 seconds. The supernatant was discarded and the collection tube was placed back to the column. This step was repeated to remove the residual W2 buffer. For DNA elution, the column was placed in a clean 1.5 ml micro-centrifuge tube and 25  $\mu$ l of buffer E was added into the middle of each PM column and incubated for 5 minute. Centrifugation at 14000 x g for 2 minutes was done after to elute the DNA and the resulting DNA solution from 4 tubes was mixed in one tube. Isopropanol (300  $\mu$ l) was added to the DNA solution and stored overnight at -20°C. Afterwards, the mixture was centrifuged at 16000 x g for 20 minutes and washed with 400  $\mu$ l of 70% ethanol. It was placed in the fume hood for 30 minutes afterward to dry the pellet cells completely and then 10  $\mu$ l of TE was added and mixed using a pipette.

### 3.3.5 Preparation of competent yeast cells for electroporation

*P. pastoris* strain was grown on YPD agar medium and incubated at 28°C for 3 days (Figure 3). Its colony was cultured (in culture tube) by inoculating 5 ml of YPD broth into the medium at 30°C while shaking at 200 rpm for overnight. The 1 ml of the cultured *P. pastoris* strain was added into 100 ml fresh YPD-broth medium in a 250 ml conical flask and was grown at 30°C for overnight until the formation of pellet cells. The shaking rate was kept 200 rpm during the culture growth to achieve OD 1.3-1.5 at 600nm. The culture was centrifuged at a speed of 1500 x g at 4°C for 5 minutes (Invitrogen, 2009). The pellet cells were then re-suspended in 20 ml ice cold sterile water. The pellet cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes at 4°C. The pellet was then re-suspended again in 10 ml of cold sorbitol following the same condition as the previous. The same process was repeated using 1 ml of cold 1 M sorbitol. The cell solution was stored in 1.5 ml microtube on ice for one hour and was used for further processing.

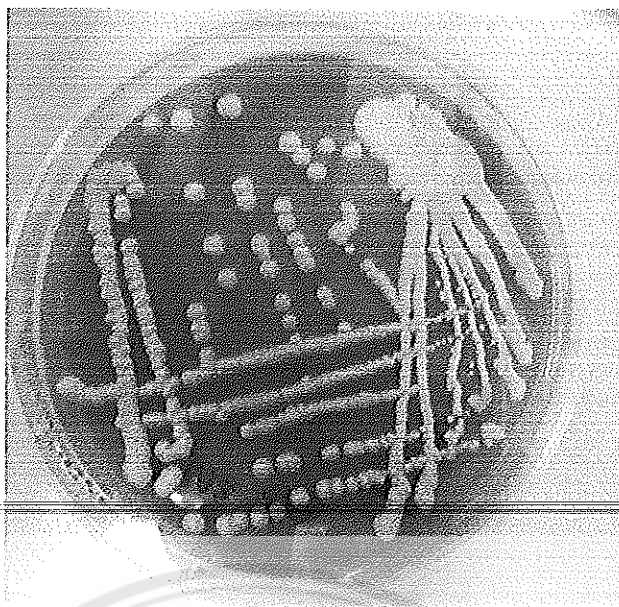


Figure 3 The strain Y11430 of *P. pastoris* used for electroporation on YPD plates

### 3.3.6 Preparation of pPICZ $\alpha$ A-crypt plasmid for transformation

The linearized pPICZ $\alpha$ A-crypt plasmid was prepared by using *Sac*I Figure 10 according to manufacturer's instruction (Invitrogen, Germany). The reaction mixture contained 7.5  $\mu$ l of pPICZ $\alpha$ A-crypt plasmid, 3.0  $\mu$ l of 10X buffer-L, 1.5  $\mu$ l of *Sac*I, and 18.0  $\mu$ l sterilized distilled water making the 30  $\mu$ l total mixture. The mixture was incubated at 37°C for 16 hours, and at 65°C for 20 minutes for the enzyme activity. Finally, the solution was stored at -20°C until further use (Weidner et al., 2010).

On the other hand, the circular pPICZ $\alpha$ A-crypt plasmid was prepared as follows: 7.5  $\mu$ l of circular pPICZ $\alpha$ A-crypt plasmid and 22.5  $\mu$ l sterilized distilled water following a 30  $\mu$ l total mixture and was stored at -20°C until further use.

Both circular and linearized plasmids were confirmed on through agarose gel (1%) electrophoresis.

### 3.3.7 Transformation into *Pichia pastoris* by electroporation screening the yeast cell containing the recombinant vector

The combination between plasmid forms (circular or linear) and electric pulses (1.5 or 2.0 KV) was set up for this experiment to compare transformation efficiency. The experiment was classified into four groups namely linearized plasmid+electric pulse 1.5 KV(M1), circular plasmid+electric pulse 1.5 KV(M2), linearized plasmid+electric pulse 2.0 KV(M3) and circular plasmid+electric pulse 2.0 KV(M4). Yeast competent cells (80  $\mu$ l), prepared as described above, were mixed with 10  $\mu$ l of linearized- or circular-plasmid transferred to 0.2 cm micropulser cuvette (Gene Pulser® Cuvette, Bio-Rad, USA) and incubated on ice for 5 minutes. These mixtures were electroporated with two different electric pulses (1.5 or 2.0 KV) by using electroporation (Micropulser™ Bio-Rad, USA). After transformation, cool One milliliter of sorbitol (1 M) was

immediately added to the cuvette. The mixture was transferred into a 1.5 ml sterilized microcentrifuge tube and incubated at 30°C without shaking for 2 hours to recover the cells. The transformants (360 µl) were spread on fresh YPD agar plate, containing 100 µg/ml Zeocin™, incubated at 30°C for 3 days until colony formation. Twelve single colonies, resistant to Zeocin™, were selected from individual plate of different transformation methods. Selected colonies were streaked on a fresh master YPD agar plate containing 100 µg/ml Zeocin™ for further confirming successful transformation efficiency. Successful single colonies were selected for PCR and gel electrophoresis was done to confirm the success of the transformation.

### 3.3.8 Extraction of genomic DNA of yeast

A single colony was picked and cultured (in culture tube) by inoculating it in 2 ml of YPD medium containing Zeocin™ into the medium at 30°C while shaking at 200 rpm for overnight. The next day, the culture was transferred into a 1.5 ml microcentrifuge tube and centrifugation was done at 5000 rpm for 5 minutes. The supernatant was discarded and 100 µl of LiOAc+SDS was added. The mixture was incubated at 70°C for 10 minutes (Looke et al., 2011) afterwards, 300 µl of absolute ethanol was added to the mixture and was mixed by vortexing. Centrifugation at 15000 x g for 3 minutes was done and the supernatant was discarded. The mixture was washed with 300 µl of 70% ethanol by tipping and the liquid was completely removed by inverting the tube upside down onto a piece of paper for a few seconds and incubated in the fume hood for 30 minutes to dry the pellet cells completely. A total of 100 µl TE was added to the final volume of the mixture, was mixed by vortexing and centrifuged at 15000 x g for 30 seconds.

### 3.3.9 Screening of single colonies of *Pichia pastoris* by PCR

The single colony after the transformation was confirmed by PCR using specific primers. Primers used and their details were presented in Table 3.1.

**Table 3.1** Specific primers used in this study

Name of the Gene	Nucleotide size (bp)	Sequence (5'-3')
Beta-cryptogein	309	TCTAGATTACAAGGATGAGCACTTGT
		GAATTCATGGCTTGTACTGCTAC
AOX1 primers:	803	GCAAATGGCATTCTGACATCC
		CGAGTGGTTCCAATTGACAAGC

The single colonies were extracted through the LiOAc DNA extraction method. The inserted gene of interest was confirmed by PCR. For PCR reactions, the One PCR mix protocol (Gene Direx, USA) was used following the set conditions for 35 cycles in (Table 3.2). The PCR reaction contained 10 µl RNase-free water, 11 µl one PCR, 1 µl forward and reverse primer, and

2  $\mu$ l of template DNA making 25  $\mu$ l total reaction. PCR products were run on 1 % agarose gel stained with EtBr through electrophoresis and DNA bands were observed in UV gel doc system.

**Table 3.2** PCR steps used in the modification of 5' and 3' ends of beta-cryptogein

Step	Temperature (°C)	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	94	5 minutes	1
Denaturation	94	30 seconds	35
Annealing	59	30 seconds	
Elongation	72	1 minute	
Final Elongation	72	5 minutes	1

### 3.3.10 Small-scale production of beta-cryptogein

A single colony of transformants (as done and presented in Figure 10) was inoculated in 5 ml BMGY broth medium (1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, 10X YNB stock, 500 X B) containing 100  $\mu$ g/ml Zeocin<sup>TM</sup> in a glass tube. Cell culture was grown at 30°C in a shaking at 200 rpm for 24 hours in an incubator (BIOER TECHNOLOGY Model SI-23MC). The cell pellets from 1 ml culture were harvested by centrifuging the mixture at 5000 rpm for 5 minutes at room temperature. The pellets were resuspended in 1 ml sterile water and centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes at room temperature. The cell pellets were collected and re-suspended with 5 ml BMGY with 100  $\mu$ g/ml Zeocin<sup>TM</sup> and incubated in 30°C with shaking at 200 rpm for 7 days. Methanol was added every 24 hours into the BMGY medium for the next 7 days to maintain the concentration of 0.5%. At certain time after the start of the expression, 1 ml of the culture will be transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube, which will be centrifuged at 1300 x g for 2.5 minutes at room temperature. Supernatant and cell pellets will be transferred to a separate 1.5 ml microcentrifuge tube and stored at -20°C for further use. The samples from different time points (24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours) were analyzed to establish the optimal time period for protein expression after induction. At differently expressed proteins, the quality and quantity of target protein as the beta-cryptogein are determined by SDS-PAGE.

2 61/58/2  
2564 2560 25  
2564 2560 25

### 3.3.11 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

The casting frames were set (by clamping two glass plates in the casting frames) on the casting stands. The separating gel solution (12% and 5 %, respectively) was prepared as described in Appendix page. Ten milliliters of the 12% separating gel solution was filled into the gap between the glass plates first using a pipette. After the gel became hard, the 5% stacking gel solution was filled next into the gap between the glass casting frames until it became hard. The well-forming comb was inserted without trapping air under the teeth. The gel was completely polymerized within 30-40 minutes. After the complete gelation of the stacking gel, the comb was taken out. The casting frame was taken out and was set in the cell buffer dam. The running buffer was poured (electrophoresis buffer) into the inner chamber continuously until it reached the surface level required in the outer chamber. The samples were mixed loading buffer and were heated in boiling water for 5-10 minutes. Prepared samples were loaded into the wells without any overflow and the protein marker were loaded in the first lane. After covering the top, anodes was connected. The electrophoresis was established at 120 volts for 80 minutes and the SDS-PAGE run was stopped when the protein marker almost reached the bottom line of the glass plate. And the gel was putted blue staining for overnight on the platform rocker STR6 and then destained for overnight and changed the solution in water till the required band appeared on gel.

### 3.3.12 Statistical analysis

The data were analyzed by using the Analysis of Variance (ANOVA) method, and mean comparison among treatments (electroporated transformation methods) were calculated by Tukey HSD test at a p-value less than 0.01 as statistical significance using SPSS statistics 17.0 software. All values were expressed as the mean  $\pm$  standard error (SE).

### 3.4 การศึกษาโรคพรมมิและการพิสูจน์การเกิดโรค

การศึกษาโรคพรมมิ ในแปลงวิจัยคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ตั้งแต่เดือน มิถุนายนจนถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2560 โดยศึกษาลักษณะโรคอาการที่เกิดขึ้นบนใบและลำต้น จากนั้นนำมาแยก เชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ วิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์สาเหตุโรคใบไหม้และลำต้นไหม้พรมมิ นำใบและลำต้นพรมมิ บริเวณที่แสดงอาการ มาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Water agar (WA) โดยนำชิ้นส่วนพรมมิที่แสดงอาการ คาบต่อกับเนื้อเยื่อปกติมาตัดให้เป็นชิ้นขนาด 5.0 – 8.0 มิลลิเมตร นำมาล้างทำความสะอาดในสารละลาย Sodium hypochloride (Clorox) ความเข้มข้น 10% ซึ่งผสมสาร tween20 จำนวน 2 หยด เชยาล้างทำความสะอาดเป็นเวลา 10 นาที ย้ายชิ้นส่วนใบหรือลำต้นพรมมิในสภาพปราศจากเชื้อ มาล้างในน้ำกลั่นอบฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิเมตร เชยาล้างเป็นเวลาครั้งละ 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนพรมมิที่ปราศจากเชื้อ มาซบให้แห้งบนกระดาษซับฆ่าเชื้อ และนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร WA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน หรือจนกว่าจะมีเส้นใยเจริญขึ้นบนอาหาร จากนั้นทำการย้ายเส้นใยที่เจริญออกมารอบๆเนื้อเยื่อที่ซบไปเลี้ยงบน อาหาร potato dextrose agar (PDA) ในหลอดเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำไปจำแนกชนิดของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound Microscope

### 3.5 การศึกษาสาร beta-cryptogein protein กับความต้านทานโรคพรมมิ

การกระตุ้นให้เกิดการชักนำความต้านทานโรคของต้นพรมมิ โดยฉีดพ่นต้นพรมมิด้วยสาร beta-cryptogein protein ที่มีความเข้มข้น 100 300 และ 500 ppm. ตามลำดับ ทำการฉีดพ่นจำนวน 3 ครั้ง โดยเว้นระยะเวลาการฉีดพ่นห่างกัน 48 ชั่วโมง สำหรับต้นพรมมิควบคุมฉีดพ่นน้ำ ทุกกรรมวิธีดำเนินการก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนส เป็นระยะเวลา 10 วัน

3.6 ศึกษาผลของการใช้ beta-cryptogein หรือ/และ capsicain protein ต่อการแสดงออกของยีน oxidosqualene cyclase (OSC) และ acetyl-coA C-acetyltransferase (AACT) ในพรมมิ โดยเทคนิค quantitative real time PCR (qRT-PCR)

1) การสกัด RNA (total RNA isolation)

- นำต้นกล้าพรมมิที่เตรียมจากวิธีการทดลองที่ 2 มาตัดแยกชิ้นส่วน ใบ ลำต้น และราก แล้วทำการสกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัด TRIzol® Reagen (Life Technologies) ตามวิธีของบริษัท

- ตรวจสอบคุณภาพของ total RNA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer (NanoDrop2000, Thermo Scientific) (ห้องปฏิบัติการของคณะแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)

- ตรวจสอบคุณภาพของ total RNA โดยวิธี gel electrophoresis ใช้ total RNA (1.5µg) ตรวจสอบคุณภาพบน agarose gel (1.5%) และ TAE buffer (1X) (ห้องปฏิบัติการของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)

- เก็บตัวอย่างสารละลาย total RNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2) สังเคราะห์ First-Strand cDNA (first stranded cDNA synthesis)

- สังเคราะห์สายแรกของ cDNA โดยเติม total RNA (1µg) ลงในชุดสังเคราะห์สำเร็จ first strand cDNA synthesis โดยใช้ชุด Reverse Transcription for Real-Time PCR (Life Technologies)

3) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยใช้ Quantitative Real-time PCR (Detection of gene expression using qRT-PCR)

- นำสารละลาย cDNAs (1µl) และ gene specific primers สำหรับยีน *BmOSC* ใช้คู่ไพรเมอร์ qOSC-F (5'-GCATGTGGAATGCACTGCTTCTGT-3') และ qOSC-R (5'-TGCCTTCGCCACGGAGATTCTAT-3') (Vishwakarma et al., 2013a) และ สำหรับยีน *BmAACT* ใช้คู่ไพรเมอร์ qAACT-F (5'-GACTACGGCATGGGAGTTTG-3') และ qAACT-R (5'-ATTCCACGCTCAAACTTTGG-3') (Vishwakarma et al., 2013b) และ normalization โดยใช้ 18S rRNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 18S-F (5'-GCACGCGCGCTACACCGAAG-3') และ 18S-R (5'-GTCTGTACAAAGGGCAGGGACG-3') (Vishwakarma et al., 2013a,b)

- เติม cDNA และ primers ลงในชุด SYBR Green Mastermixes (Life Technologies)

- ปฏิบัติการ qRT-PCR reactions ใช้ conditions ดังนี้: 1 cycle ของ 10 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 30 s at 72 °C (ทุกปฏิบัติการทำ 3 ซ้ำ) โดยใช้เครื่อง Real-Time PCR Instruments (Life Technologies)

- วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *BmOSC* และ *BmAAC* ในส่วนของ ลำต้น ใบและรากของพรมมิ โดยใช้วิธี comparative Ct method ด้วย RealTime StatMiner® Software (Life Technologies)

### 3.7 Statistical analysis

The data were analyzed by using the Analysis of Variance (ANOVA) method, and mean comparison among treatments (electroporated transformation methods) were calculated by Tukey HSD test at a p-value less than 0.01 as statistical significance using SPSS statistics 17.0 software. All values were expressed as the mean  $\pm$  standard error (SE).

### 3.8 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

- 1) โรงเรือนปลูกพืชทดลอง และห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
- 2) ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง และวิจารณ์

#### 4.1 Production of cryptogin in *Escherichia coli* strain BL21 Star™(DE3)

ทำการทดลอง 6 การทดลอง ดังนี้

##### 4.1.1 Transformation into *Escherichia coli* strain BL21 Star™(DE3)

ทำการถ่ายถ่าย recombinant vector เข้าสู่ *Escherichia coli* strain BL21 Star™(DE3) โดยวิธี heat-shock transformation โดยนำ Transformant *Escherichia coli* strain BL21 เลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria Broth (LB) medium ที่เติม 100 µg/ml ampicillin แล้วเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า Transformants ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร LB-ampicillin เป็นแบคทีเรียที่บรรจุ pET TOPO® expression vectors ซึ่งมียีน beta-cryptogin (Figure 4.1)

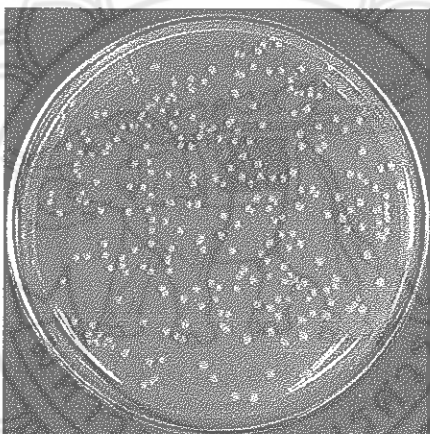


Figure 4.1: โคโลนี *Escherichia coli* strain BL21 Star™(DE3) เพื่อนำมาวิเคราะห์ transformant cells

#### 4.1.2 ผลของปริมาณ Recombinant Vector ต่อประสิทธิภาพการ transformation

จากการทดลองการทำ Transforming The Recombinant Vector Into *Escherichia Coli* โดยการแบ่งความเข้มข้นของ Recombinant Vector (RV) เป็น 2, 4, 6, 8, และ 10 นาโนกรัม ในปริมาตร 50, 100, และ 150 ไมโครลิตร ของ bacterial competent cells เพื่อตรวจสอบอัตราการเกิด Transformed Competent Cell หลังจากถ่าย vector เข้าสู่ *E. coli* แล้ว พบว่า เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ RV ที่เท่ากัน จะมีอัตราการเกิดโคโลนีเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาตรของเซลล์ *E. coli* และอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาตรที่เท่ากันในความเข้มข้นของ RV ต่างกัน อัตราการเกิดก็จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดย RV ที่ระดับปริมาณ 4, 6, และ 8 นาโนกรัม ในปริมาตร 150 ไมโครลิตร ของ bacterial competent cells มีอัตราการเกิดโคโลนีที่เหมาะสมที่สุด (Figure 4.2) ส่วน RV ปริมาณ 10 นาโนกรัม ในทุกปริมาตร มีอัตราการเกิดโคโลนีน้อยกว่า (Figure 4.2)



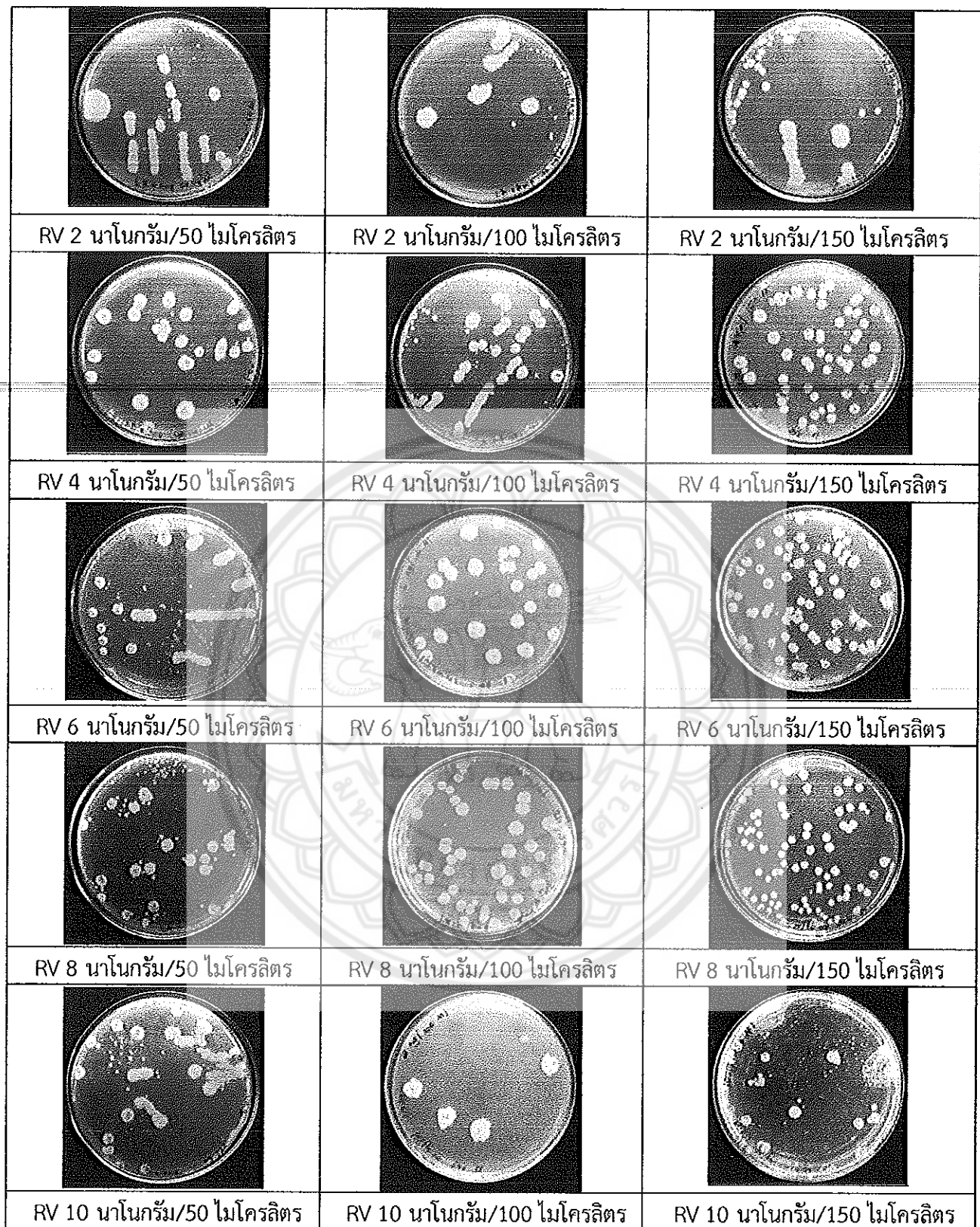


Figure 4.2 แสดงโคโลนีของ Transformed Competent Cell ที่ความเข้มข้นของสารละลายต่างกัน

#### 4.1.3 การวิเคราะห์เซลล์แบคทีเรียที่มี pET-crypt โดยวิธี single colony PCR

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) ตรวจสอบ *crypt* gene โดยวิธี colony PCR (ควรทำเครื่องหมายหรือสัญลักษณ์ของแต่ละโคโลนีเดี่ยวด้วย) โดยใช้ไม้จิ้มฟันแตะที่โคโลนีเดี่ยว นำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ (Table 4.1) ผลการทดลองพบว่า PCR product จากการใช้ ไพรเมอร์คู่ที่ 1, 2 และ 3 มีขนาดประมาณ 109, 112 และ 198 bp ตามลำดับ (Figure 4.3 และ Figure 4.3) ซึ่งบ่งชี้ว่า โคโลนีของ *Escherichia coli* strain BL21 ทั้ง 3 clones มีพลาสมิดซึ่งบรรจุยีน *crypt* อยู่ (pET-crypt gene)

จากนั้นนำโคโลนีดังกล่าวมาทำ master plate และ stock เชื้อใน 30% glycerol ในอัตราส่วน 1:1 เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้งานต่อไป

Table 4.1 : ไพรเมอร์ 3 คู่ ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสของ *crypt* gene

Name	Length	Sequence 5'-3'	product
F1-crypt <sub>109</sub>	20 bp	TTGATGTGCGCTTCTACTGC	109 bp
R1-crypt <sub>109</sub>	20 bp	AAACGTTCAAAACCAATCCG	
F2-crypt <sub>182</sub>	20 bp	TGTCTGACGCGTCTTTCAAC	112 bp
R2-crypt <sub>182</sub>	20 bp	CATGCAGTAGAAGCGCACAT	
F2-crypt <sub>182</sub>	20 bp	TGTCTGACGCGTCTTTCAAC	198 bp
R1-crypt <sub>109</sub>	20 bp	AAACGTTCAAAACCAATCCG	

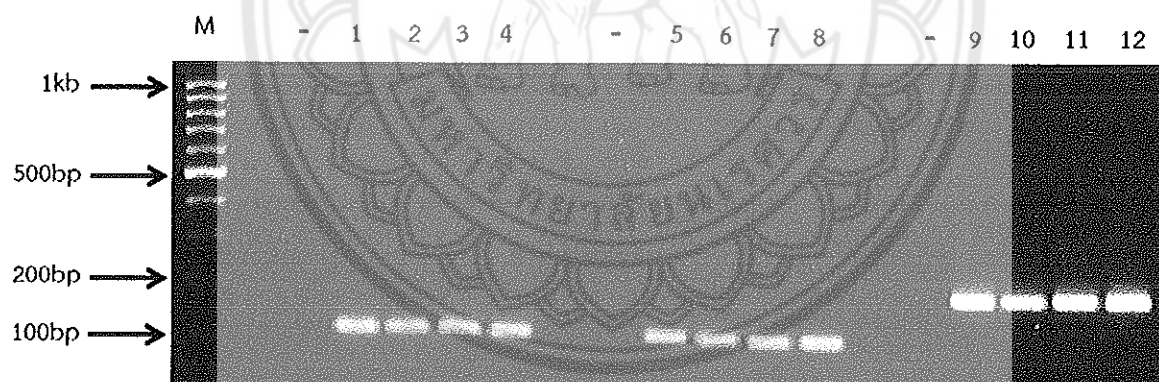


Figure 4.3 : ตรวจสอบ *crypt* gene จากโคโลนีที่คัดเลือกมาโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ gene จำนวน 3 คู่ที่

Note: Lane M คือ Marker 100bp Plus DNA Ladder; Lane (-) คือ negative control; Lane 1-4 คือ ตัวอย่างที่ 1-4 ตามลำดับ ใช้ primer F1-crypt<sub>109</sub> และ R1-crypt<sub>109</sub>; Lane 5-8 คือ ตัวอย่างที่ 1-4 ตามลำดับ ใช้ primer F2-crypt<sub>182</sub> และ R2-crypt<sub>182</sub>; Lane 9-12 คือ ตัวอย่างที่ 1-4 ตามลำดับ ใช้ primer F2-crypt<sub>182</sub> และ R1-crypt<sub>109</sub>

#### 4.1.4 การทดลองผลของ D-glucose ต่อการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* strain BL21 Star™(DE3)

นำโคโลนีที่คัดเลือกจาก stock เชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว Luria Broth (LB) medium ที่เติม 100 µg/ml ampicillin ที่มีปริมาตร 5 ml นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 ml ลงในอาหารเหลว Luria Broth (LB) medium ที่เติม 100 µg/ml ampicillin ที่มีปริมาตร 100 ml นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 45 นาที (ทำ 3 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600nm (OD600) ~ 0.5-0.8 (midlog phase) แล้วเติม D-glucose โดยให้ชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 มีความเข้มข้นเป็น 0%, 1% และ 2% ตามลำดับ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบผลการทดลองโดยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ผลการทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้น D-glucose 2% มีเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* strain BL21 Star™ (Figure 4.4) และ อุณหภูมิ 25°C มีเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* strain BL21 Star™ (Figure 4.5) โดยพบปริมาณ beta-cryptogein ในส่วนของตะกอน มากกว่าส่วนใสของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ผลการทดลองบ่งชี้ว่า *Escherichia coli* strain BL21 Star™ สามารถผลิตโปรตีน beta-cryptogein โดยใช้ระบบ gene-cloning และ expression system ความเข้มข้น D-glucose 2% ที่อุณหภูมิ 25°C ได้ดีที่สุด

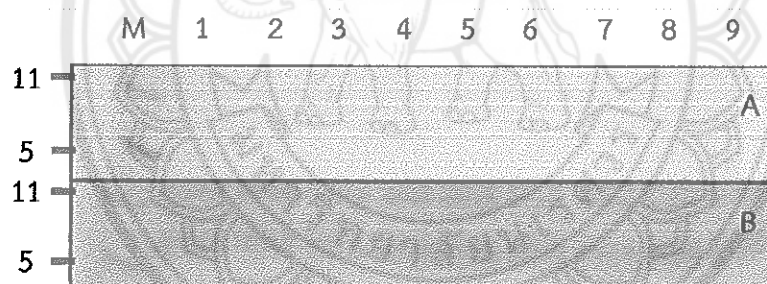


Figure 4.4: แสดงผลของ D-glucose ต่อการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* strain BL21 Star™; สารละลายเซลล์ (A), ตะกอนเซลล์ (B)

Note: M คือ BLUelf Prestained Protein Ladder (Tris-Glycine 4~20%); lane 1, 2, 3 คือ beta-cryptogein protein เติม D-glucose 0%; lane 4, 5, 6 คือ beta-cryptogein protein เติม D-glucose 1%; lane 7, 8, 9 คือ beta-cryptogein protein เติม D-glucose 2%

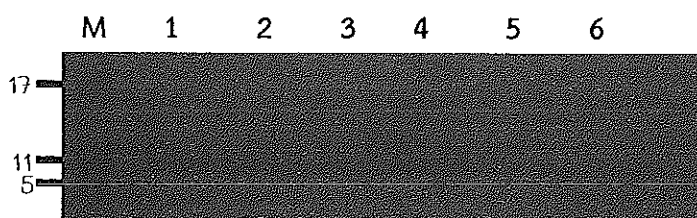


Figure 4.5 : แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* strain BL21 Star™

Note: M คือ BLUelf Prestained Protein Ladder (Tris-Glycine 4~20%); lane 1, 2 คือ beta-cryptogein protein ที่อุณหภูมิ 18°C; lane 3, 4 คือ beta-cryptogein protein ที่อุณหภูมิ 25°C; lane 5, 6 คือ beta-cryptogein protein ที่อุณหภูมิ 37°C

#### 4.1.5 Optimization of culture media on bacteria growth

เพื่อศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ แบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า ช่วงระยะเวลา 3-6 ชั่วโมง ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ (Log Phase) จะเพิ่มขึ้นและคงที่ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นช่วงระยะเวลา 18-21 ชั่วโมง ค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียจะมีอัตราการตายที่เพิ่มมากขึ้น (Table 4.2 และ Figure 4.6)

Table 4.2: แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อแบคทีเรีย (*E. Coli* (Strain BL21 Star™(DE3)

ชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสง (OD= 600 nm)
0	0.450
3	0.458
6	3.024
9	3.716
12	4.275
15	6.398
18	10.301
21	3.644
24	4.158

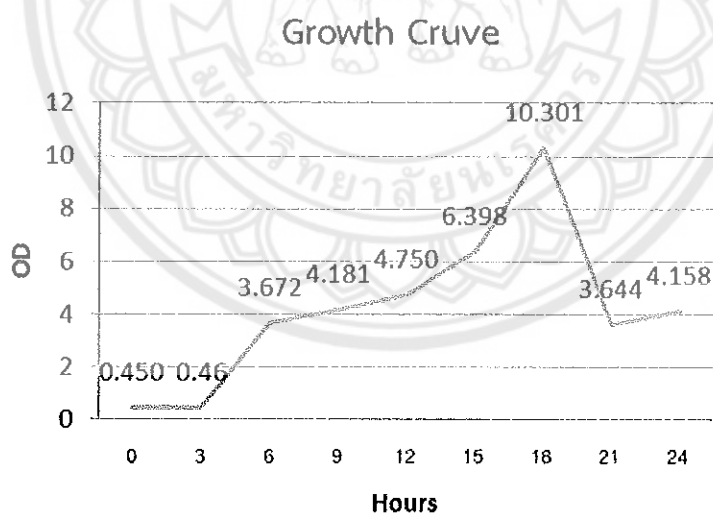


Figure 4.6 แสดงการเจริญเติบโตของ *E. coli* BL21 STAR

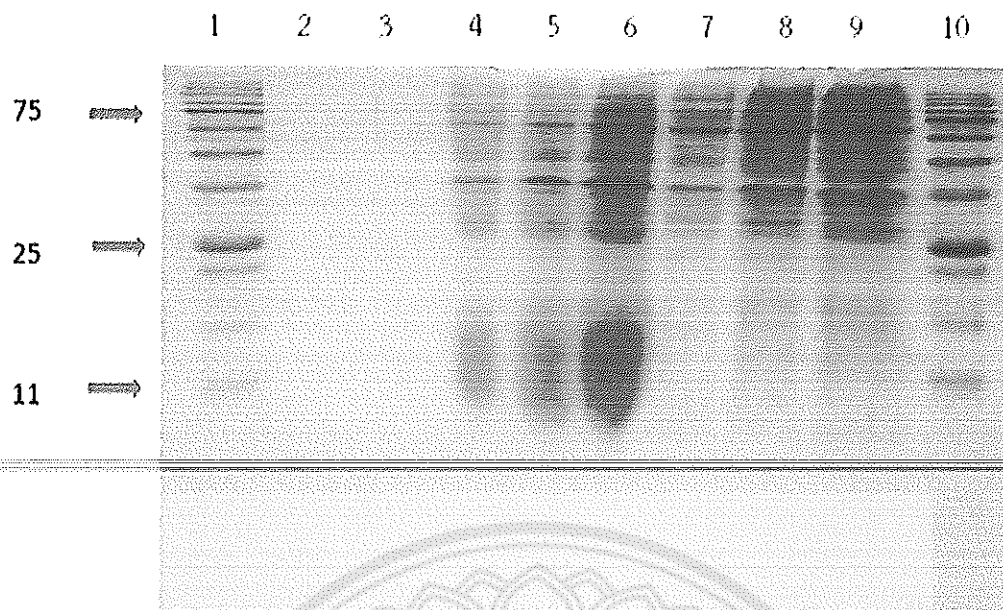
#### 4.1.6 Optimization of electrical voltage on protein separation on SDS-PAGE

ทดสอบระดับ voltage (V) ที่เหมาะสมสำหรับการแยกขนาดโปรตีน บนแผ่น SDS-PAGE โดยทดลอง 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 กำลังไฟฟ้า 150 โวลต์ บนแผ่น Polyacrylamide gel เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง (Figure 4.7); กรรมวิธีที่ 2 กำลังไฟฟ้า 120 โวลต์ บนแผ่น Polyacrylamide gel เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 30 นาที (Figure 4.8); กรรมวิธีที่ 3 กำลังไฟฟ้า 120 โวลต์ บนแผ่น Polyacrylamide gel เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 20 นาที (Figure 4.9) สิ้นสุดการทดลองทำการย้อมแผ่นเจลด้วยสีย้อมส่วน separating gel ย้อมสีด้วยสีย้อม Coomassie blue R-250 นานข้ามคืน พร้อมแช่แผ่น gel ระหว่างทำ ด้วยเครื่องแช่สาร จากนั้นล้างสีย้อมด้วย Destaining reagent จนกระทั่งเห็นแบนของ protein ชัดเจนและพื้นหลังไม่ติดสีย้อม จะเห็น แบน ของ Marker และแบนของ โปรตีนชัดเจน โดย Cryptogin protein จะมีขนาด 10 KDa

ผลการทดลองกรรมวิธีที่ 1 พบว่า การผ่านกำลังไฟฟ้า 150 โวลต์ บนแผ่น Polyacrylamide gel เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ส่วนของ Cryptogin Pellet ที่ปริมาตร 3 6 และ 12 ไมโครลิตร จะพบส่วนของโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกับ Marker (Protein ladder 10 kDa) ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบ ในขณะที่ช่องที่ใส่ Cryptogin Supernatant ปริมาตร 3 6 และ 12 ไมโครลิตร ไม่พบขนาดของโปรตีนที่มีน้ำหนักใกล้เคียงขนาด 10 kDa (Figure 4.7)

กรรมวิธีที่ 2 พบว่า การผ่านกำลังไฟฟ้า 120 โวลต์ บนแผ่น Polyacrylamide gel เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 30 นาที ส่วนของ Cryptogin Pellet ที่ปริมาตร 1.5 และ 3 ไมโครลิตร จะพบส่วนของโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับ 10 kDa อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับ Marker (Protein ladder 10 kDa) ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบ ในขณะที่ช่องที่ใส่ *E. coli* with Crypt Gene and non-sonication และ Control (*E. coli*) ทุกปริมาตร ไม่พบขนาดของโปรตีนที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกับ Marker (Protein ladder 10 kDa) (Figure 4.8)

กรรมวิธีที่ 3 พบว่า การผ่านกำลังไฟฟ้า 120 โวลต์ บนแผ่น Polyacrylamide gel เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 20 นาที ส่วนของ Cryptogin Pellet ที่ปริมาตร 1 และ 3 ไมโครลิตร จะพบส่วนของโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับ 10 kDa อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับ Marker (Protein ladder 10 kDa) ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบ หากเปรียบเทียบปริมาตรของ Cryptogin Pellet ที่ใส่ในแต่ละช่องพบว่า Cryptogin Pellet ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แสดงแถบของโปรตีนที่ขนาด 10 kDa ได้ชัดเจนและมีความแตกต่างของขนาดและความเข้มของแถบโปรตีนบนแผ่น Polyacrylamide gel ในขณะที่ช่องที่ใส่ Cryptogin supernatant และ Control (*E. coli*) ทุกปริมาตร ไม่พบขนาดของโปรตีนที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกับ Marker (Protein ladder 10 kDa) (Figure 4.9)



**Figure 4.7:** protein profile separated on SDS-PAGE as method 1

Note: Lane 1 : Marker (Protein ladder 10 kDa)	3 ul
Lane 2 : Control ( <i>E. coli</i> )	3 ul
Lane 3 : Control ( <i>E. coli</i> )	6 ul
Lane 4 : Cryptogein Pellet	3 ul
Lane 5 : Cryptogein Pellet	6 ul
Lane 6 : Cryptogein Pellet	12 ul
Lane 7 : Cryptogein Supernatant	3 ul
Lane 8 : Cryptogein Supernatant	6 ul
Lane 9 : Cryptogein Supernatant	12 ul
Lane 10 : Marker (Protein ladder 10 kDa)	5 ul



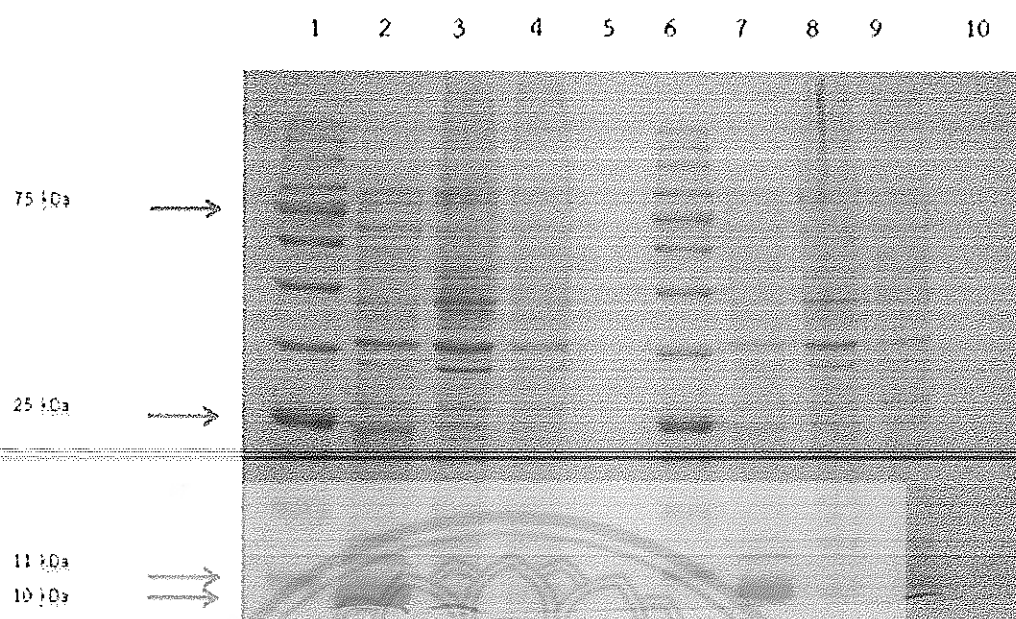


Figure 4.8: protein profile separated on SDS-PAGE as method 2

Note: Lane 1 : Marker (Protein ladder 10 kDa)	5 ul
Lane 2 : Cryptogein Pellet	3 ul
Lane 3 : <i>E. coli</i> with Crypt Gene and non-sonication	3 ul
Lane 4 : Control ( <i>E. coli</i> )	3 ul
Lane 5 : -	-
Lane 6 : Marker (Protein ladder 10 kDa)	5 ul
Lane 7 : Cryptogein Pellet	1.5 ul
Lane 8 : <i>E. coli</i> with Crypt Gene and non-sonication	1.5 ul
Lane 9 : Control ( <i>E. coli</i> )	1.5 ul
Lane 10 : -	-

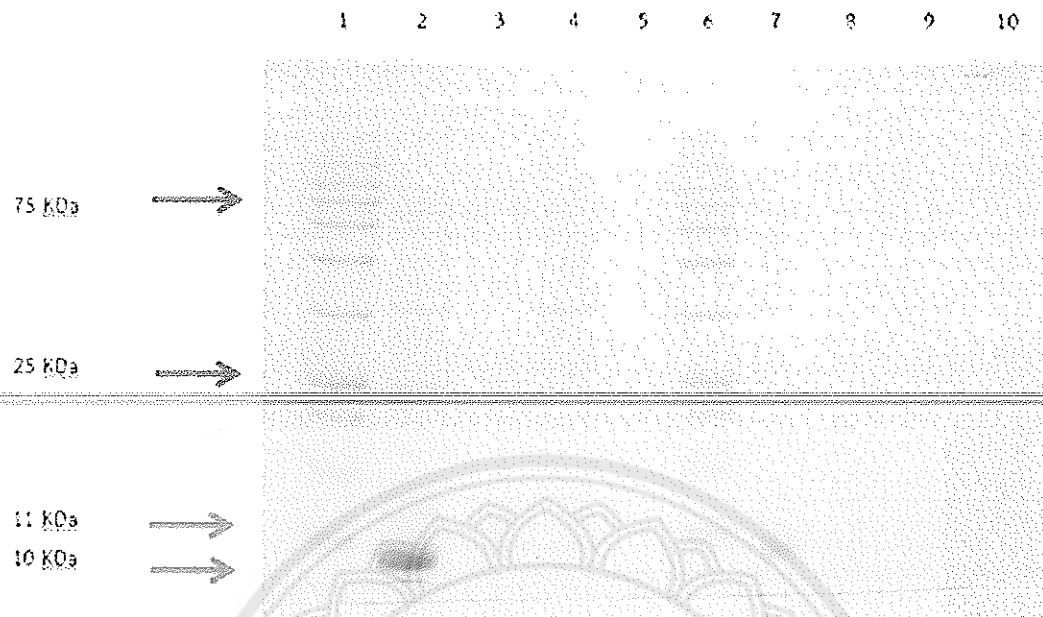


Figure 4.9: protein profile separated on SDS-PAGE as method 3

Note: Lane 1 : Marker (Protein ladder 10 kDa)	5 ul	heat : 12 min
Lane 2 : Cryptogein Pellet	3 ul	120 V
Lane 3 : Cryptogein supernatant	3 ul	time : 1:20 hr
Lane 4 : Control ( <i>E. coli</i> )	3 ul	
Lane 5 : -	-	
Lane 6 : Marker (Protein ladder 10 kDa)	5 ul	
Lane 7 : Cryptogein Pellet	1 ul	
Lane 8 : Cryptogein Supernatant	1 ul	
Lane 9 : Control ( <i>E. coli</i> )	1 ul	
Lane 10 : -	-	

## 4.2 Production of the beta-cryptogein gene for *Pichia pastoris* (yeast)

### 4.2.1 Original gene sequence

The beta-cryptogein which is a sterol scavenging protein produced from the phytopathogenic pseudo-fungus *P. cryptogea* (Boissy et al., 1996; Ricci et al., 1989 ; Mikes et al., 1997) The gene (accession number X83001.1) encodes a 297 bp nucleotide sequence (Figure 4.10) as presented in the report of (O'Donohue., 1995). This gene encoded codon that was able to translate 98 amino acids (Figure 4.11) with molecular weight 10 kDa and formed to protein containing a hydrophobic pocket with three disulfide bridges (Amelot et al., 2011)

>X83001.1 Artificial sequence gene of beta-cryptogein

5' **ATG**GTAGCGGCCGCAACCATGGCTTGCCTGCTACTCAGCAGACTGCTGCTTACAAGACTTTGGTTTCTAT  
CTTGTCTGACGCGTCTTTCAACCAGTGCTCTACTGACTCTGGTTACTCTATGTTGACTGCCAAGGCCTTGCCA  
ACTACTGCTCAGTACAAGTTGATGTGCGCTTCTACTGCATGCAACACTATGATCAAGAAGATCGTTATTTGAA  
CCCACCAAAGTGCAGCTTGACCGTTCCAACCTCCGGATTGGTTTTGAACGTTTACTCTTACGCTAACGGATTTC  
TCTAACAAGTGCTCTTCCTTGCTAGCTAGCTGCAGGT**TAG**3'

**Figure 4.10** The 297 nucleotide sequence of the beta-cryptogein gene (X83001:1)

Note: Sequence was taken from NCBI (O'Donohue et al., 1995). The start codon was highlighted in green, and stop codon in red.

MACTATQQTAAAYKTLVSLSDASFNQCSTDSGYSMILTAKALPTTAQYKLMCASTACNTMIKKIVTLNPPNCDLTV  
PTSGLVLNVYSYANGFSNKCSSL

**Figure 4.11** The 98 amino acid sequences of the beta-cryptogein gene as taken from NCBI (O'Donohue et al., 1995)

#### 4.2.2 Modified sequence of the pPICZ $\alpha$ A carrying beta-cryptogein

The sequence of beta-cryptogein was predicted from NCBI gene bank. The nucleotides of beta-cryptogein gene sequence are modified and after confirmation, it was inserted into pPICZ $\alpha$ A (Figure 4.12) through cloning with 6 nucleotide sequences recognizing the size of *Eco*RI and *Xba*I added at the 5' and 3' end of the gene, respectively.

```
5'GAATTCATGGCTTGACTGCTACTCAGCAGACTGCTGCTTACAAGACCTTGGTTTCTATCTTGTCCGACGC
CTCCTTCAACCAAGTGTCTACTGATTCTGGTTACTCCATGTTGACCGCTAAGGCTTTGCCAACTACTGCCCAG
TACAAGTTGATGTGTGCTTCCACTGCTTGCAACACCATGATCAAGAAGATCGTCACTCTGAACCCACCAAAC
TGC GACTTGACTGTTCCAAC TTCCGGTTTGGTCTTGAACGTTTACTCCTACGCTAACGGTTTCTCCAACAAGT
GCTCATCCTTGTAATCTAGA3'
```

**Figure 4.12** Modified sequence of the beta-cryptogein gene from NCBI (O'Donohue et al., 1995) with 6 nucleotide of *Eco*RI and *Xba*I which were highlighted in red, added at the 5' and 3' end of the gene, respectively.

As the wobble hypothesis that the standard base pairs (between codon of mRNA and anticodon of tRNA) may be rather strict in the first and the second than the third positions of the triplet mRNA codon (Crick, & Francis, 1966). This was called degenerated codons meaning some tRNA molecules can recognize more than one codon with different nucleotides at the third position of mRNA codon, and it can be encoded the same protein (Alberts et al., 2008). The degenerated codons were preferred for different expression in each organism (Fath et al., 2011).

In present study, the triplet mRNA codons of the original *crypt*-gene (297bp) was modified bases at the third position of each codon by using GeneArt™ and Gene Optimizer™ software to maximize expression of synthetic genes in *P. pastoris* system (developed by Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 2009). Nucleotide sequences between modified and original sequence of the *crypt*-gene were compared by using the CLUSTAL online program (European Molecular Biology Laboratory (EMBL), UK). As shown in Figure 4.13, the result revealed that some codons were modified base types, which were base substitution at the third position of mRNA codon of the *crypt* gene. In this case, this software enabled to optimize and modify codons for maximum gene expression, and it was able to deal with a large number of sequence-related multi parameters involved in different aspects of protein expression in yeast cell such as codon usage, ribosomal entry sites, RNA instability motifs, secondary structure formations (Higgins, & Cregg, 1998; Fath et al., 2011).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment		
Original	-----ATGGCTTGCACTGCTACTCAGCAGACTGCTGCTTACAAGACTTGGTTTCTATC	54
Modified	GAATTCATGGCTTGCTACTGCTACTCAGCAGACTGCTGCTTACAAGACTTGGTTTCTATC	60
	*****	
Original	TTGCTGACGCGCTTTCAACCAGTGCTCTACTGACTCTGGT TACTCTATGTTGACTGCC	114
Modified	TTGTCCGACGCTCTTTCAACCAGTGTTCTACTGATTCTGGT TACTCCATGTTGACCGCT	120
	*****	
Original	AAGGCTTGCCAACTACTGCTCAGTACAAGTTGATGTCGCTTCTACTGCATGCAACACT	174
Modified	AAGGCTTGCCAACTACTGCCAGTACAAGTTGATGTCGCTTCCACTGCTTGCAACACC	180
	*****	
Original	ATGATCAAGAAGATCGTTACTTTGAACCCACCAAACCTGCGACTTGACCGTTCCAACCTCC	234
Modified	ATGATCAAGAAGATCGTCACTCTGAACCCACCAAACCTGCGACTTGACTGTTCCAACCTCC	240
	*****	
Original	GGATTGGTTTTGAACGTTTACTCTTACGCTAACGGATTCTTAAACAGTGCTCTTCCTTG	294
Modified	GGTTTGGTCTTGAACGTTTACTCTACGCTAACGGTTTCTCCAACAGTGCTCATCCTTG	300
	**	
Original	TAG----- 297	
Modified	TAATCTAGA 309	
	**	

Figure 4.13 Comparison of original and modified nucleotide sequences of beta-cryptogin using multiple sequence alignment (CLUSTAL)

Note: The sequence reads and were compare the original gene with modified gene sequence by using the CLUSTAL online program (European Molecular Biology Laboratory (EMBL UK). The start (\*) indicates nucleotide similarity.

Original amino-acid sequences of beta-cryptogein were compared with modified sequences using multiple sequence alignment of (CLUSTAL). The results of the analysis showed that in Figure 4.14 all amino acid sequences of modified nucleotide within *crypt* gene were 100% homologs original *crypt* gene sequence.

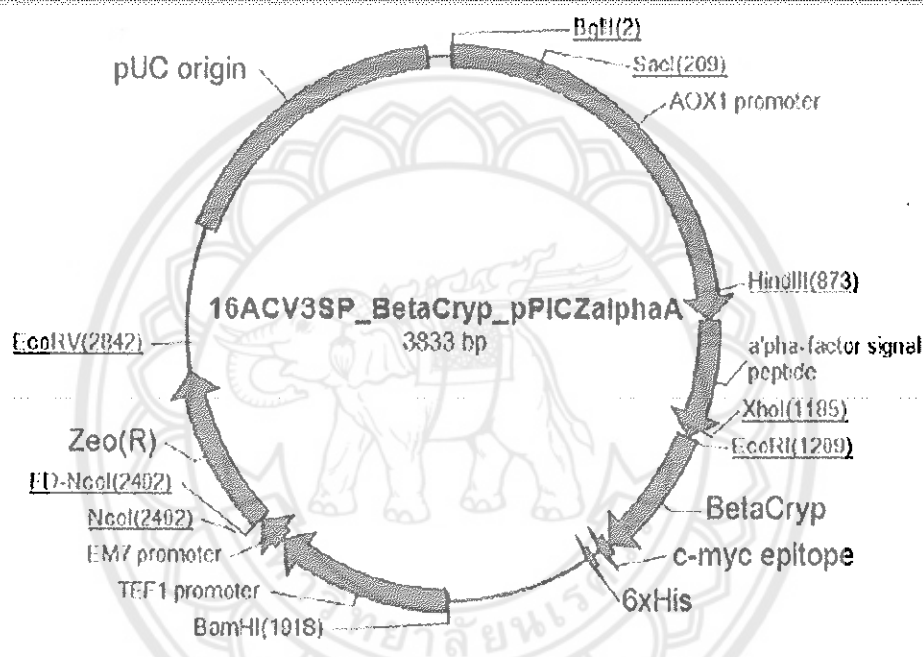
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment		
Original	MACTATQQTAAVKTLVSI LSDASFHQ CSTDSGYSHLTAKALPTTAQYKLHCAS TACHTHI	60
Modified	MACTATQQTAAVKTLVSI LSDASFHQ CSTDSGYSHLTAKALPTTAQYKLHCAS TACHTHI	60
*****		
Original	KKIVTLNPPHCDLTVPTSGVLNVYSYANGFSHKCSSL	98
Modified	KKIVTLNPPHCDLTVPTSGVLNVYSYANGFSHKCSSL	98
*****		

Figure 4.14 Comparison of 98 original and modified amino acids of beta-cryptogein using multiple sequence alignment (CLUSTAL)

Note: The sequence reads and were compared the original and modified amino acid sequences by using the CLUSTAL online program (European Molecular Biology Laboratory (EMBL UK). The start (\*) indicates nucleotide similarity.

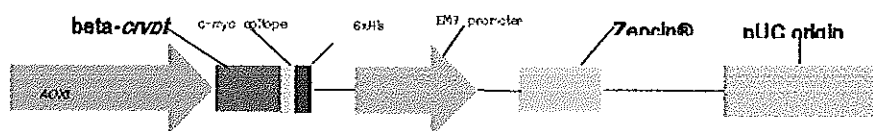
#### 4.2.3 Construction of pPICZ $\alpha$ vector

The synthetic gene beta-cryptogein was assembled from synthetic oligonucleotides and the fragment was inserted into pPICZ $\alpha$  (Figure 4.15; Figure 4.16). The pPICZ $\alpha$  contains the AOX1 promoter for tightly regulated and its site allows over-expression of the recombinant gene when placed behind the alcohol oxidase gene promoter with (Higgins, & Cregg, 1998). This plasmid confers Zeocin™ resistance as a selective marker and a c-terminal peptide containing the c-myc epitope and a polyhistidine (6xHis) tag for detection and purification of a recombinant protein inserted into MCS (Arnau et al., 2006). The pPICZ $\alpha$  vector was used for inducible protein expression in the yeast *P. pastoris*.



**Figure 4.15** The map of a pPICZ $\alpha$  vector carrying beta-cryptogein gene

*Note:* A picture of the pPICZ $\alpha$  plasmid showing its important features including, the  $\alpha$ -factor signal sequence for extracellular expression, 5'AOX1 promote methanol induced high level expression of recombinant protein, and the gene that confers Zeocin™ resistance.



**Figure 4.16** Physical map of the linearized pPICZ $\alpha$ -crypt plasmid (3833bp)

*Note:* AOX1 promoter region (position at 1-803); beta-cryptogein (position at 941-1270); c-myc epitope (position at 1270-1299); 6xHis (position at 1299-1316); EM7 promoter (position at 2074-2241); Zeocin® (position at 2241-2619); and pUC origin (position at 3160-3833).

#### 4.2.4 Evaluation of plasmid forms by gel electrophoresis before transformation

Migration of linearized and circular pPICZ $\alpha$ A-*crypt* plasmids in 1% agarose gel after electrophoresis is presented in (Figure 4.17). Results showed that both plasmid forms migrated differently on the gel indicating that the circular plasmid (corresponding to 3833bp) appeared to be slightly faster than the linearized plasmid indicating that even the same amount of nucleotides was inserted into the same plasmid DNA but in different forms, variation in sizes can be observed. This conforms to the findings of (Ang et al., 2016), stating that the circular pBR322 plasmid was found to have lower molecular weight compared to the linearized pBR322 plasmid after digestion by hydrogen peroxide. The DNA plasmid conformation with the same molecule weight is influenced on its electrophoretic mobility in the agarose gel. Since the circular plasmid form was reduced the size with less space by compacting which cause to be less frictional resistance from the gel, resulting in the migration of this plasmid conformation was able to be faster than other conformations (Cebrian et al., 2015).

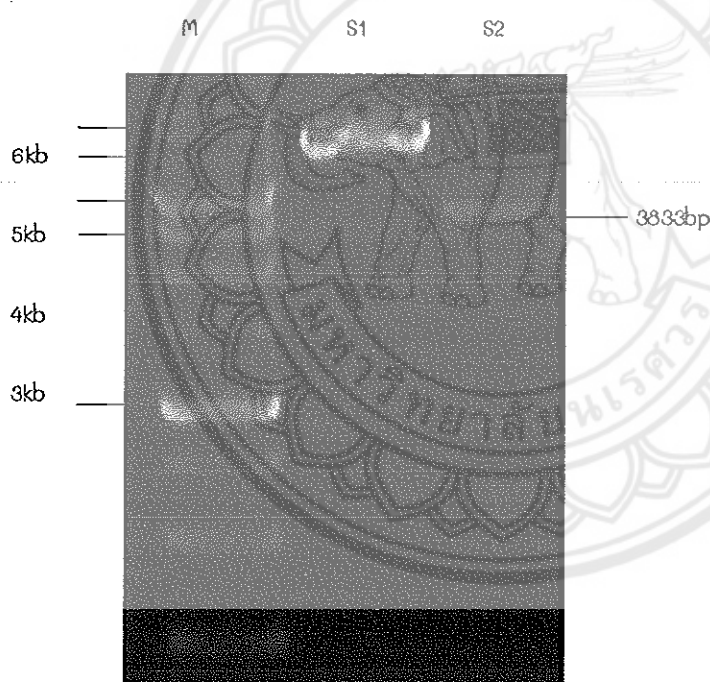


Figure 4.17 Migration of linearized (S1) and circular (S2) pPICZ $\alpha$ A-*crypt* plasmid (corresponding to 3833bp) on 1% agarose gel electrophoresis assay

Note: Lane M represents 1kb DNA RTU Ladder (GeneDireX, USA).

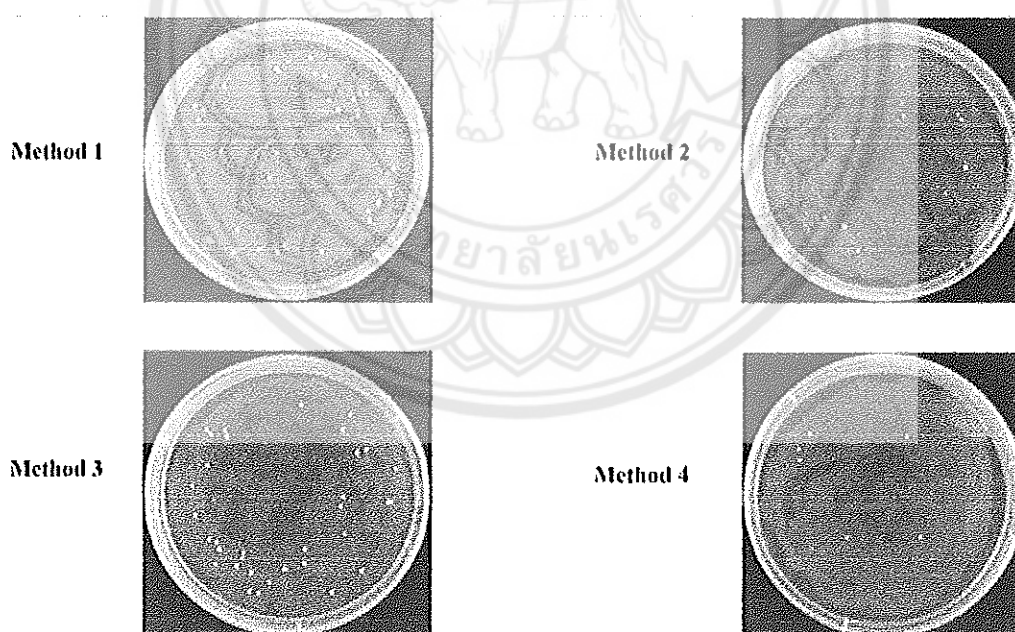
#### 4.2.5 Comparison of transformation methods

Transformation efficiency of four different transformation methods (M) indicating the combination of two plasmid forms (linearized and circular) of pPICZ $\alpha$ A-*crypt* and two electric pulses (1.5 and 2.0 kV) is presented in (Figure 4.18; Figure 4.19). Results revealed that linearized plasmid digested with *SacI* gave the higher number of transformed colonies with an average of



29.25 and 30.00 colonies/plate by 1.5 and 2.0 KV, respectively compared to the circular plasmid which yield an average of 8.13 and 7.63 colonies/plate when treated with 1.5 KV and 2.0 KV, respectively, thus indicating that linearized plasmid is more efficient in transformation than circular plasmid by either of the two electric pulses. Statistical analysis also showed significant differences in the transformation efficiency produced by the two forms of plasmid but showed no significant differences in the treatment of electric pulses at p-value 0.01 (Table 4.3). These results suggest that linearized plasmid could strongly enhance transformation efficiency in yeast by approximately 3.7 folds compared to the circular plasmid.

These findings conform to previous reports like the one which revealed that the linearized pUT37 plasmid was found to have highly increased transformation frequency up to 2-3 folds as compared to its associated circular plasmid. Similar findings were found in linearized pDHG25 plasmid digested with *Bam*H1 which generated higher transformed colonies than its circular plasmid (Bessa et al., 2012) also reported that the linearized plasmid p416-GPD digested by *Eco*RI was found to increase the stability of transformation efficiencies in *S. cerevisiae* as compared to its related circular plasmid. Furthermore Schifferdecker et al. (2016), reported that the linearized p892 plasmid with *Hind*III yielded higher average number of transformants as compared with the circular p892 plasmid which did not yield any transformants.



**Figure 4.18** Comparison of successfully transformed colonies of *P. pastoris* among four different electroporated transformation methods

*Note:* After transformation, transformed yeast cells were cultured on selective YPD medium supplemented with Zeocin<sup>TM</sup> at 30°C for three days. Each method has been done with eight biological replications, and only one representative per method has been depicted in this Figure.

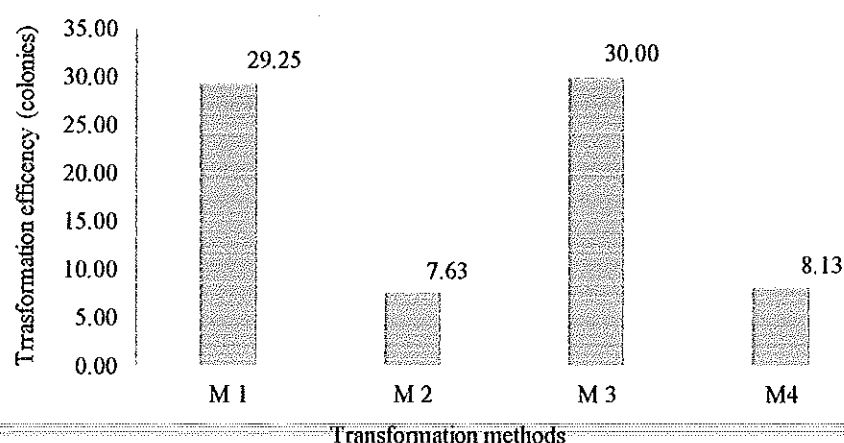


Figure 4.19 Transformation efficiency of *P. pastoris* in four different electroporated transformation methods

*Note:* After transformation, the transformed yeast cells were cultured on selective YPD medium supplemented with Zeocin<sup>TM</sup> at 30°C for three days. Transformation efficiency was determined by the average number of single colonies in the plate. M1, M2, M3, and M4 represent Method 1 (Linearized + 1.5 KV), Method 2 (Circular + 1.5 KV), Method 3 (Linearized + 2.0 KV) and Method 4 (Circular + 2.0 KV), respectively. Data presented are means of 8 replicates. Error bars represent standard error.

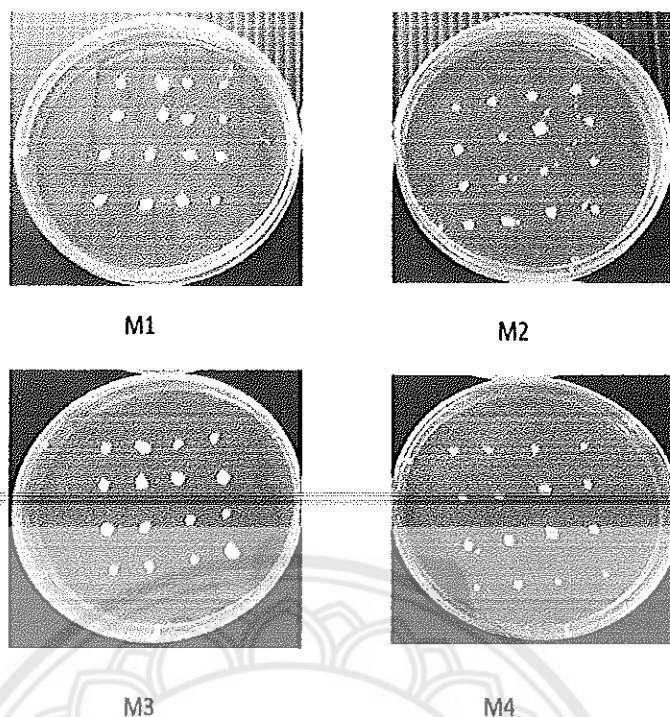
Table 4.3 Statistical analysis on the transformation efficiency of *P. pastoris* in four different electroporated transformation methods

Transformation method	Transformation efficiency
Linearized + 1.5 KV (M1)	29.25 ± 2.11a
Circular + 1.5 KV (M2)	7.63 ± 0.80b
Linearized + 2.0 KV (M3)	30.00 ± 2.05a
Circular + 2.0 KV (M4)	8.13 ± 0.85b

Note: Means with the same letters are not significantly different. Data shown is analyzed using Tukey HSD test relative to P-value < 0.01.

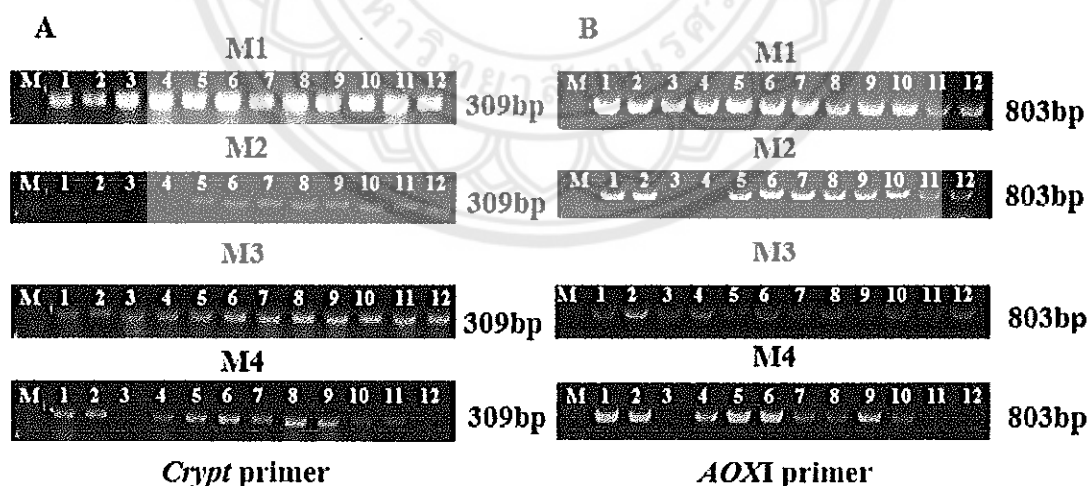
#### 4.2.6 Confirmation of successfully transformed colony using PCR

Twelve single-yeast colonies was randomly selected YPD plate from master plates (Figure 4.20) and was subjected for DNA extraction using the LiOAc DNA extraction method (Looke et al., 2011). DNAs were used as templates for PCR to confirm the success of transformation method. Results showed that all selected yeast transformants from linearized plasmid as treated with either of the two electric pulses positively carried the *crypt*-gene. Meanwhile, only 10 out of the 12 transformants from the circular plasmid either of the two electric pulses carried the inserted *crypt*-gene (Figure 4.21). In this case, the linearized pPICZαA-*crypt* plasmid with *SacI* (located at the unique 5'AOXI region) have increased transformation efficiency because it might directly transfer into yeast competent cell and its homologous sites (5'AOXI region), linked to *SacI* cleave site, were able to enhance opportunity of synapsis and recombination with the yeast chromosome.



**Figure 4.20** Picture of transformed *P. pastoris* with pPICZαA-*crypt* plasmid picked up on master YPD plates with Zeocin™

*Note:* M1, M2, M3, and M4 represent Method 1 (Linearized + 1.5 KV), Method 2 (Circular + 1.5 KV), Method 3 (Linearized + 2.0 KV) and Method 4 (Circular + 2.0 KV (M3), respectively.



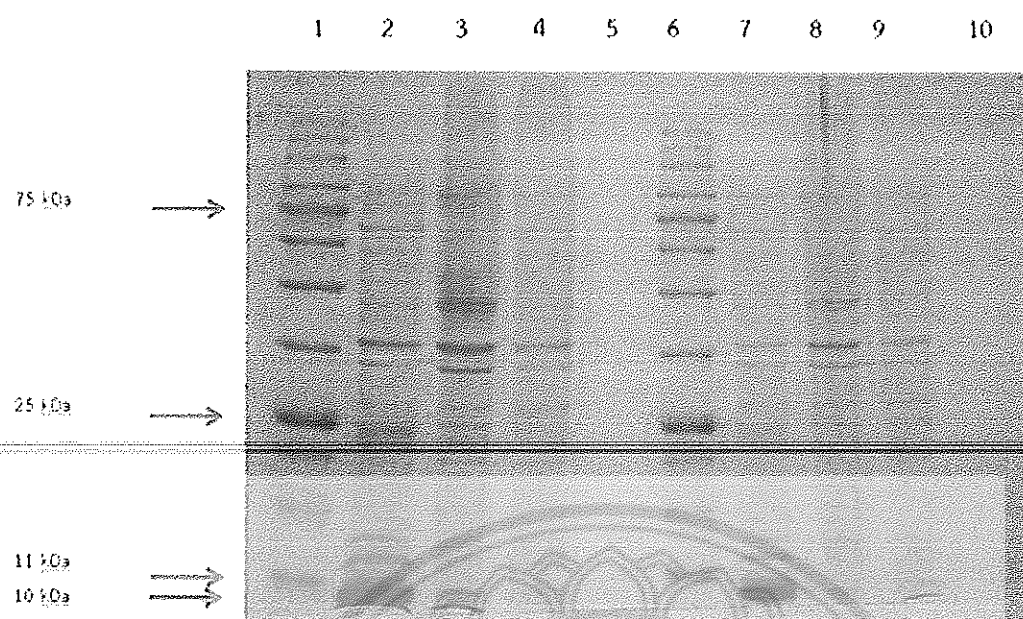
**Figure 4.21** Confirmation of successfully transformed colony using PCR and detected through gel electrophoresis

*Note:* Migration of PCR products on 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. DNA templates for PCR amplification were randomly selected from 12 transformed single colonies to confirm the success of gene insertion. Primers used were *crypt* gene specific primer, corresponding to 309 bp (A) and AOXI primer corresponding to 803 bp (B).

#### 4.2.7 Small scale of beta- crypt in *Pichia pastoris*

After successful transformation, single colonies were selected for test inductions of positive beta-crypt through PCR. Cultured cells were inoculated in BMGY to generate biomass for induction. The cells from the BMGY culture were then transferred into BMMY media for induction with methanol. Samples were collected after 24 hours and 0.5% methanol was added to the culture every 24 hours for 7 days post induction as it is an established fact that in the presence of methanol media the AOX1 production increases three to five percent. However, the addition of methanol did not produced any good results it was probably due to unchecked free methanol and oxygen concentration whose levels could only be checked in a fermenter. Cultured cells were collected at different times post induction and beta-cryptogein protein expression is analyzed by SDS PAGE in each time post. Results showed no detection of beta-crypt protein expression (corresponding to the size of approximately 10kDa) in all the test samples (Figure 4.22).

The presence of beta-cryptogein was checked in both supernatant and pellet but was not detected probably due to very low concentration levels or it could also be due to the reason that we don't have a good sophisticated technique for the determining the protein. Moreover, in *P. pastoris* the protein expression is a complex process due to the fact that *P. pastoris* is a eukaryotic organism which makes the protein expression more difficult as compared with *E. coli*. Even for those proteins that are produced at a level of >1g/l in *P. pastoris* the starting shake flask levels are poorly low i.e. <1 mg/l (Fernandez, & Hoeffler, 1998). However, various optimal conditions such as culture temperature, air circulation, methanol-inducer concentration and methanol-feeding strategy for recombinant protein technology should also be considered for further experiments to gain higher expression level of beta-cryptogein protein in *P. pastoris*.



**Figure 4.22** SDS-PAGE analysis of supernatant culture from *P. pastoris* fermentation during the growth time in the absence or presence of beta-cryptogein

**Note:** Lane 1 and 6 represents Spectra Multicolor Broad Range Protein ladder (Thermo Fisher, Lithuania); lane 2, and represent the samples of pellet culture of transformed yeast; and lane 3, 4, 8, and 9 represent the samples of supernatant culture of transformed yeast.

#### 4.3 ผลการศึกษาโรคพรมมิและการพิสูจน์การเกิดโรค

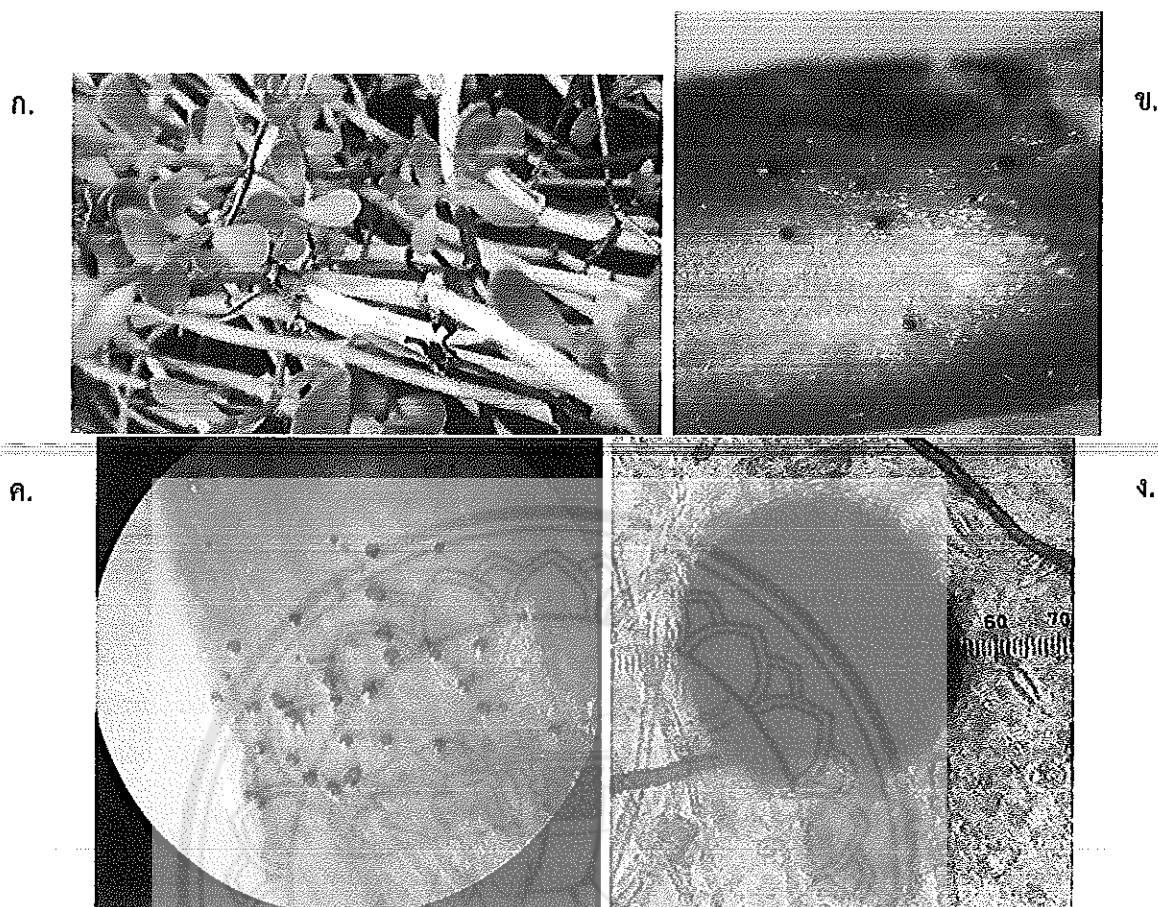
ผลการศึกษาโรคที่เข้าทำลายใบและต้นพรมมิ ในแปลงวิจัยคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ในเดือนมิถุนายนจนถึงเดือนตุลาคม พ.ศ.2560 พบว่า

##### ก. โรคลำต้นไหม้และใบจุดพรมมิ

ต้นพรมมิแสดงลักษณะอาการลำต้นไหม้ อาการระยะแรกลำต้นมีแผลยุบตัวมีสีส้มถึงน้ำตาลขนาดเล็ก ต่อมาแผลได้ขยายบริเวณไปตามรอบลำต้นและมีรอยแผลขนาดใหญ่จนเป็นสีน้ำตาลเข้มลำต้นมีลักษณะคอดเข้าหากันจนเนื้อเยื่อบริเวณลำต้นเล็กแห้งคล้ายเส้นด้ายสีดำ (ภาพที่ 4.23ก) การเข้าทำลายใบพบอาการใบจุด มีลักษณะเป็นจุดแผลเล็กสีน้ำตาล แผลยุบตัวขอบเขตแผลไม่แน่นอน เนื้อใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม เนื้อใบแห้งและยุบตัวลง เมื่ออาการลุกลามไปทั่วทั้งใบ ใบจะเหี่ยวแห้งเป็นสีดำและร่วงหลุดไป (ภาพที่ 4.23ก) เมื่อนำลำต้นและใบพรมมิที่แสดงอาการใบไหม้มาบ่มในสภาพที่มีความชื้นสูง พบการสร้างส่วนขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Fruiting body) เรียกว่า Pycnidium เป็นตุ่มนูนสีดำบนบาดแผล (ภาพที่ 4.23ข-ค) เมื่อนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound Microscope พบว่ามีโครงสร้างสปอร์เซลล์เดี่ยว สีใส ไหลออกเป็นเส้นสายออกมาจาก Pycnidium (ภาพที่ 4.23ง) จำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพบว่า เป็นเชื้อรา *Phoma* sp. (ภาพที่ 4.24) นำเชื้อรา *Phoma* sp. นำมาปลูกทดสอบบนลำต้นและใบพรมมิ ภายใต้สภาพโรงเรือน พบว่าลำต้นเริ่มแสดงแผลไหม้บนลำต้นภายหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายคลึงกับอาการที่พบจากการเข้าทำลายตามธรรมชาติ และเมื่อเชื้อเจริญรอบลำต้นส่วนของลำต้นที่ถูกทำลายจะเปลี่ยนเป็นสีดำแผลขยายไปตามความยาวของลำต้น เนื้อเยื่อบริเวณลำต้นเน่าและหลุดออกเหลือแต่แกนคล้ายเส้นด้าย

##### ข. โรคแอนแทรคโนสพรมมิ

โรคแอนแทรคโนสพรมมิ พบการเข้าทำลายใบ ลักษณะอาการระยะแรกเกิดแผลจุดชำรุดน้ำ และแผลจะค่อยๆ พัฒนามีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 4.25ก) นำเนื้อเยื่อที่แสดงอาการมาแยกเชื้อบริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA พบการสร้างเส้นใยสีขาวและมีเมือก gelatinous matrix เป็นกลุ่มสีดำ เมื่อนำมาตรวจชนิดของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound Microscope พบการสร้างสปอร์มีสี รูปปร่างยาวรี (oblong shape) ภายใน fruiting body ชนิด Acervulus สร้าง setae สีดำ ซึ่งจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Colletotrichum* sp. (ภาพที่ 4.25ข) เมื่อนำลำต้นพรมมิที่แสดงอาการแผลไม่ยุบตัวลงมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง พบการสร้าง fruiting body ชนิด Acervulus สร้าง setae สีดำ ได้ชัดเจน (ภาพที่ 4.25ข) นำเชื้อรา *Colletotrichum* sp. นำมาปลูกทดสอบบนใบพรมมิ ภายใต้สภาพโรงเรือน พบว่าใบพรมมิเริ่มแสดงแผลชำรุดน้ำบนลำต้นภายหลังการปลูกเชื้อ 14 วัน เชื้อมีการพัฒนาอย่างช้าๆ เมื่ออาการโรครุนแรงใบพรมมิจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำและยุบตัวแห้งตาย



ภาพที่ 4.23 อาการโรคลำต้นไหม้และใบไหม้ของพรมมิเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Phoma* sp.

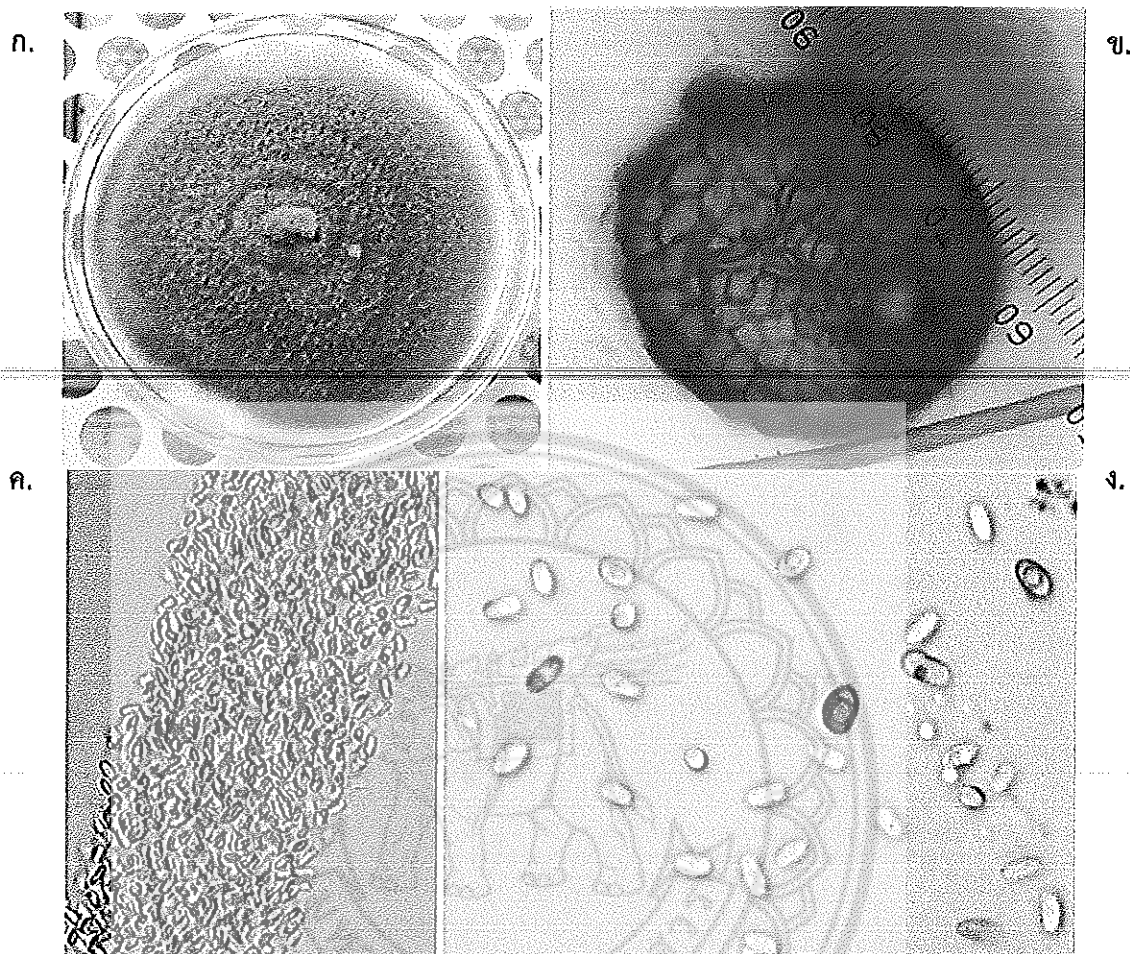
ก. ผลยวบตัวบนลำต้น

ข. Fruiting body ของเชื้อรา *Phoma* sp. บนลำต้นบนพรมมิ

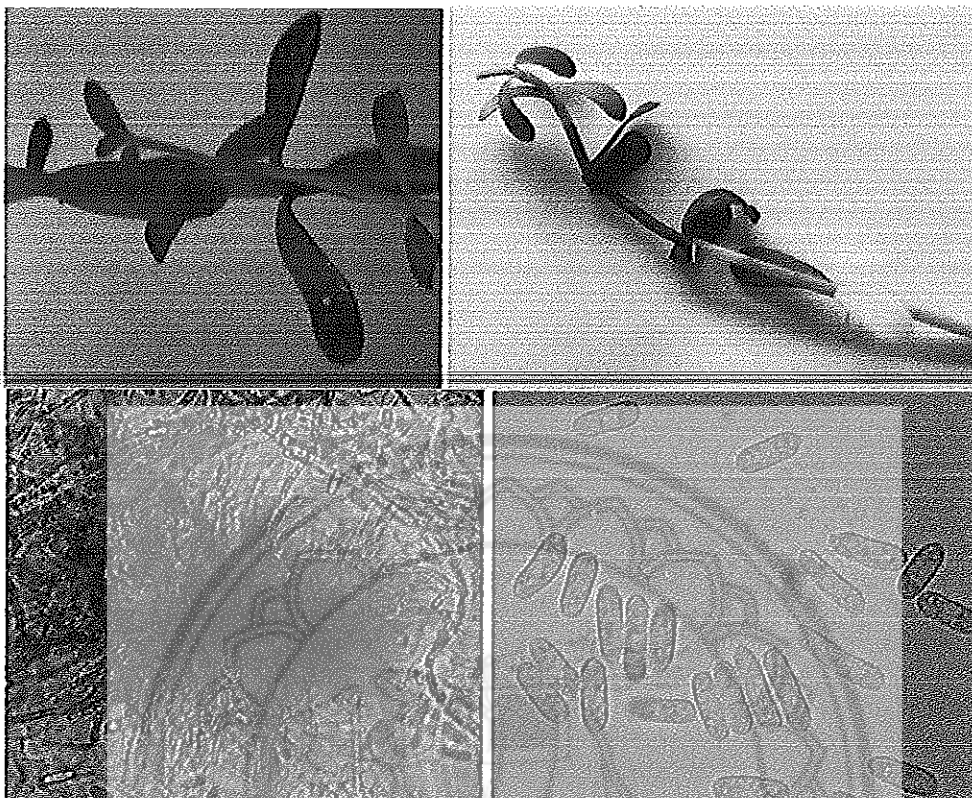
ค. Fruiting body ของเชื้อรา *Phoma* sp. บนใบบนพรมมิ

ง. Fruiting body ชนิด Pycnidium ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ชนิด Compound Microscope





ภาพที่ 4.24 เชื้อรา *Phoma* sp. สาเหตุโรคลำต้นและใบไหม้พรมมิ  
 ก. ลักษณะโคโรนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ  
 ข. Fruiting body ของเชื้อรา *Phoma* sp. ที่กำลังขยาย 40 เท่า  
 ค. และ ง. สปอร์ของเชื้อรา *Phoma* sp. ที่กำลังขยาย 40 เท่า



ก.

ข.

ภาพที่ 4.25 โรคแอนแทรคโนสพรมมิ เชื้อราสาเหตุ *Colletotrichum* sp.

ก. อาการบนใบพรมมิ

ข. Fruiting body ชนิด Acervulus และสปอร์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

#### 4.4 ผลการศึกษาสาร beta-cryptogein protein กับความต้านทานโรคพรมมิ

ต้นพรมมิทดสอบกรรมวิธีที่ได้รับการฉีดพ่นสาร beta-cryptogein protein ที่มีความเข้มข้น 100 300 และ 500 ppm. ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมต้นพรมมิได้รับการฉีดพ่นน้ำ ทุกกรรมวิธีฉีดพ่นจำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 48 ชั่วโมง กรรมวิธีละ 5 กระถาง กระถางละ 4 ต้น ภายหลังจากการฉีดพ่นต้นพรมมิทุกกรรมวิธีเป็นระยะเวลา 10 วัน ทำการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. บนใบพรมมิจำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 วิธีการทำแผลโดยการตัดปลายใบ ใช้กรรไกรปราศจากเชื้อจุ่มในสารละลายของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่ความเข้มข้น  $9.0 \times 10^8$  สปอร์/มิลลิลิตร คลุมต้นพรมมิด้วยถุงพลาสติกให้มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปิดถุง 12 ชั่วโมง และทำการปลูกเชื้อครั้งที่ 2 วิธีการฉีดพ่นสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่ความเข้มข้น  $1.72 \times 10^8$  สปอร์/มิลลิลิตร คลุมต้นพรมมิด้วยถุงพลาสติกให้มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง คลุมต้นพรมมิด้วยถุงพลาสติกให้มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปิดถุง 12 ชั่วโมงและตรวจผลการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคภายหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าการฉีดพ่นสาร beta-cryptogein protein ที่ความเข้มข้น 500 ppm. มีค่าร้อยละการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนต้นพรมมิคิดเป็นร้อยละ 10.93 ของการเกิดโรคทั้งต้น หรือมีร้อยละการเกิดโรคมากกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบฉีดพ่นน้ำและกรรมวิธีฉีดพ่นสาร beta-cryptogein protein ที่ความเข้มข้น 100 และ 300 ppm. คิดเป็นร้อยละ 10.93 7.51 และ 5.16 ของการเกิดโรคทั้งต้น ตามลำดับ และการเกิดโรคแอนแทรกโนสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับการประเมินความรุนแรงของโรคด้วยสายตาพบว่ากรรมวิธีฉีดพ่นสาร beta-cryptogein protein ที่ความเข้มข้น 100 300 และ 500 ppm. โรคแอนแทรกโนสบนใบพรมมิมีความรุนแรงคิดเป็นร้อยละ 49.50 49.30 และ 65.50 ของพื้นที่ใบทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งความรุนแรงของโรคแอนแทรกโนสไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมฉีดพ่นน้ำกับทุกกรรมวิธีที่ฉีดพ่นสาร beta-cryptogein protein พบว่าต้นพรมมิที่ผ่านการฉีดพ่นสาร beta-cryptogein protein มีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Colletotrichum* sp. และมีความรุนแรงโรคมากกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบฉีดพ่นน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 การฉีดพ่นสาร beta-cryptogein protein บนต้นพรมมิกับการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคแอนแทรกโนส

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนใบที่เกิดโรคต่อจำนวนใบทั้งหมด <sup>1/</sup>	ค่าเฉลี่ยร้อยละของความรุนแรงของโรคบนใบ <sup>2/</sup>
สาร beta-cryptogein protein ความเข้มข้น 100ppm.	3.42 <sup>ab</sup>	49.50 <sup>b</sup>
สาร beta-cryptogein protein ความเข้มข้น 300ppm.	5.77 <sup>ab</sup>	49.30 <sup>b</sup>
สาร beta-cryptogein protein ความเข้มข้น 500ppm.	10.93 <sup>b</sup>	65.50 <sup>b</sup>
กรรมวิธีเปรียบเทียบ น้ำ ความเข้มข้น 0ppm.	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>

หมายเหตุ <sup>1/2/</sup> อักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test

#### 4.5 Effect of cryptogein elicitation on expression pattern of *BmA*ACT and *BmOSC* genes

The previous section (4.4) shown that treated elicitor concentration (500ppm) strongly affected on severe acute pathogen on brahmi seedling. In this section, the expression pattern of *BmA*ACT and *BmOSC* genes, involved in the early and later phase of triterpenoid saponin biosynthesis respectively in brahmi, was further investigated at 8 time points within a 3 day periods after 500ppm elicitor treated one-month-old seedling of brahmi, compare to a mock solution used as a control. At all-time points, whole plant was sampled from three biological replicates, and 100mg of individual plant was randomly sampled for total RNA extraction. The result found that both *BmA*ACT and *BmOSC* gene was not significantly up-regulated at all time points of post elicitor-treated brahmi (Table 4.4). This indicated that the beta-crytogen elicitor might be not affected on change of both *BmA*ACT and *BmOSC* gene of post elicitor-treated brahmi.

**Table 4.4 :** Expression of genes (*ATTCT* and *OSC ATTCT*) of post elicitor-treated brahmi at different time course

Time course (hours)	Untreated MeJA	Gene expression (fold) compared to untreated MeJA	
		<i>AACT</i>	<i>OSC</i>
0	1	1.21±0.40 <sup>ns</sup>	1.15±0.23 <sup>ns</sup>
1	1	1.81±0.42 <sup>ns</sup>	1.10±0.24 <sup>ns</sup>
4	1	1.52±0.08 <sup>ns</sup>	1.91±0.17 <sup>ns</sup>
8	1	1.57±0.14 <sup>ns</sup>	1.11±0.349 <sup>ns</sup>
12	1	1.03±0.184 <sup>ns</sup>	1.96±0.42 <sup>ns</sup>
24	1	1.13±0.215 <sup>ns</sup>	1.90±0.39 <sup>ns</sup>
48	1	1.20±0.14 <sup>ns</sup>	1.24±0.25 <sup>ns</sup>
72	1	1.27±0.15 <sup>ns</sup>	1.91±0.17 <sup>ns</sup>

Note: Values from qRT-PCR are expressed as means ± standard error of triplicate experiments.

Mean values with different letters (in same the gene) are significantly different at  $p < 0.01$ , analyzed by one-way ANOVA with Tukey's HSD (honestly significant difference) test using SPSS version 17.0 software program.

The gene expression levels of *BmA*ACT and *BmOSC* in mock solution treatment were set to 1, and their *BmA*ACT and *BmOSC* at different time points were accordingly calculated and presented as the relative fold changes, respectively.

All the reactions were normalized using *Bm18s-rRNA* gene

## บทที่ 5

### Conclusions and Recommendation

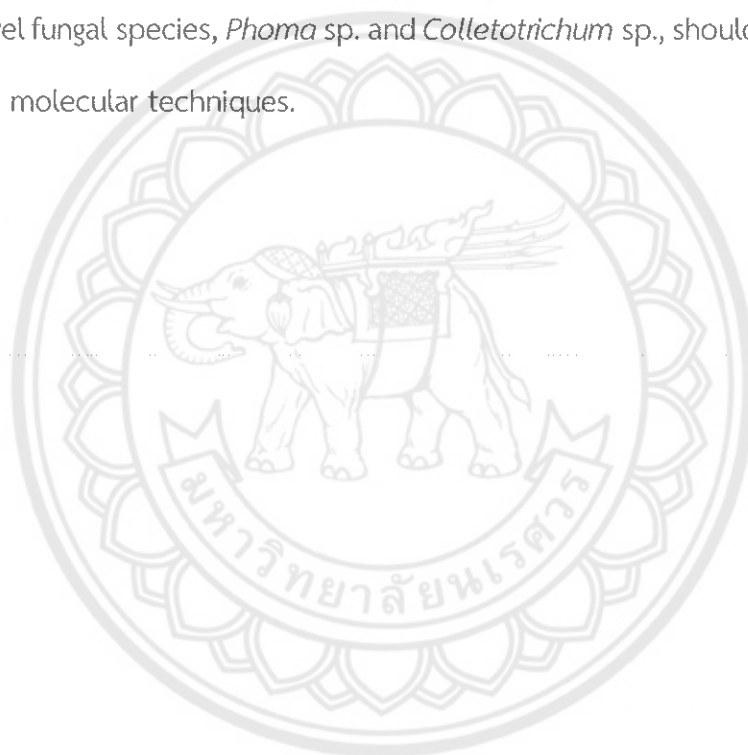
#### CONCLUSIONS

1. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต beta-cryptogein ใน *Escherichia coli* strain BL21 Star™ คือ การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25°C และใช้สารกระตุ้น D-glucose ความเข้มข้น 2% โดยพบปริมาณ beta-cryptogein ในส่วนของตะกอน มากกว่าส่วนใสของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวงลอย
2. Linearized plasmid is more efficient in producing successful pPICZ0A-crypt transormants than circular plasmids.
3. Either electric pulses either 1.5 KV or 2.0 KV can yield good results for transformation efficiency in *P. pastoris*.
4. The small scale of beta-cryptogein protein was examined by SDS PAGE assay, and it showed that both supernatant and pellet of yeast culture could not detected presence of this target protein.
5. พบเชื้อราชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดโรคในพรมมิ 2 เชื้อ คือ เชื้อรา *Phoma* sp. ทำให้เกิดอาการไหม้ที่ลำต้นของพรมมิ และ เชื้อรา *Colletotrichum* sp. ทำให้เกิดอาการแผลที่ใบ โดยแผลมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำและยุบตัวแห้งตาย
6. การฉีดพ่นสาร beta-cryptogein protein ทำให้ต้นกล้าพรมมิมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Colletotrichum* sp. และมีความรุนแรงโรคมกกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบฉีดพ่นน้ำ
7. that the beta-cryptogen elicitor might be not affected on change of both *BmAAC*T and *BmOSC* gene of post elicitor-treated brahmi.

## RECOMMENDATION

For this result, the further experiments should be recommended that:

1. various optimal conditions such as culture temperature, air, methanol-inducer concentration and methanol-feeding strategy for recombinant protein technology should also be considered for further experiments to gain higher expression level of beta-cryptogein protein in both *E. coli* and *P. pastoris*.
2. the novel fungal species, *Phoma* sp. and *Colletotrichum* sp., should be identified further by using SEM and molecular techniques.



## บทที่ 6

### References

- 1 Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *P. pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(12), 5301-5317.
- 2 Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis, J., Raff, M., & Roberts, K. (2008). Molecular cell biology (4<sup>th</sup> ed.). *New York and London: Garland Science*.
- 3 Amelot N, Carrouche A, Danoun S, Bourque S, Haiech J, Pugin A, Ranjeva R, Grima-Pettenati J, Mazars C, and Briere C (2011) Cryptogein, a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium dependent manner, *Plant Cell Environ*, 34:149–161.
- 4 Ang, R. P., Teoh, L. S, Chan, M. K., Miswan, N., & Khoo, B. Y. (2016). Comparing the expression of human DNA topoisomerase I in KM71H and X33 strains of *P. pastoris*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(3), 01-09.
- 8 Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., & Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification*, 48(1), 1-13.
- 6 Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24: 1-15.
- 7 Ashtamker C, Kiss V, Sagi M, Davydov O, and Fluhr R (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco bright yellow-2 Cells. *Plant Physiol*, 143:1817-1826.
- 8 Baldi A, Srivastava AK, and Bisaria VS (2009) Chapter 23 : Fungal Elicitors for Enhanced Production of Secondary Metabolites in Plant Cell Suspension Cultures (page 373-380) in *Symbiotic fungi, Principles and practice*. *Soil Biology*, 18 :430p.
- 9 Bessa, D., Pereira, F., Moreira, R., Johansson, B., & Queiros, O. (2012). Improved gap repair cloning in yeast: treatment of the gapped vector with *Taq* DNA polymerase avoids vector self-ligation. *Yeast*, 29(10), 419-423.
- 10 Blein, J. P. (2002). Involvement of lipid-protein complexes in plant-microorganism interactions. *Oleagineux Corps Gras Lipides*, 9(1), 31-36.
- 11 Boïssy G, O'Donohue M, Gaudemer O, Perez V, Pernollet JC, and Brunie S (1999) The 2.1 A structure of an elicitin-ergosterol complex: A recent addition to the Sterol Carrier Protein family. *Protein Sci*, 8: 1191-1199.
- 12 Bourque, S., Binet, M.N., Ponchet, M., Pugin, A., & Lebrun-Garcia, A. (1999). Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34699-34705.

- 13 Calmels, T., Parriche, M., Durand, H., & Tiraby, G. (1991). High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Current Genetics*, 20(4), 309-314.
- 14 Cebrian, J., Castan, A., Martínez, V., Kadomatsu-Hermosa, M. J., Parra, C., Fernández-Nestosa, M. J., et al. (2015). Direct evidence for the formation of precatenanes during DNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, 290(22), 13725-13735.
- 15 Celik, E., & Çalık, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1108-1118.
- 16 Chaudhuri K, Das S, Bandyopadhyay M, Zalar A, Kollmann A, Jha S, and Tepfer D (2009) Transgenic mimicry of pathogen attack stimulates growth and secondary metabolite accumulation. *Transgenic Res*, 18:121–134.
- 17 Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *P. pastoris*. *Molecular biotechnology*, 16(1), 23-52.
- 18 Cregg, J. M., Vedvick, T. S., & Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *P. pastoris*. *Nature Biotechnology*, 11(8), 905-910.
- 19 Crick, F. H. C. (1966). Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *Journal of Molecular Biology*, 19(2), 548-555.
- 20 DePalma, A. (2014, October 10). Electroporation and Competing Transfection Methods. Genetic engineering & Biotechnology News. Retrieved January 22, 2018 from <https://www.genengnews.com/gen-exclusives/electroporation-and-competing-transfection-methods/77900282>.
- 21 Dobes, P., Kmunicek, J., Mikes, V., & Damborsky, J. (2004). Binding of fatty acids to beta-cryptogein: quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutants. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 44(6), 2126-2132.
- 22 Dokladal, L., Oboril, M., Stejskal, K., Zdrahal, Z., Ptackova, N., Chaloupkova, R., et al. (2012). Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitin-induced resistance. *Journal of experimental botany*, 63(5), 2203-2215.
- 23 Edreva A (2004) A novel strategy for plant protection: Induced resistance. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 3:61-69.
- 24 Farkya S, Julka A, Mehra R, DattaV, Srivastava AK, Bisaria VS (2005) Enhanced production of secondary metabolites by biotic elicitors in plant cell suspension cultures. Presented at 5th Asia Pacific Biochemical Engineering Conference, May 15–19, 2005, Jeju Island, Korea.
- 25 Fath, S., Bauer, A. P., Liss, M., Spriestersbach, A., Maertens, B., Hahn, P., et al. (2011). Multi parameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. *Plos One*, 6(3), e17596.



- 26 Fernandez, J. M., & Hoeffler, J. P. (1998). Gene expression systems: using nature for the art of expression. Academic press: USA.
- 27 Ghosh S, Ghosh B, Jha S (2006) Aluminium chloride enhances colchicines production in root cultures of *Gloriosa superba*. *Biotechnol Lett* 28:497–503
- 28 Gozzo F (2003) Systemic resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J Agric Food Chem*, 51: 4487-4503.
- 29 Guo ZJ, Chen XJ, Wu XL, Ling JQ, Xu P (2004) Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP 1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol*, 55:607–618.
- 30 Higgins, D. R., & Cregg, J. M. (1998). Introduction to *P. pastoris*. *Pichia protocols, methods in Molecular Biology*, 103. Humana Press. USA.
- 31 Huet JC, Pernollet JC (1989) Amino acid sequence of cinnamomin, a new member of the elicitin family, and its comparison to cryptogein and capsicein. *FEBS Lett*, 257:302–306.
- 32 James, M.C., Ilya, T., Anasua, K., Jay, S., Knut, M., & Thomas. C. (2009). Expression in the yeast *P. pastoris*. Keck graguate Institute of Applied life sciences, Clarmont, California, USA. (Vol. 463)
- 33 Jin JH, Shin JH, Kim JH, Chung IS, Lee HJ (1999) Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in madder (*Rubia akane* Nakai) cell culture. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 4:300–4.
- 34 Kamkaew N, Scholfield CN, Ingkaninan K, Taepavarapruk N, and Chootip K (2013) *Bacopa monnieri* Increases Cerebral Blood Flow in Rat Independent of Blood Pressure. *Phytother. Res.*, 27: 135–138.
- 35 Kuc J (2001) Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur J Plant Pathol*, 107:7-12.
- 36 Lascombe, M. B., Ponchet, M., Venard, P., Milat, M. L., Blein, J. P., & Prange, T. (2002). The 1.45 Å resolution structure of the cryptogein–cholesterol complex: a close-up view of a sterol carrier protein (SCP) active site. *Acta Crystallographic Section D: Biological Crystallography*, 58(9), 1442-1447.
- 37 Lecourieux D, Ouaked F, Pugin A, and Lebrun-Garcia A (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact*, 13:821–829.
- 38 Lin-Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 45-66.
- 39 Lin-Cereghino, J., Wong, W. W., Giang, W., Luong, L. T., Vu, J., Johnson, S. D. (2005). Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *P. pastoris*. *Biotechniques*, 38(1), 44.
- 40 Looke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50(5), 325-328.

- 41 Lyon GD, Reglinski T, and Newton AC (1995) Novel disease control compounds: the potential to "immunize" plants against infection. *Plant Pathol*, 44:407-427.
- 42 Majumdar S, Garai S, and Jha S (2012) Use of the cryptogein gene to stimulate the accumulation of bacopa saponins in transgenic *Bacopa monnieri* plants. *Plant Cell Rep*, 31:1899-1909.
- 43 Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *P. pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249-270.
- 44 Majumdar, S., Garai, S., & Jha, S. (2012). Use of the cryptogein gene to stimulate the accumulation of bacopa saponins in transgenic *Bacopa monnieri* plants. *Plant cell reports*, 31(10), 1899-1909.
- 45 Metzker, M. L., & Caskey, C. T. (2009). Polymerase chain reaction (PCR). *Transactions of the Institute of Measurement and control*, 38 (3), 293.
- 46 Mikes, V., Louise-Milat, L., Ponchet, M., Ricci, P., & Blein, J. P. (1997). The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Letters*, 416(2), 190-192.
- 47 Mathew J, Paul J, Nandhu MS, Paulose CS (2010) *Bacopa monniera* and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits. *Fitoterapia* 81:315-322.
- 48 Muhammad AA, Pauz NAP, Arulselvan P, Abas F, and Fakurazi S (2013) *In Vitro* Wound Healing Potential and Identification of Bioactive Compounds from *Moringa oleifera* Lam. *BioMed Research International*, Article ID 974580, 10 pages.
- 49 O'Donohue M, Gousseau, H, Huet JC, Tepfer D, and Pernollet JC (1995) Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding b cryptogein, an elicitin produced by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Mol. Biol*, 27:577-586.
- 50 Osman H, Mikes V, Milat ML, Ponchet M, Marion D, Prange T, Maume BF, Vauthrin S, Blein JP (2001) Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Lett*, 489: 55-58.
- 51 Ouephanit, C. (2015). Expression of xylanase gene from *Penicillium citrinum* in *P. pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. Thesis, Chulalongkorn University.
- 52 Raab, D., Graf, M., Notka, F., Schodl, T., & Wagner, R. (2010). The Gene Optimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multipara meter DNA sequence optimization. *Systems and synthetic biology*, 4(3), 215-225.
- 53
- 54 Ren D, Yang KY, Li GJ, Liu Y, Zhang S (2006) Activation of Ntf4, a tobacco MAPK, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. *Plant Physiol*, 141(4):1482-1493.
- 55 Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M et al (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem*, 183:555-563. doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb21084.x

- 56 Romanos, M. (1995). Advances in the use of *P. pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in biotechnology*, 6(5), 527-533.
- 57 Schifferdecker, A. J., Siurkus, J., Andersen, M. R., Joerck-Ramberg, D., Ling, Z., Zhou, N., & Ishchuk, O. P. (2016). Alcohol dehydrogenase gene *ADH3* activates glucose alcoholic fermentation in genetically engineered *Dekkera bruxellensis* yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(7), 3219-3231.
- 58 Siegel, R., & Brierley, R. (1989). Methylophilic yeast *P. pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnology and bioengineering*, 34(3), 403-404.
- 59 Sil B, Mukherjee C, Jha S, Mitra A (2014) Metabolic shift from withasteroid formation to phenylpropanoid accumulation in cryptogin-cotransformed hairy roots of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Protoplasma*, DOI 10.1007/s00709-014-0743-8.
- 60 Staniszewska I, Krolicka A, Mali E, Ojkowska E, and Szafranek J (2003) Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. *Enzyme Microbiol Technol*, 33:565-8.
- 61 Terce-Laforge, T., & Huet, J. C. (1992). Biosynthesis and secretion of cryptogin, a protein elicitor secreted by *P. cryptogea*. *Plant physiology*, 98(3), 936-941.
- 62 Thieffry, D., & Sarkar, S. (1998). Forty years under the central dogma. *Trends in biochemical sciences*, 23(8), 312-316.
- 63 Uabundit N, Wattanathorn J, Mucimapura S, and Ingkaninan K (2010) Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *Journal of Ethnopharmacology*, 127 26-31.
- 64 van't Slot K, Knogge W (2002) A dual role for microbial pathogen derived effector proteins in plant disease and resistance. *Crit Rev Plant Sci*, 21(3): 229- 271.
- 65 Vishwakarma RK, Ruby, Singh S, Sonawane PD, Srivastava S, Kumari U, Kumar RJS, and Khan BM (2013a) Molecular Cloning, Biochemical Characterization, and Differential Expression of an Acetyl-CoA C-Acetyltransferase Gene (AACT) of Brahmi (*Bacopa monniera*). *Plant Mol Biol Rep*, 31:547-557
- 66 Vishwakarma RK, Sonawane PD, Singh S, Kumari U, Ruby, and Khan BM (2013b) Molecular characterization and differential expression studies of an oxidosqualene cyclase (OSC) gene of Brahmi (*Bacopa monniera*). *Physiol Mol Biol Plants*, 19(4):547-553.
- 67 Vries, Y. D., Arvidson, D. N., Waterham, H. R., Cregg, J. M., & Woldegiorgis, G. (1997). Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast *P. pastoris*. *Biochemistry*, 36(17), 5285-5292.
- 68 Vukovic R, Bauer N, and Curkovic-Perica M (2013) Genetic elicitation by inducible expression of  $\gamma$ -cryptogin stimulates secretion of phenolics from *Coleus blumei* hairy roots. *Plant Science*, 199- 200:18-28.

- 69 Wang, J. H., Hung, W., & Tsai, S. H. (2011). High efficiency transformation by electroporation of *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Microbiology*, 49(3), 469-472.
- 70 Weidner, M., Taupp, M., & Hallam, S. J. (2010). Expression of Recombinant Proteins in the Methylotrophic Yeast *P. pastoris*. *Journal of visualizes experiments* 36, 1862.
- 71 Wu, S., & Letchworth, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *P. pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 36(1), 152-155.
- 72 Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23:283–333. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.01.003
- 



## บทที่ 7 ภาคผนวก

### 7.1 Certificate for Publication

### 7.2 Cover of IJB International Journal of Biosciences

### 7.3 Publication paper (Ahmed et al., 2018)

Riaz Ahmed, Niran Aeksiri, Pongsanat Pongcharoen, Kawee Sujipuli (2018) Influences of plasmid forms and electric pulses on transformation efficiency in yeast using electroporation. International Journal of Biosciences 12(4): 188-195.





International Network For Natural Sciences

INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOSCIENCES (IJB)

Reference No: ijb 2018 0006

ISSN: P 2220-6655 E 2222-5234



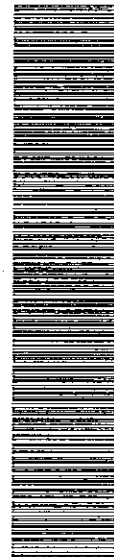
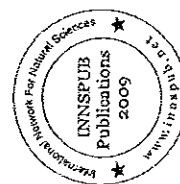
### Certificate for Publication

This is certify that the paper entitled 'Influences of plasmid forms and electric pulses on transformation efficiency in yeast using electroporation' has been published in "International Journal of Biosciences (IJB)" journal with following details:

**Authors Name:** Riaz Ahmed, Niran Aeksiri, Pongsanat Pongcharoen, Kawee Sujipuli

**Journal Name:** International Journal of Biosciences (IJB)

**Publication:** Volume 12, Number 4, 2018



www.innspub.net  
(INNSPUB)

Editor in chief/Publisher

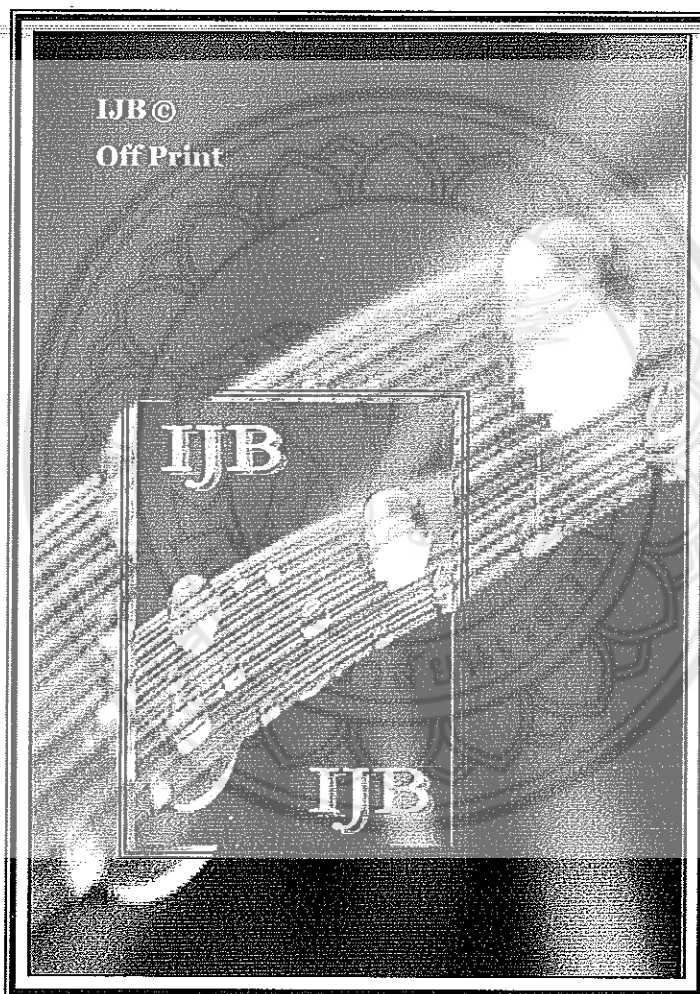


**IJB**

**International Journal of Biosciences**

ISSN 2220-6655 (Print)  
ISSN 2222-5234 (Online)

**Volume 12, Number 4, April 2018**



INNSPUB  
International Network For Natural Sciences

Website: [www.innspub.net](http://www.innspub.net)

Copyright © INNSPUB 2017



## RESEARCH PAPER

## OPEN ACCESS

## Influences of plasmid forms and electric pulses on transformation efficiency in yeast using electroporation

Riaz Ahmed<sup>1,2</sup>, Niran Aeksiri<sup>1,2</sup>, Pongsanat Pongcharoen<sup>1,2</sup>, Kawee Sujipuli<sup>1,2\*</sup>,

<sup>1</sup>Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Thailand

<sup>2</sup>Center of Excellence in Research in Agricultural Biotechnology, Naresuan University, Thailand

**Key words:** Electroporation, *Pichia pastoris*, pPICZαA plasmid, Transformation efficiency.

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/12.4.188-195>

Article published on April 15, 2018

### Abstract

The electroporation systems was widely used for transforming eukaryotic gene. The purpose of this research was to compare effects of plasmid forms and electric pulses on transformation efficiency in yeast using various electroporation approaches. The pPICZαA-*crypt* plasmid, containing the beta-cryptogein gene, was digested and undigested by *SacI* to produce linearized- and circular-plasmid, respectively. Both plasmid forms were transformed into competent cells of *Pichia pastoris* (Y11430) using either electric pulse of 1.5 or 2.0 KV. The single colony was selected and cultured in YPD medium, containing 100 µg/ml zeocin<sup>TM</sup>, and successful transformants were confirmed by using PCR-amplification. The result showed that the linearized plasmid in both electric pulses significantly generated higher transformants (average 29.25-30.00 colonies/plate) than the circular plasmid (7.63-8.13 colonies/plate). Twelve putative transformants in each transformation system were assessed successful transformation efficiency through PCR with present of the inserted *crypt* gene and AOX1. The result showed that transformation efficiency of the linearized plasmid (12 of 12 transformants) was significantly higher ( $p=0.01$ ) than the circular plasmid (10 of 12 transformants) in both electric pulses. This study indicated that the linearized plasmid might be used for increasing electroporated transformation efficiency in *P. pastoris*.

\* Corresponding Author: Kawee Sujipuli ✉ [kaweess@nu.ac.th](mailto:kaweess@nu.ac.th)



## Introduction

The cryptogein, belongs to the peptide beta-elicitin, is a low molecular weight protein (10 kDa) containing 98 amino acids and produced by pseudo-fungi (*Phytophthora cryptogea*). The protein is regulated by the beta-cryptogein (*crypt*; accession number X83001.1) and encoded 297 nucleotide sequences (Gousseau *et al.*, 1995). It has been previously proved to enhance the defensive properties in plants such as tobacco (Amelot *et al.*, 2011). It also provides a binding site to the fatty acids and phospholipids in plants (Dobeš *et al.*, 2004). Because it is a nonspecific carrier of sterol protein which enables the fatty acids and sterols to bind with it. Generally, the cryptogein protein was produced by using the *in vitro* approach. In brief, the *P. cryptogea* was cultured in a medium, supplemented asparagine and nitrogen, and grown under a dark condition at 26°C for 28 days (Tercé-Laforgue *et al.*, 1992). However, the limitation of this approach was time-consuming, laborious, and difficult to grow in culture conditions and less amount of this protein production. Nowadays, recombinant proteins are widely produced by using commercial expression systems in bacteria and yeast. Since this system is simple, able to highly produce proteins and also easy to purify them (Weidner *et al.*, 2010). However, the genes encoded eukaryotic proteins were expressed at the low level in bacterial system. For example, the beta-cryptogein protein production in *Escherichia coli* is low yield with soluble protein. The reason is that protein is refolded itself, and it is an indigenous property. For this limitation, another alternative protein production system was to express in a eukaryotic cell such as *P. pastoris* reported by (O'Donohue *et al.*, 1996). It was first reported that expression vector (pTRC99A), carrying *crypt* gene, was able to produce soluble protein secreted into culture medium in *P. pastoris*. Because of this reason, its expression systems may trend to give a significant advantage for the production of many heterologous eukaryotic proteins. Transformation systems in the eukaryotic cell, such as yeast, have two commonly main methods namely chemical and electroporation methods. For chemical method, the competent cells are mostly prepared by

using calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>), whose ions have two main functions for generating temporary pores at the membrane and binding foreign DNA which is able to transfer into the competent cell (Oswald, 2007). However, the disadvantage of this method is that its process requires a high amount of plasmid DNA, time-consuming (Version and Carlsbad, 1999) and low transformation efficiency, compared to electroporation method (Oswald, 2007).

The transformation efficiency using the electroporation method relies on electric pulses, which are high potential to create many temporary pores in the cell membrane. Resulting that the foreign DNA is easily transferred into the cell. As supported by Wuet *al* (2004), reported that the electric pulse at 1.5 KV revealed higher transformation efficiency in yeast than 2.0 KV. Furthermore, the plasmid forms, such as linearized and circular, also played an important role in transformation efficiency. It was supported by Calmels *et al* (1991) and Wang *et al* (2011), reported that linearized plasmid highly increased transformation efficiency as 2-3 folds compared to the circular plasmid.

Therefore, the aim of this study was to compare the transformation efficiency in yeast (*P. pastoris*, strain Y11430) competent cell using different electroporation methods, under the combinations between different plasmid forms and electric pulses.

## Materials and methods

### Construct of pPICZaA plasmid

The nucleotide sequences of beta-cryptogein (*crypt*) gene (registration number X83001.1 329 bp) from NCBI, were modified by adding with recognized nucleotide sequences of *Eco*RI (5'-GAATTC-3') and *Xba*I (5'-TCTAGA-3') at the 5' and 3' end, respectively. The *crypt* was inserted into the expression plasmid; pPICZaA (approximately 3.8 kb) (Invitrogen, Germany), and this recombinant plasmid (pPICZaA-*crypt*) was transformed into *E. coli*, strain DH5α using heat shock technique (Lau and Fong, 2008). After that, it was grown on LB agar medium containing 100 µg/ml ampicillin and incubated at



## RESEARCH PAPER

## OPEN ACCESS

## Influences of plasmid forms and electric pulses on transformation efficiency in yeast using electroporation

Riaz Ahmed<sup>1,2</sup>, Niran Aeksiri<sup>1,2</sup>, Pongsanat Pongcharoen<sup>1,2</sup>, Kawee Sujipuli<sup>1,2\*</sup>,

<sup>1</sup>Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Thailand

<sup>2</sup>Center of Excellence in Research in Agricultural Biotechnology, Naresuan University, Thailand

**Key words:** Electroporation, *Pichia pastoris*, pPICZαA plasmid, Transformation efficiency.

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/12.4.188-195>

Article published on April 15, 2018

### Abstract

The electroporation systems was widely used for transforming eukaryotic gene. The purpose of this research was to compare effects of plasmid forms and electric pulses on transformation efficiency in yeast using various electroporation approaches. The pPICZαA-*crypt* plasmid, containing the beta-cryptogein gene, was digested and undigested by *SacI* to produce linearized- and circular-plasmid, respectively. Both plasmid forms were transformed into competent cells of *Pichia pastoris* (Y11430) using either electric pulse of 1.5 or 2.0 KV. The single colony was selected and cultured in YPD medium, containing 100 µg/ml zeocin<sup>TM</sup>, and successful transformants were confirmed by using PCR-amplification. The result showed that the linearized plasmid in both electric pulses significantly generated higher transformants (average 29.25-30.00 colonies/plate) than the circular plasmid (7.63-8.13 colonies/plate). Twelve putative transformants in each transformation system were assessed successful transformation efficiency through PCR with present of the inserted *crypt* gene and AOX1. The result showed that transformation efficiency of the linearized plasmid (12 of 12 transformants) was significantly higher ( $p=0.01$ ) than the circular plasmid (10 of 12 transformants) in both electric pulses. This study indicated that the linearized plasmid might be used for increasing electroporated transformation efficiency in *P. pastoris*.

\*Corresponding Author: Kawee Sujipuli ✉ [kaweess@nu.ac.th](mailto:kaweess@nu.ac.th)

37°C for 14-16 hours. The positive recombinant clones were selected and confirmed by using colony PCR with *crypt* and AOX1 (alcohol oxidase) primers, which were expected sizes to 329 and 803 bp long respectively. The selected plasmid was extracted by using the kit (Pure Direx plasmid mini PREP kit, Taiwan). The purified plasmid was quantified by using UV-spectrophotometry (Bio Tek®, USA). Its concentration was adjusted to 300 ng/ml with sterilized distilled water, and stored at -20°C until further use in next step.

#### *Preparation of pPICZaA-crypt plasmid for transformation*

The linearized pPICZaA-crypt plasmid (Error! Reference source not found.) was prepared by using *SacI* as according to the manufacturer instruction (Invitrogen, Germany). Briefly, the reaction mixture (30 µl) contained circular pPICZaA-crypt plasmid 7.5 µl, 10X buffer-L 3.0 µl, *SacI* 1.5 µl, sterilized distilled water 18.0 µl. The mixture was incubated at 37°C for 16 hours, and the enzyme activity in the mixture was stopped at 65°C for 20 minutes. Finally, the solution was stored at -20°C before further use.

Meanwhile, the circular pPICZaA-crypt plasmid (30 µl) was prepared as follows: circular pPICZaA-crypt plasmid 7.5 µl and sterilized distilled water 22.5 µl, finally the mixture was stored at -20°C for further use.

Both linearized and circular plasmids were confirmed on 1% agarose gel electrophoresis.

#### *Preparation of P. pastoris competent cells*

The yeast (*P. pastoris*, strain Y11430) competent cell was prepared according to manufacturer instruction of Easy select™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, Germany). Briefly, the yeast was cultured in 5 ml of YPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose) and incubated at 30°C with shaking at 200 rpm overnight. The cells were collected by centrifugation at 2000 g for 5 minutes at 4°C. The

pellets were dissolved in 1 ml of 1 M cool sorbitol and immediately used for transformation.

#### *Transformation of pPICZaA-crypt plasmids into yeast cells by electroporation*

The combination between plasmid forms (circular or linear) and electric pulse (1.5 or 2.0 KV) was set up for this experiment to compare transformation efficiency. The experiment was classified into four groups; linearized plasmid+electric pulse 1.5 KV (named as M1), circular plasmid+electric pulse 1.5 KV (named as M2), linearized plasmid+electric pulse 2.0 KV (named as M3) and circular plasmid+electric pulse 2.0 KV (named as M4). Yeast competent cells (80 µl), prepared as described above, were mixed with 10 µl of linearized- or circular-plasmid, transferred to 0.2 cm micropulser cuvette (Gene Pulser® Cuvette, Bio-Rad, USA) and incubated on ice for 5 minutes. These mixtures were electroporated with two different electric pulses (1.5 or 2.0 KV) by using electroporation (Micropulser™ Bio-Rad, USA). After transformation, cool sorbitol (1 M) 1 ml was immediately added to the cuvette. The mixture was transferred into a 1.5 ml sterilized microcentrifuge tube and incubated at 30°C without shaking for 2 hours to recover the cells. The transformants (360 µl) were spread on fresh YPD agar plate, containing 100 µg/ml zeocin™, incubated at 30°C for 3 days until colony formation. Twelve single colonies, resistant to zeocin™, were selected from individual plate of different transformation methods. Selected colonies were streaked on a fresh YPD agar plate containing 100 µg/ml zeocin™ for further confirming successful transformation efficiency.

#### *Confirmation of successful transformation using PCR*

A selected transformants colony was cultured in YPD broth medium, containing zeocin™, and its genomic DNA was extracted using the LiOAc-SDS method (Lóoke *et al.*, 2011). The inserted *crypt* gene was confirmed by using PCR amplification with gene-specific primers (*crypt*-reverse 5'-TCTAGATTACAAGGATGAGCACTTGT-3' and *crypt*-forward 5'-GAATTCATGGCTTGTACTGCTAC-3') or

plasmid-specific primers (AOXI-reverse 5'-GCAATGGCATTCTGACATCC-3' and AOXI-forward 5'-CGAGTGGTTCCAATTGACAAGC-3'). The PCR condition was performed by an initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 59°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute, and a final extension at 72°C for 5 minutes. The PCR product was separated to detect the expected sizes on 1% agarose gel electrophoresis. The expected sizes of PCR product amplified by gene-specific and plasmid-specific primers were corresponded to 329 and 803 bp, respectively.

#### Statistical analysis

The data were analyzed by using the Analysis of Variance (ANOVA) method, and mean comparison

among treatments (electroporated transformation methods) were calculated by Tukey HSD test at a p-value less than 0.01 as statistical significance using SPSS statistics 17.0 software.

All values were expressed as the mean  $\pm$  standard error (SE).

## Results and discussion

### Preparation of plasmid for transformation

The pPICZaA plasmid carrying the beta-cryptogein gene (pPICZaA-crypt) in *E.coli* strain DH5 $\alpha$  was extracted by using the kit (Pure Direxplasmid mini PREP kit, Taiwan).

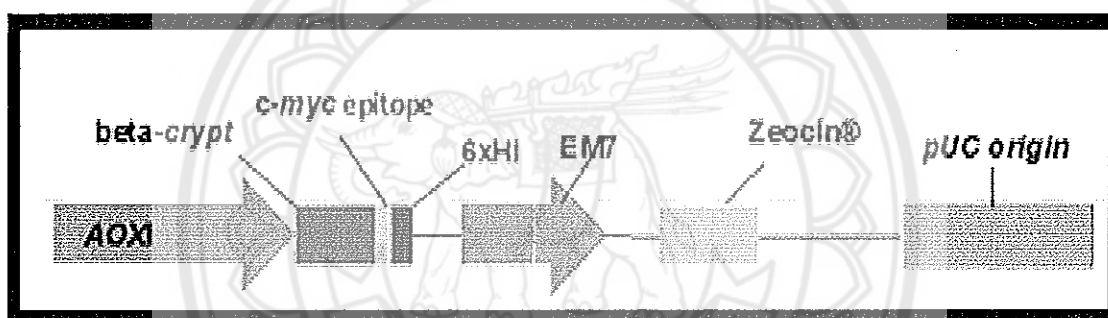


Fig. 1. Physical map of the linearized pPICZaA crypt plasmid (3833bp).

Note: AOXI promoter region (position at 1-803); beta- cryptogein (position at 941-1270); c-myc epitope (position at 1270-1299); 6xHis (position at 1299-1316); EM7 promoter (position at 2074-2241); Zeocin® (position at 2241-2619); and pUC origin (position at 3160-3833).

The undigested-circular-plasmid form and the linearized-plasmid form digested by *SacI* were used for further transformation into *P. pastoris* competent cell, strain Y11430. After treatment with *SacI*, the undigested or digested-product was determined by 1% agarose gel electrophoresis. As shown in (Fig.) the result found that both pPICZaA-crypt plasmid forms were different migrations, which the circular plasmid (corresponded to 3833bp) moved slightly faster than the linearized plasmid on 1% agarose gel electrophoresis. This indicated that the same number of base pairs in plasmid DNA had different migration as previously reported that the circular pBR322 plasmid was expected to lower molecular weight on agarose gel, compared to linearized pBR322 plasmid

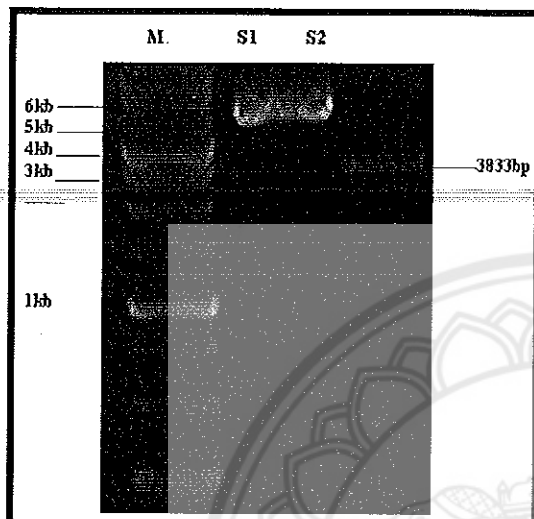
with digested by hydrogen peroxide (Ping *et al.*, 2016).

The DNA plasmid conformation with the same molecule weight is influenced on its electrophoretic mobility in the agarose gel. Since the circular-plasmid form was reduced the size with less space by compacting which cause to be less frictional resistance from the gel, resulting in the migration of this plasmid conformation was able to be faster than other conformations (Cebrián *et al.*, 2015).

### Comparison of transformation methods

Four different transformation methods (M) by combining two plasmid forms (linearized and circular) of pPICZaA-crypt and two electric pulses (1.5

and 2.0 KV) were compared the transformation efficiency. M1 and M3 represented linearized plasmids of pPICZαA-*crypt* combined with electric pulses of 1.5 and 2.0 KV respectively, and M2 and M4 represented circular plasmids of pPICZαA-*crypt* combined with electric pulses of 1.5 and 2.0 KV respectively.

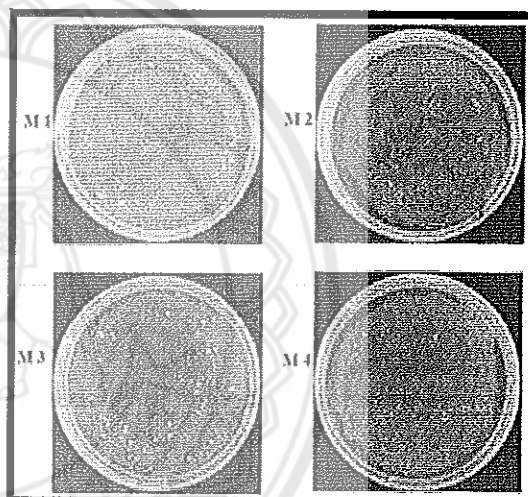


**Fig.2.** Migration of linearized (S1) and circular (S2) pPICZαA-*crypt* plasmid (corresponding to 3833bp) on 1% agarose gel electrophoresis assay.

Note: lane M represents 1kb DNA RTU Ladder (GeneDireX, USA).

The result revealed the linearized plasmid (M1 and M3) with *SacI* gave higher transformed colonies than circular plasmid (M2 and M4) (Fig.). The statistical analysis showed that the linearized plasmid in M1 ( $29.25 \pm 2.11$  colonies a plate) and M3 ( $30.00 \pm 2.05$  colonies a plate) showed higher average transformation efficiency with highly significant difference at p-value 0.01 than circular plasmid in M2 ( $8.13 \pm 0.85$  colonies a plate) and M4 ( $7.63 \pm 0.80$  colonies a plate) (Error! Reference source not found.). Moreover, the result demonstrated that transformation efficiency in difference electric pulses among 1.5 and 2.0 KV was not significant different at p-value 0.01 (Error! Reference source not found.). This indicated that the linearized plasmid could strongly enhance transformation efficiency in yeast competent cells approximately 3.7 folds when comparing to the circular plasmid. This was supported by some previous publications. For

example, linearized pUT37 plasmid was highly increased transformation frequency as 2-3 times compared to its circular plasmid (Calmels *et al.*, 1991). The linearized pDHG25 plasmid with *Bam*HI generated higher transformant colonies than its circular plasmid (Sanchez and Aguirre, 1996). This also agreed to (Bessa *et al.*, 2012), who reported that the linearized plasmid p416-GPD digested by *Eco*RI was shown to significantly increase the stable transformation efficiencies in *Saccharomyces cerevisiae*, compared to its circular plasmid. Furthermore, (Schifferdecker *et al.*, 2016), reported that the linearized p892 plasmid with *Hind*III yielded average 68 transformants, but circular p892 plasmid did not give any transformants.



**Fig.3.** Comparison of successfully transformed colonies of *P.pastoris* among four different electroporated transformation methods.

Note: M1, M2, M3, and M4 represented transformation method of linearized plasmid+electric pulse 1.5 KV, circular plasmid+electric pulse 1.5 KV, linearized plasmid+electric pulse 2.0 KV, and circular plasmid+electric pulse 2.0 KV respectively. After transformation, the transformed yeast cells were cultured on selective YPD medium supplemented with zeocin™ at 30 °C for three days.

Each method has been done with eight biological replications, and only one representative per method has been depicted in this figure.

*Confirmation of successfully transformed colony using PCR*

Twelve putative single-yeast colonies of each transformation method, collected from selective YPD medium plates, were cultured in YPD broth medium supplemented zeocin™ at 30°C with shaking 200 rpm for 12 hours.



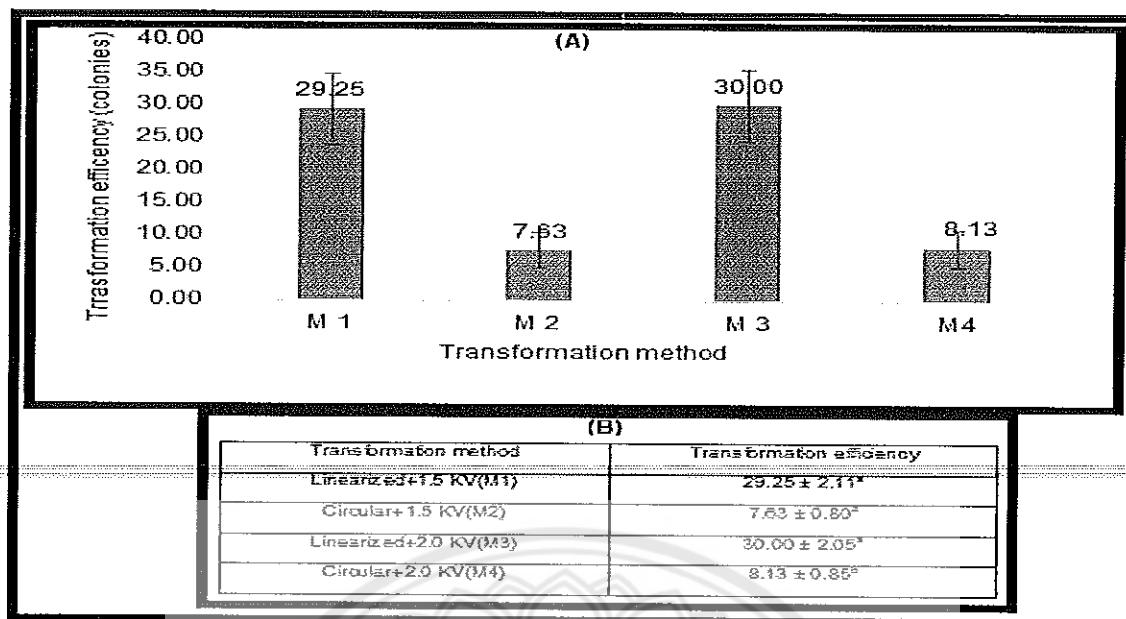


Fig.4. Transformation efficiency of *P. pastoris* from four different electroporated transformation methods.

Note: After transformation, the transformed yeast cells were cultured on selective YPD medium supplemented with zeocin™ at 30 °C for three days. The transformation efficiency was calculated by counting a number of single colonies, and bars represented SE (A). Each method has been done with eight biological replications. Values were represented in mean ± SE (B). Different lower case letters (in the same column) corresponded to significant differences at  $p < 0.01$ , calculated by Tukey HSD test.

The yeast DNA was extracted by LiOAc-SDS method (Lööke *et al.*, 2011). Its DNA was used to confirm successful transformation using PCR with *crypt*-gene specific primers and AOX1 primers. The PCR product was separated and visualized by gel electrophoresis.

The result found that all selected yeast transformants from M1 and M3 were presented the *crypt*-gene of the insert, which gave the PCR product expected to 329 and 803 bp amplified by *crypt*-gene and AOX1 primers (Fig.) respectively.

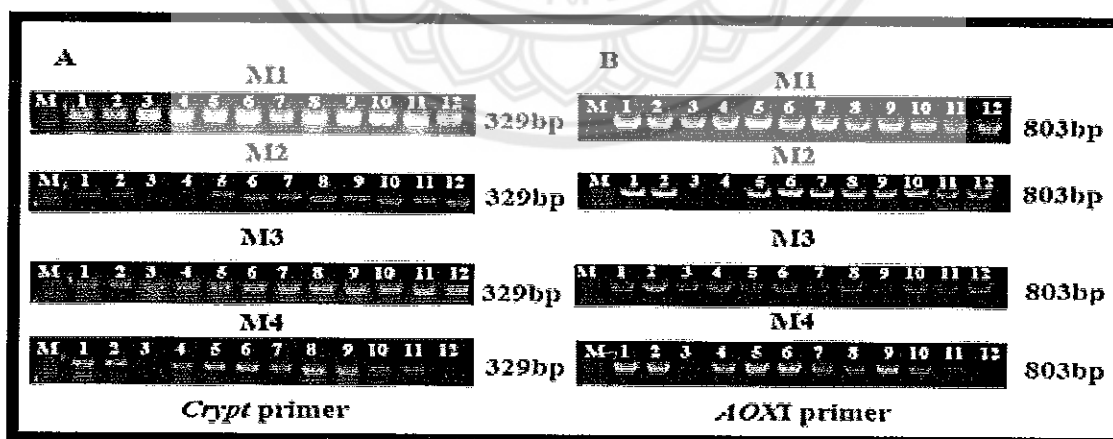


Fig. 5. Confirmation of successfully transformed colony using PCR and visualization by gel electrophoresis.

Note: PCR products were detected target sizes on 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. DNA templates for PCR amplification was randomly selected from 12 transformed single colonies to confirm the success of gene insertion. Specific primers were used, namely *crypt* primers corresponding to 329bp and AOXI primer corresponding to 803bp (Fig.).

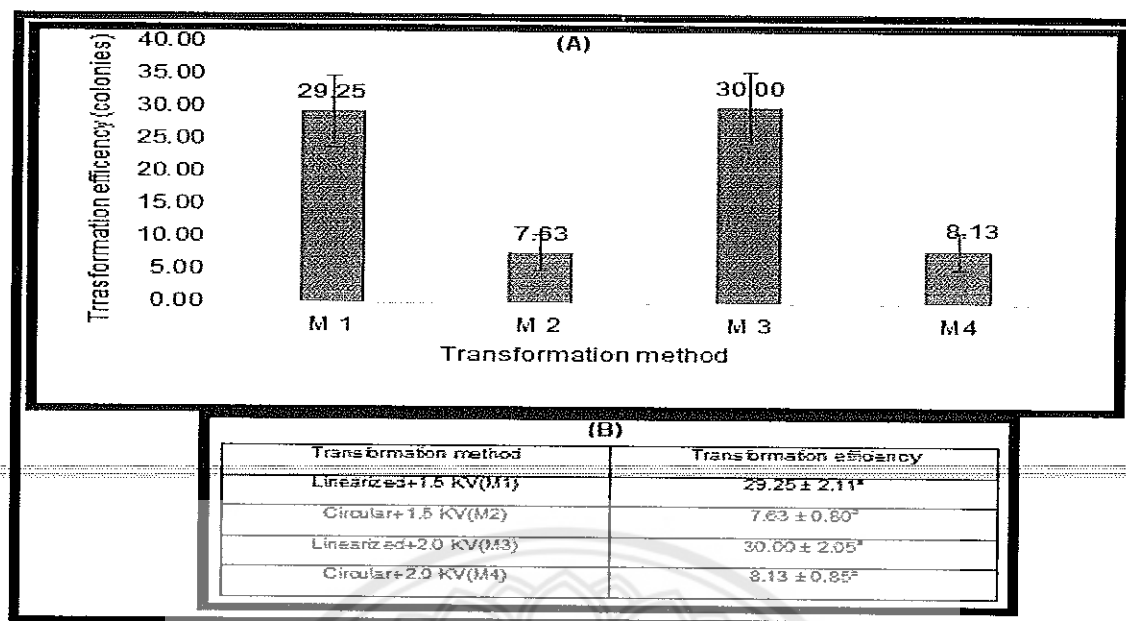


Fig.4. Transformation efficiency of *P. pastoris* from four different electroporated transformation methods.

Note: After transformation, the transformed yeast cells were cultured on selective YPD medium supplemented with zeocin™ at 30 °C for three days. The transformation efficiency was calculated by counting a number of single colonies, and bars represented SE (A). Each method has been done with eight biological replications. Values were represented in mean ± SE (B). Different lower case letters (in the same column) corresponded to significant differences at  $p < 0.01$ , calculated by Tukey HSD test.

The yeast DNA was extracted by LiOAc-SDS method (Lööke *et al.*, 2011). Its DNA was used to confirm successful transformation using PCR with *crypt*-gene specific primers and AOX1 primers. The PCR product was separated and visualized by gel electrophoresis.

The result found that all selected yeast transformants from M1 and M3 were presented the *crypt*-gene of the insert, which gave the PCR product expected to 329 and 803 bp amplified by *crypt*-gene and AOX1 primers (Fig.). respectively.

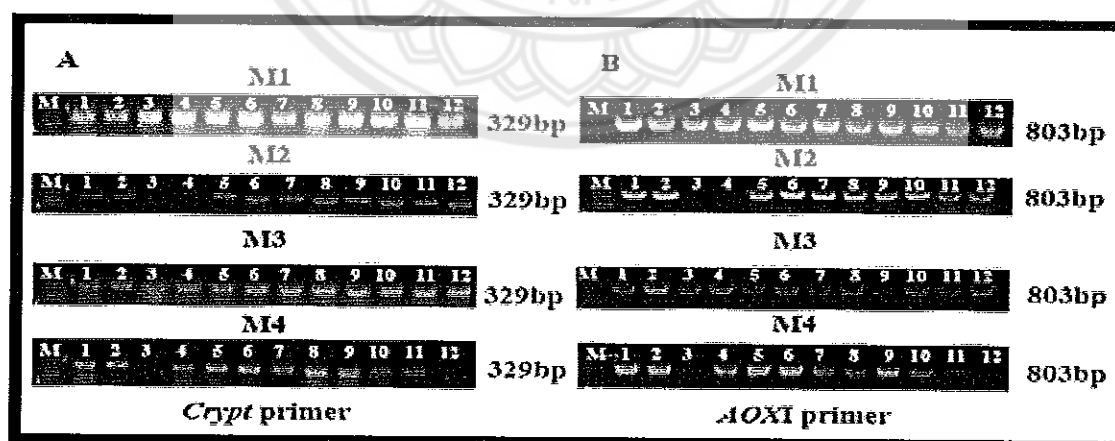


Fig. 5. Confirmation of successfully transformed colony using PCR and visualization by gel electrophoresis.

Note: PCR products were detected target sizes on 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. DNA templates for PCR amplification was randomly selected from 12 transformed single colonies to confirm the success of gene insertion. Specific primers were used, namely *crypt* primers corresponding to 329bp and AOX1 primer corresponding to 803bp (Fig.).



From 12 selected yeast transformants, only ten transformants (from M2 and M4) were presented the *crypt*-gene of the insert. In this case, this indicated that the linearized pPICZaA-*crypt* plasmid with *SacI* (located at the unique 5'AOXI region) increased greater transformation efficiency than circular plasmid. The reason of this was that the linearized plasmid might directly transfer into yeast competent cell and it increase long homologous sites were able to enhance opportunity of synapsis and integration with the yeast chromosome (David and Siewers, 2015).

### Conclusion

In conclusion, this study demonstrated that the linearized plasmid had significantly higher yeast transformation efficiency than the circular plasmid in both electric pulses (1.5 or 2.0 KV). However, optimal conditions (such as culture temperature, methanol-inducer concentration and methanol-feeding strategy) should also be considered for the further experiment to gain the high expression level of beta-cryptogein protein in *P. pastoris*.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgment

This study was financially supported by Naresuan University, Thailand (Project number R2560B013), and Thailand International Cooperation Agency (TICA).

### References

- Amelot N, Carrouche A, Danoun S, Bourque S, Haiech J, Pugin A, Ranjeva R, Grima-Pettenati J, Mazars C, Briere C. 2011. Cryptogein a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium-dependent manner. *PlantCell and Environment* **34**(1), 149-161.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02233.x>.
- Ang RP, Teoh LS, Chan MK, Miswan N, Khoo BY. 2016. Comparing the expression of human DNA topoisomerase I in KM71H and X33 strains of *Pichiapastoris*. *Electronic Journal of Biotechnology* **19**(3), 9-17.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.01.007>.
- Bessa D, Pereira F, Moreira R, Johansson B, Queirós O. 2012. Improved gap repair cloning in yeast: treatment of the gapped vector with Taq DNA polymerase avoids vector self-ligation. *Yeast* **29**(10), 419-423.  
<http://dx.doi.org/10.1002/yea.29.19>.
- Calmels T, Parriche M, Durand H, Tiraby G. 1991. High efficiency transformation of *Tolypocladiumgeodesconidiospores* to phleomycin resistance. *Current Genetics* **20**(4), 309-314.
- Cebrián J, Castán A, Martínez V, Kadomatsu MJ, Parra C, Fernández-Nestosa C, Schaerer, Hernández P, Krimer D, Schwartzman JB. 2015. Direct evidence for the formation of precatenanes during DNA replication. *Journal of Biological Chemistry* **290**(22), 13725-13735.
- David F, Siewers V. 2015. Advances in yeast genome engineering. *FEMS Yeast Research* **15**(1), 1-14.  
<http://dx.doi.org/10.1111/1567-1364.12200>.
- Dobeš P, Kmuniček J, Mikeš V, Damborský J. 2004. Binding of fatty acids to beta-cryptogein quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutants. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **44**(6), 2126-2132.  
<http://dx.doi.org/10.1021/ci049832x>.
- Lau YL, Fong MY. 2008. *Toxoplasma gondii*: Serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichiapastoris*. *Experimental Parasitology* **119**(3), 373-378.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2008.03.016>.
- Löoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. 2011.

Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* 50(5), 325-328.

<http://dx.doi.org/10.2144/00.0113672>.

Michal J, O'Donohue, Gousseau H, Jean CH, David T, Jean CP. 1995. Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding beta-cryptogein, an elicitor produced by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Molecular Biology* 27(3), 577-586.

O'Donohue MJ, Boissy G, Huet JC, Nespoulous C, Brunie S, Pernollet JC. 1996. Overexpression in *Pichia pastoris* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus, *Phytophthora cryptogea*. *Protein Expression and Purification* 8(2), 254-261.

<http://dx.doi.org/10.1006/prep.1996.0098>.

Oswald N. 2007. E. coli electroporation vs chemical transformation. Retrieved 19-02, 2018, from <https://bitesizebio.com/10297/ecoli-electroporation-vs-chemical-transformation>.

Sanchez O, Aguirre J. 1996. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genetics Reports* 43(1), 48-51.

<http://dx.doi.org/10.4148/1941-4765.1317>.

Schifferdecker AJ, Siurkus J, Andersen MR, Joerck-Ramberg D, Ling Z, Zhou N, Blevins

JE, Sibirny AA, Piškur J, Ishchuk OP. 2016. Alcohol dehydrogenase gene ADH3 activates glucose alcoholic fermentation in genetically engineered *Dekkera bruxellensis* yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(7), 3219-3231.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7266-x>.

Tercé-Laforgue T, Huet JC, Pernollet JC. 1992. Biosynthesis and secretion of cryptogein, a protein elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology* 98(3), 936-941.

<http://dx.doi.org/10.1104/pp.98.3.936>.

Version E, Carlsbad C. 1999. Multi-copy *Pichia* Expression Kit, USA: Invitrogen.

Wang JH, Hung W, Tsai SH. 2011. High efficiency transformation by electroporation of *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Microbiology* 49(3), 469-472.

<http://dx.doi.org/10.1007/s12275-011-0433-6>.

Weidner M, Taupp M, Hallam SJ. 2010. Expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Visualized Experiments* (36), 1862.

<http://dx.doi.org/10.3791/1862>.

Wu S, Letchworth GJ. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pre-treated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques* 36(1), 152-154.