

บทความวิจัย

รูปแบบของเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสองระนาบ ของมะละกอพันธุ์แขกนวล (*Carica papaya* Lin. cv Khak Nual)

ชาลินี คงสวัสดิ์^{1,2,4*} ทนง เพ็ญอ้วน³ สิทธิรักษ์ รอยตระกูล⁴
ปาริชาติ เบิร์นส⁴ และ วิชัย โหมสิทธิ์ตัน^{1,2,5}

บทคัดย่อ

การศึกษาโปรตีนโอมิกส์ของมะละกอ (*Carica papaya* Lin.) สายพันธุ์แขกนวลจากส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ ดอก ผลแก่ และราก ที่อายุ 270 วัน ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสองระนาบ (2-D PAGE) โดยแยกตามความแตกต่างของประจุสุทธิของโปรตีนด้วย non linear gradient pH 3 - 10 ขนาด 18 เซนติเมตร ในระนาบแรก และใช้ 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) แยกตามขนาดโมเลกุลของโปรตีน ในระนาบที่สอง และย้อมโปรตีนในเจลด้วยวิธีซิลเวอร์ แต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากการทดลองพบว่า จำนวนโปรตีนโอมิกส์ของมะละกออยู่ในช่วง 553 - 967 จุด จำนวนโปรตีนโอมิกส์ของมะละกอในดอกมีจำนวนจุดของโปรตีนมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ใบ ราก และผลแก่ โดยมีจำนวนของจุดโปรตีนที่ 967 ± 10.60 , 960 ± 8.02 , 780 ± 13.32 และ 553 ± 11.02 จุด ตามลำดับ โปรตีนโอมิกส์จะกระจายอยู่ในช่วง pI 14 - 7.5 ที่น้ำหนักโมเลกุล 10 - 100 กิโลดาลตัน และ pI 9.5 - 10 ที่น้ำหนักโมเลกุล 15 - 50 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบหาจุดของโปรตีนร่วมในแต่ละส่วนของมะละกอพันธุ์แขกนวล พบว่ามีจุดร่วมกัน จำนวน 33 จุด จากการสืบค้นชนิดของโปรตีนเหล่านั้นจาก

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

³ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

⁴ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

⁵ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: chalinee@biotec.or.th

คุณสมบัติของค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลในฐานะข้อมูล TagIdent ยังไม่พบโปรตีนที่ตรงกับฐานข้อมูล มะละกอ แต่พบตรงกับเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งโปรตีนเหล่านั้นมีการแสดงออกปริมาณสูง (highly abundant protein) ในพืชชนิดอื่น เช่น ข้าว *Arabidopsis* กาแฟ และทานตะวัน เป็นต้น จึงคาดว่าเป็น house keeping protein

คำสำคัญ: มะละกอ โปรตีโอมิกส์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองระนาบ

2-D PAGE Patterns of Khak Nual Papaya (*Carica papaya* Linn. cv Khak Nual)

Chalinee Kongsawat^{1,2,4*}, Tanong Phueaouan³, Sittiruk Roytrakul⁴,
Parichart Burns⁴ and Wichai Kositratana^{1,2,5}

ABSTRACT

Proteomics differentially expressed of leaf, flower, mature fruit and root of Khak Nual Papaya (*Carica papaya* Lin.) were determined by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) using a 18 cm of non linear gradient of pH ranged 3 - 10 strip for *pI* separation and then 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for molecular weight determination. Approximately 553 - 967 protein spots from different parts of papaya plants were resolved. Comparison of the total proteome in each part, the most number of protein spots were found in flower. There were 967 ± 10.60 , 960 ± 8.02 , 780 ± 13.32 and 553 ± 11.02 protein spots in flower, leaf, root and mature fruit, respectively. Separated papaya protein spots were located mainly in the area of *pI* 4 - 7.5 / MW 10 - 100 kDa and *pI* 9.5 - 10 / MW 15 - 50 kDa. Comparison of protein spots in each part, only 33 highly abundant protein spots were coincidentally found in every part expected to be house keeping proteins. These spots were searched against TagIdent database by *pI* and MW. Not of the protein matched with papaya protein but the 33 highly abundant protein spots matched with various proteins including enzyme involved in synthesis and processing of DNA, RNA and protein or the major metabolic pathway from other plants such as rice, *Arabidopsis*, coffee and sunflower.

Keywords: *Carica papaya*, proteomics, 2-D PAGE

¹Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus

²Center for Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE)

³School of Science, Mae Fah Luang University

⁴National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA)

⁵Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus

*Corresponding author, e-mail: chalinee@biotec.or.th

บทนำ

มะละกอ (*Carica papaya* Lin.) เป็นพืชสำคัญของประเทศไทย มีการปลูกทั่วทุกภาคของประเทศ เพื่อใช้รับประทานเป็นผลไม้และประกอบอาหาร โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการบริโภคมะละกอดิบเป็นอาหารในชีวิตประจำวัน นอกจากนี้ มะละกอสุกยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอุตสาหกรรมการทำผลไม้บรรจุกระป๋องเพื่อการส่งออก [1] การสร้างข้อมูลด้านชีววิทยาโมเลกุลในระดับโปรตีนเป็นพื้นฐานสำคัญเพื่อนำไปสู่การศึกษาด้านอณูชีววิทยา การศึกษาโปรตีนทั้งหมดที่เรียกว่าโปรตีโอม (proteome) นิยมใช้เทคนิค 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำสูงในการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อ และช่วงเวลาต่างๆ [2] ปัจจุบันมีการศึกษาโปรตีโอมในพืชหลายชนิด ทั้งการศึกษารูปแบบของ 2-D PAGE ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ทั้ง ราก ใบ ดอก ผล และเมล็ดของข้าวโพด ถั่วเหลือง ยาสูบ ฝ้าย พริกไทย ชูการ์บีท แอปริคอต กล้วย ทานตะวัน กุหลาบ และพืชอีกหลายชนิด [3, 4] การศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีโอมเมื่อถูกกระตุ้นด้วย biotic stress หรือ abiotic stress ในข้าว [5, 6] ข้าวสาลี [7, 8] ถั่วลิสง [9] การใช้โปรตีโอมิกส์ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดต่างๆ [10] และการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชตัดแปรพันธุกรรม เช่น มะเขือเทศ และมันฝรั่ง [11, 12] การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบของ 2-D PAGE ของมะละกอพันธุ์แขกนวลในเนื้อเยื่อส่วน ใบ ดอก ผลแก่ และราก โดยศึกษาโปรตีนสำคัญที่ปรากฏในทุกตัวอย่าง เพื่อนำไปสู่การใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการจัดทำฐานข้อมูลโปรตีนของมะละกอและศึกษาในด้านอื่นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สายพันธุ์มะละกอและการเพาะปลูก

เพาะเมล็ดมะละกอพันธุ์แขกนวลในดินผสมที่มี ดิน: ขี้เถ้าแกลบ: ปุ๋ยหมัก: ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 6: 4: 2: 4 จนต้นกล้ามะละกอมีใบจริงประมาณ 5 - 7 ใบ หรืออายุประมาณ 1 - 2 เดือน แล้วย้ายปลูกมะละกอลงในกระถางพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร ประกอบด้วยดินผสมสูตรเดิมภายใต้สภาพโรงเรือน ทำการรดน้ำวันละ 2 ครั้ง และให้ปุ๋ยสูตร 46 - 0 - 0 ในช่วง 3 เดือนแรกของการเจริญเติบโต และใช้ปุ๋ยสูตร 16 - 16 - 16 ในช่วงเริ่มติดผล จำนวน 2 ครั้งต่อเดือน เก็บตัวอย่างใบ ดอก ผลแก่ และรากของมะละกอเมื่ออายุต้น 270 วัน

การสกัดโปรตีน

นำตัวอย่างใบ ดอก ผลแก่ และรากของมะละกอมาสกัดโปรตีนตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Westermeier and Naven [13] โดยบดตัวอย่างจำนวน 3 กรัม ในโกร่งบดที่เติมไนโตรเจนเหลว สกัดโปรตีนด้วย lysis buffer (8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 2% IPG buffer 3 - 10) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร มากำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย 2-D Clean-Up Kit ตามข้อแนะนำของผู้ผลิต (GE Healthcare Life Sciences) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Bradford [14] วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ โดยเทียบจากโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin

การตรวจสอบโปรตีนโอมิกส์ด้วยเทคนิค 2-D PAGE

นำโปรตีนที่สกัดได้มาแยกตามความแตกต่างของค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล เริ่มจากการนำตัวอย่างโปรตีนของมะละกอกที่สกัดได้ ปริมาณ 150 ไมโครกรัม มาทำการแยกขนาดที่ 1 โดยวิธี isoelectric focusing (IEF) ตามความแตกต่างของค่า isoelectric point (pI) ในโปรตีนแต่ละชนิดๆ ละ 3 เจล ซึ่งค่า pI เป็นค่า pH ที่โปรตีนมีประจุรวมเป็นศูนย์ ทำให้โปรตีนไม่เคลื่อนต่อไปในเจลที่มีกระแสไฟฟ้าผ่าน ทั้งนี้ค่า pI ของโปรตีนแต่ละตัวจะมีค่าเฉพาะตัวในโปรตีนแต่ละชนิด ทำการแยกโดยใช้แผ่นเจลสำเร็จรูป Immobiline™ DryStrip pH 3-10 ชนิด immobilized pH gradient gel (IPG) ที่ผลิตทางการค้า (GE Healthcare Life Sciences) ขนาดความยาวแผ่นเจล 18 เซนติเมตร ด้วยเครื่อง Ettan IPGphor II (GE Healthcare Life Sciences) โดยใช้สภาวะ ดังนี้

| | | | |
|-----------|---------------|-------------|------------|
| ขั้นที่ 1 | Step and Hold | 300 โวลต์ | 600 Vh. |
| ขั้นที่ 2 | Step and Hold | 500 โวลต์ | 500 Vh. |
| ขั้นที่ 3 | Step and Hold | 1,000 โวลต์ | 1,000 Vh. |
| ขั้นที่ 4 | Step and Hold | 8,000 โวลต์ | 14,500 Vh. |
| ขั้นที่ 5 | Gradient | 5,000 โวลต์ | 20,000 Vh. |
| ขั้นที่ 6 | Step and Hold | 500 โวลต์ | 3,000 Vh. |

จากนั้น นำแผ่นเจล Immobiline™ DryStrip ที่แยกได้จากข้างต้น มาทำการปรับสภาพใน equilibration buffer (2% SDS, 50 mM tris-HCl pH 8.6, 6M urea, 30% (v/v) glycerol, 0.002% bromophenol blue) ที่เติม DTT 100 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที และใน equilibration buffer ที่เติม idoacetamide 250 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อแผ่นเจล ตามลำดับ นำเจล Immobiline™ DryStrip แยกโปรตีนขนาดที่ 2 แยกตามขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วย 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) [15] โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 15 นาที และกระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ตามลำดับ

การย้อมสีเจล

นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยวิธี silver staining โดยดัดแปลงจากวิธีของ Blum และคณะ [16] เริ่มจากตรึงโปรตีนในแผ่นเจลในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ 40 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 30% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้น ทำการ sensitization แผ่นเจล ด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที แช่เจลในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 1 นาที แล้วจึงล้างเจลด้วยสารละลายของโซเดียมคาร์บอเนต 3 เปอร์เซ็นต์ และฟอร์มัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ จนกว่าจุดของโปรตีนจะปรากฏชัดเจน จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างในสารละลายกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที เก็บแผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์

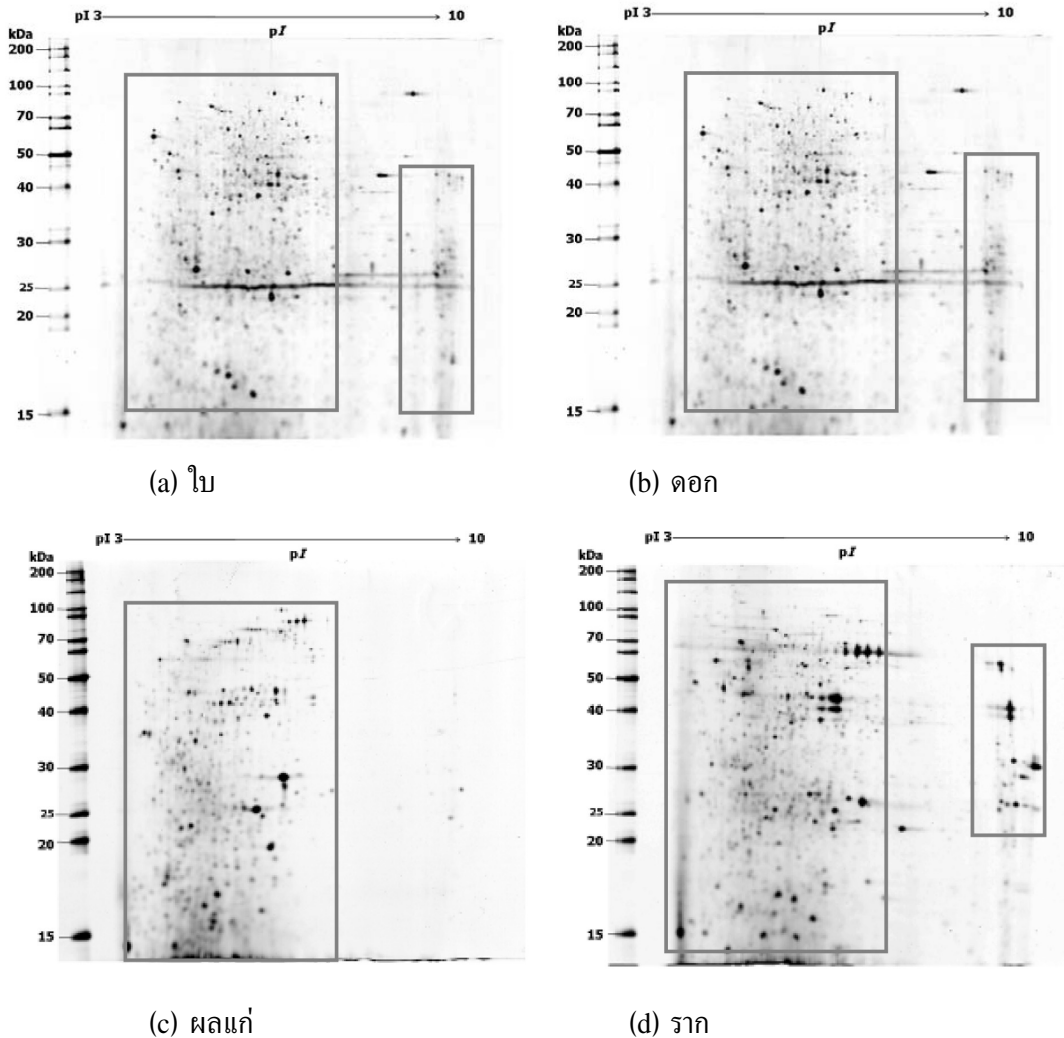
การเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีโอมิกส์

นำแผ่นเจลไปสแกนด้วยเครื่อง ImageMaster Scanner และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 (GE Healthcare Life Sciences) เพื่อวิเคราะห์จำนวนจุดของโปรตีนในแต่ละตัวอย่างของมะละกอ โดยเปรียบเทียบหาจุดโปรตีนร่วมที่พบในทุกส่วนของมะละกอตัดแปรพันธุกรรม นำมาวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนโดยใช้ค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลในการสืบค้นจากฐานข้อมูล Viridiplantae ของ TagIdent (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>) [17]

ผลการทดลอง

รูปแบบเจล 2-D PAGE ของใบ ดอก ผลแก่ และรากมะละกอพันธุ์แขกนวล

รูปแบบการกระจายของโปรตีโอม ในตัวอย่างใบและดอกของมะละกอพันธุ์แขกนวล พบว่ามีกลุ่มการกระจายจุดของโปรตีน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม pI 4 - 7.5 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10 - 100 กิโลดาลตัน

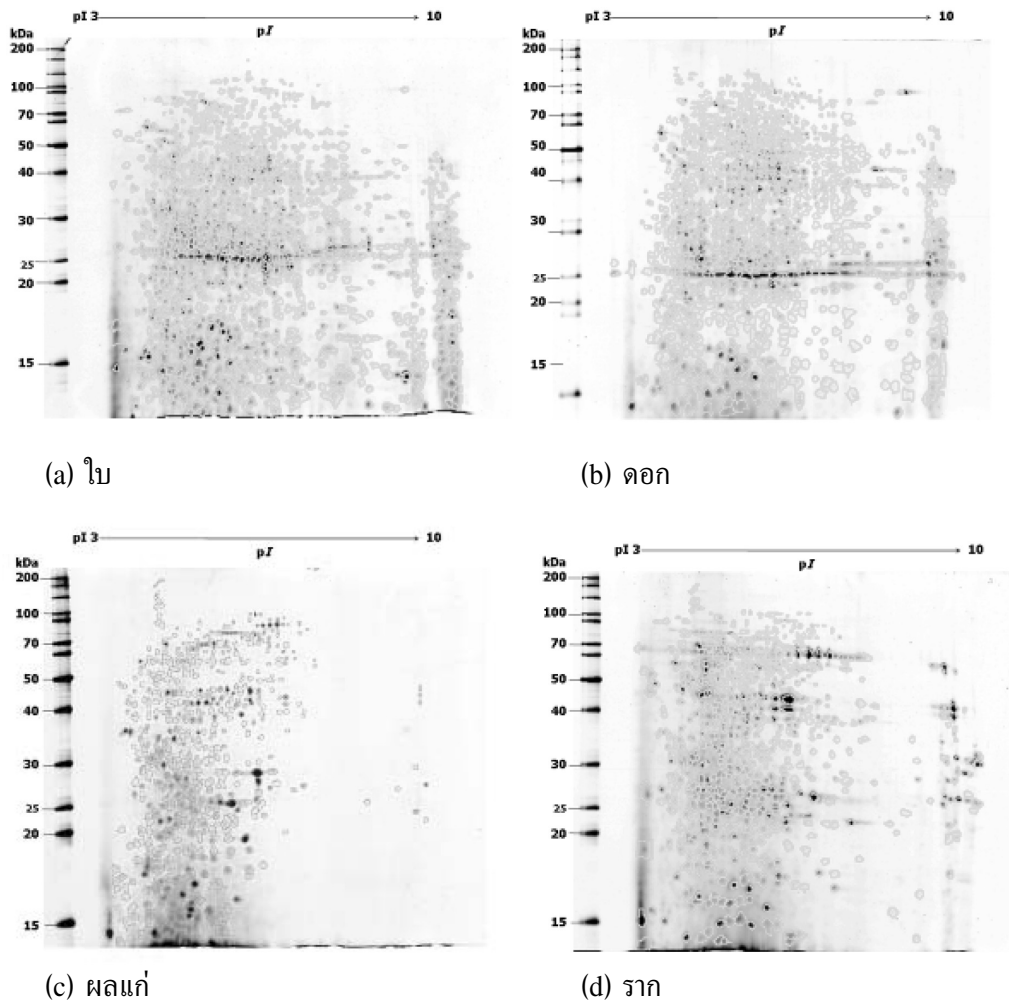


รูปที่ 1 รูปแบบการกระจายจุดโปรตีนใน 2-D PAGE ของตัวอย่างในส่วนต่างๆ ของมะละกอพันธุ์แขกนวลที่อายุ 270 วัน

และกลุ่ม pI 9.5 - 10 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15 - 50 กิโลดาลตัน (รูปที่ 1 a และ b) สำหรับตัวอย่างผลแก่ มะละกอพันธุ์แขกนวลพบการกระจายจุดของโปรตีนเพียงกลุ่มเดียวในช่วง pI 4 - 7.5 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10 - 100 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 1 c) ในตัวอย่างรากพบการกระจายจุดของโปรตีนเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม pI 4 - 7.5 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10 - 100 กิโลดาลตัน และกลุ่ม pI 9.5 - 10 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 - 50 กิโลดาลตัน (รูปที่ 1 d)

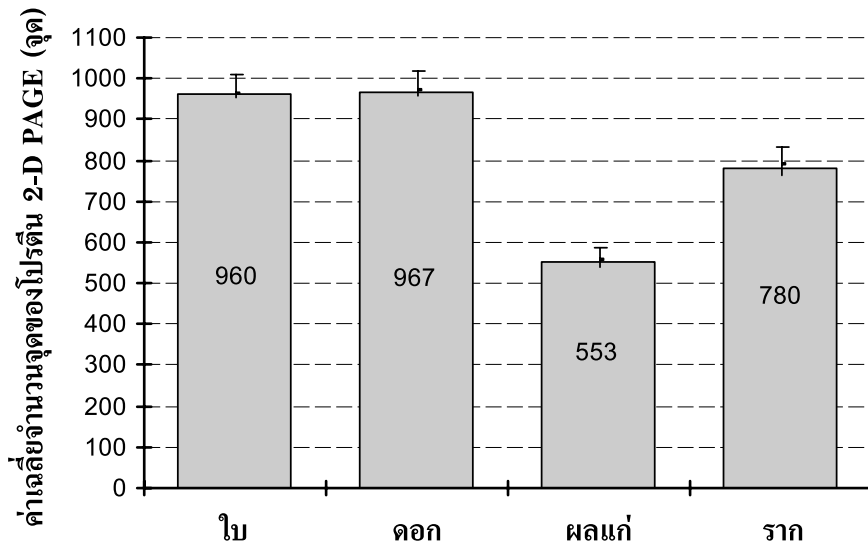
จำนวนจุดของโปรตีนในใบ ดอก ผลแก่ และรากมะละกอพันธุ์แขกนวล

เมื่อใช้โปรแกรมวิเคราะห์สำเร็จรูป ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 ตรวจสอบจำนวนจุดของโปรตีนบน 2-D PAGE จำนวนโปรตีนของมะละกออยู่ในช่วง 553 - 967 จุด โดยพบจุดของโปรตีนในดอก ใบ ราก และผลแก่ จำนวน 967 ± 10.60 , 960 ± 8.02 , 780 ± 13.32 และ 553 ± 11.02 ตามลำดับ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 จำนวนจุดโปรตีนใน 2-D PAGE ของตัวอย่างในส่วนต่างๆ ของมะละกอพันธุ์แขกนวลที่อายุ 270 วัน ที่ตรวจนับได้โดยโปรแกรมวิเคราะห์สำเร็จรูป ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5

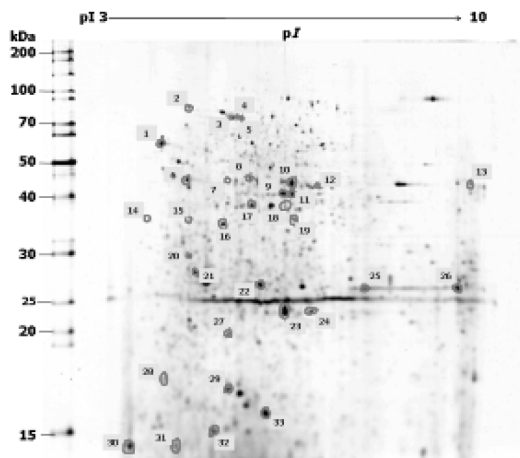
เมื่อเปรียบเทียบจำนวนจุดของโปรตีนพบว่า ในดอกของมะละกอมีจำนวนจุดของโปรตีนมากที่สุด (967 จุด) รองลงมาได้แก่ ใบใบ (960 จุด) ราก (780 จุด) และผลแก่ (553 จุด) ตามลำดับ ดังรูปที่ 3



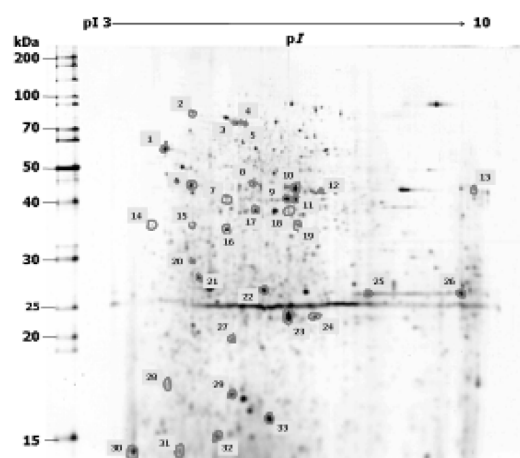
รูปที่ 3 กราฟเปรียบเทียบจำนวนจุดของโปรตีนในใบ ดอก ผลแก่ และรากของมะละกอพันธุ์แขกนวลที่อายุ 270 วัน

เปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนในใบ ดอก ผลแก่ และรากมะละกอพันธุ์แขกนวล

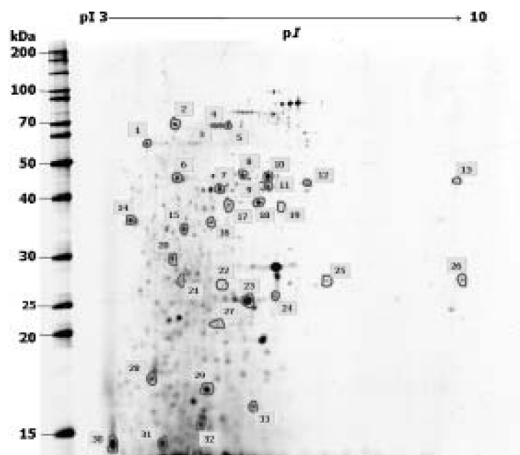
เปรียบเทียบจุดของโปรตีนเพื่อหาจุดของโปรตีนร่วมระหว่างใบ ดอก ผลแก่ และรากของมะละกอพันธุ์แขกนวล โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สำเร็จรูป ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 พบว่ามีจุดของโปรตีนที่มีความเข้มข้นมาก (highly abundant protein) และพบที่ตำแหน่งเดียวกันในทุกส่วนของมะละกอ [18] คาดว่าโปรตีนเหล่านั้นจะเป็นโปรตีนในกลุ่ม house keeping protein จำนวน 33 จุด ในตำแหน่งค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ดังรูปที่ 4 เมื่อค้นหาชนิดของโปรตีนจากค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลในฐานข้อมูล TagIdent ยังไม่สามารถจำแนกว่าเป็นโปรตีนชนิดใดจากฐานข้อมูลโปรตีนมะละกอ แต่พบว่าในแต่ละตำแหน่งของจุดโปรตีนจะตรงกับโปรตีนของพืชชนิดอื่น เช่น ข้าว *Arabidopsis* กาแฟ และทานตะวัน เป็นต้น ดังตารางที่ 1



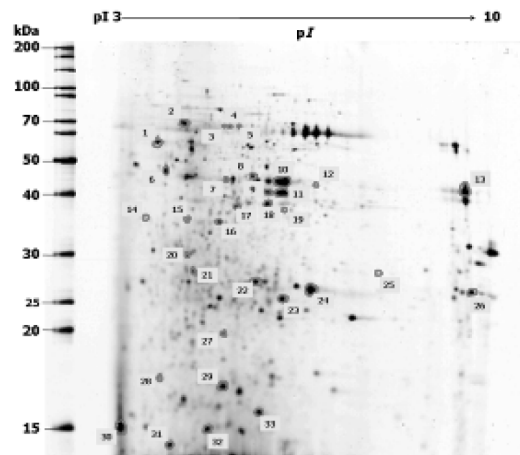
(a) ใบ



(b) ดอก



(c) ผลแก่



(d) ราก

รูปที่ 4 จำนวนจุดโปรตีนรวมใน 2-D PAGE ที่พบในตัวอย่างทุกส่วนของมะละกอพันธุ์แขกนวลที่อายุ 270 วัน ตรวจสอบได้โดยโปรแกรมวิเคราะห์สำเร็จรูป ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5

ตารางที่ 1 แสดงค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบร่วมในทุกลูกของมะละกอ เมื่อสืบค้นเปรียบเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล TagIdent

| หมายเลขจุดของโปรตีน | ค่าจาก 2-D PAGE | | ค่าจากการค้นหาในฐานข้อมูล TagIdent | | | | |
|---------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------------|---|---|------|-----------------------------|
| | pI | น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) | Accession number | ชื่อโปรตีน | ชนิดพืช | pI | น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) |
| 1 | 3.80 | 57.0 | AN321_ORYSJ (Q6YSF3) | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32-related protein 1 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. japonica (ข้าว) | 3.74 | 51.8 |
| 2 | 4.20 | 80.0 | P2C18_ORYSJ (A3A8Q4) | Probable protein phosphatase 2C 18 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. japonica (ข้าว) | 4.20 | 85.0 |
| 3 | 5.10 | 78.0 | HSP81_ORYSI (A2YWQ1) | Heat shock protein 81-1 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. indica (ข้าว) | 5.00 | 80.2 |
| 4 | 5.20 | 78.0 | SL11_ORYSI (A2ZLU6) | Protein spotted leaf 11 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. indica (ข้าว) | 5.20 | 75.3 |
| 5 | 5.30 | 78.0 | WNK1_ORYSI (A2YMV6) | Serine/threonine-protein kinase WNK1 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. indica (ข้าว) | 5.38 | 79.8 |
| 6 | 4.20 | 44.0 | ATX3_ORYSJ (Q8LQ36) | Putative ataxin-3 homolog | <i>Oryza sativa</i> sub sp. Japonica (ข้าว) | 4.24 | 36.2 |
| 7 | 5.00 | 44.0 | CCA33_ARATH (A0MEB5) | Cyclin-A3-3 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 5.05 | 38.1 |
| 8 | 5.40 | 45.0 | PSBD_COFAR (A0A330) | Photosystem II D2 protein | <i>Coffea arabica</i> (กาแฟ) | 5.33 | 39.6 |
| 9 | 6.10 | 41.0 | RPOA_RANMC (A1XGS0) | DNA-directed RNA polymerase subunit alpha | <i>Ranunculus macranthus</i> (ดอกบีตเตอร์คัพ) | 6.24 | 39.4 |
| 10 | 6.20 | 44.0 | COBL6_ARATH (O04500) | COBRA-like protein 6 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 6.19 | 45.7 |
| 11 | 6.30 | 41.0 | CHSY_PERFR (O04111) | Chalcone synthase | <i>Perilla frutescens</i> (พู่ลาช่อน) | 6.33 | 42.7 |
| 12 | 6.80 | 43.0 | ADHX_ORYSI (A2XAZ3) | Alcohol dehydrogenase class-3 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. indica (ข้าว) | 6.79 | 40.8 |
| 13 | 9.70 | 43.0 | TLP6_ARATH (Q0WPY0) | Tubby-like F-box protein 6 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 9.74 | 46.1 |

ตารางที่ 1 (ต่อ)

| หมายเลขจุด ของโปรตีน | ค่าจาก 2-D PAGE | | ค่าจากการค้นหาในฐานข้อมูล TagIdent | | | | |
|-------------------------|-----------------|--------------------------------|------------------------------------|--|---|------|--------------------------------|
| | pI | น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) | Accession number | ชื่อโปรตีน | ชนิดพืช | pI | น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) |
| 14 | 3.50 | 36.0 | NEP1_NEPGR (Q766C3) | Aspartic proteinase nepenthesin-1 | <i>Nepenthes gracilis</i> (หม้อข้าว หม้อแกงลิง) | 3.75 | 37.5 |
| 15 | 4.20 | 35.0 | PAP3_ARATH (O82291) | Probable plastid-lipid-associated protein 3, chloroplastic | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 4.17 | 34.6 |
| 16 | 4.90 | 34.0 | CHLL_ANGEV (A2T392) | Light-independent protochlorophyllide reductase iron-sulfur ATP-binding protein | <i>Angiopteris evecta</i> (เฟิร์น) | 4.96 | 31.7 |
| 17 | 5.50 | 39.0 | ODPB_CHLAT (A2CI50) | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta | <i>Chlorokybus atmophyticus</i> (สาหร่ายดิน) | 5.50 | 36.7 |
| 18 | 6.10 | 39.0 | SF21_HELAN (O23969) | Pollen-specific protein SF21 | <i>Helianthus annuus</i> (ดอกทานตะวัน) | 6.19 | 39.2 |
| 19 | 6.50 | 36.0 | AP2L3_ARATH (A0JPZ8) | AP2-like ethylene-responsive transcription factor At1g79700 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 6.57 | 34.2 |
| 20 | 4.20 | 29.0 | CHIA_CUCSA (P17541) | Acidic endochitinase | <i>Cucumis sativus</i> (แตงกวา) | 4.28 | 28.0 |
| 21 | 4.40 | 28.0 | ACTN_ACTDE (A5HII1) | Actinidain | <i>Actinidia deliciosa</i> (กีวี) | 4.42 | 27.4 |
| 22 | 5.70 | 27.0 | CEMA_NUPAD (A1XFW7) | Chloroplast envelope membrane protein | <i>Nuphar advena</i> (ดอกบัวเหลือง) | 5.78 | 26.7 |
| 23 | 6.10 | 24.0 | REHY_ARATH (O04005) | 1-Cys peroxiredoxin PER1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 6.12 | 24.1 |
| 24 | 6.60 | 24.0 | RAN2_ORYSI (A2Y7R5) | GTP-binding nuclear protein Ran-2 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. indica (ข้าว) | 6.66 | 25.0 |
| 25 | 7.70 | 27.0 | NDHK_NUPAD (A1XFV9) | NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K, chloroplastic | <i>Nuphar advena</i> (บัวเหลือง) | 7.61 | 25.3 |
| 26 | 9.50 | 26.5 | RR2_COFAR (A0A324) | 30S ribosomal protein S2, chloroplastic | <i>Coffea arabica</i> (กาแฟ) | 9.58 | 26.9 |

ตารางที่ 1 (ต่อ)

| หมายเลขจุด ของโปรตีน | ค่าจาก 2-D PAGE | | ค่าจากการค้นหาในฐานข้อมูล TagIdent | | | | |
|-------------------------|-----------------|--------------------------------|------------------------------------|---|--|------|--------------------------------|
| | pI | น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) | Accession number | ชื่อโปรตีน | ชนิดพืช | pI | น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) |
| 27 | 5.00 | 20.0 | SRS1_ORYSI (A2WMG6) | Salt stress root protein RS1 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. indica (ข้าว) | 4.91 | 21.8 |
| 28 | 3.80 | 17.5 | K501_ACTDE (P43393) | Fruit protein pKIWI501 | <i>Actinidia</i> <i>deliciosa</i> (กีวี) | 3.77 | 18.9 |
| 29 | 5.00 | 17.0 | TL16_ARATH (O22773) | Thylakoid lumenal 16.5 kDa protein, chloroplastic | <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> | 4.90 | 15.7 |
| 30 | 3.00 | 14.0 | BCP1_BRACM (P41507) | Anther-specific protein BCP1 | <i>Brassica</i> <i>campestris</i> (มัสตาร์ด) | 3.50 | 11.3 |
| 31 | 4.00 | 14.0 | CALM3_ORYSI (A2WNH1) | Calmodulin-3 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. indica (ข้าว) | 4.09 | 16.6 |
| 32 | 4.70 | 15.0 | NU3C_ANGEV (A2T338) | NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 3, chloroplastic | <i>Angiopteris</i> <i>evecata</i> (เฟิร์น) | 4.73 | 13.8 |
| 33 | 5.70 | 16.0 | SODC1_ORYSI (A2XGP6) | Superoxide dismutase [Cu-Zn] 1 | <i>Oryza sativa</i> sub sp. indica (ข้าว) | 5.71 | 15.1 |

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

รูปแบบการกระจายตัวของโปรตีนโอมใน 2-D PAGE ของตัวอย่างใบและดอกมีรูปแบบการกระจายที่คล้ายคลึงกัน โดยพบการกระจายตัวใน 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ ช่วง pI 4 - 7.5 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10 - 100 กิโลดาลตัน และช่วง pI 9.5 - 10 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15 - 50 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับการกระจายตัวของโปรตีนโอมบน 2-D PAGE ของตัวอย่างรากที่พบการกระจายตัวของจุดโปรตีนในสองช่วงเช่นเดียวกัน แต่มีค่า pI และมวลโมเลกุลต่างกันเล็กน้อย ส่วนในตัวอย่างของผลแก่พบการกระจายตัวของโปรตีนโอมบน 2-D PAGE เพียงกลุ่มเดียว

เมื่อตรวจสอบจำนวนโปรตีนโอมด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 พบว่ามีจุดของโปรตีนมากที่สุดในตัวอย่างดอก ผลแก่ ใบ และราก ตามลำดับ โดยมีจำนวนโปรตีนโอมอยู่ในช่วง 500 - 1,000 จุด จากจำนวนยีนทั้งหมดของมะละกอ 24,746 ยีน จากจีโนมขนาด 372 ล้านคู่เบส [19] ซึ่งจำนวนยีนทั้งหมด (genome) จะมีจำนวนมากกว่าจำนวนโปรตีนทั้งหมด (proteome) เนื่องจากในแต่ละอวัยวะและแต่ละช่วงเวลาจะมียีนเพียงบางยีนเท่านั้นที่จะแสดงออก และอาจมีการดัดแปลงภายหลังการแปลรหัส (post-translation modification) เป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตหรือตอบสนองต่อสิ่งเร้า

ณ ช่วงเวลานั้นๆ นอกจากนี้ การแสดงออกของยีนจะขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพีช อายุ และเวลาที่เก็บ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบจำนวนของจุดโปรตีนอยู่ในช่วง 553 - 967 จุด สอดคล้องกับรายงานของ Maldonado และคณะ [20] ที่พบว่า จำนวนจุดของโปรตีนที่ตรวจพบโดย 2-D PAGE จากตัวอย่างพีช จะอยู่ในช่วง 200 - 3,000 จุด ใกล้เคียงกับที่ Tsugita และ Kamo [21] รายงานว่า โปรตีโอมของพีชที่แยกโดย 2-D PAGE จะอยู่ในช่วง 200 - 2,000 จุด ต่อ 2-D PAGE ขนาด 22.5 x 22.5 เซนติเมตร

จากการเปรียบเทียบจุดของโปรตีนพบจุดของโปรตีนที่มีความเข้มสูง และพบในทุกส่วนของมะละกอ ทั้งในตัวอย่างใบ ดอก ผลแก่ และรากของมะละกอพันธุ์แขกนวล จำนวน 33 จุด เมื่อค้นหาชนิดของโปรตีนจากค่า *pI* และน้ำหนักโมเลกุลในฐานข้อมูล TagIdent พบว่า โปรตีนทั้ง 33 จุด ตรงกับโปรตีนสำคัญของพีชชนิดอื่น ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์และกระบวนการเมตาบอลิซึมของพีช เช่น protein phosphatase 2C, serine/threonine-protein kinase WNK1, photosystem II D2 protein และ pyruvate dehydrogenase E1 เป็นต้น [22 - 24] โปรตีนสำคัญในกระบวนการแปลรหัสของ RNA เช่น DNA-directed RNA polymerase subunit alpha [25] รวมทั้งโปรตีนสำคัญที่ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพีช เช่น AP2-like ethylene-responsive transcription factor At1g79700 และ Anther-specific protein BCP1 เป็นต้น [26, 27] แต่ยังไม่พบโปรตีนที่ตรงกับฐานข้อมูลมะละกอ เนื่องจากจำนวนข้อมูลโปรตีนของมะละกอในฐานข้อมูล TagIdent ยังมีอยู่จำกัด

อย่างไรก็ตาม คาดว่าโปรตีนที่ตรวจพบจะเป็นโปรตีนในกลุ่ม house keeping protein [28] ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นในการดำรงชีวิต เช่น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน รวมทั้งเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมที่สำคัญ เช่น เอนไซม์ในวิถีไกลโคไลซิส และวัฏจักรเครปส์ [29] จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในส่วนต่างๆ ของพีชชนิดต่างๆ พบว่า โปรตีนที่มีการแสดงออกในใบเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มการสร้างพลังงานและใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงและการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น เอนไซม์ Rubisco เป็นต้น สำหรับโปรตีนที่มีการแสดงออกในดอกส่วนใหญ่เกี่ยวกับกระบวนการสร้างพลังงาน ได้แก่ กระบวนการไกลโคไลซิส ไพรูเวตเมตาบอลิซึม และวัฏจักร Tricarboxylic acid (TCA) [30] ส่วนโปรตีนที่มีการแสดงออกในผลเป็นกลุ่มของการสร้างพลังงาน กระบวนการป้องกัน กระบวนการตอบสนองต่อความเครียด และกระบวนการเมตาบอลิซึม [31] กลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกในรากส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของกระบวนการป้องกันเชื้อโรค [32] โดยเฉพาะเอนไซม์ peroxidase ซึ่งมีบทบาทในการกำจัดสารพิษจากเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide detoxification) ที่เกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย รวมถึงเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ลิกลิน [33]

อนึ่ง โปรตีนจุดที่ 18 (pollen-specific protein SF21) โปรตีนจุดที่ 27 (salt stress root protein RS1) และโปรตีนจุดที่ 30 (anther-specific protein BCP1) เป็นโปรตีนชนิดที่มีความจำเพาะเฉพาะจงต่ออวัยวะของพีช แต่กลับพบในทุกส่วนของตัวอย่างมะละกอ เนื่องจากข้อจำกัดของเทคนิค 2-D PAGE แม้ว่าจะสามารถแยกและมองเห็นจุดของโปรตีนได้หลายร้อยจุดของโปรตีนต่อการแยก แต่มีข้อจำกัดที่จะมองเห็นได้เฉพาะโปรตีนที่มีปริมาณมากในเซลล์ ในกรณีโปรตีนที่มีความเข้มข้นต่ำ อาจถูกบดบังโดยโปรตีนที่มีปริมาณมากได้ หรือโปรตีนที่มีค่า *pI* และน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันอาจมีการซ้อน

ทับกัน [34] อีกทั้ง โปรแกรม TagIdent เป็นเพียงการทำนายชนิดของโปรตีนจากค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล ในกรณีที่โปรตีนมีค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน อาจเกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ ดังนั้น ควรมีการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry เช่น MALITO-TOF MS หรือ LC-MS ซึ่งมีความแม่นยำมากขึ้น เพื่อยืนยันชนิดของโปรตีนเหล่านั้น [35] เพื่อศึกษาหาชนิดของโปรตีน ที่เป็น house keeping protein ในเชิงลึกต่อไป เนื่องจากโปรตีนสำคัญเหล่านี้จะนำไปเป็นองค์ความรู้ พื้นฐานในการพัฒนาไปสู่การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมะละกอ การปรับปรุงพันธุ์มะละกอ และการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม หรือการประยุกต์ใช้ประโยชน์อื่นๆ จากโปรตีโอมิกส์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัย ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่สนับสนุนงบประมาณบางส่วนในการวิจัย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้งบประมาณในการสนับสนุนการวิจัยในโครงการ BT-B-01-PG-11-4910

เอกสารอ้างอิง

1. ประพันธ์ นันระไชย. 2525. แนวทางการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ. รายงานการประชุมสัมมนาการเกษตร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มะละกอ ครั้งที่ 1. ท่าพระ ขอนแก่น. สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. 183 หน้า.
2. Tyman, R. M. 2004. Principle of Proteomics. U.K. Bios Scientific Publisher, York.
3. Canovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H. P., and Rossignol, M. 2004. Plant Proteome Analysis. *Proteomics* 4: 285-298.
4. Rossignol, M., Peltier, J., Mock, H., Matros, A., Maldonado, A. M., and Jorin, J. V. 2006. Plant Proteome Analysis: A 2004 - 2006 update. *Proteomics* 6: 5529 - 5548.
5. Tanaka, N., Matsuoka, M., Kitano, H., and Asano, T. 2006. *gid1*, a Gibberellin-Insensitive Dwarf Mutant, Shows Altered Regulation of Probenazole-inducible Protein (PBZ1) in Response to Cold Stress and Pathogen Attack. *Plant Cell Environment* 29: 619 - 631.
6. Lee, J., Bricker, T. M., Lefevre, M., Pinson, S. R. M., and Oard, J. H. 2006. Proteomic and Genetic Approaches to Identifying Defense-related Proteins in Rice Challenged with the Fungal Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant Pathology* 7: 405 - 416.
7. Herman, E. M., Rotter, K., Premakumar, R., and Elwinger, G. 2006. Additional Freeze Hardiness in Wheat Acquired by Exposure to -3 Degrees C Is Associated with Extensive Physiological, Morphological, and Molecular Changes. *Journal of Experimental Botany* 57: 3601 - 3618.

8. Rampitsch, C., Bykova, N. V., McCallum, B., Beimcik, E., and Ens, W. 2006. Analysis of the Wheat and *Puccinia triticina* (Leaf Rust) Proteomes during a Susceptible Host-Pathogen Interaction. *Proteomics* 6: 1897 - 1907.
9. Jain, S., Srivastava, S., Sarin, N. B., and Kav, N. N. V. 2006. Proteomics Reveals Elevated Levels of PR10 Proteins in Saline-Tolerant Peanut (*Arachis hypogaea*) Calli. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 253 - 259.
10. Agrawal, G. K., Yonekur, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H., and Rakwal, R. 2005. System, Trends and Perspectives of Proteomics in Dicot Plants Part III: Unraveling the Proteomes Influenced by the Environment, and at the Levels of Function and Genetic Relationships. *Journal of Chromatography* 815: 137 - 145.
11. Corpillo, D., Gardini, G., Vaira, A. M., Basso, M., Aime, S., Accotto, G. P., and Fasano, M. 2004. Proteomics as a Tool to Improve Investigation of Substantial Equivalence in Genetically Modified Organisms: The Case of a Virus-resistant Tomato. *Proteomics* 4: 193 - 200.
12. Lehesranta, S. J., Davies, H. V., Shepherd, L. V., Nunan, N., McNicol, J. W., Auriola, S., Koistinen, K. M., Suomalainen, S., Kokko, H. I., and Karenlampi, S. O. 2005. Comparison of Tuber Proteomes of Potato Varieties, Landraces, and Genetically Modified Lines. *Plant Physiology* 138: 1690 - 1699.
13. Westermeier, R., and Naven, T. 2002. Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis. UK. Wiley-VHC, Little Chalfont.
14. Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 - 254.
15. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685.
16. Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. 1987. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* 8: 93 - 99.
17. Schneider, M., Tognolli, M., and Bairoch, A. 2004. The Swiss-Prot Protein Knowledgebase and ExPASy: Providing the Plant Community with High Quality Proteomic Data and Tools. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 1013 - 1021.
18. Blackstock, W. P., and Weir, M. P. 1999. Proteomics: Quantitative and Physical Mapping of Cellular Proteins. *Trends Biotechnology* 17: 121 - 127.
19. Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu Q., Dionne-Laporte, A., Saw J. H., Senin, P., Wang W., Ly, B. V., Lewis, K. L., Salzberg, S. L., Feng, L., Jones, M. R., Skelton, R. L., Murray, J. E., Chen, C., Qian, W., Shen, J., Du, P., Eustice, M., Tong, E., Tang, H., Lyons, E., Paull, R. E., Michael, T. P., Wall, K., Rice, D. W., Albert, H., Wang, M., Zhu, Y. J., Schatz, M., Nagarajan,

- N., Acob, R. A., Guan, P., Blas, A., Wai, C. M., Ackerman, C. M., Ren, Y., Liu, C., Wang, J., Wang, J., Na, J., Shakirov, E. V., Haas, B., Thimmapuram, J., Nelson, D., Wang, X., Bowers, J. E., Gschwend, J. R., Delcher, A. L., Singh, R., Suzuki, J. Y., Tripathi, S., Neupane, K., Wei, H., Irikura, B., Paidi, M., Jiang, N., Zhang, W., Presting, G., Windsor, A., Navajas-Pérez, R., Torres, M. J., Feltus, A., Porter, B., Li, Y., Burroughs, M., Luo, M., Liu, L., Christopher, D. A., Mount, S. M., Moore, P. M., Sugimura, T., Jiang, J., Schuler, M. A., Friedman, V., Mitchell-Olds, T., Shippen, D. E., dePamphilis, C. W., Palmer, J. D., Freeling, M., Paterson, A. H., Gonsalves, D., Wang, L., and Alam, M. 2008. The Draft Genome of the Transgenic Tropical Fruit Tree Papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452: 991 - 997.
20. Maldonado A. M., Echevarría-Zomeña, S., Jean-Baptiste, S., Hernandez, M., and Jorin-Novo, J. V. 2008. Evaluation of Three Different Protocols of Protein Extraction for *Arabidopsis thaliana* Leaf Proteome Analysis by Two-Dimensional Electrophoresis. *Journal of Proteomics* 71: 461 - 472.
21. Tsugita, A., and Kamo, M. 1999. 2-D Electrophoresis of Plant Proteins. pp. 95 - 97. In: Link, A. J. Editors. 2-D Proteome Analysis Protocols. New Jersey. Human Press.
22. Marley, A. E., Sullivan, J. E., Carling, D., Abbott, W. M., Smith, G. J., Taylor, I. W., Carey, F., and Beri, R. K. 1996. Biochemical Characterization and Deletion Analysis of Recombinant Human Protein Phosphatase 2C Alpha. *Biochemical Journal* 320: 801 - 806.
23. Goldsmith, E. J., Akella, R., Min, X., Zhou, T., and Humphreys, J. M. 2007. Substrate and Docking Interactions in Serine/Threonine Protein Kinases. *Chemical Review* 107: 5065 - 5081.
24. Boekema, E. J., Hankamer, B., Bald, D., Kruij, J., Nield, J., Boonstra, A. F., Barber, J., and Rogner, M. 1995. Supramolecular Structure of the Photosystem II Complex from Green Plants and Cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 175 - 179.
25. Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S. 1996. Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-Coding Regions. *DNA Research* 3: 109 - 136.
26. Feng, J., Liu, D., Pan, Y., Gong, W., Ma, L., Luo, J., Deng, X. W., and Zhu, Y. 2005. An Annotation Update via cDNA Sequence Analysis and Comprehensive Profiling of Developmental, Hormonal or Environmental Responsiveness of the *Arabidopsis* AP2/EREBP Transcription Factor Gene Family. *Plant Molecular Biology* 59: 853 - 868.

27. Theerakulpisut, P., Xu, H., Singh, M. B., Pettitt, J. M., and Knox, R. B. 1991. Isolation and Developmental Expression of Bcp1, an Anther-specific cDNA Clone in *Brassica campestris*. *Plant Cell* 3: 1073 - 1084.
28. Garfin, D. E. 2003. Two-dimensional Gel Electrophoresis: An Overview. *Trends in Analytical Chemistry* 22: 263 - 272.
29. Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., and Svensson, B. 2002. Proteome Analysis of Grain Filling and Seed Maturation in Barley. *Plant Physiology* 129: 1308 - 1319.
30. Watson, B. S., Asirvatham, V. S., Wang, L., and Sumner, L. W. 2003. Mapping the Proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology* 131: 1104 - 1123.
31. Sarry, J., Sommerer, N., Sauvage, F., Bergoin, A., Rossignol, M., Albagnac, G., and Romieu, C. 2003. Grape Berry Biochemistry Revisited Upon Proteomic Analysis of the Mesocarp. *Proteomics* 4: 201 - 215.
32. Agrawal, G. K., Yonekura, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H., and Rakwal, R. 2003. System, Trends and Perspectives of Proteomics in Dicot Plants: Part II: Proteomes of the Complex Developmental Stages. *Journal of Chromatography B* 815: 125 - 136.
33. Peng, H., Dreyer, D. A., VandenBosch, K. A., and Cook, D. 1996. Gene Structure and Differential Regulation of the *Rhizobium*-Induced Peroxidase Gene rip7'. *Plant Physiology* 112: 1437 - 1446.
34. Issaq, H. J., and Veenstra, T. D. 2008. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (2D-PAGE): Advances and Perspectives. *BioTechniques* 44: 697 - 700.
35. Mukhopadhyay, S., Miller, R. D., Sullivan, E. D., Theodoropoulos, C., Mathews, S. A., Timms, P., and Summersgill, J. T. 2006. Protein Expression Profiles of *Chlamydia pneumoniae* in Models of Persistence versus Those of Heat Shock Stress Response. *American Society for Microbiology* 74: 3853 - 3863.

ได้รับบทความวันที่ 8 ธันวาคม 2552

ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 5 มกราคม 2553

