บทคัดย่อ

T 150502

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจลนศาสตร์การสังเคราะห์ recombinant NS1 protein โดยใช้ระบบ Baculovirus Expression Vector System (BEVS) ที่อาศัยเซลล์แมลง (*Spodoptera frugiperda*, Sf-9) เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตโปรตีน โดยการ infection ของ recombinant NS1 baculovirus ซึ่งเป็นแบคคิวโลไวรัสที่ผ่านกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม ให้มียีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ NS1 protein ของไวรัสเดงกี่ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการเจริญของเซลล์แมลง การใช้สารอาหาร และการสะสมของ by-products ในเซลล์แมลง Sf-9 ทั้งก่อนและหลังการ infection ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงพบว่า เซลล์ Sf-9 มีการเจริญจนถึงความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ $1.1x10^7$ cells/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ SF-900II และ TC100 ร่วมกับ Fetal bovine serum (FBS) ในอัตราส่วน 45% 45% และ 10% ตามลำดับ โดยมีค่า maximum specific growth rate เท่ากับ 0.031 h^{-1} ในด้านการใช้สารอาหารของเซลล์ Sf-9 พบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้มีปริมาณกลูโคสจำกัด มีผลทำให้การเจริญของเซลล์ลดลง ส่วนกรดอะมิโนแต่ละชนิดนั้นมีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญของเซลล์และกรดอะมิโนที่มีปริมาณการใช้มากที่สุด ได้แก่ glutamine และพบการสะสมของ alanine lactate และ ammonia ในปริมาณ 12, 4.3 และ 27 mmol/L ตามลำดับ

สำหรับผลการศึกษาเซลล์แมลงภายหลังถูก infection ด้วย recombinant NS1 baculovirus ด้วยปริมาณต่างๆ ได้แก่ Multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 0.5, 1, 5 และ 10 พบว่า กลูโคสและกรดอะมิโนในอาหารที่ใช้มีปริมาณเพียงพอ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลล์มีการเจริญและการใช้สารอาหารต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ Sf-9 ที่ไม่ถูก infection โดยกรดอะมิโนที่ถูกใช้ไปเป็นปริมาณมากที่สุดคือ glutamine เช่นเดียวกับเซลล์ Sf-9 ที่ไม่ถูก infection และพบว่ามีการสะสมของ alanine lactate และ ammonia ในปริมาณที่ต่ำกว่าเซลล์ Sf-9 ที่ไม่ถูก infection โดยปริมาณการสะสมของกรดอะมิโนและสารเหล่านี้จะลดลงเมื่อใช้ปริมาณไวรัสในการ infection ที่ MOI สูงขึ้น สำหรับปริมาณไวรัสต่อเซลล์แมลง (MOI) ที่ทำให้ได้ปริมาณ recombinant NS1 protein มากที่สุด คือ MOI 1 โดยสามารถผลิตได้ประมาณ 99 mg/L ในวันที่ 7 หลังจากทำการ infection

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิต recombinant NS1 protein เช่น ควรใช้ MOI ในการ infection ที่เหมาะสม คือ MOI 1 ซึ่งทำให้ได้ปริมาณ recombinant NS1 protein สูงสุด นอกจากนั้นอาจทำการปรับปรุงสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ Sf-9 โดยการลดปริมาณของกรดอะมิโนในอาหารลงเนื่องจากมีปริมาณที่มากเกินพอ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต recombinant NS1 protein

คำสำคัญ : แบคคิวโลไวรัส / เซลล์แมลง Sf-9 / recombinant NS1 protein / จลนศาสตร์

Abstract

TE150502

Recombinant dengue viral (NS1) protein was produced from Baculovirus Expression Vector System (BEVS). Insect cells were used as hosts for the production of recombinant NS1 protein when infected with recombinant NS1 baculovirus that had been engineered by insertion of NS1 gene into the baculovirus genome. This study focused on the kinetic of recombinant dengue viral (NS1) protein synthesis by insect cell culture. The growth and nutrient consumption and by-products accumulation of uninfected and infected Sf-9 cells were examined. The results from the study of Sf-9 culture showed that the maximum cell density and specific growth rate of Sf-9 cells were $1.1x10^{7}$ cells/ml and 0.031 h^{-1}, respectively. Glucose depleted during the culture period and the limitation of glucose correlated with decreasing of viable cell density. Amino acids were not limited throughout cell growth and glutamine was consumed at the highest rate. Alanine, lactate and ammonia were found to be accumulated to approximately 12, 4.3 and 27 mmol/L, respectively.

Sf-9 cells were infected with various amounts of recombinant NS1 baculovirus (MOI 0.5, 1, 5 and 10). The nutrient consumptions and by-products accumulations of infected cell culture were examined. The results showed that unlike non infected Sf-9 cells, glucose and glutamine in infected Sf-9 cell culture were not limited because the growth rate and nutrient consumption rate of infected Sf-9 cells were lower than uninfected Sf-9 cells. Glutamine was the highest consumed amino acid. The alanine, lactate and ammonia accumulation rates were lower than uninfected culture and decrease with the increasing multiplicity of infection (MOI) of recombinant NS1 baculovirus. Maximum yield (99 mg/L) of recombinant dengue viral NS1 protein was obtained from the cells infected with MOI 1 at 7 days post infection.

The information obtained from this study can be used for recombinant NS1 protein production such as the optimal amount of recombinant baculovirus used to infect into Sf-9 cells growing at early exponential phase was at MOI 1 and this information can used for design the low cost formula of medium for culturing Sf-9 cells such as lower amounts of amino acids in medium can be used.

Keywords : Baculovirus / Sf-9 cells / Recombinant NS1 Protein / Kinetic