

โปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ที่สร้างจากธรรมชาติได้ในปริมาณต่ำ สามารถถูกผลิตให้มีปริมาณสูง และยังคงคุณสมบัติทางชีวภาพเหมือนโปรตีนธรรมชาติได้โดยอาศัยความรู้ และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยอาศัยเทคนิคการตัดต่อยีน และนำเข้าพลาสมิด DNA เพื่อทำการผลิตโปรตีนที่ต้องการ ในระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม เซลล์เจ้าบ้านหลายชนิดได้ถูกทดลองใช้ผลิตชีววิศวกรรมโปรตีน (Bioengineered protein) นี้ โดยแต่ละระบบต่างก็มีทั้งข้อดีและข้อเสียในตัวเอง ปัจจุบันยังไม่พบว่ามีระบบเซลล์เจ้าบ้านใดที่จะเหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนได้ทุกชนิด เซลล์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ก็เป็นระบบเซลล์เจ้าบ้านหนึ่งที่มีความนิยมสูงในการผลิตชีววิศวกรรมโปรตีนสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค การผลิตวัคซีน และเอ็นไซม์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรม ดังนั้นในงานวิจัยนี้มุ่งหมายที่จะพัฒนาระบบการผลิตโปรตีนจากการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นเซลล์เจ้าบ้านโดยเลือกผลิตโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มไวรัสเด็งกี (dengue envelope protein) ซีโรไทป์ 2 เป็นต้นแบบของการศึกษา เนื่องจากปัญหาของโรคติดต่อเชื้อไข้เลือดออก เป็นปัญหาใหญ่ปัญหาหนึ่งของการสาธารณสุขของประเทศ ประกอบกับความรู้ทางด้านอนุพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัสเด็งกี ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคดังกล่าวที่มีมากขึ้น ได้ดัดแปลง Yeast expression vector 2 ชนิด ที่ใช้โปรโมเตอร์ต่างกันขึ้น ได้แก่ pYC301 ซึ่งใช้โปรโมเตอร์ชนิดที่ถูกควบคุมได้ (regulated promoter) จากยีน *PHO84* ซึ่งใช้ระดับความเข้มข้นของ inorganic phosphate ในอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมการผลิตโปรตีนที่ต้องการ และ pYC304 ซึ่งใช้โปรโมเตอร์ชนิดที่มีการชักนำให้เซลล์มีการผลิตโปรตีนที่ต้องการตลอดเวลา (constitutive promoter) จากยีน *PGK* โดย cDNA ของยีนสำหรับโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มไวรัสเด็งกี (Den2E) ได้ถูกโคลนเข้าไปใน pYC301 และ pYC304 ตามลำดับ โปรตีนผลผลิตที่ได้จะเป็นชนิดที่อยู่ภายในเซลล์ Recombinant DNA ที่ได้ถูกนำเข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ 12T7C และ JEL-1 ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี Western blot จาก crude protein lysate ของ recombinant yeast สายพันธุ์ 12T7C[pYC301/Den2E] พบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตันที่ใกล้เคียงกับโปรตีนชนิดเดียวกันกับที่ผลิตจากระบบที่ใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน แต่ไม่พบโปรตีนดังกล่าวใน crude protein lysate ของ สายพันธุ์ JEL-1[pYC301/Den2E] และของสายพันธุ์ 12T7C[pYC304/Den2E] โดยโปรตีนที่ผลิตได้จากยีสต์นี้ สามารถทำปฏิกิริยาที่จำเพาะได้กับ polyclonal antibodies จากน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก (pooled convalescent sera: PCS) แต่ไม่ทำปฏิกิริยาที่จำเพาะกับ monoclonal antibody (3H5) เนื่องจากปลายด้าน 5' ของ cDNA สำหรับโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มไวรัสเด็งกีมีลำดับเบสสำหรับกรดอะมิโน histidine 6 ขุดอยู่ ซึ่งกรดอะมิโน histidine 6 ขุดทางด้าน N- ของโปรตีนผลผลิตที่ผลิตได้จากยีสต์ จับได้กับ Ni-NTA agarose (ด้วยหลักการ immuno affinity ระหว่าง Ni^{2+} ของ resin กับกรดอะมิโน histidine 3-6 ขุด ของโปรตีนผลผลิต) อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนดังกล่าวที่ผลิตได้ต่ำมาก ปัจจัยต่างๆที่อาจเป็นสาเหตุที่ได้ผลผลิตต่ำได้ถูกเสนอไว้ในงานวิจัยนี้ ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้คือสามารถพัฒนาระบบยีสต์ *S. cerevisiae* ให้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตชีววิศวกรรมโปรตีนได้ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของ inorganic phosphate ต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ แม้ว่าจะยังต้องการการศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบถึงสาเหตุของการที่ได้ผลผลิตของโปรตีนดังกล่าวที่ต่ำ เพื่อว่าจะได้สามารถปรับปรุงให้มีการผลิตในปริมาณที่สูงขึ้นได้ต่อไป แต่งานวิจัยนี้จะ เป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาระบบดังกล่าวในการผลิตโปรตีนที่มีคุณค่าสูงชนิดอื่นๆที่ใช้ระบบยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นเซลล์เจ้าบ้านต่อไป

Proteins especially those from eukaryotes which are produced in relatively low amount can be expressed in large quantity while retaining their biological activities using the knowledge and techniques of molecular bioengineering. By doing genetic manipulation and uptaking the plasmid DNA into cells of suitable host organisms, cells from several organisms were used as host systems to produce desired bioengineered proteins. However, each system have advantages and disadvantages, there is no existing expression system suitable for production of all kinds of proteins by present molecular biology techniques. Heterologous gene expression in *S. cerevisiae* for production of pharmaceutical agents, antigens for vaccines or industrial enzymes, is one of the systems oftenly used. This project aimed at studying the heterologous gene expression in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) using Dengue viral gene encoded envelope protein for Dengue virus serotype 2 as a model gene for the expression. Since Dengue viral infection is still one of the major public health problems in Thailand and much current knowledge of molecular biology of Dengue virus was known. Two kinds of promoter were chosen and used in modified expression vectors respectively: one was regulated promoter from *PHO84* (the gene encodes P_i transporter) and the other was constitutive promoter from *PGK* (the gene encodes phosphoglyceratekinase). cDNA encodes envelope protein of Dengue virus serotype 2 viral protein (Den2E) was cloned into these modified yeast expression vectors (pYC301 and pYC304). The recombinant plasmids were then transformed into cells of *S. cerevisiae* (strain 12T7C and JEL-1). Western blot was used for screening the expression of dengue viral gene from crude protein lysates prepared from cells of the yeast transformants. The lysates from cells of transformant 12T7C[pYC301/Den2E] grown in low- P_i condition (0.22 mM KH_2PO_4) were successfully detected the expressed protein though in very low amount. However, the lysates from those of the transformants JEL-1[pYC301/Den2E] and 12T7C[pYC304/Den2E] failed to be detected. The expressed protein of 12T7C[pYC301/Den2E] has relatively same size of approximately 55 kDa as that expressed from *E. coli* system (as positive control). The expressed protein could react with pooled convalescent sera (PCS) from dengue infected patient but not with the specific monoclonal antibody (3H5). Using immuno affinity method, Ni-NTA agarose could capture the expressed protein whose N-terminal contains six copies of histidine residues which could react to Ni^{++} . Several possible factors caused the low expression level were discussed. From this study, the system utilized inorganic phosphate controlled heterologous gene expression in *S. cerevisiae* was developed. The system still need further studies on the cause(s) of the low expression. In order to further improve the yield of expression. This study could serve as a basis for production of other high value protein using this expression system.