

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยการพัฒนาการผลิต recombinant proteins จาก *Escherichia coli* โดยใช้อินซูลิน HMR1423 เป็นตัวนำร่อง

การผลิตโปรตีนจากเทคโนโลยีเอ็นเอสายผสมได้มีการศึกษาและนำมาใช้ผลิตโปรตีนซึ่งเรียกว่า recombinant proteins อย่างกว้างขวาง ข้อดีของการผลิตโปรตีนด้วยเทคนิคนี้เช่น สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก ในระยะเวลาค่อนข้างสั้นเนื่องจากใช้สิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนเป็นเซลล์เจ้าบ้าน โครงการวิจัยนี้เริ่มต้นจากการใช้ *Escherichia coli* ในการนำร่องผลิตอินซูลินชนิด HMR1423 ซึ่งเป็นอินซูลินชนิดออกฤทธิ์นานและมีคุณสมบัติหลายอย่างที่ใกล้เคียงกับอินซูลินของมนุษย์ โดยการโคลนยีนอินซูลินชนิด wild type และ HMR1423 เข้าในพลาสมิด pBluescriptII KS(+) และ pQE-30 Xa แล้วให้แสดงออกใน *E. coli* อย่างไรก็ตามพบว่าไม่สามารถตรวจพบอินซูลินที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตดังกล่าว และยีน HMR1423 ไม่ถูกต้อง จากความยุ่งยากที่เกิดขึ้นประกอบกับความยุ่งยากอื่นที่อาจพบต่อไป เช่น การสกัดโปรตีน รวมทั้งโปรตีนที่ต้องการอาจมีลักษณะและคุณสมบัติต่างจากโปรตีนต้นแบบ จึงได้เปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านเป็นยีสต์ *P. pastoris* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอตที่ไม่ซับซ้อน และมีความเหมาะสมกว่าในการใช้ผลิตอินซูลินที่เป็นโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต เมื่อทำการใส่ยีน HMR1423 ลงบนโครโมโซมของ *P. pastoris* แล้วได้ทำการศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิและแหล่งไนโตรเจนต่อการแสดงออกของยีนอินซูลิน HMR1423 เปรียบเทียบกับยีนอินซูลิน MIP จากการศึกษาพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM *P. pastoris* สายพันธุ์ MIP ผลิตอินซูลินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 °C แต่สายพันธุ์ที่ผลิต HMR1423 ผลิตโปรตีนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 30 °C อินซูลิน HMR1423 ผลิตได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 32.74 µg/ml ณ ชั่วโมงที่ 24 โดยมี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่ อินซูลิน MIP ผลิตได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 42.52 µg/ml ณ ชั่วโมงที่ 48 โดยมี Yeast extract+Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยที่อัตราการเจริญเติบโตไม่ได้แสดงถึงความสามารถในการผลิตอินซูลิน ดังนั้นในการผลิต recombinant proteins ปัจจัยต่างๆ เช่น ยีนอุณหภูมิ แหล่งไนโตรเจน เป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงเป็นอย่างยิ่ง เพราะแม้จะเป็นยีนเดียวกันที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันไม่มาก ก็ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนที่ต่างกัน

คำสำคัญ: recombinant proteins, อินซูลิน HMR1423, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

The development of recombinant protein production from *Escherichia coli* by using insulin analogue HMR1423 as a navigator

The recombinant DNA technology has been widely studied and applied for production of proteins, so-called recombinant proteins. Benefits of this technique include producing high yield of proteins in a relatively short period of time. Organisms used for recombinant protein production are usually simple. In the beginning of this project, *Escherichia coli* was chosen as a host for producing wild type insulin and the insulin analogue HMR1423 which is a long-acting insulin with many similar properties as the regular human insulin. The wild type and HMR1423 insulin genes were cloned into pBluescriptII KS(+) and pQE-30 Xa for the insulin expression in *E. coli*. However, recombinant insulin could not be detected and HMR1423 DNA sequence was not correct. With this and further potential complications such as recombinant protein extraction, the altered structures and properties of the recombinant proteins, expression system was switched to *Pichia pastoris*. *P. pastoris* is a kind of yeasts which is a simple eukaryotic organism, so it is potentially suitable to be a host for producing eukaryotic proteins such as insulin. The HMR1423 gene was integrated onto *P. pastoris* chromosome, then the effects of temperature and nitrogen sources on HMR1423 expression comparing to the insulin MIP were investigated. In this research, MIP is better produced at 20°C while at 30°C for HMR 1423 in BM medium. Moreover, at 30°C, HMR1423 can be detected at the most concentration, 32.74 µg/ml, at hour 24 with (NH₄)₂SO₄ as the nitrogen source while MIP can be detected at the most concentration, 42.52 µg/ml, at hour 48 with Yeast extract+Peptone as the nitrogen source. However, the growth rates of the cultures in this study do not usually indicates the efficiency of recombinant protein expression. From this project, it is suggested that factors such as genes, temperature and nitrogen sources are very important to be concerned for recombinant protein production. Although the same genes with few differences in amino acid sequence are used, conditions for growth and protein production are significantly different.

Keywords: recombinant proteins, insulin analogue HMR1423, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*