

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยการพัฒนาการผลิต Recombinant Proteins จาก *Escherichia coli* โดยใช้
อินซูลิน HMR1423 เป็นตัวนำร่อง

THE DEVELOPMENT OF RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION FROM
Escherichia coli BY USING INSULIN ANALOGUE HMR1423 AS A NAVIGATOR

อ.ดร.ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการทุนสนับสนุนนักวิจัยใหม่ (วท.)

ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รศ.ดร. อมร เพชรสม อดีตผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ปัจจุบันดำรงตำแหน่งคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และรศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวนิช ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ น.ส. ศศิธร เงินประเสริฐศิริ นิสิตปริญญาโทที่ทำงานอย่างหนักในโครงการวิจัยนี้ งานวิจัยนี้ถือได้ว่าเป็นงานวิจัยแรกหลังจากข้าพเจ้าจบการศึกษา มา ซึ่งศศิธรก็เป็นนิสิตในความดูแลของข้าพเจ้าเป็นคนแรกอย่างเต็มตัว ในการทำงานวิจัยนี้เราพบปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ มากมาย แต่สุดท้ายเพราะความตั้งใจในการทำงานและการทำงานอย่างหนักก็ทำให้รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เล่มนี้เกิดขึ้นได้

ขอขอบพระคุณ อ.ดร. ศรีนทิพ สุกใส อาจารย์ประจำสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำปรึกษาและเทคนิคต่างๆ เกี่ยวกับ *Pichia pastoris* รวมถึงอนุเคราะห์ให้ใช้ *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มียีน MIP ที่อาจารย์ทำการสร้างเพื่อการทำวิจัยในโครงการนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ อ.ดร. นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ประจำสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับเทคนิคด้านอิมมูโนวิทยาสำหรับการตรวจหาปริมาณอินซูลิน

ขอขอบพระคุณบุคคลากรทุกท่านในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือทุกอย่างจนรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้สำเร็จได้

และสุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณโครงการทุนสนับสนุนนักวิจัยใหม่ (วท.) ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สำหรับทุนวิจัยในโครงการนี้ ทุนวิจัยนี้ถือได้ว่าเป็นทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอกทุนแรกของข้าพเจ้านับว่ามีคุณค่ากับข้าพเจ้าเป็นอย่างมาก ทั้งนี้แม้ว่าได้กระทำการบางสิ่งบางอย่างผิดพลาดไปบ้าง แต่ก็ถือว่าเป็นงานวิจัยที่ข้าพเจ้าภูมิใจอย่างยิ่ง

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*

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (ABSTRACT).....	ค
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	5
2.1 อุปกรณ์.....	5

2.2 จุลินทรีย์ พลาสมิด และไพรเมอร์.....	7
2.2.1 พลาสมิด.....	7
2.2.2 จุลินทรีย์.....	7
2.2.3 ไพรเมอร์.....	8
2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายและบัฟเฟอร์.....	8
2.3.1 อาหารเหลว LB.....	8
2.3.2 อาหารแข็ง LB.....	8
2.3.3 อาหารเหลว LB low salt	8
2.3.4 Lysis Buffer	8
2.3.5 อาหารแข็ง YPD.....	9
2.3.6 อาหารเหลว YPG	9
2.3.7 อาหารเหลว BM.....	9
2.3.8 สารละลาย PTM ₁	9
2.3.9 สารละลาย PBS.....	9
2.3.10 สารละลาย PBST	9
2.4 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	9
2.4.1 การสร้าง <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่สามารถผลิตอินซูลิน wild type และ HMR1423.....	9
2.4.2 การแสดงออกของอินซูลิน wild type และ HMR1423 ใน <i>E. coli</i>	10
2.4.3 การสร้าง <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ที่สามารถผลิตอินซูลิน HMR1423.....	10
2.4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wild type และ HMR1423 ด้วยวิธี DNA Sequencing.....	11
2.4.5 การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของอินซูลิน HMR1423 ใน <i>P. pastoris</i> GS115 Mut ⁺ (<i>his4</i>)	11
2.4.6 การศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนต่อการแสดงออกของอินซูลิน HMR1423 ใน <i>P. pastoris</i> GS11 Mut ⁺ (<i>his4</i>).....	11
2.4.7 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight) ของ <i>P. pastoris</i>	12
2.4.8 การหาความเข้มข้นของอินซูลินด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA.....	12

3.	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	16
3.1	การสร้างและการแสดงออกของ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน wild type และ HMR1423.....	16
3.2	การสร้าง <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ที่สามารถผลิตอินซูลิน HMR1423.....	17
3.3	ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ <i>P. pastoris</i> GS115 Mut ⁺ (<i>his4</i>) ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423.....	17
3.4	ผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของ <i>P. pastoris</i> GS115 Mut ⁺ (<i>his4</i>) ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423.....	18
3.5	ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของอินซูลิน MIP และ HMR1423 ใน <i>P. pastoris</i> GS115 Mut ⁺ (<i>his4</i>).....	19
3.6	ผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนต่อการแสดงออกของอินซูลิน MIP และ HMR1423 ใน <i>P. pastoris</i> GS115 Mut ⁺ (<i>his4</i>).....	21
4.	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	35
4.1	สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	35
4.2	ข้อเสนอแนะ.....	36
	ภาคผนวก	37
	ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่างจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค Competitive Indirect ELISA.....	37
	บรรณานุกรม.....	41
	ประวัติผู้วิจัย.....	43

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 อัตราการเจริญเติบโตของ <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C.....	23
3.2 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C	24
3.3 ความเข้มข้นของอินซูลินที่ <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ผลิตได้ที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C	25
3.4 อัตราการเจริญเติบโตของ <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน.....	26
3.5 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน.....	27
3.6 ความเข้มข้นของอินซูลินที่ <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน.....	28
ก1 ตัวอย่างค่าความเข้มข้นของอินซูลินที่คำนวณได้ ณ เวลาต่างๆ.....	40

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของอินซูลิน wild type, HMR1423 และ MIP ที่ใช้ใน โครงการวิจัยนี้	14
2.2 หลักการใช้ Competitive Indirect ELISA เพื่อหาความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่าง.....	15
3.1 รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่างๆของการสร้างพลาสมิดที่มีอินซูลิน wild-type และ HMR1423 เพื่อการแสดงออกใน <i>E. coli</i>	29
3.2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของการสร้าง <i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ที่มีอินซูลิน HMR1423 บนโครโมโซม	30
3.3 ความเข้มข้นของอินซูลิน อัตราการเจริญเติบโต และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C.....	31
3.4 เปรียบเทียบความเข้มข้นของอินซูลินที่ผลิตได้จาก <i>P. pastoris</i> ทุกสายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ	32
3.5 ความเข้มข้นของอินซูลิน อัตราการเจริญเติบโต และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้แหล่ง ไนโตรเจนต่างกัน.....	33
3.6 เปรียบเทียบความเข้มข้นของอินซูลินที่ผลิตได้จาก <i>P. pastoris</i> ทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงในแหล่ง ไนโตรเจนต่างกัน.....	34
ก1 ตัวอย่างการสร้าง Standard curve เพื่อหาความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่าง	38

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
°C	องศาเซลเซียส
1°Ab	Primary Anitibody
2°Ab	Secondary Anitibody
αA	<i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ NGEN3 ซึ่งสร้างจากการนำพลาสมิด pPicZ เปล่าใส่ลงบนโครโมโซมของ <i>P. pastoris</i>
μg/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
μl	ไมโครลิตร
μm	ไมโครเมตร
AOX	Alcohol Oxidase
BM	Basal Medium
BSA	Bovine Serum Albumin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g/L	กรัมต่อลิตร
H ₂ SO ₄	กรดซัลฟิวริก
HMR1423	Insulin analogue ชนิด HMR1423
HRP	Horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
L	ลิตร
LB	Luria-Bertani
M	โมลาร์ หรือ โมลต่อลิตร
MIP	Monomeric B27 Lys destripeptide Insulin Precursor
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิเมตร
NH ₄ NO ₃	แอมโมเนียมไนเตรต
(NH ₄) ₂ SO ₄	แอมโมเนียมซัลเฟต
nm	นาโนเมตร

OD ₆₀₀	Optical Density หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween20
PCR	Polymerase Chain Reaction
Standard Insulin-BSA	Standard Insulin ที่ conjugate กับ BSA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
v/v	volume by volume (ปริมาตรต่อปริมาตร)
w/v	weight by volume (น้ำหนักต่อปริมาตร)
Y+P	Yeast Extract+Peptone
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose
YPG	Yeast Extract-Peptone-Glycerol

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความต้องการ โปรตีนในปริมาณมากเพื่อที่จะใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหรืออินซูลินเพื่อรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ทำให้การสกัดโปรตีนนั้นๆจากแหล่งธรรมชาติเพื่อตอบสนองความต้องการโปรตีนดังกล่าวไม่เพียงพอต่อความต้องการหรือไม่สามารถทำได้ เช่น อินซูลินของมนุษย์ นอกจากนี้ความพยายามในการสกัดโปรตีนที่ต้องการจากสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีคุณสมบัติของโปรตีนนั้นๆที่ใกล้เคียงกัน เช่นการสกัดอินซูลินจากโค กระบือ สุกรและปลาบางชนิด แม้ว่าจะประสบความสำเร็จในการใช้กับมนุษย์ แต่ก็พบว่ายังประสบปัญหาในการรักษาผู้ป่วย เช่นอาการแพ้ รวมถึงปัญหาด้านสิทธิของสัตว์ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว การใช้เทคนิคด้านวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่เรียกว่า เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) เพื่อผลิต recombinant proteins จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญเพื่อนำมาใช้ผลิตฮอร์โมนหรือโปรตีนของมนุษย์เพื่อใช้ในการแพทย์และสามารถทำในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสิ่งมีชีวิตที่ใช้มักเป็นจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนและเจริญเติบโตได้ง่าย ตัวอย่างการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีดังกล่าว เช่น การผลิตสารละลายลิ่มเลือด tissue plasminogen activator (Manosroi *et al.*, 2001), การผลิตอินซูลินของมนุษย์จาก *Escherichia coli* (Goeddel *et al.*, 1979)

ในปี ค.ศ. 1982 อินซูลินมนุษย์ (recombinant human insulin) ภายใต้อี่ห้อ Humulin จากบริษัท Eli Lilly ได้วางจำหน่าย และหลังจากนั้นอินซูลินได้รับการพัฒนาการผลิตเรื่อยมาโดยอาศัยเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม อินซูลินเป็นโปรตีนที่มีความต้องการอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มากขึ้นทุกปี จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) พบผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลกถึง 177 ล้านคนในปี ค.ศ. 2000 และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นกว่า 2 เท่า ในปี ค.ศ. 2030 สำหรับในประเทศไทยจากข้อมูลของสำนักโรคไม่ติดต่อ กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบผู้ป่วยโรคเบาหวานในปี พ.ศ. 2553 ประมาณ 600,000 คน (<http://thaincd.com/information-statistic/non-communicable-disease-data.php>) ซึ่งโรคเบาหวานเป็นภาวะที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงผิดปกติเนื่องจากความผิดปกติในการสร้างฮอร์โมนอินซูลินจากตับอ่อนหรือความผิดปกติที่ร่างกายผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลิน เนื่องจากโรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่รักษาไม่หายทำให้ผู้ป่วยที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ต้องพึ่งพาการใช้อินซูลินเป็นจำนวนมาก

แม้ว่าการผลิตอินซูลินด้วยเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสมจะได้รับการพัฒนาและผลิตออกจำหน่ายเป็นเวลานาน แต่ยังประสบปัญหาเช่น อินซูลินสังเคราะห์ไม่สามารถอยู่ในกระแสเลือดได้นาน ดังนั้น การผลิตอินซูลินยังต้องมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Barnett, 2003; Garg, 2005; Girish *et al.*, 2006; Modi, 2007) อินซูลิน

ชนิดใหม่ๆ ได้ถูกคิดค้นขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบนสายโปรตีนอินซูลินเพื่อให้เกิดฤทธิ์ที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วย โดยในโครงการวิจัยนี้ได้เลือกใช้อินซูลินชนิด HMR1423 (Gly[A21],His[B31],His[B32]) เป็นตัวนำร่องในการพัฒนาการผลิต recombinant proteins ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเป็นอินซูลิน HMR1423 เป็นชนิดออกฤทธิ์นาน (long-acting) และมีคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น การจับและปล่อยจากตัวรับอินซูลิน (insulin receptor) ใกล้เคียงกับอินซูลินของมนุษย์ (Hennige *et al.*, 2005) แม้ว่าอินซูลินจะเป็นฮอร์โมนที่มีการผลิตมานาน แต่ด้วยจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานที่เพิ่มขึ้นทำให้อัตราการใช้อินซูลินเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นการใช้อินซูลิน HMR1423 เป็นตัวนำร่องในการพัฒนาการผลิต recombinant proteins ในโครงการวิจัยนี้ จะช่วยให้มีความเข้าใจในระบบการผลิต recombinant proteins มากขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ในการพัฒนาการผลิตอินซูลินเพื่อลดการนำเข้าอินซูลินจากต่างประเทศ รวมถึงใช้เป็นระบบในการผลิต recombinant proteins ตัวอื่นๆ ได้อีกด้วย

1.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) เป็นการนำดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันมาตัดต่อกันด้วยเทคนิค Molecular Cloning ทำให้เกิดดีเอ็นเอสายผสมที่ไม่พบดีเอ็นเอเช่นนี้ในธรรมชาติ โดยโปรตีนที่ผลิตจากดีเอ็นเอสายผสมเรียกว่า recombinant protein เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสมถูกนำเสนอครั้งแรกโดย Peter Lobban (Lear, 1978) จากนั้นมีการตีพิมพ์ผลงานในปี ค.ศ. 1972 และ 1973 (Jackson *et al.*, 1972; Lobban and Kaiser, 1973) และมีการจดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1974 ซึ่งเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสมได้ถูกพัฒนาและนำมาใช้อย่างกว้างขวางรวมถึงการผลิตอินซูลินเพื่อรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน

โรคเบาหวานเกิดจากความบกพร่องในการผลิตอินซูลินจากตับอ่อนหรือมีการผลิตแต่ร่างกายไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลิน ทำให้อินซูลินไม่สามารถนำน้ำตาลเข้าไปใช้ได้เต็มที่ ก่อให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ หากไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ต้องได้รับฮอร์โมนอินซูลินโดยการฉีดเข้าร่างกาย แต่เดิมฮอร์โมนอินซูลินสกัดจากตับอ่อนของสัตว์ เช่น สุนัข กระบือ ปลา แม้ว่าฮอร์โมนอินซูลินจากสัตว์เหล่านี้จะมีความคล้ายคลึงกับของมนุษย์ แต่ก็ยังประสบปัญหาการแพ้เกิดขึ้น เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสมจึงถูกนำมาใช้เพื่อการผลิตฮอร์โมนดังกล่าวและประสบความสำเร็จซึ่งมีการวางจำหน่ายครั้งแรกในปี ค.ศ. 1882 ภายใต้ชื่อ Humulin โดยบริษัท Eli Lilly หลังจากนั้นเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสมก็ได้ถูกนำมาใช้เพื่อการผลิตอินซูลินอย่างต่อเนื่อง โดยมีการพัฒนา Insulin analogue ใหม่ ๆ เกิดขึ้นด้วยการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนเพื่อให้อินซูลินมีฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้เพื่อประสิทธิภาพในการรักษาโรคดีขึ้น โดย analogue ที่สร้างขึ้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ชนิดออกฤทธิ์เร็ว (short-acting หรือ rapid-acting) และชนิดออกฤทธิ์นาน (long-acting) แม้ว่าอินซูลิน analogue หลายชนิดจะทำให้การออกฤทธิ์ดีขึ้น แต่บางชนิดเช่น Asp(B10) กระตุ้นให้เกิดมะเร็งเต้านมในสัตว์ฟันแทะ Hamel *et al.*, 1999 พบว่าอินซูลิน analogue ชนิด HMR1423 (Gly[A21],His[B31],His[B32]) มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น

อินซูลินชนิดออกฤทธิ์นาน และมีกิจกรรมกระตุ้นให้เกิดการเป็นมะเร็ง (mitogenic activity) ใกล้เคียงกับอินซูลินมนุษย์ (Hennige *et al.*, 2005) จึงเป็นไปได้ว่าอินซูลิน HMR1423 จะมีความปลอดภัย

นอกจากการใช้ *E. coli* เป็นระบบเพื่อผลิตอินซูลินแล้ว ยังมีความพยายามในการผลิตอินซูลินจากจุลินทรีย์อื่น เช่น ยีสต์ (Ding *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2008) แม้ว่าการผลิต recombinant proteins จาก *E. coli* สามารถทำได้ไม่ยุ่งยากเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น และการศึกษามาเป็นเวลานาน แต่โปรตีนที่ได้อาจมีโครงสร้างและคุณสมบัติที่ผิดไปจากโปรตีนต้นแบบเพราะ *E. coli* เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดโพรคาริโอต (prokaryote) ดังนั้นยีสต์เช่น *Pichia pastoris* จึงได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (eukaryote) ที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ซับซ้อน และโปรตีนที่ผลิตได้มีความใกล้เคียงกับต้นแบบเพราะมี post-translational modification เช่น protein folding, glycosylation โดย *P.pastoris* มีคุณสมบัติเด่นหลายประการที่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นระบบเพื่อการแสดงออกของโปรตีน เช่น promoter ของยีน *AOX1* (Alcohol Oxidase I) ซึ่งสามารถกระตุ้นได้ด้วยเมทานอล ทำให้ง่ายต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน (Cregg *et al.*, 2009) ตัวอย่างการใช้ *P. pastoris* เป็นระบบในการแสดงออกของอินซูลินเช่น การใช้ *P. pastoris* เพื่อการแสดงออกของ Insulin precursor (Xie *et al.*, 2008) ซึ่งการทดลองนี้พบว่า Insulin precursor สามารถเปลี่ยนเป็นอินซูลินมนุษย์ด้วยวิธี transpeptidation ได้ปริมาณถึง 70% และกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity) ใกล้เคียงกับอินซูลินตามธรรมชาติของมนุษย์ (Native Human Insulin) นอกจากนี้ยังพบว่า อุณหภูมิและแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิต recombinant proteins ใน *P. pastoris* เช่นการผลิต mini-proinsulin (Pais-Chanfrau *et al.*, 2004) การผลิต mouse α -amylase (Choi and Park, 2006) ดังนั้นเพื่อให้การผลิต recombinant proteins อย่างมีประสิทธิภาพ จึงต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อการผลิต recombinant proteins แต่ละชนิดด้วย

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ *Escherichia coli* และ *Pichia pastoris* เพื่อการผลิตอินซูลิน HMR1423 ในระดับ Shake Flask

2. ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิและแหล่งไนโตรเจนต่อการแสดงออกของอินซูลิน HMR1423 ในระดับ Shake Flask

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการผลิต recombinant proteins จาก *E. coli* และ *P. pastoris* โดยนำร่องจากการผลิตอินซูลิน HMR1423 ซึ่งเป็นอินซูลินชนิดออกฤทธิ์นาน (long-acting insulin) โดยยีนซึ่งผลิตอินซูลินดังกล่าวจะถูกตัดต่อเพื่อให้แสดงออกใน *E. coli* และ *P. pastoris* จากนั้นศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิและแหล่งไนโตรเจนต่อการแสดงออกของ HMR 1423 เปรียบเทียบกับอินซูลินชนิด MIP (Monomeric B27 Lys destripeptide Insulin Precursor) ในระดับ Shake Flask

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัดต่อยีนอินซูลิน HMR1423 เข้าสู่พลาสมิด pBluescriptII KS(+) และ pQE-30 Xa โดยการตัดต่อด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) และเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ไลเกส (Ligase) จากนั้นนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ MG1655 ด้วยวิธี Chemical Transformation

2. เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีอินซูลินเพื่อให้อินซูลินแสดงออก สำหรับพลาสมิด pQE-30 Xa มีการกระตุ้นการแสดงออกด้วยการใส่สาร Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) จากนั้นทำให้เซลล์แตกแล้วหาปริมาณโปรตีนในส่วน Cytosol และส่วนอื่นๆของเซลล์ เพื่อหาว่าอินซูลินที่ต้องการอยู่ในส่วนใด ปริมาณเท่าใด

3. ตัดต่อยีนอินซูลิน HMR1423 เข้าสู่พลาสมิด pPICZOA (Invitrogen Co., Ltd) เพื่อตัดต่อเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*)

4. ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ และแหล่งไนโตรเจนต่อการแสดงออกของอินซูลิน HMR1423 ใน *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*) โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30°C สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ศึกษาได้แก่ (NH₄)₂SO₄, (NH₄)NO₃, ยูเรีย และ Yeast Extract+Peptone โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลาทั้งสิ้น 84 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปกรองเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วหาอัตราการเจริญเติบโตด้วยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดปริมาณโปรตีนอินซูลินซึ่งหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีความเข้าใจเรื่องเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสมและการแสดงออกของ recombinant proteins ใน *E. coli* และ *P. pastoris* มากขึ้น

2. พัฒนาเทคนิคการผลิต recombinant proteins เช่น อินซูลิน HMR1423 ที่มีประสิทธิภาพ สามารถนำไปประยุกต์ใช้การผลิตโปรตีนในปริมาณมากโดยใช้ระยะเวลาสั้น ซึ่งสามารถลดต้นทุนและเวลาในการผลิตโปรตีนในระดับอุตสาหกรรม

3. สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนต่างๆ เช่น อินซูลิน เพื่อลดการนำเข้าจากต่างประเทศ และสามารถประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตโปรตีนอื่นๆ เช่น เอนไซม์ต่างๆที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์

กระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรู 0.45 μm (Cellulose acetate filter, pore size 0.45 μm)	Sartorius, Germany
เครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction Thermocycler)	Applied Biosystems, Singapore
เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน รุ่น C-MAG HS7 (Hot plate stirrer : model C-MAG HS7)	IKA, China
เครื่องเขย่าผสม รุ่น Vortex-Genie2 (Vortex mixer: model Vortex-Genie2)	Scientific Industries, USA
เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubator shaker : model Innova 4330)	New Brunswick Scientific, USA
เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น FX-180 (Electronic balance : model FX-180)	A&D Co., Ltd., Japan
เครื่องชั่งแบบหยาบ รุ่น FX-3000 (Electronic balance : model FX-3000)	A&D Co., Ltd, Japan
เครื่องทำให้สารแตกตัวโดยใช้คลื่นเสียง รุ่น UD-201 (Ultrasonic disruptor model : UD-201)	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงยูวี (Uvitec Platinum Gel Documentation system)	UVItec, UK
เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated high speed centrifuge)	Kubota cooperating, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอด micro-tube ความเร็วสูง รุ่น MTX-150 (High speed micro refrigerated centrifuge : model MTX-150)	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
เครื่องเพิ่มความเข้มข้นโดยระเหยตัวทำละลายแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrivap concentrator)	LABCONCO, USA
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo, USA

(pH meter)	
เครื่องวิ่งเจลอะกาโรส	ADVANCE Co., Ltd., Japan
(Agarose gel electrophoresis equipments)	
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ	Taladlab, Thailand
(Autoclave)	
เครื่องอังน้ำ	Yamato, Japan
(Water bath)	
เครื่องอ่านค่าไมโครเพลท	Biotek, USA
(Synergy™ HT Multi-detection microplate reader)	
ชุด <i>Pichia pastoris</i> Transformation	Invitrogen, USA
(<i>Pichia</i> EasyComp™ Transformation Kit)	
ชุดทำ cloning ใน <i>Escherichia coli</i>	Invitrogen, USA
(TOPO® Cloning Kits)	
ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล	MACHEREY-NAGEL, Germany
(NucleoSpin® Extract II Kits)	
ชุดสกัดพลาสมิด	MACHEREY-NAGEL, Germany
(NucleoSpin® plasmid)	
ตู้แช่แข็ง -20°C	Sanyo, Japan
(Freezer -20°C)	
ตู้แช่แข็ง -70°C	Sanyo, Japan
(Freezer -70°C)	
ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น HF safe-12006	Heal Force, China
Laminar flow: model HF safe-12006	
ตู้เพาะเชื้อ อุณหภูมิ 30°C	Sanyo, Japan
(Incubator)	
ตู้เพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37°C	Sanyo, Japan
(Growth cabinet)	
ตู้อบแห้ง รุ่น UNB-400	Memmert Co.,Ltd., Germany
(Oven : model UNB-400)	
ไมโครปิเปต รุ่น Discovery Comfort	Mettler Toledo, USA
(Micro auto pipette: model Discovery Comfort)	

ไมโครเพลท 96 หลุม (96-well microtiter plate)	Corning, USA
สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ช่วงแสงยูวี รุ่น UV-160 (UV-visible Recording spectrophotometer : model UV-160)	Shimadzu corporate, Japan
หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 ml (Centrifuge tubes 50 ml)	Labcon, USA

2.2 จุลินทรีย์ พลาสมิด และไพรเมอร์

2.2.1 พลาสมิด

pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen, USA
pBluescriptII KS(+)	Agilent Technologies, USA
pPicZ α A	Invitrogen, USA
pQE-30 Xa	Novagen, Germany
pRB79	พลาสมิด pCR [®] 2.1-TOPO [®] ที่มียีนอินซูลิน wild type
pRB80	พลาสมิด pCR [®] 2.1-TOPO [®] ที่มียีนอินซูลิน HMR1423 [*]
pRB81	พลาสมิด pBluescriptII KS(+) ที่มียีนอินซูลิน wild type
pRB82	พลาสมิด pQE-30 Xa ที่มียีนอินซูลิน wild type
pRB83	พลาสมิด pBluescriptII KS(+) ที่มียีนอินซูลิน HMR1423 [*]
pRB84	พลาสมิด pQE-30 Xa ที่มียีนอินซูลิน HMR1423 [*]
pSST2	พลาสมิด pPicZ α A ที่มียีนอินซูลิน HMR1423

หมายเหตุ ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ยีนในพลาสมิด pRB80, 83 และ 84 ไม่ใช่ HMR1423 จึงแทนด้วยสัญลักษณ์ HMR1423^{*} และจะกล่าวถึงในบทที่ 3

2.2.2 จุลินทรีย์

<i>E. coli</i> competent cells สายพันธุ์ Super 10 ⁹ HIT-DH5a	United Bioinformatica Inc., Canada
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ MG1655	Dr. Steven Sandelr's lab, USA
<i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ GS115 Mut ⁺ (<i>his4</i>)	อ.ดร. ศรีนทิพ สุกใส, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>P. pastoris</i> สายพันธุ์ GS115 Mut ⁺ (<i>his4</i>) ที่มียีน MIP	อ.ดร. ศรีนทิพ สุกใส, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
NGEN2	<i>P. pastoris</i> GS115 Mut ⁺ (<i>his4</i>) ที่มียีน HMR1423

NGEN3	<i>P. pastoris</i> GS115 Mut ⁺ (<i>his4</i>) ที่มี pPicZQA
RB12	<i>E. coli</i> Super 10 ⁹ HIT-DH5a ที่มี pRB79
RB13	<i>E. coli</i> Super 10 ⁹ HIT-DH5a ที่มี pRB80
RB15	<i>E. coli</i> Super 10 ⁹ HIT-DH5a ที่มี pRB81
RB16	<i>E. coli</i> Super 10 ⁹ HIT-DH5a ที่มี pRB82
RB17	<i>E. coli</i> Super 10 ⁹ HIT-DH5a ที่มี pRB83
RB18	<i>E. coli</i> Super 10 ⁹ HIT-DH5a ที่มี pRB84
RB20	<i>E. coli</i> MG1655 ที่มี pRB81
RB21	<i>E. coli</i> MG1655 ที่มี pRB82
RB22	<i>E. coli</i> MG1655 ที่มี pRB83
RB23	<i>E. coli</i> MG1655 ที่มี pRB84
RB32	<i>E. coli</i> MG1655 ที่มี pBluescript KS(+)
RB33	<i>E. coli</i> MG1655 ที่มี pQE-30 Xa

2.2.3 ไพรมเมอร์

<i>AOX1</i> forward	5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'
<i>AOX1</i> reverse	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'
prRB27	5'GGATCCAAGTTTGTGAACCAA3'
prRB28	5' GAACTACTGCAACTAGAAAGCTTGC 3'
prRB29	5' GAACTACTGCGGCTAGAAAGCTTGC 3'

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายและบัฟเฟอร์

2.3.1 อาหารเหลว LB

10g/L Bacto-peptone, 5g/L yeast extract, 10g/L NaCl ละลายในน้ำแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

2.3.2 อาหารแข็ง LB

อาหารเหลว LB เติม 2% Bacto-agar แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

2.3.3 อาหารเหลว LB low salt

10g/L Bacto-peptone, 5g/L yeast extract, 5g/L NaCl ละลายในน้ำแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

2.3.4 Lysis Buffer

50 mM NaH_2PO_4 pH 8, 300 mM NaCl, 10mM imidazole ละลายในน้ำ

2.3.5 อาหารแข็ง YPD

1% w/v yeast extract, 2% w/v peptone, 2% w/v dextrose, 2% Bacto-agar ละลายในน้ำแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

2.3.6 อาหารเหลว YPG

1% w/v yeast extract, 2% w/v peptone and 1% w/v glycerol ละลายในน้ำแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

2.3.7 อาหารเหลว BM

10 g/L KH_2PO_4 , 3.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.35 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ละลายในน้ำ ปรับ pH ที่ 5.0 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

2.3.8 สารละลาย PTM_1

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.0 g, NaI 0.08 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, Boric Acid 0.02 g, CoCl_2 0.5 g, ZnCl_2 20.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 65.0 g, Biotin 0.2 g, H_2SO_4 เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 L แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาดรู 0.22 μm เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

2.3.9 สารละลาย PBS

137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na_2HPO_4 , 1.46mM KH_2PO_4 ละลายน้ำแล้วปรับ pH ที่ 7.4

2.3.10 สารละลาย PBST

0.05% Tween 20 ในสารละลาย PBS

2.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

2.4.1 การสร้าง *E. coli* สายพันธุ์ที่สามารถแสดงออกอินซูลิน wild type และ HMR1423

ยีนอินซูลินชนิด wild type และ HMR1423 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนดังรูปที่ 2.1 สังเคราะห์โดย GenScript USA Inc. ใส่อยู่ในพลาสมิด pUC57 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์นี้ประกอบด้วยสาย β และ α ของอินซูลินพร้อมกับบริเวณตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *NotI* ที่ด้านหัวและท้ายตามลำดับ หลังจากทำการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวด้วยวิธี PCR โดยยีนอินซูลินชนิด wild type ใช้ไพรเมอร์ prRB27 และ prRB28 ส่วน HMR1423 ใช้ไพรเมอร์ prRB27 และ prRB29 ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวเหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะของ *BamHI* และ *HindIII* ที่บริเวณส่วนหัวและท้ายตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ PCR โคลน

เข้าสู่พลาสมิด pCR[®] 2.1-TOPO[®] และนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* competent cells สายพันธุ์ Super 10⁹ HIT-DH5a ด้วยชุด TOPO[®] Cloning Kits เพื่อเก็บรักษายีนและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ พลาสมิด pCR[®] 2.1-TOPO[®] ที่มียีนอินซูลินชนิด wild type และ HMR1423 มีชื่อว่า pRB79 และ pRB80 ตามลำดับ จากนั้นตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III และเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ไลเกสกับพลาสมิด pBluescriptII KS(+) และ pQE-30 Xa ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน พลาสมิดที่ได้ถูกนำเข้าสู่ *E. coli* competent cells สายพันธุ์ Super 10⁹ HIT-DH5a ด้วยวิธี Chemical Transformation และทำการสกัดพลาสมิดเพื่อนำพลาสมิดมาตรวจสอบว่ามียีนอินซูลินหรือไม่ด้วยการตัดเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III หากมียีนอินซูลินจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 คู่เบส (รูปที่ 3.1) พลาสมิดที่มียีนอินซูลิน (pRB81-84) นำสู่ *E. coli* สายพันธุ์ MG1655 ด้วยวิธี Chemical Transformation ได้เป็นสายพันธุ์ RB20-24 เพื่อใช้ในการแสดงออกต่อไป ในการรักษาพลาสมิดไว้ในเซลล์ *E. coli* นั้น *E. coli* ทุกสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดในโครงการวิจัยนี้จะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มี Ampicilin ความเข้มข้น 100 µg/ml

2.4.2 การแสดงออกของอินซูลิน wild type และ HMR1423 ใน *E. coli*

เตรียมกล้าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ RB20-23, RB 32-33 เลี้ยงในอาหารเหลว LB 5 ml ที่มี Ampicilin ความเข้มข้น 100 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำกล้าเชื้อ 2.5 ml ใส่ลงในอาหารเหลว LB 50 ml ที่มี Ampicilin ความเข้มข้น 100 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm จนกระทั่งค่า OD₆₀₀ อยู่ที่ 0.5-0.7 (ประมาณ 2 ชั่วโมง) เก็บตัวอย่าง 1 ml แล้วจึงใส่ IPTG ให้ความเข้มข้นของ IPTG ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.1 mM (เฉพาะ RB21, 23, 33) เก็บตัวอย่าง 1 ml ก่อนจะนำไปเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาทั้งสิ้น 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่าง 1 ml และวัดค่า OD₆₀₀ เพื่อติดตามการเจริญเติบโตทุกๆ 3 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่เก็บนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 X g เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเก็บเซลล์ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะใช้ สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน เซลล์ที่เก็บไว้นำมาละลายใน Lysis Buffer 5 ml ที่มี Lysozyme ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic disruptor เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°C 4000 X g เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใส (Supernatant) ถูกเก็บไว้และติดฉลากว่า soluble matter (เป็นส่วนของ Cytosol) ส่วนตะกอนนำกลับไปละลายใน Lysis Buffer ที่ไม่มี Lysozyme 5 ml และติดฉลากว่า insoluble matter ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือในเซลล์ จากนั้นนำ soluble matter และ insoluble matter ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของอินซูลิน

2.4.3 การสร้าง *P. pastoris* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตอินซูลิน HMR1423

ยีน HMR1423 ซึ่งอยู่ในพลาสมิด pJET1.2 สังเคราะห์โดย First Base Company, Malaysia ทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Not*I จากนั้นเชื่อมติดด้วยเอนไซม์ไลเกสกับพลาสมิด pPICZαA ที่ตัดด้วยเอนไซม์

เดียวกัน แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* competent cells สายพันธุ์ Super 10⁹ HIT-DH5a ด้วยวิธี Chemical Transformation คัดเลือกบนอาหารแข็ง LB low salt ที่มี Zeocin 25 µg/ml หลังจากตรวจสอบว่ามีขึ้น HMR1423 แล้ว พลาสมิดนี้ ตั้งชื่อว่า pSST2 ซึ่งพลาสมิด pSST2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* เพื่อให้เกิดเป็นดีเอ็นเอเส้นตรง ก่อนนำเข้าสู่ *P. pastoris* GS115 Mut⁺(*his4*) competent cells ด้วย *Pichia* EasyCompTM Transformation Kit (Invitrogen, USA) และคัดเลือกบนอาหารแข็ง YPD ที่มี Zeocin ความเข้มข้น 100 µg/ml ด้วยวิธีดังกล่าวยีนบน pPICZαA จะถูกนำเข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* จากนั้นตรวจสอบว่ามีขึ้น HMR1423 หรือไม่ด้วยวิธีโคลนนิ่ง PCR ด้วยการ สุ่มเลือกโคลนบนอาหารแข็ง YPD ที่มี 100 µg/ml Zeocin ทำให้เซลล์แตกด้วยเอนไซม์ Lyticase ก่อนทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ *AOX1* forward และ *AOX1* reverse โดย *P. pastoris* GS115 Mut⁺(*his4*) สายพันธุ์ที่มีขึ้น HMR1423 บนโครโมโซมเรียกว่า NGEN2 (รูปที่ 3.2)

2.4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wild type และ HMR1423 ด้วยวิธี DNA Sequencing

ผลิตภัณฑ์ PCR จาก pRB79-84 ด้วยไพรเมอร์ prRB27 กับ prRB28 สำหรับอินซูลิน wild type (pRB79, 81,82) และไพรเมอร์ prRB27 กับ prRB29 (pRB80, 83,84) สำหรับ HMR1423 ถูกส่งไปการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA Sequencing ที่ First Base Company, Malaysia ขณะที่ผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำวิธีโคลนนิ่ง PCR สายพันธุ์ NGEN2 ถูกส่งไปการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA Sequencing ที่ Macrogen Inc., Korea ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของห้องปฏิบัติการด้วยโปรแกรม ApE-Aplasmid Editor v1.17

2.4.5 การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของอินซูลิน HMR1423 ใน *P. pastoris* GS115 Mut⁺(*his4*)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 Mut⁺(*his4*) ที่มีขึ้น MIP, NEGN2 และ NGEN3 ในอาหารเหลว YPG 25 ml แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C ตามลำดับ โดยใช้แรงเหวี่ยงที่ 250 rpm จนกระทั่งค่า OD₆₀₀ ถึง 2-6 (ประมาณ 16-18 ชั่วโมง) จากนั้นเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 1500-3000 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำเซลล์ไปใส่ในอาหารเหลว BM 50 ml pH 5.0 ที่มี 0.004% w/v Histidine และ 0.435% v/v สารละลาย PTM₁ โดยใส่เซลล์ในปริมาตรที่ทำให้ค่า OD₆₀₀ เป็น 0.1 แล้วเติม 100% เมทานอลโดยให้ความเข้มข้นของเมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.5% v/v เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของอินซูลิน และเติม 100% เมทานอลที่ความเข้มข้นนี้ทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อรักษาการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน จากนั้นเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดิมแล้วเก็บตัวอย่าง 50 ml ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งสิ้น 84 ชั่วโมง ตัวอย่างที่เก็บนี้นำไปกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรู 0.45 µm นำส่วนใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของอินซูลินด้วยวิธี ELISA ในขณะที่เซลล์นำไปวิเคราะห์อัตราการผลิตโดยวัดด้วยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight)

2.4.6 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการแสดงออกของอินซูลิน HMR1423 ใน *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 Mut⁺ (*his4*) ที่มีขึ้น MIP, NEGN2 และ NGEN3 ในอาหารเหลว YPG (1% w/v yeast extract, 2% w/v peptone and 1% w/v glycerol) 25 ml แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C, โดยใช้แรงเหวี่ยงที่ 250-300 rpm จนกระทั่งค่า OD₆₀₀ ถึง 2-6 (ประมาณ 16-18 ชั่วโมง) จากนั้นเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 1500-3000 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำไปใส่ในอาหารเหลว BM 50 ml pH 5.0 ที่มี 0.004% w/v Histidine และ 0.435% v/v PTM₁ ในโครงการวิจัยนี้การศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนทำโดยเปลี่ยน (NH₄)₂SO₄ ในอาหารเหลว BM เป็น 2% w/v NH₄NO₃, 2% w/v ยูเรีย หรือ 1% w/v Yeast Extract+2% w/v Peptone โดยใส่เซลล์ในปริมาณที่ทำให้ค่า OD₆₀₀ เป็น 0.1 แล้วเติม 100% เมทานอลโดยให้ความเข้มข้นของเมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.5% v/v เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของอินซูลิน และเติม 100% เมทานอลที่ความเข้มข้นนี้ทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อรักษาการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน จากนั้นเลี้ยงเชื้อในสถานะเดิมแล้วเก็บตัวอย่าง 50 ml ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งสิ้น 84 ชั่วโมง ตัวอย่างที่เก็บนี้นำไปกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรู 0.45 µm นำส่วนใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของอินซูลินด้วยวิธี ELISA ในขณะที่เซลล์นำไปวิเคราะห์อัตราการผลิตโดยวัดการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight)

2.4.7 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight) ของ *P. pastoris*

อัตราการเจริญเติบโตวิเคราะห์จากน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเซลล์ *P. pastoris* ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรู 0.45 µm นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (หรือจนน้ำหนักตกจนค่าแห้งที่ 2 คงที่) นำไปชั่งน้ำหนักแล้วนำมาคำนวณกลับหาความเข้มข้นในหน่วย g/L

2.4.8 การหาความเข้มข้นอินซูลินด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA

นำ Standard Insulin (Insulin Zinc Human Recombinant *P. pastoris*, Merck, Germany) ปริมาณ 2.5 µg ที่ทำการ conjugate กับ BSA (Standard Insulin-BSA) ละลายในสารละลาย PBS แล้วเคลือบลงบนไมโครเพลท 96 หลุมด้วยปริมาตร 100 µl/หลุม บ่มที่ 4°C ซ้ำมคืน นำไมโครเพลทไปล้างด้วยสารละลาย PBST 3 ครั้ง แล้วบล็อกโดยการบ่มด้วย 5% Skim milk ใน PBS ปริมาตร 300 µl/หลุม ที่ 37°C 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBST 3 ครั้ง ใส่ตัวอย่างลงไปหลุมละ 50 µl (ก่อนนำตัวอย่างมาใช้ต้องปรับค่า pH ให้อยู่ประมาณ 7) แล้วบ่มกับ Primary Antibody (Monoclonal Anti-Insulin Mouse Ascites Fluid, Sigma USA) ที่มีอัตราเจือจาง 1:3000 ปริมาตร 50 µl/หลุม ที่ 37°C 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยด้วยสารละลาย PBST 3 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วย Secondary Antibody คือ goat anti-mouse IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch LABORATORIES, Inc., USA) ที่มีอัตราเจือจาง 1:10000 ปริมาตร 100 µl/หลุม ที่ 37°C 1 ชั่วโมง ล้างด้วยด้วยสารละลาย PBST เป็นครั้งสุดท้าย ก่อนเติมสารละลาย TMB (Sigma, USA) ซึ่งเป็นซับสเตรตของ HRP และสุดท้ายเติม 2M H₂SO₄ ปริมาตร 100

μl /หลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไมโครเพลทนี้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่างสามารถหาได้โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงไปแทนค่าในสมการซึ่งได้มาจาก Standard curve โดยที่ Standard curve สร้างมาจากการทำ Competitive Indirect ELISA เช่นกัน แต่ใช้ Standard Insulin ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.2, 0.097, 0.049 และ 0 $\mu\text{g/ml}$ หลุมละ 50 μl บ่มกับ Primary Antibody (1°Ab) ที่มีอัตราเจือจาง 1:3000 ปริมาตร 50 μl /หลุม สมการที่ใช้ในการคำนวณความเข้มข้นมาจากการสร้างกราฟลอการิทึมความเข้มข้นของ Standard Insulin ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm และเลือกบริเวณที่กราฟเป็นเส้นตรง หลักการใช้ Competitive Indirect ELISA เพื่อหาความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่างแสดงไว้ในรูปที่ 2.2

wild type

EcoRI
 5'- gaattcaagTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTC
 F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V C G E R G F F
 TACACACCCAAGACCgctgctaagGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAAC
 Y T P K T A A K G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C N
 TAGgcgccgcgc-3'
 *
NotI

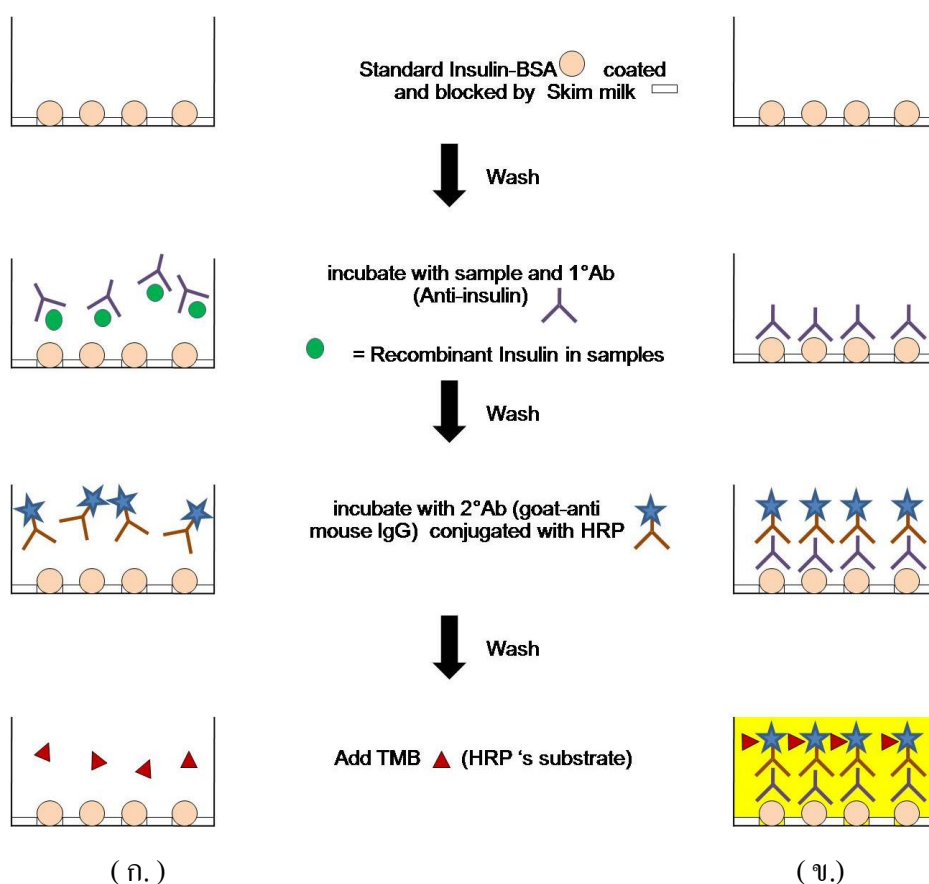
HMR1423

EcoRI
 5'- gaattcaagTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTC
 F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V C G E R G F F
 TACACACCCAAGACC**CATCAT**gctgctaagGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACT
 Y T P K T **H H** A A K G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y
 TGGGGCTAGgcgccgcgc-3'
 C **G** *
NotI

MIP

EcoRI
 5'- gaattcaagTTCGTCAACCAACACTTGTGTGGTTCCACATTGGTGGAGGCTTTGTACTTGGTCTGTGGTGAAAGAGGTTTCTTC
 F V N Q H L C G S H L **A** E A L Y L V C G E R G F F
 TACAAG-----gctgctaagGGTATCGT**CG**AACAATGTGTACCT**CC**CATCTGCTCCCTTGTACCAATTGGAGAACTACTGTAAAC
 Y **K** - - - A A K G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C N
 TAGgcgccgcgc-3'
 *
NotI

รูปที่ 2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของอินซูลิน wild type, HMR1423 และ MIP ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ ประกอบด้วยสาย β (สีแดง) เชื่อมต่อกับสาย α (สีน้ำเงิน) ด้วย processing sequence (gctgctaag) ส่วนหัวมีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* และส่วนท้ายมีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *NotI* ส่วนที่แรเงาในลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนคือส่วนที่ต่างจาก wild type ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของอินซูลิน MIP เป็นไปตามงานวิจัยของ Ding *et al.*, 2005



รูปที่ 2.2 หลักการใช้ **Competitive Indirect ELISA** เพื่อหาความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่าง นำ Standard Insulin ซึ่ง conjugate กับ BSA เคลือบบนไมโครเพลท 96 หลุมและบล็อกด้วย Skim milk จากนั้นบ่มกับตัวอย่าง และ 1°Ab (Anti-insulin) (ก.) ถ้ามี Recombinant Insulin ในตัวอย่าง Recombinant Insulin จะแย่ง Standard Insulin จับกับ Anti-insulin และจะถูกล้างออกไป เมื่อเติม 2°Ab (goat anti-mouse IgG-HRP) เนื่องจาก 1°Ab ถูกล้างออกไป 2°Ab จึงไม่มี 1°Ab ให้จับ และจะถูกล้างออกไปเช่นกัน ดังนั้นเมื่อเติม TMB ซึ่งเป็นซับสเตรตของ HRP จึงไม่มีปฏิกิริยาสีเหลืองเกิดขึ้น (ข.) กรณีที่ตัวอย่างไม่มี Recombinant Insulin ดังนั้น Anti-insulin จะจับกับ Standard Insulin บนไมโครเพลทและไม่ถูกล้างออกไป เมื่อเติม 2°Ab (goat anti-mouse IgG-HRP) แอนติบอดีตัวนี้จะไปจับกับ Anti-insulin และทำปฏิกิริยาเป็นสีเหลืองเกิดขึ้นเมื่อเติม TMB ทั้งนี้ในช่วงความเข้มข้นช่วงหนึ่ง ความเข้มข้นของโปรตีน (แอนติเจนหรือในกรณีนี้คืออินซูลิน) ในสารละลายจะจับกับแอนติบอดีเป็นสัดส่วนที่มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นเมื่อทำ Standard curve จะได้ค่าสมการซึ่งสามารถนำไปแทนค่าหาความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่างได้

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การสร้างและการแสดงออกของ *E. coli* สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน wild type และ HMR1423

เมื่อโคลนชิ้นส่วนยีนอินซูลิน wild type และ HMR1423 เข้าสู่พลาสมิด pBluescriptII KS(+) และ pQE-30 Xa แล้วพลาสมิดดังกล่าวได้ถูกตรวจสอบความถูกต้องโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อตรวจสอบว่ามีอินซูลินหรือไม่ พลาสมิดที่มีอินซูลินจะมีรูปแบบการตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III ดังรูปที่ 3.1 ข และ ค ซึ่งมีชิ้นส่วนอินซูลินขนาดประมาณ 200 คู่เบส เมื่อได้พลาสมิด pBluescriptII KS(+) และ pQE-30 Xa ที่มีอินซูลิน (pRB81-84) ได้นำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* MG1655 ด้วยวิธี Chemical Transformation ได้เป็น *E. coli* สายพันธุ์ RB21-23 ซึ่งได้นำไปทดสอบการแสดงออกของอินซูลิน สาเหตุที่เลือกใช้พลาสมิด pBluescriptII KS(+) และ pQE-30 Xa เพราะต้องการทดสอบความสามารถในการแสดงออกเมื่อยีนอยู่บนพลาสมิดที่แตกต่างกัน สำหรับพลาสมิด pQE-30 Xa นั้นมี IPTG เป็นตัวกระตุ้น (inducer) ดังนั้นเมื่อมีอินซูลินบนพลาสมิดนี้น่าจะมีการแสดงออกเสมอถ้ามีการใส่ IPTG ลงไป ทำการเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนอินซูลินบนพลาสมิด pBluescriptII KS(+) ซึ่งไม่ใช่ตัวกระตุ้น

หลังจากเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ RB20-23 เพื่อทดสอบการแสดงออกของอินซูลินโดย RB21 และ 23 มีการกระตุ้นด้วย IPTG เมื่อนำตัวอย่างที่เก็บทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งสิ้น 24 ชั่วโมงมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของอินซูลินพบว่า ไม่สามารถตรวจพบอินซูลินทั้งชนิด wild type และ HMR1423 เมื่อใช้พลาสมิดทั้ง 2 ชนิดตามสมมุติฐานแล้วพลาสมิด pQE-30 Xa เมื่อกระตุ้นด้วย IPTG ควรพบการแสดงออกของอินซูลินบ้าง แต่ก็ไม่พบ ซึ่งในการตรวจสอบไม่พบอินซูลินทั้งในส่วน soluble matter และ insoluble matter ของเซลล์ ทั้งนี้คาดว่า Recombinant Insulin ที่แสดงออกอาจรวมกลุ่มอยู่ในรูป Inclusion Bodies ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นในการใช้ *E. coli* เป็นเจ้าบ้านเพื่อการแสดงออกโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต โดยปัจจัยที่ทำให้เกิด Inclusion Bodies เช่นการผลิตโปรตีนที่มากเกินไป การที่ recombinant protein ที่ผลิตจาก *E. coli* ไม่สามารถสร้างพันธะ disulfide ที่ถูกต้องใน Cytosol ได้ (Carrio and Villaverde, 2002) นอกจากนี้ Inclusion Bodies อาจประกอบด้วยโปรตีนมากกว่า 1 ชนิดมารวมกลุ่มกัน (Abolghasemi Dehaghani *et al.*, 2010) การสกัดโปรตีนจาก Inclusion Bodies นั้นค่อนข้างยุ่งยากเพราะต้องใช้สารจำพวก detergent ที่แรงเช่น ยูเรีย, เบสแก่, guanidine-HCl ก่อนที่จะให้โปรตีนกลับมาพับใหม่ (Abolghasemi Dehaghani *et al.*, 2010; Jessen *et al.*, 1993) ซึ่งมีความเสี่ยงสูงที่โปรตีนที่ต้องการจะถูกทำลายจากขั้นตอนดังกล่าว

จากความยุ่งยากที่เกิดขึ้น และปัญหาที่คาดว่าจะพบจากการแสดงออกของ recombinant protein ใน *E. coli* เช่น โปรตีนที่ได้อาจจะมีความสมบัติไม่เหมือนเดิม และนอกจากนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HMR1423

บนพลาสมิด pRB80, 83 และ 84 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DNA Sequencing แล้วมีความผิดพลาดเกิดขึ้น ความผิดพลาดของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้คาดว่าน่าจะเกิดจากเทคนิค PCR กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) คณะผู้วิจัยจึงตัดสินใจเปลี่ยนระบบการแสดงผลใหม่โดยใช้ยีสต์ *P. pastoris* แทน เพราะเป็นสิ่งมีชีวิตที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว และ *P. pastoris* เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต ดังนั้น recombinant protein ที่ได้จึงมีความใกล้เคียงกับโปรตีนต้นแบบ และการสกัด recombinant protein ก็ไม่ยุ่งยาก เพราะเมื่อพลาสมิด pPicZ α ที่ใช้นำยีนอินซูลินเข้าสู่โครโมโซมของยีสต์มีส่วนของ α -factor อยู่หน้ายีนอินซูลิน ทำให้อินซูลินที่ผลิตได้หลั่งออกจากเซลล์ไปสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 การสร้าง *P. pastoris* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตอินซูลิน HMR1423

ตัดพลาสมิด pJET2.1 ที่มียีนอินซูลิน HMR1423 (สังเคราะห์โดย First Base Company, Malaysia) ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *NotI* (รูปที่ 3.2 ก) แล้วสกัดชิ้นส่วนประมาณ 200 คู่เบสซึ่งเป็นชิ้นส่วนยีน HMR1423 ทำการโคลนเข้าบริเวณตัดจำเพาะเดียวกันของพลาสมิด pPicZ α ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ว่ามียีน HMR1423 หรือไม่ด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ *AOX1* forward และ *AOX1* reverse โดยถ้ามียีน HMR1423 จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 750 คู่เบส (รูปที่ 3.2 ข) พลาสมิดที่ได้นี้ตั้งชื่อว่า pSST2 จากนั้นตัดพลาสมิด pSST2 ด้วยเอนไซม์ *SacI* เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอเส้นตรง (รูปที่ 3.2 ค) แล้วทำการนำเข้าสู่ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 Mut⁺ (*his4*) ด้วย *Pichia EasyComp*TM Transformation Kit (Invitrogen, USA) คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง YPD ที่มี Zeocin ความเข้มข้น 100 μ g/ml แล้วนำไปทดสอบว่ามียีนอินซูลินบนโครโมโซมด้วยวิธีโคลน PCR ด้วยไพรเมอร์ *AOX1* forward และ *AOX1* reverse โดยถ้ามียีนอินซูลินบนโครโมโซม จะได้ชิ้นส่วนขนาด 750 คู่เบส (รูปที่ 3.2 ง) *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 Mut⁺ (*his4*) ที่มียีน HMR1423 บนโครโมโซมมีชื่อว่า NGEN2 และชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากโคโลนี PCR นี้ได้ส่งไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA Sequencing ที่ Macrogen Inc, Korea

3.3 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*) ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423

สาเหตุที่เลือกใช้การแสดงผลของยีน HMR1423 เปรียบเทียบกับอินซูลิน MIP ใน *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*) เพราะ *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*) สายพันธุ์ที่มียีน MIP นั้น อ.ดร.ศรินทร์พ สุกใส สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการทดลองมาแล้วว่ามีการแสดงออกของยีนอินซูลินจริง (ข้อมูลไม่ได้แสดงในรายงานนี้) คณะผู้วิจัยจึงใช้เพื่อเป็นตัวแปรควบคุมชนิด Positive Control (มีการแสดงออกของอินซูลิน) ส่วนสายพันธุ์ NGEN3 ซึ่งเกิดจากการใส่พลาสมิด pPicZ α เปล่าลงบนโครโมโซมของ *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*) เป็นตัวแปรชนิด Negative Control (ไม่มีการแสดงออกของอินซูลิน)

เมื่อทำการทดสอบผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ *P. pastoris* ที่มียีนอินซูลิน โดยเลี้ยง *P. pastoris* GS115 Mut⁺(his4) สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP (สำหรับรูปและตารางใช้สัญลักษณ์ว่า MIP), HMR1423 (สายพันธุ์ NGEN2 สำหรับรูปและตารางใช้สัญลักษณ์ว่า 1423) และสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pPicZ α A เปล่าบนโครโมโซม (สายพันธุ์ NGEN3 สำหรับรูปและตารางใช้สัญลักษณ์ว่า α A) ในอาหาร BM ที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C พบว่าอัตราการเจริญเติบโตโดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง สายพันธุ์ NGEN3 (α A) เจริญเติบโตได้ดีในทุกอุณหภูมิ ในขณะที่สายพันธุ์ที่มียีน MIP เจริญเติบโตช้าในอุณหภูมิ 20°C แต่ที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C มีการเจริญเติบโตและเจริญเติบโตที่ 30°C ดีที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ NGEN2 (1423) เหมือนๆ ไม่มีการเจริญเติบโตเลยในทุกอุณหภูมิ (ตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.3) เมื่อวัดค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเมื่อมีการเจริญเติบโต ค่า pH จะลดลง (ตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.3) แสดงว่าเซลล์มีการนำสารอาหารไปใช้และมีการเมแทบอลิซึมที่ได้ผลผลิตหรือผลพลอยได้ที่เป็นกรด เช่น กรดคาร์บอนิกที่เกิดจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ขับออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมละลายในน้ำ แต่สำหรับสายพันธุ์ NGEN2 (1423) ที่เหมือนๆ ไม่มีการเจริญเติบโตเลยในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ทุกอุณหภูมิ พบว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อก็ไม่มีเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.3) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเซลล์ไม่ได้นำสารอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต

ทั้งนี้เนื่องจาก *P. pastoris* ที่มียีน MIP เจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน ในขณะที่สายพันธุ์ NGEN2 ไม่เห็นการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิใดๆเลย ในการทดลองขั้นต่อไปคือผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนต่อการแสดงออกของอินซูลิน คณะผู้วิจัยจึงเลือกเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C บนสมมติฐานที่ว่าถ้ามีการเจริญเติบโตหมายถึงมีจำนวนเซลล์มาก เมื่อมีจำนวนเซลล์มากก็น่าจะมีการผลิต Recombinant Insulin ปริมาณมากตาม

3.4 ผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของ *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (his4) ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423

ทดสอบผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของ *P. pastoris* ที่มียีนอินซูลิน โดยเลี้ยง *P. pastoris* GS115 Mut⁺(his4) สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP, สายพันธุ์ NGEN2 (1423) และสายพันธุ์ NGEN3 (α A) ที่อุณหภูมิ 30°C ในอาหาร BM ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันไปได้แก่ (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, ยูเรีย และ Yeast Extract+Peptone โดยวัดอัตราการเจริญเติบโตจากน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าสายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และสายพันธุ์ NGEN3 (α A) สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิดเพื่อการเจริญเติบโตได้ (ตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.5) ทั้งนี้เมื่อวัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่าสำหรับอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ ((NH₄)₂SO₄ และ NH₄NO₃) ค่า pH ลดลง ในขณะที่อาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ (ยูเรีย และ Yeast Extract+Peptone) ค่า pH ค่อนข้างคงที่ (ตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.5) ซึ่งเป็นไปได้ว่าแหล่ง

ในโตรเจนจากสารอนินทรีย์และอินทรีย์นำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์คนละวิธี ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หรือผลพลอยได้ที่แตกต่างกัน

สำหรับสายพันธุ์ NGEN2 (1423) แทบจะไม่เห็นการเจริญเติบโตเลยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4NO_3) แต่สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ (ยูเรีย และ Yeast Extract+Peptone) เพื่อการเจริญเติบโตได้ และเจริญเติบโตได้ดีเมื่อใช้ Yeast Extract+Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน

ทั้งนี้จากการศึกษาผลกระทบทั้งอุณหภูมิและแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของ *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*) สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP, สายพันธุ์ NGEN2 (1423) พบว่าแม้ว่าจะเป็นยีนอินซูลินเหมือนกันและมีลำดับกรดอะมิโนต่างกันไม่มาก (รูปที่ 2.1) สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตนั้นแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดซึ่งนำไปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมาจากยีนที่แตกต่างกันนี้อาจมีผลในการควบคุมการเจริญเติบโตทางใดทางหนึ่งเช่น ความสามารถในการจับตัวรับบางตัว ทำให้กระตุ้นการเจริญเติบโตในสภาวะที่ต่างกันหรือ recombinant protein ที่สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีผลต่อการดูดซึมสารอาหารบางชนิด เป็นต้น

3.5 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของอินซูลิน MIP และ HMR1423 ใน *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*)

ในโครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยเลือกใช้เทคนิค Competitive Indirect ELISA ในการตรวจหาความเข้มข้นของ Recombinant Insulin ที่ *P. pastoris* สร้างและหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหตุผลที่เลือกใช้วิธีดังกล่าววิเคราะห์เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกไปแล้วแต่ยังไม่ได้มีการสกัดและทำให้อินซูลินบริสุทธิ์ การทำให้บริสุทธิ์จะต้องใช้ระยะเวลานานเนื่องจากมีตัวอย่างจำนวนมาก (มากกว่า 400 ตัวอย่าง เพราะเก็บตัวอย่างและเติมเมทานอลเพื่อกระตุ้นการผลิต Recombinant Insulin ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งสิ้น 84 ชั่วโมง ดังนั้นเก็บ 8 ตัวอย่างต่อสายพันธุ์ต่อชุดการทดลอง และทำการทดลอง 3 ชุดต่อชุดการทดลอง) หากวัดโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐานอื่นเช่น Lowry method หรือ Bradford method จะวัดโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย ไม่ใช่แค่อินซูลินอย่างเดียว หรือการใช้ Mass Spectroscopy ในกรณีที่มีโปรตีนตัวอื่นมีปนเปื้อนอยู่มาก การวิเคราะห์ก็ทำได้ลำบาก หรือการวิเคราะห์โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทดลองทำโดยใช้เงื่อนไขเดียวกับ Pais-Chanfrua *et al.*, 2004 และ Xie *et al.*, 2008. แต่เนื่องจากคอลัมน์ที่มีอยู่ที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หรือหน่วยงานใกล้เคียงเช่น คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นคอลัมน์คนละชนิดกับเอกสารอ้างอิง ทำให้ไม่สามารถได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณอินซูลิน ซึ่งหากจะใช้การวิเคราะห์ด้วย HPLC จะต้องใช้เวลาในการหาเงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับคอลัมน์ที่มี ดังนั้น Competitive Indirect ELISA จึงเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการทดลองนี้ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาจำเพาะ ในทางทฤษฎีแล้ว

แม้ว่าจะไม่ได้ทำการสกัดอินซูลินให้บริสุทธิ์ แอนติบอดีต่ออินซูลินก็จำเพาะต่อการจับอินซูลินเท่านั้น นอกจากนี้วิธีดังกล่าวสามารถทดสอบกับตัวอย่างจำนวนมากในครั้งเดียว และการทดสอบแต่ละครั้งใช้เวลาไม่มาก

การหาความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่างจากการวิธี Competitive Indirect ELISA คำนวณจากการแทนค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ในสมการที่ได้จาก Standard curve (ภาคผนวก) ทั้งนี้ ความสัมพันธ์ที่เป็นสัดส่วนกันระหว่างการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี (วัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm) และความเข้มข้นของแอนติเจน (ในที่นี้คืออินซูลินที่ผลิตได้และอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะมีช่วงจำกัด ทำให้ถ้าความเข้มข้นของโปรตีนอินซูลินมากหรือน้อยเกินกว่าช่วง Standard curve ไม่สามารถตรวจสอบได้ (ตัวอย่างการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก) ความผิดพลาดในการตรวจสอบด้วยวิธีนี้อาจขึ้นได้เนื่องจากโปรตีนตัวอื่น หรือตะกอนแขวนลอยที่มักไปรบกวนระบบ โดยเฉพาะการรบกวน HRP ที่ติดบน 2° Ab

เมื่อวัดความเข้มข้นของอินซูลินที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิต่างๆ ในอาหาร BM ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน (ตารางที่ 3.3 รูปที่ 3.3 และ 3.4) พบว่าสำหรับอินซูลิน MIP จะผลิตอินซูลินได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 20°C ณ ชั่วโมงที่ 84 จากรูปที่ 3.3 จะเห็นได้ว่าแม้ว่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C จะดีกว่า แต่อินซูลินที่ผลิตได้กลับมีปริมาณน้อยกว่า ทั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pais-Chanfrua *et al.*, 2004 ที่แนะนำให้เลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* เพื่อการผลิต mini-proinsulin ที่อุณหภูมิ $\leq 20^\circ\text{C}$ เพื่อป้องกันกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity)

สำหรับสายพันธุ์ NGEN2 ซึ่งผลิตอินซูลิน HMR1423 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร BM ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลิตอินซูลินมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C ณ ชั่วโมงที่ 24 (ตารางที่ 3.3 รูปที่ 3.3 และ 3.4) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตจะเห็นว่า สายพันธุ์ NGEN2 แทบไม่เห็นการเจริญเติบโตเลย แสดงว่าสารอาหารที่เซลล์นำไปใช้นี้เอาไปใช้เพื่อการผลิต Recombinant Insulin เท่านั้น แต่ไม่ได้ใช้เพื่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้การที่ผลิตอินซูลินได้ดีที่ 30°C เป็นไปได้ว่าอินซูลินไม่ได้ถูกทำลายด้วยกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity) เหมือนอย่างที่เกิดขึ้นกับอินซูลิน MIP โดยตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบนสายของอินซูลิน HMR1423 (รูปที่ 2.1) อาจเป็นตำแหน่งจับจำเพาะของเอนไซม์จำพวก protease หรือในช่วงที่เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตน้อย (MIP ที่ 20°C และ NGEN2 ทุกอุณหภูมิ) เป็นช่วงที่ไม่ได้นำสารอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตมากจึงนำมาใช้เพื่อการผลิต Recombinant Insulin ประกอบกับในช่วงที่มีการเจริญเติบโต ยังไม่มีการกระตุ้นกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity)

สำหรับสายพันธุ์ NGEN3 (αA) เป็นตัวแปรชนิด Negative Control ซึ่งไม่ควรพบการแสดงออกของอินซูลิน แต่จากตารางที่ 3.3 รูปที่ 3.3 และ 3.4 พบว่าที่อุณหภูมิ 25°C ณ ชั่วโมงที่ 60 และ ที่อุณหภูมิ 30°C ณ ชั่วโมงที่ 0 ตรวจพบอินซูลินเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเกิดจากความผิดพลาดและข้อจำกัดของเทคนิค Competitive

Indirect ELISA ที่ได้กล่าวมาก่อนหน้านี้ และค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm มีค่าเกือบจะหลุดจาก Standard curve หรือเกือบจะหลุดจากช่วงที่สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้น ณ จุดนี้คาดว่าน่าจะเป็นเพราะข้อจำกัดของเทคนิคที่ทำให้เกิดความผิดพลาด

ณ ชั่วโมงที่ 0 เป็นจุดเวลาที่คาดว่าไม่มีการแสดงออกของอินซูลินแต่กลับตรวจพบอินซูลินทั้ง MIP และ HMR1423 คาดว่าอาจเกิดจากความล่าช้าในการเก็บตัวอย่างทำให้ชั่วโมงที่ 0 ไม่ใช่ชั่วโมงที่ 0 ที่แท้จริง จึงมีการแสดงออกของ Recombinant Insulin ออกมาบ้าง ทั้งนี้ในระบบการแสดงออกของ recombinant protein ด้วย *P. pastoris* ควบคุมด้วย promoter *AOXI* ซึ่งกระตุ้น (induce) ด้วยเมทานอล และถูกยับยั้ง (repress) ด้วยกลูโคส สำหรับกลีเซอรอลเป็น de-repressor แต่ไม่สามารถกระตุ้น promoter *AOXI* ได้ (Balamurugan *et al.*, 2007; Krainer *et al.*, 2012) ดังนั้นเพื่อให้การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนมีประสิทธิภาพดี ต้องทำการเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอล ก่อนที่จะเติมเมทานอลเพื่อกระตุ้น promoter *AOXI* ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อก่อนจะเปลี่ยนเป็นอาหาร BM คือ อาหาร YPG ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

3.6 ผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนต่อการแสดงออกของอินซูลิน MIP และ HMR1423 ใน *P. pastoris* GS115 Mut⁺ (*his4*)

เมื่อให้อุณหภูมิคงที่ที่ 30°C แล้วแปรผันแหล่งไนโตรเจน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM ที่ใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนไม่สามารถตรวจพบอินซูลินทั้ง MIP และ HMR1423 ทั้งที่มีการเจริญเติบโต ซึ่งคณะผู้วิจัยยังไม่สรุปว่ายูเรียไม่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อสร้างอินซูลินได้ เนื่องจากยูเรียเป็นสาร detergent ที่แรงและยูเรียที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 2% w/v อาจมีปริมาณมากเกินไปแล้วไปทำลาย Recombinant Insulin ที่ผลิตได้

สำหรับสายพันธุ์ที่มีอินซูลิน MIP นั้น พบว่านอกจากเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อใช้ Yeast Extract+Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนแล้ว ยังผลิตอินซูลินได้มากที่สุด ในอาหาร BM ที่มี Yeast Extract+Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนอีกด้วย โดยตรวจพบอินซูลินที่ความเข้มข้นสูงสุด 42.52 µg/ml ณ ชั่วโมงที่ 48 (ตารางที่ 3.6 รูปที่ 3.5 และ 3.6) แสดงว่า *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มีอินซูลิน MIP สามารถนำไนโตรเจนจาก Yeast Extract+Peptone ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ไปใช้ได้ดีทั้งการเจริญเติบโตและการสร้างอินซูลิน ทั้งนี้ 1.) อินซูลิน MIP ที่สายพันธุ์นี้ผลิตได้อาจมีปริมาณมากกว่านี้แต่ที่อุณหภูมิ 30°C เกิดกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity) ทำให้อินซูลินบางส่วนเสียหายไป หรือ 2.) จาก รูปที่ 3.5 พบว่าอินซูลิน MIP ที่ตรวจสอบได้ในแหล่งไนโตรเจนนี้มีความเข้มข้นสูงในเวลาที่ยังอัตราการเจริญเติบโตยังไม่มาก แต่เมื่อหลังชั่วโมงที่ 48 อินซูลินที่ผลิตได้ลดลง แต่อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นลักษณะ exponential ซึ่งในช่วงเวลา ก่อน 48 ชั่วโมงเซลล์ยังอยู่ในระหว่างปรับตัว ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ การเจริญเติบโตยังไม่มาก ทำให้กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนเกิดขึ้นน้อย หรือ 3.) เมื่ออัตราการเจริญเติบโตมีมากขึ้น (หลังชั่วโมงที่ 48) ไนโตรเจนถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตมากกว่าการสร้าง

Recombinant Insulin มากและกระตุ้นเอนไซม์ protease หรือ 4.) การสะสมของสารบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของ Recombinant Insulin

สายพันธุ์ NGEN2 ซึ่งผลิตอินซูลิน HMR1423 มีความแตกต่างจาก MIP (ตารางที่ 3.3 รูปที่ 3.5 และ 3.6) โดยสายพันธุ์นี้แม้ว่าจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อมี Yeast Extract+Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่กลับมีการผลิตโปรตีนมากที่สุดเมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แทบไม่เห็นการเจริญเติบโต โดยมีความเข้มข้นสูงสุด 32.74 $\mu\text{g/ml}$ ณ ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญเติบโตมากไม่ได้หมายความว่าผลผลิตโปรตีนได้ปริมาณมาก เพราะที่อัตราการเจริญเติบโตสูง เซลล์อาจนำอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตมากกว่าการสร้าง Recombinant Insulin ประกอบกับที่อัตราการเจริญเติบโตสูง อาจมีการกระตุ้นกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน

สำหรับอินซูลินที่ตรวจสอบได้ในสายพันธุ์ NGEN3 (αA) ปริมาณเล็กน้อยในอาหาร BM ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ณ ชั่วโมงที่ 0 และ NH_4NO_3 ณ ชั่วโมงที่ 72 และ 84 คาดว่าเกิดจากข้อจำกัดของเทคนิค Competitive Indirect ELISA ดังที่กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ นอกจากนี้อินซูลินที่ตรวจพบ ณ ชั่วโมงที่ 0 น่าจะเกิดจากความล่าช้าในการเก็บตัวอย่างทำให้ไม่ได้เป็นชั่วโมงที่ 0 ที่แท้จริง

ตารางที่ 3.1 อัตราการเจริญเติบโตของ *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C อัตราการเจริญเติบโตวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้งทุกๆ 12 ชั่วโมงโดยเชื้อทุกสายพันธุ์ทำการเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 200 rpm ในอาหาร BM ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมเมทานอลกระตุ้นการแสดงออกของ Recombinant Insulin ทุก 12 ชั่วโมง

สายพันธุ์	อุณหภูมิ	น้ำหนักเซลล์แห้งสุทธิ (g/L) ณ ชั่วโมงที่							
		0	12	24	36	48	60	72	84
α A	20°C	0.55	0.73	0.92	1.26	2.05	3.46	3.44	3.89
	25°C	0.52	0.43	0.43	0.54	0.75	1.14	2.53	2.78
	30°C	0.65	0.94	2.40	2.78	1.58	3.25	3.15	3.31
MIP	20°C	0.50	0.51	0.51	0.56	0.62	0.77	0.847	1.17
	25°C	0.52	0.55	0.55	0.62	0.85	1.20	2.72	2.59
	30°C	0.53	0.75	1.17	1.46	2.80	2.49	2.87	2.52
HMR1423	20°C	0.53	0.58	0.57	0.54	0.54	0.52	0.54	0.56
	25°C	0.53	0.58	0.57	0.53	0.54	0.53	0.54	0.56
	30°C	0.48	0.50	0.55	0.60	0.52	0.46	0.47	0.54

ตารางที่ 3.2 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ทำการเลี้ยงในอาหาร BM ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเร็วรอบ 200 rpm และเก็บตัวอย่างและเติมเมทานอลกระตุ้นการแสดงออกของ Recombinant Insulin ทุก 12 ชั่วโมง

สายพันธุ์	อุณหภูมิ	ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงที่							
		0	12	24	36	48	60	72	84
α A	20°C	4.92	4.57	4.44	3.95	3.26	3.00	2.92	2.9
	25°C	5.10	5.07	5.10	5.01	4.82	4.43	3.16	2.96
	30°C	5.21	5.22	3.66	3.36	3.20	3.24	3.19	3.17
MIP	20°C	4.88	4.86	4.87	4.80	4.64	4.43	4.43	3.88
	25°C	5.11	5.07	5.02	4.95	4.66	4.10	3.14	2.95
	30°C	5.33	5.29	4.99	4.56	3.80	3.39	3.29	3.27
HMR1423	20°C	5.10	5.12	5.12	5.15	5.12	5.11	5.10	5.10
	25°C	4.98	5.02	5.03	5.07	5.07	5.09	5.06	5.08
	30°C	4.96	4.97	5.20	5.02	4.99	5.03	4.99	5.04

ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นของอินซูลินที่ *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ผลิตได้ที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ทำการเลี้ยงในอาหาร BM ที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เก็บตัวอย่างและเติมเมทานอลกระตุ้นการแสดงออกของ Recombinant Insulin ทุก 12 ชั่วโมง

สายพันธุ์	อุณหภูมิ	ความเข้มข้นของอินซูลิน (μg/ml) ณ ชั่วโมงที่							
		0	12	24	36	48	60	72	84
αA	20°C	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39
	25°C	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	2.72	<0.39	<0.39
	30°C	1.18	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39
MIP	20°C	2.89	9.20	11.14	9.45	24.10	11.68	20.49	39.47
	25°C	7.69	4.93	7.63	5.24	10.34	14.19	21.58	12.45
	30°C	4.41	6.91	10.96	13.29	12.11	12.00	25.43	17.86
HMR1423	20°C	10.84	8.81	10.64	12.18	11.34	10.47	13.62	16.52
	25°C	7.20	10.26	11.25	10.21	9.47	10.42	9.92	9.51
	30°C	5.97	10.10	32.74	13.75	28.89	17.65	13.62	8.25

ตารางที่ 3.4 อัตราการเจริญเติบโตของ *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน อัตราการเจริญเติบโตวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้งทุกๆ 12 ชั่วโมงโดยเชื้อทุกสายพันธุ์ทำการเลี้ยงที่ 30°C ความเร็วรอบ 200 rpm ในอาหาร BM ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน และเติมเมทานอลกระตุ้นการแสดงออกของ Recombinant Insulin ทุก 12 ชั่วโมง

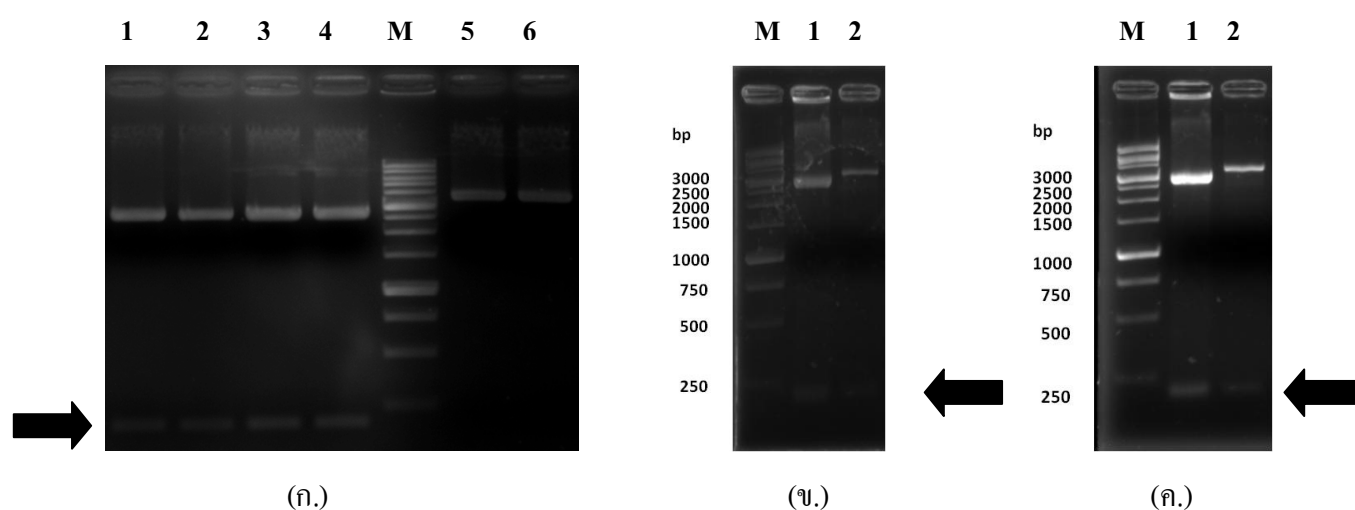
สายพันธุ์	แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้งสุทธิ (g/L) ณ ชั่วโมงที่							
		0	12	24	36	48	60	72	84
αA	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.65	0.94	2.40	2.78	1.58	3.25	3.15	3.31
	NH ₄ NO ₃	0.60	0.48	2.22	0.59	3.45	3.64	3.59	3.83
	Urea	1.82	2.59	3.13	3.04	3.69	4.59	3.99	4.03
	Yeast Extract+Peptone	0.74	0.88	1.46	1.48	2.74	3.63	5.97	5.64
MIP	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.53	0.75	1.17	1.46	2.80	2.49	2.87	2.52
	NH ₄ NO ₃	0.52	0.70	1.30	2.60	2.72	3.00	2.94	3.24
	Urea	2.04	2.54	2.90	3.16	3.68	3.84	4.28	4.21
	Yeast Extract+Peptone	0.66	0.98	1.25	1.65	1.88	3.42	4.34	6.22
HMR1423	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.48	0.50	0.55	0.60	0.52	0.46	0.47	0.54
	NH ₄ NO ₃	0.54	0.56	0.68	0.70	0.66	0.56	0.54	0.58
	Urea	1.96	2.48	2.58	2.50	2.66	2.68	2.58	2.50
	Yeast Extract+Peptone	0.678	2.182	4.64	6.31	6.23	7.08	6.81	7.36

ตารางที่ 3.5 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ทำการเลี้ยงที่ 30°C ความเร็วรอบ 200 rpm ในอาหาร BM ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน เก็บตัวอย่างและเติมเมทานอลกระตุ้นการแสดงออกของ Recombinant Insulin ทุก 12 ชั่วโมง

สายพันธุ์	แหล่งไนโตรเจน	ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงที่							
		0	12	24	36	48	60	72	84
αA	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.21	5.22	3.66	3.36	3.20	3.24	3.19	3.17
	NH ₄ NO ₃	5.05	4.97	3.42	4.85	2.92	2.91	2.77	2.80
	Urea	7.00	7.00	6.73	7.00	6.69	6.71	6.76	6.74
	Yeast Extract+Peptone	5.03	5.00	5.29	5.00	5.10	5.11	4.80	4.95
MIP	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.33	5.29	4.99	4.56	3.80	3.39	3.29	3.27
	NH ₄ NO ₃	4.97	4.85	4.16	3.11	2.96	2.92	2.90	2.85
	Urea	7.05	6.99	6.96	6.91	6.88	6.92	6.79	6.87
	Yeast Extract+Peptone	5.08	5.29	5.32	5.27	5.18	5.36	5.72	5.44
HMR1423	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.96	4.97	5.20	5.02	4.99	5.03	4.99	5.04
	NH ₄ NO ₃	4.99	5.04	5.03	5.07	5.06	5.07	5.03	5.08
	Urea	6.98	7.00	6.98	7.18	7.00	7.01	7.13	7.05
	Yeast Extract+Peptone	5.06	5.85	6.30	6.64	6.76	6.84	6.86	6.82

ตารางที่ 3.6 ความเข้มข้นของอินซูลินที่ *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ทำการเลี้ยงที่ 30°C ความเร็วรอบ 200 rpm ในอาหาร BM ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน เก็บตัวอย่างและเติมเมทานอลกระตุ้นการแสดงออกของ Recombinant Insulin ทุก 12 ชั่วโมง

สายพันธุ์	แหล่งไนโตรเจน	ความเข้มข้นของอินซูลิน (μg/ml) ณ ชั่วโมงที่							
		0	12	24	36	48	60	72	84
αA	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.18	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39
	NH ₄ NO ₃	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	0.34	1.73
	Urea	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39
	Yeast Extract+Peptone	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39
MIP	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.41	6.91	10.96	13.29	12.11	12.00	25.43	17.86
	NH ₄ NO ₃	22.23	6.66	15.00	26.95	17.11	30.83	11.16	7.88
	Urea	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39
	Yeast Extract+Peptone	<0.39	30.09	26.27	26.46	42.52	20.03	7.30	13.19
HMR1423	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.97	10.10	32.74	13.75	28.89	17.65	13.62	8.25
	NH ₄ NO ₃	10.57	12.80	11.50	6.07	3.09	4.99	4.10	3.65
	Urea	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39	<0.39
	Yeast Extract+Peptone	<0.39	22.32	7.36	6.33	6.18	5.91	6.18	6.06



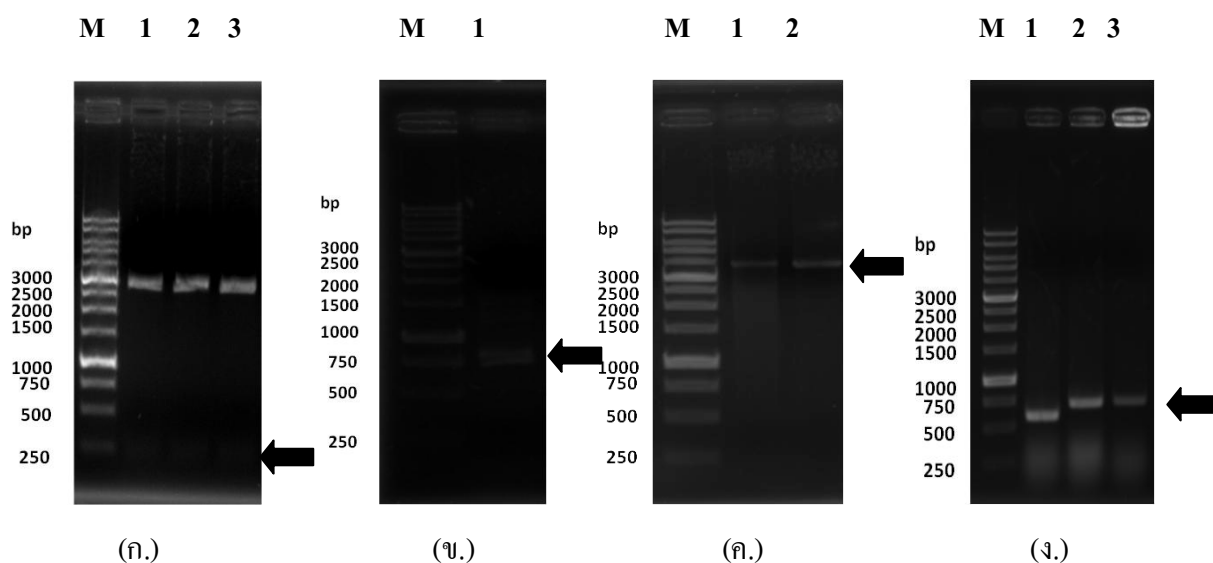
รูปที่ 3.1 รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่างๆของการสร้างพลาสมิดที่มียีนอินซูลิน wild-type และ HMR1423 เพื่อการแสดงออกใน *E. coli* โดยชิ้นส่วนขนาดประมาณ 200 คู่เบส (ตำแหน่งลูกศรชี้) คือชิ้นส่วนของยีนอินซูลิน

(ก.) แถว 1 และ 2 พลาสมิด pRB79 (อินซูลิน wild type ในพลาสมิด pCR[®] 2.1-TOPO[®]) ตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III
 แถว 3 และ 4 พลาสมิด pRB80 (อินซูลิน HMR1423* ในพลาสมิด pCR[®] 2.1-TOPO[®]) ตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III
 แถว M DNA Marker
 แถว 5 และ 6 พลาสมิด pQE-30 Xa ตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III

(ข.) แถว M DNA Marker
 แถว 1 พลาสมิด pRB81 (อินซูลิน wild type ในพลาสมิด pBluescriptII KS(+)) ตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III
 แถว 2 พลาสมิด pRB82 (อินซูลิน wild type ในพลาสมิด pQE-30 Xa) ตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III

(ค.) แถว M DNA Marker
 แถว 1 พลาสมิด pRB83 (อินซูลิน HMR1423* ในพลาสมิด pBluescriptII KS(+)) ตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III
 แถว 2 พลาสมิด pRB84 (อินซูลิน HMR1423* ในพลาสมิด pQE-30 Xa) ตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III

หมายเหตุ ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ยีนในพลาสมิด pRB80, 83 และ 84 ไม่ใช่ HMR1423 จึงแทนด้วยสัญลักษณ์ HMR1423*



รูปที่ 3.2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของการสร้าง *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มียีนอินซูลิน HMR1423 บนโครโมโซม

(ก.) แถว M DNA Marker

แถว 1-3 พลาสมิด pJET2.1 ที่มียีนอินซูลิน HMR1423 ตัดด้วย *EcoRI* และ *NotI* ได้ชิ้นส่วนของยีนอินซูลิน ขนาดประมาณ 200 คู่เบส (ตำแหน่งลูกศรชี้)

(ข.) แถว M DNA Marker

แถว 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 750 คู่เบส (ตำแหน่งลูกศรชี้) เมื่อ PCR พลาสมิด NGEN2 ด้วยไพรเมอร์ *AOXI* forward และ *AOXI* reverse

(ค.) แถว M DNA Marker

แถว 1 และ 2 พลาสมิด NGEN2 ตัดด้วย *SacI* เพื่อให้เกิดดีเอ็นเอเส้นตรง สำหรับนำยีน HMR1423 ลงบนโครโมโซมของ *P. pastoris*

(ง.) ผลการทำโคลนี PCR ด้วยไพรเมอร์ *AOXI* forward และ *AOXI* reverse เพื่อตรวจสอบว่ามียีนอินซูลินบนโครโมโซมของ *P. pastoris* หรือไม่

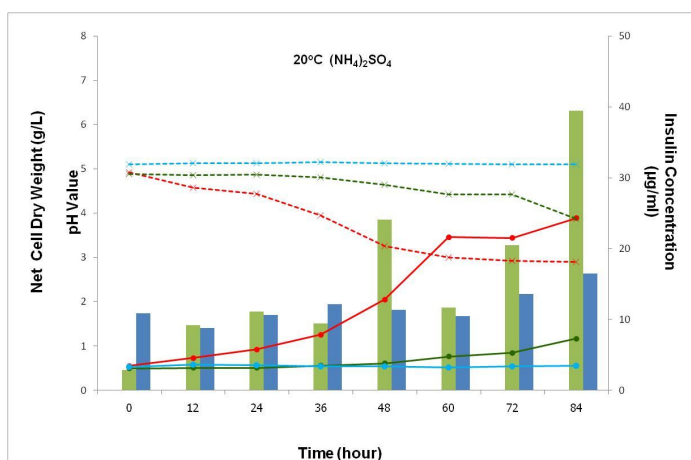
แถว M DNA Marker

แถว 1 สายพันธุ์ NGEN3 เกิดจากการนำพลาสมิด pPicZXA เปล่าใส่ลงบนโครโมโซม ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 500 คู่เบส (ไม่มียีนอินซูลิน)

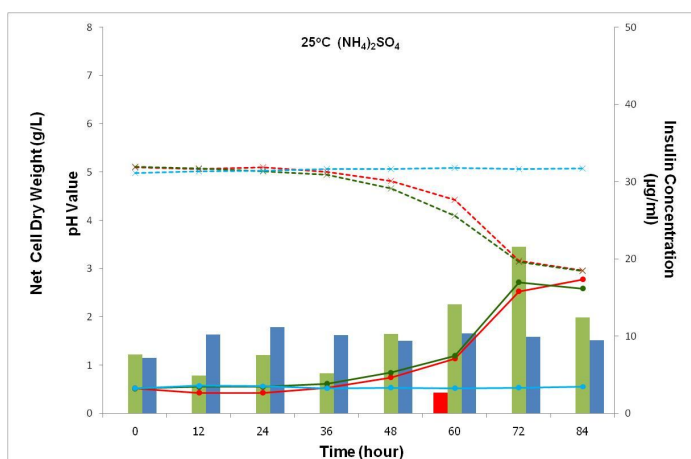
แถว 2 สายพันธุ์ที่มียีน MIP ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 750 คู่เบส

แถว 3 สายพันธุ์ NGEN2 มียีน HMR1423 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 750 คู่เบส

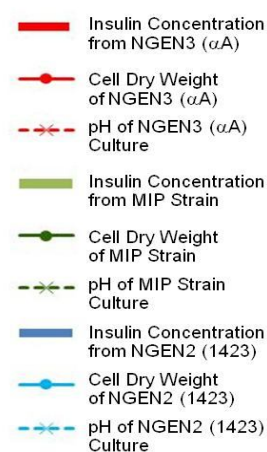
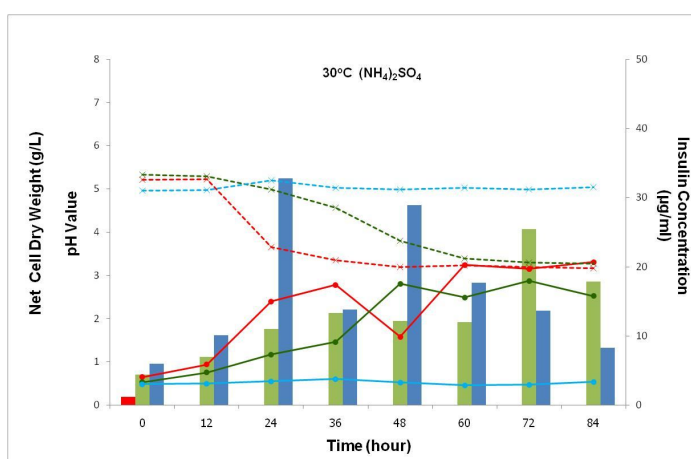
(ก.)



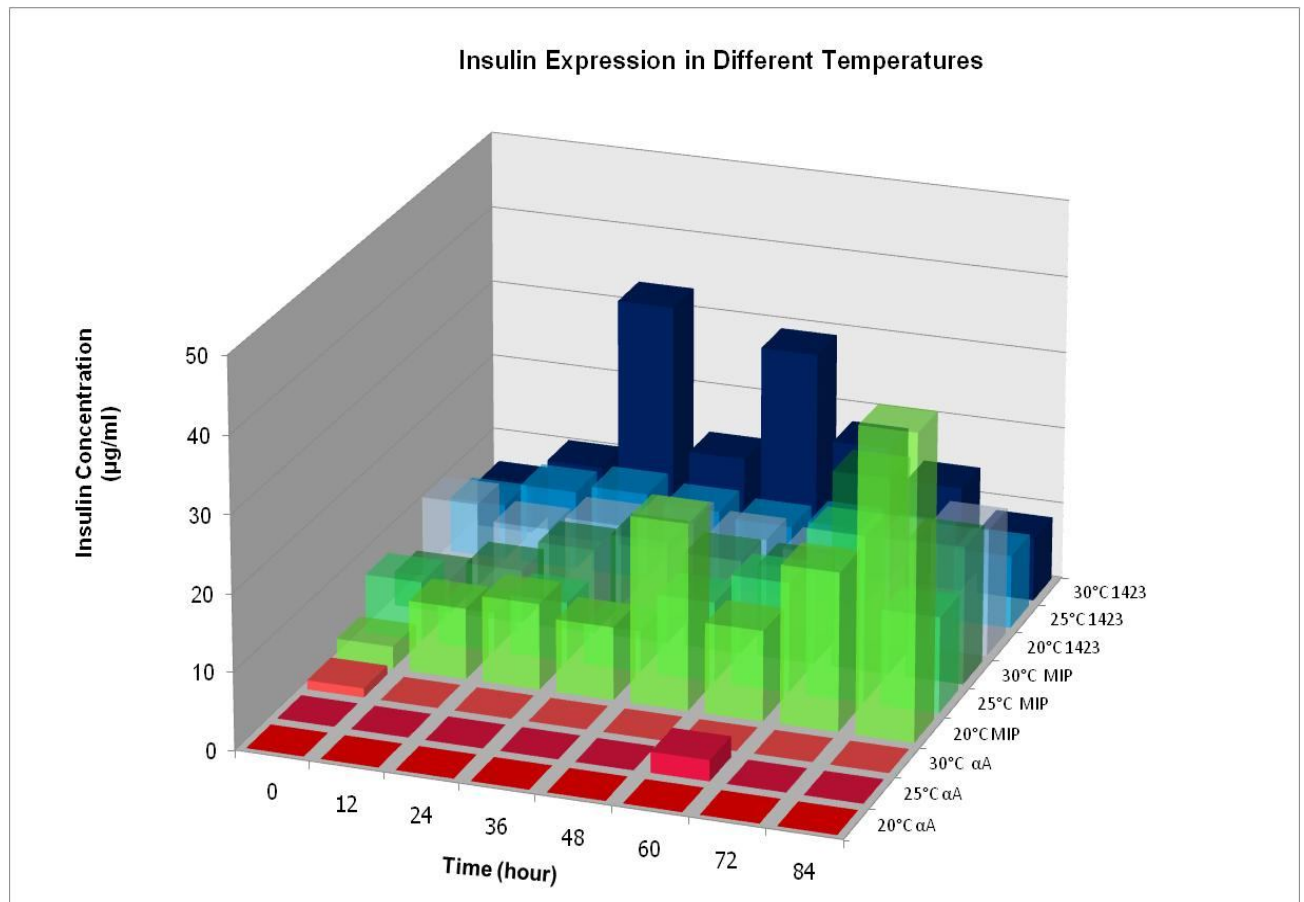
(ข.)



(ค.)

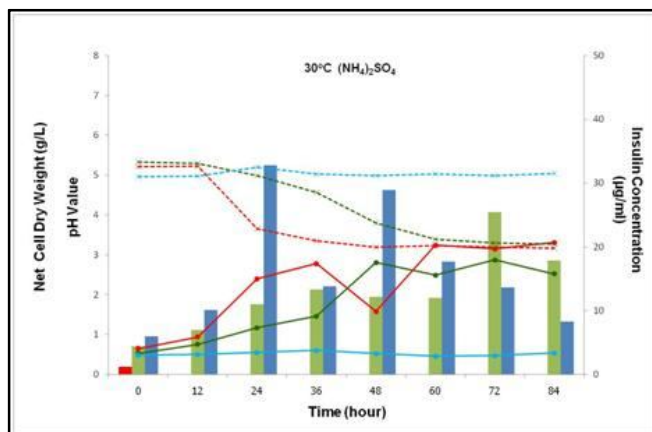


รูปที่ 3.3 ความเข้มข้นของอินซูลิน อัตราการเจริญเติบโต และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20°C, 25°C และ 30°C ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร BM ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และเลี้ยงเชื้อที่ (ก.) 20°C (ข.) 25°C และ (ค.) 30°C โดยเติม 100 % เมทานอลเพื่อกระตุ้นการผลิตทุกๆ 12 ชั่วโมงและอัตราการเจริญเติบโตวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้ง

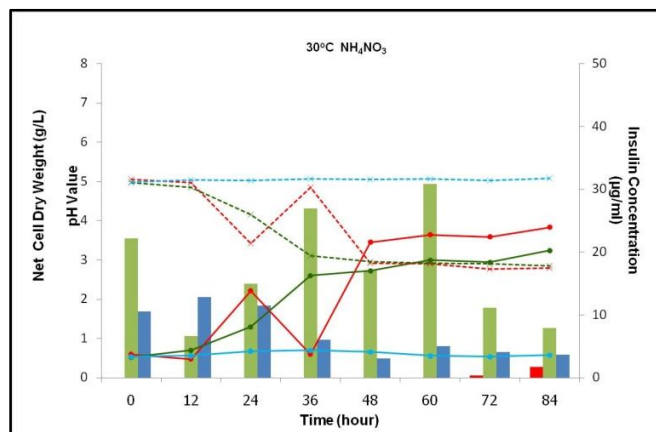


รูปที่ 3.4 เปรียบเทียบความเข้มข้นของอินซูลินที่ผลิตได้จาก *P. pastoris* ทุกสายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

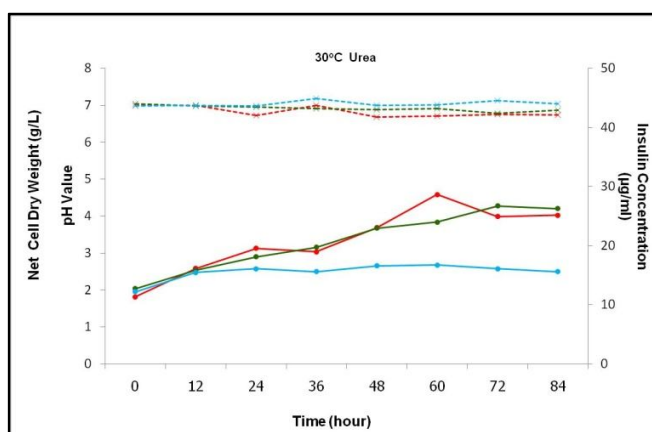
(ก.)



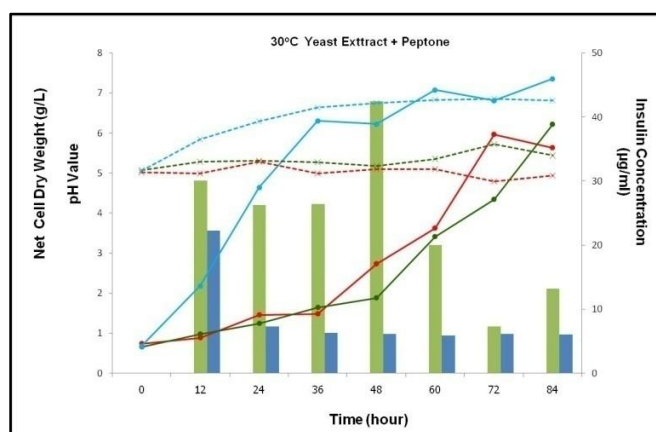
(ข.)



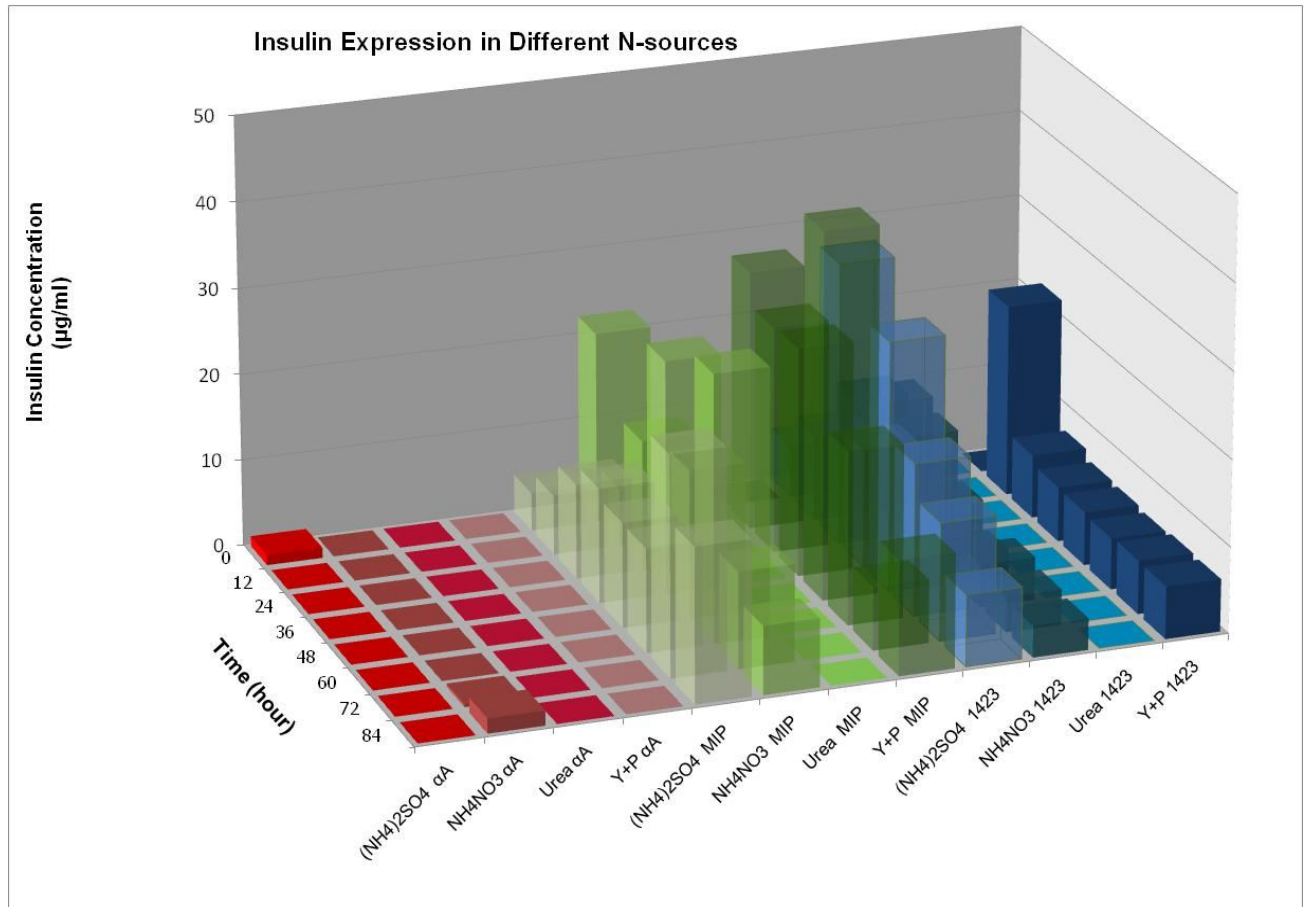
(ค.)



(ง.)



รูปที่ 3.5 ความเข้มข้นของอินซูลิน อัตราการเจริญเติบโต และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกันทำการเลี้ยงเชื้อที่ 30°C ในอาหาร BM ที่มี (ก.) (NH₄)₂SO₄ (ข.) NH₄NO₃ (ค.) ยูเรีย และ (ง.) Yeast Extract+Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยเติม 100 % เมทานอลเพื่อกระตุ้นการผลิตทุกๆ 12 ชั่วโมงอัตราการเจริญเติบโตวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้ง



รูปที่ 3.6 เปรียบเทียบความเข้มข้นของอินซูลินที่ผลิตได้จาก *P. pastoris* ทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนต่างกัน

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

เนื่องจากความยุ่งยากในการสกัด recombinant protein จาก *E. coli* ซึ่งคาดว่าโปรตีนรวมกลุ่มกันอยู่ในรูปของ Inclusion Bodies และความผิดพลาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HMR1423 บนพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออก คณะผู้วิจัยจึงเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านเป็นยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 Mut⁺ (*his4*) เพราะพลาสมิด pPicZα ที่ใช้โคลนยีนอินซูลินมี α-Factor ที่ทำให้ recombinant protein หลั่งออกจากเซลล์มาสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนอินซูลิน MIP และ HMR1423 พบว่าแม้เป็นยีนอินซูลินเหมือนกันแต่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันไม่มาก สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตอินซูลินกลับต่างกัน โดยเมื่อศึกษาผลกระทบเรื่องอุณหภูมิ MIP ผลิตได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 20°C ขณะที่ HMR1423 ผลิตได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C ในขณะที่ MIP ผลิตได้มากที่สุดเมื่อใช้ Yeast Extract+Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ HMR1423 กลับมีการผลิตมากที่สุดเมื่อมี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญเติบโตที่ดีไม่ได้หมายความว่าจะมีการผลิต Recombinant Insulin มาก เนื่องจากเซลล์อาจนำสารอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตมากกว่าการผลิต Recombinant Insulin นอกจากนี้เมื่อมีการเจริญเติบโตมากอาจมีการกระตุ้นกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนทำให้ได้ Recombinant Insulin น้อยลง

จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า การผลิต recombinant protein แต่ละตัวต้องคำนึงถึงปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อเช่น ยีนที่ใช้เพื่อการแสดงออกโปรตีน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ เพราะการผลิตโปรตีนตัวหนึ่งๆ อาจใช้ปัจจัยการผลิตที่ต่างกัน แม้ว่าจะเป็นโปรตีนชนิดเดียวกันแต่มีความแตกต่างกันเล็กน้อย โครงสร้างที่ต่างกันเพียงเล็กน้อยนี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระบบภายในของเซลล์ส่งผลให้ความต้องการปัจจัยต่างๆต่างกัน

อินซูลิน HMR 1423 ที่ผลิตได้จาก *P. pastoris* สายพันธุ์ NGEN2 มีความเข้มข้นสูงสุด 32.74 µg/ml ณ ชั่วโมงที่ 24 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และมีแหล่งไนโตรเจนคือ (NH₄)₂SO₄ ซึ่งเป็นผลดีของการผลิตอินซูลิน HMR 1423 เพราะโปรตีนที่ต้องการแสดงออกดีที่สุดในช่วงเวลาไม่นาน (24 ชั่วโมง) เทียบกับ MIP ที่ผลิตได้มากที่สุดเมื่อใช้ Yeast Extract+Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งต้องใช้เวลาต่างกันถึง 2 เท่า (48 ชั่วโมง) ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตไม่นานนี้ทำให้ค่าใช้จ่ายลดลงอย่างมาก เมื่อผลิตในสเกลที่ใหญ่ขึ้น

ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อต่อยอดในการผลิตอินซูลิน HMR 1423 ในสเกลที่ใหญ่ขึ้น รวมทั้งการนำไปใช้เพื่อผลิต recombinant protein อื่นๆ ด้วย

4.2 ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ เป็นการผลิตอินซูลินในสเกลเล็ก (Shake Flask) ซึ่งไม่สามารถควบคุมตัวแปรบางอย่างได้ เช่น ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลง โดยการที่อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรดหรือเบสมากเกินไป จะไปทำลาย recombinant protein ที่ผลิตได้ นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนก็เป็นตัวแปรสำคัญเนื่องจาก *P. pastoris* เป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องใช้ออกซิเจน การเลี้ยงใน Shake Flask ไม่มีการเติมออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนถูกใช้หมดไป ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตและการผลิต recombinant protein ยังไม่ได้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด ดังนั้นหากมีการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งสามารถควบคุมตัวแปรเหล่านี้ได้ ปริมาณอินซูลินที่ผลิตได้น่าจะมีปริมาณมากขึ้น

2. ดังที่ได้กล่าวก่อนหน้านี้ถึงข้อจำกัดของเทคนิค Competitive Indirect ELISA รวมทั้งการรบกวนระบบการตรวจสอบด้วยโปรตีนตัวอื่นหรือตะกอนแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงควรมีการสกัดและทำอินซูลินจากตัวอย่างเหล่านี้ให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาวัดปริมาณ โปรตีนอีกครั้ง ซึ่ง recombinant protein ที่ได้จากการโคลนยีนเข้าพลาสมิด pPicZXA นี้จะมี His-Tag ทำให้การสกัดโปรตีนไม่ยุ่งยากมากนัก ทั้งนี้จากข้อมูลการทดลองที่ได้ทำให้ทราบว่าตัวอย่างที่เก็บ ณ เวลาใดมีอินซูลินอยู่และน่าจะสกัดได้

3. ควรมีการหาสถานะอื่นๆที่อาจทำให้มีการผลิตอินซูลินที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนหนึ่งๆ เป็นต้น หรือการศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนแต่ควบคุมอุณหภูมิที่ 20°C ซึ่งคาดว่าจะเกิดกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนน้อยกว่าที่อุณหภูมิอื่น

4. จากการทดลองนี้ไม่สามารถตรวจสอบหาอินซูลินได้เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งคณะผู้วิจัยคาดว่าเกิดจากปริมาณยูเรียที่มากเกินไปทำลาย Recombinant Insulin ที่ผลิตขึ้น เพื่อทดสอบว่ายูเรียสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการผลิตอินซูลินได้หรือไม่ จึงควรมีการทดสอบใหม่โดยใช้ยูเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ

5. อินซูลิน HMR 1423 ที่ผลิตได้จาก *P. pastoris* สายพันธุ์ NGEN2 มีความเข้มข้นสูงสุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และมีแหล่งไนโตรเจนคือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แต่พบว่าแทบไม่เห็นอัตราการเจริญเติบโตเลย ดังนั้นเพื่อให้มีการผลิตอินซูลินมากขึ้น จึงควรมีการทดสอบหาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสม

6. ควรทดสอบคุณสมบัติของ Recombinant Insulin ที่ผลิตได้ เช่น คุณสมบัติการขนส่งน้ำตาลกลูโคส ด้วย 3-O-methylglucose transport

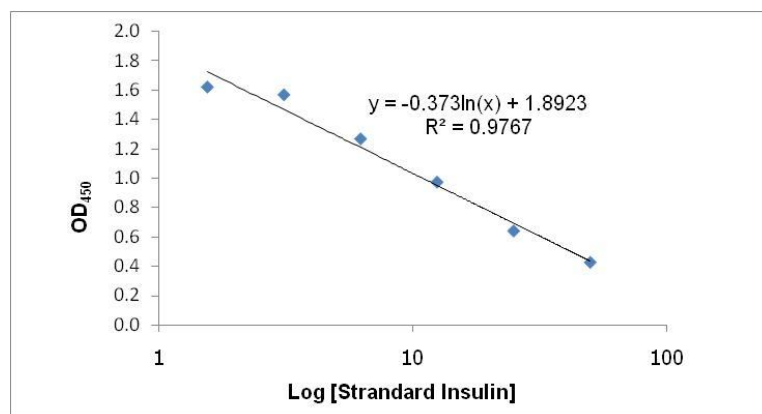
ภาคผนวก

ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่างจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค Competitive Indirect ELISA

เริ่มต้นจากการหาระบบที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหาอินซูลินในตัวอย่างโดยการทดลองเคลือบ Standard Insulin ที่ conjugate กับ BSA (Standard Insulin-BSA) บนไมโครเพลทที่ปริมาณต่างๆ และการหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมของ 1°Ab (Anti- Insulin) ต่อการจับกับ Standard Insulin ในสารละลาย และพบว่าระบบที่เหมาะสมคือใช้ Standard Insulin-BSA ปริมาณ 2.5 μg และอัตราการเจือจางของ Anti- Insulin ที่ 1:3000

จากนั้นทำ Standard curve โดยทำ Competitive Indirect ELISA ตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.8 โดยใช้ Standard Insulin ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.2, 0.097, 0.049 และ 0 $\mu\text{g/ml}$ บ่มกับ 1°Ab โดยทุกๆครั้งที่ทำการตรวจสอบจะทำการทดลองทั้งสิ้น 2 ครั้ง (duplicate) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ตัวอย่างค่าความเข้มข้นของ Standard Insulin และค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ที่ใช้มาสร้าง Standard curve แสดงในรูปที่ ก1 จากนั้นสร้างกราฟลอการิทึมความเข้มข้นของ Standard Insulin ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm คัดจุดที่ไม่ได้อยู่ในเส้นตรงออก ซึ่งจะได้สมการดังรูป ก1 เมื่อใช้สมการนี้ในการหาค่าความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่างหมายความว่า สามารถตรวจสอบความเข้มข้นของอินซูลินในสารละลายได้ในช่วง 1.56-50 $\mu\text{g/ml}$ หากค่าการดูดกลืนแสงมากหรือน้อยกว่าค่าการดูดกลืนแสงในช่วงกราฟนี้หมายความว่าไม่สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นสำหรับตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจสอบได้จะต้องทำการเจือจางหรือเพิ่มความเข้มข้นเพื่อให้อยู่ในช่วงที่ตรวจสอบได้ แล้วนำค่าความเข้มข้นที่ได้คำนวณกลับโดยคูณด้วยอัตราความเข้มข้นหรือเจือจาง

ความเข้มข้นของStandard Insulin ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าเฉลี่ย OD ₄₅₀
50	0.424
25	0.6375
12.5	0.97
6.25	1.265
3.13	1.565
1.56	1.6175
0.78	1.6245
0.39	1.629
0.2	1.629
0.097	1.6345
0.049	1.6365
0	1.635



รูปที่ 1 ตัวอย่างการสร้าง Standard curve เพื่อหาความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่าง โดยการเคลือบ Standard Insulin-BSA ปริมาณ 2.5 μg บนไมโครเพลท จากนั้นทำตามวิธีการ ที่กล่าวไว้บทที่ 2 ข้อ 2.4.8 ในการ ทำ Standard curve ทำการบ่ม Standard Insulin ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.2, 0.097, 0.049 และ 0 $\mu\text{g/ml}$ บ่มกับ 1^oAb (Anti-insulin) จากนั้นสร้างกราฟลอการิทึมความเข้มข้นของ Standard Insulin ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ค่าที่อยู่ในกรอบในตารางคือค่าที่อยู่ในช่วงเส้นตรงที่ใช้สร้างสมการดังรูป ดังนั้นค่าที่ไม่ได้อยู่ในช่วงนี้ที่ใช้สร้างสมการนี้คือค่าที่ไม่สามารถตรวจสอบได้

จากสมการที่ได้จากกราฟ Standard curve ดังที่แสดงไว้ในรูป ก1 คือ $y = -0.373\ln x + 1.8923$ นำมาหาค่าความเข้มข้นของอินซูลินในตัวอย่าง โดยนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงมาแทนที่ค่า y เช่น ในชุดการทดลองเลี้ยงสายพันธุ์ NGEN2 (1423) ที่ 30°C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM ที่มี NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งในการทดลองครั้งที่ 1 พบว่า เมื่อทำการตรวจสอบหาปริมาณอินซูลินด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA ณ ชั่วโมงที่ 0 ได้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยคือ 1.364 เมื่อแทนค่าในสมการจะได้ดังนี้

$$y = -0.373\ln x + 1.8923$$

$$1.364 = -0.373\ln x + 1.8923$$

$$-0.373\ln x = -0.5283$$

$$\ln x = 1.416$$

$$x = e^{1.416} = 4.12$$

ดังนั้น ค่าความเข้มข้นของอินซูลินจากสายพันธุ์ NGEN2 (1423) ที่ 30°C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM ที่มี NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ณ ชั่วโมงที่ 0 คือ $4.12 \mu\text{g/ml}$

ตัวอย่างค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ในชุดทดลองนี้ แสดงไว้ในตารางที่ ก1 ส่วนค่าที่แสดงในบทที่ 3 เป็นค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของอินซูลินจากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ

ตารางที่ ก1 ตัวอย่างค่าความเข้มข้นของอินซูลินที่คำนวณได้ ณ เวลาต่างๆ จากชุดการทดลองที่ 1 เมื่อเลี้ยง *P. pastoris* สายพันธุ์ NGEN2 ซึ่งมียีน HMR1423 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM ที่มี NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 30°C

ชั่วโมงที่	ค่าเฉลี่ย OD ₄₅₀	ความเข้มข้นของอินซูลิน ในตัวอย่าง ($\mu\text{g/ml}$)
0	1.364	4.12
12	0.812	18.14
24	0.986	11.38
36	0.953	12.44
48	1.568	2.39
60	1.109	8.19
72	1.511	2.79
84	1.467	3.14

บรรณานุกรม

- Abolghasemi Dehaghani, S., Babaeipour, V., Mofid, M.R., Divsalar, A., and Faraji, F. (2010) An efficient purification method for high recovery of Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor from recombinant *E.coli*. *International Journal of Environmental Science and Development* **1**: 111-114.
- Balamurugan, V., Reddy, G.R., and Suryanarayana, V.V.S. (2007) *Pichia Pastoris*: A notable heterologous system for the production of foreign protein-Vaccines. *Indian J Biotech* **6**: 175-186.
- Barnett, A.H. (2003) A review of basal insulins. *Diabet Med* **20**: 873-885.
- Carrio, M.M., and Villaverde, A. (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol* **96**: 3-12.
- Choi, D.B., and Park, E.Y. (2006) Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* **41**: 390-397.
- Cregg, J.M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K., and Chappell, T. (2009) Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol* **463**: 169-189.
- Ding, J.G., Fei, J., Cui, D.F., and Zhang, Y.S. (2005) Expression of monomeric insulin precursor in *Pichia pastoris* and its conversion into monomeric B27 Lys destripeptide insulin by tryptic hydrolysis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**: 234-240.
- Garg, S.K. (2005) New insulin analogues. *Diabetes Technol Ther* **7**: 813-817.
- Girish, C., Manikandan, S., and Jayanthi, M. (2006) Newer insulin analogues and inhaled insulin. *Indian J Med Sci* **60**: 117-123.
- Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., and Riggs, A.D. (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 106-110.
- Hamel, F.G., Siford, G.L., Fawcett, J., Chance, R.E., Frank, B.H., and Duckworth, W.C. (1999) Differences in the cellular processing of AspB10 human insulin compared with human insulin and LysB28ProB29 human insulin. *Metabolism* **48**: 611-617.

- Hennige, A.M., Strack, V., Metzinger, E., Seipke, G., Haring, H.U., and Kellerer, M. (2005) Effects of new insulin analogues HMR1964 (insulin glulisine) and HMR1423 on insulin receptors. *Diabetologia* **48**: 1891-1897.
- Jackson, D.A., Symons, R.H., and Berg, P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2904-2909.
- Jessen, T.H., Komiyama, N.H., Tame, J., Pagnier, J., Shih, D., Luisi, B., Fermi, G., and Nagai, K. (1993) *Methods in enzymology* London: Academic Press.
- Krainer, F.W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O., and Glieder, A. (2012) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact* **11**: 22.
- Lear, J. (1978) *Recombinant DNA: The Untold Story*. New York: Crown Publishers.
- Lobban, P.E., and Kaiser, A.D. (1973) Enzymatic end-to end joining of DNA molecules. *J Mol Biol* **78**: 453-471.
- Manosroi, J., Tayapiwatana, C., Gotz, F., Werner, R.G., and Manosroi, A. (2001) Secretion of active recombinant human tissue plasminogen activator derivatives in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2657-2664.
- Modi, P. (2007) Diabetes beyond insulin: review of new drugs for treatment of diabetes mellitus. *Curr Drug Discov Technol* **4**: 39-47.
- Pais-Chanfrau, J.M., Garcia, Y., Licor, L., Besada, V., Castellanos-Serra, L., Cabello, C.I., Hernandez, L., Mansur, M., Plana, L., Hidalgo, A., Tambara, Y., del, C.A.-P.M., del Toro, Y., Valdes, J., and Martinez, E. (2004) Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* **26**: 1269-1272.
- Xie, T., Liu, Q., Xie, F., Liu, H., and Zhang, Y. (2008) Secretory expression of insulin precursor in *Pichia pastoris* and simple procedure for producing recombinant human insulin. *Prep Biochem Biotechnol* **38**: 308-317.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย (ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

(ภาษาอังกฤษ) Dr. RUETHAIRAT BOONSOMBAT

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ A-5

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 10330 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 3

โทรศัพท์ 8078-2218-0 โทรสาร 3543-2253-0 Email: Ruethairat.B@Chula.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน 1550/3 ถนนประชาราษฎร์ .1 แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800

โทรศัพท์ 02-5872352

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่จบการศึกษา
มหาวิทยาลัยมหิดล	ปริญญาตรี	วท(ชีววิทยา).บ.	2544
University of Massachusetts, Amherst	ปริญญาโทเอก-	Ph.D. (Microbiology)	2551

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ พันธุศาสตร์โมเลกุล

ผลงานทางวิชาการ

Ngenprasertsiri, S., Suksai, S., Kongchareonpom, N. and **Boonsombat, R.** Effect of Temperature and Nitrogen Sources on the Expression of Different Insulin Analogues from *Pichia pastoris* in Shake Flask level. *Manuscript preparation*

Moon-ai, W., Niyomploy, P., **Boonsombat, R.**, Sangvanich, P. and Karnchanatat, A. (2012) A superoxide dismutase purified from the rhizome of *Curcuma aeruginosa* Roxb. as inhibitor of nitric oxide production in the macrophage-like RAW 264.7 cell line. *Appl Biochem Biotechnol* **166**: 2138-2155

Lopper, M., **Boonsombat, R.**, Sandler, S. J. and Keck, J. L. (2007) A hand-off mechanism for primosome assembly in replication restart. *Molecular Cell* **26** : 781-793.

- Boonsombat, R.**, Yeh, S.P., Milne, A., and Sandler, S.J. (2006) A novel *dnaC* mutation that suppresses *priB rep* mutant phenotypes in *Escherichia coli* K-12. *Mol Micro* **60**: 973-983.
- Renzette, N., Gumlaw, N., Nordman, J.T., Krieger, M., Yeh S.P., Long, E., Centore, R., **Boonsombat, R.** and Sandler, S.J. (2005) Localization of RecA in *Escherichia coli* K-12 using RecA-GFP. *Mol Micro* **57**:1074-85.

ผู้ร่วมวิจัย

(ภาษาไทย) (น.ศ.ศศิธร เงินประเสริฐศิริ)

(ภาษาอังกฤษ) Miss SASITHORN NGENPRASERTSIRI

ตำแหน่งปัจจุบัน นิสิตปริญญาโท, ผู้ช่วยวิจัยโครงการ

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 10330 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 3

โทรศัพท์ 807-2218-01 3543-2253-0 โทรสาร Email: tukko007@hotmail.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 1/2 หมู่ 3 ต.ท่าผา อ.บ้านโป่ง จราชบุรี

โทรศัพท์ 087-9169211

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่จบการศึกษา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	วท).บ.จุลชีววิทยา(	2551

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ จุลชีววิทยา, พันธุศาสตร์โมเลกุล

ผลงานทางวิชาการ

Ngenprasertsiri, S., Suksai, S., Kongchareonporn, N. and Boonsombat, R. Effect of Temperature and Nitrogen Sources on the Expression of Different Insulin Analogues from *Pichia pastoris* in Shake Flask level. *Manuscript preparation*

การเสนอผลงานวิจัย

Ngenprasertsiri, S. and Boonsombat, R. Development of insulin production in *Pichia pastoris* GS115.

Processing in the 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology on “Systems Biotechnology : Quality and Success” February 1-2, 2012, Bangkok, Thailand.