บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิด จำเป็นต้องใช้สารเคมี ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในกลุ่มไซโตไคน์ และโกรทแฟคเตอร์ เพื่อให้เซลล์ดังกล่าวมีความสามารถที่จะเจริญอย่างไม่มีที่สิ้นสุด (unlimited proliferation) และสามารถในการชักนำให้เป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ภายในร่างกาย (differentiation) เบสิคไฟโบรบลาสต์โกรธแฟคเตอร์ของมนุษย์ (hbFGF) เป็น heparin binding โกรทเฟคเตอร์ ที่มีฤทธิ์ และส่งผลต่อการเพิ่มขยาย (proliferation) และการชักนำให้เป็นเซลล์ชนิดต่างๆ (differentiation) ของเซลล์หลายชนิด งานวิจัยนี้ได้แสดงวิธีการที่ง่ายและมีประสิทธิภาพในการ hbFGF โดยได้มีการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพ ในการผลิต hbFGF เช่น ชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน (BL21(DE3) หรือ ArcticExpress®RIL) ความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ระยะเวลาที่ใช้กระตุ้นให้เกิดการสร้าง และวิธีการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าภายใต้สภาวะที่ดีที่สุดสามารถผลิต hbFGF ได้ 60-80 มิลลิกรัมโปรตีน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร และ hbFGF บริสุทธิ์ที่ได้มีคุณสมบัติทางชีวภาพหลังจากทดสอบกับเซลล์ NIH3T3 เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ (hESCs) และเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำของมนุษย์ (iPSCs) อีกทั้งยังพบว่า ฟิวชั่นโปรตีนที่ติดแท็กอยู่กับ hbFGF (6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF) ไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพ และ 6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF บริสุทธิ์ที่ได้สามารถนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ hESCs และ iPSCs โดยเซลล์ดังกล่าวหลังจากการเลี้ยงหลายรุ่น (passage) ยังคงรูปร่าง คุณสมบัติพลูริโพเทนท์ และการแสดงออกของยีนบางยีนที่ศึกษา ไม่ต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงด้วย hbFGF ที่นำเข้าจากต่างประเทศ จากการนำ hbFGF ที่ผลิตด้วยวิธีการผลิตที่ง่าย และมีประสิทธิภาพนี้มาใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์สามารถลดต้นทุนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ประมาณ 30-60 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความเป็นได้ที่จะสามารถนำกระบวนการนี้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนไซโตไคน์ และโกรธแฟคเตอร์ตัวอื่นๆ เพื่อใช้ในงานวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

In stem cell research or even in the use of stem cell for real clinical trial, a lot of expensive growth factors and chemical are needed. Human basic fibroblast growth factor (hbFGF) is a heparin binding protein needed for cell proliferation and differentiation. In this work easy and efficient expression system for in-house human basic fibroblast growth factor (hbFGF) production was demonstrated. Several parameters for optimizing the expression of soluble hbFGF, including fusion tagged strategy (6xHis-hbFGF and Trx-6xHis-hbFGF), *E. coli* expression host strains (BL21(DE3) or ArcticExpress®RIL), concentration of isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) used for induction, duration of induction and affinity purification procedures were investigated. Under the optimal condition, approximately 60-80 mg of hbFGF fusion proteins was obtained from 1 liter culture broth. The biological activity of purified hbFGF was assessed using NIH3T3 cells and undifferentiated hESCs and induced pluripotent stem cells (iPSCs). The results demonstrated that the N-terminal fusion tags of 6xHis-hbFGF and Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins did not interfere with their biological activities. Human ESCs and iPSCs supplemented with the fusion proteins could maintain undifferentiated stage for several passages. No significant differences in the stem cells morphology and gene expression were observed when supplement with our purified hbFGF fusion proteins or commercialized hbFGF. The use of the fusion proteins in our laboratory was found to significantly reduce the cost of media preparation, approximately 30-60%. We have demonstrated an easy and efficient expression system for in-house hbFGF production, and this system may not only facilitate further production of recombinant hbFGF, but also allow possible large-scale production of other biologically active cytokines and growth factors used for stem cell research.