



รายงานการวิจัย

พัฒนาระบวนการผลิตโกรทแฟกเตอร์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเซลล์ต้น
กำเนิดมนุษย์และเวชสำอาง

Development of Growth Factors Production Process for
Human Stem Cell and Cosmetic Industries



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

พัฒนาระบบการผลิตโกรทแฟคเตอร์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเซลล์ต้น
กำเนิดมนุษย์และเวชสำอาง

Development of Growth Factors Production Process for
Human Stem Cell and Cosmetic Industries

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. สุเมธ อิมสุนทรรักษา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2562

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2564

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย ผู้อำนวยการแผนบูรณาการ ชุดโครงการวิจัย การนำเซลล์ต้นกำเนิดร่างกายไปทดสอบประสิทธิภาพ ที่ให้งานการ พัฒนาระบบการผลิตโกรทแฟคเตอร์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์และเวชสำอาง มีส่วนร่วมในแผนบูรณาการนี้ ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ ดร. รัฐจักร รังสิวิวัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ปัจจุบัน ปฏิบัติงานที่ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ) ที่ช่วยงานทางด้าน Human embryonic stem cells and Human iPSCs ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์ หัวหน้าสาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้สนับสนุน ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะด้านการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ ที่ช่วยในส่วนของการ Scale up และ การทำบริสุทธิ์โปรตีน งานวิจัยชิ้นนี้จึงสำเร็จไปได้ด้วยดีในระดับหนึ่ง

ขอขอบคุณ คุณศุภกาญณ์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลด้านการเงินและงบประมาณทั้งหมด การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2562

อย่างไรก็ตามโครงการนี้เป็นโครงการต่อเนื่อง 3 ปี และปีงบประมาณ 2562 เป็นปีแรกที่ได้รับงบประมาณจัดสรร งานวิจัยจึงยังไม่บรรลุวัตถุประสงค์ทั้งหมดของโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิด จำเป็นต้องใช้สารเคมี ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในกลุ่มไซโตไคน์ และโกรทแฟคเตอร์ เพื่อให้เซลล์ดังกล่าวมีความสามารถที่จะเจริญอย่างไม่มีที่สิ้นสุด (unlimited proliferation) และสามารถในการชักนำให้เป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ภายในร่างกาย (differentiation) เบสิคไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ของมนุษย์ (hbFGF) เป็น heparin binding โกรทแฟคเตอร์ 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 พีวชั้นโปรตีนที่ติดแท็กอยู่กับ hbFGF (6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF) ไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพ และ 6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF บริสุทธิ์ที่ได้สามารถนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ hESCs และ iPSCs โดยเซลล์ดังกล่าวหลังจากการเลี้ยงหลายรุ่น (passage) ยังคงรูปร่าง คุณสมบัติฟลูออโรเฟเทนซ์ และการแสดงออกของยีนบางยีนที่ศึกษา ไม่ต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงด้วย hbFGF ที่นำเข้าจากต่างประเทศ จากการนำ hbFGF ที่ผลิตด้วยวิธีการผลิตที่ง่าย และมีประสิทธิภาพนี้มาใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์สามารถลดต้นทุนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ประมาณ 30-60 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำกระบวนการนี้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนไซโตไคน์ และโกรทแฟคเตอร์ตัวอื่นๆ เพื่อใช้ในงานวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด

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.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
2.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	2
2.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
2.3. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
2.4. การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	7
3.1. การสร้างเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกของยีน	7
3.2. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการทำให้บริสุทธิ์	7
3.3. การทำรีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่ได้ให้บริสุทธิ์	9
3.4. การทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา	10
3.5. การย้อมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและอิมมูโนไซโตเคมีคอล	11
3.6. Quantitative polymerase chain reaction	11
3.7. วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล	14
4.1. การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของ hbFGF fusion protein	14
4.2. กิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity) ของรีคอมบิแนนท์ hbFGF	25
4.3. การทดสอบความสามารถของ รีคอมบิแนนท์ hbFGF fusion proteins	26

	หน้า
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	29
บรรณานุกรม	30
ประวัติผู้วิจัย	35

สารบัญญัตินำ

	หน้า
ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการทำ qPCR	12
ตารางที่ 2 Purification of hbFGF fusion proteins from recombinant expression in <i>E. coli</i> with different expression vectors and expression hosts with HiTrap Heparin HP column	21
ตารางที่ 3 Purification of hbFGF fusion proteins from recombinant expression in <i>E. coli</i> with different expression vectors and expression hosts by IMAC on a HisTrap HP column	22

สารบัญภาพ

	หน้า
Figure 1 Schematic diagram of the recombinant proteins. pET28a(+) and pET32a(+) vector backbones were used to construct the expression vectors	15
Figure 2 Effect of host cell, induction temperature and IPTG concentration on expression of recombinant hbFGF fusion proteins.	16
Figure 3 The effect of induction times on solubility of recombinant hbFGF fusion proteins	17
Figure 4 SDS-PAGE of recombinant hbFGF fusion proteins at various stages of purification.	18
Figure 5 Analysis of purified recombinant hbFGF on SDS-PAGE and western blot (A) and biological activity (B).	19
Figure 6 Recombinant hbFGF fusion proteins support several passages of undifferentiated human ESCs and iPSCs.	27
Figure 7 qPCR quantitative analysis of pluripotency-associated and the differentiation markers expression in hESCs (A) and iPSCs (B)	28

บทที่ 1

บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) ถูกใช้ในการศึกษาทางการแพทย์อย่างหลากหลาย รวมถึง การศึกษาทางชีววิทยาของโรค การคิดค้นยา การบำบัดด้วยยีน และการบำบัดด้วยการแทนที่เซลล์ (Picanco-Castro et al., 2014; Singh et al., 2015) อย่างไรก็ตาม กลไกรวมถึงการถนอมรักษาและการขยายออกของเซลล์ระยะ undifferentiated state ในหลอดทดลอง (in vitro) และการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ชนิดต่างๆ (differentiation) ในหลอดทดลอง และในสิ่งมีชีวิต (in vivo) ยังคงต้องการมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้รู้กลไกควบคุมที่ชัดเจน ก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคต่อไป สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์ คือหนึ่งในตัวแปรสำคัญสำหรับงานวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดต้องการโกรทแฟคเตอร์ และไซโตไคน์เป็นตัวช่วยกระตุ้น เพื่อให้เกิดการเพิ่มจำนวน และชักนำให้เป็นเซลล์ชนิดต่างๆ (van der Sanden et al., 2010) ปัจจุบันนอกจากหน่วยงานของรัฐที่ทำงานวิจัยทางด้านเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์แล้ว ยังมีหน่วยงานเอกชนที่ให้ความสนใจนำผลงานวิจัยดังกล่าวไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในหลายบริษัททุกภูมิภาคทั่วโลก ทั้งด้านการรักษา บำบัดโรคต่างๆ และการเสริมความงามด้านผิวพรรณ จะเห็นได้ว่างานวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิดมีมูลค่าทางเศรษฐกิจมหาศาล และสิ่งจำเป็นที่อุตสาหกรรมเซลล์ต้นกำเนิด และเวชสำอางต้องการและต้องใช้จำนวนมาก คือ โกรทแฟคเตอร์ และไซโตไคน์ เช่น activins, bone morphogenetic proteins (BMPs), epidermal growth factor (EGF), fibroblast-derived growth factors (FGFs) และ insulin-like growth factor (IGFs) เป็นต้น โปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่มีราคาสูง อีกทั้งประเทศไทย ยังไม่สามารถผลิตเองได้ จึงจำเป็นต้องสั่งจากต่างประเทศ และในบางกรณีอาจเกิดข้อผิดพลาดระหว่างการขนส่งสินค้าทำให้ได้โปรตีนที่ด้อยคุณภาพ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่องานวิจัย และอุตสาหกรรมดังกล่าว ประกอบกับคณะผู้วิจัยมีความรู้ และประสบการณ์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนมาแล้ว (Imsoonthornruksa et al., 2011) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุน และอุปสรรคในการทำงานวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิด รวมทั้งเป็นต้นแบบของการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน คณะผู้วิจัยจึงได้เสนอชุดโครงการวิจัย เพื่อหาวิธีการสร้าง และผลิตโปรตีนดังกล่าวไว้ใช้สำหรับงานวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิดและผลิตภัณฑ์เสริมความงามด้านผิวพรรณ อย่างไรก็ตามโครงการนี้เป็นโครงการต่อเนื่อง 3 ปี และปีงบประมาณ 2562 เป็นปีแรกที่ได้รับงบประมาณจัดสรร งานวิจัยจึงยังไม่บรรลุวัตถุประสงค์ทั้งหมดของโครงการ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ กำลังได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งเป็นงานวิจัยที่จำเป็นต้องใช้โปรตีนจำพวกไซโตไคน์ และโกรทแฟกเตอร์เป็นจำนวนมาก โปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่มีราคาสูง อีกทั้งประเทศไทย ยังไม่สามารถผลิตเองได้ จึงจำเป็นต้องสั่งจากต่างประเทศ และในบางกรณีอาจเกิดข้อผิดพลาดระหว่างการขนส่งสินค้า ทำให้ได้โปรตีนที่ด้อยคุณภาพ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่องานวิจัย ประกอบกับคณะผู้วิจัยมีความรู้ และประสบการณ์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนมาแล้ว (Imsoonthornruksa et al., 2011) ดังนั้น เพื่อเป็นการลดต้นทุน และอุปสรรคในการทำงานวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิด รวมทั้งเป็นต้นแบบของการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน คณะผู้วิจัยจึงได้เสนอการทดลองเพื่อหาวิธีการสร้าง และผลิตโปรตีนดังกล่าวไว้ใช้สำหรับงานวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิดและผลิตภัณฑ์เสริมความงามด้านผิวพรรณ

2.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เนื่องจาก โครงการนี้เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี แต่ได้รับงบประมาณเพียงปีแรกปีเดียวจึงไม่สามารถดำเนินการตามวัตถุประสงค์ ข้อที่ 4-6 ได้อย่างสมบูรณ์

1. ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน basic Fibroblast growth factor ของมนุษย์ (hbFGF) ใน *Escherichia coli*
2. พัฒนาระบบการผลิตและขยายขนาดกำลังการผลิต hbFGF
3. ทำรีคอมบิแนนท์ hbFGF ให้บริสุทธิ์ และทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา (biological activity)
4. พัฒนาสูตรระบบนำส่งนีโอโซม (Niosome) เพื่อบรรจุ hbFGF เพื่อพัฒนาเป็นเวชสำอาง
5. พัฒนาบุคลากร ให้สามารถผลิตโกรทแฟกเตอร์ ไว้ใช้เอง เพื่อเป็นการลดต้นทุนในระยะยาว และจัดจำหน่ายให้หน่วยงานภายนอก
6. นำโกรทแฟกเตอร์ที่ผลิตได้ไปให้อุตสาหกรรมเซลล์ต้นกำเนิด และเวชสำอาง ทดสอบคุณภาพ และทดลองใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม

2.3. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนhbFGF ที่ใช้กับงานวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิด ได้ด้วยกระบวนการที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว และขั้นตอนไม่ยุ่งยาก สามารถลดต้นทุนในการนำเข้าจากต่างประเทศได้มากขึ้น อีกทั้งองค์ความรู้ที่ได้สามารถไปพัฒนาต่อยอด เพื่อผลิตโปรตีนในกลุ่มไซโตไคน์ และโกรทแฟกเตอร์ จนนำไปถึงการผลิตในเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตามการนำ รีคอมบิแนนท์โปรตีน ที่ผลิตได้ไปใช้ในภาคอุตสาหกรรมจริง จำเป็นต้องมีห้องปฏิบัติการที่สะอาด ปราศจากโรค ระดับมาตรฐานGMP PIC/S (Good Manufacturing Practice, Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme)

2.4. การทบทวนวรรณกรรม

E. coli เป็นสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอต ที่ได้รับความนิยมในการใช้เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ด้วยเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการศึกษาองค์ประกอบทางพันธุกรรมอย่างละเอียด ทำให้สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น (heterologous proteins) ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังมีเวกเตอร์ที่ออกแบบมาเพื่อใช้ในการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตนี้มากมาย และวิธีการที่ใช้ในการสร้าง และผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli* ยังเป็นวิธีการมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับ ทั้งในด้านการวิจัย และในเชิงพาณิชย์ (Terpe, 2006; Sahdev et al., 2008) นอกจากนี้ *E. coli* ที่นิยมใช้เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแล้ว ยังมีสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รับการศึกษาเพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เช่น ยีสต์ เซลล์แมลง เซลล์พืช และเซลล์สัตว์ แต่สิ่งมีชีวิตดังกล่าวก็ยังมีข้อจำกัด เช่น ให้ผลผลิตต่ำ มีขั้นตอนและวิธีการยุ่งยากในการเลี้ยงเซลล์ และมีค่าใช้จ่ายสูง เมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอต ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าเป็นระบบที่ง่าย ให้ผลผลิตสูง เซลล์เจริญเติบโตรวดเร็ว และต้นทุนการผลิตต่ำ (Nfor et al., 2008; Graslund et al., 2008) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า *E. coli* สามารถใช้เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ไซโตไคน์ และโกรทแฟกเตอร์ เช่น interleukin-29 (Li and He, 2006) interleukin-24 (Yang et al., 2007) human leukemia inhibitory factor (Tomala et al., 2010; Imsoonthornruksa et al., 2011) epidermal growth factor (Abdull Razis et al., 2008), fibroblast growth factor (Gasparian et al., 2009) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำองค์ความรู้พื้นฐานดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ไซโตไคน์ และโกรทแฟกเตอร์ ไว้ใช้ในงานวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิด

การศึกษาวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิด ไม่ว่าจะเป็นของมนุษย์หรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น จำเป็นต้องใช้สารเคมีมากมาย ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในกลุ่มไซโตไคน์ และโกรทแฟกเตอร์ เพื่อให้เซลล์ดังกล่าวยังคงคุณสมบัติความสามารถในการเจริญเติบโตอย่างไม่มีที่สิ้นสุด (unlimited proliferation) และความสามารถในการชักนำให้เป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ภายในร่างกาย (differentiation) จากการประมาณของคณะผู้วิจัยพบว่า เงินทุนวิจัยส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 80 จะสูญเสียไปกับโปรตีนในกลุ่มไซโตไคน์ และโกรทแฟกเตอร์ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนการวิจัย คณะผู้วิจัย จึงมีแนวคิดที่จะสร้าง และผลิตโปรตีนในกลุ่มไซโตไคน์ และโกรทแฟกเตอร์ ไว้ใช้เองภายในห้องปฏิบัติการ โดยในการศึกษารุ่นนี้ คณะผู้วิจัยเลือกที่จะสร้าง และผลิต hbFGF ซึ่งเป็นอีกหนึ่งโกรทแฟกเตอร์ที่สำคัญ และมีความจำเป็นในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ (Klimanskaya et al., 2005; Levenstein et al., 2005) อีกทั้งยังเป็นโปรตีนที่มีราคาสูง ประมาณ 150 ดอลลาร์สหรัฐ ต่อ 10 ไมโครกรัม (Invitrogen)

bFGF หรือ FGF-2 เป็น heparin binding โกรทแฟกเตอร์ ที่มีฤทธิ์ และส่งผลต่อการเพิ่มขยาย (proliferation) และการชักนำให้เป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ (differentiation) ของเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์ fibroblasts เซลล์ vascular endothelial เซลล์ smooth muscle เซลล์ myoblasts และเซลล์ในระบบประสาท เป็นต้น (Gospodarowicz, 1989; Lindner, 1995; Bikfalvi et al., 1997) ซึ่ง bFGF เป็นโปรตีนโมเลกุลสายเดี่ยว (single chain) ไม่มีการเติมหมู่ไกลโคซิล (non-glycosylation) มีหลาย isoforms ถึงแม้จะมาจากการแสดงออกของ mRNA สายเดียวกัน (Florkiewicz and Sommer, 1989) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลหลายขนาดขึ้นอยู่กับบริเวณที่พบ เช่น ถ้าพบบริเวณนิวเคลียสจะมีน้ำหนัก 22 23 และ 24 กิโลดัลตัน แต่ถ้าพบบริเวณไซโตพลาสซึม หรือผิวเซลล์ จะมีน้ำหนัก 18 กิโลดัลตัน มีรายงานการวิจัยพบว่า bFGF สามารถสกัดได้จาก สมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) สมองส่วนไทมัส (thymus) และไต (Dailey et al., 2005) แต่ได้ผลผลิตที่ต่ำ (ประมาณ 9-10 M) ในปี ค.ศ. 1986 ได้มีการศึกษายีน hbFGF เพื่อเข้าใจโครงสร้างของยีน (Abraham et al., 1986) อันนำไปสู่การศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์ hbFGF ใน *E. coli* (Gospodarowicz et al., 1986; Kroihner et al., 1995; Garke et al., 2000; Wang et al., 2006) เพื่อเพิ่มผลผลิต อย่างไรก็ตาม พบว่ารีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ (insoluble inclusion bodies) ทำให้ยากต่อการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นเรื่องที่พบในระบบของการแสดงออกของยีนใน *E. coli* จึงเป็นเรื่องที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ในการหา

ปัจจัยที่ช่วยให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำ (soluble form) ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้า พบว่าเมื่อเชื่อมต่อ glutathione S-transferase เข้ากับ bFGF มีส่วนช่วยทำให้สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตเพิ่มขึ้น แต่รีคอมบิแนนท์ bFGF ที่ได้มีคุณภาพด้อยกว่าโปรตีนที่สกัดได้จากธรรมชาติ (Sheng et al., 2003) และได้มีการศึกษาเพิ่มเติม พบว่าถ้าทำการเปลี่ยน cysteine ตัว 78 และ 96 (C78 และ C96) เป็น serine จะสามารถช่วยเพิ่มความสามารถการละลายน้ำ (solubility) และคุณภาพ (biological activity) ของรีคอมบิแนนท์ bFGF (Wang et al., 2006)

จากที่กล่าวมานั้นจะเห็นได้ว่า ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีรายงานความสำเร็จในการผลิตรีคอมบิแนนท์ bFGF ใน *E. coli* แต่ยังคงประสบปัญหาหลายด้าน เช่น รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่แน่นอน ตลอดจนกระบวนการผลิตที่ยุ่งยาก และซับซ้อน ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการออกแบบการทดลอง เพื่อเพิ่มผลผลิต และคุณภาพของรีคอมบิแนนท์ hbFGF ตลอดจนใช้กระบวนการผลิตอย่างง่าย และมีประสิทธิภาพ ซึ่งจากรายงานก่อนหน้าของ Imsoonthornruksa et al. (2011) ที่คณะผู้วิจัยได้สามารถผลิต human leukemia inhibitory factor ด้วยวิธีการอย่างง่าย สะดวก และรวดเร็ว อันจะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่คณะผู้วิจัยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในการใช้ผลิตรีคอมบิแนนท์ hbFGF ซึ่งถ้าประสบความสำเร็จในอนาคตก็จะสามารถนำองค์ความรู้ไปพัฒนาต่อยอด เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนในกลุ่มไซโตไคน์ และโกรทแฟกเตอร์ ตัวอื่นๆ ต่อไป

ในประเทศไทย ปัจจุบันมีผู้ให้บริการในการเก็บรักษาสเต็มเซลล์ 5 บริษัท โดยมี 2 บริษัทที่ดำเนินการโดยคนไทย 1 ใน 2 บริษัทของคนไทยที่ให้บริการในด้านนี้ ได้แก่ บริษัท เมดิซสเต็มเซลล์ จำกัด (เดิมชื่อ บริษัท กรุงเทพสเต็มเซลล์ จำกัด) ซึ่งปีงบประมาณฝากเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากได้ทั้งจากเลือดสายสะดือ เนื้อเยื่อสายสะดือและเนื้อเยื่อไขมัน ที่ใหญ่ที่สุดและมีประสบการณ์มากที่สุดในประเทศ และมีความจำเป็นต้องใช้โกรทแฟกเตอร์จำนวนมาก ด้วยความร่วมมือทางวิชาการที่ บริษัท เมดิซสเต็มเซลล์ จำกัด มีต่อหัวหน้าโครงการ ทำให้บริษัทให้ความสนใจที่จะให้คณะผู้วิจัยผลิต hbFGF ซึ่งเป็นอีกหนึ่งโกรทแฟกเตอร์ที่สำคัญ และมีความจำเป็นในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์ เพื่อลดมูลค่าการนำเข้าของโปรตีนดังกล่าว อีกทั้งยังเป็นโปรตีนที่มีราคาสูง ประมาณ 150 ดอลลาร์สหรัฐ ต่อ 10 ไมโครกรัม (Invitrogen) ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำการเลือกที่จะสร้าง และผลิต hbFGF เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา และผลิตโปรตีนตัวอื่นๆ ต่อไปในอนาคต โดยการศึกษาครั้งนี้จะทำการโคลนยีน bFGF ของมนุษย์ เข้าสู่

เวกเตอร์ที่ใช้สำหรับการแสดงออกของยีนใน E. coli และศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าว เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลา และความเข้มข้นของสารที่ใช้กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจะทำการขยายกำลังการผลิตในระบบถังปฏิกรณ์ต่อไป จากนั้นจะนำรีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่สร้างได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค affinity chromatography และทดสอบคุณสมบัติกิจกรรมทางชีววิทยา (Biological activity assay) หลังจากนั้นจะนำรีคอมบิแนนท์ hbFGF บริสุทธิ์ที่ได้จะถูกส่งให้ บริษัท เมดิซสเต็มเซลล์ จำกัด เพื่อทดสอบและนำไปใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์ เพื่อศึกษาความสามารถในการใช้งานแทนที่ รีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ นอกจากนี้ รีคอมบิแนนท์ hbFGF บริสุทธิ์ที่ได้จะถูก encapsulate ด้วยระบบนำส่งนีโอโซม (Niosome) เพื่อพัฒนาเป็นเวชสำอางต่อไป



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การสร้างเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกของยีน (Expression vector construction)

เวกเตอร์ pET28a(+) และ pET32a(+) (Novagen, Germany) ถูกนำมาใช้ในการแสดงของยีน โดยยีน hbFGF ถูกเพิ่มจำนวนจากเวกเตอร์ pWPI_SPbFGF (Addgene, USA) โดยใช้ forward primer คือ bFGF_pET28: CCGGATCCATGGCAGCCGGGAGC, bFGF_pET32: AAGAGCTCATGGCAGCCGGGAGC และ reverse primer: GGCTCGAGTCAGCTCTTAGCAG AAGACATTGG ชิ้นส่วนที่ถูกเพิ่มจำนวน (amplified fragment) ถูกตัดด้วย *Bam*HI/*Xho*I และ *Sac*I/*Xho*I (New England Biolabs, USA) และถูกเชื่อมต่อไปในส่วนที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI/*Xho*I และ *Sac*I/*Xho*I ของเวกเตอร์ pET28 และ pET32 ตามลำดับ ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (NEB, USA) หลังจากการเชื่อมต่อ (ligation) เวกเตอร์ถูกถ่ายเข้าไปใน *E. coli* strain DH5 α จากนั้นทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ (colony PCR) (Zon et al., 1989) เวกเตอร์ที่ถูกสร้างขึ้นเรียกว่า pET28/hbFGF และ pET32/hbFGF ซึ่งถูกตรวจสอบลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencing

3.2. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการทำให้บริสุทธิ์ (Recombinant protein expression and purification)

รีคอมบิแนนท์เวกเตอร์ (pET28/hbFGF และ pET32/hbFGF) ที่มีลำดับเบสที่ต้องการ ถูกส่งถ่ายด้วยกระแสไฟฟ้าเข้าไปยัง *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) (Novagen) และ ArcticExpress™ RIL (Stratagene, USA) เพื่อให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ฟิวชันโปรตีน (recombinant fusion protein) โคลนที่ถูกเลือกจะถูกเลี้ยงข้ามคืนและทำให้เจือจาง 1:100 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ lysogeny broth (LB) ที่เตรียมใหม่ (Bertani, 1952) และเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม บ่มให้เซลล์เจริญที่ 37°C จนกระทั่งได้ค่า optical density 600 nm เท่ากับ 0.6 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ฟิวชันโปรตีน ถูกเหนี่ยวนำด้วยการเติม isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) เซลล์จะถูกเลี้ยงพร้อมเขย่า ที่ 15°C หรือ 20°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมงหรือมากกว่า จากนั้นเซลล์ถูกเก็บเกี่ยวกับการปั่นเหวี่ยงที่ 4000 \times g เป็นเวลา 20 นาที เซลล์ถูกเก็บรักษาที่ -70°C จนกว่าจะถูกนำมาใช้งาน ก่อนการทำบริสุทธิ์ เซลล์จะถูกทำให้ละลายและเติม

บัฟเฟอร์ lysis/binding ที่ประกอบไปด้วย บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 50 mM (pH 8.0) (Sambrook et al., 1989), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) เข้มข้น 1 mM, โซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 150 mM, Triton X-100 เข้มข้น 0.1%, กลีเซอรอลเข้มข้น 10%, อิมิดาโซลเข้มข้น 2 mM และ โลโซไซม์เข้มข้น $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ เซลล์ถูกทำให้แตกบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (GE 100 ultrasonic processor, สภาวะที่ใช้คือ 60-80% amplitude, 60% cycle duty, sonicates 10 วินาที, stop 5 วินาที เป็นเวลา 15 นาที) ส่วนที่ละลายน้ำและไม่สามารถละลายน้ำได้ถูกแยกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ $11,700 \times g$ เป็น 10 นาที ส่วนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ถูกเก็บเกี่ยวและกรองผ่านเมมเบรน polyethersulfone ขนาด $0.45 \mu\text{m}$ และถูกผ่านคอลัมน์ heparin-sepharose affinity chromatography (HiTrap Heparin HP, GE Healthcare, Sweden) หรือ IMAC (HisTrap HP, GE Healthcare) ตามวิธีการของโรงงานผู้ผลิต ส่วนที่แยกได้ประกอบด้วย Trx-6xHis-hbFGF จะถูกเก็บเกี่ยวและผ่านกระบวนการ dialysis ในบัฟเฟอร์ phosphate buffered saline (PBS) จากนั้นโปรตีน Trx-His6-hbFGF ถูกย่อยด้วย enterokinase protease ที่ผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ (Kupradit et al., 2008) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่ 28°C จากนั้นชิ้นส่วน Trx-6xHis และ hbFGF ถูกแยกออกจากขั้นตอนที่สองของ HisTrap HP IMAC ซึ่ง 6xHis-hbFGF, Trx-6xHis-hbFGF และ hbFGF ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะถูกกรองผ่าน $0.2 \mu\text{m}$ และเก็บรักษาที่ 4°C จนกว่าจะนำไปศึกษาต่อไป จากนั้นปริมาณเซลล์ที่แตกทั้งหมด, ส่วนที่ละลายน้ำและไม่สามารถละลายน้ำได้ และส่วนที่ชะออกมาจาก คอลัมน์ถูกเก็บ และวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE ตามด้วยการย้อมสี Coomassie Brilliant Blue ความเข้มข้นของโปรตีนถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford ปริมาณความเข้มข้นของฟิวชั่นโปรตีนในส่วนผสม (mixture) ถูกวิเคราะห์ด้วยโดยซอฟต์แวร์ Quantity One (Bio Rad, USA) และตัวอย่างโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วย immunoblotting โดยตัวอย่างโปรตีนจาก SDS-PAGE ถูก electro-transfer ไปยัง nitrocellulose membrane (Bio Rad) จากนั้นนำเมมเบรนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี His-tag rabbit polyclonal (GenScript, USA) และตามด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง goat anti-rabbit ที่เชื่อมต่อกับ alkaline phosphatase (Sigma, USA) จากนั้นแผ่นเมมเบรนถูกตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย NBT/BCIP substrate (Sigma)

3.3. การทำรีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่ได้ให้บริสุทธิ์ (Recombinant Protein Purification)

เชื้อที่แช่แข็งจะถูกละลายใน native lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM imidazole, 0.1% triton X-100 และ protease inhibitor cocktail) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการสกัดแยกโปรตีนด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูงโปรตีน ทำการแยกเศษเซลล์ด้วยการปั่นที่ความเร็ว 16,000 x g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ส่วน inclusion bodies จะทำการละลายด้วย native lysis buffer ส่วนของเหลวที่มีรีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่มี polyhistidine-tagged จะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย metal ion affinity chromatography (IMAC) resin

นำส่วนใส่เหลวที่มีรีคอมบิแนนท์ hbFGF บ่มร่วมกับ IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) resin ที่ถูก equilibrate ด้วย 50 mM CoCl₂·6H₂O เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารผสมทั้งหมดไปบรรจุใน PD-10 column (GE Healthcare) แล้วล้างด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl (washing buffer) เพื่อกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่เกาะบนเรซินออก ทำการเก็บเกี่ยวรีคอมบิแนนท์ hbFGF โดยการชะล้างคอลัมน์ด้วย washing buffer ที่มีความเข้มข้นของเกลือ imidazole ที่ระดับต่างๆ กัน (10 50 100 250 และ 500 mM ตามลำดับ)

นำตัวอย่างรีคอมบิแนนท์ hbFGF ก่อนและหลังการแยกให้บริสุทธิ์ไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และความจำเพาะด้วยเทคนิค Western Blot โดยใช้ HRP-linked INDIA His probe (Pierce) กล่าวโดยย่อคือ ส่วน soluble และ insoluble fraction ของตัวอย่างโปรตีนจะผ่านการแยกด้วย SDS-PAGE และย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie® G-250 เพื่อตรวจขนาดโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์ hbFGF จากนั้นตรวจความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์ hbFGF ด้วย Western Blot ใช้ SDS-PAGE แยกขนาดของโปรตีนก่อน จากนั้น electroblot โปรตีนไปยัง polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad) แล้วแช่ด้วย blocking buffer ที่ประกอบด้วย western buffer (500 mM Tris pH 7.5, 2 M NaCl) + 1% BSA นาน 30 นาที เปลี่ยนมาแช่ด้วย primary antibody buffer ที่ประกอบด้วย western buffer + 0.05% Tween 20 + 1% BSA และ 1:1,000 primary antibody (HRP-linked INDIA His probe) นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้าง 3 ครั้ง (ครั้งละ 5 นาที) ด้วย Western buffer + 0.05% Tween 20 แล้วตรวจปฏิกิริยาด้วย 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma).

3.4. การทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา (Biological activity assay)

การวิเคราะห์การเพิ่มขยายของเซลล์ด้วยวิธี MTT (MTT cell proliferation assay)

คุณสมบัติ (functional activity) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน 6xHis-hbFGF, Trx-6xHis-hbFGF และ hbFGF ถูกประเมินโดยความสามารถในการเพิ่มปริมาณของเซลล์ NIH3T3 ในสภาวะที่ไม่มีซีรัม (serum-free conditions) เปรียบเทียบกับกิจกรรมของ commercial hbFGF (PHG0026, Invitrogen, USA) ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและ commercial hbFGF (1.7, 3.4, 6.9, 14 and 27 nM) จะถูกเติมลงในเซลล์ที่มีความเข้มข้น 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ที่เลี้ยงหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96-well microtiter ในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) โดยที่ไม่มีซีรัม บ่มที่ 37°C และสภาวะที่มี CO_2 5% หลังจากเลี้ยงเซลล์ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนและ commercial hbFGF เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตัวอย่างจะถูกเติม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma) เข้มข้น 12 mM ปริมาตร 10 μL ใน PBS และบ่มต่อเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อรวมถึงสารละลาย MTT จะถูกดูดออกจากเพลท และเติม SDS เข้มข้น 10% ที่มี HCl เข้มข้น 10 mM ปริมาตร 100 μL เพื่อละลายตะกอนคริสตัล จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 570 nm การเพิ่มขยายของเซลล์ถูกวิเคราะห์และแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเพิ่มขยายที่ได้จากเซลล์ ซึ่งถูกเลี้ยงใน FCS เข้มข้น 10% แต่ระดับความเจือจางของ hbFGF ถูกทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

การรักษา undifferentiated state ของเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์ (Maintenance of the undifferentiated state of human pluripotent stem cells in culture)

hESCs (Pruksananonda et al., 2012) และ hiPSCs (Nishishita et al., 2012) ถูกเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยง (human foreskin-derived fibroblasts) และเคลือบพื้นผิวจากเพาะเลี้ยงด้วย 0.1% gelatin ในอาหาร Knock out DMEM (Invitrogen) ที่มี Knock out serum replacement เข้มข้น 20%, glutamax® เข้มข้น 1%, β -mercaptoethanol เข้มข้น 0.55 mM, nonessential amino acids เข้มข้น 1% (Invitrogen), penicillin ปริมาณ 50 U ml^{-1} (Invitrogen), streptomycin เข้มข้น 50 μg ml^{-1} (Invitrogen), และ commercial hbFGF เข้มข้น 8 ng ml^{-1} (Invitrogen) หรือ 6xHis-hbFGF, Trx-

6xHis-hbFGF จากนั้นโคลน hESC และ hiPSC ที่มีสัญญาณของเซลล์ต้นกำเนิด ถูกเลือกสำหรับเพิ่มจำนวน (subculture) หลังจากการเลี้ยง 8-10 รุ่น (passages) hESC และ hiPSC ถูกวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด (การแสดงผลของ embryonic stem cell markers ด้วยวิธี quantitative polymerase chain reaction (qPCR) และการย้อม immunocytochemical)

3.5. การย้อมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและอิมมูโนไซโตเคมีคอล (Alkaline phosphatase and immunocytochemical staining)

โคลน hESC และ hiPSC ถูก fix ด้วยพาราฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 4% จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสถูกตรวจโดยใช้ AP detection kit (Sigma) ตามวิธีของโรงงานผู้ผลิต สำหรับปฏิกิริยาของ OCT4 antibody นั้น โคลนจะถูกบ่มด้วย Triton X-100 (Sigma) ใน DPBS (Invitrogen) เข้มข้น 2% เป็นเวลา 15 นาที และบ่มในบัพเฟอร์ blocking ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (HyClone) เข้มข้น 5% ใน DPBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตัวอย่างจะถูกล้างด้วย DPBS และบ่มด้วย primary antibodies ซึ่ง primary antibodies ซื้อจาก Abcam ประเทศสหรัฐอเมริกา รวมถึง rat antibodies against stage-specific embryonic antigen (SSEA)-3 (ab162286), mouse anti-SSEA-4 (ab16287) และ goat anti-OCT4 (ab27985) ถูกทำให้เจือจาง 1:200 ด้วย PBS ที่ไม่มีแคลเซียมและแมกนีเซียม โคลนถูกบ่มข้ามคืนที่ 4°C ด้วย primary antibodies ที่เจือจาง สำหรับการตรวจวัดของแอนติบอดี เซลล์ถูกบ่มด้วย rabbit anti-rat-FITC (ab8520) ที่เจือจาง 1:200, แอนติบอดี goat anti-mouse-Cy3 (Milipore) และ rabbit anti-goat-FITC (ab97009) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นโคลนถูกย้อมด้วย Hoechst 33342 (Sigma) และตรวจวัดผลภายใต้กล้อง fluorescence microscope

3.6. Quantitative polymerase chain reaction

อาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ถูกสกัดจากโคลน hESC และ hiPSC ด้วยชุดสกัด GeneJET RNA purification และถูกเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit ตามวิธีของโรงงานผู้ผลิต (Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาณการแสดงผลของ mRNA ของ *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CDX2*, *BRACHYURY* และ *PAX6* ถูกวิเคราะห์โดยใช้วิธี SYBR-

green-based real-time quantitative-PCR (qPCR) ด้วยเครื่อง Bio-Rad Chromo4 real-time PCR (Bio-Rad) ซึ่งชุด primer ที่ใช้แสดงใน Table1 ปฏิบัติการเพิ่มจำนวน (amplification reaction) ประกอบด้วย cDNA เข้มข้น 10 ng, สารละลาย 1x KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems, USA), และ primer จำเพาะของแต่ละตัวที่ความเข้มข้น 0.25 μ M ในปริมาตรทั้งหมด 20 μ l ปฏิบัติการถูกทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ และสภาวะรอบอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ qPCR คือ 95°C เป็นเวลา 3 นาที, ตามด้วย 45 รอบของ 95°C เป็นเวลา 20 วินาที และ 62°C เป็นเวลา 1 นาที

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการทำ qPCR.

Primer	Sequence (5' to 3')
OCT4-F	TGGGCTCGAGAAGGATGTG
OCT4-R	GCATAGTCGCTGCTTGATCG
SOX2-F	CCCCCGGCGGCAATAGCA
SOX2-R	TCGGCGCCGGGAGATACAT
NANOG-F	CAGAAGGCCTCAGCACCTAC
NANOG-R	GTCACTGGCAGGAGAATTTGG
CDX2-F	CCTCCGCTGGGCTTCATTCC
CDX2-R	TGGGGGTTCTGCAGTCTTTGGTC
BRACHYURY-F	TGCTTCCCTGAGACCCAGTT
BRACHYURY-R	GATCACTTCTTTCTTTGCATCAAG
PAX6-F	CAGCTCGGTGGTGTCTTTG
PAX6-R	AGTCGCTACTCTCGGTTTA
GAPDH-F	GTCAACGGATTTGGTCGTATTG
GAPDH-R	CATGGGTGGAATCATATTGGA

3.7. วิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

เปอร์เซ็นต์การเจริญของเซลล์ NIH3T3 ถูกแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean \pm SD) Relative quantification ของระดับที่แสดงออกของยีนเป้าหมายถูกแสดง ค่าความแตกต่างและข้อมูลถูกวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) ด้วย Statistical Analysis System

(SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างถูกวิเคราะห์โดยใช้ analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



บทที่ 4

ผลการวิจัย และการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1. การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของ hbFGF fusion protein

เวกเตอร์ที่ใช้สำหรับการแสดงออกของยีน (Expression vector) คือ เวกเตอร์ pET28a(+) และ pET32a(+) (Figure 1A) ผลของลำดับเบสของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28/hbFGF และ pET32/hbFGF แสดงใน Figure 1B และ C ซึ่งพบว่าไม่มีการมิวเตชัน (mutation) เกิดขึ้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pWPI_SPbFGF และใน GenBank (accession no. M27968) ที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28/hbFGF หลังจากกระบวนการทรานสเลชัน จะได้ hbFGF ที่มีกรดอะมิโน 34 ตัว คือ MGSSHHHHHSSGVPRGSHMASMTGGQQMGRGS อยู่ด้าน N-terminal และมี hexa-histidine (6xHis)-tag สำหรับทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) เก้ารวมอยู่ด้วย ในขณะที่ pET32/hbFGF สร้าง fusion protein ที่มี N-terminal thioredoxin (Trx) domain เป็นลำดับเบสของ pET32a(+) ต่ออยู่กับ 6xHis-tag ตามด้วย enterokinase ที่ต่อดำเนินลำดับเบสของ hbFGF จากการวิเคราะห์ด้วย ExPASy Protein Parameters Tools สามารถทำนายได้ว่า ขนาดโมเลกุล (molecular mass) และ ค่า pI ของโปรตีน 6xHis-hbFGF (189 amino acid), Trx-6xHis-hbFGF (324 amino acid) และ hbFGF (166 amino acid) คือ 20,740 Da/pI=9.8, 35,417 Da/pI=7.2 และ 18,360 Da/pI= 9.4 ตามลำดับ (Figure 1)

การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ, ความเข้มข้นของ isopropyl- β -D -thiogalactoside (IPTG) และเวลา (induction time) ต่อการแสดงออกของ 6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins รวมถึงโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble protein) จาก pET28/hbFGF และ pET32/hbFGF ใน *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และ ArcticExpress ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 20°C fusion protein มีการแสดงออกมากกว่า ที่อุณหภูมิ 15°C และการเพิ่มความเข้มข้นของ IPTG จาก 0.1 มิลลิโมลาร์ ถึง 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลกระทบต่อระดับการแสดงออก (expression level) ของ fusion protein โดยที่โปรตีน Trx-6xHis-hbFGF สามารถแสดงออกได้โดยที่ไม่มี IPTG ทั้งใน BL21(DE3) และ ArcticExpress (Figure 2) การเพิ่มระดับการแสดงออกของ fusion protein สามารถทำได้โดยการเพิ่ม introduction time (Figure 3) จาก Figure 4A และ B พบว่ามากกว่า 95% ของโปรตีน 6xHis-hbFGF

ที่ถูกผลิตขึ้นอยู่ในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (soluble form) และน้อยกว่า 3% อยู่ในรูปที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (insoluble form)

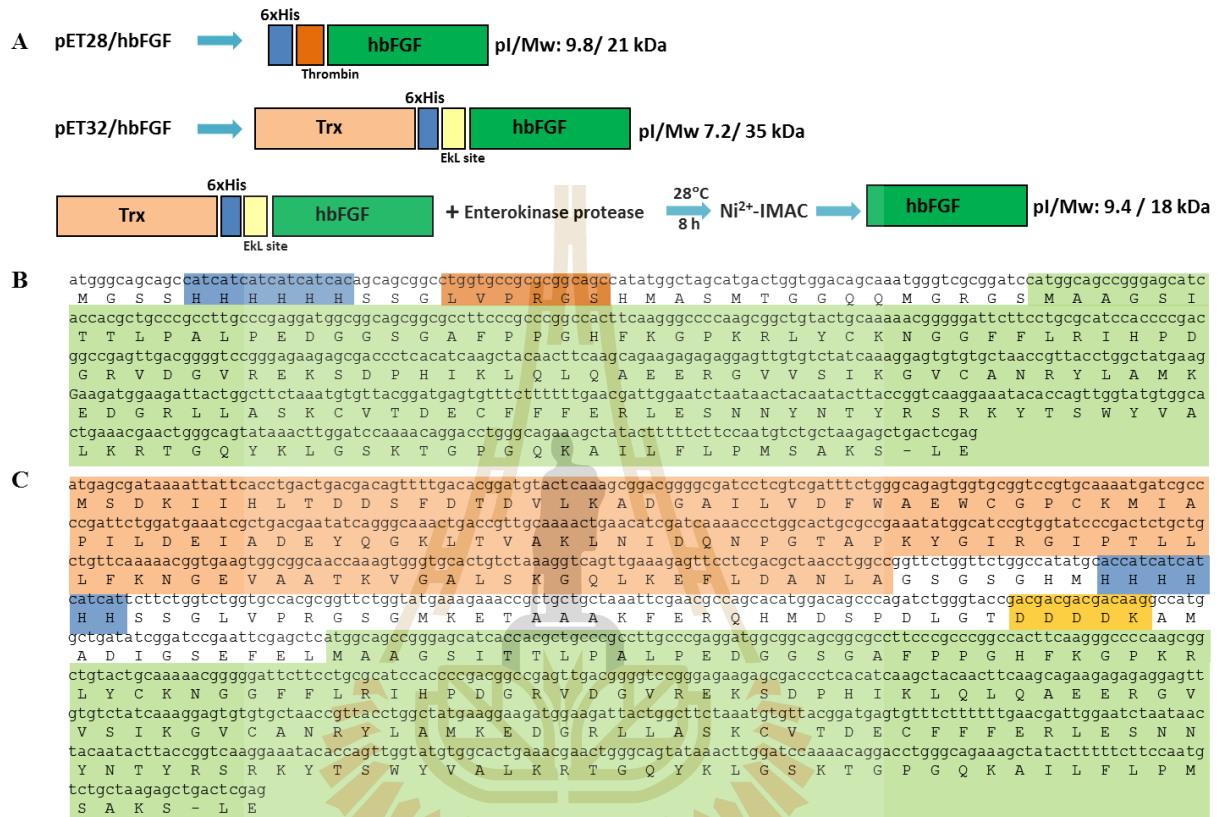


Figure 1 Schematic diagram of the recombinant proteins. pET28a(+) and pET32a(+) vector backbones were used to construct the expression vectors (A). pET28/hbFGF and pET32/hbFGF expression vectors were verified by sequencing (B and C). Hexahistidine (6xHis)-tags are at the N-terminus of both recombinant proteins. The thrombin and enterokinase cleavage sites (LVPRGS and DDDDK, respectively) are located between the 6xHis-tag and the thioredoxin (Trx)-6xHis-tag and the hbFGF sequence, to release of mature hbFGF from the 6xHis-hbFGF and the Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins, respectively.

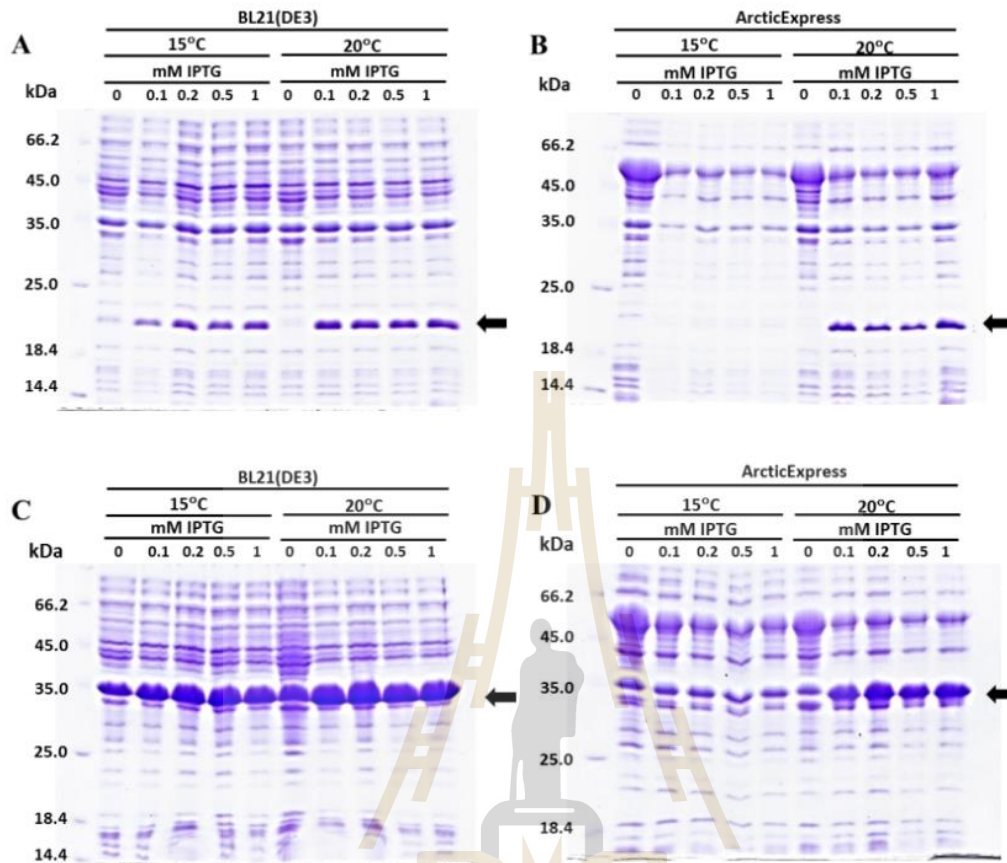


Figure 2 Effect of host cell, induction temperature and IPTG concentration on expression of recombinant hbFGF fusion proteins. The pET28/hbFGF (A and B) and pET32/hbFGF (C and D) expression vectors were transformed into *E.coli* BL21(DE3) (A and C) and ArcticExpress strains (B and D). The transformed cells were grown at 37°C to an OD600 of 0.6 and then induced with 0 to 1 mM IPTG for 12 h at 15 or 20°C. The induced cells were harvested, the whole cell lysate was analyzed on 15% SDS-PAGE and the gels stained with Coomassie Brilliant Blue. Proteins from equal amount of cells were loaded into each lane. The arrows indicate the positions of recombinant fusion proteins.

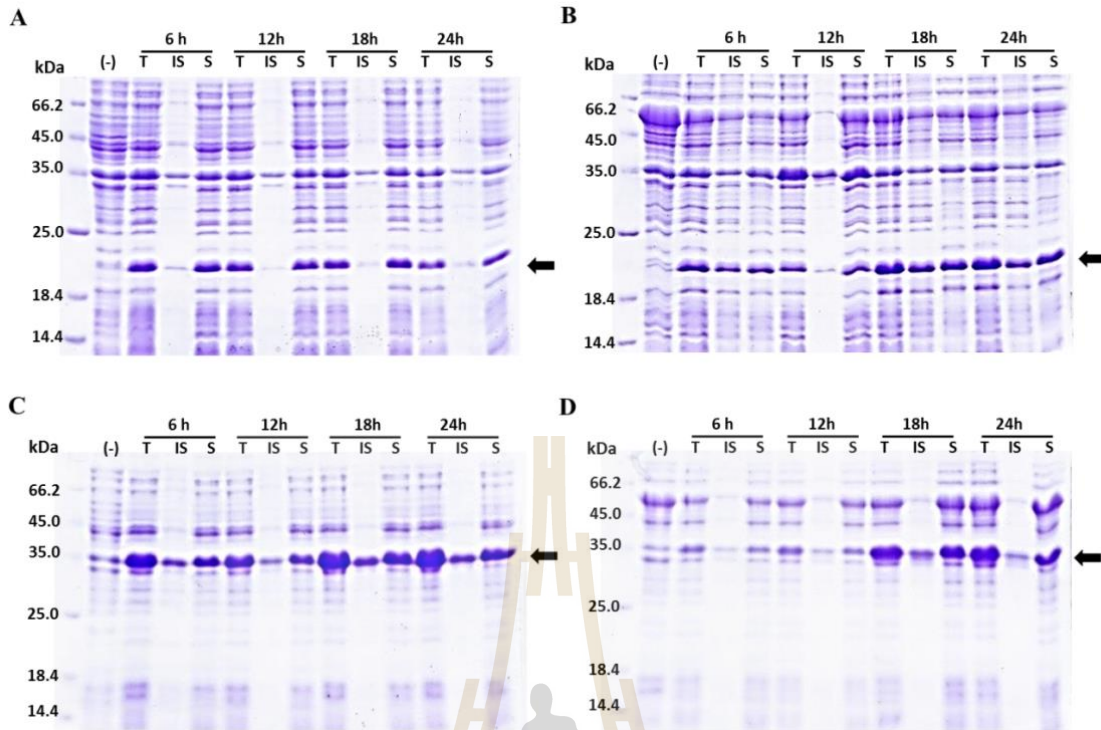


Figure 3 The effect of induction times on solubility of recombinant hbFGF fusion proteins. The pET28/hbFGF (A and B) and pET32/hbFGF (C and D) vectors were transformed into *E. coli* BL21(DE3) (A and C) and ArcticExpress(DE3) (B and D) strains. The transformed cells were grown at 37°C to an OD600 of 0.6 and then induced with 0.2 mM IPTG for 6 to 24 h at 20°C. The induced cells were harvested and then the cell lysates were separated into soluble and the insoluble fraction by centrifugation. The solubility of the fusion proteins was analyzed on 15% SDS-PAGE and the gels stained with Coomassie Brilliant Blue. Equal cell concentration was loaded into each lane. The arrows indicate the position of recombinant fusion proteins. (-), total protein before induction; T, total cellular protein after induction; IS, insoluble fraction from induced cells; S, soluble fraction from induced cells.

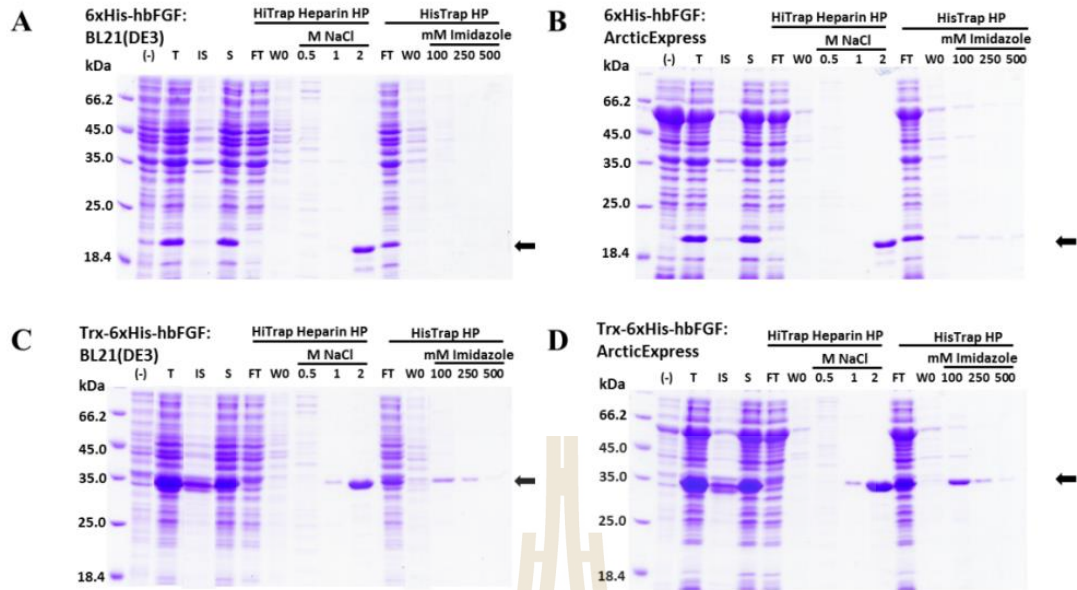


Figure 4 SDS-PAGE of recombinant hbFGF fusion proteins at various stages of purification. (A) pET28/hbFGF in *E. coli* BL21(DE3), (B) pET28/hbFGF in *E. coli* ArcticExpress(DE3), (C) pET32/hbFGF in *E. coli* BL21(DE3), (D) pET32/hbFGF in *E. coli* ArcticExpress(DE3). The cells were grown until the OD600 reached 0.6 and were then induced with 0.2 mM IPTG at 20°C for 18 h. The cells (1g wet cell weight) were harvested, and the recombinant proteins were purified on heparin-sepharose affinity chromatography (HiTrap HeparinHP) and Ni-IMAC (HisTrap HP) columns under native conditions. The proteins were analyzed on a 15% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. These results represent three independent experiments. The lanes from left to right are protein molecular weight markers (masses marked in kilodaltons); (-), total protein before induction; T, total cellular protein after induction; IS, insoluble fractions from induced cells; S, soluble fractions from induced cells; FT, flow through fractions; W0, initial washing buffer fraction. For the HiTrap Heparin HP column, the fusion proteins were eluted with 0.5, 1 and 2 M NaCl. For HisTrap HP, the fusion proteins were eluted with 100, 250 and 500mM imidazole. The arrows indicate the fusion proteins.

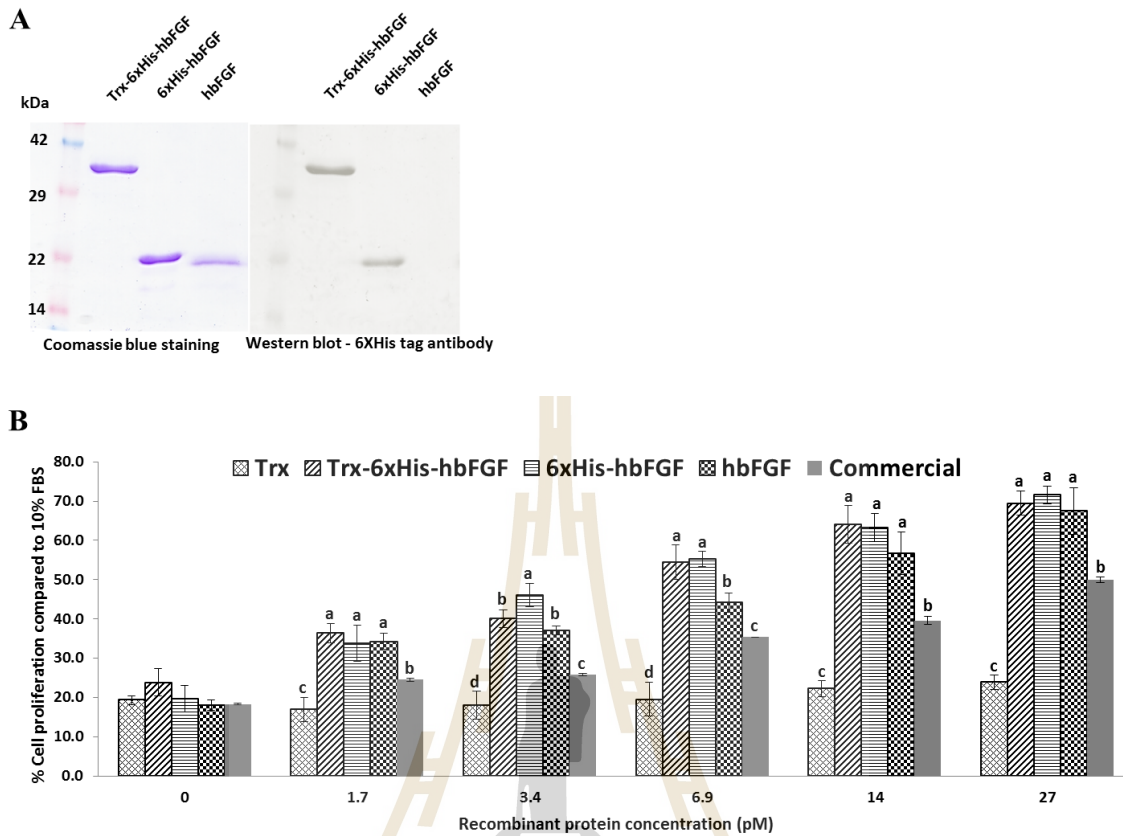


Figure 5 Analysis of purified recombinant hbFGF on SDS-PAGE and western blot (A) and biological activity (B). Purified 6xHis-hbFGF and Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins and hbFGF were separated on a 15% SDS-PAGE gel and were then either stained with Coomassie Brilliant Blue or transferred to a nitrocellulose membrane and identified by immunoblotting with a goat anti-His antibody (A). Comparison of the percentage of growth of NIH3T3 after 72 h incubation with Trx-tag (□), Trx-6xHis-hbFGF (▨), 6xHis-hbFGF (▤), hbFGF (▧) and commercial hbFGF (Invitrogen) (■) (B). Different letters (a, b, c, d) within the same concentration indicate significant different ($P < 0.05$).

การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์แบบสัมพรรคภาพ (Affinity purification) ด้วย HisTrap HP (GE Healthcare, Sweden) โปรตีน 6xHis-hbFGF ไม่สามารถจับบนตัวดูดซับและสูญเสียไปในขั้นตอนการจับบนตัวดูดซับ (Binding) ประมาณ 60-80% และสามารถเก็บเกี่ยวได้ 10-24% หลังการชะ (elution) โปรตีนออกจากคอลัมน์โดยใช้อิมิดาโซล (imidazole) ความเข้มข้น 100, 250 และ 500 มิลลิโมลาร์ ส่วนการทำบริสุทธิ์แบบสัมพรรคภาพด้วย HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) โปรตีน 6xHis-hbFGF สามารถจับกับตัวดูดซับในคอลัมน์ได้ 100% การชะโปรตีนด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นสูง (2 M) พบการแสดงออกของโปรตีน Trx-6xHis-hbFGF มีความคล้ายคลึงกันทั้งใน *E. coli* BL21(DE3) และ *E. coli* ArcticExpress (Figure 4C และ D) จากผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงเซลล์ *E. coli* ทั้ง 2 ชนิด ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จะให้เซลล์หนัก 1 กรัม (น้ำหนักเปียก) จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiTrap Heparin HP จะให้ผลผลิต (yield) ของโปรตีน 6xHis-hbFGF ประมาณ 12 มิลลิกรัม และของ Trx-6xHis-hbFGF ประมาณ 14 มิลลิกรัม (Table 1) ในทางตรงกันข้าม การทำให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap HP chromatography ได้ผลผลิตของโปรตีนในปริมาณที่ต่ำ (Table 2) จากผลทดลองปรากฏว่าโปรตีนทั้งสองชนิดมีค่าความบริสุทธิ์มากกว่า 95% จากนั้นโปรตีน Trx-6xHis-hbFGF ถูก dialyzed ในบัฟเฟอร์ PBS เพื่อกำจัดโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และอิมิดาโซล (imidazole) และตามด้วยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ enterokinase protease ที่จะแยก hbFGF ออกจาก N-terminal Trx-6xHis-tag จากนั้นทำ hbFGF ให้บริสุทธิ์จาก enterokinase และ Trx-6xHis-tag ด้วย HisTrap HP chromatography รีคอมบิแนนท์ enterokinase และ Trx-6xHis-tag ที่ผลิตขึ้นเองยังคงมี 6xHis tags อยู่ ดังนั้น โปรตีนทั้งสองชนิดจะจับบนตัวดูดซับในคอลัมน์ ส่วน hbFGF จะถูกชะล้างออกมา และ tags จะถูกแยกออกจาก hbFGF อย่างสมบูรณ์ ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ได้ถูกวิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE (Figure 5A) ขนาดโมเลกุลของ 6xHis-hbFGF, Trx-6xHis-hbFGF และ hbFGF คือ 21, 35 และ 18 kDa ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลที่วิเคราะห์ด้วย ExPASy Protein Parameters Tools (Figure 1) จากนั้นโปรตีนหลังทำให้บริสุทธิ์ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blotting ผลการทดลองพบว่า 6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF สามารถตรวจจับด้วยแอนติบอดี rabbit anti-His polyclonal ยกเว้น hbFGF เนื่องจาก 6xHis tag ถูกกำจัดออกหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ enterokinase protease (Figure 5A)

Table 2 Purification of hbFGF fusion proteins from recombinant expression in *E. coli* with different expression vectors and expression hosts with HiTrap Heparin HP column.

Expression vector	Expression Host	Fraction	Total protein (mg) ¹	hbFGF fusion protein (mg) ^{1,2}	Purity (%) ³	Yield (%) ⁴
pET28/hbFGF	BL21(DE3)	Cell lysate	105.7	13.8	13.1	100
		Soluble protein	84.6	13.6	16.1	98.6
		0.5 M NaCl	3.5	0	0	0
		1 M NaCl	0	0	0	0
		2 M NaCl	13.1	12.4	94.7	90
	ArcticExpress	Cell lysate	117.4	13.4	11.4	100
		Soluble protein	92.8	12.9	13.9	96.3
		0.5 M NaCl	2.8	0	0	0
		1 M NaCl	0	0	0	0
		2 M NaCl	12.9	12.2	94.6	91
pET32/hbFGF	BL21(DE3)	Cell lysate	123.7	18.9	15.3	100
		Soluble protein	96.5	17.6	18.2	93.1
		0.5 M NaCl	3.9	0	0	0
		1 M NaCl	1.8	1.8	100	9.5
		2 M NaCl	15.2	14.8	97.3	78.3
	ArcticExpress	Cell lysate	135.2	21.7	16.1	100
		Soluble protein	107.8	20.3	18.8	93.5
		0.5 M NaCl	3.3	0	0	0
		1 M NaCl	4.7	4.7	100	21.7
		2 M NaCl	14.7	14.2	96.6	65.4

¹ Results are derived from 1 g of wet cell weight. Protein concentrations were estimated by the method of Bradford with bovine serum albumin (BSA) as a standard.

² The amount of hbFGF fusion protein was calculated from the ratio of the intensity of the target protein band to the intensity of all protein bands in the fraction. The band intensity was analyzed with Quantity One software.

³ The % Purity was determined by dividing the amount of the target protein by that of the total proteins in each fraction and multiply by 100.

⁴ The yield at each step in the procedure is the amount of the target protein at that step divided by the amount of the target protein in the first step (defined as 100%).

Table 3 Purification of hbFGF fusion proteins from recombinant expression in *E. coli* with different expression vectors and expression hosts by IMAC on a HisTrap HP column.

Expression vector	Expression Host	Fraction	Total protein (mg) ¹	hbFGF fusion protein (mg) ^{1,2}	Purity (%) ³	Yield (%) ⁴
pET28/hbFGF	BL21(DE3)	Cell lysate	108.3	10.2	9.4	100
		Soluble protein	84.6	9.6	11.3	94.1
		100 mM Imidazole	0.5	0.4	80	3.9
		250 mM Imidazole	0.3	0.3	100	2.9
		500 mM Imidazole	0.3	0.3	100	2.9
	ArticExpress	Cell lysate	115.7	12.6	10.9	100
		Soluble protein	95.4	11.9	12.5	94.4
		100 mM Imidazole	1.2	0.7	58.3	5.5
		250 mM Imidazole	0.5	0.5	100	4
		500 mM Imidazole	0.4	0.4	100	3.1
pET32/hbFGF	BL21(DE3)	Cell lysate	119.1	14.9	12.5	100
		Soluble protein	96.5	14.4	14.9	96.6
		100 mM Imidazole	3.5	3.1	88.6	20.8
		250 mM Imidazole	1.2	1.2	100	8.1
		500 mM Imidazole	0.5	0.5	100	3.4
	ArticExpress	Cell lysate	125.1	15.7	12.5	100
		Soluble protein	102.2	15.4	15.1	98.1
		100 mM Imidazole	4.2	3.5	83.3	22.3
		250 mM Imidazole	0.9	0.9	100	5.7
		500 mM Imidazole	0.4	0.4	100	2.5

¹ Results are derived from 1 g of wet cell weight. Protein concentrations were estimated by the method of Bradford with bovine serum albumin (BSA) as a standard.

² The amount of hbFGF fusion protein was calculated from the ratio of the intensity of the target protein band to the intensity of all protein bands in the fraction. The band intensity was analyzed with Quantity One software.

³ The % Purity was determined by dividing the amount of the target protein by that of the total proteins in each fraction and multiply by 100.

⁴ The yield at each step in the procedure is the amount of the target protein at that step divided by the amount of the target protein in the first step (defined as 100%).

เซลล์เจ้าบ้าน เช่น *E. coli*, *Pichia pastoris*, insect cells, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, soybean seeds, silkworms (*Bombyx mori* L.) และ rice seeds ถูกใช้สำหรับการแสดงของยีนเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ hbFGF ซึ่งได้ผลผลิตโปรตีนประมาณ 1-100 มิลลิกรัมต่อเซลล์ 1 ลิตร (Squires et al., 1988; Hill and Crane-Robinson, 1995; Wu et al., 2001; Ding et al., 2006; Mu et al., 2008; Gasparian et al., 2009; Song et al., 2013; Rassouli et al., 2013; Kwong et al., 2013) *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ถูกนิยมใช้ในการแสดงออกของ hbFGF มากที่สุด เพราะเป็นระบบที่ทำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสูง และเจริญได้ง่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาไม่แพง การแสดงออกในระดับสูงของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli* ทำให้เกิด misfolding และเกิดการรวมตัวของสารที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ที่เรียกว่า inclusion bodies ส่งผลให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนไม่ละลายน้ำ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli* รวมถึงเวกเตอร์ที่ใช้แสดงออก เซลล์เจ้าบ้าน และการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและความคงตัว นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการแสดงออกโดยการลดอุณหภูมิ, การแสดงออกร่วมของ molecular chaperones, การปรับความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำ (inducer), รวมถึงโคดอน (codon) และโปรตีนเป้าหมาย (targeting protein) ที่จะส่งออกไปยัง periplasm (Sorensen and Mortensen, 2005; Esposito and Chatterjee, 2006; Rosano and Ceccarelli, 2009) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21(DE3) และ ArcticExpress ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ละลายน้ำได้ในระดับที่เท่ากัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การมี chaperones และ tRNA ที่มีโคดอน R, I และ L ใน ArcticExpress ไม่มีความจำเป็นสำหรับการแสดงออกของ hbFGF ที่ละลายน้ำได้ และการลดอุณหภูมิ จาก 20°C ถึง 15°C ไม่ได้ทำให้การแสดงออกเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม Trx-6xHis-bFGF มีแสดงออกของโปรตีน สูงกว่า 6xHis-hbFGF ประมาณ 2 เท่า (Figure 2)

การทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่แสดงออกใน *E. coli* ถูกทดลองในหลายๆระบบ รวมถึง 6xHis, maltose binding protein (MBP), glutathione S-transferase (GST), Trx and b'a' domains of human protein disulfide isomerase (PDI) (Lemaître et al., 1995; Sheng et al., 2003; Song et al., 2013; Rassouli et al., 2013) ซึ่ง fusion tags ไม่เพียงแต่ทำให้การละลายน้ำและระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพิ่มขึ้นเท่านั้น แต่ยังเพิ่มความคงตัวของโปรตีนอีกด้วย ใน

การศึกษานี้ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนสองแบบ คือ Trx- และ 6xHis-tagged ภายใต้สภาวะที่ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตรีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่ละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ Trx-tagged ในสภาวะคู่ควบกับอุณหภูมิที่ต่ำ (20°C) มีการแสดงออกที่สูงกว่า Trx-6xHis-hbFGF และเทียบเท่ากับ 6xHis-hbFGF ยีน *Trx* ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการ transcription และ translation ในช่วงต้น ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มผลผลิตของรีคอมบิแนนท์โปรตีน และโปรตีน Trx ยังแสดงตัวเป็น intramolecular chaperone ที่เป็นตัวกลางในการรวมกับ partner ซึ่งขั้นตอนนี้อาจเป็นเหตุผลว่าทำไมการแสดงออกของ Trx-6xHis-hbFGF ถึงสูงกว่า 6xHis-hbFGF โดยที่ 6xHis tags ถูกหลอมรวมกับ N-terminal ของโปรตีนทั้งสอง เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยที่โปรตีนนี้ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี IMAC อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่แสดงออกประมาณ 20-60% เท่านั้นที่จับกับ Ni²⁺ IMAC ซึ่งผลการทดลองนี้ต่างจากการรายงานของ Rassouli et al. (2013) และ Gasparian et al. (2009) กระบวนการทำให้บริสุทธิ์มีหลากหลายวิธีที่แสดงให้เห็นถึงการผลิตรีคอมบิแนนท์ hbFGF จาก *E.coli* รวมถึงการทำให้บริสุทธิ์แบบ single-step ด้วย heparin affinity chromatography หรือ immobilized metal ion affinity chromatography, การใช้ cation exchange column chromatography ร่วมกับ heparin affinity chromatography และ การใช้ continuous bed หรือ expanded bed chromatography ร่วมกับ heparin affinity chromatography เป็นที่ทราบกันว่า hbFGF มี unique heparin-binding domain ที่เป็นที่ต้องการสำหรับการสร้าง tri-molecular signaling complex ที่คงตัว กับ hbFGF ligand และ receptor tyrosine kinases (Dowd et al., 1999) ในการศึกษาครั้งนี้ การใช้ Ni²⁺ IMAC ในช่วงต้นของขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ไม่ได้มีประสิทธิภาพมากนัก เพราะว่า hbFGF มีการสูญเสียบางส่วน ซึ่งส่งผลให้การฟื้นคืน (recovery) โปรตีนสู่สภาพปกติที่ต่ำ อย่างไรก็ตามการใช้ heparin-sepharose affinity chromatography ส่งผลให้การฟื้นคืนโปรตีน hbFGF เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Trx-6xHis-hbFGF ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วนั้น ถูกทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ enterokinase ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าเกิดการตกตะกอนของโปรตีนและทำให้เกิดการสูญเสียโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากโปรตีนไม่มีความคงตัวหลังจากการเอา tag ออก

4.2. กิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity) ของรีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณของ NIH3T3 cell

การทดสอบ MTT cell proliferation โดยใช้ NIH3T3 cell line ถูกใช้เพื่อวัดกิจกรรมทางชีววิทยาของโปรตีนบริสุทธิ์ 6xHis-hbFGF, Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins และ hbFGF ที่ถูกแยกเอา tag ออกแล้ว ในการทดสอบ NIH3T3 cells นั้นได้เปลี่ยนจากอาหารเหลวที่มี fetal bovine serum (FBS) มาเป็น serum-free medium และมีการเติม purified recombinant proteins หรือ commercial hbFGF (Invitrogen) ผลการทดลองได้ถูกแสดงออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเจริญของ NIH3T3 cell กับเซลล์ที่ถูกทดสอบในอาหารเหลวที่ประกอบไปด้วย FBS ความเข้มข้น 10% เพียงอย่างเดียว (Figure 5B) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า NIH3T3 cells ที่ถูกทดสอบด้วย recombinant Trx-tag (negative control) สามารถเพิ่มจำนวนได้เพียง 20% ของอัตราการเจริญของเซลล์ที่เจริญใน FBS ที่มีความเข้มข้น 10% ผลการทดลองบ่งชี้ว่า Trx-tag เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ สามารถเพิ่มขึ้นได้โดยสัมพันธ์กับความเข้มข้น effective doses ที่ 50% (ED_{50}) ประมาณ 6.2, 6.3 และ 12.4 pM สำหรับ 6xHis-hbFGF, Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins และ hbFGF ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่ถูกผลิตในการศึกษาครั้งนี้ มีค่า potency (ED_{50} 6 ถึง 12 pM; ประมาณ 0.1-0.2 ng hbFGF ml^{-1}) สูงกว่า commercially available hbFGF (Invitrogen) (ED_{50} 27 pM) อย่างมีนัยสำคัญ การทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ของ mitogenic activity ของรีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่มี ED_{50} ประมาณ 0.15-3 ng ml^{-1} (Gasparian et al., 2009; Song et al., 2013) นอกจากนี้ hbFGF ที่ทำให้บริสุทธิ์ที่ถูกผลิตขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ แสดงค่า mitogenic activity สูงกว่า commercial hbFGF ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การมี fusion partner ไม่ได้รบกวนกิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity) ของโปรตีน ผลที่ได้นี้มีความคงที่เมื่อเทียบกับการรายงานที่มีก่อนหน้านี้ บ่งชี้ว่าการเอา tags ออกด้วยเอนไซม์ หลังจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์นั้น ไม่มีความจำเป็น (Imsoonthornruksa et al., 2011; Rassouli et al., 2013)

4.3. การทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนท์ hbFGF fusion proteins ที่มีผลต่อคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์

เนื่องจากรีคอมบิแนนท์ hbFGF ที่มี fusion tags ไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีน ดังนั้น 6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins จึงถูกนำมาทดสอบความสามารถในการรักษาระยะ undifferentiated ของ hESCs และ hiPSCs เปรียบเทียบกับ commercial hbFGF ซึ่ง hESCs และ hiPSCs ถูกทำให้เจริญบน mitotically inactive HFF ใน gelatin-coated dishes และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติม 6xHis-hbFGF, Trx-6xHis-hbFGF หรือ commercial hbFGF (8 ng ml^{-1}) ประมาณ 0.4 nM อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนใหม่ทุกวัน โคลินี่ที่เจริญจะถูกเปลี่ยนภาชนะใหม่ (passage) ทุก 5-7 วัน ด้วยวิธีการ manual cutting ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 23G หลังจากที่ถูกเลี้ยงและเปลี่ยนภาชนะใหม่ครบ 8-10 ครั้ง พบว่าอัตราการเพิ่มขยาย (proliferation rate) และลักษณะสัณฐานวิทยาของโคลินี่ (colony morphology) (Baharvand et al., 2006) ของ hESCs และ hiPSCs แสดงให้เห็นว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ 6xHis-hbFGF หรือ Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins หรือ commercial hbFGF (Figure 6A และ B) โคลินี่ของ hESCs และ hiPSCs ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี fusion proteins เป็นผลบวกสำหรับเอนไซม์ alkaline phosphatase, POU family transcription factor OCT4, และ stage-specific embryonic antigens SSEA-3 และ SSEA-4 ซึ่งยืนยันว่าเซลล์ยังคงรักษา pluripotent characteristics ไว้ได้ (Figure 6A และ B) Negative control ถูกทดสอบเพื่อตรวจสอบสำหรับ auto-fluorescence ในขั้นตอนนี้ทำได้ด้วยการกำจัด primary antibody และเติมเพียง secondary antibody ผลปรากฏว่าไม่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เกิดขึ้น (ไม่ได้แสดงผล) การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กันของ pluripotency-associated genes OCT4, SOX2 และ NANOG พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ในระดับการแสดงออกระหว่างเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ 6xHis-hbFGF หรือ Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins หรือ commercial hbFGF (Figure 7A และ B) ในขณะที่การแสดงออกของ differentiation markers PAX6, CDX2 และ BRACHYURY ไม่สามารถถูกตรวจจับได้ (Figure 7A และ B) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ 6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF สามารถถูกใช้ในการรักษาและขยายระยะเวลาการเปลี่ยนถ่ายของ undifferentiated hESCs และ iPSCs ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ดีเทียบเท่ากับ commercial hbFGF จาก Invitrogen

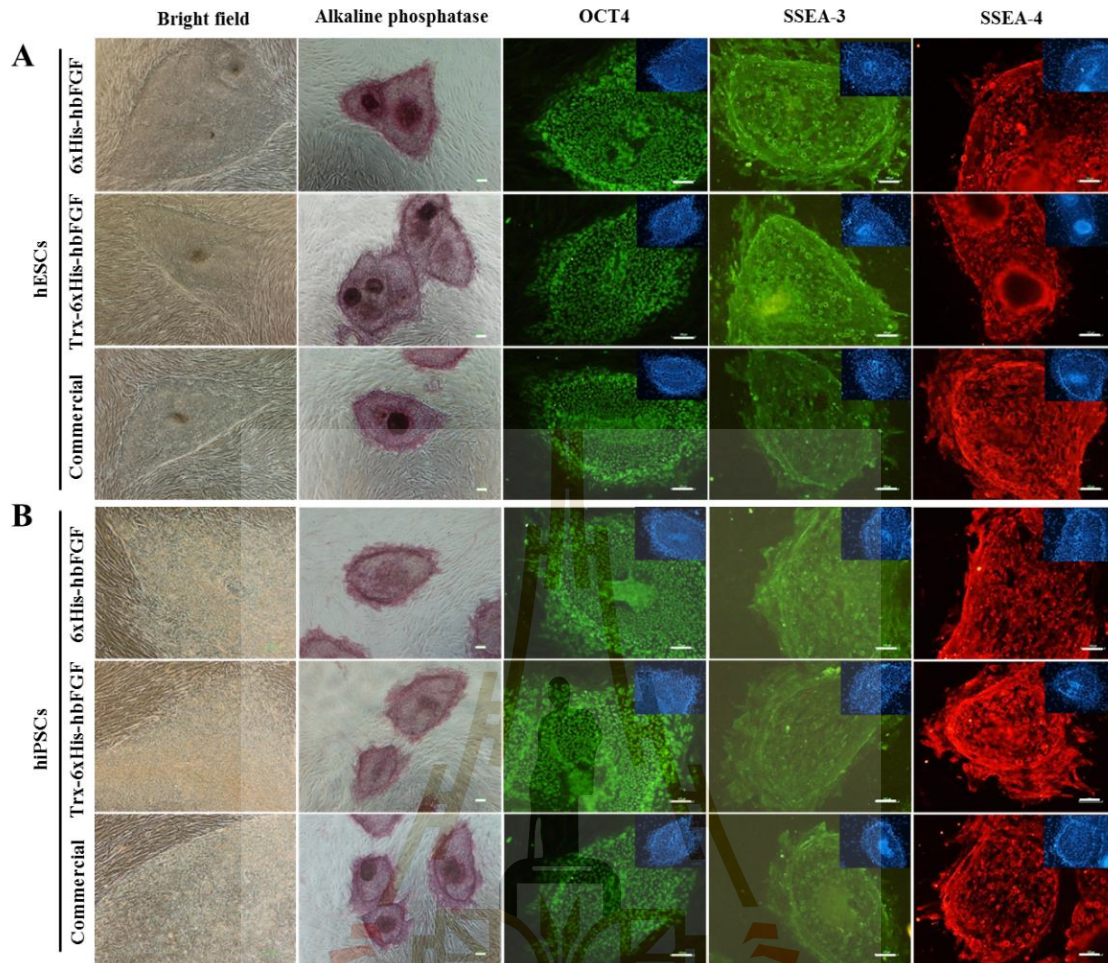


Figure 6 Recombinant hbFGF fusion proteins support several passages of undifferentiated human ESCs and iPSCs. The culture media supplemented with the 6xHis-hbFGF, Trx-6xHis-hbFGF or commercial hbFGF maintained the morphology of undifferentiated hESCs (A) and iPSCs (B) colonies. The cells were positive for alkaline phosphatase activity, and immunostaining of expanded colonies revealed expression of nuclear pluripotency (OCT4) and cell-surface markers (SSEA-3 and SSEA-4). Insert boxes show Hoechst 33342 nuclear staining. Scale bars, 100 μm .

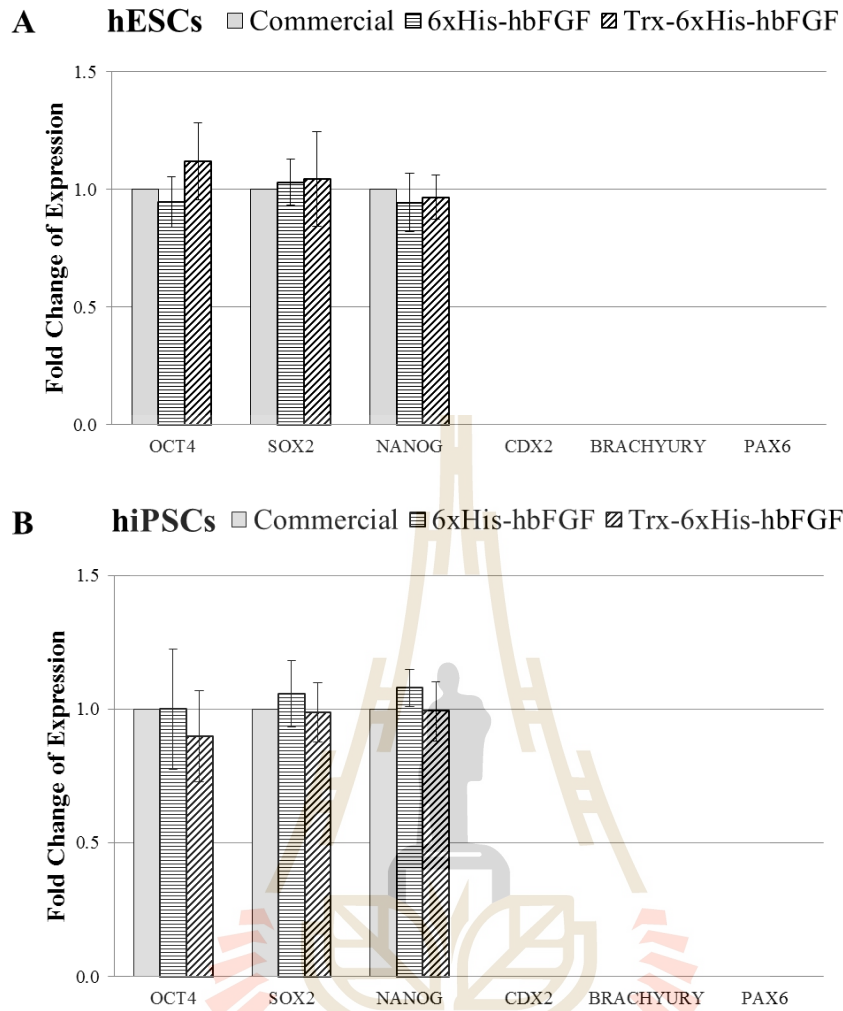


Figure 7 qPCR quantitative analysis of pluripotency-associated and the differentiation markers expression in hESCs (A) and iPSCs (B) that were cultured in the media supplemented with commercial hbFGF (□), 6xHis-hbFGF (▨) and Trx 6xHis-hbFGF (▩) for 8-10 passages. These results are representative of three independent experiments. The values were standardized to GAPDH expression. The data are presented as the mean \pm SD values indicate non significant different ($P > 0.05$).

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ง่ายและมีประสิทธิภาพ สำหรับการผลิต hbFGF ที่ละลายน้ำได้ คือ 6xHis-bFGF และ Trx-6xHis-hbFGF ใน *E. coli* ได้ผลผลิต ประมาณ 60-80 mg l⁻¹ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถถูกทำให้บริสุทธิ์อย่างง่ายไปเป็นโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ > 95% ซึ่ง fusion proteins ที่ได้ แสดงกิจกรรมทางชีววิทยา และสามารถถูกใช้ได้โดยตรงกับเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์ (human stem cell) โดยที่ไม่ต้องกำจัดเอา tags ออก การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงถึงวิธีที่ง่ายและราคาไม่แพงสำหรับการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น (large-scale production) ของโปรตีน hbFGF ซึ่งเป็นที่ต้องการและจำเป็นสำหรับการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์ในระดับที่ใหญ่ขึ้น เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการทางการแพทย์

เนื่องจาก โครงการนี้เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี แต่ได้รับงบประมาณเพียงปีแรกปีเดียว แล้วรัฐบาลที่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างการให้ทุน และไม่ได้รับทุนต่อเนื่อง จึงไม่สามารถดำเนินการตามวัตถุประสงค์ได้ทั้งหมด สามารถดำเนินการได้เพียง ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน basic Fibroblast growth factor ของมนุษย์ (hbFGF) ใน *Escherichia coli* พัฒนาระบบการผลิตและขยายขนาดกำลังการผลิตได้ในเบื้องต้น และสามารถทำรีคอมบิแนนท์ hbFGF ให้บริสุทธิ์ และทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา (biological activity) อีกทั้งยังสามารถพัฒนาบุคลากร ให้สามารถผลิตโกรทแฟคเตอร์ ไวไข่เอง เพื่อเป็นการลดต้นทุนในระยะยาว และจัดจำหน่ายให้หน่วยงานภายนอกได้ แต่ยังไม่สามารถพัฒนาสูตรระบบนำส่งนีโอโซม (Niosome) เพื่อบรรจุ hbFGF เพื่อพัฒนาเป็นเวชสำอาง หรือนำโกรทแฟคเตอร์ที่ผลิตได้ไปให้อุตสาหกรรมเซลล์ต้นกำเนิด และเวชสำอาง ทดสอบคุณภาพ และทดลองใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม

บรรณานุกรม

- Abdull Razis, A.F., Ismail, E.N., Hambali, Z., Abdullah, M.N., Ali, A.M., Mohd Lila, M.A. (2008). Expression of recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli* and characterization of its biological activity. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 144, 249-261.
- Abraham, A. A., Whang, J. L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C. (1986). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. **EMBO J.** 5: 2523-2528.
- Baharvand, H., Ashtiani, S. K., Taei, A., Massumi, M., Valojerdi, M. R., Yazdi, P. E., Moradi, S. Z., and Farrokhi, A. (2006). Generation of new human embryonic stem cell lines with diploid and triploid karyotypes. **Dev. Growth Differ.** 48: 117-128.
- Bertani, G. (1952). Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriology.** 62: 293-300.
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Rifkin, D. B. (1997). Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. **Endocr. Rev.** 18: 26-45.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., Basilico, C. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. **Cytokine Growth Factor Rev.** 16: 233-247.
- Ding, S. H., Huang, L. Y., Wang, Y. D., Sun, H. C., and Xiang, Z. H. (2006). High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. **Biotechnol Lett.** 28: 869-875.
- Ding, V. M., Ling, L., Natarajan, S., Yap, M. G., Cool, S. M., and Choo, A. B. (2010). FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3beta signaling. **J. Cell Physiol.** 225: 417-428.
- Dowd, C. J., Cooney, C. L., and Nugent, M. A. (1999). Heparin sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. **J. Biol. Chem.** 274: 5236-5244.
- Esposito, D., and Chatterjee, D. K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. **Curr. Opin. Biotechnol.** 17: 353-358.

- Florkiewicz, R.Z., Sommer, A. (1989) Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 86: 3978-3981.
- Garke, G., Deckwer, W. D., and Anspach, F. (2000). Preparative two step purification of recombinant human basic fibroblast growth factor from high cell density cultivation of *E.coli*. **J. Chromatogr. B.**737: 25-38.
- Gasparian, M. E., Elistratov, P. A., Drize, N. I., Nifontova, I. N., Dolgikh, D. A., and Kirpichnikov, M. P. (2009). Overexpression in *Escherichia coli* and purification of human fibroblast growth factor (FGF-2). **Biochemistry (Mosc).** 74: 221-225.
- Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B.M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., et al. (2008). Protein production and purification. **Nat. Methods.** 5: 135-146.
- Gospodarowicz, D., Neufeld, G., Schweigerer, L. (1986). Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. **Cell Diff.** 19: 1-17.
- Gospodarowicz, D. (1989). Fibroblast growth factor. In: **Perucho M (ed) Critical reviews in oncogenesis.** CRC Press, Boca Raton, Fla, pp 1-26
- Hills, D., and Crane-Robinson, C. (1995). Baculovirus expression of human basic fibroblast growth factor from a synthetic gene: role of the Kozak consensus and comparison with bacterial expression. **Biochim. Biophys. Acta.** 1260: 14-20.
- Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., Parnpai, R., Ketudat-Cairns, M. (2011). A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.** 151: 295-302.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M.D., Lanza, R. (2005). Human embryonic cells derived without feeder cells. **Lancet.** 365: 1636-1641.
- Kroiher, M., Raffioni, S., Steele, R. E. (1995). Single step purification of biologically active recombinant rat basic fibroblast growth factor by immobilized metal affinity chromatography. **Biochim. Biophys. Acta.** 1250: 29-34.

- Kupradid, C., Charoenrat, T., and Ketudat-Cairns. (2008). Bovine enterokinase light chain production by *Pichia pastoris*: Effect of induction temperature. **Thai J. Biotechnol.** 8: 99-105.
- Kwong, K. W., Ng, K. L., Lam, C. C., Wang, Y. Y., and Wong, W. K. (2013). Authentic human basic fibroblast growth factor produced by secretion in *Bacillus subtilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 97: 6803-6811.
- Lemaître, G., Laaroubi, K., Soulet, L., Barritault, D., and Miskulin, M. (1995). Production and purification of active FGF2 via recombinant fusion protein. **Biochimie.** 77: 162-166.
- Levenstein, M. E., Ludwig, T. E., Xu, R. H., Llanas, R.A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., Thomson, J.A. (2005). Basic FGF support of human embryonic stem cell self-renewal. **Stem. Cells.** 24: 568-574
- Li, M., He, S. (2006). Purification and characterization of recombinant human interleukin-29 expressed in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.** 122: 334-340
- Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., Song, Z., Ding, M., and Deng, H. (2007). MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. **Differentiation.** 75: 299-307.
- Lindner, V. (1995). Role of basic fibroblast growth factor and plateletderived growth factor (B-chain) in neointima formation after arterial injury. **Z. Kardiol.** 4:137-144
- Mu. X., Kong, N., Chen, W., Zhang, T., Shen, M., and Kirpichnikov, M. P. (2008). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human basic fibroblast growth factor in *pichia pastoris*. **Protein Expr. Purif.** 59: 282-288.
- Nfor, B.K., Ahamed,T., van Dedem, G. W. K., van der Wielen, L. A. M., van de Sandt, E. J. A. X., Eppink, M. H. M. Ottens, M. (2008). Design strategies for integrated protein purification processes: challenges, progress and outlook. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 83: 124-132.
- Nishishita, N., Shikamura, M., Takenaka, C., Takada, N., Fusaki, N., and Kawamata, S. (2012). Generation of virus-free induced pluripotent stem cell clones on a synthetic matrix via a single cell subcloning in the naïve state. **PLoS One** 7: e38389.
- Picanco-Castro, V., Moreira, L. F., Kashima, S., and Covas, D. T. (2014). Can pluripotent stem cells be used in cell-based therapy? **Cell Reprogram.** 16: 98-107.

- Pruksananonda, K., Rungsiwiwut, R., Numchaisrika, P., Ahnonkitpanit, V., Isarasena, N., and Virutamasen, P. (2012). Eighteen-year cryopreservation does not negatively affect the pluripotency of human embryos: evidence from embryonic stem cell derivation. **Biores. Open Access.** 1: 166-173.
- Rassouli, H., TabeBordbar, M. S., RezaeiLarijani, M., Pakzad, M., Baharvand, H., and Salekdeh, G. H. (2013). Cloning, expression and functional characterization of in-house prepared human basic fibroblast growth factor. **Cell J.** 14: 282-291.
- Rosano, G. L., and Ceccarelli, E. A. (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. **Microb. Cell Fact.** 8: 41.
- Sahdev, S., Khattar, S.K., Saini, K.S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol. Cell Biochem.** 307: 249-264.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. volume 3, apendix B.12.
- Sheng, Z., Chang, S. B., and Chirico, W. J. (2003). Expression and purification of a biologically active basic fibroblast growth factor fusion protein. **Protein Expr. Purif.** 27: 267-271.
- Singh, V. K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A., and Chandra, R. (2015). Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. **Front Cell Dev. Biol.** 3: 2.
- Song, J. A., Koo, B. K., Chong, S. H., Kwak, J., Ryu, H. B., Nguyen, M. T., Vu, T. T., Jeong, B., Kim, S. W., and Choe, H. (2013). Expression and purification of biologically active human FGF2 containing the b'a' domains of human PDI in *Escherichia coli*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 170: 67-80.
- Sorensen, H. P., and Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microb. Cell Fact.** 4: 1.

- Squires, C. H., Childs, J., Eisenberg, S. P., Polverini, P. J., and Sommer, A. (1988). Production and characterization of human basic fibroblast growth factor from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 263: 16297-16302.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 211-222.
- Tomala, M., Lavrentieva, A., Moretti, P., Rinas, U., Kasper, C., Stahl, F., Schambach, A., Warlich, E., Martin, U., Cantz, T., Scheper, T. (2010). Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant *Escherichia coli* using thioredoxin as fusion partner. **Protein Expr. Purif.** 73: 51-57.
- van der Sanden, B., Dhobb, M., Berger, F., and Wion, D. (2010). Optimizing stem cell culture. **J. Cell Biochem.** 111: 801-807.
- Wang, J., Honga, A., Renb, J., Suna, F., Shi, Y., Liu K., Xie, Q., Dai, Y., Li, Z., and Chenc, Y. (2006). Biochemical properties of C78SC96S rhFGF-2: a double point-mutated rhFGF-2 increases obviously its activity. **J. Biotechnol.** 121: 442-447.
- Wu, X., Kamei, K., Sato, H., Sato, S. I., Takano, R., Ichida, M., Mori, H., and Hara, S. (2001). High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori L.*) using recombinant baculovirus. **Protein Expres. Purif.** 21: 192-200.
- Yang, J., Zhang, W., Liu, K., Jing, S., Guo, G., Luo, P., Zou, Q. (2007). Expression, purification, and characterization of recombinant human interleukin 24 in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.** 53: 339-345.
- Zon, L. I., Dorman, D. M., and Orkin, S. H. (1989). The polymerase chain reaction colony miniprep. **Biotechniques.** 7: 696-698.

ประวัติผู้วิจัย

- 1 ชื่อ นาง มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
Mrs. Mariena Ketudat-Cairns
เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1014 011xx xx x
รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999
- 2 ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- 3 หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ.
นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150
e-mail: ketudat@sut.ac.th
- 4 ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) 3.24
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biology) 4.00
University of California, San Diego, USA
พ.ศ. 2538 ประกาศนียบัตร Industrial Biotechnology
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Germany
- 5 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
 - Molecular Biology & Genetic Engineering (Plant & Animal)
 - Recombinant Protein Production
 - Gene Expression in cloned animals and stem cells
- 6 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

6.1 **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** :โครงการการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้เชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักแบบกะ
ส่งรายงาน

6.2 **ผู้ประสานงานชุดโครงการ** การวิจัยโปรตีนแห่ง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

6.3 **หัวหน้าโครงการวิจัย** : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- พัฒนาระบบการผลิตโพรตีนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์และเวชสำอาง รายงานฉบับนี้
 - โครงการพัฒนาขีดความสามารถทางเทคโนโลยีและวิจัยของภาคเอกชนในพื้นที่ (IRTC)
 - ผลิตรีคอมบิแนนท์อินเทอร์ลิวคิน บริษัท เมดิซสเต็มเซลล์ จำกัด ส่งมอบผลิตภัณฑ์แล้ว
 - ผลิตรีคอมบิแนนท์เปลือกไฟโบรบลาสโพรตีนเพื่อแพทย์ บริษัท เมดิซสเต็มเซลล์ จำกัด ส่งมอบผลิตภัณฑ์แล้ว
 - การผลิตไซโตไคน์ การทำให้บริสุทธิ์ และการนำไปใช้ในงานวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2561
 - การดัดแปลงพันธุกรรมของ *Sacchromyces cerevisiae* เพื่อให้สามารถผลิตเอทานอลจากแป้งมัน
 - ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2561
 - การผลิต *Pichia pastoris* ที่มีโอเมก้า 3 สูง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2559
 - การพัฒนาเทคนิคเพื่อตรวจเชื้อก่อโรคปนเปื้อนในเนื้อไก่สด ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2559
 - การโคลนและศึกษาการทำงานของ Os1BGlu4 เบตากลูโคซิเดสจากข้าว ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2557
 - การศึกษาความยาวของเทลโลเมียร์ในลูกแมวที่เกิดจากการโคลนนิ่ง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2557
 - การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวสายพันธุ์พิจิตร (M33)
 - ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2556
 - โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออูจิจิ Y ของวัว ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2557
 - การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2555
 - การพัฒนาเครื่องหมายการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากทส ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2553
 - การค้นหาและการแสดงออกของกลุ่มยีน Glycosyl Hydrolases ในจีโนมของข้าวหอมมะลิ
 - ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2554
 - การโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรโคเนสสายสั้น ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2551
 - การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
 - การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase จาก *Pyrococcus furiosus* ในแบคทีเรีย *Escherichia coli*
 - ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
 - การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมัก ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2549
 - การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคซิเดส โดย *Pichia pastoris* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2548
 - การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม สรีระวิทยา และพฤติกรรมของไก่พื้นเมืองไทย ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547
 - การหาแผนที่ทางพันธุกรรมของไผ่ตง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2546
 - การพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของโครโมโซมเพศปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543
 - การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Taq DNA polymerase ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2541
- และเป็นผู้ร่วมโครงการวิจัยอื่นๆอีกมาก

ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ แมว และสัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
- Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions. ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550

(National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology)

Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses

ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2545

- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA)

แล้วเสร็จ 2537

6.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

ดูหัวข้อ 7.3

ผลงานเด่น นวัตกรรม และผลกระทบจากผลงานนั้น ๆ ที่เกิดขึ้นในระดับชุมชน ประเทศ หรือนานาชาติ (Success stories and the impacts): เขียนเล่าเรื่อง อธิบาย

งานทางด้านการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เริ่มจากการผลิตโปรตีนจำพวกเอ็นไซม์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ต่างๆ และใช้งานเองในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ และ ชีวเคมี รวมทั้งเพื่อสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่

จากการร่วมงานทางด้านโคลนนิ่งและสเต็มเซลล์กับ รศ.ดร. รั้งสรรค พาลพ่าย ทำให้พบว่า โปรตีนจำพวกโกรทแฟคเตอร์ที่ใช้ในงานสเต็มเซลล์ต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาสูงมาก จึงได้เริ่มศึกษาที่จะผลิตโกรทแฟคเตอร์ใช้เอง เมื่อมีผลงานตีพิมพ์และไปนำเสนอในงานภายในและต่างประเทศ มีนักวิจัยให้ความสนใจเป็นจำนวนมาก ซึ่งปัจจุบันนี้นักวิจัย จาก ศูนย์ความเป็นเลิศทางงานวิจัยสเต็มเซลล์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล คณะแพทยศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ นำผลผลิตจากงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ เพื่อลดการนำเข้าจากต่างประเทศและลดค่าใช้จ่ายลงมาก

Publications:

- Colli, L., Milanese, M., Vajana, E., (...), Williams, J.L., Ajmone-Marsan, P. (2018) New insights on water buffalo genomic diversity and post-domestication migration routes from medium density SNP chip data *Frontiers in Genetics* 9, 53
- Tanthaisong, P., Imsoonthornruksa, S., Ngermsoungnern, A., Ngermsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M., Parnpai, R.(2017) Enhanced chondrogenic differentiation of human umbilical cord wharton's jelly derived mesenchymal stem cells by GSK-3 Inhibitors *PLoS ONE* 12(1),0168059
- Kupradit, C., Innok, S., Woraratphoka, J. **Ketudat-Cairns, M.** (2016) Novel multiplex PCR assay for rapid detection of five bacterial foodborne pathogens. *Suranaree J. Sci. Technol.* 24(1):41-50
- Parnpai, R., Ling, Y-Y., **Ketudat-Cairns, M.**, Somfai, T., and Nagai, T. (2016) Vitrification of Buffalo Oocytes and Embryos *Theriogenology.* 86(1) 214-220
- Wendong, D. Gerdthai, T. Huang , Z., Ketudat-Cairns, M., Tang, R. Wang, S. (2015) Genetic analysis for anthocyanin and chlorophyll contents in rapeseed (*Brassica napus* L.) *Ciência Rural* 46 (5) 790-795
- Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., Parnpai, R., Rungsiwiwut, R., **Ketudat-Cairns, M.** (2015) Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture *J Mol Microbiol Biotechnol.* 25(6):372-380
- Sripunya, N., Ling, Y-Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngermsoungnern, A. Ngermsoungnern, P., **Ketudat-Cairns, M.**, and Parnpai, R. (2014) Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. *Cryobiology* 2014 Dec 16;69(3):496-9.
- Rouyi, C., Changxiang Z., Jiang C., Minna P., **Ketudat- Cairns, M.** (2014) Optimization of Quantitative Real-time PCR System on Amplification of Os1bglu4 gene. *Agricultural Science and Technology* 15(7):1096-1100.
- Rouyi, C., Changxiang Z., Jiang C., Minna P., **Ketudat- Cairns, M.** (2014) Evaluation on Inducible Effect of pOp6 Promoter in Transgenic Rice. *Agricultural Science and Technology* 15(5):742-744
- Srirattana, K., **M. Ketudat-Cairns**, T. Nakai, kaneda, M., R. Parnpai (2014) Effects of Trichostatin a on *in vitro* development and DNA methylation level of the Satellite I Region of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos. *J Reprod Dev* 60(5) 336-341
- Pakping, S., **Ketudat-Cairns, M.**, Boontawan, A. (2014) Extractive Fermentation of Ethanol from Fresh Casava Roots using Vacuum Fractionation Techniques. *Adv. Mat. Res* 931: 1096-1100

- Rouyi C, Baiya S, Lee S-K, Mahong B, Jeon J-S, Ketudat-Cairns, J. and **Ketudat-Cairns, M.** (2014) Recombinant Expression and Characterization of the Cytoplasmic Rice β -Glucosidase Os1BGlu4. *PLoS ONE* 9(5): e96712. doi:10.1371/journal.pone.0096712
- Parnpai, R., Liang, Y-Y., Paul A. K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., and **Ketudat-Cairns, M.** (2014) Cryopreservation of Buffalo Oocytes. *Thai J. Vet. Med.* 44(1) 119-123
- Kupradit, C., Ruamkuson, D., Rodtong, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2013) Novel multiplex polymerase chain reaction and an oligonucleotide array for specific detection of the dominant foodborne bacterial pathogens in chicken meat. *African Journal of Microbiology Research* 7 (24) 3085-3095 DOI: 10.5897/AJMR12.2102
- Kupradit, C., Ruamkuson, D., Rodtong, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2013) Oligonucleotide macroarray for specific detection of bacterial foodborne pathogens *Chiang Mai Journal of Science* (accepted 4 June 2013)
- Kupradit, C., Rodtong, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2013) Development of a DNA macroarray for simultaneous detection of multiple foodborne pathogenic bacteria in fresh chicken meat *World J Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s11274-013-1394-1 (accepted 31 May 2013)
- Chittapun, S., Ruamkuson, D. and **Ketudat-Cairns, M.** (2013) Identification and Nutritional Value of Live Feeds for Ornamental Fish from Bangkok Metropolitan Markets in Thailand *Chiang Mai Journal of Science* 40 (3) 364-375
- Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Ling, Y-Y., **Ketudat-Cairns, M.**, and Parnpai, R. (2012) Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. *Small Ruminant Research.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.10.011>,
- Imsoonthornruksa, S., K. Srirattana, W. Phewsoi, W. Tunwattana, R. Parnpai, **M. Ketudat-Cairns** (2012) Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring *Mitochondrion* 12(5): 506-513
- Srirattana K, , Imsoonthornruksa S., Laowtammathron C, Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., **Ketudat-Cairns M**, Parnpai, R. (2012). Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of Trichostatin A treatment *Cellular Reprogramming* 14(3): 248-257
- Imsoonthornruksa, S., A. Sangmalee, K. Srirattana, , R. Parnpai, **M. Ketudat-Cairns** (2011) Development of intergeneric and intragenetic somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring *Cellular Reprogramming* 14(1): 79-87
- Songwattana, P. and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) Comparison between Serological and Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) *Molecular Pathogens* 2(4) 1-7
- Ruamkuson, D., Tongpim, S., and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) A Model to develop biological probes from microflora to assure traceability of tilapia *Food Control* 22: 1742-1747
- Rattanasuk, S., Parnpai, R., and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) Multiplex Polymerase Chain Reaction used for Bovine Embryo Sex Determination *J of Reprod and Dev* 57(4)
- Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, T. Nakai, R. Parnpai (2011) The effects of manipulation medium, culture system and recipient cytoplasm on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos *J Reprod Dev* 57(3) 385-392
- Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., Parnpai, R., **Ketudat-Cairns, M.** (2011) A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology* (151): 295-302
- Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, R. Parnpai (2010) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos *Reprod Fertil Dev* 2010; 22(4):613-24
- Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2010). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (*Bos taurus*) and Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos *J Reprod Dev* 2010 Feb; 56(1):49-54.
- Rattanasuk, S., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Genetic Diversity of Felids' Cytochrome B *Suranaree J. Sci Technol* 16 (4) 283-290
- Ruamkusol, D., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Optimum Conditions for DGGE of 16S rDNA from SUT Tilapia Intestinal Microflora *Suranaree J. Sci Technol* 16 (4) 311-317
- Kupradit, C., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) The extraction and purification of boar sperm surface protein *Suranaree J. Sci Technol* 16 (3) 245-251

- Rattanasuk, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Chryseobacterium indologenes, novel mannanase producing bacteria, Songklanakarin J. of Sci and Tech 31(4) 395-399
- Kupradit, C., Charoenrat, T., and **Ketudat-Cairns, M.** (2008) Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain Production by *Pichia pastoris*: Effect of Induction Temperature Thai Journal of Biotechnology 8 (1) 99-105
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A. W. S., **Ketudat-Cairns, M.** and Parnpai, R. (2008) Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocyte J of Reprod and Dev 54(5) 306-313
- Phetsom, J., Jung, K., **Ketudat-Cairns, M.**, and Ronald, P. (2007). Quality assessment of NSF Rice Oligonucleotide Array. Agricultural Sci. J. 38(6): 11-14.
- Opassiri R., Pomthong B., Akiyama T., Nakphaichit M., Onkoksoong T, **Ketudat-Cairns M**, and Ketudat Cairns JR. (2007) A stress-induced rice beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain Biochem. J. (408) 241-249
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya N. Laowtammathron, C., **Ketudat-Cairns, M.** and Parnpai, R. 2006. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. Reproduction, Fertility and Development 19(1) 141
- Lorthongpanich, C., K. Srirattana, S. Imsoonthornruksa, N. Sripunya, C. Laowtammathron, O. Kumpung, **M. Ketudat-Cairns** and R. Parnpai (2007) Expression and Distribution of Oct-4 in Interspecies-Cloned Long-Tailed Monkey (*Macaca fascicularis*) Embryo Reproduction, Fertility and Development 19(1) 149 doi:10.1071/RDv19n1Ab62
- Muenthaisong S, Laowtammathron C, **Ketudat-Cairns, M.**, Parnpai R, Hochi S. (2007) Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. Theriogenology. 67(4) 893-900
- Toonkool, P., Metheenukul, P., Sujiwattanasarat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., **Ketudat-Cairns, M.**, Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J. (2006) Expression and purification of dalcocinase, a α -glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. Protein Expression and Purification
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Jahic M., Veide, A., and Enfors, S.-O., (2006) Increase total air pressure versus oxygen limitation for enhance oxygen transfer and production formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process Biochemical Engineering Journal. 30: 205-211.
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Enfors, S.-O., Jahic M., and Veide, A. (2006) Recovery of Recombinant b-glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high cell density culture broth. Journal of Biotechnology (122) 86-98
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns M.**, Stendahl-Andersen, H., Jahic M., and Enfors S.-O (2005) Oxygen limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystems Engineering (27) 399-406 ** Received Best paper of the year award. **
- Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., **Ketudat-Cairns, M.**, Hochi, S., Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: the effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in culture medium, and Ficoll supplementation to vitrification solution. Theriogenology (64), 1185-1196
- Charoenrat, T., Vanichsrirattana, V., and **Ketudat-Cairns, M.** (2004) Recombinant β -glucosidase Production by *Pichia pastoris*: Influence of pH. Thai Journal of Biotechnology 5 (1) 51-55
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Likitdecharote, B. and Parnpai, R. (2004). *In vitro* development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Reprod. Fert. Dev.* (16): 149.
- Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and **Ketudat-Cairns, M.** (2000) Biotechnology Graduate Education in Thailand. Thai J. of Biot 2 (1): 55-62
- Carlini, L.E., **M. Ketudat**, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). Plant Molec. Biol.41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)
- Ketudat-Cairns, M.** (1998) Biotechnology and Daily Life. Suranaree J. Sci Technol 5:208-211
- Manakasem Y., Sornsuk P., and **Ketudat-Cairns M.** (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. Suranaree J. Sci Technol 5:95-100

- Schmidt, R. J., Pysh, L. D., **Ketudat, M.**, Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings
- Schmidt, R. J., **Ketudat, M.**, Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:689-700
- Ueda T, Wawerczak W, Ward K, Sher N, **Ketudat M**, Schmidt RJ, Messing J. (1992) Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* 4:701-709

Paper Presented at National and International Conferences (since 1998 > 80 titles)

Major advisor to 7 Ph.D. and 15 M.Sc. graduates (since 2000)

Currently major advisor to 2 Ph.D. students

mkc

