การผลิตโปรตีน recombinant Interferon α-2b จากการเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์

Expression of Recombinant Interferon α-2b from *Escherichia coli* BL21(DE3) in Shake Flask Culture

ภารุจีร์ ภูมิไกล[1*] นิพัทรา พรมมาอินทร์[1] อรชร ทองดอนง้าว[1] และ วันวิสาข์ ทองคำวิฑูรย์[1]
Parujee Phumklai[1*], Nipatthra Phromma-in[1], Orachorn Thongdonngaw[1] and Wanwisa Thongkamwitoon[1]

บทคัดย่อ

อินเตอร์เฟอรอนเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาโรค โดยมีคุณสมบัติในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น ไวรัส ปรสิต หรือเซลล์มะเร็ง เป็นต้น งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Escherichia coli* BL21(DE3) เพื่อผลิต recombinant Interferon α-2b (rIFN α-2b) ในระดับฟลาสก์ การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหาร Terrific Broth (TB) วัดความหนาแน่นเซลล์ (OD_{600}) ได้ 9.18 ± 0.12 OD สูงกว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Luria-Bertani (LB) ซึ่งวัดค่าได้เพียง 4.34 ± 0.06 OD เมื่อศึกษาวิธีการกระตุ้นเซลล์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (-80°C) พบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วยวิธีการเลี้ยงในอาหารเหลว TB ข้ามคืน เมื่อย้ายกล้าเชื้อมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์อาหารใหม่ วัดความหนาแน่นเซลล์ได้สูงกว่าเชื้อที่ผ่านการกระตุ้นด้วยวิธีเลี้ยงในอาหารแข็ง TB เมื่อนำกล้าเชื้อที่เตรียมด้วยวิธีการที่เหมาะสมข้างต้น มาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนของเซลล์ในระดับฟลาสก์ โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เซลล์เจริญอยู่ในช่วง log phase เมื่อเหนี่ยวนำเซลล์ให้สร้างโปรตีนด้วยสารละลาย Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า *E. coli* BL21(DE3) สามารถผลิตโปรตีน rIFN α-2b ในรูปของ inclusion body คิดเป็น 118.13 ± 12.70 mg/L ผลการศึกษาที่ได้นำไปสู่การกำหนดวิธีเตรียมกล้าเชื้อและเกณฑ์การยอมรับสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) เพื่อผลิตโปรตีน rIFN α-2b ในถังหมักระดับปฏิบัติการต่อไป

คำสำคัญ: *E. coli* BL21(DE3) ความหนาแน่นเซลล์ อินเตอร์เฟอรอน inclusion body

Abstract

Interferons are proteins that play an important role in the treatment of several diseases. They can defend against foreign agents (antigen) such as viruses, parasites, as well as tumor cells. The current study investigated the expression of recombinant Interferon α-2b (rIFN α-2b) from *Escherichia coli* BL21(DE3) in shake flask culture. Effect of culture medium on cell growth was studied. Terrific Broth (TB) medium gave cell density (OD_{600}) about 9.18 ± 0.12 OD higher than culture in Luria-Bertani (LB) medium which yielded only 4.34 ± 0.06 OD. Bacterial cells that are preserved at low temperature (-80°C) should be stimulated before cultivation step. Bacterial cells activated in TB broth, after transfered seeding culture to fresh medium, they presented high cell growth than activated by streaking on TB agar plate. Cell growth of *E. coli* BL21(DE3) and the expression of rIFN α-2b in shake flask were observed.

[1] โครงการจัดตั้งศูนย์เสริมสร้างอุตสาหกรรมชีวภาพจากนวัตกรรม มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170
[1] Establishment of Bio-industry Through Innovation and Translational Research, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170
*Corresponding author: e-mail: parujee.pha@mahidol.ac.th
Received: *27 September 2019,* ***Accepted:*** *15 November 2019,* ***Published:*** *19 November 2019*

Cells grew into log phase in 4 hours of cultivation. After induction with Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside for 4 hours, *E. coli* BL21(DE3) produced rIFN α-2b as inclusion body about 118.13 ± 12.70 mg/L. This study leads to acceptance criteria of critical parameters for cell growth and seed prepration precedure to produce rIFN α-2b from *E. coli* BL21(DE3) in lab-scale fermenter

Keyword : *E. coli* BL21(DE3), cell density, Interferon, inclusion body

บทนำ

ยาชีววัตถุคล้ายคลึง (Biosimilar) มีแนวโน้มที่ได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากสามารถใช้ในการรักษาโรคเรื้อรังที่สำคัญหรือโรคร้ายแรงได้อย่างมีประสิทธิผลและปลอดภัย เช่น อินซูลิน (Insulin) อินเตอร์เฟอรอน (Interferon) อีริโทรโพอิติน (Erythropoietin) โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยาชีววัตถุคล้ายคลึงส่วนใหญ่มักมีราคาแพงเนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่สูงทำให้การเข้าถึงผลิตภัณฑ์ดังกล่าวของผู้ป่วยมีข้อจำกัดโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา เมื่อไม่นานมานี้อายุสิทธิบัตรของยาชีววัตถุหลายตัวหมดลง จึงทำให้มีการวิจัยเพื่อศึกษาและพัฒนาการผลิตชีววัตถุคล้ายคลึงชนิดต่างๆ เป็นจำนวนมาก การผลิตยาชีววัตถุส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยอาศัยการตัดต่อชิ้นส่วนยีนที่สามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์สิ่งมีชีวิต จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงและเหนี่ยวนำเซลล์เพื่อให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการ

Recombinant Interferon α-2b (rIFN α-2b) เป็นยาชีววัตถุที่ใช้ในการรักษา hepatitis B แบบเรื้อรัง ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตับแข็ง ตับวายและมะเร็งตับ ซึ่งมีผลเสียต่อสุขภาพของประชากรและเศรษฐกิจประเทศเป็นอย่างมาก การรักษาด้วยยาดังกล่าวสามารถลดการติดเชื้อรวมถึงลดโอกาสการเป็นมะเร็งตับได้และยาดังกล่าวอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ

Escherichia coli เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมในการศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีระบบพันธุกรรมที่ไม่ซับซ้อน กระบวนการเพาะเลี้ยงทำได้ง่าย ต้องการสารอาหารน้อยและเจริญเติบโตได้เร็ว และยังได้รับการรับรองจาก FDA ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัยในการประยุกต์ใช้สำหรับมนุษย์ (Marisch *et al*., 2013; Gaciarz *et al*., 2017; Srivastava *et al*., 2005) การผลิตโปรตีนรักษาโรคมนุษย์ (human therapeutic proteins) ในเซลล์ *E. coli* มักเกิดการรวมกันของโปรตีนเป็นลักษณะของ inclusion body (IB) เนื่องมาจากการม้วนพับ (folding) ของโปรตีนหลายชนิดต้องมีการฟอร์ม disulfide bone หรือเกิดกระบวนการ glycosylation ซึ่งไม่มีกระบวนการดังกล่าวใน cytoplasm ของระบบพันธุกรรมของ *E. coli* แม้โปรตีนที่อยู่ในรูป IB จะไม่สามารถแสดงกิจกรรมได้ อย่างไรก็ตามการผลิตโปรตีนรักษาโรคในทางการค้าหลายชนิดก็ทำการผลิตในรูปของ IB เช่น อินเตอร์เฟอรอน (Interferon) อินเตอร์ลิวคิน (Interleukin) โกรทฮอร์โมน (growth hormone) เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก โปรตีนที่ได้มีความเสถียรและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ protease ภายในเซลล์ การแยก IB ออกจากเซลล์หลังการทำให้เซลล์แตกสามารถทำได้ง่าย นอกจากนี้ IB ที่ได้ยังสามารถเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิต่ำได้เป็นระยะเวลาหลายเดือน ช่วยให้กระบวนการผลิต (manufacturing process) มีความยืดหยุ่นได้ (Graumann and Premstaller, 2006; Huang *et al*., 2012; Gaciarz *et al*., 2017) ทั้งนี้เมื่อนำ IB เข้าสู่กระบวนการปลายน้ำโดยผ่านขั้นตอนการคืนสภาพ (refolding) และทำบริสุทธิ์ (purification) ก็ได้โปรตีนบริสุทธิ์ในรูปที่สามารถแสดงกิจกรรมได้ (Srivastava *et al*., 2005; Singh *et al*., 2005; Singh *et al*., 2015)

โครงการจัดตั้งศูนย์เสริมสร้างอุตสาหกรรมชีวภาพจากนวัตกรรม มหาวิทยาลัยมหิดล จัดตั้งขึ้นเพื่อรองรับการวิจัยและพัฒนายาชีววัตถุทั้งในระดับปฏิบัติการตลอดจนพัฒนาเข้าสู่การผลิตในระดับกึ่งอุตสาหกรรม เพื่อประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมและเชิงพาณิชย์อย่างเป็นรูปธรรม จากวัตถุประสงค์ของโครงการฯ จึงทำการคัดเลือกการผลิตโปรตีน rIFN α-2b จาก *E. coli* BL21(DE3) เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบในการศึกษา โดยมีแผนการศึกษาการผลิตโปรตีนดังกล่าวในฟลาสก์และถังหมักในระดับปฏิบัติการเพื่อกำหนด

เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) ของแต่ละขั้นตอนในกระบวนการผลิต และกำหนดขั้นตอนการปฏิบัติงานที่เหมาะสม และนำไปสู่กระบวนการผลิตโปรตีนในถังหมักระดับกึ่งอุตสาหกรรมในห้องปราศจากเชื้อ (clean room) ที่สอดคล้องกับมาตรฐาน PIC/S GMP ต่อไป

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) เพื่อผลิตโปรตีน rIFN α-2b โดยนำ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีการโคลน cDNA เพื่อผลิตโปรตีน rIFN α-2b เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pET27b ที่ตำแหน่ง *NdeI/SacI* ที่ด้าน 5' และ 3' ตามลำดับ และมีชิ้นส่วนของยีนที่ทนต่อยาปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนคัดเลือก (selective marker) ซึ่งทำการโคลนและตรวจสอบคุณสมบัติสำเร็จในห้องปฏิบัติการของโครงการฯ มาทำการศึกษา โดยทำการศึกษาชนิดของอาหารและวิธีการกระตุ้นเซลล์ที่เหมาะสม ตลอดจนศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนของเซลล์ในระดับฟลาสก์ ผลการทดลองที่ได้นำไปสู่การกำหนดขั้นตอนการปฏิบัติงานและค่าของตัวแปรสำคัญเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) เพื่อผลิตโปรตีน rIFN α-2b ในถังหมักระดับปฏิบัติการต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์
2. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่ถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C
3. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีน rIFN α-2b ของ *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์

ระเบียบวิธีวิจัย

การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

รีคอมบิแนนท์ *E. coli* BL21(DE3) ที่เก็บรักษาในสารละลาย 10% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TB (Tryptone 12 g/L, Yeast extract 24 g/L, Glycerol 4 g/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 12.54 g/L) และอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Tryptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ kanamycin 30 mg/L โดยเลี้ยงในอาหารเหลวในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm หรือเลี้ยงในอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เชื้อที่ได้นำไปเป็นกล้าเชื้อสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TB ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ kanamycin 30 mg/L โดยเติมกล้าเชื้อ 5% (v/v) เลี้ยงในอาหารปริมาตร 120 mL ในฟลาสก์ขนาด 500 mL จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวัดความหนาแน่นเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600})

การเหนี่ยวนำเซลล์เพื่อผลิตโปรตีน : เมื่อเซลล์ในฟลาสก์เจริญเข้าสู่ log phase ทำการเหนี่ยวนำเซลล์ให้ผลิตโปรตีนโดยการเติมสารละลาย Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เก็บตัวอย่างน้ำหมักหลังการเหนี่ยวนำที่เวลา 4 ชั่วโมง ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 *xg* เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบนทิ้ง ตะกอนเซลล์ที่อยู่ด้านล่างนำไปทำให้เซลล์แตกและศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนบน 14% SDS-PAGE ต่อไป

การวัดค่าความขุ่นของเซลล์

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 mL มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{600} โดยเจือจางน้ำหมักให้อยู่ในช่วงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงระหว่าง 0.2-0.8 (linear range) ทำการวัดซ้ำจำนวน 3 ครั้ง จดบันทึกค่าความขุ่นเซลล์ที่วัดได้

การตรวจสอบเสถียรภาพของพลาสมิด (plasmid stability)

นำตัวอย่างน้ำหมักก่อนและหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ปริมาตร 1 mL มาทำการเจือจางแบบ serial dilution ดูดตัวอย่างน้ำหมักที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบด้วยวิธี drop plate technique บนอาหารแข็ง

TB ที่มีการเติมและไม่เติมยาปฏิชีวนะ Kanamycin 30 mg/L นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จดบันทึกจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและคำนวณเสถียรภาพของพลาสมิด ดังสมการที่ 1

$$\text{เสถียรภาพของพลาสมิด (\%)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ}}{\text{จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่ไม่มียาปฏิชีวนะ}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 1}$$

การสกัดโปรตีนจากเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) และวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

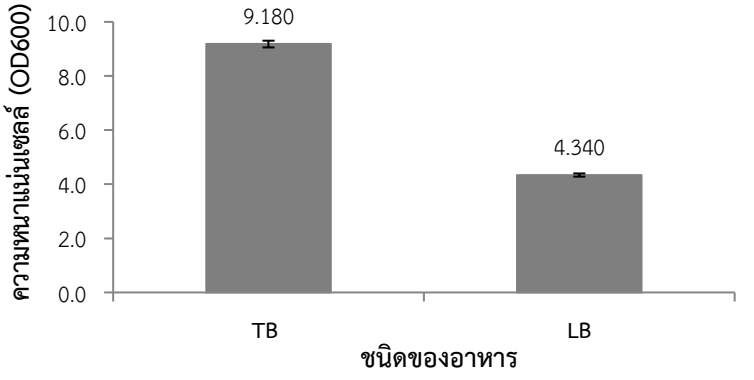
นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาเติมสารละลาย PBS buffer (NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, Na_2HPO_4 1.44 g/L, KH_2PO_4 0.24 g/L) จากนั้นนำเข้าเครื่อง sonicator (50 Amplitude, 30s on/30s off, 6 cycle) เพื่อทำให้เซลล์แตก โดยแช่หลอดตัวอย่างในน้ำแข็งระหว่างการทำให้เซลล์แตก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 *xg* เป็นเวลา 10 นาที ดูดแยกสารละลายส่วนใสด้านบนออกจากตะกอนด้านล่าง จากนั้นละลายส่วนตะกอนด้านล่างด้วย solubilization buffer (50 mM CAPS pH 11.0, 0.3% N-lauroylsarcosine)

นำตัวอย่างสารละลายที่ได้ผสมกับสารละลาย sample buffer (4X) (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromphenol blue, 0.125 M Tris HCl) ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อ sample buffer 3:1 แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็งอุณหภูมิ 4°C ทันทีเป็นเวลา 5-10 นาที นำสารละลายตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมได้มาศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนบน 14% SDS-PAGE วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนบนเจลด้วยเครื่องวิเคราะห์ภาพเจล (c300 Azure biosystems, USA) โปรแกรม AzureSpot 2.0 โดยเทียบกับความเข้มของแถบโปรตีน-Interferon α-2b มาตรฐานที่รู้ความเข้มข้นแน่นอน

ผลการวิจัย

การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์

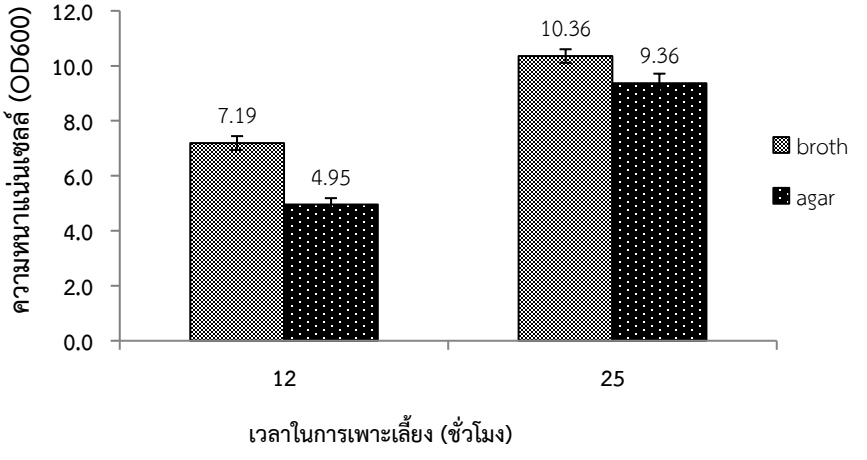
การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำการศึกษาโดยนำเซลล์จาก cell bank ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C มาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร 2 ชนิด คือ LB และ TB โดย ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TB สามารถเจริญเติบโตได้ 9.18 ± 0.12 OD ในขณะที่การเลี้ยงในอาหาร LB เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้เพียง 4.34 ± 0.06 OD ดังแสดงในภาพที่ 1 จากผลการทดลองที่ได้ จึงเลือกใช้อาหาร TB สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของ *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร TB และอาหาร LB บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

การกระตุ้นเซลล์จาก glycerol stock ก่อนการเพาะเลี้ยง

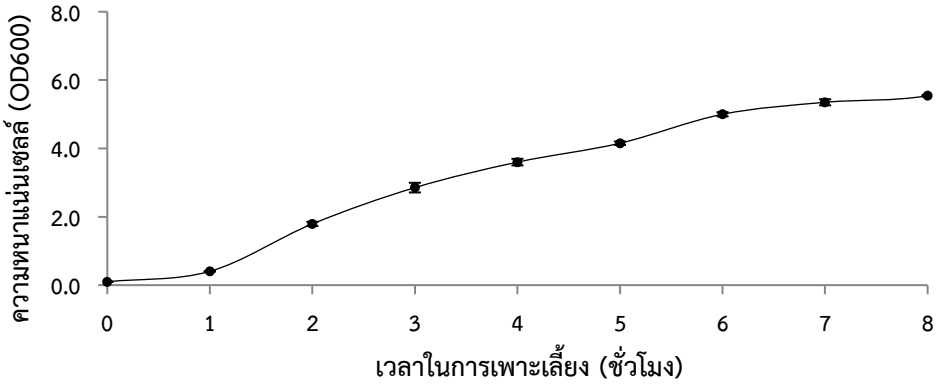
เซลล์ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำที่ -80°C จะมีกิจกรรม (activity) น้อยกว่าปกติ ก่อนนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต (growth profile) หรือศึกษาความสามารถในการผลิตโปรตีนจึงต้องทำการกระตุ้น (activate) เซลล์ก่อนเข้าสู่การเพาะเลี้ยงในขั้นตอนต่อไป การกระตุ้นเซลล์โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเลี้ยงในอาหารเหลว TB และการเลี้ยงบนอาหารแข็ง TB พบว่า เซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นในอาหารเหลวเมื่อย้ายกล้าเชื้อมาเลี้ยงในฟลาสก์ใหม่ในอาหารชนิดเดียวกัน วัดความหนาแน่นเซลล์ได้ 7.19 ± 0.25 OD และ 10.35 ± 0.24 OD เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 และ 25 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่การกระตุ้นเซลล์ด้วยวิธี streak plate บนอาหารแข็ง เมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงในฟลาสก์ที่สภาวะเดียวกัน วัดความหนาแน่นเซลล์ได้ 4.95 ± 0.23 OD และ 9.36 ± 0.35 OD ที่เวลาของการเพาะเลี้ยง 12 และ 25 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเลือกวิธีการกระตุ้นเซลล์ด้วยการเลี้ยงในอาหารเหลว TB ข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อ ก่อนนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของ *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์ เมื่อกระตุ้นเซลล์บนอาหารเหลว TB (broth) และอาหารแข็ง TB (agar) ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C

การเจริญเติบโตและผลิตโปรตีนของเซลล์ในระดับฟลาสก์

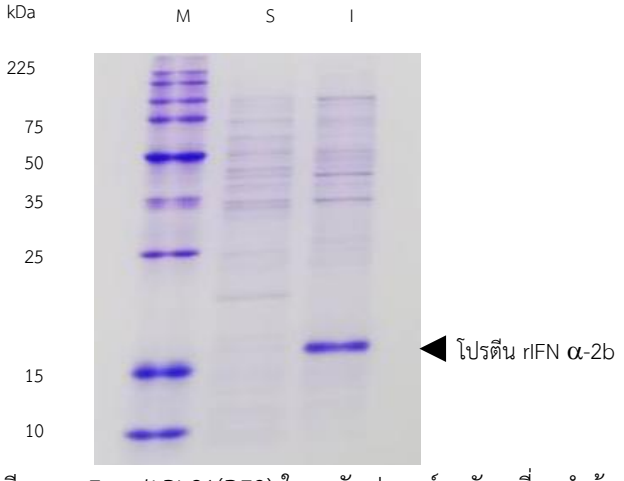
การเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตในระดับฟลาสก์ ทำการศึกษาโดยนำกล้าเชื้อที่ผ่านการกระตุ้นในอาหารเหลว TB ข้ามคืน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TB บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แสดงดังภาพที่ 3 พบว่าในชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์อยู่ใน lag phase ซึ่งเป็นระยะปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ จากนั้นระหว่างชั่วโมงที่ 1-6 เซลล์เข้าสู่ log phase ซึ่งเป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียลโดยมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6-8 เซลล์เข้าสู่ stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่มีจำนวนคงที่โดยอัตราการเพิ่มเท่ากับอัตราการตาย จากลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ได้จากการทดลอง จึงเลือกชั่วโมงที่ 4 ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะกลางของการเจริญเติบโตแบบ log phase เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม สำหรับการเติมสาร IPTG เพื่อเหนี่ยวนำเซลล์ให้ผลิตโปรตีนในระดับฟลาสก์ในการทดลองขั้นต่อไป



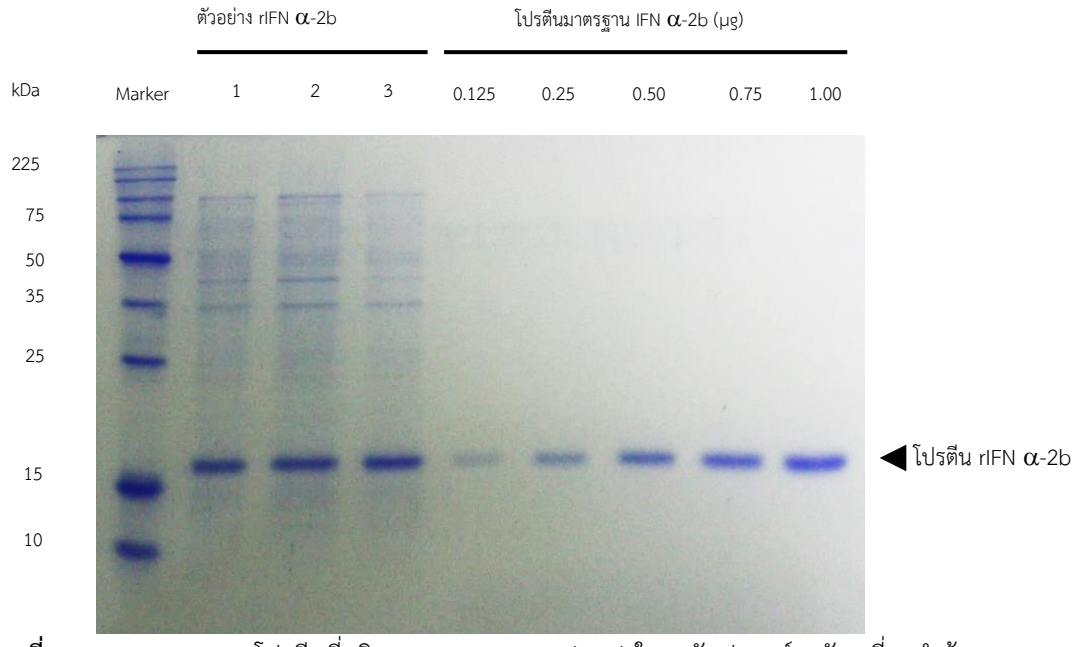
ภาพที่ 3 กราฟการเจริญเติบโตของ *E. coli* BL21(DE3) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TB ระดับฟลาสก์ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C

การศึกษาการผลิตโปรตีนของ *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์ ทำการทดลองโดยเติมกล้าเชื้อ 5% (v/v) ลงในอาหารเหลว TB เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนเซลล์เข้าสู่ช่วง log phase (OD_{600} = 3.89 ± 0.07) ทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างโปรตีนด้วย IPTG จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 8 ชั่วโมง (ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำเซลล์เพื่อสร้างโปรตีน 4 ชั่วโมง) โดยความหนาแน่นเซลล์เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงวัดได้ 5.34 ± 0.12 OD

เมื่อนำตะกอนเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ไปทำให้เซลล์แตกแล้วนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนบน 14% SDS-PAGE พบว่าตัวอย่างสารละลายส่วนใสด้านบน (Soluble fraction, S) ไม่ปรากฏแถบของโปรตีนที่ต้องการ ในขณะที่ตัวอย่างตะกอนด้านล่าง (Insoluble fraction, I) ปรากฏแถบของโปรตีน rIFN α-2b ที่ต้องการ โดยแสดงผลที่ตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 kDa ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยมีการทดสอบความถูกต้องของโปรตีนด้วยวิธี western blot มาก่อนหน้าแล้ว (ไม่แสดงข้อมูล) เมื่อนำตัวอย่างโปรตีน rIFN α-2b ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องวิเคราะห์ภาพเจล โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน IFN α-2b ที่ปริมาณ 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 µg ดังแสดงในภาพที่ 5 พบว่า *E. coli* BL21(DE3) ที่เลี้ยงในระดับฟลาสก์สามารถผลิตโปรตีน rIFN α-2b ได้ปริมาณ 118.13 ± 12.70 mg/L



ภาพที่ 4 การแสดงออกของโปรตีนจาก *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์ หลังเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วิเคราะห์บน 14% SDS-PAGE จากตัวอย่างเซลล์ปริมาณ 0.02 OD โดย M: Marker, S: Soluble fraction, I: Insoluble fraction



ภาพที่ 5 การแสดงออกของโปรตีนที่ผลิตจาก *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์ หลังเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วิเคราะห์บน 14% SDS-PAGE โดยใช้เซลล์ปริมาณ 0.02 OD จากตัวอย่างในระดับฟลาสก์ จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน IFN α-2b ที่ปริมาณ 0.125-1.00 µg

เมื่อมีการกระตุ้นเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ให้ผลิตโปรตีนเป้าหมายด้วย IPTG อาจส่งผลทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ ทำให้มีความจำเป็นต้องทดสอบ plasmid stability ควบคู่กับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เซลล์ผลิตในช่วงการกระตุ้นการผลิตโปรตีน เพื่อประเมินว่าเป็น critical in-process control ที่จำเป็นต้องทำในการผลิตจริงหรือไม่ เมื่อนำตัวอย่างน้ำหมักก่อนและหลังการเติม IPTG มาทดสอบเสถียรภาพของพลาสมิดโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง TB ที่มีการเติมและไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะ kanamycin ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าก่อนการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เจริญบนอาหารแข็ง TB มีปริมาณ $(3.70 \pm 0.46) \times 10^6$ CFU/mL เมื่อเหนี่ยวนำเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จำนวนโคโลนีที่ตรวจพบมีปริมาณ $(3.47 \pm 0.21) \times 10^5$ CFU/mL ในขณะที่เมื่อนำมาทดสอบบนอาหารแข็ง TB ที่มียาปฏิชีวนะสามารถตรวจนับปริมาณเซลล์เริ่มต้นได้ $(3.63 \pm 0.29) \times 10^6$ CFU/mL และปริมาณเซลล์ลดลงเหลือเพียง 4.00×10^4 CFU/mL หลังการเหนี่ยวนำเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยการเหนี่ยวนำเซลล์ด้วย IPTG ส่งผลให้ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะของเซลล์ลดลงประมาณ 10 เท่า (1 log cycle) เมื่อคำนวณเสถียรภาพของพลาสมิดโดยเปรียบเทียบจากจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมยาปฏิชีวนะต่อจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่ไม่มียาปฏิชีวนะพบว่าเสถียรภาพของพลาสมิดของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่เลี้ยงเพื่อผลิตโปรตีนในระดับฟลาสก์หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมง คิดเป็น 98.20 และ 11.53% ตามลำดับ

ตารางที่ 1 จำนวนโคโลนีของ *E. coli* BL21(DE3) ที่เจริญบนอาหารแข็ง TB ที่มีการเติมและไม่เติมยาปฏิชีวนะ kanamycin หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 0 และ 4 ชั่วโมง

ระยะเวลาการเหนี่ยวนำเซลล์	จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (CFU/mL)		เสถียรภาพของพลาสมิด (%)
	TB	TB + kanamycin	
0 ชั่วโมง	$(3.70 \pm 0.46) \times 10^6$	$(3.63 \pm 0.29) \times 10^6$	98.20
4 ชั่วโมง	$(3.47 \pm 0.21) \times 10^5$	4.00×10^4	11.53

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ชนิดและความเข้มข้นของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารแต่ละชนิดส่งผลให้ความสามารถในการใช้สารอาหาร การผลิตของเสียหรือสารเมทาบอไลท์ต่างๆ มีความแตกต่างกัน Tan *et al.* (2009) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ TB ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* และเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีน IFN-α2b ใน periplasmic เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงถึง 156 mM ซึ่งมาจากสัดส่วนของสารสกัดยีสต์ 24 g/L และจากทริปโตน 12 g/L ในขณะที่อาหาร LB มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 70 mM ซึ่งมาจากสารสกัดยีสต์ 5 g/L และจากทริปโตน 10 g/L Kram and Finkel (2015) ทำการศึกษาการชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อลักษณะการเจริญเติบโตของ *E. coli* K-12 พบว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร TB ข้ามคืน ให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์สูงกว่าการเลี้ยงในอาหาร LB 10 เท่า (1 log cycle) ทั้งนี้เนื่องจากข้อแตกต่างระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ประการ คือ 1) อาหาร TB มีปริมาณโปรตีนรวมสูงกว่าอาหาร LB 2) ชนิดและความเข้มข้นของเกลือในอาหาร โดย LB ประกอบด้วยเกลือ NaCl ในขณะที่ TB ไม่มีเกลือ NaCl แต่ประกอบด้วยเกลือโพแทสเซียมฟอสเฟตซึ่งทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ให้กับระบบ 3) แหล่งคาร์บอน โดยพบว่า LB ไม่มีส่วนประกอบใดๆ ที่เป็นคาร์โบไอเดรต เซลล์จึงใช้โปรตีนที่อยู่ในอาหารเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง ในขณะที่อาหาร TB มีส่วนประกอบของ glycerol ซึ่งจัดเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติมให้กับเซลล์ นอกจากนี้ Srivastava *et al*. (2005) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5 α โดยเปรียบเทียบชนิดของอาหาร TB, LB และ M9 พบว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร TB ให้ค่าความเข้มข้นเซลล์ (OD_{600}) สูงสุด 4.45 ในขณะที่การเลี้ยงในอาหาร LB และ M9 ให้ความเข้มข้นเซลล์เพียง 3.3 และ 1.6 ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TB ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยอาหาร LB

การกระตุ้นเซลล์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 ^{o}C ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการผลิตโปรตีนโดยการกระตุ้นในอาหารเหลวเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงต่อให้ผลความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าการกระตุ้นบนอาหารแข็งอาจเป็นผลมาจาก การกระตุ้นเซลล์ในอาหารเหลวใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยงคงเดิม เมื่อย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเหลวใหม่ที่มีสารอาหารสมบูรณ์และไม่มีของเสียสะสมตกค้างในอาหารจึงทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่การกระตุ้นในอาหารแข็งเมื่อย้ายเซลล์มาเพาะเลี้ยงต่อในระดับฟลาสก์ แม้จะเป็นอาหารชนิดเดียวกันแต่รูปแบบของการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน เซลล์ต้องมีการปรับตัวกับสภาวะใหม่ในการเพาะเลี้ยงจึงทำให้การเจริญเติบโตน้อยกว่า อย่างไรก็ตามการนำเซลล์มากระตุ้นในอาหารแข็งมีข้อดีในแง่ของสามารถทดสอบความบริสุทธิ์ของกล้าเชื้อก่อนนำมาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป โดยดูจากลักษณะโคโลนีของเซลล์ที่เจริญบนจานอาหาร

การเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) เพื่อผลิต rIFN-α2b โดยการเติม IPTG เพื่อเหนี่ยวนำเซลล์ให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการพบว่า ก่อนการเติม IPTG เซลล์ยังคงความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะในอัตราส่วนสูง 98.20% เมื่อเติม IPTG เป็นผลให้ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะลดลงเหลือเพียง 11.53% แสดงให้เห็นว่า IPTG ทำให้เซลล์สูญเสียพลาสมิดที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ kanamycin ทำให้เซลล์เจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะดังกล่าวลดลง โดยการเติม IPTG เป็นการเพิ่มแรงกดดัน (stress) ให้กับเซลล์ ทำให้เซลล์ผลิตสาร metabolite เพิ่มขึ้น เกิดเป็น metabolic burden ส่งผลให้เซลล์สูญเสียคุณสมบัติในการเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ (selective medium) โดยที่เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่แต่ไม่สามารถแบ่งตัวเพื่อการเจริญเติบโตได้ (viable but not culturable) (Andersson *et al*., 1996; Marish *et al*., 2013) นอกจากนี้ Morowvat *et al*. (2015) รายงานว่าการนำชิ้นส่วนยีนที่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเข้าสู่โฮสต์เซลล์ใดๆ จะทำให้เกิด metabolic burden ซึ่งเป็นผลให้เซลล์นั้นๆ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลง ปริมาณเซลล์ (biomass content) ลดลง และทำให้เกิดความไม่เสถียรของพลาสมิด (plasmid instability) ตามมา

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าแม้ความสามารถในการเจริญของเซลล์บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะจะลดลง แต่ความสามารถในการผลิตโปรตีนของเซลล์ภายในระยะเวลาของการเหนี่ยวนำที่ทำการทดลอง (4 ชั่วโมง) ยังคงอยู่ ดังเห็นได้จากผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนบน 14% SDS-PAGE อย่างไรก็ตามการศึกษาระยะเวลาในการเหนี่ยวนำเซลล์เพื่อผลิตโปรตีน (post induction time) ต่อปริมาณผลได้ของโปรตีนควรมีการศึกษาในโอกาสต่อไป นอกจากนี้โปรตีน rIFN α-2b ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) อยู่

ในรูปของ IB ซึ่งเป็นลักษณะของโปรตีนที่ยังไม่สามารถแสดงกิจกรรมได้ (inactive form) ต้องมีการนำไปเข้าสู่กระบวนการคืนสภาพ (refolding) และทำบริสุทธิ์ (purification) ในลำดับต่อไป อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงและเหนี่ยวนำเซลล์ให้ผลิตโปรตีนในรูปของ inclusion body มีข้อดีคือสามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ในปริมาณมาก (Gaciarz *et al*., 2017) นอกจากนี้สิ่งที่ควรพิจารณาในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตโปรตีนในระดับฟลาสก์คือ การกำหนดอัตราส่วนระหว่างปริมาตรฟลาสก์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยในการทดลองครั้งนี้กำหนดให้ใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 20% ของปริมาตรฟลาสก์ โดยปริมาตรอาหารที่แตกต่างกันย่อมส่งผลให้การผสมหรือการกระจายของออกซิเจนในระบบแตกต่างกัน การกำหนดอัตราส่วนข้างต้นให้คงที่ ช่วยให้การเจริญเติบโตของเซลล์ในระดับฟลาสก์ให้ผลการทดลองสอดคล้องไปในทางเดียวกัน เมื่อมีการขยายขนาดหรือเพิ่มปริมาตรการเพาะเลี้ยงเซลล์

สรุปผลการวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ TB มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) โดยให้ผลการเจริญเติบโตดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร LB

2. การกระตุ้นเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -80°C โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว TB ให้ผลการเจริญเติบโตดีกว่าการกระตุ้นเซลล์โดยเลี้ยงในอาหารแข็งด้วยวิธี streak plate

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์ ใช้เวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เจริญเข้าสู่ช่วง log phase ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำโปรตีน

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในระดับฟลาสก์ สามารถผลิตโปรตีน rIFN α-2b ในรูปของ inclusion body คิดเป็น 118.13 ± 12.70 mg/L

5. ผลการทดลองที่ได้นำไปใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) เพื่อผลิตโปรตีน rIFN α-2b ในถังหมักระดับปฏิบัติการต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Andersson, L., S. Yang, P. Neubauer, P. and S. Enfors. 1996. Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology. 46 (3): 255-263.

Gaciarz, A., N. K. Khatri, M. L. Velez-Suberbie, M. J. Saaranen, Y. Uchida, E. Keshavarz-Moore and L. W. Ruddock. 2017. Efficient soluble expression of disulfide bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* in fed-batch fermentations on chemically defned minimal media. Microbial Cell Factories. 16: 108.

Graumann, K. and A. Premstaller. 2006. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. Biotechnology Journal. 1(2): 164-86.

Huang, C.J., H. Lin and X. Yang. 2012. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 39: 383–399.

Kram, K. E. and S. E. Finkel. 2015. Rich medium composition affects *Escherichia coli* survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture. Applied and Environmental Microbiology. 81(13): 4442-4450.

Marisch , K., K. Bayer, M. Cserjan-Puschmann, M. Luchner and G. Striedner. 2013. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. Microbial Cell Factories. 12: 58.

Morowvat, M. H., B. Valiollah, H. R. Memari and V. Hossein. 2015. Optimization of fermentation conditions for recombinant human interferon beta production by *Escherichia coli* using the response surface methodology. Jundishapur Journal of Microbiology. 8(4): e16236.

Singh, A., V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh and A. K. Panda. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. Microbial Cell Factories. 14: 41.

Singh, S. M. and A. K. Panda. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. Journal of Bioscience and Bioengineering 99 (4): 303310.

Srivastava, P., P. Bhattacharaya, G. Pandey and K.J. Mukherjee. 2005. Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification. 41: 313–322

Tan, J. S., R. N. Ramanan, S. N. A. Azaman, T. C. Ling, M. Shuhaimi and A. B. Ariff. 2009. Enhanced Interferon-α2b Production in Periplasmic Space of *Escherichia coli* through Medium Optimization using Response Surface Method. The Open Biotechnology Journal. 3: 117-124.