

Thesis Title Optimization of Sequential Simplex in Bioreactor for Highly Efficient Production of Secreted Single Chain Variable Fragment Against HIV-1 Matrix Protein in *Escherichia coli*

Author Miss Kannaporn Intachai

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee

Dr. Bordin Butr-Indr Advisor

Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Co-advisor

ABSTRACT

The optimal culture condition for extracellular recombinant single chain variable fragment anti HIV-1 p17 protein (scFv anti-p17) production in *Escherichia coli* HB2151 was investigated by the sequential simplex optimization (SS) method. Five variable parameters were submitted in the fermentation process. The most favorable condition obtained from 19 independent experiments was as follows: 58 μ M of IPTG induction to 1.7 OD_{600nm} at 25.5 °C for 16 h with 202 rpm agitation rate. The amount of secreted scFv anti-p17 at the optimal condition was 38% higher than under the control condition. The binding activity of soluble extracellular scFv anti-p17 protein increased 73.2% and 95.5% in comparison with the control condition and non-

optimized condition respectively. The soluble scFv anti-p17 from crude HB2151 lysated was subsequently purified by immobilized metal ion affinity chromatography. (IMAC) with His-tag. The purified scFv anti-p17 was intact and retained its antigen-binding affinity against HIV-1 p17. We demonstrated that the sequential simplex optimization method was a key for exertion of high yield with fewer experimental requirements for acquiring of large scale secretory protein production.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับชีควอนเซียม ซิมเพล็กซ์
ในชีวปฏิกิริยาเพื่อผลิตซิงเกิลเซน แวเรียเบิล แฟรกเมนต์
แบบคัดหลังต่อเมทริกซ์โปรตีนของ HIV-1
ใน *Escherichia coli*

ผู้เขียน

นางสาวกรรณาภรณ์ อินทชัย

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ.ดร. บดินทร์ บุตรอินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร. ชัชชัย ตะยาภักพัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนซิงเกิลเซน แวเรียเบิล แฟรกเมนต์ แบบคัด
หลังต่อเมทริกซ์โปรตีนของเฮชไอวี-1 (scFv anti-p17) ในเอชเชอริเชีย โคลิ ในถึงชีวปฏิกิริยาดัง
วิธีชีควอนเซียมเพล็กซ์ ในการศึกษานี้ได้กำหนดตัวแปรที่มีความสำคัญ และมีความสัมพันธ์
กันในกระบวนการผลิตโปรตีนในถึงชีวปฏิกิริยาทั้งหมด 5 ตัวแปร จากการทดลองหาสภาวะที่
เหมาะสมทั้งหมด 19 สภาวะ ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ กระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วยสาร IPTG ความ
เข้มข้น 58 μM ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ใช้กระตุ้นการสร้างโปรตีน 1.7 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) อุณหภูมิ
หลังการกระตุ้นด้วย IPTG เท่ากับ 25.5 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ปล่อยให้เชื้อผลิตโปรตีน
หลังจากการกระตุ้นด้วย IPTG เท่ากับ 16 ชั่วโมง และอัตราการกวน 202 รอบต่อนาที ซึ่งปริมาณ
การหลังโปรตีน scFv anti-p17 ออกสู่นอกเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมมีปริมาณมากกว่าในสภาวะ
เริ่มต้นคิดเป็น 38% และค่าความสามารถในการจับกับแอนติเจนของโปรตีน scFv anti-p17 ที่ผลิต
ในสภาวะที่เหมาะสมมีค่ามากกว่า สภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นการสร้างโปรตีนและสภาวะเริ่มต้นของ
ซิมเพล็กซ์ คิดเป็น 73.2% และ 95.5% ตามลำดับ โปรตีน scFv anti-p17 ที่ผลิตได้สามารถทำ
บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธี immobilized metal ion affinity chromatograph โดยใช้ histidine tag ในการทำ
บริสุทธิ์ โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ยังคงมีความสามารถในการจับกับแอนติเจนได้ดี ดังนั้นการหา

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนด้วยวิธีซีเควนเซียลซิมเพิล็กซ์ เป็นกุญแจสำคัญในการช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีนมากขึ้น และลดจำนวนการทดลองลง เพื่อประยุกต์ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved