Thesis Title Expression of Single Chain Variable Fragments anti-CD147 in *Pichia pastoris*

Author Miss Tanatporn Chunkeson

Degree Master of Science (Biotechnology)

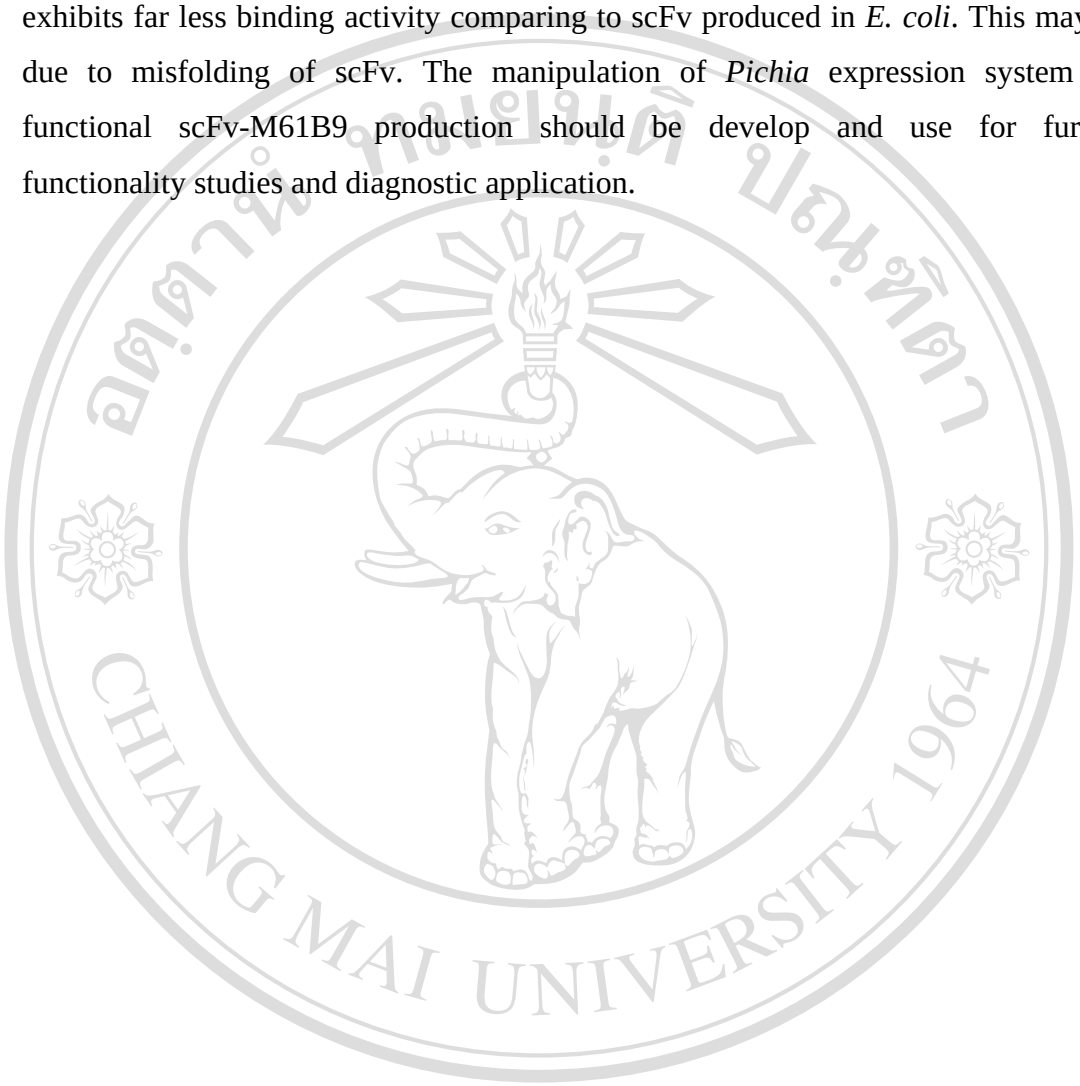
Thesis Advisor Dr. Ronachai Pratanaphon

ABSTRACT

Pichia pastoris is a methylotrophic yeast mainly used to produce recombinant proteins. The advantage of performing complex post-translational modification and express proteins at high levels make it a host of choice for expressing mammalian protein. Morever, recombinant *P. pastoris* can be used as a biocatalyst or methanol removing from a waste stream in paper industry. In the present study the cloning and expression of scFv-M61B9 in *P. pastoris* is reported. The scFv produced from *P. pastoris* will be used to study function of CD147. In this study, hanging primers were designed to amplify scFv-M61B9 and add restriction enzymes sites (*Eco* RI and *Not* I) to 5' end and 3' end, respectively. The amplified products were cloned into the pPICZ expression vector and transformed into *E. coli* (XL-1 blue). Three colonies of *E. coli* from the selective media were randomly selected for confirmation using PCR technique, restriction analysis and DNA sequencing. After that, vector containing scFv-M61B9 gene was cloned into *P. pastoris* using electroporation technique. Colonies of *P. pastoris* growing on the selective media were randomly selected for the present of scFv gene using PCR technique. Then, the PCR positive clones were cultured and induced for 3 days with 0.5% (v/v) methanol. The expression of scFv was test from yeast cell lysate prepared by glass bead using ELISA technique and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

western blotting. Result from western blot showed that scFv-M61B9 was expressed in *P. pastoris*. However, ELISA results indicated that the scFv produced by *P. pastoris* exhibits far less binding activity comparing to scFv produced in *E. coli*. This may be due to misfolding of scFv. The manipulation of *Pichia* expression system for functional scFv-M61B9 production should be develop and use for further functionality studies and diagnostic application.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของ Single Chain Variable Fragments ต่อโมเลกุล CD147 ในยีสต์ *Pichia pastoris*

ผู้เขียน นางสาวธนัชพร ชื่นเกษร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. รณชัย ปรารถนาผล

บทคัดย่อ

Pichia pastoris เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (methylotrophic yeast) มักใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต recombinant protein หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนจากเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากสามารถแสดงออกได้ดีและผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก นอกจากนั้นยังมีการนำ recombinant *P. pastoris* ไปใช้ประโยชน์อื่นๆ อีก เช่น การเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ การบำบัดเมทานอลในน้ำเสียจากโรงงานกระดาษ เป็นต้น ในรายงานนี้ได้ศึกษาถึงการโคลนและผลิต scFv ต่อ CD147 (scFv-M61B9) ใน *P. pastoris* เพื่อศึกษาหน้าที่ของ CD147 ให้ชัดเจนยิ่งขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบ primer เพื่อเพิ่มปริมาณยีน scFv-M61B9 และเติมลำดับเบสที่จำเพาะต่อเอนไซม์ *Eco* RI และ *Not* I แล้วทำการโคลนยีนเข้าไปใน pPICZ expression vector แล้วเหนี่ยวนำเข้าใน *E. coli* (XL-1 blue) และสุ่มเลือก *E. coli* จำนวน 3 โคโลนีที่พบบน selective media ไปตรวจยืนยันโดยวิธี PCR การตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ และตรวจดูลำดับเบสในรีคอมบิแนนท์เวคเตอร์ (DNA sequencing) จากนั้นเหนี่ยวนำเวคเตอร์ที่มียีน scFv-M61B9 เข้าในยีสต์ *P. pastoris* ด้วยกระบวนการ electroporation แล้วสุ่มเลือก *P. pastoris* ที่พบบน selective media ไปตรวจยืนยันโดยวิธี PCR แล้วนำโคลนที่ให้ผลบวกไปเลี้ยงและกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติมเมทานอล 0.5 เปอร์เซนต์ ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทดสอบดูการแสดงออกของ scFv-M61B9 ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ *P. Pastoris* โดยวิธี western blotting พบว่ามีการผลิต scFv-M61B9 ได้ปริมาณมาก แต่เมื่อตรวจโดยใช้ ELISA พบว่า scFv ที่ผลิตจาก *P. pastoris* มีความสามารถในการจับกับ CD147 น้อยมากเมื่อเทียบกับ scFv ที่ผลิตจาก *E. coli* ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการ folding ที่ไม่ถูกต้อง ทั้งนี้ควรมีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของ scFv-M61B9 แล้วจึงนำมาใช้ในการผลิต scFv-M61B9 ให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved