50355201 : MAJOR : BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES
KEY WORDS : SUPER CORE PROMOTER / HYBRID PROMOTER / CHO CELL
THARATREE SRICHAN : EXPRESSION ACTIVITY OF SUPER CORE PROMOTER BETA AND ITS HYBRIDS IN CHO-K1 CELLS. THESIS ADVISORS : ASST. PROF. WISIT TANGKEANGSIRISIN, Ph.D., AND ASST. PROF. SIRIPAN LIMSIRICHAIKUL, Ph.D., 93 pp.

Recombinant gene promoter optimization is one of the most efficient methods which is able to increase recombinant protein production using mammalian cell culture. This study therefore is to develop a core promoter by introducing transcription factor II B recognition element (BRE) into the super core promoter (SCP). The result presented that reporter gene expression under the control of a SCP containing BRE (SCP beta) was higher than under the control of the SCP in Chinese hamster ovary (CHO) cells by 49% and 35% increase in serum supplemented and serum depleted cell culture, respectively. Furthermore, the study of hybrid enhancer/SCP beta activity demonstrated that different enhancer type generated various promoter strengths. It varied from non-effect in hybrid human EF-1α/SCP beta, about 11-fold increase in hamster β-actin/SCP beta, about 21-fold increase in hamster GADD 153/SCP beta, to about 287-fold increase in CMV IE/SCP beta by comparison with SCP beta activity. The similar trend is also observed in serum-free medium. Altogether, it could be concluded that BRE consensus sequence, locating at position -38 to -32 (upstream of TATA-box) of the SCP up-regulates transcriptional expression of gene. The hybrid hamster β-actin/SCP beta, the hybrid hamster GADD 153/SCP beta and the hybrid CMV IE/SCP beta could increase transgene expression in both cells cultured with completed medium and serum-free medium. This information would lead an idea to advance promoter activity for biological research use and improve therapeutic protein production efficiency.

Program of Biopharmaceutical Sciences Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2011
Student's signature.....
Thesis advisors' signature 1. …….…… 2. ……...……..

50355201 : สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ
คำสำคัญ : ซุปเปอร์คอร์โปรโมเตอร์ / โปรโมเตอร์ลูกผสม / เซลล์เพาะเลี้ยง CHO

ธาราธีร์ ศรีจันทร์ : การแสดงออกของซุปเปอร์คอร์โปรโมเตอร์บีต้าและลูกผสมในเซลล์เพาะเลี้ยง CHO-K1. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ภก. ผศ. ดร. วิสิฐ ตั้งเคียงศิริสิน และ ภญ. ผศ. ดร. สิริพรรณ ลิ้มศิริชัยกุล. 93 หน้า.

การเพิ่มฤทธิ์โปรโมเตอร์ของ recombinant gene เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งในการเพิ่มศักยภาพการผลิต recombinant protein ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงคอร์โปรโมเตอร์ด้วยการใส่ transcription factor II B recognition element (BRE) ให้กับซุปเปอร์คอร์โปรโมเตอร์ (SCP) ผลพบว่าซุปเปอร์คอร์โปรโมเตอร์ที่มี BRE (SCP beta) มีฤทธิ์ทำให้ยีนรายงานผลแสดงออกในเซลล์ CHO ได้มากกว่าซุปเปอร์คอร์โปรโมเตอร์ (SCP) โดยมีผลทำให้การแสดงออกของยีนรายงานผลเพิ่มมากขึ้นประมาณร้อยละ 49 ในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารแบบมีซีรั่ม และประมาณร้อยละ 35 ในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารแบบปราศจากซีรั่ม และการศึกษาฤทธิ์ของซุปเปอร์คอร์โปรโมเตอร์บีต้าลูกผสมพบว่าชนิดของ enhancer มีผลต่อฤทธิ์ของโปรโมเตอร์ลูกผสมแตกต่างกัน โดย human EF-1α/SCP beta มีฤทธิ์ไม่แตกต่างจาก SCP beta แต่ hamster β-actin/SCP beta, hamster GADD 153/SCP beta และ CMV IE/SCP beta มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 11, 22 และ 287 เท่าในเซลล์ CHO ที่เลี้ยงด้วยอาหารแบบมีซีรั่มตามลำดับ และผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันเมื่อทดสอบในเซลล์ที่เลี้ยงแบบปราศจากซีรั่ม จากผลการทดลองทั้งหมดพอจะสรุปได้ว่า BRE ที่ตำแหน่ง -38 ถึง -32 (ทางด้าน 5' ของ TATA-box) ของซุปเปอร์คอร์โปรโมเตอร์มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนในระดับ transcription และโปรโมเตอร์ลูกผสม hamster β-actin/SCP beta, hamster GADD 153/SCP beta และ CMV IE/SCP beta มีฤทธิ์ทำให้ transgene แสดงออกในเซลล์ CHO เพิ่มมากขึ้นทั้งแบบที่เลี้ยงในอาหารที่มีซีรั่มและแบบปราศจากซีรั่ม ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้คงจะช่วยก่อให้เกิดแนวคิดในการพัฒนาคุณสมบัติของโปรโมเตอร์เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน รวมทั้งการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคต่อไปในอนาคต

สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา .....

รายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. ……... 2. ……..

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis is aimed to create the new generation of promoters for mammalian expression vector. It is a little study, but could not be accomplished without the great support by my graduate advisors, Asst. Prof. Dr. Wisit Tangkeangsirisin and Asst. Prof. Dr. Siripan Limsirichaikul. I'm much appreciated. I cannot forget to thank you to all of them. I would also like to thank Prof. Dr. Prasert Auewarakul for material supplement. I would like to present my sincere gratitude to the member of thesis committee, Dr. Piyanuch Jongsamak, Dr. Krit Thirapanmethee and Dr. Perayot Pamonsinlapatham who devoted their time to suggest me to write this report. Without their guidance and reviews, this thesis cannot complete. I always keep in mine about people who gave me knowledge and many tools. This thesis has been finished because of many helps from laboratory members, Miss Sirikul Dangmanee, Miss Siripun Tipluechar and Miss Arporn Kaeopardtana. I also thank to my best friend Mr. Niti Osirisakul who always stand by me even when I lost my mind. Finally, I would like to mention to my smiling mother, Mrs. Ploi Srichan who stands behind this success and raises me up whenever I fall.

Tharatree Srichan

สำนักหอสมุดกลาง
มหาวิทยาลัยศิลปากร