รหัสโครงการ SUT3-304-47-24-11

รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี

(Application of phage display technology for the production of monoclonal antibody)

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภัย
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2547-2549
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2552

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสภาวิจัยแห่งชาติผ่านมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ Professor Dr. Brian K. Kay ผู้เป็นครูคนแรกในทางเทคโนโลยีนี้ ขอขอบคุณ ดร.พจมาศ แพนศรี ลูกศิษย์ปริญญาเอกที่ได้ช่วยกันพัฒนาเทคโนโลยีนี้ขึ้นในประเทศไทยจนสำเร็จ และ Assoc. Prof. Dr. Peter Kristensen ที่ได้ช่วยเหลือทางเทคนิคหลายประการ โดยเฉพาะ helper phage KM13

บทคัดย่อ

โครงการ การพัฒนาเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) นี้ ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี โดยในขั้นแรกได้ทำการพัฒนาวิธีการที่สะดวก ประหยัด รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพดีในการคัดหาแอนติบอดีจากคลังของฟาจ รวมทั้งได้ทำการสร้างเวคเตอร์ หรือ ฟาจมิด ซึ่งสำหรับใช้ในการสร้างคลังขึ้นมาใหม่ เรียกเวคเตอร์นี้ว่า pMod1 จากนั้นจึงได้ทำการสร้างคลังของฟาจโดยใช้เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ทั้งชายและหญิงรวม 140 คน ในจังหวัดนครราชสีมา เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนแอนติบอดีส่วนที่มีความแปรปรวนสูง โดยการสังเคราะห์เริ่มจากการสกัด mRNA แล้วสร้างเป็น cDNA ก่อนที่จะนำมาเพิ่มจำนวนเป็น DNA ของชิ้นแอนติบดีส่วนต่างๆ ด้วยวิธีการ PCR รวมทั้งสิ้น 75 ปฏิกิริยา จากนั้นจึงนำชิ้น DNA ที่เหมาะสมมารวมกันเข้าเป็น แอนติบอดีส่วน scFv ด้วยวิธีการ PCR ก่อนที่จะนำไปโคลนเข้าเวคเตอร์ pMod1 เพื่อสร้างเป็นคลังของฟาจที่สมบูรณ์ จากการวิเคราะห์พบว่าคลังของฟาจที่แสดง monoclonal antibody ของมนุษย์ ส่วน scFv ที่ได้สร้างขึ้นนั้นมีขนาดความหลากหลายสูงถึง 1.5×10^8 ชนิด และมีศักยภาพสูงในการนำไปคัดหา antibody ต่อ แอนติเจน (antigen) ชนิดต่างๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ทั้งที่เป็น โปรตีนบริสุทธิ์ (BSA, GST) เป็นสารโมเลกุลเล็กประเภท hapten คือสาร อะฟลาทอกซิน และสารที่มีความสลับซับซ้อนสูง ได้แก่ พิษงูเห่า และผิวเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผู้วิจัยได้ตั้งชื่อคลังนี้ว่า คลัง "ย่าโม๑" ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัย และการประยุกต์ใช้ในทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพด้านต่างๆได้อย่างกว้างขวางต่อไป

Abstract

This research project entitled "Application of phage display technology for the production of monoclonal antibody" has been successfully conducted. In the first step, an efficient method for the affinity selection of phage antibody library has been established. After that, the vector or phagemid that was used for the construction of phage display antibody library in this projected has been constructed. This vector was named "pMod1". The phage-displayed antibody library was constructed by using a very large antibody variable region gene repertoires derived from 140 non-immunized donors, both male and female in Nakhon Ratchasima province. The construction of the library started from the isolation of mRNA from peripheral blood lymphocyte, cDNA synthesis, and synthesis of all possible combinations of heavy and light chains using a complex set of modified primers by 75 independent PCR reactions, before re-assembling into scFv fragments by overlapping PCR. The inserts were then cloned into pMod1 vector for the generation of phage library containing $1.5x10^8$ individual clones. This library could be used to affinity select specific monoclonal antibodies against a wide variety of antigens including purified protein (BSA and GST), hapten (aflatoxin), and highly complex antigens, namely crude cobra venom and cholangiocarcinoma cell surface. This high quality antibody library was designated "Yamo1" and has tremendous potential for a wide area of researches and applications in the future.

สารบัญเรื่อง

บทที่ 1:บทนำ 5
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาการทำวิจัย และ การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง 5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ 9
บทที่ 2: เนื้อเรื่อง 11
การสร้างคลังแอนติบอดีบนผิวเฟจ 11
ขั้นที่ 1 การออกแบบ oligonucleotides สำหรับสร้าง variable domains 11
ขั้นที่ 2 การสกัด mRNA จาก B lymphocyte 11
ขั้นที่ 3 การสร้าง cDNA ของ immunoglobulin heavy chain และ light chain 14
ขั้นที่ 4 การสร้างชิ้น VH และ VL ด้วยวิธี PCR 15
ขั้นที่ 5 การรวมชิ้น VH และ VL เพื่อสร้างเป็น scFv (Re-assemble) 16
ขั้นที่ 6 การเชื่อม scFv เข้ากับ vector (ligation) 18
ขั้นที่ 7 การ transform recombinant vector เข้าสู่ E. coli 20
ขั้นที่ 8 การสร้างเป็นคลังของฟาจที่แสดง scFv (Rescuing phagemid library) 23
การตรวจสอบคุณภาพของคลัง 24
การคัดเลือกโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากคลัง (Bio-Panning) 25
ขั้นที่ 1 การตรึง antigen เป้าหมาย 26
ขั้นที่ 2 การคัดเลือกรอบแรก 26
ขั้นที่ 3 การเตรียมฟาจเพื่อทำการคัดเลือกรอบที่สอง 27
ขั้นที่ 4 การคัดเลือกรอบที่สอง 27
ขั้นที่ 5 การแยกเป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว 27
ขั้นที่ 6 การเตรียมฟาจโคโลนีเดี่ยว 28
ขั้นที่ 7 การทำ Monoclonal Phage ELISA 29
การผลิตชิ้นแอนติบอดีส่วน scFv หรือ Fab 29
การผลิต soluble antibody fragment โดยการเปลี่ยนชนิดของแบคทีเรีย 30
การเตรียม soluble antibody fragment ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ 31
การเตรียม soluble antibody fragment ที่อยู่ใน periplasmic space 31
การเตรียม soluble antibody fragment บน 96-well plate 32
การตรวจสอบความสามารถในการจับกับ antigen ด้วยวิธีการ ELISA 33
สรุปผลการคัดเลือกฟาจจากคลังย่าโม๑ ที่ได้จากทำวิจัยในโครงการนี้ 34
บทที่ 3: ข้อวิจารณ์ 37
ข้อดีของคลังย่าโม๑ ซึ่งเป็นผลงานที่ถูกประดิษฐ์คิดค้นจากโครงการวิจัยนี้ 37
ข้อเสียหรือข้อบกพร่องของผลงานอื่นๆ ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน 38
บทที่ 4: สรุป 41
บรรณานุกรม 43

ภาคผนวก.....47
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ.....47
ผลงานการนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติ/นานาชาติ.....47
การถ่ายทอดเทคโนโลยี.....47
ผลงานทางวิชาการอื่นๆ.....48
เอกสารประกอบการสอน.....48
เอกสารคำสอน.....48
e-course.....48
การผลิตบัณฑิต.....48
ตารางแสดงลำดับกรดอะมิโนของแอนติบอดีที่สุ่มมาจากคลังจำนวน 10 ชิ้น.....49
ประวัตินักวิจัย.....51
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้.....51

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการสร้างคลัง 14
ตารางที่ 2 ลำดับเบสของ primers ใช้ในการสร้าง cDNA 15
ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ pull-through primers 17
ตารางที่ 4 ผลการคัดหาฟาจที่สามารถจับจำเพาะกับเป้าหมายต่างๆ 35
ตารางที่ 5 แสดงลำดับกรดอะมิโนในส่วน CDR3 และ ประเภทของ germ line ของแอนติบอดี 35

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 ขั้นตอนทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างคลังของฟาจที่แสดง monoclonal antibody 13
รูปที่ 2 โครงสร้างของ vector pMOD 22
รูปที่ 3 แสดงรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากการตัดยีน scFv จากฟาจที่เลือกมาแบบสุ่ม 25

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาการทำวิจัย และ การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

โมโนโคลนอลแอนติบอดี เป็นสารทางชีวภาพที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพหลายด้าน (1) ทั้งที่เกี่ยวกับการทำงานของยีน โปรตีน หรือกลไกการทำงานของเซลในสภาวะปกติ และในสภาวะที่เกิดโรคชนิดต่างๆ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะถูกใช้เป็นตัวตรวจสอบในงานวิจัยที่ต้องใช้เทคนิคทาง western blot analysis การตรวจสอบทาง ELISA การย้อมเซลเพื่อศึกษาตำแหน่งของโมเลกุลที่สนใจ (immuno-cytochemistry) หรือการแสดงออกของยีน รวมทั้งการใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีการโครมาโตกราฟฟี (affinity chromatography) การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอนติบอดี (immunoprecipitation) การคัดเลือกเซล (cell sorting) หรือแม้แต่การใช้เป็นตัวช่วยให้สามารถสร้างผลึกของโปรตีนที่อยู่บนผนังเซล เพื่อใช้ในการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติด้วย นอกจากนั้นแล้วยังสามารถประยุกต์ใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ต่างๆ (diagnostic antibody) ทั้งการตรวจโรคชนิดต่างๆ และการตรวจหาสารปนเปื้อน และในเวลาไม่นานมานี้ยังได้มีการเริ่มใช้แอนติบอดีเป็นสารสำหรับการรักษาโรค โดยเฉพาะโรคมะเร็งชนิดต่างๆ (therapeutic use) (2) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าแอนติบอดีเป็นสารทางชีวภาพที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการค้นคว้าวิจัย ทั้งการวิจัยพื้นฐานและการวิจัยประยุกต์ด้านต่างๆ

วิธีการทั่วไปที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น ทำได้โดยการฉีด แอนติเจน เข้าไปในหนู เพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนชนิดนั้นๆ จากนั้นจึงใช้เทคนิคการสร้างเซลผสม (Hybridoma technology) เพื่อผลิตให้ได้เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆกัน เซลผสมที่ถูกสร้างขึ้นให้มีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถเก็บรักษาไว้ให้เป็นแหล่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ตลอดไป (3) การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดหนึ่งๆ แต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลานาน (4-5 เดือนขึ้นไป) และการลงทุนเป็นจำนวนสูง นอกจากนั้นแล้วยังต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูง รวมทั้งยังต้องเกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองคือ หนู อีกด้วย ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าขบวนการการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นค่อนข้างยุ่งยาก บางครั้งนักวิจัยไม่มีเวลาหรือบุคลากรเพียงพอ จึงต้องสั่งทำจากต่างประเทศซึ่งเป็นการเพิ่มความขาดดุลย์

นอกจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธีการดั้งเดิมนั้นจะมีความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายที่สูงแล้ว ยังมีข้อจำกัดที่เกิดจากเทคโนโลยีนี้หลายอย่างเช่น ข้อจำกัดในชนิดของแอนติเจนที่จะใช้ เพราะต้องเป็นแอนติเจนที่ไม่เป็นพิษต่อหนูทดลอง นอกจากนั้นแล้วยังต้องไม่เป็นแอนติเจนที่คล้ายกับแอนติเจนของหนู เช่นแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในขั้นต้นของลำดับการวิวัฒนาการ (conserved antigens) หรือใช้ได้เฉพาะกับแอนติเจนที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูได้ (immunogenecity) นอกจากนั้นแล้วผลที่ได้จากการกระตุ้นหนูทดลองยังมีความแปรปรวนสูงขึ้นกับประวัติทางสุขภาพของหนูแต่ละตัว ข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือจำนวนชนิดของแอนติเจนที่จะใช้ในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดย

ปกติการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนแต่ละชนิดมักต้องใช้หนูทดลอง 3-5 ตัวขึ้นไป ในยุคปัจจุบันซึ่งเป็นยุคหลังการค้นพบลำดับ ยีโนมมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด ความสำคัญในการศึกษาวิจัยจึงมุ่งไปสู่การศึกษาการทำงานของยีโนม หรือโปรตีน (functional genomics หรือ proteomics) (4) ซึ่งการวิจัยเหล่านี้จำเป็นต้องเกี่ยวกับโปรตีนจำนวนมหาศาล การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีนเหล่านี้โดยวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบันจึงเป็นไปไม่ได้ หรือต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่กำลังได้รับความสนใจอยู่มากในปัจจุบันนี้ ได้แก่การนำโมโนโคล นอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนู หรือสัตว์อื่น ไปปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเป็นเหมือนของมนุษย์ (humanization) เพื่อให้สามารถใช้ในการบำบัดโรคต่างๆ (human therapy) (5; 6) ปัจจุบันมีโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคหลายประเภท โดยเฉพาะโรคมะเร็งออกจำหน่ายแล้ว (7) การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้นับวันจะมีความสำคัญและได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น (8) ดังนั้นจึงเป็นการดีที่จะใช้เทคโนโลยีอื่นในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ยุ่งยากและรวดเร็วกว่าวิธีการ hybridoma ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความสนใจ และได้รับการพัฒนาเป็นอย่างยิ่งในช่วงเวลา 20 กว่าปีที่ผ่านมานี้ (9) ทั้งนี้เป็นเพราะเทคโนโลยีนี้มีข้อเด่นที่สำคัญคือสามารถคัดเลือกได้ทั้งยีนและโปรตีนจากยีนนั้น ที่มีความสามารถในมีอันตรกริยา (interaction) ที่ต้องการได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการคัดเลือกความสามารถในการจับกับสารเป้าหมาย (target) ที่สะดวกและรวดเร็ว ภายในห้องทดลอง (*in vitro*) โปรตีนที่กล่าวมานี้อาจเป็นเปปไทด์ (peptide) เส้นสั้นๆ หรือโปรตีนขนาดต่างๆกัน ตั้งแต่ความยาว 10-500 กรดอะมิโน รวมทั้งแอนติบอดีประเภทต่างๆ (10) ดังนั้นจึงพบว่าได้มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการศึกษาการมีอันตรกริยาระหว่างโปรตีนหลายประเภท เช่น การจับกันของเปปไทด์กับโปรตีนโดเมนชนิดต่างๆ หรือการใช้เป็นแหล่งคลังของ cDNA เพื่อใช้ในการคัดหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา (11) คลังของฟาจที่แสดงเปปไทด์เส้นสั้นๆยังถูกใช้เป็นแหล่งในการหาตัวกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ เปปไทด์เส้นสั้นๆที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการพัฒนายา (drug lead) ต่อไปได้ (12-14)

การให้ความสนใจที่จะนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจมาใช้เป็นแหล่งในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นได้เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี 2533 (15) โดยในขั้นแรกเป็นการสร้างคลังของแอนติบอดีจากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนแล้ว (16) โดยทำการแสดงเฉพาะแอนติบอดี ส่วน Fab [19-21] หรือเป็นสายเดี่ยวเรียกว่า scFv (17-19) ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้จะถูกแสดงออกบนโปรตีนที่ปกคลุมบนผิวฟาจชนิดรอง (pIII) ที่อยู่บริเวณส่วนหัวของเฟจ พบว่ามีความสำเร็จจากการใช้คลังเหล่านี้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนหลายชนิด (20) แต่ข้อจำกัดประการสำคัญของการใช้วิธีการนี้คือต้องทำการกระตุ้นสัตว์ทดลองก่อนจึงเป็นการเสียเวลา และยังเป็นคลังที่มีเฉพาะแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ใช้ อย่างไรก็ตามความสำเร็จนี้นับเป็นเครื่องชี้ว่าสามารถนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจมาใช้ในการคัดเลือกและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับอย่างมีความเฉพาะเจาะจงสูงได้จริง

การพัฒนาก้าวสำคัญที่ทำให้การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นที่แพร่หลายและได้รับความสนใจเป็นอย่างสูง ทั้งในงานวิจัยขั้นพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เริ่มต้นในเวลา 2 ปีต่อมา เมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถสร้างคลังของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนได้สำเร็จ (nonimmune library หรือ naive library) (21-23) คลังชนิดนี้สามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยได้กว้างขวางกว่าคลังที่สร้างจากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนหลายเท่า เพราะสามารถใช้ในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนเกือบทุกชนิดที่ต้องการ เนื่องจากคลังของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นนี้เป็นตัวแทนความเป็นไปได้ทั้งหมดจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ตามธรรมชาติ โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกมาได้นั้นมีคุณภาพดีคือมีความสามารถในการจับ (affinity, ในช่วง 1-200 nM) และมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) สูงเท่ากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก hybridoma (23-25)

ถึงแม้ว่าการสร้างคลังของฟาจที่แสดงโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนนี้จะสามารถใช้สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้หลากหลาย และได้รับความสนใจเป็นอันมาก แต่ก็มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ คลังของแอนติบอดีที่มีคุณภาพดีจริงนั้นจะต้องเป็นคลังที่มีขนาดใหญ่มาก คือประกอบไปด้วยแอนติบอดีประมาณ 10^{9-11} ชนิดอยู่ด้วยกัน (22-25) ชนิดในที่นี้หมายถึงลักษณะของส่วนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจน (binding site) ที่แตกต่างกัน คลังที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นมีหลายประเภท โดยแต่ละคลังก็มีความแตกต่างกันในด้านต่างๆ เช่น แหล่งที่มาของ RNA ที่จะใช้เป็นต้นแบบในการสร้างโครงสร้างของแอนติบอดีที่ใช้แสดง (แบบ Fab หรือ ScFv) ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการสร้างคลัง (plasmid หรือ phgemid) พันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย และเฟจตัวช่วย (helper phage) ที่ใช้ในการเลี้ยงฟาจ หรือขั้นตอนการตัดต่อยีนเข้าไปในตัวฟาจ (20) ทั้งนี้นักวิจัยกลุ่มใดจะใช้วิธีการไหนนั้นขึ้นอยู่กับความชำนาญประสบการณ์ และวัสดุที่มีอยู่ นอกจากนั้นแล้วในปัจจุบันยังมีความพยายามในการสร้างคลังจากเส้นดีเอ็นเอสังเคราะห์อีกด้วย (synthetic oligonucleotide) (26) คลังแบบ naive นี้จะมีประโยชน์สูงในงานวิจัยที่ใช้หุ่นยนต์ทำงานเช่นในการวิจัยที่เกี่ยวกับ proteomics (27)

เทคนิคอีกชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมในการสร้างแอนติบอดีให้มีคุณภาพสูงคือมีความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการจับสูง (high specificity และ affinity) คือการนำแอนติบอดีที่คัดได้จากคลังมาทำให้เจริญเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณภาพดีขึ้น (maturation) โดยใช้หลักการกำกับวิวัฒนาการ (directed evolution) (28) ด้วยเทคนิคต่างๆเช่น การทำให้เกิดการกลายพันธ์อย่างสุ่มด้วยเทคนิคทาง PCR ที่มีความแม่นยำต่ำ (error prone PCR) หรือ การใช้เทคโนโลยการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ (DNA shuffling) (29) การปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโดยการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการสร้างแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับสูงมากขึ้นกว่าเดิมหลายเท่า ตัวอย่างเช่นพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับของแอนติบอดีชนิดหนึ่งได้ถึง 10 เท่า ทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับสูงถึง 10^{11} M^{-1} ซึ่งสูงกว่าค่าที่จะได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตด้วยวิธีการเดิม (คือ 10^{10} M^{-1}) (30-34) นอกจากการปรับปรุงคุณภาพในการจับแล้ว แอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นด้วยเทคโนโลยีเฟจยังสามารถใช้ในการเปลี่ยนคุณสมบัติอื่นๆ ของแอนติบอดีตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่นความ

สามารถในการทำงาน (function) ต่างๆ เช่นการกระตุ้น หรือยับยั้งการส่งสัญญาณภายในเซล (cell signaling) (35) นอกจากนั้นแล้วยังใช้ในการคัดเลือกแอนติบอดีที่ทนต่อสภาวะบางอย่างเช่น สภาวะกรด ด่าง หรือทนต่อเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteinase) หรือที่สภาวะ reducing รวมทั้งการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค (therapeutic use) หรือติดฉลาก (tag) เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ (36)

จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ชัดเจนว่าการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น มีประโยชน์มาก ดังจะได้สรุปไว้เป็นข้อๆดังนี้

1. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีฟาจ สะดวก และประหยัดกว่าการใช้เทคนิคดั้งเดิม เพราะใช้เวลาน้อยกว่า ใช้เงินน้อยกว่า ใช้แรงงานและความชำนาญน้อยกว่า และข้อสำคัญคือไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง
2. สามารถใช้กับแอนติเจนได้หลากหลายชนิดกว่า เพราะสามารถใช้กับแอนติเจนที่เป็นพิษต่อสัตว์ แอนติเจนที่คล้ายกับโปรตีนในสัตว์ทดลอง หรืออาจใช้เซลทั้งเซลเป็นแอนติเจนก็ได้ นอกจากนั้นแล้วยังสามารถใช้กับแอนติเจนที่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้ (nonimmunogenic antigen)
3. สามารถใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนจำนวนมาก ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในงานด้าน proteomics ในปัจจุบัน
4. สามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเหมือนของคน (humanized antibody) เพื่อใช้ในการรักษาโรค (therapeutic antibody)
5. สามารถปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามต้องการ เช่นมีความสามารถในการจับ หรือความจำเพาะเจาะจงสูงขึ้น หรือทนต่อสภาวะต่างๆ
6. สามารถนำไปผลิตเป็นจำนวนมากได้ง่าย ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยทั่วไป เพื่อใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

จากข้อดีทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นจึงเห็นได้ว่าเทคโนโลยีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยฟาจนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิจัยและพัฒนาของชาติ ถ้าสามารถผลิตคลังที่มีคุณภาพดีจริง ด้วยเหตุที่ในปัจจุบันไม่มีการนำคลังของฟาจที่แสดงโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจำหน่าย เพราะยังอยู่ในระหว่างการพัฒนาคลังให้มีคุณภาพดีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆด้วยเทคโนโลยีใหม่ๆ โดยทั่วไปผู้ที่ต้องการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีนี้จึงต้องสร้างคลังขึ้นมาเองซึ่งคลังแต่ละคลังก็มีความแตกต่างกันขึ้นกับวัตถุประสงค์การใช้งานและความรู้ความชำนาญของผู้สร้าง คลังเหล่านี้จึงถูกใช้อยู่ในวงจำกัดเท่านั้น ดังนั้นข้าพเจ้าจึงมีความต้องการที่จะสร้างคลังเพื่อเป็นแหล่งใหม่ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีขึ้นใช้ในประเทศ โดยข้าพเจ้าจะได้ใช้ประสบการณ์ในงานด้านเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีใหม่ทางการตัดต่อพันธุกรรม มาประยุกต์ใช้ เพื่อพัฒนาวิธีการสร้างคลังของฟาจที่แสดงโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณภาพสูง เหมาะแก่การใช้งานทางการตรวจวิเคราะห์โดยทั่วไป แนวทางการสร้างคลังที่ข้าพเจ้าจะใช้ในการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางที่ข้าพเจ้ามีความชำนาญและมีประสบการณ์มาก่อน

ดังจะอธิบายโดยละเอียดในส่วนระเบียบวิธีวิจัยต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก คือการพัฒนาเทคโนโลยี เพื่อทำการสร้างคลังของฟาจที่แสดงโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณภาพสูง เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีความสามารถในการมีอันตรกริยาสูงต่อแอนติเจนหลายประเภท เพื่อใช้ ในการวิจัยและพัฒนาภายในประเทศ วัตถุประสงค์ทั้งหมดของโครงการวิจัยนี้แสดงเป็นข้อๆตามลำดับความสำคัญได้ดังนี้

1. เพื่อสร้างคลังของฟาจที่แสดงโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีการใหม่จากวิธีการที่ใช้อยู่เดิม เป็นการสร้างเทคโนโลยีเพื่อการพึ่งตนเองและลดการนำเข้าจากต่างประเทศ
2. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมที่ใช้ในการสร้างคลังของฟาจที่มีขนาดใหญ่เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการสร้างคลังชนิดอื่นๆต่อไป
3. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการกำกับวิวัฒนาการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการสลับสับเปลี่ยน ดีเอ็นเอ (DNA shuffling) เพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพแอนติบอดีให้เป็นตามต้องการ ความรู้ที่ได้จากการปรับปรุงนี้จะสามารถประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพโปรตีนชนิดอื่นได้
4. เพื่อถ่ายทอดความรู้ให้แก่บุคลากรภายในประเทศ เช่นนักศึกษาบัณฑิตวิทยาลัย และผู้ช่วยวิจัย รวมทั้งนักวิจัยอื่นๆที่สนใจ
5. เพื่อผลิตผลงานตีพิมพ์เกี่ยวกับการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากฟาจลงในวารสารระดับนานาชาติ
6. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนวัว หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนอื่นที่น่าสนใจ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้คือ คือองค์ความรู้และผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้ในการวิจัยอื่นๆต่อไป ตามที่ได้กล่าวแล้วว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีที่ใช้กว้างขวางในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพหลายสาขา รวมทั้งการประยุกต์ใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ ทั้งนี้จึงเห็นได้ว่านอกจากจะได้ประโยชน์ที่เป็นรูปธรรมคือคลังของฟาจที่แสดงโมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้ว ประโยชน์ที่สำคัญอีกประการหนึ่งซึ่งเป็นนามธรรมที่เกิดขึ้น ก็คือการพัฒนาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมชั้นสูงเพื่อใช้ในการสร้างคลังที่มีความหลากหลายสูง และการปรับปรุงคุณภาพของยีนให้แสดงโปรตีนที่มีคุณสมบัติตามต้องการ

หน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนที่จะสามารถนำผลงานวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ คือห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพทั่วประเทศ ที่ต้องการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่สนใจ เพื่อใช้ในงานวิจัยขั้นพื้นฐานและการประยุกต์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ทั้งทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ อุตสาหกรรมการเกษตร และเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

เนื้อเรื่อง

การสร้างคลังแอนติบอดีบนผิวเฟจ

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้คิดค้นวิธีการสร้างคลังของเฟจที่แสดง antibody ของคน ที่มีโครงสร้างเป็น scFv และเป็นแบบ naive คือไม่เจาะจงต่อ antigen ใด โดยมีวัตถุประสงค์คือต้องการให้ครอบคลุม antigen ชนิดต่างๆให้มากที่สุด ดังนั้นจึงต้องใช้ B cell ของคนปกติเป็นต้นแบบในการสร้าง immunoglobulin gene :ซึ่งอาจเตรียมได้จาก ม้าม ไขกระดูก หรือเลือด โดยในโครงการวิจัยนี้ได้เลือกใช้ B-cell จากเลือด ของคนปรกติ เพราะหาได้ง่ายและสดวก โดยขั้นตอนการสร้างเริ่มตั้งแต่ การออกแบบเส้น oligonucleotides และเลือก vector ที่เหมาะสม แล้วทำการสกัด mRNA จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีเพื่อใช้เป็นต้นแบบ จากนั้นจึงทำการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของส่วน variable domain ของทั้ง heavy และ light chain ด้วยวิธีการ RT-PCR แล้วรวมกันเข้าเป็นชิ้น scFv โดยมีตัวเชื่อม (linker) ที่เหมาะสม หลังจากนั้นจึงทำการเชื่อม (ligate) ชิ้น DNA ของ scFv ที่ได้สร้างขึ้นเข้าไปใน vector แล้วนำไปใส่ใน electrocompetent *E. coli* จากนั้นทำการคำนวณขนาดของคลัง (library complexity หรือ library diversity) ที่ได้สร้างขึ้นซึ่งอยู่ในรูปของ bacteria ที่มี vector ที่ได้ตัดต่ออยู่ แล้วเก็บคลังของ antibody ที่อยู่ใน bacteria ไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ จากนั้นทำการสร้างเป็นคลังของฟาจที่แสดง scFv โดยการใช้ helper phage ช่วย แล้วเก็บคลังฟาจที่ได้สร้างขึ้นโดยการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย polyethylene glycol แล้วเก็บไว้ที่ -80 °ซ เช่นกัน ขั้นตอนทั้งหมดนี้สรุปได้ดังแผนผังใน**รูปที่ 1** รายละเอียดของแต่ละขั้นตอนในการสร้างคลังจะได้อธิบายเป็นข้อๆ ดังนี้

ขั้นที่ 1 การออกแบบ oligonucleotides สำหรับสร้าง variable domains

ในโครงการวิจัยนี้ได้ออกแบบ primer ที่ใช้ในการสร้างชิ้น variable domain ของ heavy และ light chain ให้มีส่วนของ restriction site (SfiI และ NotI) สำหรับโคลนเข้า vector ที่ได้สร้างขึ้นมา (pMod1) หรือส่วนที่จะใช้ในการเชื่อมต่อระหว่าง heavy และ light chain ที่ประกอบด้วย linker sequence ไว้ด้วยกันเลย ดังแสดงไว้ในแผนภาพการสร้างดัง**รูปที่ 2** วิธีการนี้ช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและสะดวกรวดเร็วกว่าวิธีการแบบเก่า ซึ่งต้องทำการเพิ่มจำนวน DNA ถึง 2 ครั้ง โดยลำดับของเบสของ primers ที่ใช้ในการสร้างคลังทั้งหมดแสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยมีลำดับของ amino acid ส่วน linker sequence คือ GGGGSGGGGSGGGGS

ขั้นที่ 2 การสกัด mRNA จาก B lymphocyte

แหล่งของ mRNA ในกรณีที่ต้องการสร้างเป็นคลัง antibody ของมนุษย์ เป็น mRNA ที่เตรียมได้จาก B lymphocyte ที่เอามาจากเลือด (peripheral blood) หรืออาจเป็นจากต่อมน้ำเหลืองอื่นๆ เช่น ต่อมทอนซิล หรือม้าม ถ้าสามารถหาได้ ในกรณีของคลังที่สร้างขึ้นในโครงการวิจัยนี้ ได้นำ B lymphocyte มาจากเลือดของผู้บริจาคเลือดให้กับสภากาชาดไทยในเขตจังหวัดนครราชสีมาซึ่งมีสุขภาพดีประมาณ 140 คน โดยมีขั้นตอนการสกัดดังนี้

1. เก็บส่วน buffy coat จากเลือดที่ถูกระงับการแข็งตัวด้วยสาร LCD โดยรวมกลุ่มเลือดเดียวกันไว้ด้วย

กัน

2. เจือจางส่วน buffy coat ที่รวบรวมมาได้ด้วย PBS ในปริมาณเท่าๆกัน
3. ใส่สารจากข้อ 1.2 จำนวน 20 มล ให้ลงเป็นชั้น (overlay) บน Ficoll Paque จำนวน 15 มล
4. ปั่นหลอดในข้อ 1.3 ที่ 400g เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อแยกเม็ดเลือดขาวออกจากเม็ดเลือดแดง จากนั้นทำการแยกส่วนเม็ดเลือดขาว (lymphocyte) ออกโดยการใช้ Pasteur pipette ดูดออกอย่างนุ่มนวล
5. เจือจาง lymphocyte ที่เตรียมได้ด้วย PBS ในปริมาณที่เท่ากัน แล้วปั่นแยกที่ 400g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างเอา platelets และ plasma protein ที่ปนมาออก
6. ดูดเอาของเหลวส่วนใสด้านบนออก แล้วใส่ PBS อีก 1 มล แล้วกระจายเซลล์ให้เข้ากันดี (resuspend) โดยการใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ จากนั้นแบ่งเซลล์ที่ได้ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มล ในปริมาณเท่าๆกัน
7. ปั่นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้ตกโดยการปั่นที่ความเร็วต่ำ (ประมาณ 2000g) จากนั้นดูดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนออก ในกรณีที่ไม่สามารถสกัดเป็น mRNA ได้ทันทีในขั้นต่อไป ให้เก็บไว้ที่ -70 °ซ
8. ทำการสกัด total RNA หรือ mRNA โดยในกรณีของ mRNA ใช้ชุดสกัดที่ซื้อมาจากบริษัท Qiagen หรือบริษัทอื่นที่เหมาะสม แล้วทำตามวิธีการสกัดตามที่บริษัทได้เขียนแนะนำไว้ ส่วนการสกัด total RNA ใช้วิธีการที่ใช้สาร trizol (Invitrogen) สกัดดังนี้

   8.1. ผสม B lymphocyte ที่เตรียมได้จากขั้นที่ 1.6 กับ trizol 1 มล ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มล จากนั้นบ่ม (incubate) ไว้ที่ 65°ซ เป็นเวลา 15 นาที โดยในระหว่างนั้นให้กลับหลอดขึ้นลงเป็น ระยะ ๆ

   8.2. เติม choloroform 0.2 มล แล้วผสมโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นปั่นลง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°ซ

      8.2.1. ดูดเอาส่วนที่เป็นชั้นน้ำ (aqueous phase) ด้านบนออก แล้วนำไปใส่ในหลอด microcentrifuge อันใหม่ซึ่งมีสาร RnaseOut (40 U/µl, Invitrogen) อยู่ 1 µl จากนั้นเติม isopropanol 0.5 มล เพื่อตกตะกอน RNA

      8.2.2. ทำการปั่นที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°ซ เพื่อปั่นแยกตะกอน RNA ให้ตกลงมา

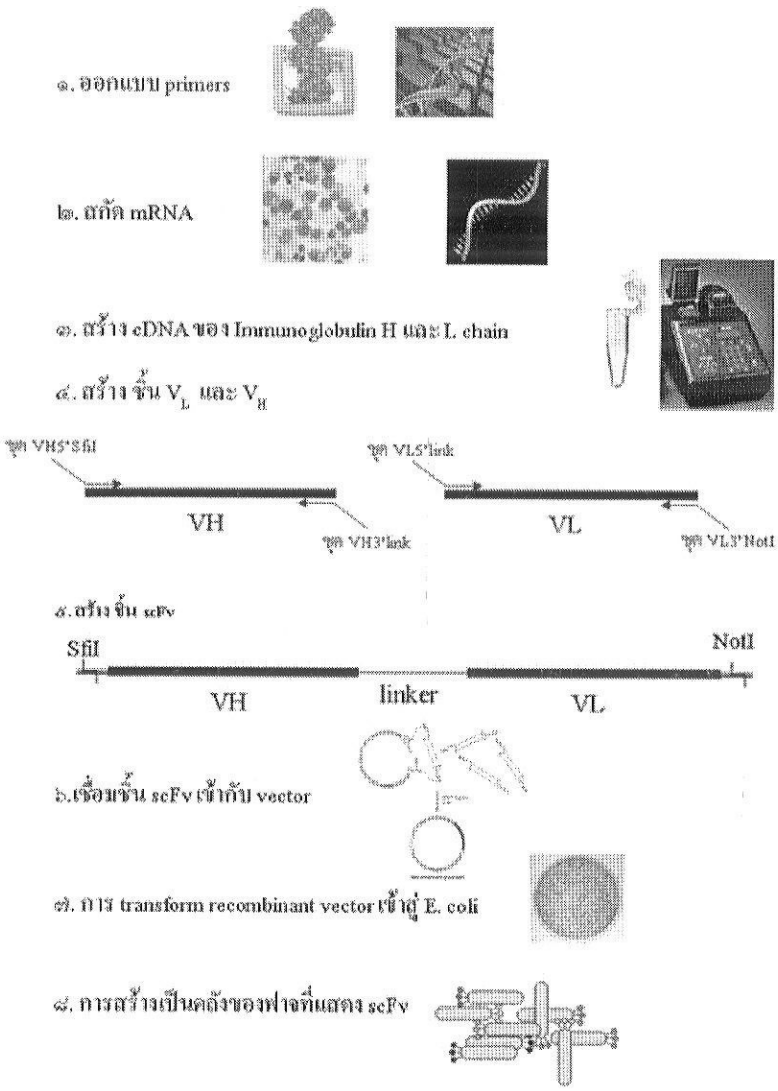
      8.2.3. ล้างตะกอน RNA โดยใส่ 75% ethanol ปริมาณ 0.5 มล แล้วปั่นที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°ซ

      8.2.4. เทส่วนใสด้านบนออก แล้วทิ้งตะกอน RNA ให้แห้งโดยการเปิดฝา แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที หรือจนกว่าจะแห้ง

      8.2.5. ละลายตะกอน total RNA ที่เตรียมได้ในน้ำสะอาดที่ปราศจาก DNase และ RNase และอาจใส่ RnaseOut (40 unit/100µl) ลงไปด้วยก็ได้

ทั้งนี้โดยก่อนจะทำการสกัด RNA จะต้องทำการเตรียมอุปกรณ์ และน้ำที่จะใช้ในการสกัดให้ปราศจาก เอนไซม์ RNase ก่อนโดยการใช้สาร diethlypyrocarbonate (DEPC) ตามคำแนะนำจากหนังสือ Molecular cloning ของ Sambrook และ Russell โดยการเตรียม DEPC-treated H_2O นั้นทำได้โดยการเติม ลงในน้ำให้ได้ปริมาณ 0.1% แล้วบ่มไว้ หรือใช้แช่อุปกรณ์ที่ 37 °ซ ข้ามคืน หรือที่ 65 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นทำการ autoclave เพื่อทำลาย DEPC ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง จึงต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง [110]

8.3. ตรวจ total RNA ที่เตรียมได้โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นนำ RNA ที่เตรียมได้ไปเป็นต้นแบบในการสร้าง cDNA ของ immunoglobulin gene ในขั้นที่ 3 ต่อไป ในกรณีที่ไม่สามารถทำได้ทันที ให้เก็บไว้ที่ -70 °ซ



รูปที่ 1 ขั้นตอนทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างคลังของฟาจที่แสดง monoclonal antibody

ขั้นตอนทั้งหมดในการสร้างคลังของฟาจที่แสดงโมโนโคล แอนติบอดีมีทั้งหมด 8 ขั้น ได้แก่ 1) การออกแบบ primers 2) การสกัด mRNA จาก B lymphocytes 3) การสร้างยีน Immunoglobulin ทั้ง heavy และ light chain 4) การสร้างชิ้น V_H และ V_L 5) การรวมชิ้นเพื่อสร้างเป็น scFv (re-assemble) 6) การเชื่อม scFv เข้ากับ vector 7) การ transform recombinant vector เข้าใน E. coli และ 8) การสร้างเป็นคลังของฟาจที่แสดงโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่สมบูรณ์

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการสร้างคลัง

ชุด VH5'SfiI

```
1. 5' cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG 3'
2. 5' cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG 3'
3. 5' cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG 3'
4. 5' cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG 3'
5. 5' cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG 3'
6. 5' cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC 3'
```

ชุด VH3'link

```
1. 5' acc aga gcc gcc gcc gcc gct acc acc acc acc TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC 3'
2. 5' acc aga gcc gcc gcc gcc gct acc acc acc acc TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC 3'
3. 5' acc aga gcc gcc gcc gcc gct acc acc acc acc TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC 3'
4. 5' acc aga gcc gcc gcc gcc gct acc acc acc acc TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC 3'
```

ชุด VL5'link

```
k1. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC 3'
k2. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC 3'
K3. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC 3'
K4. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC 3'
K5. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC 3'
K6. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC 3'

L1. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA 3'
L2. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC 3'
L3. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC 3'
L4. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CC 3'
L5. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC 3'
L6. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC 3'
L7. 5' agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc CAG GCT GTG CTC ACT CAG CCG TC 3'
```

ชุด VL3'NotI

```
k1. 5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC 3'
k2. 5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC 3'
K3. 5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC 3'
K4. 5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC 3'
K5. 5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC 3'

L1. 5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACC TAA AAC GGT GAG CTG GGT CCC 3'
L2. 5'           c tcg act tGC GGC CGC ACC TAG GAC GGT GAC CTT GGT CCC 3'
L3. 5'           c tcg act tGC GGC CGC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC 3'
```

ขั้นที่ 3 การสร้าง cDNA ของ immunoglobulin heavy chain และ light chain

หลังจากที่ได้ RNA ทั้งที่เป็น total RNA และ mRNA จากขั้นที่ 2 แล้ว ขั้นต่อไปคือการเปลี่ยนให้เป็น cDNA เพื่อที่จะสร้างเป็นชิ้น DNA ส่วน variable domain ของทั้ง heavy และ light chain (V_H และ V_L) ต่อไป วิธีการสร้างชิ้น cDNA จาก mRNA ทำได้ด้วยวิธีการ reverse transcription โดยใช้ primer 3 แบบคือ random hexamer, oligo dT, หรือ specific primer สำหรับ IgM หรือ IgG1 constant region ในกรณีที่เป็น heavy chain ส่วนในกรณีที่เป็น light chain ใช้ primer ที่จำเพาะกับ constant region ของ κ หรือ λ chain ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของ primers ใช้ในการสร้าง cDNA

ชื่อ	ลำดับเบส
Oligo dT_{18}	TTT TTT TTT TTT TTT TTT
Random hexamer	NNNNNN
HumanIgM	5' TGG AAG AGG CAC GTT GCT GGG CTT CTT 3'
HumanIgG1-4CH	5' GTC CAC CTT GGT GTT GCT GGG CTT 3'
Human κ	5' AGA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT 3'
Human λ	5' TGA AGA TTC TGT AGG GGC CAC TGT CTT 3'

จากผลการวิจัยในห้องปฏิบัติของข้าพเจ้า พบว่า เมื่อผสมระหว่าง random hexamer และ oligo dT จะให้ผลดีที่สุดดังนี้

ปฏิกิริยาที่ใช้ในการสร้าง cDNA คือ

Total RNA	10	µg
Oligo-dT_{18} primer	20	µM
Random hexamer primer	8	ng
dNTP	0.125	mM each
10x RT buffer (NEB)	1x	
MMuLV reverse transcriptase (NEB)	200	units
RNaseOut	160	units
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	100	µl

โดยก่อนที่จะเริ่มทำปฏิกิริยานั้นให้นำ RNA ไปให้ความร้อนที่ 90 °ซ เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยวางลงบนน้ำแข็งก่อน เพื่อทำลาย secondary structure ของ RNA จากนั้นทำปฏิกิริยาข้างต้นที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนที่ 90 °ซ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยนำหลอดไปใส่ในน้ำแข็ง เก็บ cDNA ไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ต่อในขั้นต่อไป ชิ้น cDNA ที่ได้สร้างขึ้นเสร็จแล้วนี้ไม่ควรเก็บไว้นาน

ขั้นที่ 4 การสร้างชิ้น V_H และ V_L ด้วยวิธี PCR

หลังจากที่สร้างชิ้น cDNA ได้ในขั้นที่แล้ว ในขั้นต่อไปคือการสังเคราะห์เป็น ชิ้น DNA ของ variable domain ของทั้ง heavy และ light chain ด้วยวิธี PCR โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

cDNA จากปฏิกิริยาในขั้นที่ 3	2.5-5	µl
Forward (5') primer	1	µM
Reverse (3') primer	1	µM

dNTPs	200	µM each
10x *Taq* Buffer	1x	
Taq DNA polymerase (NEB)	2.5	units
Pfu DNA polymerase (Promega)	1.25	units
BSA	0.1	mg/ml
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	50	µl

โดยต้องทำการจับคู่ primers ที่ใช้ในการสังเคราะห์ DNA ทีละคู่ทุกคู่ ดังนั้นจึงต้องทำปฏิกิริยาทั้งหมด (6x4+6x5+7x3) = 76 ครั้ง

ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง thermo cycler โดยตั้งค่าดังนี้

Pre-denaturing	94°C	1 min	1 cycle
Amplification			
Denaturing	94°C	1 min	35 cycle
Annealing	57-65°C	1 min	
Extension	72°C	2 min	
Final Extension	72°C	10 min	1 cycle

เมื่อทำการสังเคราะห์ DNA แล้วต้องทำการตรวจ DNA ที่สังเคราะห์ได้โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 2% agarose gel (agarose gel electrophoresis) โดย DNA ส่วน V_H จะมีขนาดประมาณ 340 bp ส่วน DNA ส่วน V_L จะมีขนาดประมาณ 325 bp หลังจากนั้นนำ PCR products ที่ได้จากปฏิกิริยาในส่วน V_H และ V_L มาเก็บรวมไว้ด้วยกัน แล้วทำการสกัดให้บริสุทธิ์จาก agarose gel (gel purification) โดยใช้วิธีการแยก DNA ผ่าน low melting agarose gel แล้วตัดชิ้น gel ที่มี DNA อยู่แล้วนำไปละลายใน elution buffer (20MM Tris pH 8. 1mM EDTA pH 8.0) จากนั้นทำการสกัด DNA ให้สะอาดด้วยการสกัดด้วย phenol/chloroform แล้ว นำไปตกตะกอนด้วย 10M ammonium acetate และ absolute ethanol ตามวิธีการมาตรฐานทางอณูชีววิทยาทั่วไป [110] จากนั้นเก็บ DNA ที่สังเคราะห์ได้นี้ไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ในขั้นต่อไป

ขั้นที่ 5 การรวมชิ้น V_H และ V_L เพื่อสร้างเป็น scFv (Re-assemble)

หลังจากที่ได้สังเคราะห์ DNA สำหรับ V_H และ V_L ได้ทั้งหมดแล้ว ขั้นต่อไปคือการนำชิ้น DNA ทั้งสองส่วนมารวมกันเข้าด้วยวิธี PCR ให้ได้เป็นชิ้น scFv ที่มีตำแหน่งสำหรับการตัดด้วย SfiI ทาง 5' และ NotI ทาง 3' และเชื่อมกันตรงกลางด้วย linker sequence โดยใช้ปฏิกิริยาเป็น 2 ขั้น ขั้นแรกเป็นการ re-assemble โดยทำการรวมชิ้น VH และ VL ในปฏิกิริยาที่ปราศจาก primer จากนั้นทำการสร้างเป็นชิ้น scFv ที่สมบูรณ์โดยปฏิกิริยา PCR ที่มี primers อยู่เรียกปฏิกิริยาชนิดนี้ว่า pull-through โดยชุดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา pull-through แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ pull-through primers

ชื่อ	ลำดับเบส
PTfw1	5'CCT TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC 3'
PTrv1	5'CAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC 3'
PTfw2	5'CCT TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC 3'
PTrv2	5'CAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG 3'

ปฏิกิริยาขั้นแรก (Assemble)

V_H and V_L ในปริมาณที่เท่ากัน	600-800	ng
dNTPs	200	µM
10x *Pfu* Buffer	1x	
Pfu DNA polymerase (Promega)	1.25	units
BSA	0.1	mg/ml
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	50	µl

โดยทำปฏิกิริยา assemble ในเครื่อง thermo cycler โดยตั้งค่าดังนี้

Denaturing	94°C	45 sec	} 5 cycle
Annealing	60°C	50 sec	
Extension	72°C	1 min	

ปฏิกิริยาขั้นที่2 (Pull-through)

Assembled products จากขั้นแรก	1	µl
PTfw (5') primer	1	µM
PTrv (3') primer	1	µM
dNTPs	200	µM
10x *Pfu* Buffer	1x	
Pfu DNA polymerase (Promega)	1.25	units
BSA	0.1	mg/ml
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	100	µl

ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง thermo cycler โดยตั้งค่าดังนี้

Denaturing	94°C	1 min	} 30 cycle
Annealing	60°C	1 min	
Extension	72°C	2 min	

Final Extension 72°C 10 min 1 cycle

หลังจากที่ทำปฏิกิริยาเสร็จแล้ว ต้องทำการตรวจ DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน agarose gel (agarose gel electrophoresis) โดยต้องทำปฏิกิริยา pull-through ทั้งหมด 5 ครั้งให้ได้ปริมาตรรวม 500 µl จากนั้นทำการลดปริมาณของ PCR products ที่เตรียมได้โดยการตกตะกอนด้วย Sodium acetate และ absolute ethanol ให้ได้ปริมาณ 150 µl ก่อน [110] จึงนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดจาก agarose gel โดยใช้ชุดสกัดจากบริษัท promega ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 µl เก็บ DNA ที่เตรียมได้จากขั้นนี้ไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ในขั้นต่อไป

ขั้นที่ 6 การเชื่อม scFv เข้ากับ vector (ligation)

ขั้นต่อไปหลังจากที่สร้างชิ้น scFv ได้แล้วคือการ clone เข้า vector เพื่อใช้ในการแสดงบนผิวฟาจ โดยให้เชื่อมอยู่กับโปรตีนปกคลุมผิวชนิดรอง (pIII) โดย vector ที่ใช้เป็นประเภท phagemid ซึ่งพัฒนามาจาก vector pCANTAB หรือ pHEN [41] ส่วน phagemid ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้านั้นได้สร้างขึ้นมาเองโดยการพัฒนาต่อมาจาก vector p3.2 (Maxim Biotech) ตั้งชื่อว่า **pMod1** ส่วนประกอบของ vector แสดงดัง**รูปที่ 2** ขั้นตอนการเชื่อม scFv insert เข้ากับ vector เริ่มจากการตัด ทั้ง insert และ vector ด้วย restriction enzyme SfiI และ NotI โดยต้องตัดแยกกันตามลำดับทีละครั้ง (serial digestion) โดยต้องใช้ vector ในปริมาณสูงคือประมาณ 20 µg ซึ่งควรทำการตัด phosphate group ออกจากปลาย 5' ของ vector ที่ได้รับการตัดแล้วด้วยเพื่อให้มี back ground หรือ vector ที่ไม่ต้องการให้น้อยที่สุด จากนั้นจึงทำการ ligate เข้ากับ vector ปฏิกิริยาต่างๆที่ใช้ในขั้นตอนนี้คือ

การตัด vector ด้วยเอนไซม์ SfiI

Vector	20	µg
10xBuffer	50	µl
100xBSA	5	µl
SfiI	8000	unit
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	500	µl

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำ DNA ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำความสะอาด DNA โดยให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 400 µl

การตัด insert ด้วยเอนไซม์ SfiI

Insert	7	µg
10xBuffer	10	µl
100xBSA	1	µl
*Sfi*I	8000	unit
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	100	µl

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำ DNA ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำความสะอาด DNA โดยให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 µl

การตัด vector ด้วยเอนไซม์ NotI

Vector จากขั้นก่อน	400	µl
10xBuffer	50	µl
100xBSA	5	µl
NotI	2000	unit
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	500	µl

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

การตัดกลุ่ม 5' phosphate จาก Vector

Reaction หลังจากด้วย NotI ในขั้นที่แล้ว	500	µl
Calf intestinal phosphatase (CIP, NEB)	3	µl

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการทำลายเอนไซม์ด้วยความร้อนที่ 85°ซ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำให้ DNA เข้มข้นขึ้นด้วยการตกตะกอนด้วย 3M Sodium acetate และ absolute ethanol ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 150-200 µl [110]

การตัด insert ด้วยเอนไซม์ NoI

Insert จากขั้นก่อน	50	µl
10xBuffer	6	µl
100xBSA	0.6	µl
NotI	2000	unit
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	60	µl

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

การทำ insert และ vector ที่ได้ถูกตัดด้วยเอนไซม์แล้วให้บริสุทธิ์

นำ insert และ vector ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์แล้วมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี agarose gel purification โดยใช้ชุดทำความสะอาด Wizard clean up kit (promega) โดยสกัดให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 120 µl และ 50 µl สำหรับ vector และ insert ตามลำดับ หลังจากนั้นเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก นั่นคือการ ligation DNA กับ insert เข้าด้วยกัน ซึ่งจำเป็นต้องมีปริมาณ vector และ insert ที่มากพอ จากผลการวิจัยในโครงการนี้พบว่าปฏิกิริยาที่ได้ผลดีในขั้นตอนนี้ต้องมี vector ประมาณ 2-3 µg และมีอัตราส่วนระหว่าง vector : insert = 1:3 การใช้ vector ในปริมาณเท่านี้ ทำให้ได้คลังที่มีขนาดความหลากหลาย = 1.5×10^8 ถ้าต้องการให้ได้คลังที่มี

ขนาดใหญ่กว่านี้ ต้องเพิ่มปริมาณ vector เป็น 20-200 µg [140]

นอกจากปฏิกิริยา ligation แล้ว ยังจำเป็นต้องทำการทดลองควบคุมการเชื่อมต่อ (ligation control) คือ การทำปฏิกิริยา ligation ที่ปราศจาก insert เพื่อประมาณ background ของคลังด้วย

ปฏิกิริยาการเชื่อม DNA เข้ากับ vector

DNA insert		2.8	µg
Vector		5.5	µg
10xBuffer		20	µl
T4 DNA ligase (NEB)	6000	unit	
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	200	µl	

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 16 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้ DNA เข้มข้น และกำจัดเกลือโดย การตกตะกอนด้วย 3M Sodium acetate pH5.2 และ absolute ethanol [110] แล้วละลายในน้ำปริมาตร 40 µl แล้ว นำ ligated products ที่ได้ในขั้นนี้ไป transform เข้า *E. coli* ในขั้นที่ 7 ต่อไป

ขั้นที่ 7 การ transform recombinant vector เข้าสู่ E. coli

หลังจากที่ได้ทำการเชื่อม scFv insert เข้ากับ vector แล้ว ขั้นต่อไปคือการนำ recombinant phagemid ที่มี scFv อยู่ใส่เข้าไปใน *E. coli* TG1 เพื่อสร้างเป็นคลังของ scFv ที่อยู่ในรูปของแบคทีเรีย ขั้นตอนนี้ถือเป็น ขั้นสำคัญในการกำหนด diversity/complexity หรือขนาดของคลัง วิธีการที่ใช้ในการนำ DNA เข้าสู่เซลล์ แบคทีเรียคือวิธีการ electroporation ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องสร้าง electro competent cells ที่มีประสิทธิภาพ สูงที่สุด วิธีการสร้าง electrocompetent cell ที่ได้พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้า และพบว่ามี ประสิทธิภาพดีในการสร้างเป็น competent cells ที่มีประสิทธิภาพ (efficiency) สูงถึง 10^{11} cells/µg DNA เป็น ดังนี้

การทำ electrocompetent cells

1. เขี่ยโคโลนีของ *E. coli* มา 1 โคโลนี แล้วนำไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่ 37°ซ หนึ่งคืน
2. นำแบคทีเรียที่เลี้ยงได้มา 500 µl แล้วใส่ลงใน flask ที่มี SOB medium ปริมาณ 50 มล
3. นำไปบ่มที่ 37°ซ โดยการเขย่าไปด้วยที่ความเร็ว 200 rpm จนแบคทีเรียโตได้ค่า $OD_{600} = 0.6$ (สำหรับ *E. coli* TG1 ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่งโมง)
4. นำ flask ไปแช่บนน้ำแข็ง 10 นาที โดยเขย่าเบาๆไปด้วยเป็นครั้งคราว
5. เทเซลล์ลงในหลอด centrifuge ที่เย็นจัด แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3500g เป็นเวลา 20 นาที
6. เทของเหลวใสด้านบนออก แล้วค่อยๆผสมเซลล์ใน น้ำ DI ที่เย็นจัดปริมาณ 50 มล อย่างเบาๆ ให้เข้ากันดี
7. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3500g เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสด้านบนออก

8. ค่อยๆผสมเซลล์ (resuspend) ใน น้ำ DI ที่เย็นจัดปริมาณ 25 มล อย่างเบาๆ ให้เข้ากันดี แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3500g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนออก (ข้อนี้ไม่จำเป็นสำหรับ *E. coli* TG1 อาจข้ามไปได้)
9. ค่อยๆผสมเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่เย็นจัดปริมาณ 4 มล อย่างเบาๆ ให้เข้ากันดี แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3500xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนออก
10. ค่อยๆผสมเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่เย็นจัดปริมาณ 150 ml อย่างเบาๆ ให้เข้ากันดี แล้วนำไปเก็บไว้ในหลอด microcentrifuge tube ที่เย็นจัดหลอดละ 50 µl

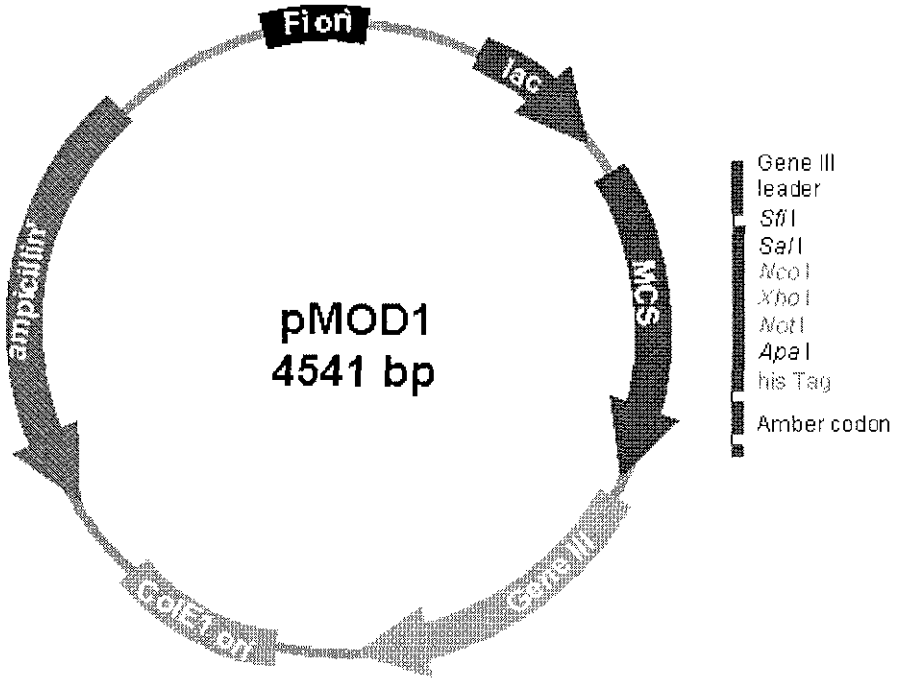
หลังจากที่ได้สร้าง electro competent cells แล้ว นำ cells ที่ได้สร้างขึ้นมาใหม่ (fresh) มาใช้ในการ transformation ทันที เพื่อให้ได้คลังที่มีคุณภาพดีที่สุด โดยใช้วิธีการดังนี้

Ligated product	20	µl
Electro competent cells	300	µl

ทำการ transform โดยใช้เครื่อง electroporator (Biorad) 2 ครั้ง โดยตั้งค่าที่ 2500 volt และ 4.5 msec ทำการ transform ทั้งหมด 2 ครั้ง หลังจากผ่านด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วเติม SOC media ปริมาณ 3 มล ลงทันทีแล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อที่ 37 °ซ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (TYE plate) ขนาด 15 ซม ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 1% glucose จำนวน 8 จาน ที่ 37°ซ ข้ามคืน

ในขั้นนี้ต้องทำการคำนวณความหลากหลาย (diversity/complexity) หรือขนาดของคลัง(complexity) โดยการนับจำนวนของ recombinant bacteria ที่โตบนจานเลี้ยง LB agar ที่มี ampicillin 100 µg/ml อยู่ด้วย โดยการเจือจางเซลล์ทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ประมาณ 4-5 ครั้งก่อนที่จะนำไปเกลี่ย (spread) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นในวันรุ่งขึ้นนับจำนวน colony แล้วคำนวณหาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดในคลัง โดยนอกจากจะต้องคำนวณจำนวนของ bacterial colony ที่ได้จากการ transform ligated phagemids แล้ว ยังต้องคำนวณหา background ซึ่งเป็นจำนวนของ bacteria ที่ได้จากการ transform ด้วย ปฏิกิริยา ligation ที่เป็นตัวควบคุม (control) ซึ่งค่า background นี้จะใช้ในการคำนวณหาขนาดของคลังที่แท้จริง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วค่า background ไม่ควรเกิน 1 %

หลังจากที่ได้คลังของ bacteria ที่มี scFv แล้ว ทำการเก็บคลังส่วนหนึ่งไว้ที่ -80 °ซ โดยการขูดเซลล์ (scrape) ออกจากจานเลี้ยงเชื้อมารวมกัน ใน 20% glycerol ปริมาณ 8 มล ส่วนคลังของแบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งนำมาสร้างเป็นคลังของฟาจในขั้นที่ 8 ต่อไป



รูปที่ 2 โครงสร้างของ vector pMod1

pMod1 ซึ่งเป็น phagemid ที่ได้สร้างขึ้นใหม่เพื่อใช้ในการสร้างคลังในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้า ได้รับการดัดแปลงมาจาก p3.2 ซึ่งมีต้นแบบมาจาก pHEN ส่วน multiple cloning site ได้รับการพัฒนาให้มีตำแหน่งสำหรับการตัดด้วย restriction enzymes 6 ชนิด และเชื่อมอยู่กับ 6xhistidine ซึ่งเป็นฉลาก (tag) ติดอยู่ที่ส่วนท้ายของโปรตีนที่ต้องการแสดงเพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ affinity chromatography ในส่วนต่อจาก DNA สำหรับ 6xhis tag มี amber stop codon ซึ่งจะถูกอ่านเป็น กรดอะมิโน glutamic acid ในแบคทีเรีย TG1 ทำให้ในแบคทีเรียประเภทนี้ จะผลิตโปรตีนที่ต้องการแสดงเชื่อมอยู่กับโปรตีน pIII ซึ่งเป็นโปรตีนปกคลุมผิวชนิดรองของฟาจ การแสดงออกของยีนถูกควบคุมโดย lac promoter จึงสามารถถูกชักนำให้แสดงโปรตีนเป็นจำนวนมากได้ด้วย IPTG phagemid นี้มียีนต้าน ampicillin อยู่เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มี phagemid อยู่ ในการสร้างเป็นคลังเพื่อการแสดงชิ้น scFv โดยใช้ phagemid นี้ จะทำการโคลนเข้าที่ตำแหน่งที่ถูกตัดด้วย *Sfi*I และ *Not*I

ขั้นที่ 8 การสร้างเป็นคลังของฟาจที่แสดง scFv (Rescuing phagemid library)

ขั้นสุดท้ายของการสร้างคลังคือการสร้างให้เป็นคลังของตัวฟาจที่แสดงชิ้น scFv ที่มีความสามารถในการจับกับ antigen ได้ต่างๆกัน โดยการนำแบคทีเรียที่มีคลังของฟาจที่ได้สร้างขึ้นในขั้นที่ 7 มา infect ด้วยฟาจตัวช่วย หรือ helper phage (หมายถึงการให้ helper phage เข้าไปเจริญในแบคทีเรียเหล่านี้โดยการส่งผ่าน DNA เข้าไป) ซึ่ง helper phage ที่เข้าไป infect แบคทีเรียเหล่านี้จะสร้าง โปรตีนที่ใช้ในการสร้างเป็นตัวฟาจทั้ง 11 ชนิดภายในแบคทีเรีย (ขั้นตอนการสร้างเป็น recombinant phage แสดงดังรูปที่ 3.3 ด้านบน) ซึ่งถ้าเลือกใช้ helper phage ที่เหมาะสมเช่นมีความบกพร่องในการจำลองตัวของ DNA ก็จะทำให้สามารถสร้างเป็นคลังของฟาจที่ไม่มี หรือมี helper phage ปนเปื้อนอยู่ให้น้อยที่สุด helper phage ที่ใช้ในการสร้างคลังในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้าคือ M13 K07 ซึ่งมีความบกพร่องในการจำลองตัวของ DNA และ KM13 ซึ่งมีตำแหน่งที่สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ trypsin บนโปรตีน pIII หลังจากที่สร้างเป็นตัวฟาจแล้ว ขั้นต่อไปคือการสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย PEG เพื่อสร้างเป็นคลังของฟาจที่สมบูรณ์ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การสร้างเป็นตัวฟาจ

1. นำคลังของแบคทีเรียจาก glycerol stock ที่เตรียมได้ในขั้นที่ 7 มาประมาณ 10^{9-10} ตัว (10 เท่าของ diversity ของคลังที่ต้องการ) โดยวิธีการคำนวณจำนวนแบคทีเรียทำได้โดยการอ่านค่า OD_{600} โดยค่า $OD_{600} = 1$ จะมีเซลล์ประมาณ $8x10^8$ เซลล์ โดยในการคำนวณต้องประมาณว่ามีเซลล์ที่มีชีวิตเป็นสัดส่วนอยู่เท่าไหร่ เพราะการคิดค่า OD_{600} นั้นจะรวมทั้งเซลล์ ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว
2. นำเซลล์แบคทีเรียไปเลี้ยงใน 2xYT ที่มี ampicillin 100 µg/ml และ 2% glucose อยู่ จำนวน 50 มล โดยทำการเลี้ยงใน flask ขนาด 250 มล
3. เลี้ยงเซลล์ที่ 30 °ซ จนเซลล์อยู่ในสภาวะ log phase คือมีค่า $OD_{600} = 0.5$
4. เติม helper phage จำนวน $2x10^{10}$ pfu แล้วบ่มไว้ที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน helper phage ที่เติมนี้จะทำให้มีอัตราส่วนระหว่าง helper phage และ bacteria เป็น 1:1
5. ปั่นเซลล์ลงมา โดยการ centrifuge ที่ 3000g เป็นเวลา 10 นาที แล้ว resuspend ใน 2xTY ที่มี ampicillin 100 µg/ml และ kanamycin 50 µg/ml อยู่ ปริมาณ 500 มล ซึ่งบรรจุอยู่ใน flask ขนาด 2 ลิตร ขั้นตอนนี้เป็นการชักนำให้เกิดการสร้าง scFv บนผิวฟาจโดยการกำจัด glucose ออกไป
6. ทำการเลี้ยงเซลล์ที่ 30 °ซ ข้ามคืนโดยเขย่าอย่างแรงไปด้วย ฟาจจะออกมาอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปั่นเซลล์แบคทีเรียให้ตกตะกอนแล้วเก็บ supernatant ส่วนใสด้านบนที่มีฟาจ อยู่มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

การสกัดฟาจให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย PEG

7. เติม 20% PEG, 2.5 M NaCl ปริมาณ 1/5 ของ ปริมาณ supernatant ที่เตรียมได้ในขั้นที่ 6
8. ตั้งทิ้งไว้ที่ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที
9. เก็บตะกอนของฟาจโดยการ centrifuge ที่ 4000g เป็นเวลา 10 นาที
10. ทำการ resuspend ใน PBS หรือ TE ในปริมาณ 1/100 เท่าของปริมาณเริ่มต้น
11. กำจัดเศษเซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาทิ้งโดยการปั่นแยกด้วย microcentrifuge

หลังจากที่ได้คลังของฟาจที่บริสุทธิ์แล้ว ควรคำนวณหาจำนวนของฟาจในคลัง (titer) ด้วยวิธีการดังนี้

นำคลังของฟาจมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-10} จากนั้นผสมฟาจที่ความเจือจาง 10^{-8}, 10^{-9} และ 10^{-10} จำนวน 10 มล กับ เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TG1 ที่กำลังโตอยู่ในช่วง log phase ใน media 2xYT จำนวน 1.75 ml (ถ้าไม่มีแบคทีเรียที่อยู่ในช่วง log phase ให้เจือจาง overnight culture ของ bacterial 100 เท่า แล้วใช้แทน) จากนั้นทำการบ่มโดยตั้งไว้นิ่งๆที่อุณหภูมิ 37 °ซ เพื่อให้ฟาจ infect แบคทีเรีย จากนั้นทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ถูก infect ด้วยฟาจ บนจานเลี้ยงเชื้อ TYE agar plate ที่มี 100% ampicillin และ 1% glucose โดยปั่นแยกเซลล์ที่ได้ให้ตกลงมาที่ความเร็วประมาณ 3000g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท media ทิ้งให้เหลือประมาณ 100 µl แล้วเกลี่ย (spread) ทั้งหมดลงบนจานเลี้ยงเชื้อ (หรืออาจทำการเจือจางเซลล์ที่ละ 10 เท่าก่อนที่จะทำการ spread เชื้อก็ได้) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°ซ ข้ามคืน แล้วนับจำนวนแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว (single colony) ในวันรุ่งขึ้น เพื่อให้สามารถคำนวณจำนวนของ ฟาจที่มีในคลังได้ จากผลการวิจัยพบว่าคลังที่ได้สร้างขึ้นมีค่า titer ประมาณ $1.0x10^{13}$

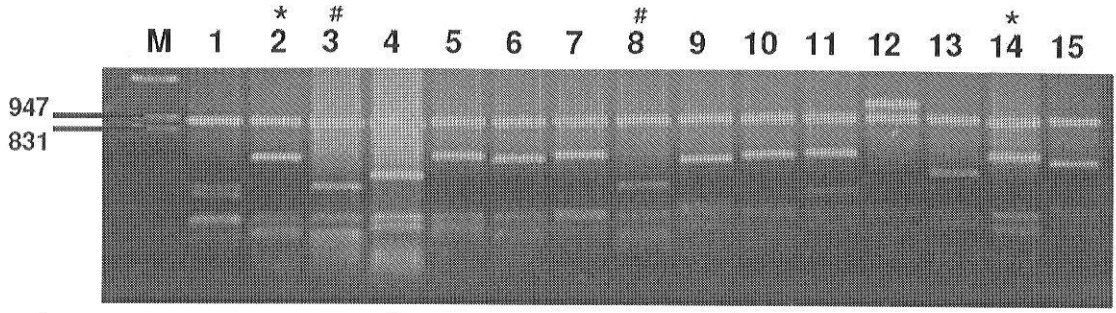
จากนั้นเก็บคลังของฟาจที่ได้สร้างขึ้นนี้ไว้ที่ -80°ซ ซึ่งพร้อมที่จะนำไปใช้ในการคัดหา monoclonal antibody ที่ต้องการ ดังจะได้อธิบายต่อไป

หมายเหตุ ผู้วิจัยได้ตั้งชื่อคลังของเฟจที่ได้สร้างขึ้นจากโครงการวิจัยนี้ว่าคลัง "**ย่าโม๑**" หรือ "**Yamo1**" เพื่อเป็นการให้รำลึกถึงท้าวสุรนารี ผู้เป็นวีรสตรีที่เป็นที่เคารพรักและภาคภูมิใจของชาวจังหวัดนครราชสีมา

การตรวจสอบคุณภาพของคลัง

เกณฑ์ที่สำคัญในการประเมินคุณภาพของคลังนั้นคือขนาดและความหลากหลาย ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการประเมินความหลากหลายของคลังโดยการสุ่มตัวอย่างฟาจจากคลัง เพื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีการ 2 วิธีคือ

1. การใช้วิธีการ Fingerprinting ซึ่งเป็นการทดสอบด้วยการเพิ่มจำนวนยีนส่วน scFv จากฟาจที่สุ่มขึ้นมา 15 ตัว ด้วยวิธีการ PCR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*N1 เพื่อดูลักษณะแถบ DNA ที่เกิดขึ้น ผลจากการทดลองพบว่า มีแถบที่แตกต่างกันทั้งหมด 13 แบบ ซึ่งพอจะบ่งชี้ได้ว่าคลังที่ได้สร้างขึ้นมานี้มีความหลากหลายสูงดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 3 แสดงรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากการตัดยีน scFv จากฟาจที่เลือกมาแบบสุ่มจำนวน 15 ตัว ซึ่งถูกเพิ่มจำนวนขึ้นด้วยวิธีการ PCR แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*N1 เครื่องหมาย # และ * แสดงรูปแบบ DNA ที่เหมือนกัน

*คัดมาจาก Pansri P, Jaruseranee N, Rangnoi K, Kristensen P, Yamabhai M. **A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens**. BMC Biotechnol. 2009 ; 96.

2. การทำการวิเคราะห์ลำดับเส้น DNA จากยีน scFv ของฟาจที่เลือกมาแบบสุ่มจำนวน 10 ตัว ด้วยวิธีการ automated DNA sequencing แล้วทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNA Plot และ Ig Blast ผลการวิเคราะห์พบว่าไม่มีลำดับกรดอะมิโนของแอนติบอดีตัวใดซ้ำกันเลย แม้ว่ารูปแบบ fingerprinting จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการแรกจะเหมือนกัน ซึ่งทำให้สรุปได้ว่าความหลากหลายของคลังที่ได้สร้างขึ้นมานี้สูงมาก รายละเอียดผลการวิเคราะห์สามารถหาดูได้จากตารางในภาคผนวก

การคัดเลือกโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากคลัง (BIO-PANNING)

หลักการคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังใช้หลักการ affinity selection คือการคัดเลือกความสามารถในการจับกับเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง วิธีการโดยทั่วไปนั้นจะทำการคัดเลือกฟาจใน immunotube ซึ่งมีความสามารถในการจับกับ antigen โดยเฉพาะโปรตีนได้ดี อย่างไรก็ตามข้อเสียของวิธีนี้คือต้องใช้ antigen เป็นจำนวนมากถึง 4 มล ในกรณีที่หา antigen ได้ยากจึงอาจมีปัญหา [38,41] ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการขึ้นมาใหม่ โดยทำการคัดเลือกในจาน microtiter plate หรือจาน ELISA แทน วิธีนี้ทำให้ลดปริมาณ antigen ที่ใช้ลงได้ถึง 20 เท่า และได้ผลดีเท่าๆ กับการใช้ immunotube โดยทั่วไปเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการคัดเลือกฟาจคือ ประมาณ 1-2 อาทิตย์ ขึ้นอยู่กับว่าจะทำการคัดเลือกกี่รอบ การคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังของฟาจ ซึ่งสร้างจาก phagemid จะใช้เวลานานกว่าการคัดเลือกจากคลังของ peptide ซึ่งสร้างจาก M13 vector เล็กน้อยทั้งนี้เป็นเพราะต้องเพิ่มขั้นตอนการสร้างเป็นตัวฟาจโดยอาศัย helper phage ซึ่งการที่จะทราบว่าควรจะต้องทำการคัดเลือกกี่รอบนั้นไม่สามารถกำหนดได้แน่นอน เพราะขึ้นกับชนิดของ antigen ผู้วิจัยจึงต้องลองทำดู วิธีการที่จะได้อธิบายนี้เป็นวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นมาเองในห้องปฏิบัติการการของข้าพเจ้าเพื่อใช้ในการคัดหา antibody จากคลังที่ได้สร้างขึ้นมาเอง วิธีการนี้มีประสิทธิภาพดี และมีหลักการเหมือนวิธีการอื่นโดยทั่วไปแต่ประหยัด antigen กว่า โดยการอธิบายวิธีการการคัดเลือก monoclonal antibody จากคลังนั้นจะได้อธิบายวิธีอย่างยาวคือการคัดเลือก 2-3 รอบ แต่จากผลการวิจัยพบว่า

สำหรับคลังย่าโม๑ ที่ได้สร้างขึ้นมาในโครงการวิจัยนี้สามารถลดเวลาการคัดหาฟาจที่จับจำเพาะลงโดยทำการคัดเลือกเพียง 1 รอบ

ขั้นที่ 1 การตรึง antigen เป้าหมาย

1.1 ใส่ antigen จำนวน 1-100 µg [40-400 µg] ที่ละลายอยู่ใน 1xPBS หรือ 100mM NaHCO3 ปริมาณ 100 µl [4 ml] ลงในหลุมของจาน ELISA ชนิด high-binding capacity (Maxisorb) [Nunc maxisorb immunotube]

1.2 ปิดปากหลุมด้วยเทปใส หรือ plastic wrap [ปิดฝาด้วยจุกที่มากับ immunotube] แล้วเก็บไว้ที่ 4°ซ เป็นเวลา 1 คืน

ขั้นที่ 2 การคัดเลือกรอบแรก

2.1 ล้างหลุม 3 ครั้งด้วย PBS

2.2 เติม 2% MPBS (2% Non-fat dried milk in PBS) ปริมาณ 200-250 µl [4 ml] ปิดปากหลุม [ปิดฝาด้วยจุกที่มากับ immunotube] แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.3 ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS

2.4 เติมคลังของฟาจปริมาณ 10^{10} ที่เจือจางอยู่ใน 2%MPBS ปริมาณ 200 µl [3.9 ml] ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง [ในกรณีของ immunotube ให้ปิดฝาด้วยจุกแล้วหมุน tube เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 1 ชั่วโมง]

2.5 เทสารทิ้ง แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.1% Tween20) 3-30 รอบ แล้วอาจล้างต่อด้วย PBS อีก 3-30 รอบ ในระหว่างแต่ละรอบที่ล้างอาจแช่และเขย่าก่อนเป็นเวลา 5 นาที

2.6 ทำการสกัด (elute) ฟาจที่จับกับ antigen โดยใส่ trypsin buffer ปริมาณ 50 µl [500 µl] ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 50mM glycine-HCl pH 2.0 ปริมาณ 50 µl [500 µl] แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที

2.7 ทำให้สารสกัดเป็นกลาง (neutralize) โดยการเติม Neutralization solution (200 mM $NaHPO_4$, pH 7.5) จำนวน 100 µl [1 ml]

2.8 เก็บฟาจที่ elute ได้ครึ่งหนึ่งไว้ที่ 4°ซ ส่วนอีกครึ่งหนึ่งเอาไปใส่ลงในหลอดที่มีแบคทีเรีย *E. coli* TG1 ที่กำลังโตอยู่ในช่วง log phase ใน media 2xYT จำนวน 1.75 ml (ถ้าไม่มีแบคทีเรียที่อยู่ในช่วง log phase ให้เจือจาง overnight culture ของ bacterial 100 เท่า แล้วใช้แทน) จากนั้นทำการบ่มโดยตั้งไว้นิ่งๆที่อุณหภูมิ 37 °ซ เพื่อให้ฟาจ infect แบคทีเรีย

2.9 ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ถูก infect ด้วยฟาจที่ได้จากการคัดเลือกในรอบที่ 1 บนจานเลี้ยงเชื้อ TYE agar plate ที่มี 100% ampicillin และ 1% glucose โดยปั่นแยกเซลล์ที่ได้ให้ตกลงมาที่ความเร็วประมาณ 3000xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท media ทิ้งให้เหลือประมาณ 100 µl แล้วเกลี่ย (spread) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°ซ ข้ามคืน โดยในขั้นตอนนี้ก่อนที่จะ spread เชื้อลงทั้งหมดต้องนำเชื้อส่วนหนึ่งมาเจือจางลงทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ก่อน แล้วจึงนำไป spread ลงบน plate เพื่อให้ได้เป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว (single colony) ดังที่ได้อธิบายไว้โดยละเอียดในขั้นที่ 5 เพื่อให้สามารถคำนวณจำนวนของฟาจที่คัดเลือกมาได้ในรอบนี้ นอกจากนั้นแล้วในกรณีที่ต้องการคัดเลือกเพียงรอบเดียว ยังสามารถข้ามจากขั้นตอนที่ได้

แบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวในขั้นนี้ ไปต่อในขั้นที่ 6 คือการสร้างเป็นตัวฟาจ เพื่อทำการตรวจความสามารถในการจับด้วยวิธีการ ELISA ในขั้นตอนที่ 7 ได้เลย

ขั้นที่ 3 การเตรียมฟาจเพื่อทำการคัดเลือกรอบที่สอง

3.1 ทำการเก็บรวบรวม colony ของแบคทีเรียที่โตขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อโดยใส่ media 2xYT จำนวน 1 ml ลงไปแล้วใช้แท่งแก้วขูดเอาแบคทีเรียออกมาให้หมด กระจายเชื้อให้เข้ากันดี อย่าให้ติดกันเป็นก้อน
3.2 นำแบคทีเรียจากขั้นแรกจำนวน 10 µl ไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 1% glucose จำนวน 5 มล
3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ พร้อมกับเขย่าไปด้วยอย่างแรงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3.4 เติม helper phage (M13 K07 [139] หรือ KM13 [89]) จำนวน $5x10^{11}$ ตัว
3.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยไม่ต้องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที
3.5 นำไป centrifuge ที่ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที
3.6 แยกเอาส่วนในด้านบนออก แล้วใส่ media 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin, 50µg/ml kanamycin และ 0.1% glucose จำนวน 5 มล กระจายแบคทีเรียที่อยู่ก้นหลอดให้ดีใน media นี้
3.3 นำแบคทีเรียไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ พร้อมกับเขย่าไปด้วยอย่างแรงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

* ในวันนี้ให้ทำการตรึงโปรตีนเป้าหมายบนจาน ELISA เพื่อทำการคัดเลือกในรอบต่อไปด้วย โดยใช้วิธีการตรึงดังที่ได้อธิบายในขั้นที่ 1 ปริมาณของ antigen ที่จะใช้ในการคัดเลือกรอบที่ 2 อาจใช้เท่ากับปริมาณที่ใช้ในการคัดเลือกรอบสุดท้าย หรืออาจน้อยกว่านั้น 2-10 เท่าแล้วแต่ความเหมาะสม

ขั้นที่ 4 การคัดเลือกรอบที่สอง

4.1 ทำการแยก media เลี้ยงเชื้อที่มีฟาจอยู่จากขั้นที่แล้วโดยการ centrifuge ที่ความเร็ว 3000g เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบน (supernatant) ปริมาณ 4 มลไว้ในหลอดทดลองที่สะอาด
4.2 ทำการตกตะกอนฟาจโดยการเติมสารละลาย PEG/NaCl (20% Polyethylene glycol 8000, 2.5M NaCl) ปริมาณ 1 มล ลงใน supernatant จากขั้นที่ 4.1 ผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 1 ชั่งโมง
4.3 นำไป centrifuge ที่ 3000xg เป็นเวลา 30 นาที
4.4 กำจัดส่วนใสด้านบน (PEG/NaCl) ออก แล้ว centrifuge อีกครั้งที่ 3000g เป็นเวลา 30 นาที
4.4 กำจัด PEG/NaCl ออกให้หมด
4.5 เติม PBS ปริมาณ 100 µl แล้วผสมกับตะกอนฟาจให้เข้ากันดี
4.5 นำฟาจทั้งหมดที่ได้จากขั้นที่ 4.5 ไปทำการคัดเลือกรอบที่ 2 ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ในขั้นที่ 2
* ถ้าต้องการคัดเลือก 3 รอบ ให้ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นที่ 2 และ 3 อีกครั้งหนึ่ง

ขั้นที่ 5 การแยกเป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว

หลังจากที่ได้บ่มฟาจที่ elute ออกมาได้ กับ *E. coli* TG1 ตามขั้นตอนที่ 2.8 แล้ว ทำการแยกให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย ซึ่งแสดง monoclonal antibody โครงสร้างต่างๆกันดังนี้

5.1 นำแบคทีเรีย TG1 ที่ถูก infect ด้วยฟาจมาเจือจางลงทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ก่อน
5.2 นำแบคทีเรียทุกความเจือจางประมาณ 100 µl ไป spread ลงบน บนจานเลี้ยงเชื้อ TYE agar plate ที่มี 100% ampicillin และ 1% glucose
5.3 นำไปบ่มที่ 37°ซ ข้ามคืนเพื่อให้ได้เป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว (single colony) เพื่อใช้ในการสร้างเป็นฟาจโคโลนีเดี่ยวในขั้นที่ 6 ต่อไป รวมทั้งต้องทำการคำนวณจำนวนของฟาจที่คัดเลือกมาได้ทั้งหมด โดยการนับจำนวนฟาจที่โตบนฟาจเลี้ยงเชื้อแล้วคูณกับค่า dilution ที่ใช้

ขั้นที่ 6 การเตรียมฟาจโคโลนีเดี่ยว

ขั้นตอนนี้ใช้เวลา 2 วัน วันแรกเป็นการเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละโคโลนีที่มี phagemid ที่แสดง monoclonal antibody แต่ละโคลนเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป (stock) และเพื่อนำไปผลิตเป็นตัวฟาจโดยการ infect ด้วย helper phage

วันแรก

6.1 เลือก plate ที่มีแบคทีเรียเป็นโคโลนีเดี่ยวจากขั้นก่อน จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟัน หรือลวดเขี่ยแต่ละโคโลนีขึ้นมา
6.2 นำแต่ละโคโลนีไปเลี้ยงใน 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin, 50µg/ml kanamycin และ 1% glucose ที่อยู่ในหลุมบนจาน microtiter plate จำนวน 100 µl ดังนั้นจึงสามารถเลี้ยงแบคทีเรียได้ทีละ 96 โคโลนี ต่อ plate ในคราวเดียวกัน
6.3 นำจาน microtiter plate ไปบ่มที่ 37°ซ โดยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน

วันที่2

6.4 นำแบคทีเรียปริมาณ 2-5 µl จากแต่ละหลุมในขั้นที่แล้วไปใส่ในหลุมบนจาน ELISA ที่มี2xYT + 100 µg/ml ampicillin + 1% glucose อยู่ 100 µl ส่วนแบคทีเรียที่เหลือเก็บไว้เป็น stock โดยการเติม glycerol ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 15% แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -80°ซ
6.5 นำไปบ่มที่ 37°ซ โดยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง
6.6 เติม 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin + 1% glucose + 10^9 helper phage จำนวน 50 µl
6.7 นำไปบ่มที่ 37°ซ โดยไม่ต้องเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6.8 นำ microtiter plate ไป centrifuge ที่ 3000xg เป็นเวลา 15 นาที
6.9 กำจัดส่วนใสด้านบน (supernatant) ออก แล้วเติม 2xYT ที่มี 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin, 50µg/ml kanamycin ปริมาณ 100 µl
6.10 นำไปบ่ม โดยการเขย่าเบาๆ ที่ 30°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

* ในวันนี้ให้ทำการตรึงโปรตีนเป้าหมายบนจาน ELISA เพื่อทำการตรวจสอบในวันถัดไปด้วย โดยใช้วิธีการตรึงดังที่ได้อธิบายในขั้นที่ 1 ปริมาณของ antigen ที่จะใช้ในการตรวจสอบ ELISA อาจใช้เท่ากับปริมาณที่ใช้ในการคัดเลือกรอบสุดท้าย หรืออาจน้อยกว่านั้นแล้วแต่ความเหมาะสม โดยทำการตรึงลงในหลุมเท่ากับจำนวนโคโลนีที่จิ้มขึ้นมาในขั้นที่ 6.1 นอกจากนั้นแล้วยังต้องมีตัวควบคุม (background) ในการวิเคราะห์ด้วย โดยการใส่ 2% MPBS ปริมาณ 200 µl หรือ antigen อื่นที่เหมาะสม ลงไปในหลุมของจาน ELISA ให้เท่ากับจำนวนของฟาจที่ต้องการทำการวิเคราะห์ โดยควรทำการทดสอบแบบ สอง หรือ สามซ้ำ (duplicate หรือ

triplicate) เพื่อความน่าเชื่อถือ

ขั้นที่ 7 การทำ Monoclonal Phage ELISA

7.1 นำ microtiter plate จากขั้นที่ 6.10 ไป centrifuge ที่ 3000g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วน supernatant ที่มีฟาจอยู่ไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

7.2 ทำการล้างจาน ELISA ที่เตรียมไว้จากขั้นที่แล้ว 3 ครั้งด้วย PBS

7.2 เติม 2% MPBS (2% Non-fat dried milk in PBS) ปริมาณ 200-250 µl ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.4 ล้างหลุม 3 ครั้งด้วย PBS

7.5 เติมฟาจจากขั้น 7.1 ปริมาณ 50 µl ที่เจือจางอยู่ใน 4%MPBS ปริมาณ 25 µl ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยอาจเขย่าเบาๆ ในเวลา 1 ชั่วโมงแรก แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 1 ชั่วโมง

7.6 คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.1% Tween20) 3-10 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3-10 รอบ ในระหว่างแต่ละรอบที่ล้างอาจแช่และเขย่าก่อนเป็นเวลา 5 นาที

2.6 เติม HRP anti-M13 ที่เจือจาง 1:50,000 เท่าใน 2%MPBS ปริมาณ 50 µl ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.7 ล้างด้วย PBST (PBS + 0.1% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

7.8 เติมสาร ABTS + 0.05% H_2O_2 หรือ substrate อื่นที่เหมาะสมเช่น TMB ปริมาณ 50 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-20 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี

7.9 หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1% SDS ปริมาณ 50 µl (ข้อนี้ไม่จำเป็น อาจข้ามไปก็ได้)

7.10 ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวแสง 405-410 nm

7.11 คัดเลือกฟาจที่มีความสามารถในการจับดี คือมีค่า OD เป็น 2 เท่าของค่า background ขึ้นไป เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

วิธีการทั้งหมดที่กล่าวมานี้เป็นวิธีการพื้นฐานเริ่มต้นในการทำการคัดเลือกฟาจจากคลัง ผู้วิจัยอาจต้องปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เช่นปริมาณของ antigen หรือวิธีการตรึง (เช่นอาจต้องใช้การตรึงระหว่าง biotinylated antigen กับ streptavidin-coated plate แทน) จำนวนครั้งในการล้าง สารที่ใช้ในการ block สารที่ใช้ในการสกัด (elute) ชนิดของ helper phage หรือจำนวนรอบในการคัดเลือก เพื่อให้ได้ antibody ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ การคัดเลือกหลายรอบนั้นอาจทำให้ได้ monoclonal antibody ที่มีความแรงสูงในการจับ แต่อาจทำให้ความหลายหลายของ antibody ที่สามารถจับกับ antigen ที่ต้องการได้ลดลง ในกรณีที่ทำการคัดเลือกรอบเดียวควรเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำการทดสอบมากกว่าเมื่อทำการคัดเลือกหลายรอบ ดังนั้นผู้วิจัยต้องทำการปรับวิธีการให้เหมาะสมตามชนิดของ antigen และวัตถุประสงค์ของการนำ monoclonal antibody ไปใช้

การผลิตชิ้นแอนติบอดีส่วน scFv หรือ Fab

หลังจากที่ได้ทำการคัดเลือกฟาจที่แสดง ชิ้นของ monoclonal antibody ที่จับกับ antigen ที่ต้องการได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการผลิตออกมาเป็นโมเลกุลเดี่ยวๆ ของ scFv (หรือ Fab) ที่ละลายน้ำได้ (soluble form) เพราะไม่ติดอยู่บนผิวของฟาจอีกต่อไป เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ และทำให้สามารถคำนวณค่า binding affinity โดยการใช้เครื่อง BIAcore ได้ [77, 78] วิธีการที่ใช้ในการผลิตเป็นชิ้นของ monoclonal antibody ที่ไม่ติดอยู่บนฟาจ (อาจเรียกว่า soluble monoclonal antibody fragment) นี้อาจทำได้ 2 วิธี วิธีแรกเป็นการโคลนยีนส่วน scFv เข้าไปแสดงใน expression vector ที่เหมาะสม แล้วผลิตออกมาจากแบคทีเรียเหมือนหลักการผลิต recombinant protein โดยทั่วไป [141, 142] ส่วนวิธีที่ 2 เป็นวิธีที่เป็นที่นิยมและง่ายกว่ามากคือการ ใช้ phagemid ที่มี amber stop codon (TAG) อยู่ระหว่าง DNA ส่วน scFv (หรือ Fab) และ gene pIII ซึ่งเมื่ออยู่ในแบคทีเรีย TG1 ซึ่งมีการกลายพันธ์ (mutation) ที่เรียกว่า suppression mutation จะอ่าน amber stop codon เป็น glutamic acid (เนื่องจากมี mutation ของ tRNA สำหรับ codon นี้) [143] ดังนั้นในแบคทีเรีย TG1 ชิ้นของ monoclonal antibody จึงเชื่อมอยู่กับโปรตีน pIII บนผิวฟาจ ในกรณีที่ต้องการสร้างเป็น soluble form ก็เพียงแต่เปลี่ยนชนิดของแบคทีเรีย (host) เป็นชนิดที่ไม่มี mutation นี้อีกต่อไป เรียกแบคทีเรียนี้ว่า non-suppressor strain เช่น strain HB2151 ดังนั้นเมื่อนำ phagemid ไป infect แบคทีเรียที่เป็น non-suppressor strain ก็จะได้เฉพาะ soluble scFv หรือ soluble Fab ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวได้ง่าย ดังจะได้อธิบายในรายละเอียดต่อไป

นอกจากการใช้ phagemid ที่มี amber stop codon ระหว่าง scFv และ pIII แล้ว phagemid ที่ใช้ส่วนใหญ่ยังมี tag เพื่อใช้ในการทำชิ้น scFv ให้บริสุทธิ์ หรือใช้ในการตรวจสอบทาง ELISA ซึ่ง tag ที่นิยมใช้ได้แก่ 6xHistidine และ c-Myc epitope ดังแสดงใน map ของ phagemid pMod ดังรูปที่ 4.4 โดย 6xHis tag นั้นสามารถนำไปใช้ในการทำ affinity purification โดย Nickel column ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ส่วน c-Myc epitope นั้นเอาไว้สำหรับการตรวจสอบด้วย anti-c-Myc antibody ดังที่จะได้อธิบายต่อไปในหัวข้อที่ 6.1 เนื่องจาก monoclonal antibody ที่ได้จากคลังของฟาจนั้นเป็น monoclonal ที่อยู่ในรูปที่เป็น scFv หรือ Fab แล้วแต่ชนิดของคลังของฟาจ monoclonal ชนิดนี้มีความสามารถในการจับกับ antigen ได้อย่างเฉพาะเจาะจง จึงสามารถนำไปใช้เป็นในการค้นคว้าวิจัย หรือใช้เป็นสารตรวจวินิจฉัยได้ รวมทั้งอาจใช้ในการรักษาบางอย่างได้ด้วย อย่างไรก็ตาม monoclonal antibody ที่อยู่ในรูปแบบนี้ไม่สามารถทำงานในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เพราะขาดส่วนที่เป็น constant region ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการทำงานของ antibody ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นในกรณีที่ต้องการเปลี่ยน scFv หรือ Fab ที่เตรียมได้จากคลังของฟาจให้มีโครงสร้างเหมือนที่ได้จากธรรมชาติ จะต้องทำการเปลี่ยนโครงสร้างของ scFv หรือ Fab ให้เป็น monoclonal antibody ที่สมบูรณ์ ด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม ดังที่จะได้อธิบายต่อไปในหัวข้อถัดไป

การผลิต soluble antibody fragment โดยการเปลี่ยนชนิดของแบคทีเรีย

วิธีการนี้ใช้ในการผลิตชิ้น monoclonal antibody แบบใดก็ได้ถ้าในโครงสร้างของ phagemid มี amber stop codon ระหว่างชิ้นของ antibody กับ pIII ดังที่ได้อธิบายแล้วข้างต้น โดย soluble antibody fragment อาจอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ หรืออยู่ใน periplasmic space ของแบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ หลังจากที่ได้ soluble antibody fragment แล้ว สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ได้ต่อไป ในกรณีที่มีโคลนของ scFv จำนวนมากที่ต้องการทดสอบ อาจทำการผลิตทีละ

หลายๆโคลนในปริมาณน้อยๆโดยการเลี้ยงใน 96-well microtiter plate เมื่อได้ soluble fragment ของ monoclonal antibody แล้ว ควรนำไปยืนยันความสามารถในการจับกับ antigen อีกครั้งหนึ่งโดยวิธีการ ELISA ด้วย รายละเอียดของการทำในขั้นตอนต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้นอธิบายได้ดังนี้

การเตรียม soluble antibody fragment ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

1. จิ้มโคโลนีเดี่ยว *E. coli* HB2151 ที่อยู่บนจานเลี้ยงเชื้อ mineral agar plate มา 1 โคโลนีแล้วนำไปเลี้ยงใน mineral broth ที่ 37°ซ
2. นำฟาจโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้จากขั้นตอนการคัดเลือกฟาจจำนวน 10 µl มาให้ความร้อนที่ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที (เพื่อฆ่าแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมา) จากนั้นนำไปผสม กับ *E. coli* HB2151 จำนวน 200 µl ที่กำลังโตอยู่ในช่วง log phase (OD_{600} ประมาณ 0.4) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยไม่ต้องเขย่า เพื่อให้ฟาจ infect แบคทีเรีย
3. นำแบคทีเรียไป streak ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ลงบน TYE plate ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 1% glucose แล้วนำไปบ่มที่ 37°ซ ข้ามคืน
4. ทำการจิ้มโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 2% glucose อยู่ แล้วบ่มที่30°ซ โดยการเขย่าไปด้วยข้ามคืน
5. นำแบคทีเรียจากขั้นที่แล้วจำนวน 50µl ไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 0.1% glucose จำนวน 5 มล ที่30°ซ โดยการเขย่าไปด้วยจนโตได้ค่า OD_{600} = 0.9 (ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง)
6. เติม IPTG จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5-1mM จากนั้นทำการบ่มพร้อมกับเขย่าต่อไปที่30°ซ เป็นเวลา 16-20 ชั่งโมง
7. ทำการปั่นแยกเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการ centrifuge ที่ 5000xg เป็นเวลา 15 นาที soluble fragment จะอยู่ในส่วนน้ำใสด้านบน (supernatant)
8. นำไปใช้ในการตรวจสอบทาง ELISA หรือนำไปเก็บไว้ที่ 4°ซ เพื่อ ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ต่อไป

การเตรียม soluble antibody fragment ที่อยู่ใน periplasmic space

วิธีการนี้ใช้ในกรณีที่ต้องการเตรียม scFv ในปริมาณมาก

1. จิ้มโคโลนีเดี่ยว *E. coli* HB2151 ที่อยู่บนจานเลี้ยงเชื้อ mineral agar plate มา 1 โคโลนีแล้วนำไปเลี้ยวใน mineral broth ที่ 37°ซ
2. นำฟาจโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้จากขั้นตอนการคัดเลือกฟาจจำนวน 10 µl มาให้ความร้อนที่ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที (เพื่อฆ่าแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมา) จากนั้นนำไปผสม กับ *E. coli* HB2151 จำนวน 200 µl ที่กำลังโตอยู่ในช่วง log phase (OD_{600} ประมาณ 0.4) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยไม่ต้องเขย่า เพื่อให้ฟาจ infect แบคทีเรีย
3. นำแบคทีเรียไป streak ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวลงบน TYE plate ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 1% glucose แล้วนำไปบ่มที่ 37°ซ ข้ามคืน

4. ทำการจิ้มโคโลนีเดี่ยว (หรือใช้ overnight culture 50µl)ไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 2% glucose อยู่ ปริมาณ 50 มล แล้วบ่มที่30°ซ โดยการเขย่าไปด้วย จนได้ค่า OD_{600}/ml = 0.7-1
5. นำไป centrifuge ที่ 3000g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปผสมให้เข้ากันดี (resuspend) ใน media 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin + 1mM IPTG แล้วเลี้ยงที่ 30°ซ เป็นเวลา 3-6 ชั่งโมง (ถ้าเลี้ยงนานกว่านี้คือมากกว่า 16 ชั่งโมง antibody fragments จะไปอยู่ใน culture media)
6. นำไป centrifuge ที่ 3000g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วผสมให้เข้ากันดีกับ periplasmic buffer (PBS/1 M NaCl/ 1mM EDTA) ที่เย็นจัดปริมาณ 1 มล แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที *
7. นำไป centrifuge ที่ 10,000g แยกส่วนในด้านบนซึ่งเป็น periplasmic extract ออก แล้วเติม $MgCl_2$ จนได้ความเข้มข้น 1-2 mM
8. นำไปใช้ในการตรวจสอบทาง ELISA หรือนำไปเก็บไว้ที่ 4°ซ เพื่อ ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ต่อไป

การเตรียม soluble antibody fragment บน 96-well plate

วิธีการนี้ใช้ในกรณีที่ต้องการทดสอบความสามารถในการจับของ scFv ทีละหลายๆ ตัว

1. ทำการเลี้ยง E. coli HB2151 ใน mineral broth ที่ 37°ซ โดยการจิ้มโคโลนีเดี่ยวออกมาจากจานเลี้ยงเชื้อ mineral agar plate
2. นำฟาจโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้จากขั้นตอนการคัดเลือกฟาจจำนวน 10 µl มาให้ความร้อนที่ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที (เพื่อฆ่าแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมา) จากนั้นนำไปผสม กับ *E. coli* HB2151 จำนวน 200 µl ที่กำลังโตอยู่ในช่วง log phase (OD_{600} ประมาณ 0.4) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยไม่ต้องเขย่า เพื่อให้ฟาจ infect แบคทีเรีย
3. นำแบคทีเรียไป streak ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวลงบน TYE plate ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 1% glucose แล้วนำไปบ่มที่ 37°ซ ข้ามคืน
4. ทำการจิ้มโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 2% glucose อยู่ ที่อยู่ใน 96 well plate แล้วบ่มที่37°ซ โดยการเขย่าไปด้วยข้ามคืน
5. นำแบคทีเรียจากขั้นที่แล้วจำนวน 2-5 µl โดยใช้ที่ย้ายเซลล์ทีละ 96 จุด (96-position multiprong transfer device)ไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 0.1% glucose ที่อยู่ใน 96 well plate จำนวน 200 µl ที่37°ซ โดยการเขย่าไปด้วยจนโตได้ค่า OD_{600} = 0.9 (ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง) จากนั้นเก็บแบคทีเรียที่เหลือไว้เป็น stock โดยการเติม glycerol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15% แล้วเก็บไว้ที่ -70°ซ
6. เติม IPTG จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5-1mM โดยการใส่ 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 9mM IPTG ปริมาณ 25 µl จากนั้นทำการบ่มพร้อมกับเขย่าต่อไปที่ 30°ซ เป็นเวลา 20 ชั่งโมง (ข้ามคืน)
7. ทำการปั่นแยกเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการ centrifuge ที่ 1,800g เป็นเวลา 10 นาที soluble fragment จะอยู่ในส่วนน้ำใสด้านบน (supernatant) *

8. นำไปใช้ในการตรวจสอบทาง ELISA ต่อไป

* หมายเหตุ ในบางครั้ง scFv อาจไม่ถูกหลั่งออกมาจาก periplasmic space จึงต้องทำการสกัดจาก cytoplasm ให้ได้เป็น cell lysate [141, 142] ก่อนที่จะนำมาทำให้บริสุทธิ์ หรือทำการทดสอบ ELISA ต่อไป

การตรวจสอบความสามารถในการจับกับ antigen ด้วยวิธีการ ELISA

1. ใส่ antigen จำนวน 1-10 µg ที่ละลายอยู่ใน 1xPBS หรือ 100mM NaHCO3 ปริมาณ 100 µl ลงในหลุมของจาน ELISA ชนิด high-binding capacity (Maxisorb) ปริมาณของ antigen ที่จะใช้ในการตรวจสอบ ELISA อาจใช้เท่ากับปริมาณที่ใช้ในการคัดเลือกรอบสุดท้าย หรืออาจน้อยกว่านั้นแล้วแต่ความเหมาะสม โดยทำการตรึงลงในหลุมเท่ากับจำนวน soluble fragments ที่ต้องการทดสอบ นอกจากนั้นแล้วยังต้องมีตัวควบคุม (background) ในการวิเคราะห์ด้วย โดยการใส่ 3% BSA in PBS หรือ antigen อื่นที่เหมาะสม ปริมาณ 200 µl ลงไปในหลุมของจาน ELISA ให้เท่ากับจำนวนของ soluble fragment ที่ต้องการทำการวิเคราะห์ โดยควรทำการทดสอบแบบ สอง หรือ สามซ้ำ (duplicate หรือ triplicate) เพื่อความน่าเชื่อถือ
2. ปิดปากหลุมด้วยเทปใส หรือ plastic wrap แล้วเก็บไว้ที่ 4°ซ เป็นเวลา 1 คืน
3. ทำการล้างจาน ELISA ที่เตรียมไว้จากขั้นที่แล้ว 3 ครั้งด้วย PBS
4. เติม 3% BSA ใน PBS ปริมาณ 200-250 µl ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ล้างหลุม 3 ครั้งด้วย PBS
6. เติม culture supernatant หรือ periplasmic extract ที่มี soluble antibody fragments ปริมาณ 50 µl ที่เจือจางอยู่ใน 3% BSA in PBS ปริมาณ 100 µl ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยอาจเขย่าเบาๆ ในเวลา 1 ชั่วโมงแรก แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 1 ชั่วโมง
7. คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.1% Tween20) 3-10 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3-10 รอบ ในระหว่างแต่ละรอบที่ล้างอาจแช่และเขย่าก่อนเป็นเวลา 5 นาที
8. เติม ProteinA-HRP หรือ ProteinL-HRP ที่เจือจาง 1:50,000 เท่าใน 3%BSA ปริมาณ 50 µl ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
9. ล้างด้วย PBST (PBS + 0.1% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ
10. เติมสาร ABTS + 0.05% H_2O_2 หรือ substrate อื่นที่เหมาะสมเช่น TMB ปริมาณ 50 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-20 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี
11. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1% SDS ปริมาณ 50 µl (ข้อนี้ไม่จำเป็น อาจข้ามไปก็ได้)
12. ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวแสง 405-410 nm
13. คัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการจับดี คือมีค่า OD ที่เป็น 2 เท่าของค่า background ขึ้นไป เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

* หมายเหตุ ในกรณีที่ต้องการใช้ anti-c-Myc antibody ในการตรวจสอบ อาจทำได้ดังนี้ (ขั้นที่ 1-7 เหมือนกัน)

1. คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.1% Tween20) 3-10 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3-10 รอบ ในระหว่างแต่ละรอบที่ล้างอาจแช่และเขย่าก่อนเป็นเวลา 5 นาที

2. เติม anti-c-Myc monoclonal antibody ที่เจือจาง 1:50,000 เท่าใน 3%BSA ปริมาณ 50 µl ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ล้างด้วย PBST (PBS + 0.1% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ
4. เติม goat anti mouse-HRP หรือ rabbit anti mouse-HRP ที่เจือจาง 1:50,000 เท่าใน 3%BSA ปริมาณ 50 µl ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. เติมสาร ABTS + 0.05% H_2O_2 หรือ substrate อื่นที่เหมาะสมเช่น TMB ปริมาณ 50 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-20 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี
6. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1% SDS ปริมาณ 50 µl (ข้อนี้ไม่จำเป็น อาจข้ามไปก็ได้)
7. ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวแสง 405-410 nm
8. คัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการจับดี คือมีค่า OD ที่เป็น 2 เท่าของค่า background ขึ้นไป เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

สรุปผลการคัดเลือกฟาจจากคลังย่าโม๑ ที่ได้จากทำวิจัยในโครงการนี้

เมื่อผู้วิจัยได้ทำการสร้างคลังเสร็จแล้วได้นำคลังไปใช้คัดเลือกหาแอนติบอดีต่อเป้าหมายที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันมากหลายชนิด เพื่อทำการตรวจสอบคุณภาพของคลังที่ได้สร้างขึ้น จากการตรวจสอบพบว่าสามารถหาแอนติบอดีได้อย่างน้อย 1 ชิ้นที่สามารถจับอย่างจำเพาะเจาะจง ต่อเป้าหมายที่ได้ทำการตรวจสอบมาทั้งหมดยกเว้นพิษงูเขียวหางไหม้ ซึ่งเหตุที่หายังไม่ได้อาจเป็นเพราะพิษงูนี้มีส่วนผสมของเอนไซม์ protease อยู่เป็นจำนวนมาก จึงทำให้เป้าหมายไม่มีความคงทนในระหว่างกระบวนการคัดหาคัดพอ อย่างไรก็ตามความสำเร็จที่เกิดขึ้นนี้เป็นเครื่องยืนยันว่าคลังที่ได้สร้างขึ้นมานี้มีคุณภาพดีจริง ตัวอย่างผลความสำเร็จในการคัดหาแอนติบอดีต่อเป้าหมายต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 ผลการคัดหาฟาจที่สามารถจับจำเพาะกับเป้าหมายต่างๆ

Antigens	Round of panning	Number of clone after 1st round	Number of binding phage after 1st round	Number of binding phage after 2nd round	Number of soluble scFv fragments	Number of different scFv producing clone
Aflatoxin	1	2.5×10^2	4/56	-	3/4	3/3
Attenuated Rabies viruses	2	1.2×10^3	1/96	7/96	8/8	2/8
Amylase	1	8.8×10	3/88	-	3/3	NA
BSA	1	2.0×10^3	6/96	-	NA	NA
Cobra snake venom	2	1.4×10^4	1/96	9/96	3/3	1/10
Cholangiocarcinoma cell KKU-100	1	2.2×10^3	2/96	-	NA	2/2
Green pit viper venom	2	5.1×10^4	0/96	0/96	NA	NA
GST	1	4.3×10^2	6/28	-	NA	NA

* The number of positive clones/the number of screened clones.

*คัดมาจาก Pansri P, Jaruseranee N, Rangnoi K, Kristensen P, Yamabhai M. **A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens**. BMC Biotechnol. 2009 ; 96.

ตารางที่ 5 แสดงลำดับกรดอะมิโนในส่วน CDR3 และ ประเภทของ germ line ของแอนติบอดีต่อแอนติเจนบางชนิดที่คัดหามาได้จากโครงการวิจัยนี้

Clone	Family	CDR3	Germline	Amino acids differences from germline
V_H gene				
Aflatoxin C3	VH1	ADDYGSGSYGFDY	IGHV1-3*01 (DP25)	1
Aflatoxin C5	VH3	SRVGLWGPRYYYYYGMDVW	IGHV3-23*04 (DP47)	4
Aflatoxin D2	VH1	GGPLDY	IGHV1-45*02 (DP4)	5
Rabies D7	VH1	GGNFDY	IGHV1-18*01 (DP14)	2
Rabies B5	VH3	GYATFDY	IGHV3-23*01 (DP47)	7
Cobra D11	VH4	HGRDTSGYTMDYFDS	IGHV4-59*07 (H4)	14
Carcinoma C4	VH3	DRGKYPGDGMGV	IGHV3-23*01 (DP47)	6
V_L gene				
Aflatoxin C3	VK1	QQSYSTPYA	IGKV1D-39*01 (DPK9)	4
Aflatoxin C5	VL3	QVWDRDSRTV	IGLV3-9*01 (V2-6)	16
Aflatoxin D2	VL2	SSYAGSNNLV	IGLV2-8*01 (V1-2)	3
Rabies D7	VL1	AAWDDSLSGPV	IGLV1-47*01 (DPL3)	2
Rabies B5	VK1	QQYSYNPYT	IGKV1D-39*01 (DPK9)	1
Cobra D11	VL6	QSYDSSNRV	IGLV6-57*01 (V1-22)	5
Carcinoma C4	VL1	AAWDDSLNGYV	IGLV1-44*01 (DPL2)	2

*คัดมาจาก Pansri P, Jaruseranee N, Rangnoi K, Kristensen P, Yamabhai M. **A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens**. BMC Biotechnol. 2009 ; 96.

บทที่ 3

ข้อวิจารณ์

คลังของฟาจที่ได้สร้างขึ้นในโครงการวิจัยนี้ เป็นคลังของเฟจที่รวบรวม monoclonal antibody ของมนุษย์ที่มีความหลากหลายสูงมาก โดยสร้างขึ้นจากเม็ดเลือดขาวของประชากรทั้งหมด 140 คนที่อยู่ในจังหวัดนครราชสีมา ด้วยวิธีการใหม่ที่ได้พัฒนามาจากวิธีการทางอณูชีววิทยาก่อนหน้านี้ สิ่งที่แปลกใหม่คือเป็นคลังที่สร้างจากประชากรที่หลากหลายสูงที่สุดในโลกตั้งแต่มีการรายงานมา แต่สร้างโดยใช้วัสดุ และขั้นตอนน้อยที่สุด รวมทั้งคลังยังมีขนาดกะทัดรัด ไม่ใหญ่จนเกินไป ข้อสำคัญคือเป็นคลังที่มีคุณภาพดีมากเพราะสามารถใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนได้อย่างหลากหลาย ทั้งที่เป็นโมเลกุลเดี่ยว อาทิเช่น เอนไซม์ และโปรตีนบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ หรือสารโมเลกุลเล็กประเภท hapten รวมทั้งสารประกอบที่ยุ่งยากซับซ้อนเช่น โมเลกุลบนผิวเซลล์มะเร็ง หรือพิษงูเห่าเป็นต้น (37) ซึ่งผลจากการคัดหาแอนติบอดี ต่อแอนติเจนต่างๆ นั้น สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์โครงสร้างของแอนติบอดีจากลำดับเบสในยีน ซึ่งพบว่ามียีนสำหรับสร้างแอนติบอดีที่มีโครงสร้างหลากหลาย โดยเฉพาะในส่วนที่มีความหลากหลายสูงมาก (hypervariable regions, CDR1,2,3) ซึ่งเกิดจากจัดเรียงตัวของยีนใน germ line cells ตามธรรมชาติ ที่ถูกกำหนดขึ้นตามพัฒนาการของ B-cell ในร่างกายมนุษย์ ส่วนขนาดของคลังแอนติบอดีซึ่งประมาณว่ามีแอนติบอดีที่แตกต่างกันทั้งหมด $1.5x10^8$ ชนิดนั้น เป็นจำนวนเท่ากับความหลากหลายของแอนติบอดีบนผิว B-cell ของมนุษย์ที่ไหลเวียนอยู่ในร่างกายของมนุษย์ในระยะเวลาหนึ่งๆ (38) ดังนั้นคลัง ย่าโม๑ ที่ได้สร้างขึ้นนี้ จึงมีความใกล้เคียงกับความหลากหลายของแอนติบอดีในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ที่แท้จริง ซึ่งอาจเป็นเหตุผลสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้คลังนี้มีคุณภาพดีมาก สามารถใช้เป็นแหล่งในการสร้างแอนติบอดีมนุษย์ต่อแอนติเจนต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย ในกรณีที่ต้องการแอนติบอดีที่มีความสามารถพิเศษเพิ่มขึ้นไปอีก เช่นมีความสามารถในการจับสูงขึ้น หรือทนต่อสภาวะแวดล้อมขึ้นเพื่อการประยุกต์ใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ ต่อไปนั้น ก็สามารถทำได้โดยวิธีการ affinity maturation หรือวิธีการกำกับวิวัฒนาการอื่นๆ (28) แล้วแต่วัตถุประสงค์ของการใช้งาน

ข้อดีของคลังย่าโม๑ ซึ่งเป็นผลงานที่ถูกประดิษฐ์คิดค้นจากโครงการวิจัยนี้

1. เทคโนโลยีการสร้างคลังในโครงการวิจัยนี้ เป็นวิธีการใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงมาก นั่นคือคลังมีขนาดเล็ก (compact) แต่มีคุณภาพดีกว่า หรือเท่ากันกับคลังที่มีขนาดเท่ากันหรือใหญ่กว่า โดยใช้วัสดุอุปกรณ์ และเวลาน้อยกว่ามาก ทำให้เสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า และสามารถดูแลรักษาคลังได้ง่าย มีอายุในการใช้งานนานกว่า ซึ่งองค์ความรู้ใหม่ที่ได้คิดค้นขึ้นในด้านเทคโนโลยีนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ก) ส่วนวิธีการสร้างคลัง และ ข) ส่วนวิธีการคัดหาแอนติบอดีจากคลัง วิธีการสร้างคลังชนิด scFv ที่ได้คิดค้นขึ้นมาใหม่นี้ เป็นวิธีการที่ได้ทำการปรับปรุงจากวิธีการเดิมที่มีอยู่แล้ว และมีส่วนที่แปลกใหม่ยังไม่มีเคยการรายงานมาก่อน เพราะวิธีการในการสร้างคลังนั้นได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นลำดับ ตามการพัฒนาของเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาที่ได้มีการพัฒนาขึ้นมาโดยตลอดเช่นกัน วิธีการที่ได้ใช้ในโครงการวิจัยนี้เป็นเทคโนโลยีล่าสุด ให้ผลดี ด้วยค่าใช้จ่ายไม่แพงนัก และสามารถทำได้ในประเทศไทย นอกจากนั้นแล้วยังได้คิดค้นวิธีการคัดหา monoclonal antibody (bio-panning) ขึ้นมา

ใหม่ ที่มีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกับวิธีการเดิม แต่ใช้ antigen น้อยกว่า 10 เท่า ซึ่งจะมีประโยชน์มากในกรณีที่ antigen มีราคาสูง หรือหาได้ยาก ทำให้ค่าใช้จ่ายโดยรวมในการผลิตเป็น monoclonal antibody น้อยลงกว่าเดิมมาก

2. เป็นคลังโมโนโคลนอล แอนติบอดี ของมนุษย์บนผิวเฟจ ซึ่งเป็นคลังที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ที่มีสุขภาพดีสูงถึง 140 คน ซึ่งมากที่สุดในโลกตั้งแต่มีการรายงานมา เป็นคลังที่ได้รับการตรวจสอบแล้วว่ามีความหลากหลายสูง และคุณภาพดีมาก เพราะสามารถใช้เป็นแหล่งในการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนได้อย่างหลากหลายทั้ง โปรตีนและเอนไซม์ที่ บริสุทธิ์ สารโมเลกุลเล็กเช่น อะฟลาทอกซิน และสารที่มีความซับซ้อนสูงเช่นพิษงูเห่า หรือโมเลกุลบนผิวเซลล์มะเร็งเป็นต้น ซึ่งคลังที่ได้สร้างขึ้นนี้สามารถนำไปสร้างต่อเป็นโมเลกุลแอนติบอดีชนิด scFv ได้โดยง่ายโดยการทำให้หลั่งออกมาจากเซลล์แบคทีเรีย ทำให้สะดวกต่อการนำไปพัฒนาต่อยอด ทั้งในการทำเป็นสารตรวจวินิจฉัย และการบำบัดรักษา

ข้อเสียหรือข้อบกพร่องของผลงานอื่นๆ ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน

ข้อเสียที่สำคัญที่สุดของผลงานอื่นๆ ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันคือนักวิจัยอื่นๆ ที่ต้องการใช้ผลงานนี้ไม่สามารถเข้าถึง หรือนำไปใช้เพื่อต่อยอดในการประยุกต์ใช้ในงานอื่นๆ ได้ เพราะคลังของแอนติบอดีมนุษย์บนผิวเฟจนั้นถือเป็นผลงานประดิษฐ์คิดค้นที่มีคุณค่า และมูลค่าสูงมาก เพราะเป็นแหล่งในการสร้าง monoclonal antibody มนุษย์ หลากหลายชนิด ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการรักษาโรคมะเร็งซึ่งอาจมีมูลค่าถึงหลายแสนล้านบาท เมื่อผู้ใดสร้างขึ้นได้สำเร็จแล้ว ก็มักจะเก็บไว้ใช้เพื่องานวิจัยและพัฒนาภายในกลุ่มของตนเอง หรืออาจให้ผู้อื่นขอใช้ได้ แต่อยู่ภายใต้ข้อจำกัดที่เคร่งครัดคือเพื่อการวิจัยเท่านั้น หากต้องการจะซื้อมาใช้ก็พอจะมีอยู่บ้าง แต่จะมีมูลค่าสูงมากและไม่รับประกันว่าจะมี monoclonal antibody ต่อ antigen ที่ต้องการหรือไม่ รวมทั้งยังมีข้อจำกัดในการใช้บางประการอยู่ด้วย เช่นไม่อนุญาตให้นำไปใช้นอกห้องปฏิบัติการที่ทำสัญญาซื้อขายกัน ดังนั้นส่วนใหญ่แล้วผู้ที่ต้องการผลิตแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีนี้ จึงต้องทำการสร้างคลังไว้ใช้เอง

ส่วนข้อเสียหรือข้อบกพร่องของผลงานอื่นๆ ในเชิงวิชาการก็คือเทคโนโลยีที่ใช้ในการสร้างคลังแอนติบอดีบนผิวเฟจนั้นมีความยุ่งยากมาก ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูงเป็นจำนวนมาก รวมทั้งต้องใช้เวลานาน และสิ้นเปลืองวัสดุอุปกรณ์ เป็นจำนวนมาก นอกจากนั้นแล้วคลังที่มีคุณภาพดีนั้นมักมีขนาดใหญ่มาก คือมีจำนวนแอนติบอดีอยู่สูงถึง พันล้านถึงหมื่นล้านชนิด ทำให้ยากต่อการเก็บรักษา และมีอายุการใช้งานสั้น นอกจากนั้นแล้วคลังบางชนิดยังมีข้อจำกัดในลักษณะของชนิดของแอนติเจนที่จะใช้ เช่นคลังบางคลังไม่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อสารโมเลกุลเล็กประเภท hapten เช่น Aflatoxin ได้ ส่วนคลังบางคลังนั้นไม่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อส่วนของร่างกายได้ ส่วนคลังบางประเภทไม่ได้ใช้ DNA จากมนุษย์เป็นแหล่งในการสร้างคลัง จึงไม่สามารถนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากคลังไปใช้ประโยชน์เพื่อการรักษาได้โดยง่าย ซึ่งความบกพร่องเหล่านี้ถือเป็นลักษณะปรกติของความก้าวหน้าทางวิทยาการที่ย่อมจะมีการพัฒนาขึ้นมาเรื่อยตามความก้าวหน้าทาง วิทยาการและเทคโนโลยีทางด้านอณูชีววิทยา ซึ่งผลงานประดิษฐ์คิดค้นของข้าพเจ้านั้นถือเป็นความก้าวหน้าขั้นเล็กๆ อีกขั้นหนึ่งในงานวิจัยทางด้านวิศวกรรมแอนติบอดี ซึ่งได้เริ่มต้นขึ้นมาตั้งแต่

ต้นทศวรรษที่ผ่านมานี้

ดังนั้นจึงเห็นว่าคลังที่สร้างขึ้นมาในโครงการวิจัยนี้ และองค์ความรู้ใหม่คือวิธีการสร้างคลังขนาดกระทัดรัด ที่มีประสิทธิภาพสูงนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อวงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และเทคโนโลยีชีวภาพ หลายสาขา รวมทั้งทางนาโนเทคโนโลยีในอนาคตต่อไป

บทที่ 4

สรุป

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) เป็นอย่างดี โดยในขั้นแรกได้ทำการพัฒนาวิธีการที่สะดวก ประหยัด รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูงในการคัดหา แอนติบอดีจากคลังของฟาจ รวมทั้งได้ทำการสร้างเวคเตอร์ หรือ ฟาจมิด ซึ่งสำหรับใช้ในการสร้างคลังขึ้นมาใหม่ เรียกเวคเตอร์นี้ว่า pMod1 จากนั้นจึงได้ทำการสร้างคลังของฟาจโดยใช้เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ทั้งชายและหญิงรวม 140 คน ในจังหวัดนครราชสีมา เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนแอนติบอดีส่วนที่มีความแปรปรวนสูง โดยการสังเคราะห์เริ่มจากการสกัด mRNA แล้วสร้างเป็น cDNA ก่อนที่จะนำมาเพิ่มจำนวนเป็น DNA ของชิ้นแอนติบดีส่วนต่างๆ ด้วยวิธีการ PCR รวมทั้งสิ้น 75 ปฏิกิริยา จากนั้นจึงนำชิ้น DNA ที่เหมาะสมมารวมกันเข้าเป็น แอนติบอดีส่วน scFv ด้วยวิธีการ PCR ก่อนที่จะนำไปโคลนเข้าเวคเตอร์ pMod1 เพื่อสร้างเป็นคลังของฟาจที่สมบูรณ์ โดยจากการวิเคราะห์พบว่าคลังของฟาจที่แสดง monoclonal antibody ของมนุษย์ ส่วน scFv ที่ได้สร้างขึ้นนั้นมีขนาดความหลากหลายสูงถึง $1.5x10^8$ ชิ้น และมีศักยภาพสูงในการนำไปคัดหา antibody ต่อ แอนติเจน (antigen) ชนิดต่างๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ทั้งที่เป็น โปรตีนบริสุทธิ์ (BSA, GST) เป็นสารโมเลกุลเล็กประเภท hapten คือสาร อะฟลาทอกซิน และสารที่มีความสลับซับซ้อนสูง ได้แก่ พิษงูเห่า และผิวเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนั้นแล้วจากการวิเคราะห์ลำดับเส้น DNA ของยีนส่วน scFv เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของแอนติบอดีในคลัง พบว่าแอนติบอดีมีความหลากหลายสูงใกล้เคียงกับลักษณะของแอนติบอดีที่พบในธรรมชาติ ซึ่งเป็นหลักฐานที่ช่วยยืนยันประสิทธิภาพของคลังที่ได้สร้างขึ้นนี้ (37) ซึ่งผู้วิจัยได้ตั้งชื่อว่า คลัง "ย่าโม๑" ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัย และการประยุกต์ใช้ในทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพด้านต่างๆได้อย่างกว้างขวางต่อไป

บรรณานุกรม

1. McCullough KC, Spier RE. Monoclonal Antibodies in Biotechnology: Theoretical and Practical Aspects. 1st ed. Cambridge University Press; 2009.
2. An Z. Handbook of Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic. Wiley; 2009.
3. Goding JW, service S(. Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry and immunology. Academic Press; 1996.
4. Wingren C, Borrebaeck CAK. Antibody-based microarrays. Methods Mol. Biol. 2009 ;50957-84.
5. Rader C, Cheresh DA, Barbas CF. A phage display approach for rapid antibody humanization: Designed combinatorial V gene libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998 Jul 21;95(15):8910-8915.
6. Almagro JC, Fransson J. Humanization of antibodies. Front. Biosci. 2008 ;131619-1633.
7. Dübel S. Recombinant therapeutic antibodies. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Mar ;74(4):723-729.
8. Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden, Matthew C Dewitz. Monoclonal antibody successes in the clinic [Internet]. 2005 Sep 1;[cited 2009 May 7] Available from: https://pisces.boku.ac.at/han/3155_0/www.nature.com/nbt/journal/v23/n9/abs/nbt0905-1073.html
9. Kehoe JW, Kay BK. Filamentous phage display in the new millennium. Chem. Rev. 2005 Nov ; 105(11):4056-4072.
10. Kay BK, Winter J, McCafferty J. Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual. 1st ed. Academic Press; 1996.
11. Rodi DJ, Makowski L, Kay BK. One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies. Curr Opin Chem Biol. 2002 Feb ;6(1):92-96.
12. Khandare JJ, Minko T. Antibodies and peptides in cancer therapy. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2006 ;23(5):401-435.
13. Petrenko V. Evolution of phage display: from bioactive peptides to bioselective nanomaterials. Expert Opin Drug Deliv. 2008 Aug ;5(8):825-836.
14. Wängler C, Buchmann I, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W. Radiolabeled peptides and proteins in cancer therapy. Protein Pept. Lett. 2007 ;14(3):273-279.
15. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science. 1985 Jun 14;228(4705):1315-1317.
16. O'Brien PM, Aitken R. Antibody phage display. 2002.
17. Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nat. Biotechnol. 2005 Sep ;

23(9):1105-1116.

18. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. Annu. Rev. Immunol. 1994 ;12433-455.

19. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature. 1990 Dec 6;348(6301):552-554.

20. Hoogenboom HR, de Bru¨ne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. Immunotechnology. 1998 Jun ;4(1):1-20.

21. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J. Mol. Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-597.

22. Hoogenboom HR, Winter G. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. J. Mol. Biol. 1992 Sep 20;227(2):381-388.

23. de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, et al. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. J. Biol. Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-18230.

24. Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, et al. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. EMBO J. 1994 Feb 1;13(3):692-698.

25. Goletz S, Christensen PA, Kristensen P, Blohm D, Tomlinson I, Winter G, et al. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. J. Mol. Biol. 2002 Feb 1;315(5):1087-1097.

26. Nahary L, Benhar I. Design of a human synthetic combinatorial library of single-chain antibodies. Methods Mol. Biol. 2009 ;52561-80, xiv.

27. Bradbury A, Velappan N, Verzillo V, Ovecka M, Chasteen L, Sblattero D, et al. Antibodies in proteomics II: screening, high-throughput characterization and downstream applications. Trends Biotechnol. 2003 Jul ;21(7):312-317.

28. Thie H, Voedisch B, Dübel S, Hust M, Schirrmann T. Affinity maturation by phage display. Methods Mol. Biol. 2009 ;525309-322, xv.

29. Arnold FH, Georgiou G. Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols. 1st ed. Humana Press; 2003.

30. Yang WP, Green K, Pinz-Sweeney S, Briones AT, Burton DR, Barbas CF. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. J. Mol. Biol. 1995 Dec 1;254(3):392-403.

31. Chowdhury PS, Pastan I. Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. Nat. Biotechnol. 1999 Jun ;17(6):568-572.

32. Sheedy C, MacKenzie CR, Hall JC. Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies. Biotechnol. Adv. 2007 Aug ;25(4):333-352.

33. Schier R, McCall A, Adams GP, Marshall KW, Merritt H, Yim M, et al. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. J. Mol. Biol. 1996 Nov 8;263(4):551-567.

34. Fermér C, Andersson I, Nilsson K, Nilsson O. Specificity rescue and affinity maturation of a low-affinity IgM antibody against pro-gastrin-releasing peptide using phage display and DNA shuffling. Tumour Biol. 2004 Apr ;25(1-2):7-13.

35. Thie H, Meyer T, Schirrmann T, Hust M, Dübel S. Phage display derived therapeutic antibodies. Curr Pharm Biotechnol. 2008 Dec ;9(6):439-446.

36. Sidhu SS. Phage Display In Biotechnology and Drug Discovery. 1st ed. CRC; 2005.

37. Pansri P, Jaruseranee N, Rangnoi K, Kristensen P, Yamabhai M. A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. BMC Biotechnol. 2009 ;96.

38. Janeway C. Immunobiology. 6th ed. Garland Science; 2004.

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ

Pansri P, Jaruseranee N, Rangnoi K, Kristensen P, Yamabhai M. **A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens**. BMC Biotechnol. 2009 ;96.

หมายเหตุ: ผลงานนี้ถูกจัดให้เป็น "Highly Accessed" article เนื่องจากมีผู้สนใจเข้าไป "download" ผลงานเป็นจำนวนสูงมาก คือมีมากกว่า 1,000 ครั้งใน 30 วันแรกที่ได้รับการตีพิมพ์ online

ผลงานการนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติ/นานาชาติ

Montarop Yamabhai, Potjamas Pansri, Nanthnit Jaruseranee, and Suphap Emrat. Phage display technology for the study of molecular interactions. Second Protein Research Network Symposium on Proteins: Structure, Function, and Proteomics. Conference Center, Chulabhorn Research Institute, 22-23 September, 2005, Bangkok, Thailand. (poster)

Nanthnit Jaruseranee, Potjamas Pansri, Suphap Emrat, and Montarop Yamabhai. Isolation of specific binding peptides by phage display technology (การค้นหาเปปไทด์ที่จับอย่างจำเพาะโดยใช้เทคโนโลยีการแสดงเปปไทด์บนผิวฟาจ). 31st Congress on Science and Technology of Thailand 18th-20th Oct. 2005. Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thaialnd. (oral)

Pansri, P. , Rangnoi, K. and Yamabhai, M., Production of ScFv Antibody Against Rabies Virus by Phage Display Technology. The 11th Biological Sciences Graduate Congress "Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable Development, and Secured Future" December 15-17, 2006 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. (oral)

Jaruseranee, N., Pansri, P., Sukasam, S.and Yamabhai, M., Phage Displayed Alpha-amylase. The 11th Biological Sciences Graduate Congress "Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable Development, and Secured Future" December 15-17, 2006 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. (oral)

การถ่ายทอดเทคโนโลยี

การจัดการประชุมเชิงปฏิบัติการระดับนานาชาติ เรื่อง "SUT WORKSHOP ON PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY : Screening of Peptide and Antibody Libraries" ในระหว่างวันที่ 20-24 กุมภาพันธ์ 2549 ซึ่งมีผู้สนใจเข้าร่วมภาคปฏิบัติการ 25 คน และภาคทฤษฎีประมาณ 100 คน โดยมีวิทยากรผู้เชี่ยวชาญจากต่างประเทศ 2 ท่านเป็นผู้ร่วมบรรยาย รายละเอียดการประชุมสามารถหาดูได้ที่

http://www.sut.ac.th/iat/biotech/PhDWorkshop/ การประชุมประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีมาก (ประเมินจากแบบสอบถาม)

ผลงานทางวิชาการอื่นๆ

เอกสารประกอบการสอน

เรื่อง "**เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ**" (2546) โดย มณฑารพ ยมาภัย พิมพ์ที่สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มทส จำนวน 20 หน้า สำหรับรายวิชา 304532 Selected Research Tchcnique และ 304513 Applied Microbiology

เอกสารคำสอน

เรื่อง "**การผลิต โมโนโคลนอล แอนติบอดี ด้วยเทคโนโลยีฟาจ**" โดย มณฑารพ ยมาภัย พิมพ์ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จำนวน 109 หน้า สำหรับรายวิชา 304 532 Selected Research Techniques รวมทั้งรายวิชา 304 512 Molecular Biology and Recombinant DNA Technology, รายวิชา 304515 Molecular Cell Biology, และรายวิชา 304561 Current Issues in Biotechnology

e-course

Phage Display Technology โดย ผศ.ดร.มณฑารพ ยมาภัย SUT eCourseware สำหรับรายวิชา Selected research techniques

การผลิตบัณฑิต

นางสาว พจมาศ แพนศรี นักศึกษาระดับปริญญาเอก หัวข้อวิทยานิพนธ์เรื่อง "การผลิตแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีฟาจ" สอบผ่านวิทยานิพนธ์ระดับ "ดีเยี่ยม" เมื่อ เดือนสิงหาคม 2551

Clone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	Germline	Amino acid different from germline	Family
VH									
1	QVQLQQSGPGLLKPSQTL SLTCAISGDSVS	SKGPAWN	WIRQSPSRGLEWLG	RTYYWSGWRHDYAP SLQS	RITINPDTSKNQFSLQLNSVTP DDTAVYYCAR	GRDSGFDI	IGHV6-1*01 (DP74)	12	VH3
2	VQLVESGGGLVKPGGSLR LSCEASGFA FS	SYNMN	WLRQAPGKGLEWVS	SMSPSGRDIFYPES LKG	RFTASRDNARNSLYLQMNSLRV EDTAMYYCVR	STLLEIAGKSPGLD M	IGHV3-21*01 (DP77)	20	VH3
3	QVNLRESGPTQVKPTQAL TLTCTVSGVSLS	TSGVGVG	WLRQAPGKGLEWL A	LLYWDDDTRYNPSL KT	RLAITRGSSRDQVVLTVTNVDP SDTGTYFCAH	RRSGLLVFGIRDAF DI	IGHV2-5*09 (S12-2)	24	VH2
4	VQLQQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFS	SYAIS	WVRQAPGQGLEWMG	GIIPIFGTANYAQK FQG	RVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAR	VRDTAMEFFDY	IGHV1-69*12 (DP10)	2	VH1
5	QVQLQQSGPGLVKPSETL SLTCIVSGGSIT	SYSWS	WTRQPAGQGLEWIG	RIYNGGSTNYNPSL KS	RVTMSLDTSKNQFSLRLSSVTA ADTAVYYCAR	GPYGTGSQCHVFDP	IGHV4-4*07 (VIV4)	2	VH4
6	QVQMQESGAGLLNPLETL SLTCIVYGGSVS	NHYYYGS	RIRQPPGKGQEWFA	YIHYTETTNYNPSL KS	RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTA ADTAVYYCAR	VDILSGMRHF	IGHV4-61*08 (DP66)	19	VH4
7	EVQLVESGAEVRRPGESL TISCRGSGDTFP	KHWIA	WVRQMPGKGLEWLG	RIDPSDSYTNYNPS FQG	HVSISADQSISTVYLQWSSPKA SDTALYYCAR	LTCRTTSCYTDNWS DA	IGHV5-a*01 (VH32)	17	VH5
8	QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVS	SNSAAWN	WIRQSPSRGLEWLG	RTYYRSKWYNEYAL SVKS	RLTINPDTSKNQFSLILNSVTP EDSAVYYCAT	WRFDY	IGHV6-1*01 (DP74)	5	VH6
9	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFS	SYEMN	WVRQAPGKGLEWVS	YISSSGSTIYYADS VKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR	VSLDTAGDAFDI	IGHV3-48*03 (DP58)	0	VH3
10	VQLVQSGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGSGGSTYYADS VKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAK	DNIEMVRGVMLYYY YYMDV	IGHV3-23*04 (DP47)	1	VH3
VL									
1	DIQMTQSPDSLAVSLGER ATINC	KSSQSVLFSS NNKHHLA	WYQQKRGLPPKLLI F	WASTRES	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYC	QQYQSIPHT	IGKV4-1*01 (DPK24)	9	VK4
2	SSELTQDPAVSVALGQTV RITC	QGDSLRTYYA S	WYQQKPGQAPVLVI Y	GKNNRPS	GIPDRFSGSSSGNTASLTITGA QAEDEADYYC	NSRDSSDNHVV	IGLV3-19*01 (DPL16)	2	VL3
3	EIVLTQSPGTVSLSPGQR VTLSC	RASQSVRGSF FA	WYQQKPGQAPRLL IH	GASSRAT	GIPDRFDGSGSGTDFTLSISRL ETEDFAVYYC	QQYGTSPYT	IGKV3-20*01 (DPK22)	12	VK3
4	QSALTQPASASGSPGQSV TISC	TGTISDIGAH ELVS	WYQQPPGKAPKLII F	EVSKRAS	GVPDRFSGSKSGNAASLTISGL QADDEADYFC	CSSTNKNNFAVE	IGLV2-8*01 (V1-2)	19	VL2
5	QAVLTQPSSLSASPGSSA SLTC	TLRSDFDVRS YRIY	WYQQKPGSPPQYLL R	FKSDSEKHRGS	GVPSRFSGSKDASANAGILLIS GLQFDDEADYYC	MIYYNMASE	IGLV5-45*03 (V4-2)	16	VL5
6	EIVLTQSPLYLPVTPGEP ASISC	RSSQSLLHSN GYNYLD	WYVQKPGQSPQLLI Y	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLEISRV EAEDVGVYYC	MQALQTPK	IGKV2D-28*01 (DPK15)	5	VK2
7	QAVLTQPSSLSASPGASA SLTC	TLRSGIDVAA YRIY	WYQQKPGSPPQYLL R	YKSDSDKQQGS	GVPSRFSGSKDASANAGILLIS GLQSQDEADYYC	AIWHNSAWV	IGLV5-45*03 (V4-2)	6	VL5
8	LTQPPSVSVSAGQTVSIT C	SGENLQKIYV S	WYQQKPGQSPILVI Y	KDNKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTVSGA LAADEADYYC	QTWDIDTAL	IGLV3-1*01 (DPL23)	23	VL3
9	SSELTQDPAVSVALGQTV TITC	QGESLRNYFA S	WYQQKPGQAPILVM Y	DEDIRPS	GIPDRFSGSSSEKTASLTITGV QAEDEADYYC	KCRGSGGDHLEIL	IGLV3-19*01 (DPL16)	19	VL3
10	NFMLTQPHSVSESPGKTV TISC	TRSSGFIDTN YVQ	WYQQRPGSAPTPVI Y	ESKQRPS	GVPVRFSGSVDISSNSASLTIS GLETEDEADYYC	QSFDSNKLFV	IGLV6-57*01 (V1-22)	13	VL6

ประวัตินักวิจัย

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ 8 มกราคม 2510 เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. 2532 แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา 1 ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี 2536 ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา 9 เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. 2541 จากนั้นในปี พ.ศ. 2543-2545 ได้ไปทำ post-doctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. 2546-2547 ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Insititute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2547 และมีบุตร 1 คน ชื่อ ดญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นรองศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยหลักที่ทำในปัจจุบันคือ การประยุกต์ใช้หลัก อณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยใช้เทคโนโลยีฟาจ (phage display technology) และ เทคนิคการกำกับวิวัฒนาการ (directed evolution) เป็นหลัก

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทร 044 224152-4, 224388 แฟกซ์ 044 224150, 224254

Email: montarop@g.sut.ac.th