รหัสโครงการ SUT3-304-55-12-33

รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคการคัดหาเฟจจากคลังและการพัฒนาคลังชนิดทุติยภูมิ เพื่อการประยุกต์ใช้ทางการเกษตร

Development of Biopanning technique and Immunized Library for Agricultural Applications

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-55-12-33

รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคการคัดหาเฟจจากคลังและการพัฒนาคลังชนิดทุติยภูมิ เพื่อการประยุกต์ใช้ทางการเกษตร

Development of Biopanning technique and Immunized Library for Agricultural Applications

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

อ. ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

รศ.ดร. สุรินทร บุญอนันธนสาร

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผศ. ดร. ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2555 โดยมีกรรมการจากวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติเป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตงานวิจัยของคณาจารย์ใน มทส ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยวิจัย ทั้ง 3 ท่านคือ นายวิษณุ ศรีลา, นางสาวณัชชา พฤกษาเมธานันท์, นางสาวกีรณา อยู่หัตถ์ และ นักศึกษา 2 ท่าน คือ นาย เหงียน ซวน วู นักศึกษาปริญญาเอก และนางสาว เพ็ญสุดา สมภูงา นักศึกษาปริญญาโท รวมทั้ง นางสาว มิชลิส ฮันนา และนางสาว มาเรีย หลุยส์ พุป นักศึกษาแลกเปลี่ยนจากออสเตรีย ที่ได้ร่วมมือกันทำการวิจัยในส่วนต่างๆ อย่างแข็งขันจนสำเร็จลุล่วงเป็นผลดี อีกทั้งขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการ เป็นอย่างดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

เป้าหมายที่ใช้เป็นแบบจำลองในการดำเนินการวิจัยนี้ คือ แบคทีเรียที่มีคุณประโยชน์ต่อพืช ได้แก่ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในกลุ่ม Bradyrhizobium โดยได้ทำการพัฒนาวิธีการคัดหาเฟจจากคลังแอนติบอดีมนุษย์ย่าโม 1 พบว่าสามารถผลิตแอนติบอดีที่จับกับ Bradyrhizobium ได้อย่างจำเพาะเจาะจง 2 ชนิดคือ แอนติบอดีจับจำเพาะ DOA9 และ SUT9-2 ส่วนในด้านการสร้างคลังนั้น ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างคลังทุติยภูมิ โดยใช้กระต่ายเป็นแหล่งในการผลิตแอนติบอดี โดยเริ่มตั้งแต่การกระตุ้นให้กระต่ายผลิตแอนติบอดี จากนั้น สกัดเอา mRNA จากม้ามมาเป็นแหล่งของยีนสำหรับสร้างแอนติบอดีบนผิวเฟจ ซึ่งวิธีการสร้างคลังแอนติบอดีกระต่ายบนผิวเฟจนั้น ใช้ในแนวทางเดียวกับการสร้างคลังแอนติบอดีมนุษย์ แต่ต้องมีการปรับวิธีการให้เหมาะสมสำหรับแอนติบอดีกระต่าย ผลการศึกษาคุณสมบัติคลัง พบว่าเป็นแหล่งที่ดีในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Bradyrhizobium เช่นเดียวกัน จากนั้นได้ทำการยืนยันความสามารถของแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมทั้งหมดที่ได้พัฒนาขึ้นในการจับกับเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งได้ทำใน 2 รูปแบบ คือ ทั้งการแสดงผลทั้งบนจานปฏิกิริยาและจากรูปถ่ายเรืองแสง ซึ่งเป็นที่น่ายินดีว่าแอนติบอดีที่คัดหามาได้นั้นสามารถจับได้อย่างเจาะจงกับทั้งแบคทีเรียในรูปอิสระ และแบคทีเรียที่กลายรูปไปแล้วเมื่อไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่ว ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า วิธีการคัดหาเฟจจากคลังและการสร้างคลังแอนติบอดีจากกระต่ายที่ได้ค้นคว้าวิจัยขึ้นมานี้มีประสิทธิภาพดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการเกษตรอื่นๆ ได้ต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

The objectives of this research were to develop an efficient method for the bio-panning of phage display antibody library and the construction of immunized phage display antibody library for agricultural applications. The targets that were used as models in this study are nitrogen-fixing bacteria in the group of Bradyrhizobium, which are beneficial for plants. The efficient bio-panning method for the selection of specific recombinant antibody against strain DOA9 and SUT9-2 from human scFv phage display library (Yamo1) was successfully developed. As for the construction of immunized phage display antibody library, rabbit was immunized with strain DOA9, and then the mRNA was extracted from spleen and used as template for synthesis of scFv antibody on the phage coat protiens. The method that was used for the construction of the library was based on our previous method that has been used successfully in our laboratory to build human antibody library; however several modification had been made to allow the construction of the rabbit library. The result from biopanning of immunized rabbit library indicated that the library was a good source for the production of specific antibody against Bradyrhizobium as well. To confirm specific binding of all recombinant antibodies that had been generated, two independent methods were performed. The first method was based on Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the second method was based on Immunofluoresecent (IF) analysis. Fortunately, our results indicated that these selected antibodies could bind not only to free form of the bacteria in pure culture but also to bacteroid inside the plant nodule. In conclusion, these results indicated that the bio-panning strategy and the method for the construction of phage display antibody from immunized rabbit that have been developed in this research project are efficient and can be further applied for other agricultural applications in the future.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ **3**

บทคัดย่อภาษาไทย **4**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ **5**

สารบัญ **6**

บทที่ 1 : บทนำ **8**

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 8

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 8

ขอบเขตของการวิจัย 8

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 9

บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรม และ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง **10**

โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) 10

คลังของแอนติบอดีบนผิวเฟจ (PHAGE ANTIBODY LIBRARY) 13

บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย **18**

3.1 การพัฒนาวิธีการคัดหาคลังจากเฟจ (biopanning) 18

วิธีการคัดหาคลังจากเฟจ 18

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการจับของเฟจกับเป้าหมายด้วยวิธีการ *Phage ELISA* 21

การวิเคราะห์โครงสร้าง 3 มิติ ของแอนติบอดีจากเฟจที่คัดหามาได้ 22

3.2 การสร้างคลัง antibody ส่วน scFv จากกระต่าย และการคัดหาแอนติบอดี (biopanning) 24

ขั้นที่ 1 การสกัด Total RNA จากม้าม 24

ขั้นที่ 2 การสร้าง cDNA ของ immunoglobulin heavy chain (HC) และ light chain (LC) 25

ขั้นที่ 3 การสังเคราะห์ variable heavy (VH) และ variable light (VL) 26

ขั้นที่ 4 การสร้างเป็นชิ้น scFv 29

ขั้นที่ 5 การเชื่อม scFv เข้ากับ vector (ligation) 30

ขั้นที่ 6 การ transform recombinant vector เข้าสู่ *E. coli* 32

ขั้นที่ 7 การสร้างเป็นคลังของเฟจที่แสดง scFv (Rescuing phagemid library) 34

ขั้นที่ 8 การทำ immunofluorescence assay 35
ผลการทดลอง 36
ผลการทำ PCR 36
ผลการทำ biopanning จากคลังกระต่าย 36
ผลการทำ phage ELISA เพื่อแสดงความจำเพาะในการจับกับเป้าหมาย 37
ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 3 มิติ 37
ผลการวิเคราะห์ด้วยภาพเรืองแสง (Immunofluorescent) 38
การผลิต antibody ให้มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการค้นคว้าวิจัยทางการเกษตรเป็นโมเลกุลเดี่ยวๆ (soluble form) 39
วิธีการ 39
ผลแสดงการผลิต free scFv 41
บทที่ 4 : บทสรุป 42
สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย 42
ข้อเสนอแนะ 43
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย 44
ภาคผนวก 52
ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน 52
1. ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ 52
ภาคผนวก ข การผลิตบุคลากร 53
ประวัติผู้วิจัยหลัก 54

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1 : บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในปัจจุบันการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับเทคโนโลยีการผลิต antibody และการทำวิศวกรรม antibody บนผิวเฟจนั้น ส่วนใหญ่เป็นการค้นคว้าเพื่อการพัฒนาและวิจัยทางด้านการแพทย์แทบทั้งสิ้น มีการวิจัยเพียงส่วนน้อยที่มุ่งเน้นเพื่อการศึกษาและวิจัยด้านการเกษตร ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาแนวทางการคัดหาแอนติบอดี หรือ biopanning ที่เหมาะสมกับ การคัดหา antibody ต่อ antigen ชนิดต่างๆ ที่มีความสำคัญทางการเกษตร ก่อน นอกจากนั้นแล้ว โครงสร้างของ antibody เพื่อการประยุกต์ใช้ในการเกษตรนั้น ไม่จำเป็นต้องเป็น antibody ของมนุษย์ เพราะมีวัตถุประสงค์เพื่อเอาไว้ใช้ในการ ตรวจ วิเคราะห์ และเหตุที่โดยส่วนใหญ่แล้ว antibody ที่ใช้สำหรับการเกษตรในปัจจุบันนั้น จะทำโดยวิธีการดั้งเดิม คือการเตรียมจากสัตว์ต่างๆ โดยเฉพาะกระต่าย ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ จึงต้องการพัฒนาวิธีการผลิตคลัง monoclonal antibody ของกระต่ายด้วยเทคโนโลยีเฟจ เพราะสามารถทำได้ง่าย คือใช้เม็ดเลือดที่เหลือจากการปั่นเอา polyclonal clonal antibody ออกไปใช้แล้วมาเป็นต้นแบบในการสร้างคลังแบบทุติยภูมิ ซึ่งแนวทางการทำวิจัยเช่นนี้ยังไม่เคยมีมาก่อน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการผลิต monoclonal antibody แนวใหม่สำหรับการค้นคว้าวิจัยเชิงเกษตรที่ไม่ต้องพึ่งสัตว์ทดลองและมีราคาถูกกว่าวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยแบ่งเป็นการพัฒนา 2 ด้าน คือ

3.1 การพัฒนาเทคนิคการคัดหาเฟจจากคลัง

3.2 การพัฒนาคลังชนิดทุติยภูมิ จากสัตว์ทดลอง

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการคัดหาเฉพาะ antibody ส่วน single chain fragment valiable (scFv) จาก คลังแอนติบอดีมนุษย์ “ย่าโม 1” และทำการสร้างคลัง antibody ส่วน single chain fragment valiable (scFv) จากกระต่าย โดยใช้ antigen ที่ได้จากโครงการวิจัยการใช้เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจเพื่อการตรวจสอบและติดตามปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม, โครงการการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจเพื่อการตรวจสอบและการสำรวจโรคเน่าเละจากแบคทีเรียของพืชผักตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย หรือโครงการการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการผลิตแอนติบอดีบนผิวเฟจการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการผลิตแอนติบอดีบนผิวเฟจเพื่อผลิตแอนติบอดีของเมลาโนไซต์สติมูเลติงฮอร์โมนสำหรับการศึกษาทางสรีรวิทยาของความเครียดและการเพิ่มการกินได้ในปลานิล ตามความเหมาะสม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แนวทางหลักในการทำ biopanning และการสร้างคลั สำหรับการผลิต monoclonal antibody เพื่อการวิจัยทางการแพทย์ สามารถนำมาปรับปรุงและพัฒนา เพื่อใช้ในการวิจัยทางการเกษตรได้ หากมีการรวมกลุ่มของนักวิจัยที่เหมาะสม เหตุที่ในปัจจุบันไม่มีผู้สนใจทำการวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคโนโลยีนี้ ทางการเกษตรกันมากนัก เป็นเพราะค่าตอบแทนจากการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ มีมากกว่าทางการเกษตรหลายเท่า และมีนักวิจัยทางการเกษตรที่มีความเชี่ยวชาญทางเทคโนโลยีเฟจไม่มากนัก การจัดตั้งกลุ่มวิจัยที่รวมเอาผู้เชี่ยวชาญหลายสาขาทั้งด้านอณูเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านปุ๋ยชีวภาพ ด้านการผลิตสัตว์น้ำ และโรคพืช เช่นนี้ เป็นโอกาสอันดีที่จะได้พัฒนางานทางด้านนี้ให้สำเร็จ และเป็นประโยชน์ต่อวงการวิจัยด้านการเกษตร ทั้งในและต่างประเทศต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรม และ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody)

เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีคุณประโยชน์ต่อการค้นคว้าและวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงต่างๆ อย่างยิ่ง [1-3] นอกจากนั้นแล้ว monoclonal antibody ยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นสารตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูง [4-10] รวมทั้งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรค [3, 10-12] ทั้งนี้เพราะ monoclonal antibody สามารถจับกับเป้าหมาย หรือ แอนติเจน (antigen) ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นผลงานของธรรมชาติที่ผ่านการวิวัฒนาการมาหลายร้อยล้านปี หน้าที่หลักของ antibody ในสิ่งมีชีวิตคือการเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย [13] จากความเข้าใจในกลไกการทำงานของธรรมชาติในด้านนี้เอง จึงทำให้มนุษย์สามารถประยุกต์ใช้ความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์นี้ ในการสร้างเป็นเทคโนโลยีการผลิต antibody ชนิดต่างๆ ซึ่งมีประโยชน์ทั้งในการศึกษาวิจัย และการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งการรักษาโรค ในชั้นต้น antibody สามารถผลิตได้จากการฉีดสาร antigen เข้าไปในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ เช่น กระต่าย ม้า โค แพะ แล้วสกัด เอา antibody ซึ่งมีลักษณะเป็นโพลิโคลนอล (polyclonal antibody) ออกมาจากซีรั่ม [2] ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการผลิต antibody อีกชนิดหนึ่งคือ monoclonal antibody [14] วิธีการทั่วไปที่ใช้ในการผลิต monoclonal antibody นั้น ทำได้โดยการฉีดแอนติเจน (antigen) เข้าไปในหนูเพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อ antigen ชนิดนั้นๆ จากนั้นจึงใช้เทคนิคการสร้างเซลล์ผสม (hybridoma technology) เพื่อผลิตเป็น monoclonal antibody ชนิดต่างๆกัน เซลล์ผสมที่ถูกสร้างขึ้นให้มีความสามารถในการผลิต monoclonal antibody นั้น สามารถเก็บรักษาไว้ให้เป็นแหล่งผลิต monoclonal antibody ที่มีเอกลักษณ์ในความจำเพาะเจาะจง (unique specificity) ได้ตลอดไป การผลิต monoclonal antibody ชนิดหนึ่งๆ แต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลานาน ประมาณ 4-5 เดือนขึ้นไป และการลงทุนสูง ทั้งยังต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูง รวมทั้งยังต้องเกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองคือหนูอีกด้วย นอกจากการผลิต monoclonal antibody โดยวิธีการดั้งเดิมจะมีความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายที่สูงแล้ว ยังมีข้อจำกัดที่เกิดจากเทคโนโลยีนี้หลายอย่างเช่น ข้อจำกัดเกี่ยวกับชนิดของ antigen ที่จะใช้ เพราะต้องเป็น antigen ที่ไม่เป็นพิษต่อหนูทดลอง และต้องไม่เป็น antigen ที่คล้ายกับ antigen ของหนู เช่น antigen ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในขั้นต้นของลำดับการวิวัฒนาการ (conserved antigens) หรือใช้ได้เฉพาะกับ antigen ที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunogenecity) ได้เท่านั้น รวมทั้งผลที่ได้จากการกระตุ้นหนูทดลองยังมีความแปรปรวนสูงขึ้นกับสุขภาพของหนูแต่ละตัว ข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือจำนวนชนิดของ antigen ที่จะใช้ในการสร้าง monoclonal antibody เพราะ โดยปกติการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen แต่ละชนิดมักต้องใช้หนูทดลอง 3-5 ตัวขึ้นไป ในยุคปัจจุบันซึ่งเป็นยุคหลังการค้นพบลำดับ ยีโนมมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด (post-genomic era) ความสำคัญในการศึกษาวิจัยจึงมุ่งไปสู่การศึกษาการทำงานของยีโนม หรือโปรตีน (functional genomics หรือ proteomics) [15-25] ซึ่งการวิจัยเหล่านี้จำเป็นต้องเกี่ยวกับโปรตีนจำนวนมาก การสร้าง monoclonal antibody จำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีนหลายชนิดพร้อมๆกันโดยวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงเป็นไปไม่ได้ หรือต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody อีกประการหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอยู่มากในปัจจุบันนี้ ได้แก่ การนำ monoclonal antibody ที่ผลิตได้จากหนูไปปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมือนของมนุษย์ (humanization) [26-31] เพื่อให้สามารถใช้ในการบำบัดโรคต่างๆ (human therapy) ปัจจุบันมี monoclonal antibody ที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายประเภทออกจำหน่ายแล้ว [32, 33] การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody เพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้นับวันจะมีความสำคัญและได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงเป็นการดีที่จะใช้เทคโนโลยีอื่นในการผลิต monoclonal antibody ที่ไม่ยุ่งยากและรวดเร็วกว่าวิธีการ hybridoma ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ หรือเทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) เป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความสนใจ และได้รับการพัฒนาเป็นอย่างยิ่งในช่วงเวลา 20 กว่าปีที่ผ่านมานี้ ทั้งนี้เป็นเพราะเทคโนโลยีนี้มีข้อเด่นที่สำคัญคือสามารถคัดเลือกได้ทั้งยีนและโปรตีนจากยีนนั้น ที่มีความสามารถในการมีอันตรกริยา (interaction) ที่ต้องการได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการคัดเลือกความสามารถในการจับกับสารเป้าหมาย (target) ที่สะดวกและรวดเร็ว ภายในห้องทดลอง (*in vitro*) [34-37] โปรตีนที่กล่าวมานี้อาจเป็นเปบไทด์ (peptide) เส้นสั้นๆ [34, 38, 39] หรือโปรตีนขนาดต่างๆ กันตั้งแต่ความยาว 7-500 กรดอะมิโน [35, 38] รวมทั้ง antibody ประเภทต่างๆ [40, 41] ดังนั้นจึงพบว่าได้มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการศึกษาการมีอันตรกริยาระหว่างโปรตีนหลายประเภท เช่น การจับกันของเปบไทด์กับโปรตีนโดเมนชนิดต่างๆ [42] หรือการใช้เป็นแหล่งคลังของ cDNA เพื่อใช้ในการคัดหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา [36] คลังของเฟจที่แสดงเปบไทด์เส้นสั้นๆ ยังถูกใช้เป็นแหล่งในการหาตัวกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ [43, 44] เปบไทด์เส้นสั้นๆที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการพัฒนายา (drug lead) ต่อไปได้ [45-49]

การให้ความสนใจที่จะนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจมาใช้เป็นแหล่งในการผลิต monoclonal antibody นั้นได้เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี 2533 [50] โดยในขั้นแรกเป็นการสร้างคลังของ antibody จากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย antigen แล้ว โดยทำการแสดงเฉพาะส่วนของ antibody ที่มีหน้าที่ในการจับคือ ส่วน Fab [51, 52] หรือ สร้างเป็น antibody เส้นเดี่ยวที่มีเฉพาะส่วนที่มีหน้าที่ในการจับ เรียกว่าส่วน single chain variable fragments (form), scFv [50] antibody เหล่านี้จะถูกแสดงบนโปรตีนที่ปกคลุมผิวชนิดรอง (pIII) พบว่ามีความสำเร็จจากการใช้คลังเหล่านี้ในการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen หลายชนิด [40, 53-60] แต่ข้อจำกัดประการสำคัญของการใช้วิธีการนี้คือต้องทำการกระตุ้นสัตว์ทดลองก่อนจึงเป็นการเสียเวลา และยังเป็นคลังที่มีเฉพาะ antibody ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย antigen ที่ใช้ อย่างไรก็ตามความสำเร็จนี้นับเป็นเครื่องชี้ว่าสามารถนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจมาใช้ในการคัดเลือกและผลิต monoclonal antibody ที่มีความสามารถในการจับอย่างมีความเฉพาะเจาะจงสูงได้จริง

การพัฒนาก้าวสำคัญที่ทำให้การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจในการผลิต monoclonal antibody เป็นที่แพร่หลายและได้รับความสนใจเป็นอย่างสูง ทั้งในงานวิจัยขั้นพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ เริ่มต้นในเวลา 2 ปีต่อมา เมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถสร้างคลังของ monoclonal antibody จากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนได้สำเร็จ (nonimmune library หรือ naïve library) [61] คลังชนิดนี้สามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยได้กว้างขวางกว่าคลังที่สร้างจากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนหลายเท่า เพราะสามารถใช้ในการสร้าง monoclonal antibody ต่อ antigen เกือบทุกชนิดที่ต้องการ เนื่องจากคลังของ antibody ที่สร้างขึ้นนี้เป็นตัวแทนความเป็นไปได้ทั้งหมดจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ตามธรรมชาติ โดยพบว่า monoclonal antibody ที่คัดเลือกมาได้นั้นมีคุณภาพดีคือมีความสามารถในการจับ (affinity, ในช่วง 1-200 nM) และมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) สูงเท่ากับ monoclonal antibody ที่สร้างจาก hybridoma [61-64]

คลังที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นมีหลายประเภท โดยแต่ละคลังก็มีความแตกต่างกันในด้านต่างๆ เช่น ความแตกต่างในชนิดของโปรตีนปกคลุมผิวที่ใช้แสดง antibody (pIII หรือ pVIII) แหล่งที่มาของ RNA ที่จะใช้เป็นต้นแบบในการสร้างโครงสร้างของ antibody ที่ใช้แสดง (แบบ Fab หรือ ScFv) ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการสร้างคลัง (plasmid หรือ phagemid) สายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรียที่ใช้ในการเลี้ยงเฟจ สายพันธุ์ของ helper phage หรือขั้นตอนการตัดต่อยีนเข้าไปในตัวเฟจ ทั้งนี้นักวิจัยกลุ่มใดจะใช้วิธีการไหนนั้นขึ้นอยู่กับความชำนาญ ประสบการณ์และวัสดุที่มีอยู่ นอกจากนั้นแล้วในปัจจุบันยังมีความพยายามในการสร้างคลังจากเส้น ดีเอ็นเอสังเคราะห์ (synthetic oligonucleotide) [65-67] อีกด้วย

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอีกอย่างหนึ่งที่มีประโยชน์ในการสร้าง antibody ให้มีคุณภาพสูงคือมีความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการจับสูง (high specificity และ affinity) คือการนำ antibody ที่คัดได้จากคลังมาพัฒนาเป็น monoclonal antibody ที่มีคุณภาพดีขึ้น (maturation) โดยใช้หลักการกำกับวิวัฒนาการ (directed evolution) [41, 68] ด้วยเทคนิคต่างๆเช่น การทำให้เกิดการกลายพันธ์อย่างสุ่มด้วยเทคนิคทาง PCR ที่มีความแม่นยำต่ำ (error prone PCR) [69, 70] หรือ การใช้เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ (DNA shuffling) [71-75] การปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโดยการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอพบว่ามีประสิทธิภาพดีในการสร้าง antibody ที่มีความสามารถในการจับสูงมากขึ้นกว่าเดิมหลายเท่า ตัวอย่างเช่นพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับของ antibody บางประเภทได้ถึง 10 เท่า ทำให้ได้ monoclonal antibody ที่มีความสามารถในการจับสูงถึง 10^{11} M^{-1} ซึ่งสูงกว่าค่าที่จะได้จาก monoclonal antibody ที่ผลิตด้วยวิธีการเดิม (คือ10^{10} M^{-1}) [76-78]

นอกจากการปรับปรุงคุณภาพในการจับแล้ว ยังสามารถใช้เทคโนโลยีนี้ในการปรับปรุงคุณสมบัติอื่นๆตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่นความสามารถในการทำงาน (function) ต่างๆ เช่นการกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) [79-86] หรือการใช้เป็นตัวกระตุ้นหรือตัวยับยั้ง (agonist หรือ antagonist) โปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆในเซลล์ [87, 88] นอกจากนั้นแล้วยังใช้ในการคัดเลือก antibody ที่ทนต่อสภาวะบางอย่างเช่น

สภาวะกรด ด่าง หรือทนต่อเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteinase) [89, 90] หรือที่สภาวะ reducing [74] รวมทั้งการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค (therapeutic use) [26, 27, 29, 31, 46-48, 66, 91-94] หรือติดฉลาก (tag) [2, 5, 9, 95-97] เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ

กล่าวโดยสรุป การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจเพื่อการผลิต monoclonal antibody นั้น มีประโยชน์มากและมีข้อดีกว่าเทคโนโลยีการผลิตแบบเดิม (conventional method) หลายประการ ดังจะได้สรุปไว้เป็นข้อๆดังนี้

1. การผลิต monoclonal antibody ด้วยเทคโนโลยีเฟจ สะดวก และประหยัดกว่าการใช้เทคนิคดั้งเดิม เพราะใช้เวลาน้อยกว่า ใช้เงินน้อยกว่า ใช้แรงงานและความชำนาญน้อยกว่า และข้อสำคัญคือไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง
2. สามารถใช้กับ antigen ได้หลากหลายชนิดกว่า เพราะสามารถใช้กับ antigen ที่เป็นพิษต่อสัตว์ หรือ antigen ที่คล้ายกับโปรตีนในสัตว์ทดลอง หรืออาจใช้เซลล์ทั้งเซลล์เป็น antigen ก็ได้ นอกจากนั้นแล้วยังสามารถใช้กับ antigen ที่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้ (nonimmunogenic antigen)
3. สามารถใช้ในการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen จำนวนมากชนิด ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในงานด้าน proteomics ในปัจจุบัน
4. สามารถประยุกต์ใช้ในการสร้าง antibody ที่มีคุณสมบัติเหมือนของคน (humanized antibody) เพื่อใช้ในการรักษาโรค (therapeutic antibody)
5. สามารถปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามต้องการ เช่นมีความสามารถในการจับ หรือความจำเพาะเจาะจงสูงขึ้น หรือทนต่อสภาวะต่างๆ
6. สามารถนำไปผลิตเป็นจำนวนมากได้ง่าย ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และเซลล์สัตว์โดยทั่วไป เพื่อใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

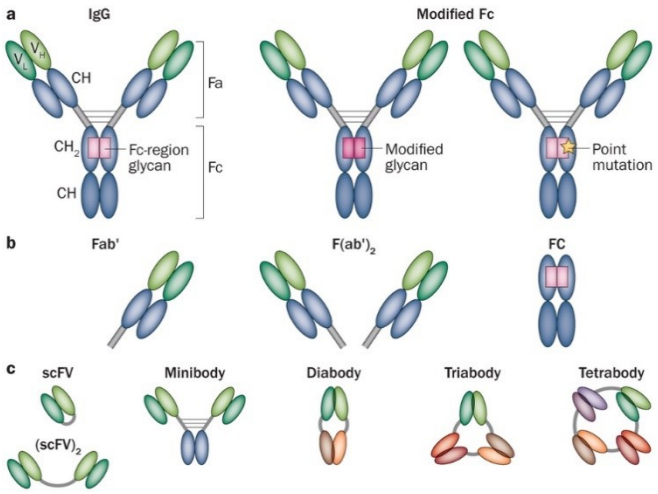
คลังของแอนติบอดีบนผิวเฟจ (PHAGE ANTIBODY LIBRARY)

Antibody เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่สามารถทำงานได้ (functional protein) ชนิดแรกต่อจาก peptide ที่ถูกนำมาแสดงบนผิวเฟจ โดยเป็นการแสดงเฉพาะส่วน single chain variable fragment (form) (scFv) ที่เชื่อมอยู่กับปลายด้าน N-terminus ของ pIII ในปี ค.ศ. 1990 [50] หลังจากนั้นจึงได้มีการสร้างคลังของเฟจที่แสดง monoclonal antibody ในรูปแบบต่างๆอย่างต่อเนื่องขึ้นมาจนถึงปัจจุบัน 41 คลังที่ถูกสร้างขึ้นมานั้นมีหลายประเภท โดยแต่ละคลังก็มีความแตกต่างกันในด้านต่างๆ เช่น ขนาดของคลัง แหล่งที่มาของ RNA ที่จะใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง โครงสร้างของ antibody ที่ใช้แสดง (แบบ Fab หรือ ScFv) ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการสร้างคลัง (plasmid หรือ phagemid) สายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรียที่ใช้ในการเลี้ยงเฟจ สายพันธุ์ของ helper phage หรือขั้นตอนการตัดต่อยีนเข้าไปในตัวเฟจ ทั้งนี้นักวิจัยกลุ่มใดจะใช้วิธีการไหน

นั้นขึ้นอยู่กับความชำนาญ ประสบการณ์ และวัสดุที่มีอยู่ นอกจากนั้นแล้วในปัจจุบันยังมีความพยายามในการสร้างคลังจากเส้น ดีเอ็นเอสังเคราะห์อีกด้วย (synthetic oligonucleotide) [19, 33]

4.1 ชนิดของคลัง

จากความเข้าใจโครงสร้างของ antibody ที่ได้กล่าวถึงในบทที่แล้ว พร้อมกับความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีอณูชีววิทยา ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถเลือกเฉพาะส่วนโครงสร้างของ antibody ที่มีความสามารถในการจับกับ antigen มาแสดงบนผิวเฟจ โดยไม่จำเป็นต้องนำโมเลกุลทั้งอันมาแสดง เพราะจะมีขนาดใหญ่เกินไปทำให้เฟจทนรับไม่ได้ โครงสร้างเฉพาะส่วนของ antibody ที่ยังมีความสามารถในการจับกับ antigen นั้นมีหลายแบบเช่น Fab, Fv, scFv, diabody, triabody, bispecfic antibody เป็นต้น [125] ดังภาพที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในแต่ละรูปแบบต่างๆนั้น สิ่งที่เหมือนกันคือจะต้องประกอบไปด้วยส่วนของ variable domain ของทั้ง heavy และ light chain คือ VH และ VL ที่มีหน้าที่ในการจับกับ antigen มารวมอยู่ด้วยกันในลักษณะต่างๆ โดยโครงสร้างของ monoclonal antibody ที่เป็นแบบ single-chain Fv molecule (scFv) นั้นเป็นโครงสร้างที่มีขนาดเล็กที่สุดที่ยังสามารถจับกับ antigen ได้อย่างแม่นยำและเฉพาะเจาะจง และสามารถผลิตขึ้นได้จากระบบการแสดงออกของโปรตีนทั้งที่เป็น prokaryotic และ eukaryotic system ส่วนของ VH และ VL นั้นยึดต่อกันอยู่โดย linker peptide ซึ่งถูกสร้างขึ้นโดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมในขั้นตอนการสร้างคลังซึ่งจะได้อธิบายต่อไป โครงสร้างของ scFv นี้เป็นโครงสร้างที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในการสร้างคลังชนิดต่างๆ เพราะมีขนาดเล็กจึงทำให้มีความเสถียรเมื่อนำไปแสดงบนผิวเฟจ นอกจากนั้นแล้วยังสะดวกในกรณีที่ต้องการสร้างคลังที่มีความหลากหลายสูงมากๆ รวมทั้ง antibody ที่คัดเลือกได้จากคลังยังมีความสามารถจับกับ antigen ได้อย่างแรง [125] และแม่นยำ ข้อเสียของโครงสร้างแบบ scFv นี้คือโมเลกุลของ scFv มักจะมารวมตัวกันเป็น multimer ทำให้ยากต่อการคำนวณค่าความแรงในการจับ (affinityconstant) [126] ส่วนโครงสร้างของ monoclonal antibody อีกรูปแบบหนึ่งที่เป็นที่นิยมเช่นกันในการสร้างเป็นคลังของเฟจนั้นคือโครงสร้างแบบ Fab โดยโครงสร้างแบบนี้ประกอบด้วย variable domain และ constant domain 1 อันที่ติดกับ variable domain ของทั้ง heavy และ light chain (ดูรูปที่ 1.1 ประกอบ) โดยในการสร้างคลังประเภทนี้ส่วนใหญ่จะเชื่อมต่อส่วน heavy chain กับโปรตีนปกคลุมผิวเฟจ pIII ส่วน light chain นั้นจะเชื่อมต่ออยู่กับ secretory peptide ซึ่งจะถูกหลั่งออกมาในส่วน periplasmic space จากนั้นจึงเข้าไปรวมกับส่วน heavy chain ที่ติดอยู่บนผิวเฟจกลายเป็น monoclonal antibody แบบ Fab ข้อดีของโครงสร้างแบบนี้คือโมเลกุล antibody จะไม่จับกลุ่มรวมกันเป็น multimer ทำให้ง่ายต่อการวัดค่าความแรงในการจับ แต่ข้อเสียคือโครงสร้างชนิดนี้มีความเสถียรน้อยกว่าโครงสร้างแบบ scFv ดังนั้นจึงไม่เป็นที่นิยมเท่าแบบ scFv [63] ส่วนโครงสร้างในแบบอื่นๆ นั้นมักจะใช้เพื่อวัตถุประสงค์เฉพาะ เช่นการใช้ bi-specific antibody ในการเป็น antibody สำหรับการบำบัดรักษา (therapeutic antibody) [127, 128]



คัดลอกมาจาก *Nature Reviews Clinical Oncology* **11**, 637–648 (2014)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะชิ้นส่วนของ antibody ชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่ เป็นแอนติบดีที่ใช้ในการรักษา

แหล่งที่มาของ gene ในการสร้างเป็นคลังของ antibody นั้นที่นิยมใช้มากที่สุดคือจากธรรมชาติ นั่นคือ re-arranged immunoglobulin genes ที่ได้จาก B-lymphocyte โดยแหล่งของ B lymphocyte นั้นอาจเป็นจาก ม้าม ต่อมน้ำเหลือง หรือจากเลือด (peripheral blood lymphocyte, PBL) รวมทั้ง hybridoma cell แล้วแต่ว่าเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใด ซึ่ง B lymphocyte นั้นอาจเตรียมได้จากสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจาก antigen ที่ต้องการ (immunized) หรือจาก สิ่งมีชีวิตปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆ เป็นพิเศษ ดังนั้นจึงอาจแบ่งชนิดของคลังได้ตามลักษณะของขอบเขตของคลัง คือเป็นคลังที่จำกัดเฉพาะต่อ antigen หนึ่งๆ หรืออาจเรียกว่า immunized library ที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการกระตุ้นด้วย antigen ที่จำเพาะ ซึ่งคลังประเภทนี้ไม่จำเป็นต้องมีขนาดใหญ่มาก monoclonal antibody ที่เตรียมได้จากคลังประเภทนี้จะจับได้กับ antigen ที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์เท่านั้น ส่วนคลังอีกประเภทหนึ่งเรียกว่า naïve library เพราะสร้างจาก B cell ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย antigen พิเศษใดๆมาก่อน ในทางทฤษฎีควรเตรียมจากประชากรของ B lymphocyte ที่เพิ่งถูกพัฒนาขึ้นมาในสิ่งมีชีวิต ซึ่งยังไม่เคยได้พบกับ antigen ใดๆเลย แต่ในทางปฏิบัติแล้วเป็นไปได้ยาก โดยเฉพาะจากมนุษย์ ดังนั้นโดยส่วนใหญ่แล้วจึงใช้การเตรียมจาก ม้าม, ต่อมน้ำเหลือง หรือ PBL ที่ได้จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีโดยทั่วไป คลังของ monoclonal antibody ชนิด naïve library นี้สร้างยากกว่าแบบ immunized library เพราะต้องมีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะครอบคลุม antibody ที่มีความสามารถในการจับกับ antigen ใดๆ ก็ได้ แต่เมื่อสร้างเสร็จแล้วจะมีประโยชน์มากกว่าคลังแบบ immunized library เพราะสามารถใช้ในการคัดหาเพื่อผลิตเป็น antibody ต่อ antigen ได้กว้างขวางกว่ามาก

นอกจากนั้นแล้วยังมีคลังอีกประเภทหนึ่งที่เรียกว่า semi-synthetic library เนื่องจากแหล่งที่มาของ immunoglobulin gene นั้นไม่ได้เอามาจาก B lymphocyte ซึ่งเป็นแหล่งทางธรรมชาติทั้งหมดแต่เป็นการ

สร้างจาก synthetic oligonucleotide ด้วย โดยส่วนที่เป็นโครงสร้างหลักของ antibody (frame work) นั้น เตรียมได้จาก immunoglobulin gene จาก B lymphocyte ที่พบว่ามีความเสถียรเมื่อนำไปแสดงบนผิวเฟจ และส่วนที่เป็น synthetic อยู่ในตำแหน่งที่มีความหลากหลายสูง โดยเฉพาะส่วนที่เป็น CDR3 ซึ่งมีหน้าที่โดยตรงในการจับกับ antigen ที่มีความแปรปรวนสูงที่สุด [65, 66]

ในการสร้างคลังนั้น สิ่งที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือชนิดของ helper phage ที่จะได้นำมาใช้ในการสร้าง เนื่องจาก vector ที่นำมาใช้ในการสร้างคลังนั้นเป็นชนิด phagemid จึงทำให้แบคทีเรียที่มี phagemid อยู่ไม่สามารถสร้างเฟจขึ้นมาได้เองแต่ต้องถูกติดเชื้อซ้ำ (super infect) ด้วย helper phage ซึ่งจะทำหน้าที่สร้าง โปรตีนที่จำเป็นในการสร้างขึ้นเป็นตัวเฟจที่สมบูรณ์ โดยในระยะเวลา 20 กว่าปีที่ผ่านมาที่ได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีนี้ขึ้นมานั้น ได้มีการพัฒนาชนิดของ helper phage ขึ้นตามมาเป็นลำดับ [129-134] โดยวัตถุประสงค์หลักของการพัฒนา helper phage นี้ก็คือทำให้สามารถได้คลังของเฟจที่มีคุณภาพดีขึ้น คือมีจำนวนของเฟจที่แสดง monoclonal antibody สูง แต่มีเฟจที่เป็นตัวรบกวน (back ground) น้อยที่สุด โดยวิธีการพัฒนา helper phage นั้นสามารถทำได้โดยการทำให้เกิดความผิดปกติบางอย่างบน genome ของ helper phage ทำให้สามารถเป็นได้แต่เพียงแหล่งของโปรตีนที่ประกอบกันเป็นตัวเฟจ เพื่อสร้างเป็นเฉพาะ recombinant phage ที่มี antibody อยู่ แต่ไม่สามารถสร้างตัวเองได้ ตารางสรุปชนิดของ helper phage และคุณสมบัติเด่นๆ แสดงดังตารางที่ 1

นอกจากคลังของ monoclonal antibody ของหนู และคน แล้ว ยังมีคลังของสิ่งมีชีวิตอื่นๆอีกหลายประเภทที่ได้ถูกนำมาสร้างขึ้น ตัวอย่างเช่น จากกระต่าย, ลูกไก่, แกะ, วัว, อูฐ, และลิงชนิด primate [135] ทั้งนี้ข้อจำกัดในการสร้างคลัง antibody ของสิ่งมีชีวิตใดๆ คือความรู้ลำดับ base pair ของ immunoglobulin genes ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพราะถ้าสามารถรู้ลำดับ DNA ก็ย่อมจะสามารถออกแบบ primers เพื่อใช้ในการสร้างคลังของสิ่งมีชีวิตใดๆ ก็ได้ ประโยชน์ของการสร้างคลังจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ คือ อาจได้ antibody ที่มีคุณสมบัติแตกต่างหลากหลายเพิ่มขึ้น มีความสามารถดีในการจับกับ antigen ของเซลล์ร่างกาย (self-antigen) หรือในกรณีที่ต้องการใช้ antibody เหล่านี้ในการรักษาโรคในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ รวมทั้งการใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการค้นคว้าวิจัย

ตารางที่ 1 ชนิดและคุณสมบัติของ helper phage

ชนิด	คุณสมบัติ	เอกสารอ้างอิง
Ex-phage	มี amber stop codon ที่ pIII	(Baek et al., 2002) [129]
CT-phage	N1-N2 ถูกตัดออก	(Kramer et al., 2003) [131]
Hyper-phage	pIII ถูกตัดออก และใช้ packaging แบบพิเศษ	(Rondot et al., 2001) [136]
R408d3	pIII ถูกตัดออก	(Rakonjac et al., 1997) [137]
M13Δ3.2	pIII ถูกตัดออก	(Duenas and Borrebaeck, 1995) [138]
Phaberge	มี amber stop codon ที่ pIII	(Soltes et al., 2003) [134]
KM13	มี protease site ที่ pIII	(Kristensen and Winter, 1998) [89]
M13 K07	มีความผิดปกติในการจำลองตัว	(Vieira and Messing, 1987) [139]
VCS M13	มีความผิดปกติในการจำลองตัว	(Sambrook and Russell, 2001) [110]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

3.1 การพัฒนาวิธีการคัดหาคลังจากเฟจ (biopanning)

ทำ biopanning โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมได้ คือ แบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) และแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ 9-2 (*Bradyrhizobium* sp SUTN9-2) โดยทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ biopanning โดยการอ้างอิงจากวิธีการที่ผู้วิจัยมีความชำนาญอยู่แล้ว แต่ปรับเปลี่ยนเพิ่มเติมเพื่อให้เหมาะสมกับเป้าหมายที่ใช้ เมื่อคัดหา antibody ได้แล้ว ทำการตรวจสอบความสามารถในการจับจำเพาะกับ target ด้วยวิธีการ phage ELISA โดยทำการคัดเลือกจากคลัง ย่าโม 1 วิธีการที่พัฒนาขึ้นมาสำเร็จ มีรายละเอียดการทำและผลการทดลองดังนี้

วิธีการคัดหาคลังจากเฟจ

<u>ขั้นที่ 1 การตรึง antigen เป้าหมาย</u>

1.1 ใส่ 20 µg ของ แบคทีเรียไรโซเบียม ใน 100 mM $NaHCO_3$ pH 8.5 ปริมาณ 400 µl ลงใน immunotube

1.2 ปิดฝาด้วยจุกที่มากับ immunotube จากนั้นเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

<u>ขั้นที่ 2 การคัดเลือกรอบแรก</u>

2.1 ล้าง immunotube 3 ครั้งด้วย PBS

2.2 เติม 2% MPBS (2% Non-fat dried milk in PBS) ปริมาณ 4 ml ปิดปาก immunotube ด้วยจุกที่มากับ immunotube แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.3 เท 2% MPBS ออก ล้าง immunotube 3 ครั้งด้วย PBS

2.4 เติมคลังของเฟจปริมาณ 10^{12} pfu ที่เจือจางอยู่ใน 2% MPBS ปริมาณ 300 ul ปิดฝาด้วยจุกแล้วหมุนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.5 เทสารทิ้ง แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween 20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 2 รอบ

2.6 ทำการสกัด (elute) เฟจที่จับกับ antigen โดยใส่ 1 mg/ml trypsin buffer ปริมาณ 100 ul ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 50 mM glycine-HCl pH 2.0 ปริมาณ 100 ul แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที

2.7 ทำให้สารสกัดเป็นกลาง (neutralize) โดยการเติม neutralization solution (200 mM $NaHPO_4$, pH 7.5) จำนวน 100 ul

2.8 เก็บเฟจที่ elute ได้ครึ่งหนึ่งไว้ที่ 4°C ส่วนอีกครึ่งหนึ่งเอาไปใส่ลงในหลอดที่มีแบคทีเรีย *E. coli* TG1 ที่กำลังโตอยู่ในช่วง log phase ใน media 2xYT จำนวน 2 ml

2.9 ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ถูก infect ด้วยเฟจที่ได้จากการคัดเลือกในรอบที่ 1 บนจานเลี้ยงเชื้อ 2xYT agar plate ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ 1% glucose โดยปั่นแยกเซลล์ที่ได้ให้ตกลงมาที่ความเร็วประมาณ 3000xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท media ทิ้งให้เหลือประมาณ 100 ul แล้วเกลี่ย (spread) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน โดยในขั้นตอนนี้ก่อนที่จะ spread เชื้อลงทั้งหมดต้องนำเชื้อส่วนหนึ่งมาเจือจางลงทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ก่อน แล้วจึงนำไป spread ลงบน plate เพื่อให้ได้เป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว (single colony) ดังที่ได้อธิบายไว้โดยละเอียดในขั้นที่ 5 เพื่อให้สามารถคำนวณจำนวนของเฟจที่คัดเลือกมาได้ในรอบนี้ นอกจากนั้นแล้วในกรณีที่ต้องการคัดเลือกเพียงรอบเดียว ยังสามารถข้ามจากขั้นตอนที่ได้แบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวในขั้นนี้ ไปต่อในขั้นที่ 6 คือการสร้างเป็นตัวเฟจ เพื่อทำการตรวจความสามารถในการจับด้วยวิธีการ ELISA ในขั้นตอนที่ 7 ได้เลย

<u>ขั้นที่ 3 การเตรียมเฟจเพื่อทำการคัดเลือกรอบที่สอง</u>

3.1 ทำการเก็บรวบรวม colony ของแบคทีเรียที่โตขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อโดยใส่ media 2xYT จำนวน 1 ml ลงไปแล้วใช้แท่งแก้วขูดเอาแบคทีเรียออกมาให้หมด กระจายเชื้อให้เข้ากันดี อย่าให้ติดกันเป็นก้อน

3.2 นำแบคทีเรียจากขั้นแรกจำนวน 10 ul ไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ 1% glucose จำนวน 10 ml

3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมกับเขย่าไปด้วยอย่างแรงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.4 เติม helper phage (KM13) จำนวน $5x10^{11}$ ตัว

3.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C โดยไม่ต้องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที

3.5 นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

3.6 แยกเอาส่วนใสด้านบนออก แล้วใส่ media 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin, 50ug/ml kanamycin และ 0.1% glucose จำนวน 10 ml กระจายแบคทีเรียที่อยู่ก้นหลอดให้ดีใน media นี้

3.7 นำแบคทีเรียไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C พร้อมกับเขย่าไปด้วยอย่างแรงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

* ในวันนี้ให้ทำการตรึงโปรตีนเป้าหมายในหลอด immunotube เพื่อทำการคัดเลือกในรอบต่อไปด้วย โดยใช้วิธีการตรึงดังที่ได้อธิบายในขั้นที่ 1 ปริมาณของ antigen ที่จะใช้ในการคัดเลือกรอบที่ 2 อาจใช้เท่ากับปริมาณที่ใช้ในการคัดเลือกรอบสุดท้าย หรืออาจน้อยกว่านั้น 2-10 เท่าแล้วแต่ความเหมาะสม ในที่นี้ทำการตรึง 15 ug และ 10 ug ของแบคทีเรียไรโซเบียม ในการคัดเลือกรอบที่สองและสามตามลำดับ

<u>ขั้นที่ 4 การคัดเลือกรอบที่สอง</u>

4.1 ทำการแยก media เลี้ยงเชื้อที่มีเฟจอยู่จากขั้นที่แล้วโดยการ ปั่นตกตะกอน ที่ความเร็ว 3300g เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบน (supernatant) ไว้ในหลอดทดลองที่สะอาด

4.2 ทำการตกตะกอนเฟจโดยการเติมสารละลาย PEG/NaCl (20% Polyethylene glycol 8000, 2.5M NaCl) ปริมาณ 2.5 ml ลงใน supernatant จากขั้นที่ 4.1 ผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 1 ชั่งโมง

4.3 นำไปปั่นตกตะกอนที่ 3300xg เป็นเวลา 30 นาที

4.4 กำจัดส่วนใสด้านบน (PEG/NaCl) ออก แล้ว ปั่นตกตะกอน อีกครั้งที่ 3300g เป็นเวลา 30 นาที

4.4 กำจัด PEG/NaCl ออกให้หมด

4.5 เติม PBS ปริมาณ 500 ul แล้วผสมกับตะกอนเฟจให้เข้ากันดี

4.6 นำเฟจทั้งหมดที่ได้จากขั้นที่ 4.5 ไปทำการคัดเลือกรอบที่ 2 ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ในขั้นที่ 2

* ถ้าต้องการคัดเลือก 3 รอบ ให้ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นที่ 2 และ 3 อีกครั้งหนึ่ง

<u>ขั้นที่ 5 การแยกเป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว</u>

หลังจากที่ได้บ่มเฟจที่ elute ออกมาได้ กับ *E. coli* TG1 ตามขั้นตอนที่ 2.8 แล้ว ทำการแยกให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย ซึ่งแสดง monoclonal antibody โครงสร้างต่างๆกันดังนี

5.1 นำแบคทีเรีย TG1 ที่ถูก infect ด้วยเฟจมาเจือจางลงทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ก่อน

5.2 นำแบคทีเรียทุกความเจือจางประมาณ 100 ul ไป spread ลงบน บนจานเลี้ยงเชื้อ 2XYT agar plate ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ 1% glucose

5.3 นำไปบ่มที่ 37 ℃ ข้ามคืนเพื่อให้ได้เป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว (single colony) เพื่อใช้ในการสร้างเป็นเฟจโคโลนีเดี่ยวในขั้นที่ 6 ต่อไป รวมทั้งต้องทำการคำนวณจำนวนของเฟจที่คัดเลือกมาได้ทั้งหมด โดยการนับจำนวนเฟจที่โตบนเฟจเลี้ยงเชื้อแล้วคูณกับค่า dilution ที่ใช้

<u>ขั้นที่ 6 การเตรียมเฟจโคโลนีเดี่ยว</u>

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

วันแรก

6.1 เลือก plate ที่มีแบคทีเรียเป็นโคโลนีเดี่ยวจากขั้นก่อน จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟัน หรือลวดเขี่ยแต่ละโคโลนีขึ้นมา

6.2 นำแต่ละโคโลนีไปเลี้ยงใน 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin, 50ug/ml kanamycin และ 1% glucose ที่อยู่ในหลุมบนจาน microtiter plate จำนวน 100 ul ดังนั้นจึงสามารถเลี้ยงแบคทีเรียได้ทีละ 96 โคโลนี ต่อ plate ในคราวเดียวกัน

6.3 นำจาน microtiter plate ไปบ่มที่ 37℃ โดยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน

วันที่ 2

6.4 นำแบคทีเรียปริมาณ 2-5 ul จากแต่ละหลุมในขั้นที่แล้วไปใส่ในหลุมบนจาน ELISA ที่มี2xYT + 100 ug/ml ampicillin + 1% glucose อยู่ 200 ul ส่วนแบคทีเรียที่เหลือเก็บไว้เป็น stock โดยการเติม glycerol ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 15% แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -80℃

6.5 นำไปบ่มที่ 37℃ โดยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง

6.6 เติม 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin + 1% glucose + 10^9 helper phage จำนวน 50 ul

6.7 นำไปบ่มที่ 37℃ โดยไม่ต้องเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.8 นำ microtiter plate ไป ปั่นตกตะกอน ที่ 3300 xg เป็นเวลา 15 นาที

6.9 กำจัดส่วนใสด้านบน (supernatant) ออก แล้วเติม 2xYT ที่มี 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin, 50ug/ml kanamycin ปริมาณ 200 ul

6.10 นำไปบ่ม ที่ 30°C, 250 rpm 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 ul หรือ antigen อื่นที่เหมาะสม ลงไปในหลุมของจาน ELISA ให้เท่ากับจำนวนของเฟจที่ต้องการทำการวิเคราะห์ โดยควรทำการทดสอบแบบ สองหรือสามซ้ำ (duplicate หรือ triplicate) เพื่อความน่าเชื่อถือ

ขั้นที่ 7 การทำ Monoclonal Phage ELISA

7.1 นำ microtiter plate จากขั้นที่ 6.10 ไป ปั่นตกตะกอน ที่ 3300 xg เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วน supernatant ที่มีเฟจอยู่ไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

7.2 ทำการล้างจาน ELISA ที่เตรียมไว้จากขั้นที่แล้ว 2 ครั้งด้วย PBS

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

7.3 เติมเฟจจากขั้น 7.1 ปริมาณ 100 ul ที่เจือจางอยู่ใน 4 %MPBS ปริมาณ 50 ul ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.4 คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

7.5 เติม HRP anti-M13 ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน 2% MPBS ปริมาณ 100 ul ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.6 ล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

7.7 เติมสาร ABTS + 0.05% H_2O_2 แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-60 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี

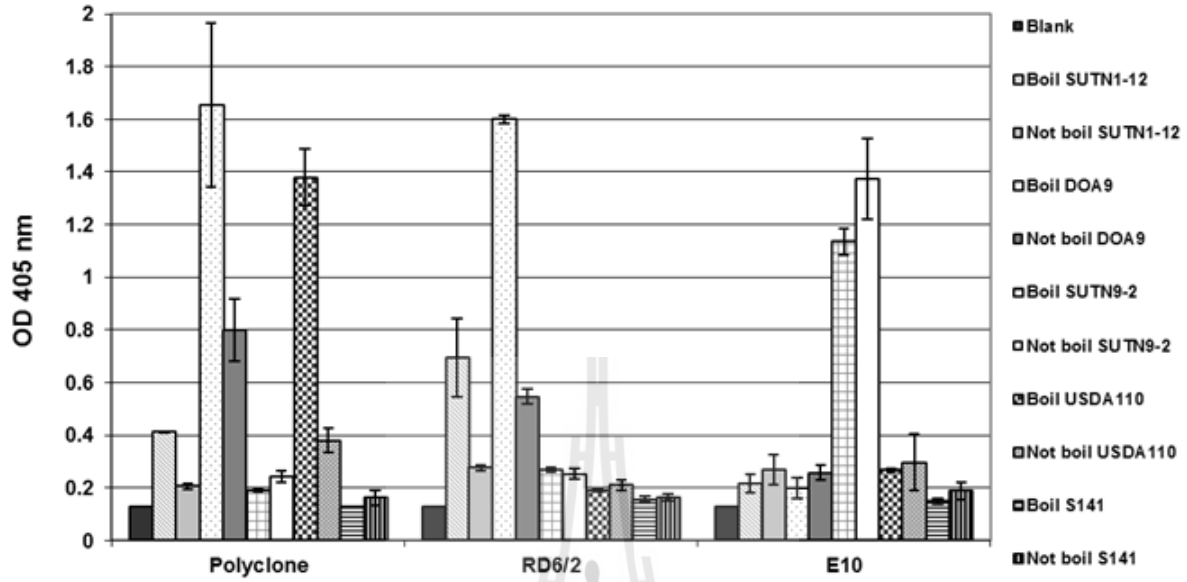
7.8 ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวแสง 405 nm

7.9 คัดเลือกเฟจที่มีความสามารถในการจับดี คือมีค่า OD เป็น 2 เท่าของค่า background ขึ้นไป เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการจับของเฟจกับเป้าหมายด้วยวิธีการ Phage ELISA

จากการทำ biopanning เพื่อคัดเลือกหาเฟจแอนติบอดีโดยใช้แอนติเจนที่เตรียมได้ คือ แบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) และแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ 9-2

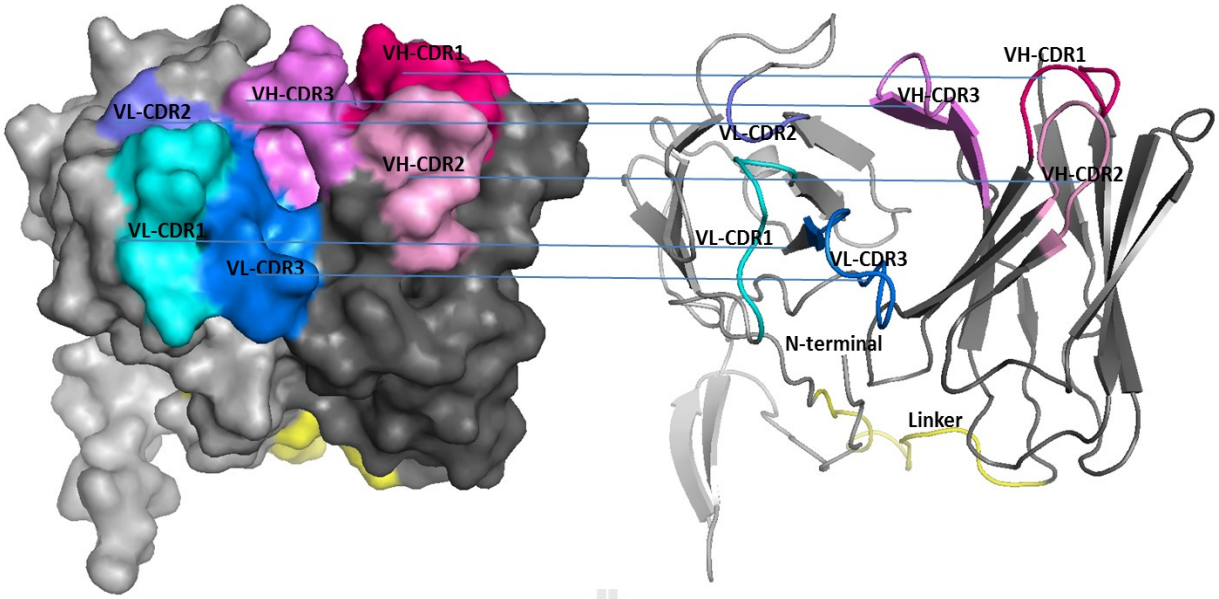
(*Bradyrhizobium* sp SUTN9-2) พบว่า โคลน RD6/2 จับจำเพาะกับไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) และโคลน E10 จับจำเพาะกับไรโซเบียมสายพันธ์ 9-2 (*Bradyrhizobium* sp SUTN9-2) ดังแสดงในภาพที่ 2



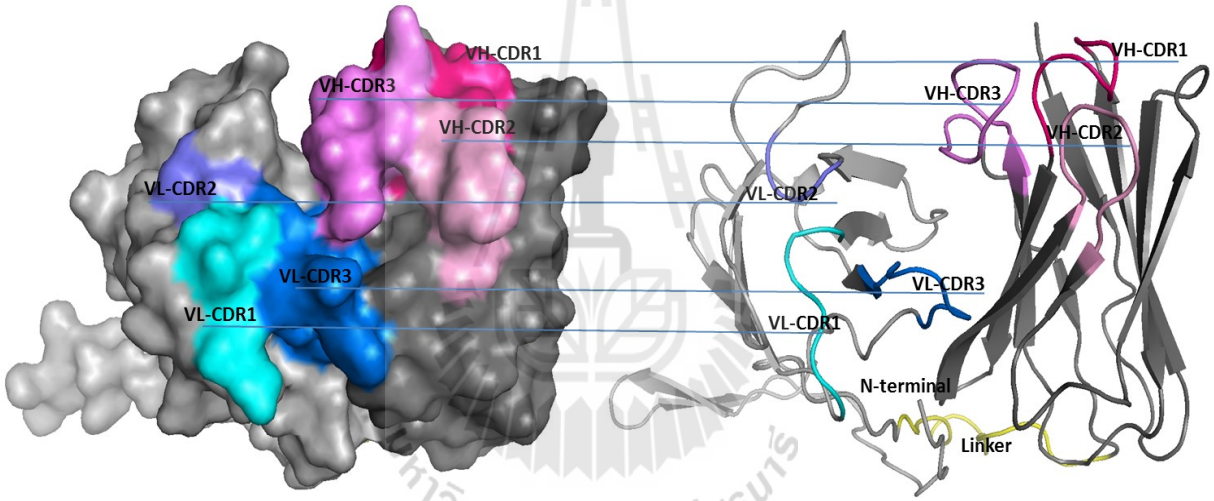
ภาพที่ 2 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ phage ELISA เพื่อแสดงเฟจโคลนที่แสดงแอนติบอดีส่วน scFv ที่สามารถจับกับแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) และแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ 9-2 (*Bradyrhizobium* sp SUTN9-2)อย่างจำเพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการตรวจจับด้วยตัวตรวจจับ anti-M13

การวิเคราะห์โครงสร้าง 3 มิติ ของแอนติบอดีจากเฟจที่คัดหามาได้

โคลน RD6/2 และ E10 ถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธีการ automated DNA sequencing แล้วตรวจผลด้วย software Vectot NTI จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำนายโครงสร้างสามมิติ โดยใช้โปรแกรมจาก Swissmodel เพื่อทำนายโครงสร้างเป็น pdb file แล้วใช้โปรแกรม pymol เพื่อดูโครงสร้างโดยละเอียด ผลการวิเคราะห์พบว่าเป็นโครงสร้างแอนติบอดีกระต่าย ที่ถูกต้องสมบูรณ์ตามความคาดหมาย ดังแสดงใน ภาพที่ 3 และ 4



ภาพที่ 3 โครงสร้างสามมิติของ RD 6/2



ภาพที่ 4 โครงสร้างสามมิติของ E10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การสร้างคลัง antibody ส่วน scFv จากกระต่าย และการคัดหาแอนติบอดี (biopanning)

การสร้างคลังของเฟจที่จะได้อธิบายในรายงานนี้เป็นวิธีการสร้างคลังของ antibody ของกระต่าย ที่มีโครงสร้างเป็น scFv และเป็นแบบ immunized คือเจาะจงต่อแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) ดังนั้นจึงต้องใช้ม้ามของกระต่ายที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9 เป็นต้นแบบในการสร้าง immunoglobulin gene ขั้นตอนการสร้างเริ่มตั้งแต่ การออกแบบเส้น oligonucleotides primers ใหม่ดังแสดงในตารางที่ 2 และเลือก vector ที่เหมาะสม แล้วทำการสกัด Total RNA 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 ℃ จากนั้นทำการสร้างเป็นคลังของเฟจที่แสดง scFv โดยการใช้ helper phage ช่วย แล้วเก็บคลังเฟจที่ได้สร้างขึ้นโดยการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย polyethylene glycol (PEG) แล้วเก็บไว้ที่ -80 ℃ เช่นกัน เมื่อสร้างคลังเสร็จแล้ว นำมาใช้ในการคัดหาแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับเป้าหมายคือ DOA9 ตามแนวทางการทำ biopanning รายละเอียดของแต่ละขั้นตอนในการสร้างคลังจะได้อธิบายเป็นข้อๆ ดังนี้

ขั้นที่ 1 การสกัด* Total RNA *จากม้าม

1.1 สกัด Total RNA จากม้ามโดยใช้ TRIzol นำม้ามกระต่ายที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C มาบดกับไนโตรเจนเหลวในโกร่งให้ละเอียด จากนั้นเติม TRIzol 1 ml ต่อน้ำหนักม้าม 50-100 มิลลิกรัม

1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 15 นาที โดยกลับหลอดทดลอง ทุกๆ 5 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็ง 5 นาที

1.3 เติมคลอโรฟอร์ม 200 ul ต่อปริมาณการใช้ TRIzol 1 ml แล้วเขย่าอย่างแรง 15 วินาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 15 นาที

1.4 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

1.5 ดูดสารละลายใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ จากนั้นเติม 1 ul RnaseOUT

1.6 เติม Isopropanal 500 ul เขย่าอย่างแรง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 °C ข้ามคืน

1.7 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

1.8 ดูดสารละลายทิ้งอย่างระมัดระวัง ตะกอนอาร์เอ็นเอสีขาวที่อยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นเติมเอธานอล 75% และกลับหลอดทดลอง 3 ครั้ง

1.9 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

1.10 ดูดสารละลายทิ้งอย่างระมัดระวัง ตะกอนอาร์เอ็นเอสีขาวที่อยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นเปิดฝาหลอดและตั้งทิ้งไว้ในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 5-10 นาที

1.11 เติมน้ำ Rnase Dnase free 50 ul เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ และทำการตรวจสอบ RNA โดยใช้ Formaldehyde agarose gel electrophoresis จากนั้นวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA โดยใช้ Qubit RNA Assay Kit

* หมายเหตุ ก่อนจะทำการสกัด RNA จะต้องทำการเตรียมอุปกรณ์ และน้ำที่จะใช้ในการสกัดให้ปราศจากเอนไซม์ RNase ก่อนโดยการใช้สาร diethlypyrocarbonate (DEPC) ตามคำแนะนำจากหนังสือ Molecular cloning ของ Sambrook และ Russell (Sambrook and Russell, 2001) โดยการเตรียม DEPC-treated H_2O นั้นทำได้โดยการเติม DEPC ลงในน้ำให้ได้ปริมาณ 0.1% แล้วบ่มไว้ หรือใช้แช่อุปกรณ์ที่ 37 °C ข้ามคืน หรือที่ 65 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นทำการ autoclave เพื่อทำลาย DEPC ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง จึงต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง

ตรวจ total RNA ที่เตรียมได้โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นนำ RNA ที่เตรียมได้ไปเป็นต้นแบบในการสร้าง cDNA ของimmunoglobulin gene ในขั้นที่ 3 ต่อไป ในกรณีที่ไม่สามารถทำได้ทันที ให้เก็บไว้ที่ -70 °C

***ขั้นที่ 2 การสร้าง* cDNA *ของ* immunoglobulin heavy chain (HC) *และ* light chain (LC)**

หลังจากที่ได้ total RNA จากขั้นที่ 1 แล้ว ขั้นต่อไปคือการเปลี่ยนให้เป็น cDNA เพื่อที่จะสร้างเป็นชิ้น DNA ส่วน variable domain ของทั้ง heavy และ light chain (VH และ VL) ต่อไป วิธีการสร้างชิ้น cDNA จาก mRNA ทำได้ด้วยวิธีการ reverse transcription โดยใช้ primer 3 แบบคือ random hexamer, oligo dT, หรือ specific primer ทั้งนี้จากผลการวิจัยในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้า พบว่าเมื่อใช้ primers ผสมระหว่าง random hexamer และ oligo dT จะให้ผลดีที่สุดดังนี้

2.1 นำ total RNA ของกระต่าย 10 - 20 ไมโครกรัม เพื่อจะเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ M-MuLV Reverse Transcriptase โดยผสม reaction บนน้ำแข็งตามตารางที่ 1 ทั้งนี้ก่อนที่จะเริ่มทำปฏิกิริยานั้นให้นำ RNA ไปให้ความร้อนที่ 90 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยวางลงบนน้ำแข็งก่อน เพื่อทำลาย secondary structure ของ RNA

2.2 จากนั้นทำปฏิกิริยาข้างต้นที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนที่ 90 °C เป็นเวลา 3 นาทีจากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยนำหลอดไปใส่ในน้ำแข็ง เก็บ cDNA ไว้ที่ -20 °C เพื่อใช้ต่อในขั้นต่อไป ชิ้น cDNA ที่ได้สร้างขึ้นเสร็จแล้วนี้ไม่ควรเก็บไว้นาน

ตารางที่ 2 Reaction ของการเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA

สาร	ปริมาณ

RNA (10 ug)	10 ul
10xM-MuLVReverse Transcriptase buffer	10 ul
1.25 mM dNTP mix	10 ul
80 ng/ul Random 6 mer	10 ul
20 mM OligoDT	1 ul
RNase OUT	4 ul
10xM-MuLVReverse Transcriptase	1 ul
Dnase Rnase free water	24 ul
Total	100 ul

***ขั้นที่ 3 การสังเคราะห์* variable heavy (VH) *และ* variable light (VL)**

ข้อมูลของ immunoglobulin gene เพื่อใช้ในการออกแบบสร้าง oligonucleotide primers สำหรับการสร้างชิ้น DNA ส่วน variable domain ของทั้ง heavy และ light chain ด้วยวิธีการ PCR สามารถหาได้จากฐานข้อมูล V-base ซึ่งเป็นที่รวบรวมข้อมูลที่ทันสมัยที่สุด [http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk] โดยในการสร้าง scFv ด้วยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้านี้ primer ที่ใช้ในการสร้างชิ้น variable domain ของ heavy และ light chain นั้นจะมีส่วนของ restriction site (*Sfi* I และ *Not* I) สำหรับโคลนเข้า vector (pMod1) หรือส่วนที่จะใช้ในการเชื่อมต่อระหว่าง heavy และ light chain ที่ประกอบด้วย linker sequence ไว้ด้วยกันเลย วิธีการนี้ช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและสะดวกรวดเร็วกว่าวิธีการแบบเก่า ซึ่งต้องทำการเพิ่มจำนวน DNA ถึง 2 ครั้ง ลำดับของเบสของ primers ที่ใช้ในการสร้างคลังทั้งหมดแสดงไว้ในตารางที่ 3 โดยมีลำดับของ amino acid ส่วน linker sequence คือ GGGGSGGGGSGGGGS

ตารางที่ 3 ไพร์เมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีน VH และ VL

ไพร์เมอร์	ลำดับเบส
rVH5'SfiI	
rVH5'SfiI1	5' GCC CAG CCG GCC atg gcc CAG TCG GTG GAG GAG TCC RGG 3'
rVH5'SfiI2	5' GCC CAG CCG GCC atg gcc CAG TCG GTG AAG GAG TCC GAG 3'
rVH5'SfiI3	5' GCC CAG CCG GCC atg gcc CAG TCG YTG GAG GAG TCC GGG 3'
rVH5'SfiI4	5' GCC CAG CCG GCC atg gcc CAG SAG CAG CTG RTG GAG TCC GG 3'
rVH5'SfiI5	5' GCC CAG CCG GCC atg gcc CAG TCG CTG GAG GAG TCC GGG GGT 3'
rVH3'link	
rVH3'link1	5' gcc aga acc gcc tcc ccc act ccc tcc gcc acc CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA RGA GAY GGT GAC CAG GGT GCC 3'

rVH3'link2	5' gcc aga acc gcc tcc ccc act ccc tcc gcc acc GAC TGA YGG AGC CTT AGG TTG C
rVL5'linkk	3'
rVL5'linkk 1	
rVL5'linkk 2	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg GAG CTC GTG MTG ACC CAG ACT CCA
rVL5'linkk 3	3'
rVL5'linkk 4	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg GAG CTC GAT MTG ACC CAG ACT CCA
rVL5'linkk 5	3'
rVL5'linkl	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg GAG CTC GTG ATG ACC CAG ACT GAA
rVL5'linkl1	3'
rVL5'linkl2	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg GCT CAA GTG CTG ACC CAG AC 3'
rVL3'Notlk	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg GMC MYY GWK MTG ACC CAG ACT CC
rVL3'Notlk1	3'
rVL3'Notlk2	
rVL3'Notlk3	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg GAG CTC GTG CTG ACT CAG TCG CCC
rVL3'Notll	TC3'
rVL3'Notll1	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg CAG CCT GTG CTG ACT CAG TCG 3'
rVL3'Notll2	
rPtfw	5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACG TTT GAT TTC CAC ATT GGT GCC 3'
rPtrv	5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACG TAG GAT CTC CAG CTC GGT CCC 3'
	5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACG TTT GAC SAC CAC CTC GGT CCC 3'
	5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC GCC TGT GAC GGT CAG CTG GGT CCC 3'
	5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC ACC TGT GAC GGT CAG CTG GGT CC 3'
	5' cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc 3'
	5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC 3'

หมายเหตุ S = G/C, R = G/A, K = G/T, M = A/C, Y = C/T, W = A/T, H = A/C/T, B = C/G/T, V = A/C/G, D = A/G/T, N = A/T/G/C.

นำ cDNA ที่ได้ 10 ul มาใช้เป็นแม่แบบในการสร้างยีนของแอนติบอดีทั้งส่วน variable heavy (VH) และ variable light (VL) ด้วยเทคนิคทาง PCR โดยผสม reaction บนน้ำแข็งตามตารางที่ 4 และทำปฏิกิริยาสภาวะการสังเคราะห์ DNA ด้วยเทคนิคทาง PCR ดังตารางที่ 5 โดยใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase และ

Pfu DNA polymerare และใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 3 จึงมีคู่ไพร์เมอร์ ทั้งหมด 29 คู่ จากนั้นตรวจสอบผลของทำพีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส

ตารางที่ 3 Reaction สังเคราะห์ DNA ด้วยเทคนิคทาง PCR

สาร	ปริมาณ
cDNA	10 ul
10x Thermol buffer polymerase	5 ul
100x BSA	0.5 ul
10 mM dNTP	1 ul
10 uM Fw primer	5 ul
10 uM Rv primer	5 ul
Taq DNA polymerase	0.3 ul
Pfu DNA polymerare	0.3 ul
Dnase Rnase free water	22.9 ul
Total	50 ul

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 5 สภาวะการสังเคราะห์ DNA ด้วยเทคนิคทาง PCR

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ
1	94	5 นาที	1
2	94	1 นาที	
	Tm ที่เหมาะสม	1 นาที	
	72	2 นาที	35
3	72	10 นาที	1

ค้างไว้ที่	4	จนกว่าจะทำ อิเล็กโทรโพรีซีส	-

***ขั้นที่ 4 การสร้างเป็นชิ้น* scFv**

ขั้นตอนนี้เป็นการนำชิ้นส่วนยีนของแอนติบอดีทั้งส่วน variable heavy (VH) และ variable light (VL) ทั้งสองส่วนมารวมกันด้วยวิธี PCR เพื่อสร้างสายแอนติบอดีสายเดี่ยว (scFv) ที่มีความหลากหลายสูง (Re-assemble)

โดยหลังจากที่สังเคราะห์ DNA สำหรับ VH และ VL ได้ทั้งหมดแล้ว ขั้นต่อไปคือการนำชิ้น DNA ทั้งสองส่วนมารวมกันเข้าด้วยวิธี PCR ให้ได้เป็นชิ้น scFv ที่มีตำแหน่งสำหรับการตัดด้วย *Sfi* I ทาง 5’ และ *Not* I ทาง 3’ และเชื่อมกันตรงกลางด้วย linker sequence (GGGGSGGGGSGGGGS) โดยใช้ปฏิกิริยาเป็น 2 ขั้น ขั้นแรกเป็นการ re-assemble โดยทำการรวมชิ้น VH และ VL ในปฏิกิริยาที่ปราศจาก primer จากนั้นทำการสร้างเป็นชิ้น scFv ที่สมบูรณ์ โดยปฏิกิริยา PCR ที่มี primers อยู่เรียกปฏิกิริยาชนิดนี้ว่า pull-through โดยชุดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา pull-through แสดงดังตารางที่ 2

4.1 เป็นการรวมชิ้นส่วน VH และ VL ด้วยปฏิกิริยาที่ปราศจาก primer

ปฏิกิริยาขั้นแรก (Assemble)

VH and VL 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

ทำปฏิกิริยา assemble ในเครื่อง thermo cycler โดยตั้งค่าดังนี้

ก. Denaturing	94°C	45 sec	
ข. Annealing	60°C	50 sec	5 cycle
ค. Extension	72°C	1 min	

4.2 ทำการสร้างชิ้นส่วน scFv ที่สมบรูณ์ โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ที่มี primer เรียกปฏิกิริยานี้ว่า pull-through โดยชุด primer ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้คือ rPtfw; cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc และ rPtrv; cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC โดยใช้เอนไซม์ Platinum Pfx DNA polymerase

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

ก. Denaturing	94°C	1 min	
ข. Annealing	60°C	1 min	30 cycle
ค. Extension	72°C	2 min	
ง. 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 (Sambrook and Russell, 2001) แล้วจึงนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดจาก agarose gel โดยใช้ชุดสกัดจากบริษัท promega ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 µl จากนั้นเก็บ DNA ที่เตรียมได้จากขั้นนี้ไว้ที่ -20 ℃ เพื่อใช้ในขั้นต่อไป โดยตรวจสอบผลของทำพีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีสดังภาพที่ 1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

***ขั้นที่ 5 การเชื่อม* scFv *เข้ากับ* vector (ligation)**

ขั้นต่อไปหลังจากที่สร้างชิ้น scFv ได้แล้วคือการ clone เข้า vector เพื่อใช้ในการแสดงบนผิวเฟจ โดยให้เชื่อมอยู่กับโปรตีนปกคลุมผิวชนิดรอง (pIII) โดย vector ที่ใช้เป็นประเภท phagemid ซึ่งพัฒนามาจาก vector pCANTAB หรือ pHEN 41 ส่วน phagemid ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้านั้นได้สร้างขึ้นมาเองโดยการพัฒนาต่อมาจาก vector p3.2 (Maxim Biotech) ตั้งชื่อว่า pMod1 ขั้นตอนการเชื่อม scFv insert เข้ากับ vector เริ่มจากการตัด ทั้ง insert และ vector ด้วย restriction enzyme *Sfi* I และ *Not* I โดยต้องตัดแยกกันตามลำดับทีละครั้ง (serial digestion) และต้องใช้ vector ในปริมาณสูงคือประมาณ 20 µg ซึ่งควรทำการตัด phosphate group ออกจากปลาย 5' ของ vector ที่ได้รับการตัดแล้วด้วยเพื่อให้มี back ground หรือ vector ที่ไม่ต้องการให้น้อยที่สุด จากนั้นจึงทำการ ligate เข้ากับ vector ปฏิกิริยาต่างๆที่ใช้ในขั้นตอนนี้คือ

5.1 การตัด vector ด้วยเอนไซม์ *Sfi I*

Vector	20	µg
10xCutsmart Buffer	50	µl
Sfi I	8000	unit
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	500	µl

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

5.2 การตัด insert (scFv) ด้วยเอนไซม์ *Sfi I*

Insert	7	µg
10xCutsmart Buffer	10	µl
Sfi I	8000	unit
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	100	µl

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

5.3 การตัด vector ด้วยเอนไซม์ *Not I*

Vector จากขั้น 5.1	400	µl
10xCutsmart Buffer	50	µl
NotI	2000	unit
H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	500	µl

5.4 การตัดกลุ่ม 5’ phosphate จาก vector

Reaction หลังจากด้วย Not I ในขั้น 5.3	500	µl
Calf intestinal phosphatase (CIP, NEB)	3	µl

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้ DNA เข้มข้นขึ้นด้วยการตกตะกอนด้วย 3M Sodium acetate และ absolute ethanol ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 150-200 µl (Sambrook and Russell, 2001)

5.5 การตัด insert ด้วยเอนไซม์ *Not I*

Insert จากขั้น 5.2	50	µl
10xCutsmart Buffer	6	µl
Not I	2000	unit

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

H_2O ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 60 µl

5.6 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 นั่นคือการทำการเชื่อมต่อ (ligation) DNA กับ insert เข้าด้วยกัน ซึ่งจำเป็นต้องมีปริมาณ vector และ insert ที่มากพอ จากการวิจัยในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้าพบว่า ปฏิกิริยาที่ได้ผลดีในขั้นตอนนี้คือ ต้องมี vector ประมาณ 2-3 µg และมีอัตราส่วนระหว่าง vector : insert = ในช่วง 1:1 ถึง 1:3 ซึ่งควรลองทำในปริมาณน้อยดูก่อนว่าอัตราส่วนใดดีที่สุด การใช้ vector ในปริมาณเท่านี้ ทำให้ได้คลังที่มีขนาดความหลากหลาย ~ 10^8 ถ้าต้องการให้ได้คลังที่มีขนาดใหญ่กว่านี้ ต้องเพิ่มปริมาณ vector เป็น 20-200 µg

ทั้งนี้นอกจากปฏิกิริยา ligation แล้ว ยังจำเป็นต้องทำการทดลองควบคุมการเชื่อมต่อ (ligation control) คือการทำปฏิกิริยา ligation ที่ปราศจาก insert เพื่อประมาณ background ของคลังด้วย

5.7 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

ทำการบ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้ DNA เข้มข้น และกำจัดเกลือโดยการตกตะกอนด้วย 3M Sodium acetate pH 5.2 และ absolute ethanol แล้วละลายในน้ำปริมาตร 40 µl จากนั้นนำ ligated products ที่ได้ในขั้นนี้ไป transform เข้า *E. coli* ในขั้นที่ 6 ต่อไป

ขั้นที่ 6 การ* transform recombinant vector *เข้าสู่ E. coli

หลังจากที่ได้ทำการเชื่อม scFv insert เข้ากับ vector แล้ว ขั้นต่อไปคือการนำ recombinant phagemid ที่มี scFv อยู่ใส่เข้าไปใน *E. coli* TG1 หรือ DH5α เพื่อสร้างเป็นคลังของ scFv ที่อยู่ในรูปของแบคทีเรีย ขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นสำคัญในการกำหนด diversity/complexity หรือขนาดของคลัง วิธีการที่ใช้ในการนำ DNA เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียคือวิธีการ electroporation ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องสร้าง electro competent cells ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด วิธีการสร้าง electrocompetent cell ที่ได้พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้า และพบว่ามีประสิทธิภาพดีในการสร้างเป็น competent cells ที่มีประสิทธิภาพ (efficiency) สูง ($10^{9\text{-}10}$ cells/µg DNA) เป็นดังนี้

6.1 การทำ electrocompetent cells

6.1.1 เขี่ยโคโลนีของ *E. coli* มา 1 โคโลนี แล้วนำไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่ 37 °C หนึ่งคืน

6.1.2 นำแบคทีเรียที่เลี้ยงได้มา 500 µl แล้วใส่ลงใน flask ที่มี SOB medium ปริมาณ 50 ml

6.1.3 นำไปบ่มที่ 37 °C โดยการเขย่าไปด้วยที่ความเร็ว 200 rpm จนแบคทีเรียโตได้ค่า OD600 = 0.6 (สำหรับ E. coli TG1 ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่งโมง)

6.1.4 นำ flask ไปแช่บนน้ำแข็ง 10 นาที โดยเขย่าเบาๆไปด้วยเป็นครั้งคราว

6.1.5 เทเซลล์ลงในหลอด centrifuge ที่เย็นจัด แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3500 xg เป็นเวลา 20 นาที

6.1.6 เทของเหลวใสด้านบนออก แล้วค่อยๆผสมเซลล์ใน น้ำ DI ที่เย็นจัดปริมาณ 50 ml อย่างเบาๆ ให้เข้ากันดี

6.1.7 นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3500 xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสด้านบนออก

6.1.8 ค่อยๆผสมเซลล์ (resuspend) ในน้ำ DI ที่เย็นจัดปริมาณ 25 ml อย่างเบาๆ ให้เข้ากันดี แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3500 xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนออก (ข้อนี้ไม่จำเป็นสำหรับ E. coli TG1 อาจข้ามไปได้)

6.1.9 ค่อยๆผสมเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่เย็นจัดปริมาณ 4 ml อย่างเบาๆ ให้เข้ากันดี แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3500 xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนออก

6.1.10 ค่อยๆผสมเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่เย็นจัดปริมาณ 150 µl อย่างเบาๆ ให้เข้ากันดี แล้วนำไปเก็บไว้ในหลอด microcentrifuge tube ที่เย็นจัดหลอดละ 50-200 µl

6.2 การนำ recombinant phagemid เข้าเซลล์ *E. coli* ด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electroporation)

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

ในขั้นนี้ต้องทำการคำนวณความหลากหลาย (diversity/complexity) หรือขนาดของคลัง (complexity) ด้วยโดยการนับจำนวนของ 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 แล้วคำนวณหา

ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดในคลัง 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 °C โดยการขูดเซลล์ (scrape) ออกจากจานเลี้ยงเชื้อมารวมกัน ใน 20% glycerol ปริมาณ 8 ml ส่วนคลังของแบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งนำมาสร้างเป็นคลังของเฟจในขั้นที่ 7 ต่อไป

ขั้นที่ 7 การสร้างเป็นคลังของเฟจที่แสดง **scFv (Rescuing phagemid library)**

ขั้นสุดท้ายของการสร้างคลังคือการสร้างให้เป็นคลังของตัวเฟจที่แสดงชิ้น scFv ที่มีความสามารถในการจับกับ antigen ได้ต่างๆกัน โดยการนำแบคทีเรียที่มีคลังของเฟจที่ได้สร้างขึ้นในขั้นที่ 6 มา infect ด้วยเฟจตัวช่วย หรือ helper phage (หมายถึงการให้ helper phage เข้าไปเจริญในแบคทีเรียเหล่านี้โดยการส่งผ่าน DNA เข้าไป) ซึ่ง helper phage ที่เข้าไป infect แบคทีเรียเหล่านี้จะสร้าง โปรตีนที่ใช้ในการสร้างเป็นตัวเฟจทั้ง 11 ชนิดภายในแบคทีเรีย ซึ่งถ้าเลือกใช้ helper phage ที่เหมาะสมเช่นมีความบกพร่องในการจำลองตัวของ DNA ก็จะทำให้สามารถสร้างเป็นคลังของเฟจที่ไม่มี หรือมี helper phage ปนเปื้อนอยู่น้อยที่สุด สำหรับ helper phage ที่ใช้ในการสร้างคลังในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้าคือ M13 K07 ซึ่งมีความบกพร่องในการจำลองตัวของ DNA และ KM13 ซึ่งมีตำแหน่งที่สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ trypsin บนโปรตีน pIII หลังจากที่สร้างเป็นตัวเฟจแล้ว ขั้นต่อไปคือการสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย PEG เพื่อสร้างเป็นคลังของเฟจที่สมบูรณ์ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

7.1 การสร้างเป็นตัวเฟจ

7.1.1 นำคลังของแบคทีเรียจาก glycerol stock ที่เตรียมได้ในขั้นที่ 7 มาประมาณ 10^{9-10} เซลล์ (10 เท่าของ diversity ของคลังที่ต้องการ) โดยวิธีการคำนวณจำนวนแบคทีเรียทำได้โดยการอ่านค่า OD_{600} ซึ่งค่า OD600 = 1 จะมีเซลล์ประมาณ $8x10^8$ เซลล์ ทั้งนี้ในการคำนวณต้องประมาณว่ามีเซลล์ที่มีชีวิตเป็นสัดส่วนอยู่เท่าไหร่ เพราะการคิดค่า OD_{600} นั้นจะรวมทั้งเซลล์ ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว

7.1.2 นำเซลล์แบคทีเรียไปเลี้ยงใน 2xYT ที่มี ampicillin 100 µg/ml และ 2% (w/v) glucose อยู่จำนวน 50 ml โดยทำการเลี้ยงใน flask ขนาด 250 ml

7.1.3 ทำการเลี้ยงเซลล์ที่ 30 °C จนเซลล์อยู่ในสภาวะ log phase คือมีค่า OD_{600} ~ 0.5

7.1.4 เติม helper phage จำนวน $2x10^{10}$ pfu แล้วบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (จำนวน helper phage ที่เติมนี้จะทำให้มีอัตราส่วนระหว่าง helper phage และ bacteria เป็นประมาณ 1:1)

7.1.5 ปั่นเซลล์ลงมา โดยการ centrifuge ที่ 3000 xg เป็นเวลา 10 นาที แล้ว re-suspend ใน 2xTY ที่มี ampicillin 100 µg/ml และ kanamycin 50 µg/ml อยู่ ปริมาณ 500 ml ซึ่งบรรจุอยู่ใน flask ขนาด 2 ลิตร ขั้นตอนนี้เป็นการชักนำให้เกิดการสร้าง scFv บนผิวเฟจโดยการกำจัด glucose ออกไป

7.1.6 ทำการเลี้ยงเซลล์ที่ 30 °C ข้ามคืนโดยเขย่าอย่างแรงไปด้วย เฟจจะออกมาอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปั่นเซลล์แบคทีเรียให้ตกตะกอนแล้วเก็บ supernatant ส่วนใสด้านบนที่มีเฟจ อยู่มาทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

7.2 การสกัดเฟจให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย PEG

7.2.1 เติม 20% PEG, 2.5 M NaCl ปริมาณ 1/5 ของ ปริมาณ supernatant ที่เตรียมได้ในขั้นที่ 7.1.6

7.2.2 ตั้งทิ้งไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที

7.2.3 เก็บตะกอนของเฟจโดยการ centrifuge ที่ 4000 xg เป็นเวลา 10 นาที

7.2.4 ทำการ re-suspend ใน PBS หรือ TE ในปริมาณ 1/100 เท่าของปริมาณเริ่มต้น

7.2.5 กำจัดเศษเซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาทิ้งโดยการปั่นแยกด้วย microcentrifuge

ขั้นที่ 7.3 การคำณวนหาจำนวนเฟจในคลัง (phage titer)

หลังจากที่ได้คลังของเฟจที่บริสุทธิ์แล้ว ควรคำนวณหาจำนวนของเฟจในคลัง (titer) ด้วยวิธีการดังนี้

7.3.1 นำคลังของเฟจมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-10}

7.3.2 ผสมเฟจที่ความเจือจาง 10^{-8} , 10^{-9} และ 10^{-10} จำนวน 10 ml 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)

7.3.3 ทำการบ่มโดยตั้งไว้นิ่งๆที่อุณหภูมิ 37 °C เพื่อให้เฟจ infect แบคทีเรีย

7.3.4 ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ถูก infect ด้วยเฟจ บนจานเลี้ยงเชื้อ TYE agar plate ที่มี 100% ampicillin และ 1% glucose โดยปั่นแยกเซลล์ที่ได้ให้ตกลงมาที่ความเร็วประมาณ 3000 xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท media ทิ้งให้เหลือประมาณ 100 µl แล้วเกลี่ย (spread) ทั้งหมดลงบนจานเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งทำการเจือจางเซลล์ที่ละ 10 เท่าก่อนที่จะทำการ spread เชื้อด้วย

7.3.5 นำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน แล้วนับจำนวนแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว (single colony) ในวันรุ่งขึ้นเพื่อให้สามารถคำนวณจำนวนของเฟจที่มีในคลังได้

7.3.6 เก็บคลังของเฟจที่ได้สร้างขึ้นนี้ไว้ที่ -80°C คลังของเฟจที่ได้สร้างขึ้นนี้พร้อมที่จะนำไปใช้ในการคัดหา monoclonal antibody ที่ต้องการ ดังที่ได้อธิบายในงวดที่ 1

***ขั้นที่ 8 การทำ* immunofluorescence assay**

8.1 ตรึงแบคทีเรียไรโซเบียมบนแผ่นแก้วสไลด์ (cover slip)

8.2 หยด 10 µl ของ polyclonal หรือ phage (10^{12} pfu) บ่มไว้ 1 ชั่วโมง

8.3 ทำการล้าง 2 ครั้งด้วย PBS จากนั้นหยด secondary FITC labelled anti-rabbit Ig antibody (สำหรับ poly clone) M13-FITC (สำหรับ phage clone)

8.4 จากนั้นนำสไลด์แก้วไปบ่มใน moist chamber เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

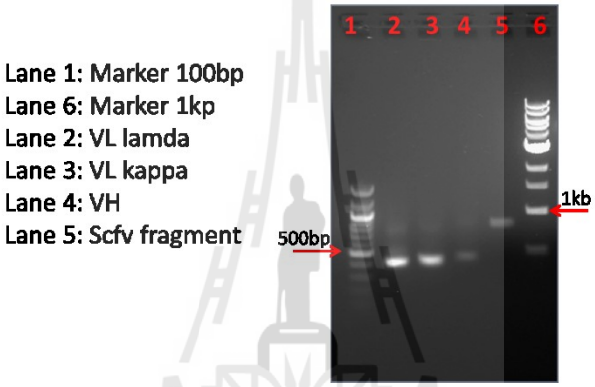
8.5 ทำการล้างด้วย PBS และ mounted ใน 40% glycerol

8.6 นำแผ่นแก้วสไลด์ไปส่องภายใต้กล้อง fluorescence microscope

ผลการทดลอง

ผลการทำ PCR

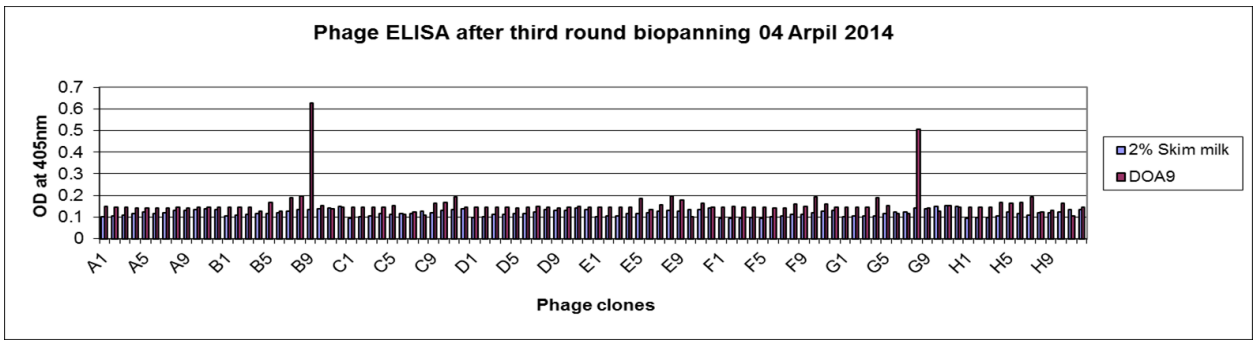
จากการใช้ primer ทั้ง 29 คู่ ในการเพิ่มปริมาณยีน VH และ VL จาก total RNA ของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียไรโซเบียม โดยวิธีทาง PCR พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน VH และ VL ได้ โดยยีนมีขนาดประมาณ 400 เบส และสามารถทำการรวมชิ้นส่วน VH และ VL เพื่อสร้างชิ้นส่วน scFv ที่สมบูรณ์ โดยวิธีทางพีซีอาร์ได้ โดยยีนมีขนาดประมาณ 800 เบส ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ภาพแสดงส่วน variable heavy (VH) และ variable light (VL) และสายแอนติบอดีสายเดี่ยว (scFv)

ผลการทำ biopanning *จากคลังกระต่าย*

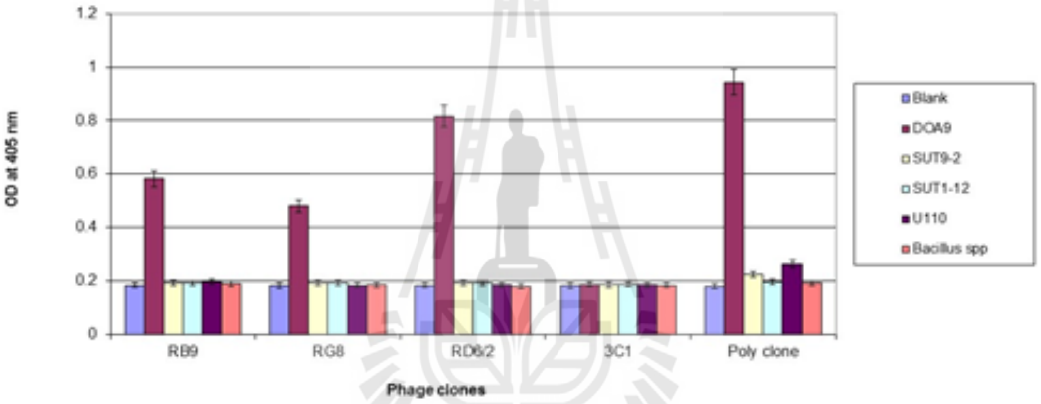
หลังจากทำ biopanning 3 รอบโดยทำการคัดเลือกจากคลังแอนติบอดีกระต่าย และทำการตรวจสอบความสามารถในการจับจำเพาะกับ target ด้วยวิธีการ phage ELISA พบว่า โคลน 3B9 และ 3G8 สามารถจับกับแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) อย่างจำเพาะเจาะจงดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ phage ELISA เพื่อแสดงเฟจโคลนที่แสดงแอนติบอดีส่วน scFv ที่สามารถจับกับแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) อย่างจำเพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการตรวจจับด้วยตัวตรวจจับ anti-M13

ผลการทำ phage ELISA *เพื่อแสดงความจำเพาะในการจับกับเป้าหมาย*

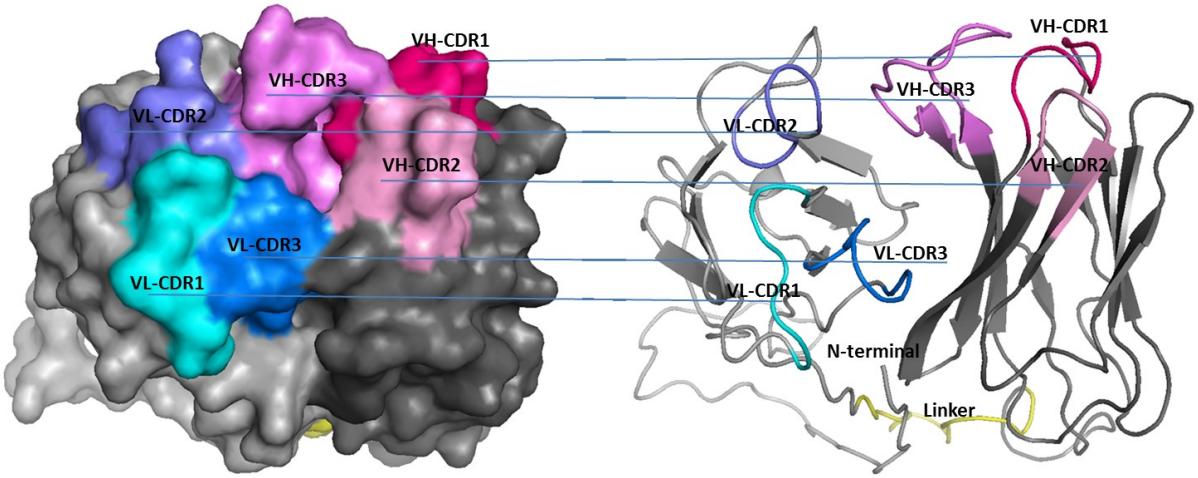
เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการจับจำเพาะกับ target ด้วยวิธีการ phage ELISA กับแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ต่างๆ พบว่า โคลน 3B9 และ 3G8 สามารถจับกับแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) อย่างจำเพาะเจาะจงดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ phage ELISA เพื่อแสดงเฟจโคลนที่แสดงแอนติบอดีส่วน scFv ที่สามารถจับกับแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) อย่างจำเพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการตรวจจับด้วยตัวตรวจจับ anti-M13 โดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ต่างๆ

ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 3 มิติ

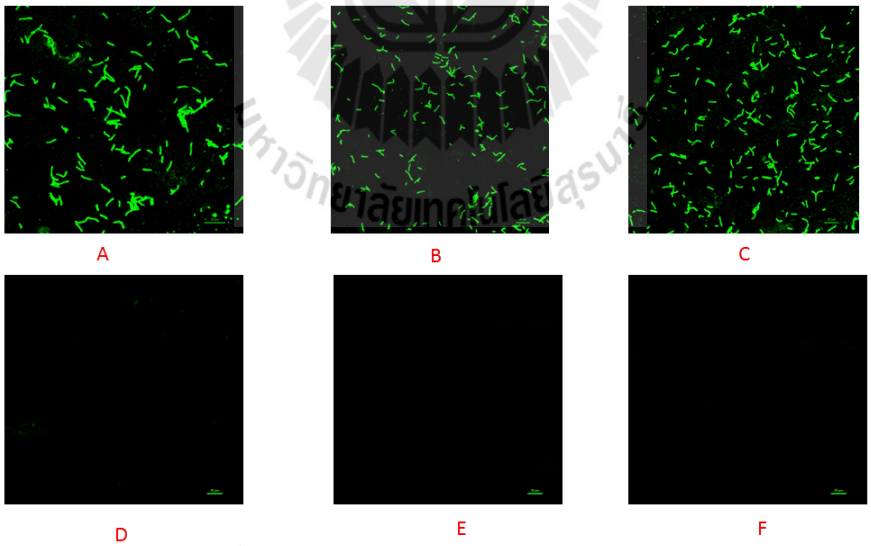
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอมิโนของโคลน 3B9 และ 3G8 พบว่า โคลนทั้งสองมีลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอมิโนของแอนติบอดีส่วน scFv ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โคลนทั้งสองเป็นตัวเดียวกัน และเรียกโคลนทั้งสองว่า โคลน RB8 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์หา Germline และโครงสร้างสามมิติดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 โครงสร้างสามมิติของ RB8

ผลการวิเคราะห์ด้วยภาพเรืองแสง (Immunofluorescent)

เมื่อทำ immunofluorescence assay เพื่อดูการ จับกันของ เฟจแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) พบว่า เฟจแอนติบอดีโคลน RD6/2 และโคลน RB8 สามารถจับกับไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) ได้อย่างจำเพาะเมื่อทำการสังเกตใต้กล้อง Confocal microscopy ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ภาพถ่ายภายใต้กล้อง Confocal microscopy แสดงการจับกันของ เฟจแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธ์ DOA 9 (*Bradyrhizobium* sp DOA9) A: เฟจโคลน RD6/2 ต่อ DOA9; B: เฟจโคลน RB8 ต่อ DOA9; C: Poly clone ต่อ DOA9; D: Negative control, No poly clone

ต่อ DOA 9; E: Negative control, No phage clone with DOA 9; F: Negative control, เฟจโคลน 3C1 ต่อ DOA 9

การผลิต antibody ให้มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการค้นคว้าวิจัยทางการเกษตรเป็นโมเลกุลเดี่ยวๆ (soluble form)

หลังจากที่ได้ทำการคัดเลือกเฟจที่แสดง ชิ้นของ monoclonal antibody ที่จับกับ antigen ที่ต้องการจากคลัง ย่าโม 1 และคลังแอนติบอดีกระต่ายชนิดทุติยภูมิได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการผลิตออกมาเป็นโมเลกุลเดี่ยวๆ ของ scFv ที่ละลายน้ำได้ (soluble form) เพราะไม่ติดอยู่บนผิวของเฟจอีกต่อไป เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ และทำให้สามารถคำนวณค่า binding affinity โดยการใช้เครื่อง BIAcore ได้ วิธีการที่ใช้ในการผลิตเป็นชิ้นของ monoclonal antibody ที่ไม่ติดอยู่บนเฟจ (อาจเรียกว่า soluble monoclonal antibody fragment) นี้อาจทำได้ 2 วิธี วิธีแรกเป็นการโคลนยีนส่วน scFv เข้าไปแสดงใน expression vector ที่เหมาะสม แล้วผลิตออกมาจากแบคทีเรียเหมือนหลักการผลิต recombinant protein โดยทั่วไป 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) ดังนั้นในแบคทีเรีย TG1 ชิ้นของ monoclonal antibody จึงเชื่อมอยู่กับโปรตีน pIII บนผิวเฟจ 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

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 โดย 6xHis tag นั้น สามารถนำไปใช้ในการทำ affinity purification โดย Nickel column ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ส่วน c-Myc epitope นั้นเอาไว้สำหรับการตรวจสอบด้วย anti-c-Myc antibody ดังที่จะได้อธิบายต่อไปในหัวข้อที่ 2 เนื่องจาก monoclonal antibody ที่ได้จากคลังของเฟจนั้นเป็น monoclonal ที่อยู่ในรูปที่เป็น scFv แล้วแต่ชนิดของคลังของเฟจ monoclonal ชนิดนี้มีความสามารถในการจับกับ antigen ได้อย่างเฉพาะเจาะจง จึงสามารถนำไปใช้เป็นในการค้นคว้าวิจัย หรือใช้เป็นสารตรวจวินิจฉัยได้ รวมทั้งอาจใช้ในการรักษาบางอย่างได้ด้วย

วิธีการ

<u>การผลิต soluble antibody fragment โดยการเปลี่ยนชนิดของแบคทีเรีย</u>

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

<u>ขั้นที่ 1 การเตรียม soluble antibody fragment ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ</u>

1.1 จิ้มโคโลนีเดี่ยว *E. coli* HB2151 ที่อยู่บนจานเลี้ยงเชื้อ mineral agar plate มา 1 โคโลนีแล้วนำไปเลี้ยงใน mineral broth ที่ 37°C

1.2 นำเฟจโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้จากขั้นตอนการคัดเลือกเฟจจำนวน 10 ul จากนั้นนำไปผสม กับ E. coli HB2151 จำนวน 200 ul ที่กำลังโตอยู่ในช่วง log phase (OD600 ประมาณ 0.4) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยไม่ต้องเขย่า เพื่อให้เฟจ infect แบคทีเรีย

1.3. นำแบคทีเรียไป streak ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ลงบน 2XYT plate ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ 1% glucose แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน

1.4 ทำการจิ้มโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ 2% glucose อยู่ แล้วบ่มที่ 30°C โดยการเขย่าไปด้วยข้ามคืน

1.5 นำแบคทีเรียจากขั้นที่แล้วจำนวน 50ul ไปเลี้ยงใน media 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ 0.05% glucose จำนวน 50-100 ml ที่ 30°C โดยการเขย่าไปด้วยจนโตได้ค่า OD600 = 0.9 (ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง)

1.6 นำไป ปั่นตกตะกอน ที่ 3000g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำไปผสมให้เข้ากันดี (resuspend) ใน media 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin + 1mM IPTG แล้วเลี้ยงที่ 30°C เป็นเวลา 20 ชั่งโมง

1.7 ทำการปั่นแยกเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการ ปั่นตกตะกอน ที่ 5000xg 4°C เป็นเวลา 15 นาที soluble fragment จะอยู่ในส่วนน้ำใสด้านบน (supernatant)

1.8 นำไปใช้ในการตรวจสอบทาง ELISA หรือนำไปเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อ ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ต่อไป

<u>ขั้นที่ 2 การตรวจสอบความสามารถในการจับกับ antigen ด้วยวิธีการ ELISA</u>

2.1 ใส่ 5 µg ของ แบคทีเรียไรโซเบียม ใน 100 mM $NaHCO_3$ ปริมาณ 100 ul 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 2% MPBS (2% Non-fat dried

milk in PBS) อื่นที่เหมาะสม ปริมาณ 200 ul ลงไปในหลุมของจาน ELISA ให้เท่ากับจำนวนของ soluble fragment ที่ต้องการทำการวิเคราะห์ โดยควรทำการทดสอบแบบสองหรือสามซ้ำ (duplicate หรือ triplicate) เพื่อความน่าเชื่อถือ

2.2 ปิดปากหลุมด้วยเทปใส หรือ plastic wrap แล้วเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

2.3 ทำการล้างจาน ELISA ที่เตรียมไว้จากขั้นที่แล้ว 2 ครั้งด้วย PBS

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

2.5 เท 2% MPBS (2% Non-fat dried milk in PBS) ทิ้ง

2.6 ทำการล้างจาน ELISA ที่เตรียมไว้จากขั้นที่แล้ว 2 ครั้งด้วย PBS

2.7 เติม culture supernatant หรือ periplasmic extract ที่มี soluble antibody fragments ปริมาณ 50-200 ul ที่เจือจางอยู่ 4% MPBS (4% Non-fat dried milk in PBS) ปริมาณ 50 ul ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.8 คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

2.9 เติม HisProbe-HRP ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน PBS ปริมาณ 100 ul ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.10 ล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

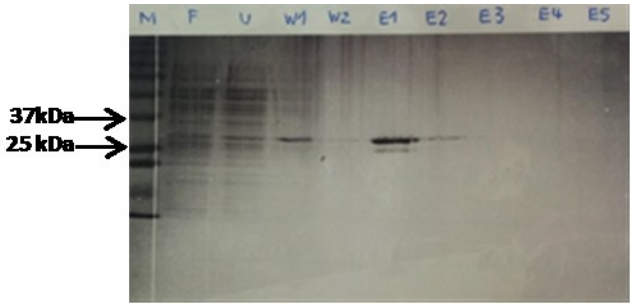
2.11 เติมสาร ABTS + 0.05% H_2O_2 ปริมาณ 200 ul แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-60 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี

2.12 ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวแสง 405 nm

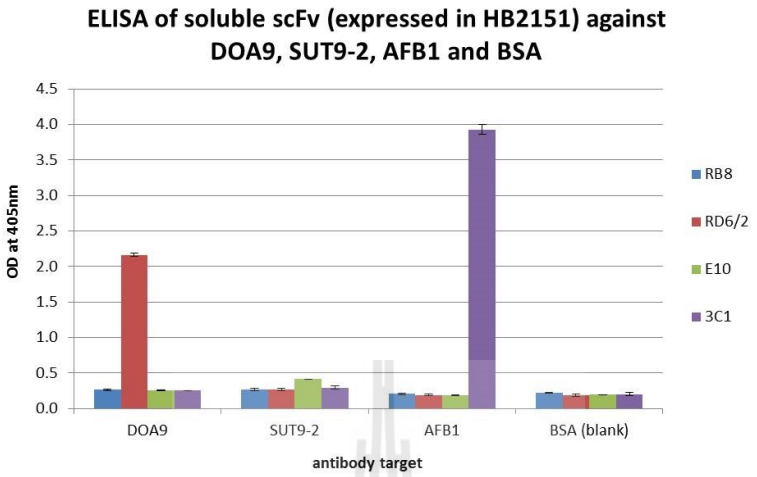
2.13 คัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการจับดี คือมีค่า OD ที่เป็น 2 เท่าของค่า background ขึ้นไป เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

***ผลแสดงการผลิต* free scFv**

ผู้วิจัยสามารถผลิตแอนติบอดีในรูปแบบ scFv อิสระได้เฉพาะจากโคลน RD6/2 ดังแสดงในภาพที่ 10 แถบดำที่เห็นคือ scFv แอนติบอดีที่ผลิตและทำให้บริสุทธิ์ออกมาได้ และเมื่อนำแอนติบอดีนี้ไปทดสอบความสามารถในการจับบนจาน ELISA พบว่าจับได้ดีดังแสดงในภาพ 11



ภาพที่ 10 แสดงผลการผลิต แอนติบอดี scFv ชนิดต่างๆ และการทำให้บริสุทธิ์; M: marker, F: flow-though fraction, U: culture supernatant, W1-W2: wash fraction, E1-E5: elute fraction



ภาพที่ 11 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ ELISA เพื่อแสดงความสามารถในการจับของแอนติบอดีส่วน scFv กับ Bradyrhizobium ได้อย่างจำเพาะเจาะจง

บทที่ 4 : บทสรุป

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการวิจัยนี้เป็นผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ของโครงการคือ สามารถพัฒนาวิธีการคัดหาเฟจจากคลังแอนติบอดีมนุษย์ ย่าโม 1 พบว่าสามารถผลิตแอนติบอดีที่จับกับ Bradyrhizobium ได้อย่างจำเพาะเจาะจง 2 ชนิดคือ แอนติบอดีจับจำเพาะ DOA9 และ SUT9-2 และได้นำวิธีเดียวกันนี้ไปคัดหาแอนติบอดี ต่อ DOA9 จากคลังกระต่ายได้สำเร็จเช่นกัน ส่วนในด้านการสร้างพัฒนาวิธีการสร้างคลังชนิดทุติยภูมินั้น สามารถทำการสร้างคลังทุติยภูมิ โดยใช้กระต่ายเป็นแหล่งในการผลิตแอนติบอดีได้สำเร็จ โดยเริ่มตั้งแต่การกระตุ้นให้กระต่ายผลิตแอนติบอดี ด้วย Bradyrhizobium DOA9 จากนั้น สกัดเอา mRNA จากม้ามมาเป็นแหล่งของยีนสำหรับสร้างแอนติบอดีบนผิวเฟจดังแสดงรายละเอียดในบทที่ 3 ผลการศึกษาคุณสมบัติคลัง พบว่าเป็นแหล่งที่ดีในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Bradyrhizobium เช่นเดียวกัน จากนั้นได้ทำการยืนยันความสามารถของแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมทั้งหมดที่ได้พัฒนาขึ้น ในการจับกับเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งได้ทำใน 2 รูปแบบ คือ ทั้งการแสดงผลทั้งบนจานปฏิกิริยาและจากรูปถ่ายเรืองแสง ซึ่งเป็นที่น่ายินดีว่าแอนติบอดีที่คัดหามาได้นั้น สามารถจับได้อย่างเจาะจงกับทั้งแบคทีเรียในรูปอิสระและแบคทีเรียที่กลายรูปไปแล้วเมื่อไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่ว ส่วนการผลิตเป็นชิ้นแอนติบอดี scFv อิสระ พบว่า มีเฉพาะแอนติบอดีจากคลังย่าโม 1 ที่สามารถผลิตออกมาได้ในปริมาณสูง และสามารถจับกับเป้าหมายได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากผลจากการใช้เฟจเป็นตัวตรวจสอบ พบว่าได้ผลดีเกินคาด เพราะจับได้ทั้งแบบอิสระและแบบที่อาศัยอยู่ในปม อีกทั้งยังให้ผลชัดเจนเมื่อ

ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง ดังนั้นจึงอาจเตรียมเฟจ ซึ่งถือเป็นโมเลกุลระดับนาโน เพื่อเก็บไว้เป็นตัวตรวจสอบได้โดยตรงโดยไม่ต้องปรับไปเป็นรูปแบบอื่นอีก ผลการวิจัยที่เกิดขึ้นทั้งหมดกำลังอยู่ในระหว่างเตรียมตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติและจดสิทธิบัตร

ข้อเสนอแนะ

ในขั้นต่อไปจะพยายามผลักดันผลงานวิจัยนี้ไปต่อยอดพัฒนาเพื่อใช้ในพื้นที่จริงต่อไป อีกทั้งวิธีการคัดหาเฟจจากคลังและการสร้างคลังแอนติบอดีจากกระต่าย ที่ได้ค้นคว้าวิจัยขึ้นมานี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการเกษตรอื่นๆ ได้ต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Harlow, E., and Lane, D. (1998) Using Antibodies : A Laboratory Manual : Portable Protocol. Cold Spring Harbor Laboratory Press
2. Howard, G.C., and Kaser, M.R., eds (2006) Making and Using Antibodies: A Practical handbook. CRC
3. Winter, G., and Milstein, C. (1991) Man-made antibodies. Nature 349, 293-299
4. Borrebaeck, C.A. (2000) Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. Immunol Today 21, 379-382
5. Buscombe, J.R. (2006) The future of infection imaging. Q J Nucl Med Mol Imaging 50, 99-103
6. Coe Clough, N.E., and Hauer, P.J. (2005) Using polyclonal and monoclonal antibodies in regulatory testing of biological products. ILAR J 46, 300-306
7. Laurino, J.P., et al. (1999) Monoclonal antibodies, antigens and molecular diagnostics: a practical overview. Ann Clin Lab Sci 29, 158-166
8. Moulds, M.K. (2006) Review: monoclonal reagents and detection of unusual or rare phenotypes or antibodies. Immunohematol 22, 52-63
9. Van de Wiele, C., et al. (2004) Radioimmunoimaging. Advances and prospects. Q J Nucl Med Mol Imaging 48, 317-325
10. Waldmann, T.A. (1991) Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. Science 252, 1657-1662
11. Blattman, J.N., and Greenberg, P.D. (2004) Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. Science 305, 200-205
12. Dubel, S., ed (2007) Handbook of therapeutic antibodies. Wiley-VCH
13. Janeway, C. (2004) Immunobiology. Garland Science
14. Albitar, M., ed (2007) Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols Humana Press
15. Barry, R., and Soloviev, M. (2004) Quantitative protein profiling using antibody arrays. Proteomics 4, 3717-3726
16. Borrebaeck, C.A. (2006) Antibody microarray-based oncoproteomics. Expert Opin Biol Ther 6, 833-838
17. Borrebaeck, C.A., and Wingren, C. (2007) High-throughput proteomics using antibody microarrays: an update. Expert Rev Mol Diagn 7, 673-686
18. Bradbury, A., et al. (2003) Antibodies in proteomics II: screening, high-throughput characterization and downstream applications. Trends Biotechnol 21, 312-317
19. Bradbury, A., et al. (2003) Antibodies in proteomics I: generating antibodies. Trends Biotechnol 21, 275-281
20. Elrick, M.M., et al. (2006) Proteomics: recent applications and new technologies. Basic Clin Pharmacol Toxicol 98, 432-441
21. Glokler, J., and Angenendt, P. (2003) Protein and antibody microarray technology. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 797, 229-240
22. Hess, J.L., et al. (2005) Immunoproteomics. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 815, 65-75

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

23. Kopf, E., and Zharhary, D. (2007) Antibody arrays--an emerging tool in cancer proteomics. Int J Biochem Cell Biol 39, 1305-1317
24. Kusnezow, W., et al. (2006) Antibody microarrays: the crucial impact of mass transport on assay kinetics and sensitivity. Expert Rev Mol Diagn 6, 111-124
25. Wingren, C., and Borrebaeck, C.A. (2004) High-throughput proteomics using antibody microarrays. Expert Rev Proteomics 1, 355-364
26. Almagro, J.C., and Fransson, J. (2008) Humanization of antibodies. Front Biosci 13, 1619-1633
27. Booy, E.P., et al. (2006) Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 54, 85-101
28. Clark, M. (2000) Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? Immunol Today 21, 397-402
29. Jolliffe, L.K. (1993) Humanized antibodies: enhancing therapeutic utility through antibody engineering. Int Rev Immunol 10, 241-250
30. Klingbeil, C., and Hsu, D.H. (1999) Pharmacology and safety assessment of humanized monoclonal antibodies for therapeutic use. Toxicol Pathol 27, 1-3
31. Santos, A.D., and Padlan, E.A. (1998) Development of more efficacious antibodies for medical therapy and diagnosis. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 60, 169-194
32. Khandare, J.J., and Minko, T. (2006) Antibodies and peptides in cancer therapy. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 23, 401-435
33. Schrama, D., et al. (2006) Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov 5, 147-159
34. Kay, B.K., et al. (2001) Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. Methods 24, 240-246
35. Kehoe, J.W., and Kay, B.K. (2005) Filamentous phage display in the new millennium. Chem Rev 105, 4056-4072
36. Rodi, D.J., et al. (2002) One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies. Curr Opin Chem Biol 6, 92-96
37. Smothers, J.F., et al. (2002) Tech.Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries. Science 298, 621-622
38. Kay, B.K., et al., eds (1996) Phage Display of Peptides and Proteins : A laboratory manual. Academic Press
39. Schumacher, T.N., et al. (1996) Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. Science 271, 1854-1857
40. Clackson, T., et al. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 352, 624-628
41. O'Brien, P.M., and Aitken, R., eds (2002) Antibody Phage Display : methods and protocols. Humana Press
42. Yamabhai, M., et al. (1998) Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. J Biol Chem 273, 31401-31407

43. Batra, S., et al. (2002) Identification of enzyme inhibitors using combinatorial libraries. Curr Med Chem 9, 307-319
44. Kay, B.K., and Hamilton, P.T. (2001) Identification of enzyme inhibitors from phage-displayed combinatorial peptide libraries. Comb Chem High Throughput Screen 4, 535-543
45. Hancock, R.E., and Sahl, H.G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat Biotechnol 24, 1551-1557
46. Ladner, R.C., et al. (2004) Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. Drug Discov Today 9, 525-529
47. Latham, P.W. (1999) Therapeutic peptides revisited. Nat Biotechnol 17, 755-757
48. McCarron, P.A., et al. (2005) Antibody conjugates and therapeutic strategies. Mol Interv 5, 368-380
49. Sato, A.K., et al. (2006) Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. Curr Opin Biotechnol 17, 638-642
50. McCafferty, J., et al. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature 348, 552-554
51. Chang, C.N., et al. (1991) Expression of antibody Fab domains on bacteriophage surfaces. Potential use for antibody selection. J Immunol 147, 3610-3614
52. Hoogenboom, H.R., et al. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Res 19, 4133-4137
53. Bugli, F., et al. (2008) Monoclonal antibody fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice. Toxicon 51, 547-554
54. Burton, D.R., et al. (1991) A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 10134-10137
55. Cai, X., and Garen, A. (1995) Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 6537-6541
56. Graus, Y.F., et al. (1997) Human anti-nicotinic acetylcholine receptor recombinant Fab fragments isolated from thymus-derived phage display libraries from myasthenia gravis patients reflect predominant specificities in serum and block the action of pathogenic serum antibodies. J Immunol 158, 1919-1929
57. Hof, D., et al. (2008) Multiple-antigen immunization of chickens facilitates the generation of recombinant antibodies to autoantigens. Clin Exp Immunol 151, 367-377
58. Lee, M.S., et al. (2008) Production and characterization of monoclonal antibody to botulinum neurotoxin type B light chain by phage display. Hybridoma (Larchmt) 27, 18-24
59. Persson, M.A., et al. (1991) Generation of diverse high-affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 2432-2436

60. Shaw, I., et al. (2008) Development of a High-Affinity Anti-Domoic Acid Sheep scFv and its Use in Detection of the Toxin in Shellfish. Anal Chem
61. Marks, J.D., et al. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol 222, 581-597
62. Nissim, A., et al. (1994) Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. EMBO J 13, 692-698
63. Sheets, M.D., et al. (1998) Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 6157-6162
64. Winter, G., et al. (1994) Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol 12, 433-455
65. Barbas, C.F., 3rd, et al. (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 4457-4461
66. Benhar, I. (2007) Design of synthetic antibody libraries. Expert Opin Biol Ther 7, 763-779
67. Hoogenboom, H.R., and Winter, G. (1992) By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. J Mol Biol 227, 381-388
68. Hoogenboom, H.R. (1997) Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. Trends Biotechnol 15, 62-70
69. Fromant, M., et al. (1995) Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. Anal Biochem 224, 347-353
70. Martineau, P. (2002) Error-prone polymerase chain reaction for modification of scFvs. Methods Mol Biol 178, 287-294
71. Crameri, A., et al. (1996) Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. Nat Med 2, 100-102
72. Fermer, C., et al. (2004) Specificity rescue and affinity maturation of a low-affinity IgM antibody against pro-gastrin-releasing peptide using phage display and DNA shuffling. Tumour Biol 25, 7-13
73. Korpimaki, T., et al. (2003) Further improvement of broad specificity hapten recognition with protein engineering. Protein Eng 16, 37-46
74. Proba, K., et al. (1998) Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. J Mol Biol 275, 245-253
75. Zhang, X.X., et al. (2003) Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library. J Med Virol 71, 511-517
76. Schier, R., et al. (1996) Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. J Mol Biol 255, 28-43
77. Schier, R., et al. (1996) 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 263, 551-567

78. Yang, W.P., et al. (1995) CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. J Mol Biol 254, 392-403
79. Burtrum, D., et al. (2003) A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. Cancer Res 63, 8912-8921
80. Dauvillier, S., et al. (2002) Intracellular single-chain variable fragments directed to the Src homology 2 domains of Syk partially inhibit Fc epsilon RI signaling in the RBL-2H3 cell line. J Immunol 169, 2274-2283
81. Gejima, R., et al. (2002) Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling. Hum Antibodies 11, 121-129
82. Kovaleva, M., et al. (2006) Abrogation of viral interleukin-6 (vIL-6)-induced signaling by intracellular retention and neutralization of vIL-6 with an anti-vIL-6 single-chain antibody selected by phage display. J Virol 80, 8510-8520
83. Li, Y., et al. (2004) Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody. Blood 104, 1137-1144
84. Paz, K., et al. (2005) Human single-domain neutralizing intrabodies directed against Etk kinase: a novel approach to impair cellular transformation. Mol Cancer Ther 4, 1801-1809
85. Piloto, O., et al. (2005) Inhibitory anti-FLT3 antibodies are capable of mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and reducing engraftment of acute myelogenous leukemia blasts in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. Cancer Res 65, 1514-1522
86. Willemsen, R.A., et al. (2005) T cell retargeting with MHC class I-restricted antibodies: the CD28 costimulatory domain enhances antigen-specific cytotoxicity and cytokine production. J Immunol 174, 7853-7858
87. Rowley, M.J., et al. (2004) Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. Biotechnol Annu Rev 10, 151-188
88. Xie, M.H., et al. (1997) Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv. Nat Biotechnol 15, 768-771
89. Kristensen, P., and Winter, G. (1998) Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. Fold Des 3, 321-328
90. Pedersen, J.S., et al. (2002) Directed evolution of barnase stability using proteolytic selection. J Mol Biol 323, 115-123
91. Hale, G. (2006) Therapeutic antibodies--delivering the promise? Adv Drug Deliv Rev 58, 633-639
92. Mitra, A., et al. (2006) Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. Curr Pharm Des 12, 4729-4749
93. Reilly, R.M. (2006) Radioimmunotherapy of solid tumors: the promise of pretargeting strategies using bispecific antibodies and radiolabeled haptens. J Nucl Med 47, 196-199
94. Stowell, C.P. (2006) Therapy with immunoglobulin: applications for monoclonal antibodies. J Infus Nurs 29, S29-44

95. Carter, P., and Merchant, A.M. (1997) Engineering antibodies for imaging and therapy. Curr Opin Biotechnol 8, 449-454
96. Filpula, D. (2007) Antibody engineering and modification technologies. Biomol Eng 24, 201-215
97. Teillaud, J.L. (2005) Engineering of monoclonal antibodies and antibody-based fusion proteins: successes and challenges. Expert Opin Biol Ther 5 Suppl 1, S15-27
98. Haas, L.F. (2001) Emil Adolph von Behring (1854-1917) and Shibasaburo Kitasato (1852-1931). J Neurol Neurosurg Psychiatry 71, 62
99. Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. Nature 302, 575-581
100. Lipman, N.S., et al. (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. ILAR J 46, 258-268
101. Jiang, Y., et al. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K+ channel. Nature 423, 33-41
102. Lange, C., and Hunte, C. (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 2800-2805
103. Osterman, M.T., and Lichtenstein, G.R. (2006) Infliximab in fistulizing Crohn's disease. Gastroenterol Clin North Am 35, 795-820
104. Ostermeier, C., et al. (1997) Structure at 2.7 A resolution of the Paracoccus denitrificans two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 10547-10553
105. Zhou, Y., et al. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K+ channel-Fab complex at 2.0 A resolution. Nature 414, 43-48
106. Birch, J.R., and Racher, A.J. (2006) Antibody production. Adv Drug Deliv Rev 58, 671-685
107. Kelley, B. (2007) Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations. Biotechnol Prog 23, 995-1008
108. Plosker, G.L., and Keam, S.J. (2006) Trastuzumab: a review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer. Drugs 66, 449-475
109. Webster, R.E. (1996) Biology of the Filamentous Bacteriopahge. In Phage Display of Peptides and Proteins : A laboratory manual (1 edn) (Kay, B.K., et al., eds), 1-20, Academic Press
110. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor
111. Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 228, 1315-1317
112. Armstrong, N., et al. (1996) Vector for Phage Display. In Phage Display of Peptides and Proteins (1 edn), 35-53, Academic Press
113. Fernandez-Gacio, A., et al. (2003) Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. Trends Biotechnol 21, 408-414
114. Gram, H. (1999) Phage display in proteolysis and signal transduction. Comb Chem High Throughput Screen 2, 19-28
115. Zucconi, A., et al. (2000) Domain repertoires as a tool to derive protein recognition rules. FEBS Lett 480, 49-54

116. Holt, L.J., et al. (2003) Domain antibodies: proteins for therapy. Trends Biotechnol 21, 484-490
117. Skerra, A. (2007) Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. Curr Opin Biotechnol 18, 295-304
118. Soderlind, E., et al. (1992) Phage display technology in antibody engineering: design of phagemid vectors and in vitro maturation systems. Immunol Rev 130, 109-124
119. Soumillion, P., et al. (1994) Phage display of enzymes and in vitro selection for catalytic activity. Appl Biochem Biotechnol 47, 175-189; discussion 189-190
120. Crameri, R., et al. (2002) Direct selection of cDNAs by phage display. Methods Mol Biol 185, 461-469
121. Crameri, R., and Kodzius, R. (2001) The powerful combination of phage surface display of cDNA libraries and high throughput screening. Comb Chem High Throughput Screen 4, 145-155
122. Crameri, R., and Walter, G. (1999) Selective enrichment and high-throughput screening of phage surface-displayed cDNA libraries from complex allergenic systems. Comb Chem High Throughput Screen 2, 63-72
123. Rhyner, C., et al. (2002) Direct selection of cDNAs from filamentous phage surface display libraries: potential and limitations. Curr Pharm Biotechnol 3, 13-21
124. de Beer, T., et al. (2000) Molecular mechanism of NPF recognition by EH domains. Nat Struct Biol 7, 1018-1022
125. Hoogenboom, H.R. (2002) Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications. In Antibody Phage Display (1 edn) (O'Brien, P.M., and Aitken, R., eds), 1-38, Humana Press
126. Holliger, P., et al. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 6444-6448
127. Wang, H., et al. (2000) Bi-specific antibodies in cancer therapy. Adv Exp Med Biol 465, 369-380
128. Withoff, S., et al. (2001) Bi-specific antibody therapy for the treatment of cancer. Curr Opin Mol Ther 3, 53-62
129. Baek, H., et al. (2002) An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. Nucleic Acids Res 30, e18
130. Chasteen, L., et al. (2006) Eliminating helper phage from phage display. Nucleic Acids Res 34, e145
131. Kramer, R.A., et al. (2003) A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein. Nucleic Acids Res 31, e59
132. Li, Z., et al. (2005) Preparation of peptide-targeted phagemid particles using a protein III-modified helper phage. Biotechniques 39, 493-497
133. Oh, M.Y., et al. (2007) Enhancing phage display of antibody fragments using gIII-amber suppression. Gene 386, 81-89
134. Soltes, G., et al. (2003) A new helper phage and phagemid vector system improves viral display of antibody Fab fragments and avoids propagation of insert-less virions. J Immunol Methods 274, 233-244
135. O'Brien, P.M., and Aitken, R. (2002) Broadening the Impact ofAntibody Phage Display Technology. In Antibody Phage Display: Methods and Protocols (O'Brien, P.M., and Aitken, R., eds), 73-86, Humana Press

136. Rondot, S., et al. (2001) A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. Nat Biotechnol 19, 75-78
137. Rakonjac, J., et al. (1997) Filamentous phage infection-mediated gene expression: construction and propagation of the gIII deletion mutant helper phage R408d3. Gene 198, 99-103
138. Duenas, M., and Borrebaeck, C.A. (1995) Novel helper phage design: intergenic region affects the assembly of bacteriophages and the size of antibody libraries. FEMS Microbiol Lett 125, 317-321
139. Vieira, J., and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. Methods Enzymol 153, 3-11

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน

๑. *ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ*

Vu, N.X., Tittabutr, P., and Yamabhai, M. (2015). Generation of rabbit single charin fragment variable (scFv) antibody for specific detection of nitrogen-fixing bacteria
Paper presented at: The 41st Congress on Science and Technology of Thailand (STT41) : STT41 SUT Speical Symposia and Workshops; Session 9 Molecular Biotechnology (Suranaree University of Technology (SUT), Nakhon Ratchasima, Thialand, (6-8 November).

Yamabhai, M., Pruksametanan, N., Rangnoi, K., Srila, W., Yoohat, K., Sompunga, P., Sumphanapuy, T., and Bonaparte, N. (2014). Isolation of peptides and human monoclonal antibodies with potential biotechnological applications from phage display library In The 3rd Thailand National Research Universities Summit, 2014: Prelude to World Class University (Bangkok Convention Center, Centara Hotel, Bangkok, (31 July - 1 August, 2014.).

Yamabhai, M. (2014). Enzyme and Antibody Engineering for Biotechnological Applications Paper presented at: Humboldt Kolleg–2nd International Conference on Natural Sciences (HK-ICONS) (25-25 September) (Batu, East Java, Indodesia).

Tittabutr, P., Yoohat, K., Srila, W., Yuttavanichakul, W., Wongdee, J., Maier, M., Sompunga, P., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Yamabhai, M. (2013). Identification of single-chain variable antibody fragment (scFv) against nitrogen fixing bacteria Bradyrhizobium for agricultural application. In The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (the Emerald Hotel, Bangkok, Thailand, 16th - 19th October).

Srila, W., Buensanteai, N., and Yamabhai, M. (2013). Identification of single-chain variable antibody fragment (scFv) against plant pathogenic bacteria for agricultural application. In The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (the Emerald Hotel, Bangkok, Thailand, 16th - 19th October).

ภาคผนวก ข การผลิตบุคลากร

๑. ส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยนี้ ได้ใช้เป็นส่วนหนึ่งวิทยานิพนธ์ ของนักศึกษาปริญญาเอก 1 คน คือ นาย เหงียน ซวน วู

๒. ส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยนี้ ใช้เป็นส่วนหนึ่งของการฝึกงานนักศึกษาแลกเปลี่ยนจาก ออสเตรีย 2 คน คือนางสาว นางสาว มิชลิส ฮันนา และนางสาว มาเรีย หลุยส์ พุป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัยหลัก

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 จบการศึกษา ระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. 2541 จากนั้นในปี พ.ศ. 2543-2545 ได้ทุนไปทำ postdoctoral 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 ประเทศสหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2547 และมีบุตร 1 คน ชื่อ ดญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นรองศาสตราจารย์ และหัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) จนถึงปัจจุบันมีผลงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ 39 เรื่อง อนุสิทธิบัตร 1 เรื่อง เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักของมหาบัณฑิต 5 คน และดุษฎีบัณฑิต 4 คน และเป็นหัวหน้า โครงการวิจัยทั้งหมด 36 โครงการ ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ดีเด่นจาก วช ในปี2547 และรางวัลพนักงานดีเด่นด้านการวิจัยจาก มทส ในปี 2556

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร 044 224152-4 224234 หรือ 244388 โทรสาร 044 224150
Email: montarop@g.sut.ac.th