รหัสโครงการ SUT3-304-42-12-14

รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวฟาจเพื่อศึกษาอันตรกริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน

Application of Phage-displayed Technology for the Study of Protein-protein Interactions

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๔๒

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน ๒๕๔๓

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2542 ประเภทโครงการระหว่างปี ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร น.ส. อุลัยวรรณ์ อุสันสา ดร.หนึ่ง เตียอำรุง และ ดร. ไบรอัน เค แห่งมหาวิทยาลัยวิสคอนสิน แมดดิสัน ที่ได้มีส่วนช่วยให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ เป็นนวัตกรรมที่แพร่หลายในประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย การวิจัยนี้เป็นโครงการขนาดเล็กประเภทงานวิจัยระหว่างปี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแสดงให้เห็นว่า สามารถนำเทคโนโลยีนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับอันตรกริยาระหว่างโปรตีนได้ในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัย จากผลการศึกษาพบว่า สามารถคัดเลือกฟาจที่จับกับโปรตีนเป้าหมาย SrcSH3 ได้อย่างเฉพาะเจาะจง อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถคัดเลือกฟาจที่จับกับโปรตีนเป้าหมาย ENTH ได้ด้วยวิธีการมาตรฐานที่ใช้อยู่ ซึ่งจะต้องทำการปรับปรุงต่อไปในอนาคต

ความสำเร็จของการวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการชี้ให้เห็นว่า สามารถนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจมาใช้ได้สำเร็จ ซึ่งข้าพเจ้าจะได้ทำการถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ให้กับคณาจารย์และนักศึกษาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อการประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ เป็นนวัตกรรมที่แพร่หลายในประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย การวิจัยนี้เป็นโครงการขนาดเล็กประเภทงานวิจัยระหว่างปี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแสดงให้เห็นว่า สามารถนำเทคโนโลยีนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับอันตรกริยาระหว่างโปรตีนได้ในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัย จากผลการศึกษาพบว่า สามารถคัดเลือกฟาจที่จับกับโปรตีนเป้าหมาย SrcSH3 ได้อย่างเฉพาะเจาะจง อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถคัดเลือกฟาจที่จับกับโปรตีนเป้าหมาย ENTH ได้ด้วยวิธีการมาตรฐานที่ใช้อยู่ ซึ่งจะต้องทำการปรับปรุงต่อไปในอนาคต

ความสำเร็จของการวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการชี้ให้เห็นว่า สามารถนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจมาใช้ได้สำเร็จ ซึ่งข้าพเจ้าจะได้ทำการถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ให้กับคณาจารย์และนักศึกษาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อการประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อ ..... ข
Abstract ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญภาพ ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ 1
บทที่ 2 คลังของฟาจที่ใช้ในการวิจัย 5
ก) การตรวจหาจำนวนฟาจในคลัง 5
ข) ผลการทดลอง 6
บทที่ 3 โปรตีนเป้าหมายที่ใช้ในการวิจัย 7
บทที่ 4 การคัดเลือกฟาจที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง 9
ก) การตรึงโปรตีนเป้าหมาย 9
ข) การคัดเลือกฟาจ 9
ขั้นที่ ข.1 การคัดเลือกฟาจรอบที่ 1 9
ขั้นที่ ข.2 การขยายจำนวนฟาจที่ได้จากการคัดเลือกในรอบที่ 1 9
ขั้นที่ ข.3 การคัดเลือกฟาจรอบที่ 2 10
ขั้นที่ ข.4 การคัดเลือกฟาจรอบที่ 3 10
บทที่ 5 การตรวจสอบความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายของฟาจแต่ละตัว 11
ก) การคัดแยกฟาจแต่ละตัวออกจากกัน 11
ขั้นที่ ก.1 ประมาณประชากรฟาจ 11
ขั้นที่ ก.2 แยกฟาจ 12
ขั้นที่ ก.3 เลี้ยงฟาจแต่ละตัว 12
ข) การตรวจสอบความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายโดยวิธี Enzyme-linked 13
immunosorbentassay (ELISA) 15
บทที่ 6 ข้อสรุปและข้อวิจารณ์ 15
ก) ความสมบูรณ์ของคลัง 15
ข) การคัดเลือกฟาจที่จับกับโปรตีนเป้าหมาย 15

บรรณานุกรม 17
ภาคผนวก 21
ก. รายการสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยและสูตรการเตรียม 21
ข. แหล่งข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ 23
ประวัตินักวิจัย 24

สารบัญภาพ/ตาราง

รูปที่ 1.1 การคัดเลือกฟาจที่ต้องการ 3
รูปที่ 1.2 ลักษณะการแสดงออกของเปปไทด์ หรือโปรตีนบนผิวฟาจ 2 ประเภท 4
รูปที่ 2.1 แสดง plaque ที่ขึ้นอยู่บนพื้นของแบคทีเรีย 6
ตารางที่ 2.1 แสดงจำนวน plaque ที่นับได้ที่ระดับความเจือจาง 10^{-8} ,10^{-9} ,10^{-10} 6
รูปที่ 3.1 โปรตีนเป้าหมายที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ 7
รูปที่ 5.1 การตรวจสอบความเจือจางที่เหมาะสมของฟาจก่อนทำการแยกให้ได้ฟาจเดี่ยวในขั้นที่ 2 12
รูปที่ 5.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายของฟาจที่ได้ผ่านการคัดเลือกแต่ละตัวด้วยวิธีการทดสอบ ELISA 14

บทที่ 1
บทนำ

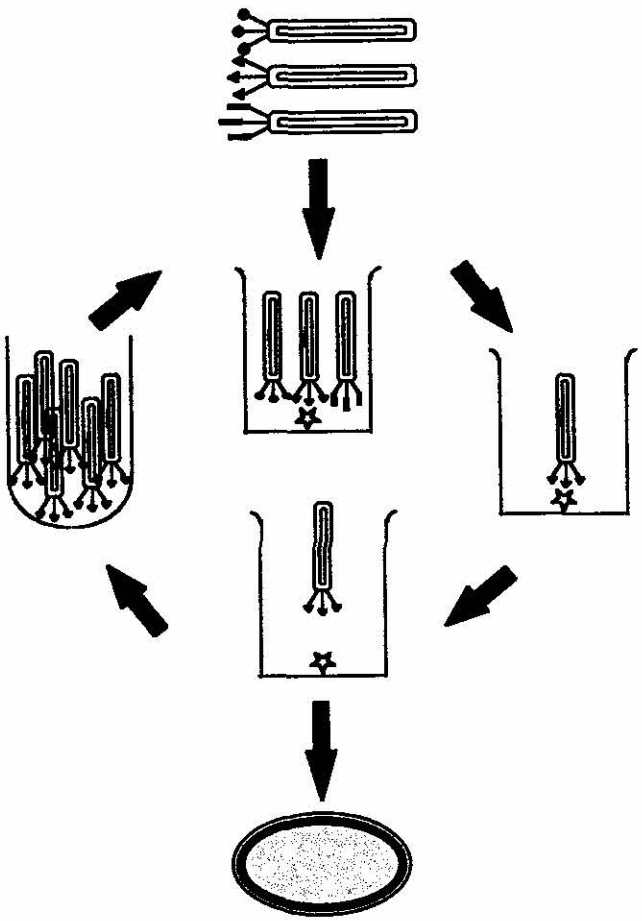
เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ

ในระยะเวลา 10 กว่าปีที่ผ่านมา การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจในการค้นคว้าวิจัยเรื่องต่าง ๆ ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้เติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว ในประเทศที่พัฒนาแล้วมีผลงานการวิจัยและบทความเกี่ยวกับเทคโนโลยีนี้เป็นจำนวนมากที่ได้รับการตีพิมพ์ (1-6) ในปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับกันในหมู่นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายว่า เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจคือ นวัตกรรมที่ยังให้มนุษย์สามารถทำให้เกิดการวิวัฒนาการในห้องทดลองได้ทั้งนี้ เนื่องจากอันตรกริยาหรือการจับกันอย่างเหมาะสมระหว่างโมเลกุลคู่หนึ่ง สามารถถูกคัดเลือกให้เกิดขึ้นได้ในห้องทดลองในระยะเวลาอันสั้น (รูปที่ 1.1) ซึ่งการหาคู่จับที่เหมาะระหว่างโมเลกุล 2 ชนิดเช่นนี้ ถ้าเกิดขึ้นเองตามระบบวิวัฒนาการในธรรมชาติอาจต้องใช้เวลาร่วมหลายร้อยล้านปี การแสดงออกของโปรตีนบนฟาจ สามารถทำได้โดยใช้เทคโนโลยีพื้นฐานทางการตัดต่อยีนและทางชีวจุลินทรีย์ ในการเชื่อมต่อโปรตีนที่ต้องการแสดงกับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผิวฟาจ (capsid) เปปไทด์หรือโปรตีนที่เชื่อมติดอยู่บนผิวฟาจนี้สามารถจับกับโมเลกุลอื่นๆได้อย่างมีอิสระ เปปไทด์หรือโปรตีนที่มีความหลากหลายจำนวนมหาศาล ซึ่งถูกถอดรหัสมาจากสายนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) นี้จะเชื่อมอยู่กับส่วนปลายทางด้านอะมิโน (N-terminus) ของโปรตีนหลักชื่อ pVIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 2,500 ชิ้น หรือโปรตีนรองชื่อ pIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 5 ชิ้น บนผิวของฟาจของแบคทีเรีย (bacteriophage) ชนิด M13, fi หรือ fd รูปที่ 2 แสดงระบบการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจทั้ง 2 ประเภทที่กล่าว ซึ่งแต่ละระบบเกิดจากใช้เวคเตอร์ต่างชนิดกัน คลังของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีความแตกต่างกันเป็นจำนวนมหาศาล คือประมาณ 10^8-10^{11} ชนิด สามารถถูกสร้างขึ้น โดยการนำเวคเตอร์จำนวนมากที่ได้ถูกตัดต่อขึ้นใส่ลงไป (transform) ในแบคทีเรีย *E.Coli* โดยวิธีการผ่านทางกระแสไฟฟ้า (electroporation) นับตั้งแต่เทคโนโลยีนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้น ได้มีการตีพิมพ์ผลงานจำนวนมากที่แสดงความสำเร็จในการประยุกต์ใช้คลังของฟาจที่แสดงเปปไทด์ที่มีความหลากหลายสูงที่มีความยาวตั้งแต่ 6-43 กรดอะมิโน ในงานวิจัยด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง (1,7-11)

มีรายงานจำนวนมากที่ได้แสดงถึงความสำเร็จในการคัดเลือกเปปไทด์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายชนิดต่าง ๆ เช่น แอนติบอดี้, รีเซฟเตอร์บนผิวเซล โปรตีนภายในเซล และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ (10) ซึ่งเปปไทด์ที่ได้รับการคัดเลือกมาเหล่านี้สามารถจะนำไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการพัฒนายาต่อไป (10)

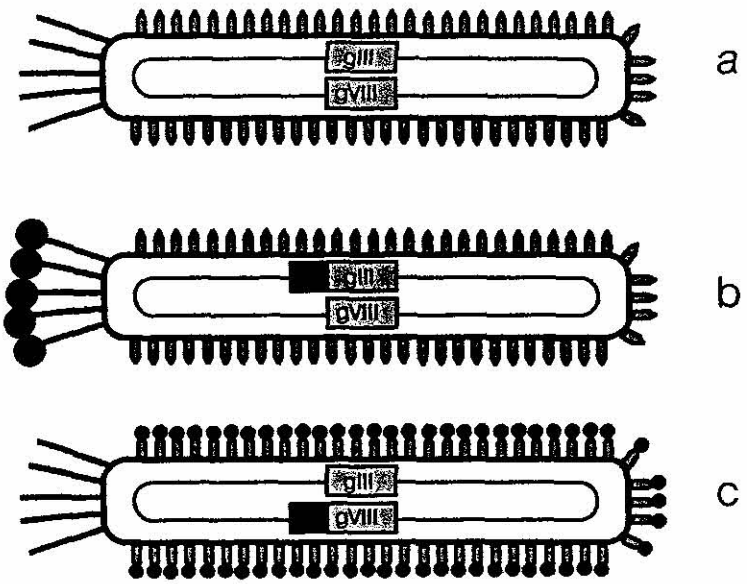
นอกจากการแสดงเปปไทด์บนผิวฟาจแล้ว โปรตีน เช่น โดเมนและเอนไซม์ชนิดต่างก็สามารถนำมาแสดงบนผิวฟาจได้ ผลจากการศึกษาได้พบว่า โดยส่วนใหญ่เอนไซม์หรือโปรตีนโดเมนยังมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาหรือมีอันตรกริยาเหมือนปกติ แม้เมื่อถูกนำมาเชื่อมอยู่กับโปรตีนบนผิวฟาจทั้งชนิด หลัก (pVIII) และรอง (pIII)

มีรายงานที่แสดงว่าโปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดต่างๆ สามารถถูกนำมาปรับแปลงให้มีลักษณะต่างๆ กันได้อย่างหลากหลาย (mutagenized) แล้วแสดงบนผิวของฟาจ (12-18) จากนั้นนำไปคัดเลือกหาคุณสมบัติใหม่ที่ต้องการ การใช้วิธีนี้จึงเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพและน่าสนใจในการสร้างแอนติบอดี้ชนิดใหม่ (antibody engineering) (19-25) หรือการปรับปรุงเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น (18) นอกจากนั้นแล้วยังมีรายงานอีกจำนวนมากที่แสดงถึงความสำเร็จในการใช้คลังของ cDNA ที่แสดงบนผิวฟาจ ในการศึกษาอันตรกริยาระหว่างโปรตีนชนิดต่าง ๆ (26-31) การคัดเลือกโปรตีนที่ต้องการจากคลังของ cDNA โดยใช้เทคโนโลยีการแสดงของโปรตีนบนฟาจจึงถือเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจอีกอันหนึ่งในการศึกษาอันตรกริยาระหว่างโปรตีน



รูปที่ 1.1 การคัดเลือกฟาจที่ต้องการ

ภาพแสดงตัวอย่างการคัดเลือกฟาจอย่างง่าย จากฟาจ 3 ตัวที่แสดงเปปไทด์ที่แตกต่างกันบนโปรตีนปกคลุมผิวชนิดรอง (pIII) ในขั้นแรกฟาจจะถูกนำไปใส่ลงในหลุมบนแผ่นทดสอบ ELISA ที่มีโปรตีนเป้าหมายเคลือบอยู่ หลังจากนั้นจะทำการล้างแต่ละหลุมเพื่อกำจัดฟาจที่ไม่จับกับโปรตีนเป้าหมายออก จากนั้นจะทำการสกัดฟาจที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายออกมาเพื่อทำการขยายจำนวนในแบคทีเรีย *E. coli* ฟาจที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายในการคัดเลือกครั้งแรกและได้ถูกขยายจำนวนเพิ่มขึ้นแล้วนี้ จะถูกนำไปผ่านการคัดเลือกอีก 1-2 ครั้ง เพื่อคัดเลือกให้ได้เฉพาะฟาจที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้อย่างเฉพาะเจาะจงจริง หลังจากผ่านการคัดเลือกถึง 3 ครั้งแล้วจะนำฟาจที่ได้มาเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการแยกฟาจแต่ละตัวออกจากกัน ฟาจแต่ละตัวที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติการจับกับโปรตีนเป้าหมายและวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนที่แสดง ต่อไป



รูปที่ 1.2 ลักษณะการแสดงออกของเปปไทด์ หรือโปรตีนบนผิวฟาจ 2 ประเภท

อณุภาคของฟาจประกอบด้วย DNA ชนิดวงกลมเส้นเดี่ยว 1 ชุด เส้นนิวคลีโอไทด์สามารถถูกตัดต่อให้เชื่อมต่อกับยีน pIII หรือ pVIII เพื่อให้แสดงบนโปรตีนบนผิวฟาจชนิดหลักหรือรองบนฟาจแต่ละตัว โปรตีนเคลือนผิวชนิด pIII และ pVIII มีประมาณ 5 ชุด และ 2,500 ชุดตามลำดับ ระบบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวฟาจชนิดอื่นๆ สามารถหาดูได้จากเอกสารอ้างอิง (1)

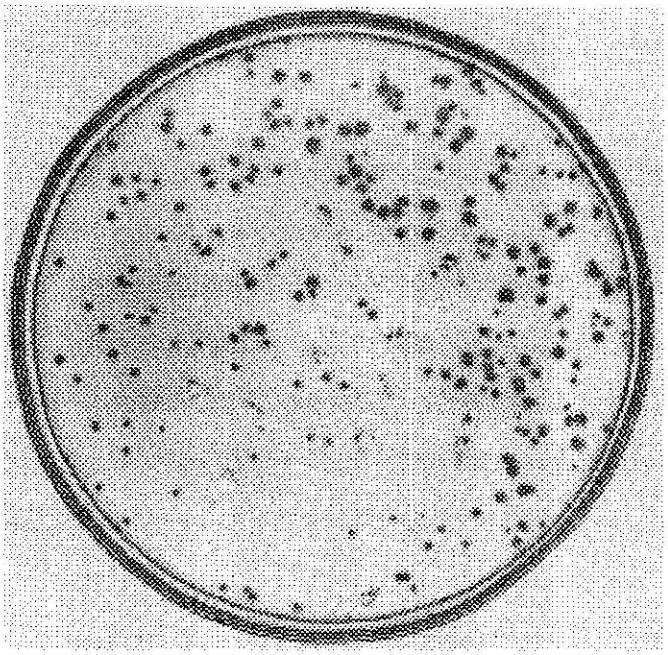
ห้องสมุดของฟาจที่ได้ถูกสร้างขึ้นเพียงแค่ 1 มล. จะสามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อคัดเลือกโปรตีนที่ต้องการได้จำนวนมากมาย เพราะการทดลองเพื่อคัดเลือกครั้งหนึ่งต้องใช้ห้องสมุดฟาจเพียงแค่ประมาณ 50 ไมโครลิตรเท่านั้น อีกทั้งห้องสมุดที่ได้สร้างขึ้นนี้ยังสามารถนำไปเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นได้อย่างง่ายดาย ด้วยเทคโนโลยีพื้นฐานทางด้านจุลชีววิทยาในขณะที่ถ้าทำการสั่งซื้อจากบริษัทห้องสมุด 1 ชุดจะสามารถใช้ได้พียง 50-100 ครั้งเท่านั้น

บทที่ 2
คลังของฟาจที่ใช้ในการวิจัย

คลังของฟาจที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้นำมาจากห้องปฏิบัติการของ ดร.ไบรอัน เค เป็นคลังซึ่งรวบรวมฟาจที่แสดงเปปไทด์ที่มีความยาว 12 กรดอะมิโน ซึ่งมีความหลากหลายสูง (ประมาณ 10^9 ชนิด) โดยปกติคลังจะถูกเก็บรักษาไว้ในที่เย็นจัด(อุณหภูมิ –80 °C) เพื่อเก็บรักษาสภาพความหลากหลายสูงไว้ เนื่องจากการนำฟาจมายังมหาวิทยาลัยจำเป็นต้องมีการเก็บคลังในอุณหภูมิ ต่ำกว่า -80°C อีกทั้งยังมีช่วงเวลาประมาณ 1 เดือนที่ต้องนำคลังไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพราะตู้ทำความเย็น -80°C ของมหาวิทยาลัยขัดข้อง จึงจำเป็นต้องนำคลังของฟาจมาตรวจหาปริมาณเพื่อให้แน่ใจว่ายังมีสภาพดีพอที่จะนำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

ก) การตรวจหาจำนวนฟาจในคลัง

นำคลังของฟาจมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-10} จากนั้นผสม ฟาจที่ความเจือจาง 10^{-8}, 10^{-9} และ 10^{-10} จำนวน 10 µl กับ เชื้อแบคทีเรีย DH5αF′ ที่ถูกบ่มเป็นเวลา 1 คืน จำนวน 200 µl โดยผสมในหลอดทดลองขนาด 15 ml จากนั้นเท top agar เหลว จำนวน 4 ml ที่มี 100 mM IPTG จำนวน 200 µl และ 2% X-gal จำนวน 30 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเทส่วนผสมทั้งหมดทับลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารชนิด 2xYT ผสมให้ top-agar เย็นแล้วจึงเก็บไปบ่มโดยคว่ำจานลง ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงนำมานับจำนวน plaque ซึ่งมีลักษณะเป็นวงสีฟ้าบนพื้นของแบคทีเรีย จำนวน plaque คือ จำนวนของฟาจ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 แสดง **plaque** ที่ขึ้นอยู่บนพื้นของแบคทีเรีย

วง plaque เกิดจากแบคทีเรียที่ติดเชื้อฟาจทำให้โตช้ากว่าแบคทีเรียปกติ จึงมีลักษณะเป็นวงกลมขุ่น สีฟ้าของ plaque เกิดจากการย่อยสลาย x-gal ด้วยเอนไซม์ β-galactosidase ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นจากยีนของฟาจที่ถูกชักนำให้แสดงออกด้วย Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)

ข) ผลการทดลอง

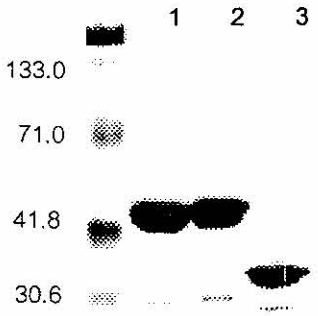
จากการทดลองข้างต้น สามารถนับจำนวน plaque ได้ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1 ซึ่งจากการคำนวณพบว่า คลังมีฟาจประมาณ 3×10^{12} ตัว/ µl ซึ่งนับว่ามีจำนวนสูงเพียงพอที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2.1 แสดงจำนวน plaque ที่นับได้ที่ระดับความเจือจาง 10^{-8},10^{-9},10^{-10}

ระดับความเจือจาง	จำนวนวงสีฟ้า
10^{-8}	289
10^{-9}	32
10^{-10}	3

บทที่ 3
โปรตีนเป้าหมายที่ใช้ในการวิจัย

โปรตีนเป้าหมาย (target proteins) ที่จะใช้ในการตรวจหาคุณสมบัติในการมีอันตรกริยาในการวิจัยครั้งนี้ คือ โดเมน SH3 ของ โปรตีน Src และ โดเมน ENTH ของโปรตีน Af10 และโปรตีน MP90 โปรตีนทั้งหมดอยู่ในรูปของโปรตีนที่เชื่อมอยู่กับ โปรตีน GST (GST fusion proteins) เหตุที่ต้องใช้โปรตีนที่เชื่อมอยู่กับ GST เพราะจะช่วยให้สามารถเตรียมโปรตีนเป้าหมายที่มีความบริสุทธิ์สูงได้ในจำนวนที่มากพอที่จะใช้ในการทำวิจัยต่อไป วิธีการเตรียม GST-fusion proteins นี้ สามารถหาได้จากคู่มือของบริษัท Amersham Pharmacia Biotech รูปที่ 3.1 เป็นภาพแสดงโปรตีนทั้งสามชนิดที่ถูกแยกบนเจลชนิด 10% SDS-polyacrylamide



รูปที่ 3.1 โปรตีนเป้าหมายที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

เลนที่ 1 คือตัวชี้ขนาด (marker) ซึ่งมีหน่วยเป็น กิโลดาลตัน (kDa) เลนที่ 2 คือ GST-Af10-ENTH เลนที่ 3 คือ GST-MP90-ENTH และเลนที่ 4 คือ GST-Src-SH3

การศึกษาคุณสมบัติด้านอันตรกริยาของโปรตีนโดเมน SH3 ของอินเตอร์เซกตินและโดเมน ENTH นี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ทำอยู่เมื่อครั้งได้ทำการศึกษาในระดับปริญญาเอก ณ. ประเทศสหรัฐอเมริกา อินเตอร์เซกตินเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโดเมน ENTH สองอันและโดเมน SH3 ห้าอัน (32) หลักฐานจากการวิจัยในเวลาไม่นานมานี้ได้บ่งชี้ว่า อินเตอร์เซกติน เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในระบบการนำสารเข้าสู่เซล (endocytosis) ทั้งในคนและสัตว์ชั้นต่ำและชั้นสูง (33) ส่วนโดเมน ENTH เป็นโดเมนที่ถูกค้นพบใหม่เช่นกัน หลักฐานจำนวนหนึ่งได้ชี้ว่าโดเมนนี้มีความสำคัญในระบบการนำสารเข้าสู่เซล และการเรียงตัวของโปรตีนโครงสร้างในเซล (cytoskeletal organization) (34) เนื่องจากโดเมนทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นโปรตีนซึ่งถูกค้นพบใหม่ ถึงแม้หลักฐานหลาย

ประการจะได้ชี้ว่าโปรตีนนี้มีหน้าที่สำคัญในเซล แต่ความเข้าใจในคุณสมบัติและการทำงานของมันยังมีน้อยมาก ความรู้ที่ได้จากการศึกษา คุณสมบัติทางอันตรกริยาของโปรตีนโดเมนทั้ง 2 นี้ โดยใช้เทคโนโลยีการแสดงของโปรตีนบนฟาจจึงจะเป็นพื้นฐานสำคัญในการทำความเข้าใจกลไกการทำงานของโปรตีนทั้ง 2 ในเซล อันจะนำไปสู่ความเข้าใจเรื่องการนำสารเข้าและออกจากเซล ซึ่งเป็นความรู้ที่สำคัญต่อมนุษยชาติต่อไป

บทที่ 4
การคัดเลือกฟาจที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง

การคัดเลือกฟาจในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีมาตรฐาน โดยจะทำการคัดเลือกฟาจบนจาน ELISA เป็นจำนวน 3 รอบ

ก) การตรึงโปรตีนเป้าหมาย

สำหรับการคัดเลือกรอบแรก นำโปรตีนเป้าหมายจำนวน 10 μg ผสมกับ 0.1 M $NaHCO_3$ จำนวน 100 μl ใส่ลงในหลุมบนจาน ELISA ชนิด MaxiSorb ™ (Nunc-Immuno™, เดนมาร์ค) ห่อจาน ELISA ด้วยแผ่นพลาสติกบาง (wrap) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 1.5 % BSA ใน 1x PBS (pH 7.4) จำนวน 100 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน

สำหรับการคัดเลือกฟาจรอบที่ 2 และ 3 ทำเหมือนรอบแรกแต่ลดปริมาณโปรตีนเป้าหมายลงเหลือ 5 μg และ 1 μg ตามลำดับ

ข) การคัดเลือกฟาจ

ขั้นที่ ข.1 การคัดเลือกฟาจรอบที่ 1

ทำการล้างหลุมจากขั้นตอนการตรึงโปรตีนเป้าหมาย (ก) โดยเติมน้ำยาล้าง [0.1% Tweenใน 1xPBS (pH 7.4)] จนเต็มหลุม จากนั้นคว่ำจานและสลัดน้ำยาล้างออกจากจาน ELISA ให้หมด ทำการล้างทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วเติมคลังของฟาจจำนวน 25 μl และ 1xPBS (pH 7.4) จำนวน 75 μl ลงในแต่ละหลุม ห่อจาน ELISA ด้วยแผ่นพลาสติกบาง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างฟาจออกจากหลุมด้วยวิธีดังที่กล่าวไปแล้ว เป็นจำนวน 5 ครั้ง แล้วทำการสกัดโปรตีนเป้าหมายออกโดยการเติม Glycine-HCl (pH 2.0) จำนวน 50 μl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกจากหลุมแล้วนำไปใส่หลอดขนาด 1.5 ml ที่มี Sodium phosphate buffer (pH 7.0) อยู่จำนวน 50 μl เพื่อปรับ pH ของสารละลายให้มีสภาพเป็นกลาง

ขั้นที่ ข.2 การขยายจำนวนฟาจที่ได้จากการคัดเลือกในรอบที่ 1

ทำการเพิ่มจำนวนฟาจที่ถูกคัดเลือกแล้วสกัดออกมาในขั้นที่ ข.1 โดยการดูดฟาจที่ปรับสภาพให้เป็นกลางแล้วในขั้นที่ ข.1 ทั้งหมดจำนวน 100 μl ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง (15 ml) ที่มีอาหารเหลว 2xYT จำนวน 1 ml และเชื้อแบคทีเรีย DH5αF′ที่ถูกบ่มข้ามคืน จำนวน 10 μl จากนั้นนำไปเขย่า

ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบหนีศูนย์กลางที่ความเร็ว 2,500 xg เพื่อตกตะกอนแบคทีเรียแล้วดูดเอาส่วนใสซึ่งมีฟาจอยู่มาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มล. เพื่อนำมาทำการคัดเลือกในรอบที่ 2 ต่อไป

ขั้นที่ ข.3 การคัดเลือกฟาจรอบที่ 2

ทำการคัดเลือกฟาจรอบที่ 2 โดยใช้จาน ELISA ที่มีโปรตีนเป้าหมายจำนวน 5 µg ตรึงอยู่ตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น โดยในขั้นแรกทำการล้างหลุมจากขั้นตอนการตรึงโปรตีนเป้าหมาย (ก) โดยเติมน้ำยาล้าง [0.1% Tweenใน 1xPBS (pH 7.4)] จนเต็มหลุม จากนั้นคว่ำจานและสลัดน้ำยาล้างออกจากจาน ELISA ให้หมด ทำการล้างทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วนำฟาจที่ได้จากขั้นที่ ข.2 จำนวน 100 µl ใส่ลงในแต่ละหลุมที่มีโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับฟาจที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากรอบที่ 1 ห่อจาน ELISA ด้วยแผ่นพลาสติกบาง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

ทำการล้างฟาจออกจากหลุมตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว โดยทำการล้าง 5 ครั้ง จากนั้นทำการสกัดฟาจที่จับกับโปรตีนเป้าหมายออก โดยการเติม Glycine-HCl (pH 2.0) จำนวน 50 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกจากหลุมแล้วนำไปใส่หลอดขนาด 1.5 ml ที่มี Sodium phosphate buffer (pH 7.0) อยู่จำนวน 50 µl เพื่อปรับ pH ของสารละลายให้มีสภาพเป็นกลาง

ขั้นที่ ข.4 การคัดเลือกฟาจรอบที่ 3

ทำการคัดเลือกฟาจในรอบที่ 3 โดยไม่ต้องทำการเพิ่มจำนวนฟาจก่อน โดยทำการคัดเลือกบนจาน ELISA ที่มีโปรตีนเป้าหมายจำนวน 1 µg ตรึงอยู่ตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น โดยในขั้นแรกทำการล้างหลุมจากขั้นตอนการตรึงโปรตีนเป้าหมาย (ก) โดยเติมน้ำยาล้าง [0.1% Tweenใน 1xPBS (pH7.4)] จนเต็มหลุม จากนั้นคว่ำจานและสลัดน้ำยาล้างออกจากจาน ELISA ให้หมด ทำการล้างทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วนำฟาจที่ได้จากขั้นที่ ข.3 จำนวน 100 µl ใส่ลงในแต่ละหลุมที่มีโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับฟาจที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากรอบที่ 1 และ 2 ห่อจาน ELISA ด้วยแผ่นพลาสติกบาง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

ทำการล้างฟาจออกจากหลุมตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว โดยทำการล้าง 5 ครั้ง จากนั้นทำการสกัดฟาจที่จับกับโปรตีนเป้าหมายออก โดยการเติม Glycine-HCl (pH 2.0) จำนวน 50 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกจากหลุมแล้วนำไปใส่หลอดขนาด 1.5 ml ที่มี Sodium phosphate buffer (pH 7.0) อยู่จำนวน 50 µl เพื่อปรับ pH ของสารละลายให้มีสภาพเป็นกลาง เก็บฟาจที่ได้จากการคัดเลือกฟาจรอบที่ 3 นี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อทำการศึกษาต่อไป

บทที่ 5

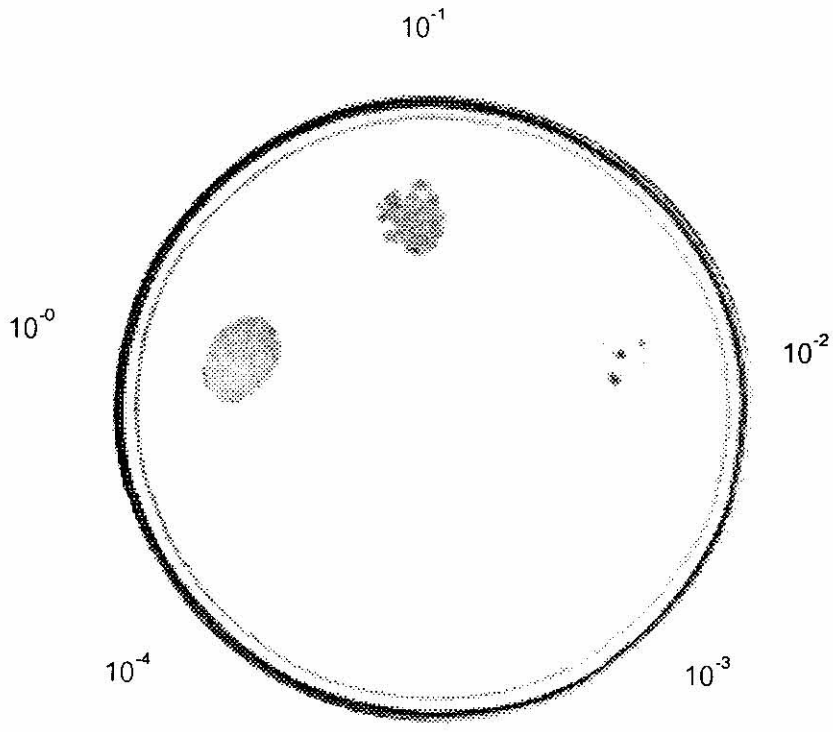
การตรวจสอบความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายของฟาจแต่ละตัว

หลังจากที่ได้ทำการคัดเลือกประชากรของฟาจสามรอบแล้ว ในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายของฟาจแต่ละตัว โดยในขั้นแรกจะต้องทำการแยกฟาจแต่ละตัวออกจากกันก่อน แล้วจึงทำการเลี้ยงให้ได้ปริมาณเพียงพอที่จะทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

ก) การคัดแยกฟาจแต่ละตัวออกจากกัน

ขั้นที่ ก.1 ประมาณประชากรฟาจ

ทำการประมาณจำนวนประชากรฟาจที่ได้จากการคัดเลือกในรอบที่ 3 โดยทำการเจือจางฟาจที่สกัดจากหลุมจาน ELISA ครั้งที่ 3 ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} นำ top-agar ที่หลอมเหลวแล้วจำนวน 4 ml ผสมกับ 100 mM IPTG และ 2% X-gal อย่างละ 30 µl เทลงในหลอดทดลองขนาด 5 ml ที่มีเชื้อแบคทีเรีย DH5αF′ ที่ถูกบ่มข้ามคืน จำนวน 200 µl ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งชนิด 2xYT รอให้ top-agar เย็นลงแล้วหยดฟาจที่ระดับความเจือจางต่างๆ จำนวน 5 µl ลงบน top agar นำไปบ่มโดยคว่ำจานลงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำออกมาตรวจสอบจำนวนวงสีฟ้าที่เกิดขึ้นในระดับความเจือจางต่างๆ (รูปที่ 5.1) ซึ่งระดับความเจือจางที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป คือ ความเจือจางที่สามารถมองเห็นวงสีฟ้าแยกออกจากกันอย่างชัดเจน



รูปที่ 5.1 การตรวจสอบความเจือจางที่เหมาะสมของฟาจก่อนทำการแยกให้ได้ฟาจเดี่ยวในขั้นที่ 2

ในภาพเป็นการตรวจหาความเข้มข้นของฟาจที่ได้ผ่านการคัดเลือกความสามารถในการจับกับ Src SH3 จากภาพจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} เป็นค่าที่เหมาะสมที่จะใช้ในการแยกฟาจต่อไปในขั้นที่ ก.2

ขั้นที่ ก.2 แยกฟาจ

ทำการแยกฟาจแต่ละตัวออกจากกันโดย เจือจางฟาจที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมจากขั้นที่ 1 ดูดฟาจจำนวน 50 µl ผสมกับเชื้อแบคทีเรีย DH5αF′ ที่บ่มข้ามคืน จำนวน 200 µl โดยผสมในหลอดทดลองขนาด 5 ml จากนั้นเท top agar เหลว จำนวน 4 ml ที่มี 100 mM IPTG และ 2% X-gal อย่างละ 30 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเทส่วนผสมทั้งหมดทับลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารชนิด 2xYT คอยให้ top-agar เย็นแล้วจึงเก็บไปบ่มโดยคว่ำจาน ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C หลังจากบ่มเป็นเวลา 1 คืน จะเห็นวง plaque สีฟ้าของฟาจแต่ละตัวแยกจากกัน ดังรูปที่ 1

ขั้นที่ ก.3 เลี้ยงฟาจแต่ละตัว

ทำการเลี้ยงฟาจแต่ละตัวที่ได้แยกออกจากกันเพื่อให้ได้ปริมาณเพียงพอที่จะตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับโปรตีนเป้าหมายต่อไป โดยใช้ปลายไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะลงตรงกลางวงสีฟ้าแล้วใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลางที่มีอาหารเหลวชนิด 2xYT จำนวน 2 ml และมีเชื้อแบคทีเรีย DH5αF′ ที่บ่มข้ามคืน จำนวน 20 µl แล้วนำไปเขย่าในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

จากนั้นนำมาปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบหนีศูนย์กลางที่ความเร็ว 1,000 xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส ด้านบนซึ่งมีฟาจอยู่เก็บไว้ในหลอดที่สะอาดแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อการตรวจสอบ ELISA ในขั้นต่อไป

ข) การตรวจสอบความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbentassay (ELISA)

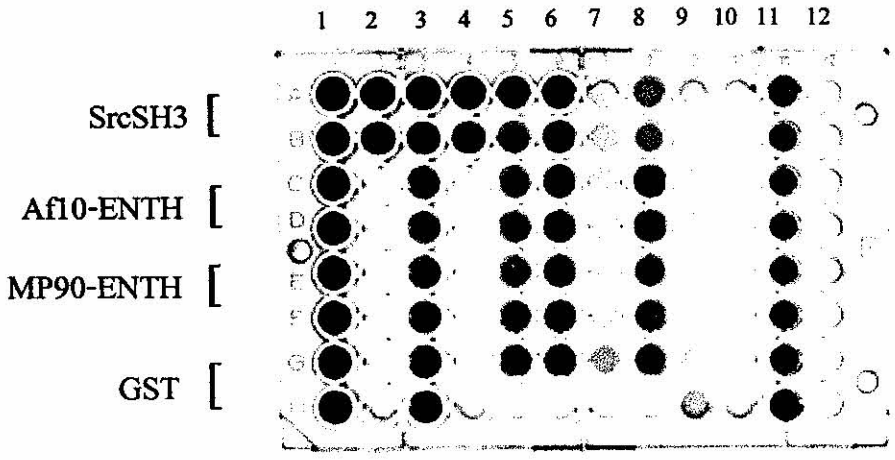
ในขั้นแรก ทำการตรึงโปรตีนเป้าหมายจำนวน 1 μg ลงในหลุมจาน ELISA โดยนำโปรตีนเป้าหมายจำนวน 1 μg ผสมกับ 0.1 M $NaHCO_3$ จำนวน 100 μl แล้วใส่ลงในหลุมของจาน ELISA ชนิด MaxiSorb ^{TM} แล้วห่อด้วยแผ่นพลาสติกบาง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 1.5% BSA ใน 1xPBS (pH 7.4) จำนวน 100 μl แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 ชั่วโมงหรือที่ 4°C 1 คืน จากนั้นทำการล้างหลุมด้วย 0.1% Tween ใน 1xPBS 3 ครั้ง แล้วเติมฟาจที่ได้จากขั้นที่ 3 จำนวน 100 μl ลงในหลุม แล้วห่อด้วยแผ่นพลาสติกบาง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างหลุมด้วย 0.1% Tween ใน 1xPBS 5 ครั้ง แล้วจึงเติมสารละลาย 1xPBS ที่มี antibody ต่อฟาจที่เชื่อมอยู่กับ HRP(HRP anti-M13) ลงในแต่ละหลุม (สารละลายของ antibody นี้สามารถเตรียมได้โดยการนำ HRP anti-M13 ของบริษัท Phamacia biotech (APB-3 27-9402-01) มาเจือจาง 1:5000 เท่าใน 1xPBS) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างแต่ละหลุมด้วย 0.1 % Tween ใน 1xPBS เป็นจำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารก่อสี (เตรียมได้จากผสม ABTS 21 ml กับ 30% H_2O_2 36 μl) จำนวน 200 μl ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที หลุมที่มีฟาจที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้จะเกิดสีเขียว ความเข้มของสีขึ้นกับจำนวนของฟาจที่อยู่ในแต่ละหลุม จากนั้นนำไปถ่ายภาพหรืออ่านค่าความเข้มของแสง(OD) ที่ความยาวคลื่น 405 nm (รูปที่ 5.2)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าฟาจตัวที่ 2 และ 4 ซึ่งผ่านการคัดเลือกความสามารถในการจับกับ SrcSH3 สามารถจับกับ SrcSH3 ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยไม่ข้ามไปจับกับโปรตีนเป้าหมายชนิดอื่นๆ ส่วนฟาจอีก 8 ตัวที่ได้ทำการคัดเลือกผ่านโดเมน ENTH ทั้ง 2 ชนิด ไม่มีตัวใดสามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง

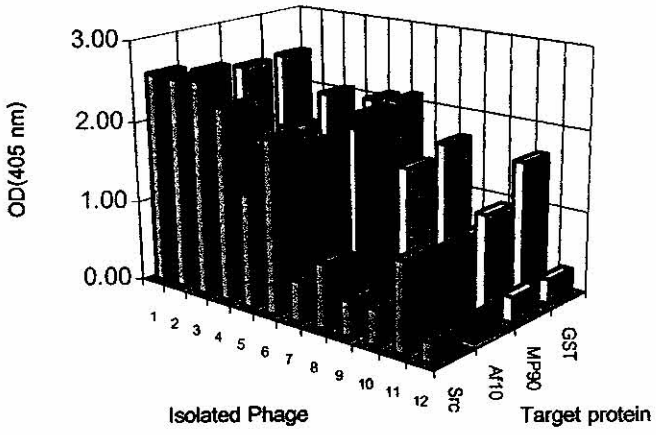
ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ก)

ฟาจที่ได้ทำการคัดแยก



ข)



รูปที่ 5.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายของฟาจที่ได้ผ่านการคัดเลือกแต่ละตัวด้วยวิธีการทดสอบ ELISA

(ก) โปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิดถูกตรึงตามแนวขวางของแต่ละแถวดังภาพ แล้วนำฟาจจำนวน 12 ตัวที่ได้ผ่านการคัดเลือกความสามารถในการจับกับโปรตีน SrcSH3(1-4), Af10-ENTH(5-8),MP90-ENTH (9-12) มาใส่ลงในหลุมตามแนวตั้ง เพื่อตรวจสอบความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายชนิดต่างๆ

(ข) แผนภาพแสดงค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง ของปฏิกิริยา ELISA ในแต่ละหลุม แกน Z แสดงค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการตรวจสอบแบบทวิกรรม (duplicate) แกน X แสดงฟาจแต่ละตัว ส่วนแกน Y คือ โปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิด

<u>หมายเหตุ</u> ไม่ได้ใส่ฟาจลงไปในหลุมที่ H5-H8

บทที่ 6
ข้อสรุปและข้อวิจารณ์

ก) ความสมบูรณ์ของคลัง

จากการตรวจสอบปริมาณฟาจในคลัง (phage titer) พบว่ามีปริมาณ 10^{12} pfu/ µl ซึ่งเป็นปริมาณเพียงพอที่จะใช้ในการคัดเลือกฟาจต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากค่าความหลากหลาย (complexity) ของคลังนี้คือ 10^{8} -10^{9} (ค่าความหลากหลายในที่นี้หมายถึงจำนวนชนิดของเส้นเปปไทด์ที่มีอยู่ในคลัง) ดังนั้นโดยเฉลี่ยคลังจำนวน 1 µl จึงมีปริมาณฟาจที่แสดงเส้นเปปไทด์ครบทั้ง 10^{9} ชนิด

ด้วยในห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพมีการวิจัยหลายเรื่องซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรียและราหลายชนิด และเนื่องจากข้อควรระวังที่สำคัญอย่างยิ่งในการใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ คือ การปนเปื้อนจากฟาจหรือแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในบริเวณที่ทำการทดลอง ดังนั้นในขั้นตอนการตรวจสอบความสมบูรณ์ของคลังโดยการนำฟาจมาเลี้ยงแยกให้ได้เป็น plaque เดี่ยว บนพื้นของแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 2.1 จึงเป็นการยืนยันว่า ไม่มีการปนเปื้อนจากฟาจหรือแบคทีเรียชนิดอื่น ทั้งนี้ขั้นตอนการทำทั้งหมดต้องทำในตู้เขี่ยเชื้อ(laminar flow)

ข) การคัดเลือกฟาจที่จับกับโปรตีนเป้าหมาย

โปรตีนเป้าหมายที่ใช้ในการทดลองนี้คือ โดเมน SrcSH3 และโดเมน Af10-ENTH และ MP90-ENTH ซึ่งโปรตีนทั้งหมดนี้จะเชื่อมอยู่กับโปรตีน GST (GST fusion protein) ดังนั้นในขั้นตอนตรวจสอบความสามารถในการมีอันตรกริยาของฟาจโดยวิธีการ ELISA จึงใช้ GST เป็นตัวควบคุมลบ (negative control) โดเมน SrcSH3 เป็นโปรตีนรูปร่างกลม(globular protein) ซึ่งมีขนาดประมาณ 80 กรดอะมิโน เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการส่งผ่านสัญญาณภายในเซล ผลการศึกษาคุณสมบัติการมีอันตรกริยาของโดเมนนี้จากหลายห้องปฏิบัติการ พบว่า โดเมน SrcSH3 จะจับกับเส้นเปปไทด์ขนาดความยาวประมาณ 7-8 กรดอะมิโน ซึ่งมีโครงสร้างส่วนหนึ่งเป็น PXXP (P คือ proline, X คือ กรดอะมิโนตัวใดก็ได้) ผู้วิจัยได้ใช้โดเมนตัวนี้ในการทดลองเพื่อเป็นตัวควบคุม (control) เพื่อตรวจสอบว่าการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนนบผิวฟาจเพื่อการศึกษาอันตรกริยาระหว่างโปรตีนในการวิจัยนี้สัมฤทธิ์ผลหรือไม่ จากผลการทดลองพบว่า จากจำนวนฟาจ 4 ตัวที่นำมาตรวจสอบมีฟาจ 2 ตัวที่สามารถับกับ Src-SH3 ได้อย่างเฉพาะเจาะจง ส่วนฟาจอีก 2 ตัวน่าจะเป็นฟาจที่จับกับ GST เพราะสามารถจับกับโปรตีน Af10-ENTH MP90-ENTH และ GST ได้ ความสำเร็จในการคัดเลือกฟาจที่สามารถจับกับ SrcSH3 ได้อย่างเฉพาะเจาะจงนี้ จึงเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าสามารถทำการถ่ายทอดเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจมาประยุกต์ใช้ได้ในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยได้จริง

ส่วนโดเมน Af10-ENTH (จากพืช) และ MP90-ENTH (จากกบแอฟริกัน) เป็นโดเมนซึ่งเพิ่งถูกค้นพบใหม่เมื่อปี พ.ศ. 2541 โดยการเปรียบเทียบลำดับการเรียงของกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล ยังไม่มีผู้ใดทราบโครงสร้างและหน้าที่ เนื่องจากโดเมนนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตตั้งแต่ชั้นต่ำ (Yeast) จนถึงชั้นสูง (คน) จึงน่าจะมีความสำคัญในการทำงานของเซลสิ่งมีชีวิต การทราบคุณสมบัติการมีอันตรกริยาของโดเมนนี้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการที่จะเข้าใจบทบาทหน้าที่ของโดเมนนี้ในเซล จากการวิจัยในครั้งนี้ยังไม่สามารถหาฟาจที่จับกับโปรตีนทั้งสองได้อย่างจำเพาะเจาะจง ด้วยวิธีการมาตรฐานที่ใช้คือ การทำการคัดเลือกบนจาน ELISA แล้วสกัดฟาจออกด้วยสารละลายที่มีความเป็นกรดสูง (pH 2.0) ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงวิธีการคัดเลือกต่อไป อาทิเช่น ทำการคัดเลือกโดยใช้หลอดปลายเปิด 2 ด้าน (column) หรือทำการสกัดฟาจออกมาด้วยสภาวะที่เป็นด่างสูง หรือโดยใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนแทน

บรรณานุกรม

1. Kay, B. K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996*). Principles and Applications of Phage Display: A Laboratory Manual.* Academic Press, New York.
2. Smith, G.P. and Petrenko, V.A. (1997) Phage display, *Chem.Rev., 97*, 391-410
3. Rodi D.J. and Makowski, L. (1999) Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack *Curr Opin Biotechnol* 10(1):87-93
4. Felici, F., Luzzago, A., Monaci, P., Nicosia, A., Sollazzo, M., Traboni, C. (1995) Peptide and protein display on the surface of filamentous bacteriophage. *Biotechnol Annu Rev;1*:149-83
5. Wilson, D.R., Finlay, B.B. (1998) Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology *Can J Microbiol* 44(4):313-29
6. Vaughan, T.J., Osbourn, J.K., Tempest, P.R. (1998) Human antibodies by design. *Nat Biotechnol* 16(6):535-9
7. Cortese, R., Monaci, P., Luzzago, A., Santini, C., Bartoli, F., Cortese, I., Fortugno, P., Galfre, G., Nicosia, A., Felici, F. (1996) Selection of biologically active peptides by phage display of randompeptide libraries. *Curr Opin Biotechnol* 7(6):616-21
8. Katz, B.A. (1997) Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by phage display. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 26:27-45
9. Lowman, H.B. (1997) Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26:401-24
10. Kay, B.K., Kurakin, A.V., Hyde-DeRuyscher, R. (1998) From peptide to drugs via phage display. Drug Discovery today 3 (8):370-8
11. Cwirla, S.E., Balasubramanian, P., Duffin, D.J., Wagstrom, C.R., Gates, C.M., Singer, S.C., Davis, A.M., Tansik, R.L., Mattheakis, L.C., Boytos, C.M., Schatz, P.J., Baccanari, D.P., Wrighton, N.C., Barrett, R.W., Dower, W.J. (1997) Peptide agonist of

the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science* Jun 13;276 (5319):1696-9

12. Lowman, H., Bass, S., Simpson, N., and Wells, J. (1991). Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* 30, 10832-10838.

13. Lowman, H. B., and Wells, J. A. (1993). Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J. Mol. Biol.* 234, 564-78.

14. Roberts, B., Markland, W., Ley, A., Kent, R., White, D., Guterman, S., and Ladner, R. (1992). Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 89, 2429-2433.

15. Dennis, M. S., and Lazarus, R. A. (1994). Kunitz domain inhibitors of tissue-factor factor VIIa. I. Potent inhibitors selected from libraries by phage display. *J. Biol. Chem.* 269, 22129-22136.

16. Choo, Y., Sanchez-Garcia, I., and Klug, A. (1994). In vivo repression by a site-specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence. *Nature* 372, 642-645.

17. Martin, F., Toniatti, C., Salvati, A. L., Venturini, S., Ciliberto, G., Cortese, R., and Sollazzo, M. (1994). The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. *EMBO J.* 13, 5303-5309.

18. Soumillion, P., Jesters, L., Bouchet, M., Marchand-Brynaert, J., Winter, G., and Fastrez, J. (1994). Selection of b-lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J. Mol. Biol.* 237, 415-422.

19. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., and Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.

20. Barbas, C., Kang, A., Lerner, R., and Benkovic, S. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88, 7978-7982.

21. Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-628.

22. Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J.W., Roovers, R.C. (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4(1):1-20

23. Vaughan, T.J., Osbourn, J.K., Tempest, P.R. (1998) Human antibodies by design. *Nat Biotechnol* 1998 16(6):535-9

24. Rader, C., Barbas, C.F. (1997) Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr Opin Biotechnol* 8(4):503-8

25. Hayden, M.S., Gilliland, L.K., Ledbetter, J.A. (1997) Antibody engineering. *Curr Opin Immunol* 1997 9(2):201-12

26. Crameri, R., and Suter, M. (1993). Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* 137, 69-75.

27. Jespers, L., Messens, J., De Keyser, A., Eeckhout, D., Van Den Brande, I., Gansemans, Y., Lauwereys, M., GP, V., and Stanssens, P. (1995). Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Bio/Tech.* 13, 378-382.

28. Maruyama, I. N., Maruyama, H., and Brenner, S. (1994). lfoo: a l phage vector for the expression of foreign proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 91, 8273-8277.

29. Sternberg, N., and Hoess, R. (1995). Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1609-1613.

30. Hottiger, M., Gramatikoff, K., Georgiev, O., Chaponnier, C., Schaffner, W., and Hubscher, U. (1995). The large subunit of HIV-1 reverse transcriptase interacts with beta-actin. *Nucl. Acids Res.* 23, 736-7341.

31. Crameri R, Hemmann S, Blaser K (1996) PJuFo: a phagemid for display of cDNA libraries on phage surface suitable for selective isolation of clones expressing allergens. *Adv Exp Med Biol* 1996;409:103-10

32. Yamabhai, M., Hoffman, N.G., Hardison, N.L., McPherson, P.S., Castagnoli, L., Cesareni, G., Kay, B.K. (1998) Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J Biol Chem* 20;273(47):31401-7

33. Hussain, N.K., Yamabhai, M., Ramjaun, A.R., Michelle Guy, A., Baranes, D., O'Bryan, J.P., Der, C.J., Kay, B.K., and McPherson, P.S. (1999) Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J. Biol. Chem.* (in press).

34. Kay, B.K., Yamabhai, M., Wendland, B., Emr, S.D. (1999) Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci* 8(2):435-8

ภาคผนวก

ก. รายการสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยและสูตรการเตรียม

2xYT media	Tryptone	16 g/l	ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 °C
	Yeast extract	10 g/l	
	NaCl	5 g/l	
	H_2O to	1 liter	
2xYT media agar plate	Tryptone	16 g/l	ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121°C
	Yeast extract	10 g/l	
	NaCl	5 g/l	
	H_2O to	1 liter	
	Bacto agar	15 g	
2xYT-Top agar (0.8% agar)	Tryptone	16 g/l	ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121°C
	Yeast extract	10 g/l	
	NaCl	5 g/l	
	H_2O to	1 liter	
	Bacto agar	8 g	
30%PEG-8000/1.6M NaCl	polyethylene glycol 8000	300 g	ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วย membrane ขนาด 0.22 µl และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C
	NaCl	92.8 g	
	ddH_2O to	1 liter	
50 mM citric acid	citrate monohydrate	10.5 g	ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วย membrane ขนาด 0.22µl และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C
	H_2O to	1 liter	
ABTS solution 2',2'-azino-*bis*-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) in 50 mM Sodium citrate, pH4.0	Add 220 mg ABTS into 1 liter of 50 mM citric acid หมายเหตุ: เติม 0.05% H_2O_2 จำนวน 36 µl ต่อ ABTS จำนวน 21 ml ก่อนนำไปใช้ตรวจสอบปริมาณ HRP		ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วย membrane ขนาด 0.22µl แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

Glutathione Elution Buffer	แบ่งเก็บ 10 mM glutathione ใน 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) ในหลอดขนาด 1 มล และเก็บที่ -20°C ไม่ควรนำ เข้า-ออก จาก -20°C เกิน 5 ครั้ง		
LB media	bacto-tryptone	10 g	ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121°C
	yeast extract	5 g	
	NaCl	10 g	
	H_2O to	1 liter	
LB media Agar	bacto-tryptone	10 g	ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121°C
	yeast extract	5 g	
	NaCl	10 g	
	H_2O to	1 liter	
	Bacto agar	15 g	
PBS-10X	NaCl	80 g	ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121°C
	KCl	2 g	
	Na_2HPO_4 (anhydrous)	14.4 g	
	KH_2PO_4	2 g	
	H_2O to	1000 ml	
PBS-1X	NaCl	8 g	ปรับ pH ให้ได้ 7.5 หรือ 8 ด้วย 1M HCl
137 mM NaCl	KCl	0.2 g	
3 mM KCl	Na_2HPO_4 (anhydrous)	1.44 g	ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121°C
8 mM Na_2HPO_4	KH_2PO_4	0.24 g	
1.5 mM KH_2PO_4	H_2O to	1000 ml	
SDS-10% (sodium dodecyl sulfate or sodium lauryl sulfate)	SDS (electrophoresis-grade)	100 g	ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 68 °C เพื่อช่วยในการละลาย และปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วยกรด HCl เข้มข้น ไม่จำเป็นต้องทำให้ปลอดเชื้อ และควรใส่หน้ากากป้องกันเวลาชั่ง SDS
	H_2O to	1000 ml	

TBS-10X 25mM Tris 145 mM NaCl 3 mM KCl	Tris base NaCl KCl H2O to	30 g 80 g 2 g 1000 ml	ปรับ pH ให้ได้ 7.5 หรือ 8 ด้วย 1M HCl ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121°C
TBS-10X 25mM Tris 145 mM NaCl 3 mM KCl	Tris base NaCl KCl H2O to	3 g 8 g 0.2 g 1000 ml	ปรับ pH ให้ได้ 7.5 หรือ 8 ด้วย 1M HCl ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121°C
X-gal-10% (w/v) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside)	ละลาย X-gal 100 มก ลงใน dimethylformamide 900 มล และเก็บไว้ในขวดแก้วทึบแสงที่ -20°C		

ข.แหล่งข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ

หนังสือ Phage Display of Peptides and Proteins and Laboratory Manual edited by Brian K. Kay, Jill winter and John McCafferty. Academic press 1996

Website http:/ kaylab.med.wisc.edu

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ: น.ส. มณฑารพ ยมาภัย (Miss Montarop Yamabhai)

วัน เดือน ปีเกิด: 8 มกราคม 2510

การศึกษา:

ก.บ.. (เกียรตินิยม) มหาวิทยาลัยมหิดล มีนาคม 2532

Ph.D. in Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, ธันวาคม 1998

หัวข้อวิทยานิพนธ์: Identification and characterization of Intersectin: a novel component of the endocytic machinery

ตำแหน่ง: อาจารย์

หน่วยงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา (044) 224152-3

ประสบการณ์การทำงาน:

4/32-4/33	เภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพาน จังหวัดอุบลราชธานี
6/34-9/35	ผู้ช่วยวิจัยในห้องปฏิบัติการของ ดร. ศกรณ์ มงคลสุข ภาควิชาจุลชีววิทยา และเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล
9/35-3/36	ได้รับทุน ฟุลไปรท์ ไปทำการวิจัยก่อนปริญญาเอก ณ University of Minnesota, MN, USA
6/37-6/40	ผู้ช่วยวิจัย และผู้ช่วยสอน ในห้องปฏิบัติการวิจัยของ Dr. Brian K. Kay, Department of Biology, University of North Carolina at Chapel Hill
7/40-12/41	Research Intern ณ Department of Pharmacology, University of Wisconsin-Madison, USA
10/41	ฝึกปฏิบัติการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาด้าน cellular signaling ณ ห้องปฏิบัติการของ of Dr.John P. O'Bryan, NIEHS, NC, USA
1/42	ฝึกปฏิบัติการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาด้าน endocytosis ณ ห้องปฏิบัติการของ Dr. Peter S. McPherson, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, QC, Canada

7/42 ได้รับทุนไปฝึกอบรมในโครงการ International Training Program in Biotechnology ณ Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung mbH (GBF) ประเทศเยอรมันนี

ผลงานตีพิมพ์

Yamabhai, M., Kay, B.K.(1997) Examining the specificity of Src homology 3 domain--ligand interactions with alkaline phosphatase fusion proteins. *Anal Biochem* 5;247 (1):143-51

Yamabhai, M., Hoffman, N.G., Hardison, N.L., McPherson, P.S., Castagnoli, L., Cesareni, G., Kay, B.K. (1998) Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J Biol Chem* 20;273(47):31401-7

Kay, B.K., Yamabhai, M., Wendland, B., Emr, S.D. (1999) Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci.* 8(2):435-8

Hussain, N.K., Yamabhai, M., Ramjaun, A.R., Michelle Guy, A., Baranes, D., O'Bryan, J.P., Der, C.J., Kay, B.K., and McPherson, P.S. (1999) Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J. Biol. Chem.* 274(22): 15671

Santolini, E., Salcini, A.E., Kay, B.K., Yamabhai, M., and Di Fiore, P. P. (1999) The EH network. *Exp. Cell Res.* 253:186-209

Adams, A., Judith M. Thorn, J.M., Yamabhai, M., Kay, B.K., and O'Bryan, J.P. (2000) Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *J. Biol.Chem* (in press)

Yamabhai, M., and Kay, B.K., (2000) Mapping protein-protein interactions with alkalilne phosphatase fusion proteins. *Methods Enzymol.* (in press)

ผลงานอื่นๆ

1. Yamabhai, M., Hussain, N.K., Hoffman, N.G., Hardison, N.L., Ramjaun, A.R., McPherson, P.S., O'Bryan, J.P., Der, C.J., and Kay, B.K., Intersectin: A novel adaptor protein involved in endocytosis. Symposium on endocytosis and intracellular trafficing, 10-23 September, 1998. The department of Biochemistry and Biophysics, Iowa state university, USA.
2. Yamabhai, M., and Kay, B.K. Ligand specificity of intersectin's EH domains. 2nd International conference on combinatorial library methods for basic research and drug discovery, January 10-12, 1999, University of Arizona, Tuscon, USA (recipient of the travel award)
3. Adams, A., Yamabhai, M., Kay, B.K., and O'Bryan, J.P. Intersectin, a novel adaptor protein with conserved EH and SH3 domains regulates endocytosis and signal transduction pathways independent of MAPK. Keystone meeting on oncogene networks in signal transduction, 9-14 April, 1999.
4. Adams, A., Thorn, J., Yamabhai, M., Blackshear P., Kay, B.K., O'Bryan, J.P. 1999, Cold Spring Habour Tyrosine phosphorylation meeting, USA.
5. Yamabhai, M. and Kay, B.K. Developing Assays for High-Throughput Screens (HTS) of Small-molecule Libraries with Alkaline Phosphatase Fusion System. 11th Annual meeting of the Thai society for biotechnology, 15-18 November, 1999, Phuket, Thailand

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี