พจมาศ แพนศรี : การผลิตแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีฟาจ (PRODUCTION OF ANTIBODY BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑารพ ยมาภัย, 115 หน้า.

คลังของแอนติบอดีชนิด scFV ได้รับการสังเคราะห์เป็นผลสำเร็จ คลังชนิด Naïve นี้สังเคราะห์โดยอาศัยแหล่งพันธุกรรมของแอนติบอดีของมนุษย์ จากผู้บริจาคซึ่งไม่เคยได้รับการฉีดกระตุ้น จำนวน 140 คน ซึ่งนับเป็นแ หล่งพันธุกรรมของแอนติบอดีที่มากที่สุด ชิ้นส่วน scFv นี้สร้างมาจากส่วน variable ของ heavy chain และส่วน variable ของ light chain โดยสายเต็มของชิ้นส่วน scFv นั้นอาศัยการผสมรวมและจับคู่ของ heavy chain และ light chain โดยให้ครอบคลุมทุกรูปแบบของแอนติบอดีที่สามารถเกิดขึ้นได้จากทุก isotype ของ immunoglobulin วิธีที่ใช้ในการทดลองได้แก่ overlap extension PCR ร่วมกันกับชุดของ primer ที่มีความซับซ้อน วิธีการโคลนนิ่งชิ้นส่วน scFv แอนติบอดีนี้ส่งผลให้ได้คลังของแอนติบอดีที่มีขนาด $1.5x10^8$ ซึ่งจัดเป็นคลังขนาดกลาง คลังของแอนติบอดีชนิด scFv นี้ถูกนำมาใช้ในการทดลองเพื่อคัดเลือกหาแอนติบอดีที่คุณสมบัติสามารถจับจำเพาะ โดยทดสอบกับตัวอย่างโปรตีนหลายชนิด ทั้ง attenuated ไวรัส เซรุ่ม รวมสกัดจากงู โปรตีนบนผิวเซลล์ และสาร hapten จากนั้นแอนติบอดีซึ่งจับจำเพาะที่คัดเลือกได้ ถูกนำมาทดสอบหาความหลากหลายของรูปแบบของแอนติบอดี ด้วยวิธีเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนและวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากนั้นตัวอย่างซึ่งจับจำเพาะที่คัดเลือกได้ถูกนำมาผลิตเป็นแอนติบอดีในรูป soluble โดยผลิตใน *E.coli* ตัวอย่างของแอนติบอดีจำนวนสี่ตัวอย่างได้ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้สาร Ni-NTA และปริมาณของแอนติบอดีบริสุทธิ์ที่แยกได้มีปริมาณที่เหมาะสม และยังคงมีคุณสมบัติในการจับจำเพาะดังเดิม การศึกษาครั้งนี้นอกจากจะมุ่งพัฒนาให้คลังของแอนติบอดีมีความหลากหลายของรูปแบบของแอนติบอดีจำนวนมากแล้ว วิธีการที่คัดเลือกแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่แตกต่างกันก็มีส่วนสำคัญ ทำ ให้แอนติบอดีที่คัดเลือกโดยใช้คลังของแอนติบอดีชนิด naïve นี้มีคุณภาพดี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

POTJAMAS PANSRI : PRODUCTION OF ANTIBODY BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 115 PP.

PHAGE DISPLAY/SCFV/PHAGE DISPLAY ANTIBODY LIBRARY/ NAÏVE LIBRARY/PANNING/MONOCLONAL ANTIBODY/RECOMBINANT ANTIBODY

A scFv antibody phage display library was successfully constructed. This naïve library was based on the widest possible human antibody gene repertoire, derived from 140 non-immunized donors. The scFv's were generated by recombining heavy chain and light chain variable regions. The full length scFv fragments were assembled in a process making use of all possible combinations of heavy and light chains, among all immunoglobulin isotypes. This was achieved by using a complex set of primers and overlap extension PCR. The resulting scFv gene repertoire was cloned to form a moderately sized library composed of $1.5x10^8$ individual clones. This naïve library was then used for selecting of specific binders by testing with different model proteins, attenuated viruses, crude venom extracts, cell surface antigens, and a hapten. Sequence variability and variable gene diversity among binders were proven by gene sequencing and DNA fingerprinting. A subset of the selected binders was then chosen for producing of soluble antibodies in *E. coli*. Four antibodies specimens were purified using Ni-NTA. The purifications yielded appropriate amounts of adequately pure scFv's, and the antibody specificity was retained. While the focus of this study has been the creation of the naïve human library, the selection of binders for

various profoundly different antigens has also played a key role. The naïve human antibody library described herein has been proven to constitute a reliable source of high quality antibodies.

School of Biotechnology

Academic Year 2008

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____