บทคัดย่อภาษาไทย

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีวิศวกรรมแอนติบอดี มาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู โดยการใช้เทคนิคไฮบริดรอมาร่วมกับเทคโนโลยีเฟจ ในการสร้างชิ้นแอนติบอดีส่วน scFv จากนั้นจึงได้ทำวิศวกรรมแอนติบอดีต่อเพื่อสร้างเป็น scFv- alkaline phosphatase fusion (scFv-AP) โดยในโครงการวิจัยนี้ ได้ใช้ ไฮบริโดมาสำหรับผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ สายเปปไทด์ชี้ตำแหน่งที่ประกอบด้วย กรดอะมิโน ฮีสติดีนเรียงกัน ๖ ตัว (6xHis tag) จากไฮบริดรอมาของหนู P5A11 ที่หาซื้อมาได้มาเป็นต้นแบบในการทำวิจัย โดยได้ออกแบบไพร์เมอร์ สำหรับการเพิ่มจำนวนโดยวิธีการ พีซีอาร์ แล้วนำไปโคลนเข้าเวคเตอร์สำหรับแสดงบนผิวเฟจ เมื่อทำการทดสอบความสามารถของเฟจที่สร้างขึ้นมาในการจับกับโปรตีน CsnA ที่เชื่อมอยู่กับ กรดอะมิโน ฮีสติดีนเรียงกัน ๖ ตัว (CsnA-6His) ด้วยวิธีการ อีไลซาร์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) พบว่าไม่สามารถใช้เฟจตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามได้ทำการสุ่มเลือก เวคเตอร์ ของ scFv ที่โคลนมาได้แล้วไปทำการวิเคราะห์ลำดับเส้น ดีเอนเอ และ โปรตีน พบว่ามี เฟจ ๓ ตัวที่มี โครงสร้างแอนติบอดี scFv ครบสมบูรณ์ แต่ ๒ ตัวนั้นเป็นตัวเดียวกัน จึงได้เลือกตัวที่เหมือนกันมาทดสอบความสามารถในการจับกับ CsnA-6His อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธีการ westernblot พบว่า แอนติบอดี P5A1112 phage scFv นั้นสามารถจับกับ HIS tag ในโปรตีนไคโตซานได้ จึงได้ตั้งชื่อโคลนแอนติบอดีนี้ว่า MH12 หลังจากนั้น MH12 scFv ถูก subcloned ลงในเวกเตอร์ pKP300ΔIII เพื่อผลิตเป็น MH12 scFv-AP fusion รวมทั้งยังได้ subcloned ลงในเวกเตอร์ pET21d+ เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต จากนั้นนำ soluble scFv-APที่เตรียมได้จากทั้ง ๒ วิธีมาทดสอบกับโปรตีนที่ถูก tag ด้วย 6xHis ชนิดต่างๆ หลายประเภท แล้วทำการตรวจสอบความสามารถในการจับทั้งด้วยวิธีการ ELISA และ Western blot พบว่าสามารถใช้แอนติบอดีในรูปแบบ scFv-AP ในการตรวจสอบได้ แต่ความสามารถในการจับ นั้นขึ้นกับ ชนิดของโปรตีนเป้าหมายและวิธีการตรวจสอบ จึงสรุปว่าผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนานวัตกรรมการผลิตแอนติบอดีหนูโดยการประยุกต์ใช้เทคนิค ไฮบริโดมาร่วมกับเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ ซึ่งหากพัฒนาวิธีการผลิตและเก็บเกี่ยว scFv-AP ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น อาจสามารถพัฒนาเป็นนวัตกรรม ชีวผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง ที่หลากหลาย เพื่อการพัฒนาประเทศต่อไปได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Antibody engineering was successfully employed for the generation of recombinant mouse monoclonal antibody (mAb) via a combination of hybridoma and phage display technology. The mouse antibodies in the form of scFv were first generated to be displayed on phage coat proteins, followed by conversion into scFv-alkaline phosphatase fusion (scFv-AP). In this research, mouse hybridoma clone P5A11, which produces mAb against a linear 6x his peptide was used as a model of the study. The project started with the design of primer set for the amplification of mouse scFv genes, followed by amplification by PCR and subclones into phagemid and display on the pIII of bacteriophage coat protein. Phage ELISA of the generated phage clones indicated that the phage-displayed scFv from mouse hybridoma couldn't detect 6xHis-tagged CsnA protein. Nevertheless, phagemid vectors from random phage clones were prepared and subjected to automated DNA sequencing. Amino acid sequence analysis indicated that there were 3 phage clones that showed complete scFv sequences, and 2 clones were indentical. Therefore, this phage clone was tested for the biding to CsnA-6xHis by westernblot (WB) analysis and the result indicated that phage-displayed scFv can be used to detect the target protein by WB. This clone was renamed MH12 and further engineered into scFv-AP format by subcloning into the pKP300ΔIII vector. In addition the MH12 scFv-AP gene was also subcloned into the pET21d+ vector to incrase the producitivty. The MH12 scFv-AP were then used to test for the bindig property against various His-tagged protiens by both ELISA and WB. The results indicated that the binding acitivity depended on both the type of the target proteins and the analysis method. In conclusion, a method for the production of recombinant mouse monoclonal antibody was successfully invented by using the combination of both hybridoma and phage display technology. After further optimization of large scale production and purification of mouse scFv-AP, these technology could be applied for the generation of a wide variety of high-value bioproducts for Thailand.