รหัสโครงการ SUT3-304-58-36-22

รายงานการวิจัย

นวตกรรมการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู
A novel method for the production of mouse monoclonal antibody

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-58-36-22

รายงานการวิจัย

นวตกรรมการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู
A novel method for the production of mouse monoclonal antibody

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
ศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2558 – 2560
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2562

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.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2558 ถึง 2560 โดยมีกรรมการจากสภาวิจัยแห่งชาติเป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ณัชชา พฤกษาเมธานันท์ และนางสาวเพ็ญสุดา สมภูงา นักวิจัยเต็มเวลาคุณวุฒิปริญญาโท ที่ได้เป็นผู้ช่วยวิจัยหลักในการทำวิจัยนี้ โดยใช้ผลงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของทุนสนับสนุนแก่คณาจารย์ที่มีผลผลิตด้านวิจัยสูงเพื่อจ้างนักวิจัยเต็มเวลาคุณวุฒิปริญญาโท (Full-time Master Researcher) และ ขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการ เป็นอย่างดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ .....ก

บทคัดย่อภาษาไทย .....ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญตาราง.....ฉ

สารบัญภาพ.....ช

บทที่ 1 : บทนำ

1.1ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย..... 3

บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 โมโนโคลนอล แอนติบอดี 4

2.2 เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจ 5

บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 8

3.2 วิธีการสร้างคลังเฟจแอนติบอดี 9

3.3 การตรวจสอบความสามารถของเฟจที่จำเพาะเจาะจงต่อ HIS tag ด้วยวิธี ELISA..... 11

3.4 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอและโครงสร้างโปรตีน..... 13

3.5 การตรวจสอบความสามารถของเฟจที่จำเพาะเจาะจงต่อ HIS tag ด้วยวิธี Western blot..... 14

3.6 การผลิตชิ้นแอนติบอดีชนิดเส้นเดี่ยวที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส scFv-AP 15

3.6.1 การโคลนยีนเข้า AP fusion vector 15

3.6.2 การโคลนยีน scFv-AP เข้า pET21d+ vector 17

3.6.3 การผลิต scFv-AP ใน *E. coli* TG1 18

3.6.4 การผลิต scFv-AP ใน *E. coli* Shuffle B cell..... 19

3.7 การวิเคราะห์ alkaline phosphate activity..... 20

3.8 การตรวจสอบความสามารถของ MH12 scFv-AP ที่จำเพาะต่อ HIS tag ด้วยวิธี Western blot ..23

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4 : บทสรุป

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 25

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย 26

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร 30

ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน 31

ประวัติผู้วิจัยหลัก 32

ประวัติผู้ช่วยวิจัย 33

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ชุดตรวจสอบสารพิษจากเชื้อราด้วยวิธีการ ELISA จากบริษัทต่างๆ.....9
ตารางที่ 2 จำนวน HIS tag ที่อยู่ในโปรตีนที่ใช้เป็น target.....23

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 แสดงการสังเคราะห์ชิ้นส่วนแอนติบอดี 10
ภาพที่ 2 ชิ้นส่วน scFv ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ด้วย *Nco*I และ *Not*I.....11
ภาพที่ 3 Phage ELISA เพื่อตรวจสอบความสามารถของเฟจแต่ละโคลน 13
ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอมิโนของโคลน P5A1112, P5A1122 และ P5A1123.....13
ภาพที่ 5 ภาพโคลงสร้างสามมิติของชิ้นส่วนแอนติบอดี 14
ภาพที่ 6 ความสามารถของเฟจโคลน P5A1112 ที่จำเพาะเจาะจงต่อ HIS tag 15
ภาพที่ 7 โครงสร้างและ บริเวณ cloning site ของ MH12 scFv-AP ในเวกเตอร์ pKP300ΔIII.....17
ภาพที่ 8 โครงสร้างและ บริเวณ cloning site ของ MH12 scFv-AP ในเวกเตอร์ pET21d+MH12AP....18
ภาพที่ 9 SDS-PAGE ของการผลิตแอนติบอดี MH12 scFv-AP ใน *E. coli* Shuffle B cell และ TG1.....20
ภาพที่ 10 ผล ELISA ของ MH12 scFv-AP (pKP300ΔIII) และ MH12 scFv-AP (pET21d+).....22
ภาพที่ 11 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมด้วยวิธี Western blotting MH12 scFv-AP (pKP300ΔIII) และ MH12 scFv-AP (pET21d+).....24

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีคุณประโยชน์ต่อการค้นคว้าและวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงต่างๆ อย่างยิ่ง [1, 2] นอกจากนั้นแล้ว monoclonal antibody ยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นสารตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูง [3-5] รวมทั้งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรค [3, 5-8] ทั้งนี้เพราะ monoclonal antibody สามารถจับกับเป้าหมายหรือ แอนติเจน (antigen) ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นผลงานของธรรมชาติที่ผ่านการวิวัฒนาการมาหลายร้อยล้านปี วิธีการดั้งเดิมทั่วไปที่ใช้ในการผลิต 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 ๔-๕ เดือนขึ้นไป และ การลงทุนค่อนข้างสูง ทั้งยังต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญ รวมทั้งยังต้องทรมานสัตว์ทดลองซึ่งส่วนใหญ่คือหนูอีกด้วย อีกด้วย [9] นอกจากนั้นแล้วยังมี อุปสรรคที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการใช้เทคโนโลยี hybridoma ในการผลิต monoclonal antibody คือ ความไม่เสถียรของ hybridoma ทำให้สูญเสียความสามารถในการผลิต monoclonal antibody ลงได้ อีกทั้งในขั้นตอนการผลิต monoclonal antibody ให้ได้เป็นจำนวนมาก (large scale) เพื่อการนำไปใช้ต่อนั้น ก็มีความยุ่งยากและต้องใช้เครื่องมือราคาแพงเช่นกัน วิธีการที่นิยมใช้ในการผลิต monoclonal antibody ให้ได้เป็นจำนวนมากนั้นมี ๒ วิธีคือ การนำ hybridomas ไปเลี้ยงในลักษณะที่เป็นมะเร็งในช่องท้องของหนู (ascites tumor) แล้วสกัดเอา ascites fluid ที่มี monoclonal antibody ออกมา วิธีนี้เป็นที่นิยมเพราะสามารถผลิต monoclonal antibody ได้ในปริมาณสูงกว่าการเลี้ยงในห้องทดลองถึง ๑,๐๐๐ – ๑๐,๐๐๐ เท่า และใช้ต้นทุนไม่สูง แต่เป็นวิธีการที่สร้างความเจ็บปวดและทรมานให้กับหนูทดลอง ในหลายประเทศไม่อนุญาตให้ใช้วิธีการนี้แล้ว นอกจากนั้นแล้ว monoclonal antibody ที่เตรียมได้ยังอาจปนเปื้อนด้วย immunoglobulin ของหนู ไวรัส หรือสาร cytokine อื่นๆจากหนู ซึ่งอาจไม่เป็นผลดีต่อการประยุกต์ใช้ต่อไป [9] วิธีการอีกวิธีหนึ่งในการผลิต monoclonal antibody เป็นจำนวนมากคือการเลี้ยงใน bioreactor ชนิดต่างๆ ได้แก่ standard

static หรือ agitated suspension cell cultures, membrane-based หรือ matrix-based culture systems, และ high cell-density bioreactors [10, 11] แต่ข้อจำกัดของวิธีการเหล่านี้คือเป็นเทคโนโลยีที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงมากรวมทั้งอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ก็มีราคาสูงมากเช่นกัน

การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody อีกประการหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอยู่มากในปัจจุบันนี้ ได้แก่การนำ monoclonal antibody ที่ผลิตได้จากหนูไปปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมือนของมนุษย์ (humanization) [12, 13] เพื่อให้สามารถใช้ในการบำบัดโรคต่างๆ (human therapy) ปัจจุบันมี monoclonal antibody ที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายประเภทออกจำหน่ายแล้ว [14, 15] การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody เพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้ นับวันจะมีความสำคัญและได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น และมีมูลค่าเชิงพาณิชย์ที่สูงมาก

ด้วยข้อจำกัดของวิธีการดั้งเดิม และข้อดีของการใช้เทคนิคทางวิศวกรรมแอนติบอดี ในการผลิตแอนติบอดีจากหนูดังได้กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับใช้ผลิต monoclonal antibody ที่ได้จาก hybridoma ที่มีประสิทธิภาพ หลีกเลี่ยงการเพาะเลี้ยง hybridoma ในหนู หรือใน fermenter ที่มีราคาแพง โดยการใช้เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจ จากนั้นจึงทำการผลิตในปริมาณมากด้วย ระบบการแสดงออกของยีนใน E. coli ซึ่งจะมีราคาต่อหน่วยสำหรับการผลิตในระยะยาวต่ำกว่ามาก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการอื่นๆ ทั่วไป จึงถือเป็นนวตกรรมการผลิตแอนติบอดีจากหนู ที่เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในการประกอบเป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรค หรือ วิเคราะห์การปนเปื้อน ต่างๆ รวมทั้งอาจใช้เป็นต้นแบบเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคแบบมุ่งเป้า (target-based therapy) ในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสร้างนวัตกรรมการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีหนู โดยไม่ต้องเลี้ยง hybridoma ทำให้มีราคาถูกและสะดวกกว่าวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน สามารถแบ่งเป็นหัวข้อย่อยได้ดังนี้

1.2.1 เพื่อค้นคว้าข้อมูล ให้สามารถคัดเลือก hybridoma จากแหล่งต่างๆ ที่เหมาะสมในการใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนานวัตกรรม

1.2.2 เพื่อออกแบบ primers และ protocol ที่มีประสิทธิภาพ ในการโคลนยีนแอนติบอดีส่วน scFv จาก hybridoma หนู เพื่อนำมาแสดงบนผิวเฟจ

1.2.3 เพื่อพัฒนาวิธีการคัดหาแอนติบอดีแบบ high-throughput เพื่อใช้คัดหาโครงสร้างของแอนติบอดีที่สามารถผลิตออกมาได้ดี ในระบบการแสดงออกของยีนในเชื้อ อี. โคไล (*E. coli* expression system) โดยยังคงความสามารถในการจับกับเป้าหมายได้สูงอยู่

1.2.4 เพื่อพัฒนาระบบการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรม (recombinant monoclonal antibody) จากหนู ด้วย *E. coli* expression system ที่มีประสิทธิภาพ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้จะซื้อ เฉพาะ hybridoma ของหนูที่อยู่ใน culture collection เป็นแบบจำลองในการพัฒนานวัตกรรม และจะทำการพัฒนาระบบการผลิตใน *E. coli* เฉพาะในระดับห้องปฏิบัติการ (lab scale) เท่านั้น

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เทคนิคการสร้างคลังแอนติบอดีมนุษย์บนผิวเฟจ จากเม็ดเลือดขาวของอาสาสมัคร ที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นสำเร็จแล้ว [16] สามารถนำมาปรับแปลงเพื่อใช้ในการโคลนยีนของแอนติบอดีของหนู จาก hybridoma มาแสดงบนผิวเฟจได้ จากนั้นสามารถนำเทคนิคการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจ ในการคัดเลือกโมโนโคลนอล แอนติบอดี ของหนู ที่สามารถผลิตได้ดีใน *E. coli* expression system ที่ได้รับการพัฒนามาก่อนหน้านี้ [17] โดยเริ่มจากการสร้างคลังของเฟจที่แสดงแอนติบอดีที่ต้องการ โดยใช้วิธี error-prone PCR หรือ chain-shuffling [18] เพื่อสร้างเป็นคลังของเฟจที่แสดงแอนติบอดีโครงสร้างต่างๆ จากนั้นใช้หลักการ affinity selection หรือ biopanning เพื่อทำการคัดเลือก antibody โดยวิธีการ high-throughput เพื่อคัดหาโคลนที่สามารถผลิตและหลั่ง แอนติบอดี ออกมานอกเซลล์ *E. coli* ได้ดี [19] โดยที่ยังคงความสามารถในการจับกับเป้าหมายได้สูงอยู่ จากนั้นโคลนของแอนติบอดีที่ได้รับการคัดเลือกมาเพราะมีคุณสมบัติที่ดีที่สุด (ซึ่งอาจดีกว่าโคลนตั้งต้นก็ได้) จะสามารถนำไปผลิตต่อ ในปริมาณสูง และทำให้บริสุทธิ์ ได้ง่าย ด้วย *E. coli* expression system ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ สามารถนำไปใช้ประกอบเป็นชุดตรวจสอบในระดับอุตสาหกรรม หรืออาจนำไปทำวิศวกรรมแอนติบอดีในรูปแบบต่างๆ เพื่อการประยุกต์ใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพที่หลากหลายต่อไป อีกทั้งแนวทางการผลิตแอนติบอดีที่จะได้พัฒนาขึ้นมานี้ ยังสามารถนำไปปรับใช้ในงานทางด้าน proteomics ต่อได้ด้วย เพราะสามารถใช้ผลิตแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้น ในคราวเดียวกัน [20-22]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 โมโนโคลนอล แอนติบอดี [4, 9, 23]

monoclonal antibody ไม่ใช่สารที่เกิดจากธรรมชาติ แต่เกิดจากการที่มนุษย์คิดค้นวิธีการสร้างขึ้นด้วยเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาในปี พ.ศ. ๒๕๑๘ วิธีการทั่วไปที่ใช้ในการผลิต monoclonal antibody นั้น ทำได้โดยการฉีด antigen เข้าไปในหนูเพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อ antigen ชนิดนั้นๆ จากนั้นจึงใช้เทคนิคการสร้างเซลล์ผสม (hybridoma technology) ระหว่าง B lymphocyte และ myeloma cell หรือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อผลิตให้ได้เป็น monoclonal antibody ชนิดต่างๆกัน [4] เซลล์ผสมที่ถูกสร้างขึ้นให้มีความสามารถในการผลิต monoclonal antibody นั้น สามารถเก็บรักษาไว้ให้เป็นแหล่งผลิต monoclonal antibody ได้ตลอดไป การผลิต monoclonal antibody ชนิดหนึ่งๆ แต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลานาน (๔-๕ เดือนขึ้นไป) และ การลงทุนเป็นจำนวนสูง นอกจากนั้นแล้วยังต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูง รวมทั้งยังต้องเกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองคือ หนูอีกด้วย [9] โดยมากนักวิจัยจึงต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง และยังมีอุปสรรคที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการใช้เทคโนโลยี hybridoma ในการผลิต monoclonal antibody ก็คือ hybridoma cell ไม่เสถียร ทำให้สามารถสูญเสียความสามารถในการผลิต monoclonal antibody ได้ อีกทั้งในขั้นตอนการผลิต monoclonal antibody ให้ได้เป็นจำนวนมาก (large scale) เพื่อการนำไปใช้ต่อนั้นก็มีความยุ่งยากและต้องใช้เครื่องมือราคาแพงเช่นกัน วิธีการที่นิยมใช้ในการผลิต monoclonal antibody ให้ได้เป็นจำนวนมากนั้นมี ๒ วิธีคือ การนำ hybridomas ไปเลี้ยงในลักษณะที่เป็นมะเร็งในช่องท้องของหนู (ascites tumor) แล้วสกัดเอา ascites fluid ที่มี monoclonal antibody ออกมา วิธีนี้เป็นที่นิยมเพราะสามารถผลิตได้ monoclonal antibody ในปริมาณสูงกว่าการเลี้ยงในห้องทดลองถึง ๑,๐๐๐ – ๑๐,๐๐๐ เท่า แต่เป็นวิธีการที่สร้างความเจ็บปวดและทรมานให้กับหนูทดลอง นอกจากนั้นแล้ว monoclonal antibody ที่เตรียมได้ยังปนเปื้อนด้วย immunoglobulin ของหนู ไวรัส หรือสาร cytokine อื่นๆจากหนูซึ่งอาจไม่เป็นผลดีต่อการประยุกต์ใช้ต่อไป [9] วิธีการอีกวิธีหนึ่งในการผลิต monoclonal antibody เป็นจำนวนมากคือการเลี้ยงใน bioreactor ชนิดต่างๆได้แก่ standard static หรือ agitated suspension cell cultures, membrane-based หรือ matrix-based culture systems, และ high cell-density bioreactors [10, 11] แต่ข้อจำกัดของวิธีการเหล่านี้คือเป็นเทคโนโลยีที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงมาก รวมทั้งอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ก็มีราคาสูงมากเช่นกัน

นอกจากการผลิต monoclonal antibody โดยวิธีการดั้งเดิมนั้นจะมีความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายที่สูงแล้ว ยังมีข้อจำกัดที่เกิดจากเทคโนโลยีนี้หลายอย่างเช่น ข้อจำกัดในชนิดของ antigen ที่จะใช้ เพราะต้องเป็น antigen ที่ไม่เป็นพิษต่อหนูทดลอง นอกจากนั้นแล้วยังต้องไม่เป็น antigen ที่คล้ายกับ antigen ของหนู เช่น antigen ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในขั้นต้นของลำดับการวิวัฒนาการ (conserved antigens) หรือใช้ได้เฉพาะกับ antigen ที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนู (immunogenicity) ได้เท่านั้น นอกจากนั้นแล้วผลที่ได้จาก

การกระตุ้นหนูทดลองยังมีความแปรปรวนสูงขึ้นกับสุขภาพของหนูแต่ละตัว ข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือ จำนวนชนิดของ antigen ที่จะใช้ในการสร้าง monoclonal antibody โดยปกติการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen แต่ละชนิดมักต้องใช้หนูทดลอง ๓-๕ ตัวขึ้นไป ในยุคปัจจุบันซึ่งเป็นยุคหลังการค้นพบลำดับยีโนม (post-genomic era) ของมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด ความสำคัญในการศึกษาวิจัยจึงมุ่งไปสู่การศึกษาการทำงานของยีโนม หรือโปรตีน (functional genomics หรือ proteomics) ซึ่งการวิจัยเหล่านี้จำเป็นต้องเกี่ยวกับโปรตีนจำนวนมหาศาล (high-througput) การสร้าง monoclonal antibody จำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีนเหล่านี้โดยวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบันจึงเป็นไปไม่ได้ หรือต้องการค่าใช้จ่ายที่สูงมาก จึงมีความจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีอื่นในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อการวิเคราะห์ในระดับ high-througput เหล่านี้ [24-26]

การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody ที่กำลังได้รับความสนใจอยู่มากอีกประการหนึ่งในปัจจุบันนี้ ได้แก่การนำ monoclonal antibody ที่ผลิตได้จากหนูไปปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเป็นเหมือนของมนุษย์ (humanization) เพื่อให้สามารถใช้ในการบำบัดโรคต่างๆ (human therapy) [5, 27, 28] อาทิเช่น monoclonal antibody ที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมขั้นสุดท้าย [29] การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody เพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้นับวันจะมีความสำคัญและได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงเป็นการดีที่จะใช้เทคโนโลยีอื่นในการผลิต monoclonal antibody ที่ไม่ยุ่งยาก และรวดเร็วกว่าวิธีการ hybridoma ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

2.2 เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจ

การให้ความสนใจที่จะนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจมาใช้เป็นแหล่งในการผลิต monoclonal antibody นั้นได้เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี ๒๕๓๓ [30] โดยในขั้นแรกเป็นการสร้างคลังของ antibody จากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย antigen แล้ว โดยทำการแสดงเฉพาะส่วนของ antibody ที่มีหน้าที่ในการจับคือ ส่วน Fab [31, 32] หรือ สร้างเป็น antibody เส้นเดี่ยวที่มีเฉพาะส่วนที่มีหน้าที่ในการจับ เรียกว่าส่วน single chain variable fragments (form), scFv [30] ซึ่ง antibody เหล่านี้จะถูกแสดงบนโปรตีนที่ปกคลุมผิวชนิดรอง (pIII) พบว่ามีความสำเร็จจากการใช้คลังเหล่านี้ในการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen หลายชนิด [33-40] แต่ข้อจำกัดประการสำคัญของการใช้วิธีการนี้คือต้องทำการกระตุ้นสัตว์ทดลองก่อนจึงเป็นการเสียเวลา และยังเป็นคลังที่มีเฉพาะ antibody ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย antigen ที่ใช้ อย่างไรก็ตามความสำเร็จนี้นับเป็นเครื่องชี้ว่าสามารถนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจมาใช้ในการคัดเลือกและผลิต monoclonal antibody ที่มีความสามารถในการจับอย่างมีความเฉพาะเจาะจงสูงได้จริง

การพัฒนาก้าวสำคัญที่ทำให้การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจในการผลิต monoclonal antibody เป็นที่แพร่หลายและได้รับความสนใจเป็นอย่างสูง ทั้งในงานวิจัยขั้นพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทาง

เทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ เริ่มต้นในเวลา ๒ ปีต่อมา เมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถสร้างคลังของ monoclonal antibody จากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนได้สำเร็จ (nonimmune library หรือ naïve library) [41] 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 [41-44] อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้ว ความสามารถในการจับ และความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ antigen (neutralizing) มักไม่ดีเท่า antibody ที่ได้จากคลังชนิด ทุติยภูมิ

คลังของแอนติบอดีบนผิวเฟจที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นมีหลายประเภท โดยแต่ละคลังก็มีความแตกต่างกันในด้านต่างๆ เช่น ความแตกต่างในชนิดของโปรตีนปกคลุมผิวที่ใช้แสดง antibody (pIII หรือ pVIII) แหล่งที่มาของ RNA ที่จะใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง โครงสร้างของ antibody ที่ใช้แสดง (แบบ Fab หรือ ScFv) ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการสร้างคลัง (plasmid หรือ phagemid) พันธุ์ (strain) ของแบคทีเรียที่ใช้ในการเลี้ยงเฟจ พันธุ์ของ helper phage หรือขั้นตอนการตัดต่อยีนเข้าไปในตัวเฟจ ทั้งนี้นักวิจัยกลุ่มใดจะใช้วิธีการไหนนั้นขึ้นอยู่กับความชำนาญ ประสบการณ์ และวัสดุที่มีอยู่ นอกจากนั้นแล้วในปัจจุบันยังมีความพยายามในการสร้างคลังจากเส้น ดีเอ็นเอสังเคราะห์ (synthetic oligonucleotide) ด้วย [41-44]

กล่าวโดยสรุป การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจเพื่อการผลิต monoclonal antibody นั้น มีประโยชน์มากและมีข้อดีกว่าเทคโนโลยีการผลิตแบบดั้งเดิม (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

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์และสารเคมี	Catalog number	บริษัท
KM1307 helper phage NEB	(Vieira and Messing, 1987)	เผยแผ่และอธิบายไว้ใน the MRC phage display protocols the MRC phage display protocols
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)	30931-67-0	Amresco, USA
p-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (pNPP)	NB0365	Amresco, USA
Mouse anti-M13–HRP	27-9421-01	GE Healthcare Life Sciences, USA
His probe-HRP	15165	Thermo Fisher Scientific, USA
E. coli strains were TG1TR (suppressor)	-	the MRC, Cambridge, UK
E. coli SHuffle B cell	C3029H	New England Biolabs, NEB (Massachusetts, United States).
6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8)	1TFS-AB-MA121315	Thermo Fisher Scientific, USA
Goat anti-Mouse IgG (H+L), HRP	62-6520	Thermo Fisher Scientific, USA
Goat anti-Mouse IgG, Alkaline phosphatase conjugated	3030173	Merck, Germany
Amersham ECL Western Blotting Detection Kit	RPN2108	GE Healthcare Life Sciences, USA
Novex® AP Chemiluminescent Substrate	WP200002	Invitrogen, USA

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 วิธีการสร้างคลังเฟจแอนติบอดี

ทำการสร้างคลังเฟจด้วยวิธีการที่ได้พัฒนามาก่อนแล้วในห้องปฏิบัติงานของหัวหน้าโครงการวิจัย ซึ่งได้รับการตีพิมพ์ไปแล้วดังนี้

Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P., and Yamabhai, M. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. BMC Biotechnol 9, 6.

ซึ่งขั้นตอนการสร้างคลังโดยละเอียด สามารถดูได้จากรายงานการวิจัย เรื่อง “การพัฒนาเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี (Application of phage display technology for the production of monoclonal antibody) รหัสโครงการ SUT3-304-47-24-11

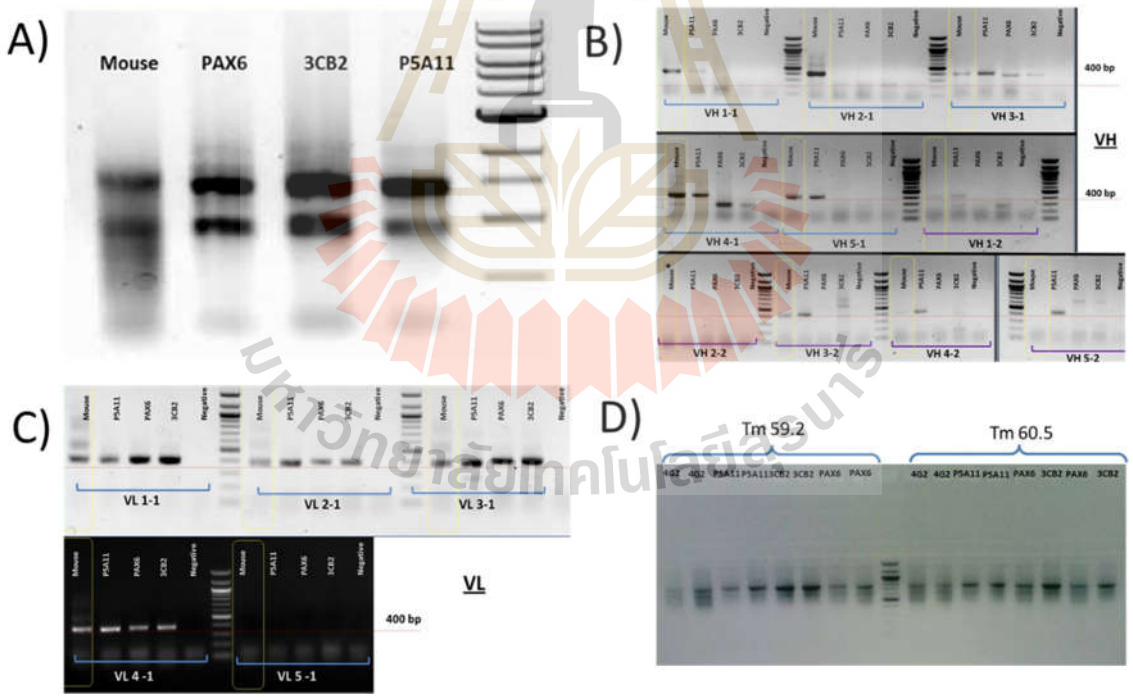
ไฮบริดรอม่าหนู (P5A11 strain RBF/DnJ) ถูกนำมาสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู (scFv) ด้วยเทคโนโลยีเฟจ โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอ (ภาพที่ 1 A) และทำการสังเคราะห์ชิ้นส่วนแอนติบอดีหนูสายหนัก (VH) และสายเบา (VL) (ภาพที่ 1B และ C) โดยใช้ primer ในตารางที่ 1 จากนั้นนำแอนติบอดีหนูสายหนักและสายเบามาเชื่อมต่อกัน (ภาพที่ 1D) โดยการสร้างชิ้นส่วน scFv ที่สมบูรณ์ โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ที่มี primer ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้คือ Fw; 5’ CCTTTCTATGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC 3’ และ Rv; 5’ CAGTCATTCTCG ACTTGCGGCCGCACG 3’ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า pull-through โดยใช้เอนไซม์ Platinum Pfx DNA polymerase เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู (scFv) หลังจากนั้นแอนติบอดีดังกล่าวนำมาเชื่อมกับ pMOD vector ซึ่งเป็นเวเตอร์ชนิด phagemid สามารถนำไปพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบได้ต่อไปในอนาคต หลังจากที่ได้ทำการเชื่อม scFv insert เข้ากับ vector แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการนำ phagemid ที่มี scFv อยู่ใส่เข้าไปใน *E. coli* TG1 เพื่อสร้างเป็นคลังของเฟจที่อยู่ในรูปของแบคทีเรีย ขั้นตอนนี้ถือว่าเป็นขั้นสำคัญในการกำหนด complexity หรือ ขนาดคลัง วิธีการที่ใช้ในการนำ DNA เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย คือวิธีการ Chemical transformation

ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีน VH และ VL

Primer	Base
mVLk5’SfiI	
mVLk5’SfiI1	5’ GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY ATT GTD HTV WCH CAG TC-3’
mVLk5’SfiI2	5’ GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY ATT NWK MTV AHD CAG TC-3’
mVLk5’SfiI3	5’ GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY RTY BWR MTS ACM CAR WC-3’
mVLk5’SfiI4	5’ GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY ATY SWG MTG ACN CAR BC-3’
mVLk5’SfiI5	5’ GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY RYT GTK RTR MYY MRG DW-3’
mVLk3’link	
mVLk3’link1	5’ gcc aga acc gcc tcc ccc act ccc tcc gcc acc CCG TTY NAK YTC CAR CTT DG 3’
mVLk3’link2	5’ gcc aga acc gcc tcc ccc act ccc tcc gcc acc MCS TWB NAB HKY CAV YYT DG 3’

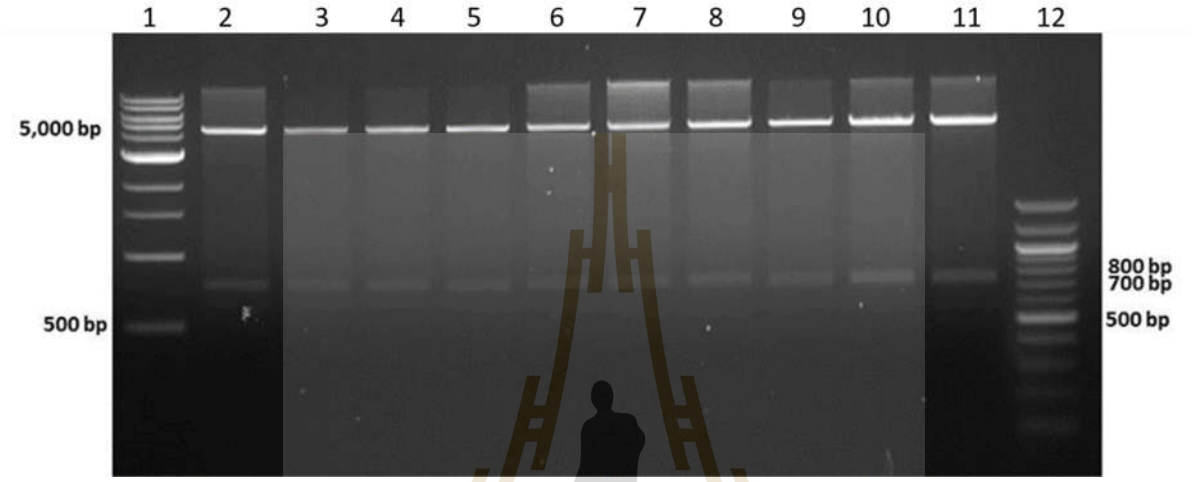
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Primer	Base
mVH5'link	
mVH5'link1	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg SAK GTB MAG CTB MAG SAS TC 3'
mVH5'link2	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg SAG GTY CAR CTB CAR CAR TC 3'
mVH5'link3	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg SAV GTS MWS BTG RWG SAR TC 3'
mVH5'link4	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg GAK GTG MAV SKG RTG GAR TC 3'
mVH5'link5	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg GAR GTR MAR STT SWB GAG TC 3'
mVH5'link6	5' agt ggg gga ggc ggt tct ggc gga ggt ggg tcg SAK GTB MMN YTV VWV SWR YS 3'
mVH3'NotI	
mVH3'NotI1	5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC YGA RGA RAC DST GAS MRK RGT 3'
mVH3'NotI2	5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC YGA RGA RRM SKK KAS WGW GRT 3'
mVH3'NotI3	5' cag tca ttc tcg act tGC GGC CGC YGA GGA GAC KGT GAS HGD GGH-3'



ภาพที่ 1 แสดงการสังเคราะห์ชิ้นส่วนแอนติบอดี A) การสกัดอาร์เอ็นเอจากไฮบริดรอม่าหนู B)การสังเคราะห์ชิ้นส่วนแอนติบอดีหนูสายหนัก(VH) C) การสังเคราะห์ชิ้นส่วนแอนติบอดีหนูสายเบา (VL) D) การเชื่อมต่อชิ้นส่วนแอนติบอดีหนูสายหนักและสายเบา

ทั้งนี้ความแตกต่างของการสร้างคลังต่างจากคลังย่าโม ๑ ที่ได้สร้างในแลป เนื่องมาจากการนำไฮบิโดม่าเพียงโนเดียวมาสร้างคลังโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู (scFv) จึงอาจทำให้มีความหลายหลากของเฟจโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู (scFv) น้อย ซึ่งหลังจากหลังจากที่ได้คลังของ bacteria ที่มี scFv แล้ว พบว่าคลังมีขนาดเล็กกว่าคือ มีโคโลนีขึ้นเพียง 136 โคโลนีเท่านั้น เมื่อตรวจสอบขนาด scFv ที่สมบรูณ์ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Not*I ก็พบว่า มี scFv ที่สมบรูณ์มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 2 จากนั้นทำการสุ่มเพื่อตรวจสอบความสามารถของเฟจที่จำเพาะเจาะจงต่อ HIS tag ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 2 ชิ้นส่วน scFv ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ด้วย *Nco*I และ *Not*I โดยช่องที่ 1 คือ 1 kb DNA ladder ช่องที่ 2-11 คือ โคลนที่ 1-10 ที่นำมาตรวจสอบยีน scFv ช่องที่ 12 คือ 100 bp DNA ladder

3.3 การตรวจสอบความสามารถของเฟจที่จำเพาะเจาะจงต่อ HIS tag ด้วยวิธี ELISA

ขั้นตอนที่ 1 การเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละโคโลนีที่มี phagemid ที่แสดง monoclonal antibody

นำแบคทีเรียเป็นโคโลนีเดี่ยวจากขั้นการสร้างคลัง โดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยแต่ละโคโลนีขึ้นมาไปเลี้ยงใน 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 1% glucose ที่อยู่ในหลุมบนจาน 96 wells plate ปริมาตร 100 µl ดังนั้นจึงสามารถเลี้ยงแบคทีเรียได้ทีละ 96 โคโลนี ต่อ plate ในคราวเดียวกัน ไปบ่มที่ 37°C โดยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน

ขั้นตอนที่ 2 ผลิตเป็นตัวเฟจโดยการ infect ด้วย helper phage

1.นำแบคทีเรียปริมาตร 5 µl จากแต่ละหลุมในขั้นที่แล้วไปใส่ในหลุมบนจานหลุมขนาดลึก (deep well ELISA plate) ที่มีอาหาร 2xYT ผสมกับ 100 µg/ml ampicillin และ 1% glucose อยู่ 200 µl ต่อหลุม และนำไปบ่มที่ 37°C โดยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2. เติม 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 1% glucose ที่มี 10^9 helper phage จำนวนปริมาตร 100 µl ต่อหลุม และนำไปบ่มที่ 37°C โดยไม่ต้องเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. ปั่นตกตะกอน ที่ 3300xg อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที

4. กำจัดส่วนใสด้านบน (supernatant) ออก แล้วเติม 2xYT ที่มี 100 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml kanamycin และ 0.1% glucose ปริมาตร 400 µl ต่อหลุม และนำไปบ่ม ที่ 30°C โดยเขย่าที่ 250 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

* ในครั้งนี้ให้ทำการตรึงโปรตีนเป้าหมาย 20 µl ของ Chitosanase (5mg/mL) ที่ละลายใน $NaHCO_3$ (100 mM, pH = 8.0) และ 100 µL ของ 1% BSA เป็น Negative control บน ELISA plate เพื่อทำการตรวจสอบการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนในวันถัดไป

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การทำโมโนโคลนอล เฟจอีไลซ่า หรือ Monoclonal Phage ELISA

1. นำ 96 wells plate จากขั้นตอนที่ 2 ปั่นตกตะกอน ที่ 3300xg เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วน supernatant ที่มีเฟจอยู่ไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2. ทำการล้างจาน ELISA ที่ทำการตรึงโปรตีนเป้าหมายด้วย 1xPBS จำนวน 3 ครั้ง

3. เติม 2% MPBS (2% Non-fat dried milk in PBS) ปริมาตร 200 µl ปิด ELISA plate ด้วยพลาสติกถนอม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. เติม 2% MPBS ปริมาตร 50 µl และเติมเฟจจากขั้น 1 ปริมาตร 150 µl จากปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5. คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS ผสมกับ 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 2 รอบ

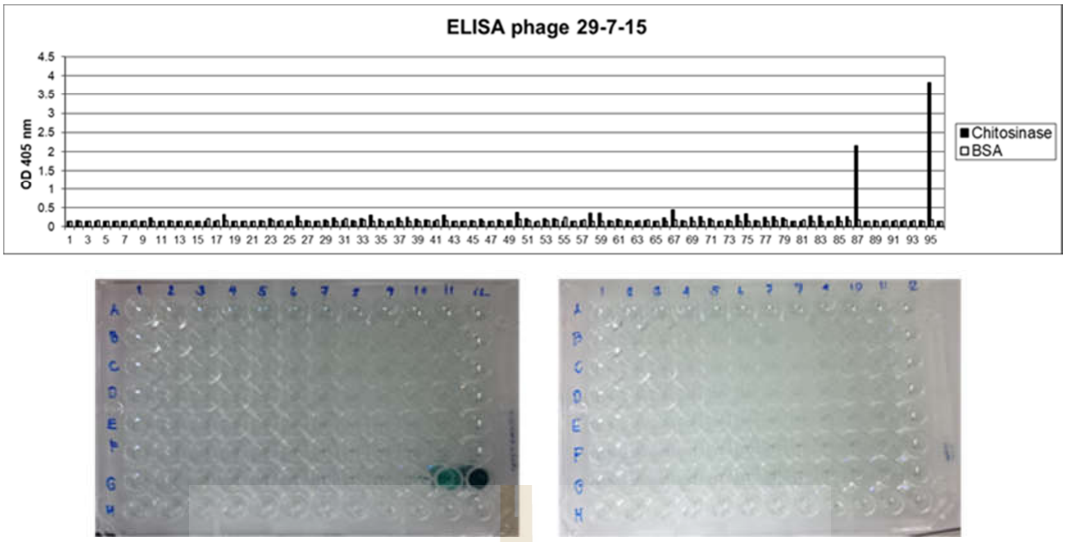
6. เติม HRP anti-M13 ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน PBS ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7. ล้างด้วย PBST (PBS ผสมกับ 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย 1xPBS อีก 2 รอบ

8. เติมสาร ABTS ใน 50 mM citric acid ที่ผสม 0.05% H_2O_2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-60 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี

9. ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่องอ่านอีไลซ่า หรือ ELISA plate reader ที่ความยาวแสง 405 nm

อย่างไรก็ตามผลการทดลอง Phage ELISA แสดงว่าไม่มีเฟจโลนใดสามารถจับกับ CsnA-His tag ได้ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 Phage ELISA เพื่อตรวจสอบความสามารถของเฟจแต่ละโคลนในการจับกับโปรตีน CsnA-His ผลการทดลองแสดงว่าเฉพาะ Positive control เท่านั้นที่แสดงการจับ

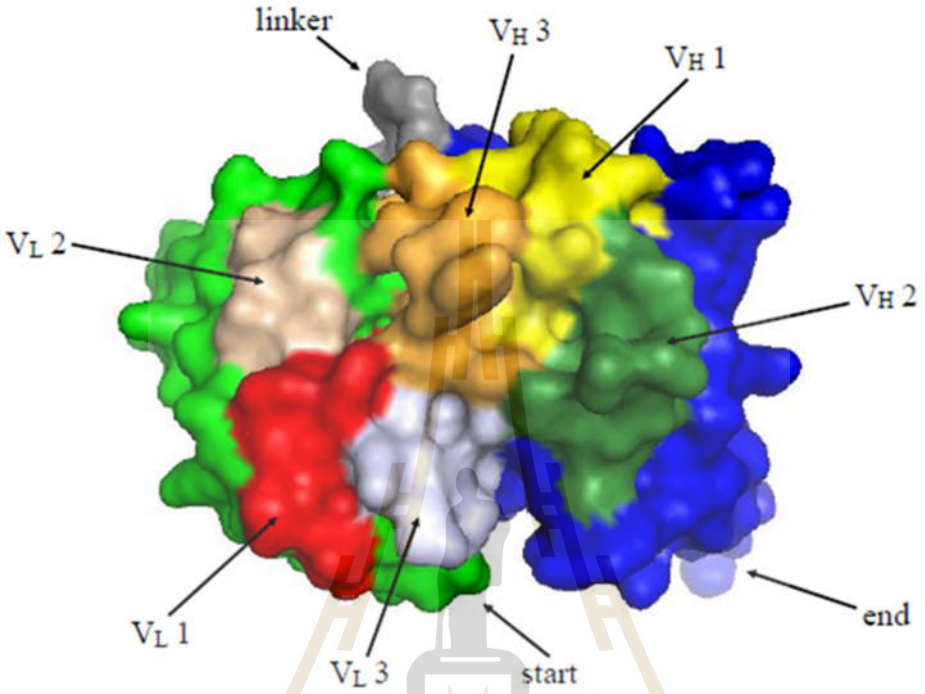
3.4 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอและโครงสร้างโปรตีน

ผลการสุ่มวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ของเฟจที่เตรียมได้ สามารถบ่งชี้ได้ว่า มีโคลนแอนติบอดี P5A1112 และ P5A1122 เป็นโคลนเดียวกัน ส่วนโคลน คือ P5A1123 มีลำดับลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่แตกต่าง ดังภาพที่ 4 ซึ่งเป็นโคลนที่มีลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ คือมีองค์ประกอบของลำดับดีเอ็นเอชิ้นส่วนแอนติบอดีทั้งสายหนักและสายเบา (heavy chain variable fragment VH และ light chain variable fragment VL) ยีนดีเอ็นเอชิ้นส่วนแอนติบอดีนี้อยู่ในเฟจมิดเวคเตอร์ และ in-frame กับ protein pIII ส่วนโคลนอื่นๆ มี ชิ้น DNA ที่ไม่สมบูรณ์

```
P5A1122         MADVLLTQSPASQSASLGESVTFTCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAATSLADGV
P5A1112         MADILMTQSPASQSASLGESVTFTCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAATSLADGV
P5A1123         MADILMT-----QTASLGESVTFTCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAATSLADGV
                ***:*:*     *:**************************************************

P5A1122         PSRFSGSGSGTKFSFKISNLQAEDFATYYCQQLYRNPRTFGGGTKLELERGGGGSGGGGS
P5A1112         PSRFSGSGSGTKFSFKISNLQAEDFATYYCQQLYRSPRTFGGGTKLELERGGGGSGGGGS
P5A1123         PSRFSGSGSGTKFSFKISNLQAEDFATYYCQQLYRNPRTFGGGTKLELERGGGGSGGGGS
                **********************************.**********************

P5A1122         GGGGSHVKLEQSGGGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMHWVRQTPEQRLEWVATISDGG
P5A1112         GGGGSEVQGVESGGGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEQRLEWVATISDGG
P5A1123         GGGGSQVQLKESGGGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEQRLEWVATISDGG
                ***** *:  :****************************:*********************

P5A1122         LYTYYPDSVKGRFTISRANVKNILYLHMNSLKSEDTAMYYCARDRLFYDYSFAMDYWGQG
P5A1112         LYTYYPDSVKGRFTISRANVKNILYLHMNSLKSEDTAMYYCARDRLFYDYSFAMDYWGQG
P5A1123         LYTYYPDSVKGRFTISRANVKNILYLHMNSLKSEDTAMYYCARDRLFYDYSFAMDYWGQG
                ************************************************************

P5A1122         TTLTVSSAAAHHHHHHGAAGPEQKLISEEDLNGTA
P5A1112         TPVTVSSAAAHHHHHHGAAGPEQKLISEEDLNGTA
P5A1123         TSVTVSSAAAHHHHHHGAAGPEQKLISEEDLNGTA
                *.:**********************************
```

ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอมิโนของโคลน P5A1112, P5A1122 และ P5A1123

ลำดับสายดีเอ็นเอของแอนติบอดีนี้ได้ถูกเปลี่ยนเป็นสายโปรตีนและนำไปวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรม Pymol ปรากฏโครงสร้างสามมิติดังรูป



ภาพที่ 5 ภาพโคลงสร้างสามมิติของชิ้นส่วนแอนติบอดี

3.5 การตรวจสอบความสามารถของเฟจที่จำเพาะเจาะจงต่อ HIS tag ด้วยวิธี Western blot

1. เตรียมตัวอย่าง Chitosanase (5mg/mL) และ 1% BSA จากนั้นจะทำการแยกโปรตีนตาม molecular weight ด้วยวิธี gel electrophoresis

2. ทำการย้ายโปรตีนจาก gel ไปยัง PVDF membrane

3. ทำการ Blocking ด้วย 5%skim milk เพื่อป้องกันการปนเปื้อนโปรตีนอื่นๆ

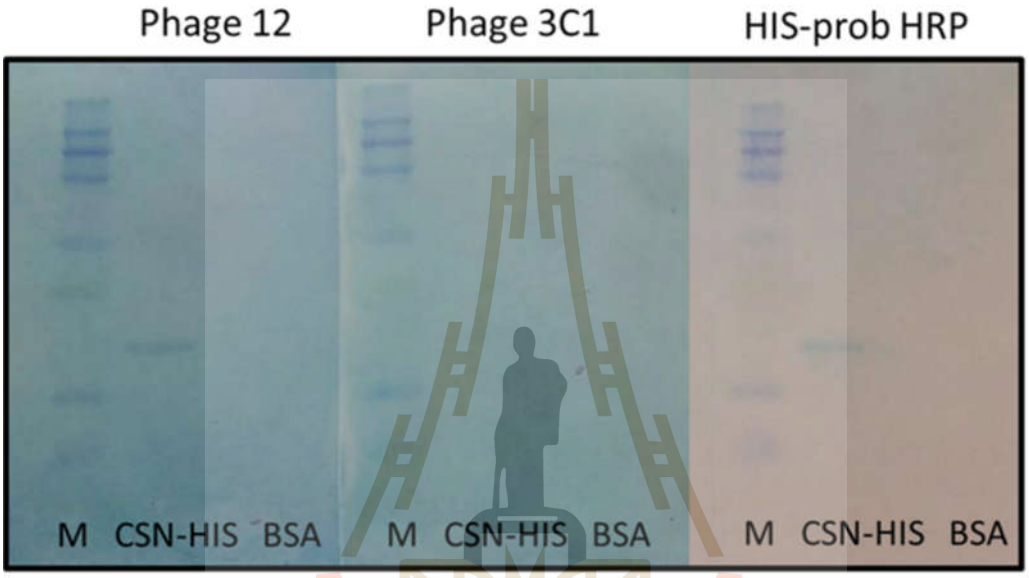
4. ล้างด้วย 1xPBS อีก 3 รอบ

5. เติมเฟจทั้ง 3 โคลน คือ P5A1112, P5A1122 และ P5A1123 ที่ต้องการตรวจสอบความสามรถในการจับอย่างจำเพาะต่อ HIS tag ซึ่งเฟจโคลน 3C1 มีความจำเพาะต่อสารพิษจากเชื้อราอลาฟาท็อกซิน เป็น negative control และ HIS prop HRP เป็น positive conrol ในการทดลองนี้ (1 แอนติบอดี ต่อ 1 แผ่น PVDF membrane)

6. PVDF membrane ที่ถูกเติมเฟจทั้ง 3 โคลน และเฟจโคลน 3C1 จะล้างด้วย PBST (PBS ผสมกับ 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย 1xPBS อีก 2 รอบ จากนั้นเติม HRP anti-M13 ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน PBS ลงใน PVDF membrane

7. ล้างด้วย PBST (PBS ผสมกับ 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย 1xPBS อีก 2 รอบ
8. เติมสาร Colorimetric detection

จากผลการทดลองพบว่าเฟจโคลน P5A1112 เท่านั้นที่มีความสามารถจับจำเพาะต่อ HIS tag ในโปรตีน chitosanase ดังมีแบนโปรตีนปรากฏในภาพที่ 5 เมื่อเทียบกับเฟจโคลน 3C1 ซึ่งเป็น negative control และ HIS prop HRP เป็น positive conrol ดังนั้นจึงตั้งชื่อเฟจโคลนว่า **MH12** เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 6 ความสามารถของเฟจโคลน P5A1112 ที่จำเพาะเจาะจงต่อ HIS tag

3.6 การผลิตชิ้นแอนติบอดีชนิดเส้นเดี่ยวที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส scFv-AP

3.6.1 การโคลนยีนเข้า AP fusion vector

โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมในการนำชิ้น ดีเอนเอ ส่วน MH12 scFv antibody ใส่เข้าไปใน vector ชื่อ pKP300ΔIII (ภาพที่ 6) ที่มี ยีน AP ของแบคทีเรีย (bacterial alkaline phosphatase) อยู่ และต่อด้วย 6xHistidine tag ประกอบไปด้วยขั้นตอนย่อยต่างๆ ดังนี้

1. นำ phagemid ที่มี gene ของ scFv ที่ต้องการโคลน และ vector ชื่อ pKP300ΔIII ที่มี gene ของ AP ต่อด้วย 6xHistidine tag ซึ่งถูกความคุมการแสดงออกด้วย pho promoter มาตัดด้วยเอนไซม์ (restriction enzyme) *NcoI* และ *NotI* แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับ vector ให้ทำการตัด phosphate group ออกจากปลาย 5’ ของ vector โดยตัดด้วยเอนไซม์ CIP (Calf intestinal phosphatase) บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้มี background (คือ vector ที่จะเกิดการเชื่อมต่อกันเองโดยไม่มี insert เมื่อทำการเชื่อมต่อในขั้นตอนที่ 4 ให้น้อยที่สุด

2. จากนั้นทำการตรวจ DNA โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 1%agarose gel (agarose gel electrophoresis) เพื่อแยกชิ้นส่วน DNA ตามขนาด ซึ่ง vector ต้องมีขนาดประมาณ 5000 base pairs (bp) และ ยีนของชิ้นส่วน scFv ต้องมีขนาดประมาณ 750-800 bp ทำการตัดเจลตรงที่มีชิ้นส่วน DNA ของทั้ง vector และ scFv (insert) ให้ถูกต้องตามขนาดดังที่กล่าวไปข้างต้น

3. ทำการสกัด DNA ออกจากเจลให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up จากบริษัท Promega, USA โดยสกัด DNA จาก column ด้วยน้ำ ปริมาตร 35 µl

4. ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน scFv เข้าสู่ vector โดยใช้เอนไซม์ DNA ligase โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง vector : insert เป็น 1:3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. จากนั้นนำ DNA ที่เชื่อมต่อแล้ว transfrom เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* TG1 (เป็นเซลล์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการอ่อนแอของผนังเซลล์ ด้วยแคลเซียม) จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มี 100 ug/ml Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 คืน

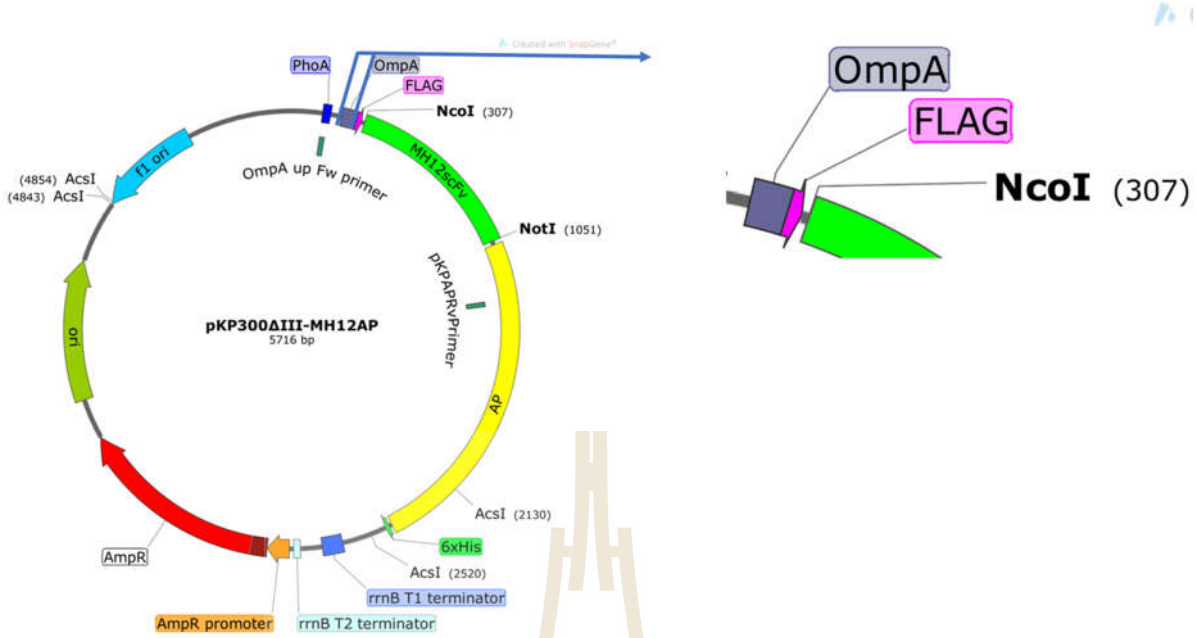
6. นำแบคทีเรียโคโลนี่เดี่ยวที่ได้ ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB ที่มี 100 µg/ml Ampicillin จำนวน 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 คืน เขย่าที่ 250 rpm

7. นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 3,300g, 4 ℃ เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส (supernatant) ด้านบนทิ้ง เก็บเซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้ในการสกัด DNA

8. ทำการสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ DNA extraction kit จากบริษัท QIAprep Spin Miniprep Kit จากบริษัท QIAGEN, Germany โดยสกัด DNA จาก column ด้วยน้ำ ปริมาตร 50 µl

9. ทำการตรวจสอบการผลิต scFv-AP ด้วยการตัด DNA ที่สกัดได้จากข้อ ๘ มาตัดด้วย restriction enzyme *Nco*I และ *Not*I ถ้าประสบผลสำเร็จ ต้องมี DNA ขนาด 750-800 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนที่แสดงชิ้นส่วน scFv

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 7 โครงสร้างและ บริเวณ cloning site ของ MH12 scFv-AP ในเวกเตอร์ pKP300ΔIII

3.6.2 <u>การโคลนยีน scFv-AP เข้า pET21d+ vector</u>

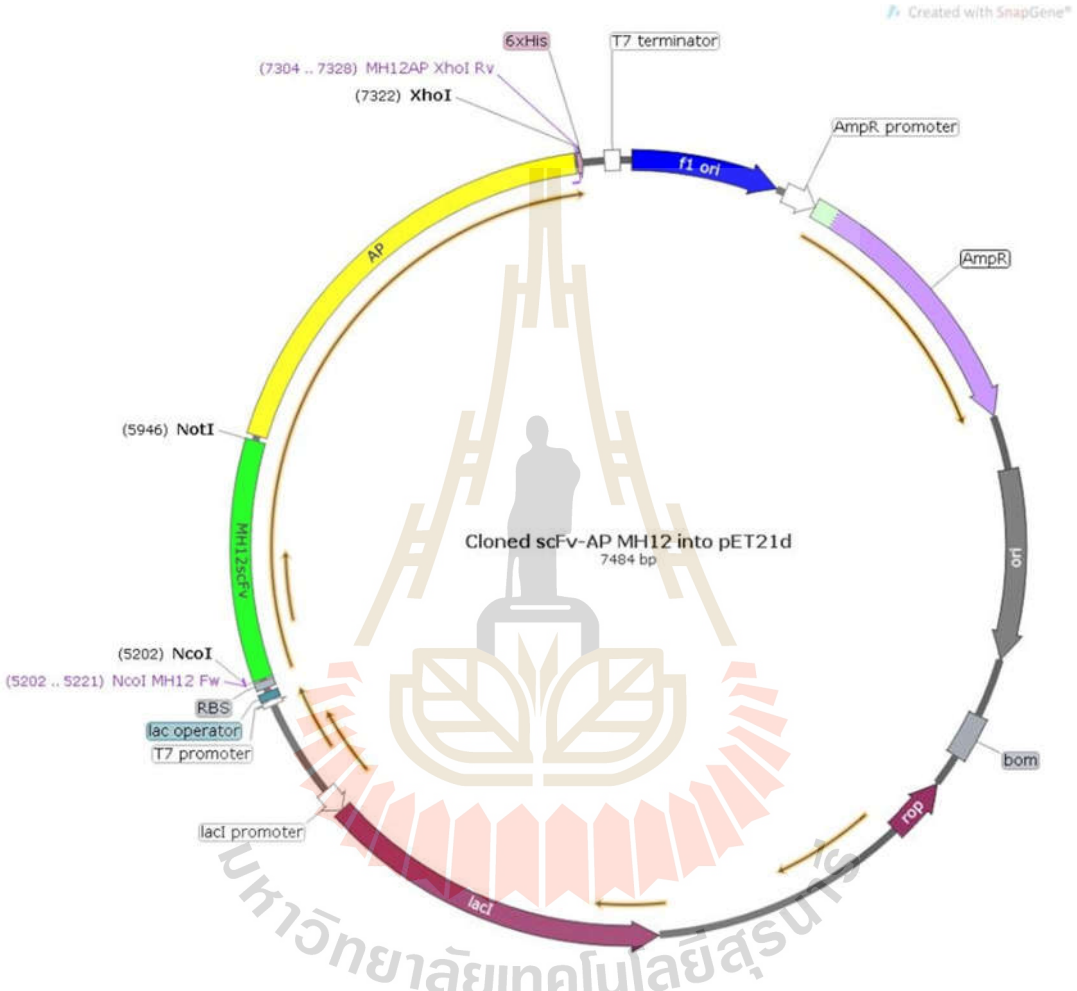
โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมในการนำชิ้น ดีเอนเอ ส่วน MH12 scFv-AP ใส่เข้าไปใน vector ชื่อ pET21d+ (ภาพที่ 7) เข้าในตำแหน่งเอนไซน์ *NcoI* และ *XhoI* และต่อด้วย 6xHistidine tag ประกอบไปด้วยขั้นตอนย่อยต่างๆ ดังนี้

1. นำ pKP300ΔIII-MH12AP ที่มี gene ของ scFv-AP ที่ต้องการโคลนเข้า pET21d+ vector มาโดยใช้ปฏิกิริยา PCR ที่มี primer ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้คือ NcoI_MH12scFvAP_Fw; CTG TGC CCA TGG CCG ACA TTC TGA TG และ MH12scFv_XhoI_Rv; GCA CAG CTC GAG CCC CGG TAC TTT CAG CCC โดยใช้เอนไซม์ Platinum Pfx DNA polymerase หลังจากทำปฏิกิริยาเสร็จแล้ว แยก DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดจากอะกาโรสเจล โดยใช้ชุดสกัดจากบริษัท Promega, USA

2. นำ PCR product ที่ได้ คือ MH12 scFv-AP และ vector ชื่อ pET21d+ มาตัดด้วยเอนไซม์ (restriction enzyme) *NcoI* และ *XhoI* แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับ vector ให้ทำการตัด phosphate group ออกจากปลาย 5’ ของ vector โดยตัดด้วยเอนไซม์ CIP (Calf intestinal phosphatase) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้มี background (คือ vector ที่จะเกิดการเชื่อมต่อกันเองโดยไม่มี insert เมื่อทำการเชื่อมต่อในขั้นตอนที่ 4 ให้น้อยที่สุด

3. จากนั้นทำขั้นตอน DNA gel purification การเชื่อมระหว่าง vector และ insert หรือ ขั้นตอน ligastion จนกระทั่งได้ plasmid ของ pET21d+MH12 scFv-AP ตามที่อธิบายใน 3.5.1

4. ทำการตรวจสอบการผลิต scFv-AP ด้วยการตัด DNA ที่สกัด plasmid จากนั้นตัดด้วย restriction enzyme *Nco*I และ Xho*I* ถ้าประสบผลสำเร็จ ต้องมี DNA ขนาด 2138 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนที่แสดงชิ้นส่วน scFv-AP



ภาพที่ 8 โครงสร้างและ บริเวณ cloning site ของ MH12 scFv-AP ในเวกเตอร์ pET21d+MH12AP

3.6.3 <u>การผลิต scFv-AP ใน *E. coli* TG1</u>

1. นำ DNA ของ pKP300ΔIII-MH12AP ที่ สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรีย transfrom เข้าสู่ *E. coli* TG1 ทำการเกลี่ย (spared) แบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่มี 100 µg/ml Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้ได้แบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว

2. ใช้ไม้จิ้มฟันหรือแท่งเหล็กเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีของแบคทีเรีย ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Luria-Bertani (LB) broth ปริมาตร 5 ml ที่มี 100 µg/ml Ampicillin จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน พร้อมกับเขย่าไปด้วยที่ 250 rpm

3. นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 100 ul ใส่ใน flask ที่มีอาหารแบบเหลว Low Phospahte media ปริมาตร 100 ml ที่มี 100 µg/ml Ampicillin, 1M $MgSO_4$ และ 1M glucose แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C โดยเขย่าไปด้วยที่ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

4. นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 8,000xg, 4 °C เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใส (supernatant) ด้านบน (เก็บไว้ทดสอบด้วยวิธี ELISA) เก็บเซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้ในการสกัดชิ้นส่วนแอนติบอดี scFv-AP จาก cell lysate ด้วย BugBuster® Protein Extraction Reagent จากบริษัท Merk, USA โดย scFv-AP นี้สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีการ Affinity Chromatography column

3.6.4 <u>การผลิต scFv-AP ใน *E. coli* Shuffle B cell</u>

1. นำ DNA ของ pET21d+MH12AP ที่ สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรีย transfrom เข้าสู่ *E. coli* Shuffle B cell ทำการเกลี่ย (spared) แบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่มี 100 µg/ml Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้ได้แบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว

2. ใช้ไม้จิ้มฟันหรือแท่งเหล็กเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีของแบคทีเรีย ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Luria-Bertani (LB) broth ปริมาตร 5 ml ที่มี 100 µg/ml Ampicillin จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 คืน พร้อมกับเขย่าไปด้วยที่ 250 rpm

3. นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 100 ul ใส่ใน flask ที่มีอาหารแบบเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 400 ml ที่มี 100 µg/ml Ampicillin แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C โดยเขย่าไปด้วยที่ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

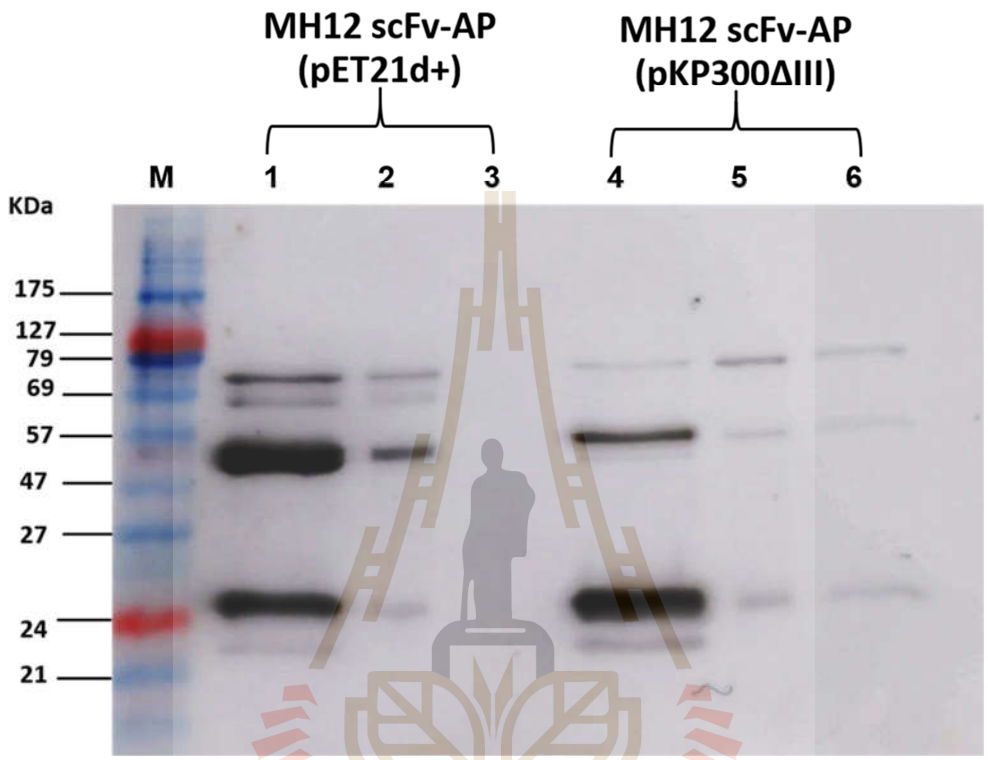
4. เติม IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.04 mM แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C โดยเขย่าไปด้วยที่ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

5. นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 8,000xg, 4 °C เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใส (supernatant) และเก็บเซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้ในการสกัดชิ้นส่วนแอนติบอดี scFv-AP จาก cell lysis โดยใช้ 15 ml ของ binding buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole และ 0.5% Tween 20) ที่มี 1 mg/ml lysozyme และ 1M PMSF scFv-AP ทำการผสมให้ cell lysate ละลายใน buffer จากนั้นบ่มทิ้งไว้ 30 นาที นำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที pulse 30 วินาที และ stop 30 วินาที ที่ Amp 40%

6. นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 8,000xg, 4 °C เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใส (supernatant) ด้านบนทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีการ Affinity Chromatography column

การนำเทคนิคพันธุวิศวกรรมในหลังจากยีนของ MH12 scFv antibody เข้าเวกเตอร์ pKP300ΔIII ที่มี gene ของ AP ต่อด้วย 6xHistidine tag ซึ่งถูกความคุมการแสดงออกด้วย pho promoter มาตัดด้วย

เอนไซม์ (restriction enzyme) *NcoI* และ *NotI* และผลิต scFv-AP ใน *E.coli* TG1 ส่วนการโคลนยีน scFv-AP เข้าเวกเตอร์ pET21d+ เพื่อผลิต scFv-AP ใน *E. coli* Shuffle B cell ซึ่งผลจากการผลิตทั้ง 2 ระบบที่ได้จาก supernatant การสกัด cell lysate และ scFv-AP ที่ทำให้บริสุทธิ์ จะถูกนำไปตรวจสอบการผลิต scFv-AP ที่มีขนาดประมาณ 79 kDa ด้วยวิธี SDS-PAGE ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 9 SDS-PAGE ของการผลิตแอนติบอดี MH12 scFv-AP ใน *E. coli* Shuffle B cell (lane 1-3) และผลิตแอนติบอดี MH12 scFv-AP ใน *E. coli* TG1 การที่จับจำเพาะกับสาร HIS tag ให้อยู่ในรูปบริสุทธิ์ โดย M คือ Enzmart's AccuProtein Chroma (APC-001), lane 1,4 คือ purified MH12 scFv-AP, lane 2,5 คือ cell lysate, lane 3,6 คือ supernatant

3.7 การวิเคราะห์ alkaline phosphate activity

การทดสอบ MH12 scFv-AP ด้วยวิธี ELISA มีขั้นตอนการทำเหมือนวิธี ELISA มาตรฐานดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น แต่ขั้นตอนการทำจะลดลง 1 ขั้นตอน เนื่องจาก ไม่ต้องใช้ secondary antibody

1. ทำการ immobilized target 1 µg/well ของโปรตีน 152 scFv-GFP, Chitosanase (CSN), Mananase (MSN), 3C1 scFv ที่ทำให้บริสุทธิ์ และ 3C1 scFv ที่อยู่ supernatant ใน 100 mM $NaHCO_3$, pH = 8.0 และ BSA ซึ่งเป็น Negative control

2. คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย TBS 3 รอบ

3. ควบคุม (background) ในการวิเคราะห์ด้วย โดยการใส่ นมปลอดไขมัน 2% (MPBS) ปริมาณ 200 µl ลงไปในหลุมของจาน

4. คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย TBS 3 รอบ

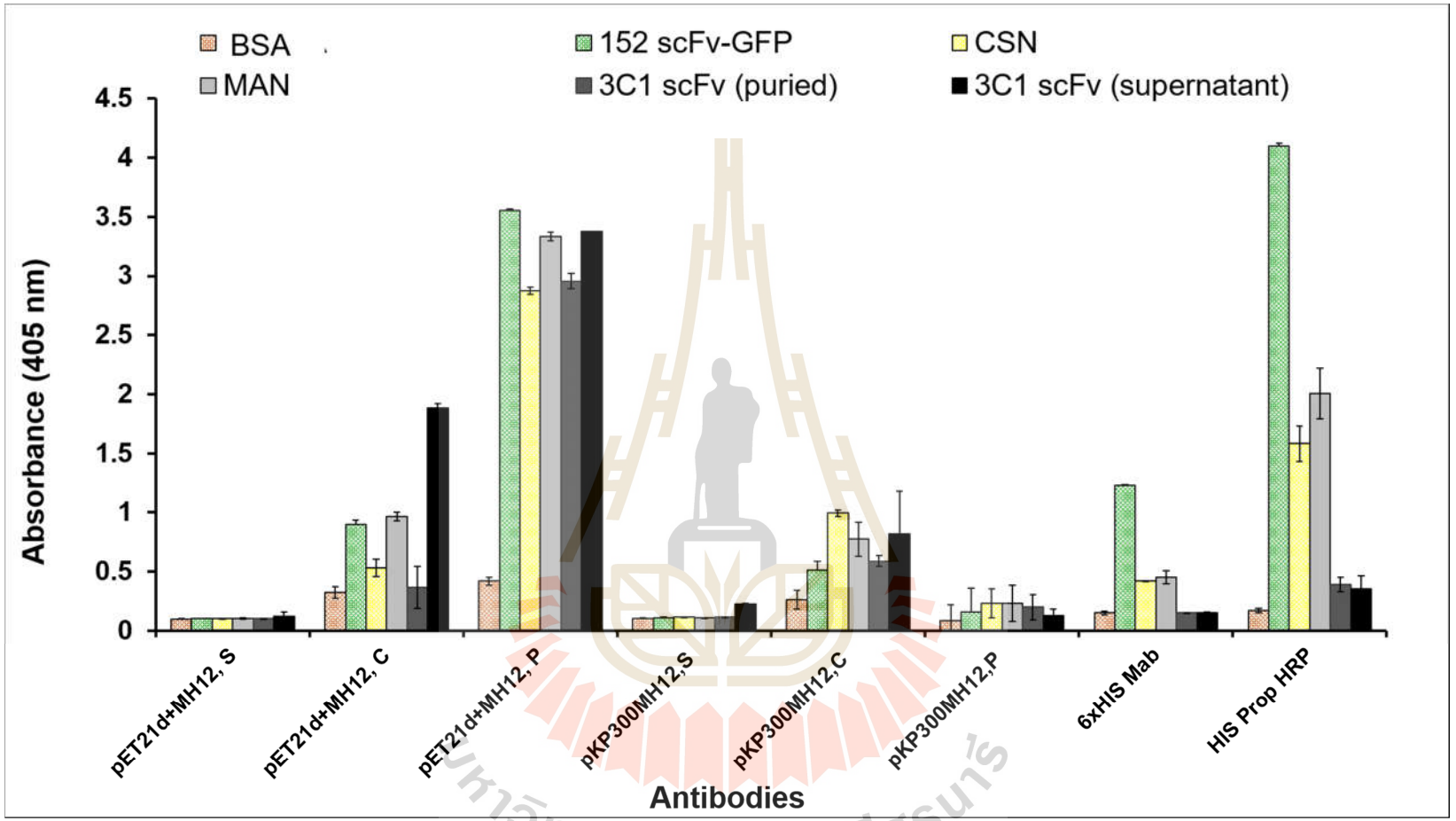
5. เติม MH12 scFv-AP (pKP300ΔIII) และ MH12 scFv-AP (pET21d+) ปริมาณ 50 µl ที่เจือจางอยู่ใน TBS ปริมาณ 50 µl ส่วน 6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8) ที่เจือจาง 1;1000 และ HIS prop HRP ที่เจือจาง 1;5000 จากบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA ปริมาณ 100 µl ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (โดย 6xHIS monoclonal antibody จะต้องใช้ secondary antibody คือ Goat anti-Mouse IgG (H+L), HRP จากบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA ที่เจือจาง 1;2500)

4. คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย TBST (TBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย TBS อีก 2 รอบ

5. เติมสาร PNPP ปริมาตร 100 ul แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-60 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี ซึ่งจะเกิดเป็นสีเหลือง ส่วนแอนติบอดีที่เชื่อมกับ HRP จะเติม ABTS ใน 50 mM citric acid ที่ผสม 0.05% H_2O_2

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

จากการวิเคราะห์ ELISA เพื่อแสดงความสามารถในการจับของแอนติบอดี MH12 scFv-AP (pKP300ΔIII) และ MH12 scFv-AP (pET21d+) ที่เก็บได้จาก supernatant, cell lysate และ scFv-AP ที่ทำให้บริสุทธิ์ พบว่า MH12 scFv-AP (pET21d+) ที่ทำให้บริสุทธิ์ มีความสามารถจับจำเพาะดีที่สุดต่อ HIS tag ในโปรตีนต่างๆ ได้แก่ 152 scFv-GFP, Chitosanase (CSN), Mananase (MSN), 3C1 scFv ที่ทำให้บริสุทธิ์ และ 3C1 scFv ที่อยู่ supernatant นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ 6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8) และ HIS prop HRP ที่เป็น commercial antibodies พบว่าทั้งสองแอนติบอดีสามารถจับจำเพาะต่อ HIS tag ในโปรตีน Chitosanase (CSN), Mananase (MSN) และ 3C1 scFv ที่ทำให้บริสุทธิ์ เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ผล ELISA ของ MH12 scFv-AP (pKP300ΔIII) และ MH12 scFv-AP (pET21d+) เมื่อเทียบกับ 6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8) และ HIS prop HRP ต่อการจับกับ HIS tag ในโปรตีนต่างๆ กัน โดยมี BSA เป็น negative control โดย S คือ supernatant, C คือ cell lysate และ P คือ puried scFv-A

3.8 การตรวจสอบความสามารถของ MH12 scFv-AP ที่จำเพาะต่อ HIS tag ด้วยวิธี Western blot

1. เตรียมตัวอย่าง 1 µg ของ 152 scFv-GFP, Chitosanase (CSN), Mananase (MSN), 3C1 scFv ที่ทำให้บริสุทธิ์ และ 3C1 scFv ที่อยู่ supernatant และ BSA ซึ่งเป็น Negative control จากนั้นจะทำการแยกโปรตีนตาม molecular weight ด้วยวิธี gel electrophoresis

2. ทำการย้ายโปรตีนจาก gel ไปยัง PVDF membrane

3. ทำการ Blocking ด้วย 1% BSA ใน 1xPBS เพื่อป้องกันการปนเปื้อนโปรตีนอื่นๆ

4. ล้างด้วย 1xPBS อีก 3 รอบ ซึ่งจะบ่ม 1 นาทีต่อการล้าง 1 ครั้ง

5. เติม MH12 scFv-AP ที่ต้องการตรวจสอบความสามรถในการจับอย่างจำเพาะต่อ HIS tag ซึ่ง 6xHIS monoclonal antibody และ HIS prop HRP เป็น positive conrol ในการทดลองนี้ (1 แอนติบอดีต่อ 1 แผ่น PVDF membrane) โดย 6xHIS monoclonal antibody จะต้องใช้ secondary antibody คือ Goat anti-Mouse IgG, Alkaline phosphatase conjugated จากบริษัท Merk, Germany

7. ล้างด้วย PBST (PBS ผสมกับ 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย 1xPBS อีก 2 รอบ ซึ่งจะบ่ม 1 นาทีต่อการล้าง 1 ครั้ง

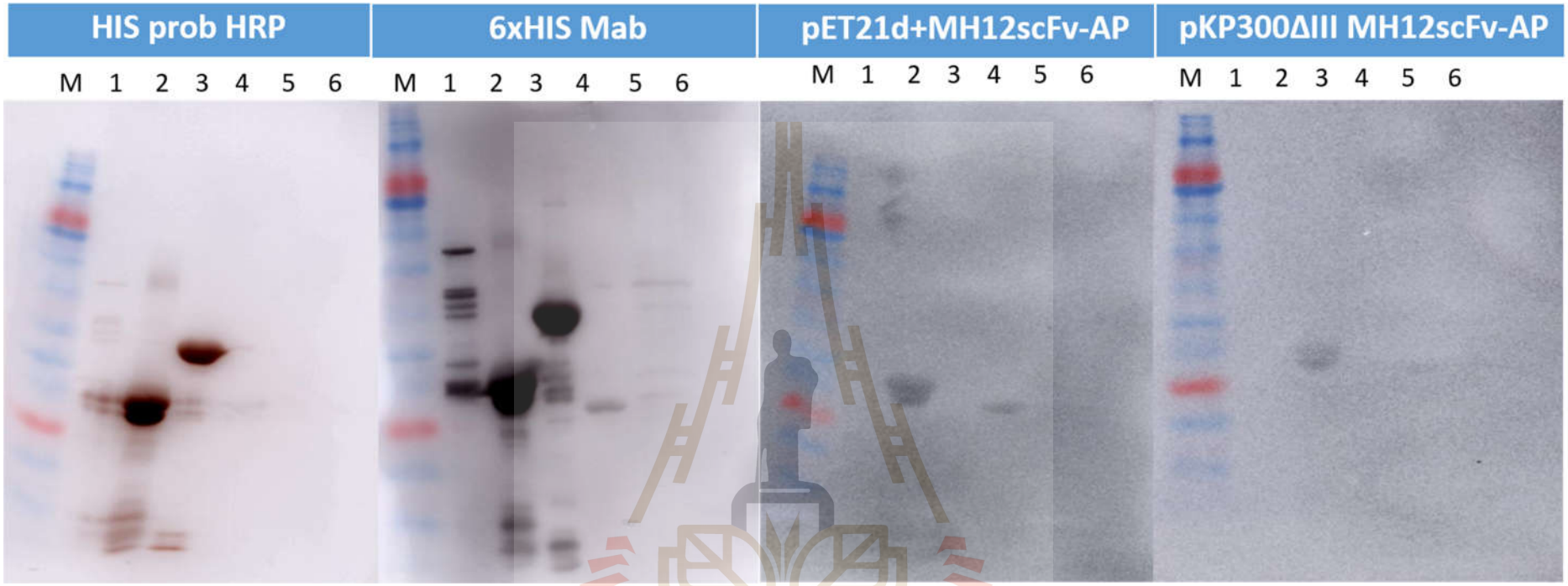
8. เติมสาร Novex AP Chemiluminescent Substrate และ chemiluminescent (ECL) horseradish peroxidase (HRP) substrate สำหรับ HIS prop HRP

จากผลการทดลองพบว่า MH12 scFv-AP (pKP300ΔIII) และ MH12 scFv-AP (pET21d+) มีความสามารถจำเพาะต่อ HIS tag ในโปรตีน Chitosanase (CSN), Mananase (MSN), 3C1 scFv ที่ทำให้บริสุทธิ์ ดังมีแบนโปรตีนปรากฏในภาพที่ 10 เมื่อเทียบกับ HIS prop HRP ซึ่งสามารถจับจำเพาะต่อ HIS tag ในโปรตีน Chitosanase (CSN) และ Mananase (MSN) ส่วน 6xHIS monoclonal antibody มีความสามารถจับจำเพาะต่อ HIS tag ในทุกโปรตีน ซึ่งจำนวน HIS tag ที่อยู่ในโปรตีนที่ใช้เป็น target ในการตรวจสอบความจำเพาะต่อ HIS tag ด้วยวิธี ELISA และ Western blot ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวน HIS tag ที่อยู่ในโปรตีนที่ใช้เป็น target

โปรตีน	จำนวน HIS tag
- 152 scFv-GFP (Puried)	6xHIS tag
- CSN (Puried)	10XHIS tag
- MSN (Puried)	6xHIS tag
- 3C1 scFv (Puried) from periplamic	6xHIS tag
- 3C1 scFv (supernatant)	6xHIS tag

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 11 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมด้วยวิธี Western blotting MH12 scFv-AP (pKP300ΔIII) และ MH12 scFv-AP (pET21d+) เมื่อเทียบกับ HIS prop HRP และ 6xHIS monoclonal antibody โดย M คือ Enzmart's AccuProtein Chroma (APC-001), lane 1 คือ 152 scFv-GFP, lane 2 คือ Chitosanase (CSN), lane 3 คือ Mananase (MSN), lane 4 คือ 3C1 scFv ที่ทำให้บริสุทธิ์ และ, lane 5 คือ 3C1 scFv ที่อยู่ supernatant, lane 6 คือ BSA

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4 บทสรุป

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

Tag sequence มีความสำคัญต่อการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ และ สามารถใช้ตรวจสอบโปรตีนปรับแต่งพันธุกรรมที่ผลิตได้ ซึ่ง HIS-tag เป็นหนึ่งใน Tag sequence ที่ได้รับความนิยมในการใช้ในการศึกษาโปรตีนปรับแต่งพันธุกรรรม ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนานวัตกรรมการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู โดยใช้แอนติบอดีต่อ His-tag เป็นตัวอย่าง ในการสร้างคลังแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมจากไฮบริดรอม่าหนู (P5A11 strain RBF/DnJ) ร่วมกับ เทคโนโลยีเฟจ โดย P5A11 เป็นไฮบริดรอม่าที่จำเพาะต่อ linear 6x his peptide ที่จะนำมาทำการสังเคราะห์ชิ้นส่วนแอนติบอดีหนูสายหนัก (VH) และสายเบา (VL) ด้วย 9 VH และ 7 VL primers. หลังจากนั้นได้นำยีนของแอนติบอดีดังกล่าว มาโคลนเข้าไปใน pMOD vector เพื่อสร้างเป็นคลังแอนติบอดีของหนูขนาดเล็ก แล้วผลิตเป็นแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรม ที่สามารถจับกับ His-tag ในรูปแบบ scFv-AP (MH12 scFv-AP) โดยการโคลนเข้า expression vector ๒ ชนิด คือ (pKP300ΔIII) สำหรับผลิตจาก *E.coli* TG1 และ MH12 scFv-AP (pET21d+) สำหรับการผลิตโดย *E.coli* Shuffle B cell ซึ่งพบว่า ระบบ pET21d+ expression system นั้นสามารถเตรียม MH12 scFv-AP ได้ในปริมาณสูงกว่า ทำให้สามารถนำไปใช้ตรวจสอบ ความสามารถในการจับจำเพาะเจาะต่อ HIS tag ในโปรตีนต่างๆ ได้เหมาะสมกว่า โดยเมื่อทำการ เทียบกับ HIS prop HRP และ mouse monoclonal antibody ที่ซื้อมาเป็น positive conrol แล้วพบว่า MH12 scFv-AP สามารถตรวจจับกับโปรตีนได้หลายประเภทมากกว่า เมื่อใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ ELISA แต่มีความสามารถในการจับน้อยกว่าเมื่อใช้วิธีการ Western blot ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการจับของแอนติบอดี และ His-probe (Nickle) ต่อ His-tag ในโปรตีนต่างๆ นั้น แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของโปรตีนเป้าหมาย และวิธีการตรวจสอบ โดยโปรตีนบนจาน ELISA นั้นจะมีสภาพ ๓ มิติปกติ แต่โปรตีนใน WB จะถูกทำลายโครงสร้าง ๓ มิติไป ดังนั้นการมีแอนติบอดีสำหรับตรวจสอบที่หลากหลายจึงมีประโยชน์ เพื่อปรับใช้กับ target โปรตีนที่หลากหลาย และวิธีการวิเคราะห์ ที่แตกต่างกัน ในอนาคตอาจนำแอนติบอดีนี้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอื่น อาทิ flow cytometry, cell/tissue staiing หรือ biosensors ได้ต่อไป

แนวทางการผลิต โมโนโคลนอลที่นำเสนอมานี้ ยังสามารถนำไปปรับใช้ในการผลิต monoclonal antibody จาก mouse hybridoma อื่นๆ ได้อีกหลากหลาย อย่างไรก็ตาม ยังมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการผลิต scFv-AP จาก *E. coli* expression system ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น รวมทั้งต้องศึกษาความคงตัว และวิธีการเก็บรักษาให้เหมาะสม เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้จริงต่อไป

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Harlow, E., and Lane, D. (1998). Using Antibodies : A Laboratory Manual : Portable Protocol, 1 Edition, (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
2. Howard, G.C., and Kaser, M.R. eds. (2006). Making and Using Antibodies: A Practical handbook, 1 Edition (CRC).
3. Borrebaeck, C.A.K. (2000). Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. Immunology Today 21, 379-382.
4. Laurino, J.P., Shi, Q., and Ge, J. (1999). Monoclonal antibodies, antigens and molecular diagnostics: a practical overview. Ann Clin Lab Sci 29, 158-166.
5. Waldmann, T.A. (1991). Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. Science 252, 1657-1662.
6. Maggon, K. (2007). Monoclonal antibody "gold rush". Curr Med Chem 14, 1978-1987.
7. Reichert, J.M., and Valge-Archer, V.E. (2007). Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov 6, 349-356.
8. Stipsanelli, E., and Valsamaki, P. (2005). Monoclonal antibodies: old and new trends in breast cancer imaging and therapeutic approach. Hell J Nucl Med 8, 103-108.
9. Albitar, M. ed. (2007). Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols 1Edition (Humana Press).
10. Birch, J.R., and Racher, A.J. (2006). Antibody production. Adv Drug Deliv Rev 58, 671-685.
11. Kelley, B. (2007). Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations. Biotechnol Prog 23, 995-1008.
12. Almagro, J.C., and Fransson, J. (2008). Humanization of antibodies. Front Biosci 13, 1619-1633.
13. Clark, M. (2000). Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? Immunol Today 21, 397-402.
14. Khandare, J.J., and Minko, T. (2006). Antibodies and peptides in cancer therapy. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 23, 401-435.
15. Schrama, D., Reisfeld, R., and Becker, J. (2006). Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov 5, 147-159.
16. Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P., Yamabhai, M. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. BMC Biotechnol 9, 6.

17. Yamabhai, M., Buranabanyat, B., Jaruseranee, N., and Songsiriritthigul, C. (2011). Efficient E. coli expression systems for the production of recombinant beta-mannanases and other bacterial extracellular enzymes. Bioeng Bugs 2, 45-49.
18. Filpula, D. (2007). Antibody engineering and modification technologies. Biomol Eng 24, 201-215.
19. Miethe, S., Meyer, T., Wöhl-Bruhn, S., Frenzel, A., Schirrmann, T., Dübel, S., and Hust, M. (2013). Production of single chain fragment variable (scFv) antibodies in Escherichia coli using the LEX™ bioreactor. J Biotechnol 163, 105-111.
20. Schirrmann, T., Meyer, T., Schutte, M., Frenzel, A., and Hust, M. (2011). Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. Molecules 16, 412-426.
21. Finlay, W.J., Bloom, L., and Cunningham, O. (2011). Phage display: a powerful technology for the generation of high specificity affinity reagents from alternative immune sources. Methods Mol Biol 681, 87-101.
22. Mersmann, M., Meier, D., Mersmann, J., Helmsing, S., Nilsson, P., Graslund, S., Colwill, K., Hust, M., and Dubel, S. (2010). Towards proteome scale antibody selections using phage display. N Biotechnol 27, 118-128.
23. Lipman, N.S., Jackson, L.R., Trudel, L.J., and Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. ILAR J 46, 258-268.
24. Elrick, M.M., Walgren, J.L., Mitchell, M.D., and Thompson, D.C. (2006). Proteomics: recent applications and new technologies. Basic Clin Pharmacol Toxicol 98, 432-441.
25. Glokler, J., and Angenendt, P. (2003). Protein and antibody microarray technology. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 797, 229-240.
26. Kusnezow, W., and Hoheisel, J.D. (2002). Antibody microarrays: promises and problems. Biotechniques Suppl, 14-23.
27. W., P., and E. F. L. J., A. (1972). Mutarotation and actions of acids and bases, in the carbohydrates chemistry and biochemistry. Volume IA, P. W. and D. Horton, eds. (Acadamic Press, New York).
28. Winter, G., and Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. Nature 349, 293-299.
29. 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.
30. McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., and Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature 348, 552-554.31. Chang, C.N., Landolfi, N.F., and Queen, C. (1991). Expression of antibody Fab

domains on bacteriophage surfaces. Potential use for antibody selection. J Immunol 147, 3610-3614.

32. Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., and Winter, G. (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.
33. Bugli, F., Graffeo, R., Sterbini, F.P., Torelli, R., Masucci, L., Sali, M., Grasso, A., Rufini, S., Ricci, E., Fadda, G., 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.
34. Burton, D.R., Barbas, C.F., 3rd, Persson, M.A., Koenig, S., Chanock, R.M., and Lerner, R.A. (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.
35. 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.
36. Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 352, 624-628.
37. Graus, Y.F., de Baets, M.H., Parren, P.W., Berrih-Aknin, S., Wokke, J., van Breda Vriesman, P.J., and Burton, D.R. (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.
38. Kramer, R.A., Marissen, W.E., Goudsmit, J., Visser, T.J., Clijsters-Van der Horst, M., Bakker, A.Q., de Jong, M., Jongeneelen, M., Thijsse, S., Backus, H.H., et al. (2005). The human antibody repertoire specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries. Eur J Immunol 35, 2131-2145.
39. Lee, M.S., Lee, J.C., Choi, C.Y., and Chung, J. (2008). Production and characterization of monoclonal antibody to botulinum neurotoxin type B light chain by phage display. Hybridoma (Larchmt) 27, 18-24.
40. Shaw, I., O'Reilly, A., Charleton, M., and Kane, M. (2008). Development of a High-Affinity Anti-Domoic Acid Sheep scFv and its Use in Detection of the Toxin in Shellfish. Anal Chem.

41. Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., and Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol 222, 581-597.
42. Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., and Winter, G. (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. EMBO J 13, 692-698.
43. Sheets, M.D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J.C., and Marks, J.D. (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.
44. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., and Hoogenboom, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol 12, 433-455.
45. Songsiriritthigul, C., Pesatcha, P., Eijsink, V.G., and Yamabhai, M. (2009). Directed evolution of a Bacillus chitinase. Biotechnol J 4, 501-509.
46. ยมาภัย, ม. (๒๕๕๑). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีเฟจ, (นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี).
47. Better, M., Chang, C.P., Robinson, R.R., and Horwitz, A.H. (1988). Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. Science 240, 1041-1043.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร

ผลงานวิจัยนี้ เป็นส่วนหนึ่งของทุนสนับสนุนแก่คณาจารย์ที่มีผลผลิตด้านวิจัยสูงเพื่อจ้างนักวิจัยเต็มเวลาคุณวุฒิปริญญาโท (Full-time Master Researcher) จำนวน ๒ คน คือ นางสาวณัชชา พฤกษาเมธานันท์ และนางสาวเพ็ญสุดา สมภูงา ได้เป็นผู้ช่วยวิจัยหลักในการทำวิจัยนี้ และนักวิจัยหลังปริญญาเอก (Full-time Doctoral) จำนวน ๑ คน คือ นางสาวกุณฑลี ร่างน้อย ที่เป็นผู้วิเคราะห์ผล ร่าง patent และเตรียม manuscript สำหรับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ที่มีผลกระทบสูง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน

ผลงานจากโครงการนี้ ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ ดังนี้

ก. งานประชุมระดับนานาชาติ

ยังไม่มี (แต่จะมีต่อไป)

ข. ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ (ดังแนบท้ายรายงานวิจัยนี้)

ยังไม่มี (แต่จะมีต่อไป)

ค. สิทธิบัตร

ยังไม่มี (แต่จะมีต่อไป)

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 ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2547 และมีบุตร 1 คน ชื่อ ด.ญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นศาสตราจารย์ และหัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering)

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

ประวัติผู้ช่วยวิจัย

นางสาว ณัชชา พฤกษาเมธานันท์ และ เพ็ญสุดา สมภูงา เป็นผู้ช่วยนักวิจัยระดับปริญญาโท ที่จบการศึกษาจากสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมี ศ.ดร. มณฑารพ ยมาภัยเป็นที่ปรึกษา มีความรู้ความสามารถด้านเทคโนโลยีเฟจ ปัจจุบันณัชชา พฤกษาเมธานันท์ ทำงานที่บริษัท Natural Starch ส่วน เพ็ญสุดา สมภูงา กำลังศึกษาต่อระดับปริญญาเอกที่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร. กุณฑลี ร่างน้อย เป็นนักวิจัยหลังปริญญาเอก จบการศึกษาระดับปริญญาโทและเอกจากสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมี ศ.ดร. มณฑารพ ยมาภัยเป็นที่ปรึกษา ปัจจุบันมุ่งเน้นงานวิจัยทางด้านวิศวกรรมแอนติบอดี เพื่อผลิตแอนติบอดีเพื่อการตรวจสอบและการรักษา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี