



รายงานการวิจัย

วิศวกรรมแอนติบอดีเพื่อทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏ
Antibody Engineering for Bio-imaging

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

วิศวกรรมแอนติบอดีเพื่อทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏ Antibody Engineering for Bio-imaging

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ เกษัชรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๕๙ - ๒๕๖๒
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม ๒๕๖๓

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2559 ถึง 2562 โดยมีกรรมการจากสภาวิจัยแห่งชาติเป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นักศึกษา ทั้งปริญญาโท-เอก และนักวิจัยในห้องปฏิบัติการหลายท่าน ที่ได้ช่วยกันทำวิจัยในหลายส่วน และขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการ เป็นอย่างดี



บทคัดย่อภาษาไทย

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) ในการผลิตแอนติบอดีสำหรับการทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏ (bio-imaging) โดยได้ทำการพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้างเวกเตอร์สำหรับผลิตแอนติบอดี ให้ยีนของแอนติบอดีแบบสายเดี่ยวเชื่อมต่อกับโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (scFv-GFP) จากนั้น นำไปผลิตในแบคทีเรีย อี โคลิ ๓ ชนิด พบว่า สามารถผลิตได้ดี และสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการใช้วิธีการโครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะ จากนั้นนำไปใช้ทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏ บนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และเซลล์แบคทีเรีย แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง พบว่าใช้ได้ดี โดยในเซลล์มะเร็งนั้นสามารถใช้ดูได้ทั้งตอนที่จับกับด้านนอกเซลล์ และเมื่อเคลื่อนเข้าไปในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามมีปัญหาคือสีจางเร็วมาก จึงได้ลองปรับวิธีการตรวจสอบ โดยการใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่สามารถเรืองแสง และสามารถจับจำเพาะกับกรดอะมิโน ฮิสทีดีน ๖ ตัวต่อกัน ที่ติดอยู่ด้านท้ายของแอนติบอดีสายเดี่ยวแทน พบว่าได้ผลดีมาก โดยนอกจากสามารถใช้ดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงแล้ว ยังสามารถใช้ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และตรวจสอบโปรตีนในเซลล์ด้วยวิธีการ western blot รวมทั้งสามารถใช้ตรวจสอบการจับกับผิวเซลล์ ด้วยวิธีการ ตรวจบนจานพลาสติก (ELISA) และเครื่องวัดแบบไหลผ่าน (Flow cytometer) ได้อีกด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้เป็นอย่างดี ผลงานวิจัยอยู่ในระหว่างการส่งไปตีพิมพ์ ๒ เรื่อง และเตรียม ยื่นจดสิทธิบัตรอีก ๑ เรื่อง ดังนั้นในรายงานนี้ ในส่วนวิธีการและผลการทดลองจึงได้เขียนรายงานเป็นภาษาอังกฤษ นอกจากนั้นแล้ว โครงการวิจัยนี้ ยังได้ใช้ประกอบการฝึกฝน สร้างการเรียนรู้ให้ นักศึกษาและนักวิจัยในห้องปฏิบัติการ ไม่ต่ำกว่า ๖ คน และผลงานวิจัยนั้น สามารถนำไปใช้ต่อยอดในการศึกษาภาพทางชีววิทยาได้อีกอย่างกว้างขวาง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Antibody engineering was successfully employed for bio-imaging application. Firstly, the expression vector for the generation of scFv-GFP fusion was constructed. Then, the recombinant expression vector was successfully expressed in three different *E. coli* hosts and purified by immobilized affinity chromatography (IMAC). After that they were used for bio-imaging of acute myeloid leukemia (AML) and bacterial cells, and observed with confocal fluorescent microscope. Endocytosis of scFv upon binding to the surface of lived AML cells could also be observed. However, there was a fading problem of the signal; therefore, another method for bio-imaging was investigated. In this second method, a fluorescent-conjugated anti-6xHis antibody was used as a secondary antibody to detect 6xHis tagged scFv and the results indicated that a good signal could be observed using this method. Moreover, in addition to fluorescent microscopy, this method can also be used for bioimaging using electron microscopy and other imaging techniques including the detection of cellular proteins by western blot analysis, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as well as cell surface staining and analysis using flow cytometry. Therefore, it can be concluded that this research project was accomplished according to the planned objectives. The results of this research are being prepared for publication in 2 international peer-review journal with good impact factor and 1 patent application. Accordingly, the materials and methods of this report is written in English. In addition to publications, this research project was also used to train at least 6 students and researchers in the laboratory. The output of the research can be applied for a wide variety of bio-imaging applications in the future.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 : บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย	11
3.1 การผลิต และการวิเคราะห์ด้วย recombinant antibody ในรูปแบบ scFv-GFP.....	11
สารเคมี ชีววัตถุ และวิธีการทดลอง	11
ผลการทดลอง	14
3.2 การผลิต และการวิเคราะห์ด้วย recombinant antibody ในรูปแบบ scFv-6xHis.....	20
สารเคมี สารชีววัตถุ และวิธีการทดลอง (Materials and Methods).....	20
ผลการทดลอง	26
บทที่ 4 : บทสรุป.....	36
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	36
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย.....	38
ภาคผนวก.....	46
ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร	46
ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน	47
ประวัติผู้วิจัยหลัก	48

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ ๑	กลไกการทำงานต่างๆ ของแอนติบอดีในร่างกาย.....	6
รูปที่ ๒	ภาพแสดงโครงสร้างชิ้นส่วนแอนติบอดีแบบต่างๆ.....	9
รูปที่ ๓	ส่วนประกอบต่างๆ ของ Antibody-Drug Conjugate (ADC) สำหรับรักษาโรคมะเร็ง.....	10
รูปที่ ๔	เวกเตอร์ในการผลิต scFv-GFP และการผลิต scFv-GFP ในแบคทีเรียต่างๆ.....	14
รูปที่ ๕	ผลการวิเคราะห์การผลิต scFv-GFP ใน E.coli strain ต่างๆ ด้วย Flow cytermeter	15
รูปที่ ๖	ผลการใช้ scFv-GFP โคลน 152 ที่ผลิตใน E.coli strain ต่างๆ ในการวิเคราะห์ การจับกับเซลล์มะเร็ง ด้วยFlowcytermeter.....	15
รูปที่ ๗	ผลการวิเคราะห์ scFv-GFP โคลน 152 ในการจับกับเซลล์ HL60 ด้วย confocal microscope.....	16
รูปที่ ๘	ผลการวิเคราะห์ scFv-GFP โคลน 152 ในการจับกับเซลล์ HL60 ด้วย Fluorescent microscope.....	17
รูปที่ ๙	ผลการวิเคราะห์ scFv-GFP โคลน 152 ในการจับกับเซลล์มะเร็ง AML ที่ได้มาจาก เลือดคนไข้ ด้วย Flow cytometry.....	18
รูปที่ ๑๐	ผลการวิเคราะห์ yPac1A8-GFP ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>P. aeruginosa</i> ด้วย Confocal microscopy.....	19
รูปที่ ๑๑	ผลการวิเคราะห์ cross-reactivity ของ scFv โคลน yPac1A8 และ yPgi3G4 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acnes</i> และ <i>P. aeruginosa</i>	27
รูปที่ ๑๒	ผล checkerboard titration และ Flow cytometry ของ scFv โคลน yPac1A8 และ yPgi3G4 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acnes</i> และ <i>P. aeruginosa</i>	28
รูปที่ ๑๓	ผลการวิเคราะห์ของ scFv โคลน yPac1A8 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>Propionibacterium</i> species ด้วย Confocal microscopy.....	29
รูปที่ ๑๔	ผลการวิเคราะห์ของ scFv โคลน yPgi3G4 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas</i> species ด้วย Confocal microscopy.....	30
รูปที่ ๑๕	ผลการวิเคราะห์ของ scFv โคลน yPac1A8 และ yPgi3G4 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acnes</i> และ <i>P. aeruginosa</i> ด้วย Confocal microscopy.....	31
รูปที่ ๑๖	ผลการวิเคราะห์การจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acnes</i> และ <i>P. aeruginosa</i> ของ scFv โคลน yPac1A8 และ yPgi3G4 ด้วย TEM.....	32
รูปที่ ๑๗	ผลการวิเคราะห์การจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2 และ DOA9	

ของ scFv โคลน E10 และ 6/2 ด้วย Confocal microscopy.....	33
รูปที่ ๑๘ ผลการวิเคราะห์การจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2 ที่อยู่ในราก และ ส่วนเปลือกลำต้นของข้าว (leaf sheath) ของ scFv โคลน E10 ด้วย Confocal laser scanning micrographs.....	34
รูปที่ ๑๙ ผลการวิเคราะห์การจับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2 ที่อยู่ใน Nodule ของ scFv โคลน E10 ด้วย immunofluorescence staining.....	35
รูปที่ ๒๐ ภาพเล่าเรื่องสรุปงานวิจัยด้วยการวิเคราะห์โดยใช้ recombinant antibody.....	37



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เทคโนโลยีการทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏ หรือ Bio-imaging เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแสดงส่วนต่างๆ หรือโมเลกุลจำเพาะภายในเซลล์ ในสภาวะ หรือช่วงเวลาต่างๆ ซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั่วไป เพราะต้องใช้กระบวนการพิเศษ ในการย้อมโมเลกุลจำเพาะด้วยสารเรืองแสง หรือ nanoparticles แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Fluorescent microscope) หรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) เพื่อให้สามารถแสดงเป็นภาพได้ชัดเจน สวยงาม รวมทั้งสามารถใช้ติดตามกระบวนการต่างๆ ในเซลล์ที่ต้องการศึกษาได้อย่างละเอียดในระดับโมเลกุล ดังนั้นเทคโนโลยีนี้จึง มีศักยภาพ และประสิทธิภาพสูง ในการศึกษาด้านอนุชีววิทยาของเซลล์ (molecular cell biology) เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ในเชิงลึก เพื่อความเข้าใจ กระบวนการพัฒนา การเจริญเติบโต การตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมต่างๆ และช่วยให้เข้าใจสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค หรือความผิดปกติต่างๆ ในร่างกายสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถหาแนวทางในการ ป้องกัน บำบัด รักษา วินิจฉัยโรคต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะแนวทางการรักษาป้องกันโรคแนวใหม่ ต่างๆ เช่น การรักษาแบบมุ่งเป้า (target-based therapy) การรักษาโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell therapy) ยีนบำบัด (gene therapy) รวมทั้งการพัฒนายาใหม่ๆ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก (high-throughput) เพื่อพัฒนายาใหม่ (drug discovery) อีกด้วย [1] นอกจากนั้นแล้วเทคนิคนี้ ยังสามารถประยุกต์ใช้ได้ ในทาง การเกษตร สิ่งแวดล้อม และนาโนเทคโนโลยี ได้เช่นกัน [2,3]

โมเลกุลหลักที่มีความสำคัญ สำหรับใช้ในเทคนิค Bio-imaging คือ แอนติบอดี ซึ่งเป็นสารทางชีวภาพ ที่มีคุณสมบัติหลักคือความสามารถในการจับกับเป้าหมายได้อย่างจำเพาะ และแม่นยำ วิธีการมาตรฐานในการใช้แอนติบอดี ไปใช้สำหรับเทคนิค bio-imaging นั้น ส่วนใหญ่แล้วจะต้องใช้แอนติบอดีตัวที่ ๒ (secondary antibody) ที่ติดฉลาก (label) ด้วยสารเรืองแสง หรือทอง มาจับก่อน จึงจะสามารถนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้เกิดภาพทางชีววิทยาได้ หากไม่ใช้แอนติบอดีตัวที่ ๒ ที่ติดฉลากแล้วมาจับ จะต้องทำการติดฉลากแอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) ตัวแรกโดยตรงก่อน ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก และมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ไม่เป็นที่นิยม [4]

แอนติบอดีที่สามารถนำไปใช้ในเทคนิค bio-imaging นั้น อาจเป็นได้ทั้ง polyclonal หรือ monoclonal antibody ซึ่งเตรียมได้โดยการ กระตุ้น (immunize) สัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ ด้วย antigen ในเซลล์ที่ต้องการศึกษา โดยสัตว์จะผลิตแอนติบอดีออกมาในเลือดส่วน serum เรียกว่า anti-serum หรือ polyclonal antibody ส่วน monoclonal antibody นั้นสามารถทำได้โดยการใช้เทคนิค hybridoma ปัจจุบันเตรียมได้จาก หนู และ กระต่าย อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า แอนติบอดี ทั้ง ๒ แบบ นี้จะสามารถผลิตได้ไม่ยาก และสามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ ๑) ต้อง

ทรมานสัตว์ ๒) มีความแปรปรวนในแต่ละรอบการผลิตในกรณีของ polyclonal antibody ๓) เซลล์ hybridoma ไม่เสถียร ในกรณีของ monoclonal antibody ๔) มีราคาต่อหน่วยหากต้องการผลิตในปริมาณมากและ ในระยะยาวสูง และประการที่สำคัญที่สุดคือ ๕) ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษา และ งานที่เป็น high-throughput ได้ [1]

ดังนั้นในระยะเวลา ๑๐ กว่าปีที่ผ่านมา มีการพัฒนาวิธีการทางวิศวกรรมแอนติบอดีต่างๆ เพื่อให้สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิจัยและพัฒนาทั่วโลกส่วนใหญ่ได้มุ่งเน้นไปในการผลิตแอนติบอดีสำหรับการรักษา (therapeutic antibody) และเพื่อใช้การตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ ด้วยการทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏ (bio-imaging) ซึ่งการวิจัยและพัฒนาเฉพาะทางด้านวิศวกรรมแอนติบอดีเพื่อการตรวจวิเคราะห์ และรักษาโรคนั้น มีมูลค่ามากกว่าหมื่นล้านบาท โดยมีผู้ลงทุนคือบริษัทขนาดใหญ่ รวมทั้งบริษัทเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ในประเทศพัฒนาแล้วทั่วโลก [5] ส่วนในประเทศไทย การวิจัยและพัฒนาทางด้านวิศวกรรมแอนติบอดีกลับมีอยู่น้อยมาก ทั้งๆ ที่เทคโนโลยีนี้เป็นเทคโนโลยีที่มีศักยภาพมาก และอาจนำมาใช้ในการวิจัยและพัฒนาทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ ของประเทศได้เป็นอย่างดี รวมทั้งจะช่วยลดทุนการผลิตแอนติบอดี สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในระยะยาวได้อีกด้วย โดยเฉพาะการพัฒนาแอนติบอดีต่อ antigen ที่มีความสำคัญในประเทศ แต่ไม่เป็นที่สนใจในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว ทั้งนี้เนื่องจากการประยุกต์ใช้แอนติบอดี ในงานด้าน bio-imaging นั้นทำได้ง่ายกว่าการประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรค ซึ่งต้องผ่านกระบวนการตรวจสอบควบคุมที่ซับซ้อน [6] โครงการวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะใช้วิธีการทางวิศวกรรมแอนติบอดี ในการพัฒนาแอนติบอดีสำหรับใช้ในงานด้าน bio-imaging

ห้องปฏิบัติการอนุเทคโนโลยีชีวภาพ ของหัวหน้าโครงการวิจัย ได้ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ (phage display technology) เพื่อการผลิตแอนติบอดีแนวใหม่มาโดยลำดับ จนถึงปัจจุบัน ห้องปฏิบัติการนี้ มีคลังเฟจที่มีคุณภาพในการแสดงแอนติบอดีมนุษย์ และสามารถผลิต recombinant antibody ต่อ antigen ได้หลายชนิดแล้ว อีกทั้งในปัจจุบันที่ห้องปฏิบัติการรวมของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้มีการติดตั้งกล้องจุลทรรศน์ confocal fluorescent microscope ที่มีคุณภาพดี ๒ เครื่อง ที่พร้อมใช้งาน จึงเป็นโอกาสอันดี ที่ข้าพเจ้าจะได้ทำการพัฒนาแอนติบอดี จากคลังเฟจที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้า ให้เหมาะสมกับงานทาง bio-imaging ทั้งเพื่อการศึกษาวิจัยเชิงลึก และการตรวจวิเคราะห์ ทางด้าน การเกษตร และทางการแพทย์ เพื่อให้ทันกับความก้าวหน้าทางวิทยาการของเทคโนโลยีนี้ โดยจะใช้วิธีการทาง antibody engineering ในการสร้างเป็นโมเลกุลแอนติบอดี ที่เสถียร สามารถผลิตได้ในปริมาณสูง จาก แบคทีเรีย ยีสต์ หรือเซลล์สัตว์ เพื่อลดต้นทุนการผลิต และให้เชื่อมต่อโดยตรงกับสารเรืองแสง เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ในงานทาง bio-imaging แบบขั้นตอนเดียว (one-step) และเพื่อรองรับเทคโนโลยี high-through put ที่จะมีขึ้นในอนาคตได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) ในการผลิตแอนติบอดีสำหรับการทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏ (bio-imaging) โดยแบ่งเป็นหัวข้อย่อยดังนี้

- 1.2.1 เพื่อสร้างแอนติบอดีให้สามารถใช้เป็นสารทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏในชั้นตอนเดียว โดยให้เชื่อมต่อกับ โปรตีนที่มีคุณสมบัติ Fluorescent หรือ Bioluminescent (recombinant bio-imaging antibody)
- 1.2.2 เพื่อพัฒนาวิธีการผลิต bio-imaging antibody ที่พัฒนาขึ้นมาได้ ในปริมาณสูง ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์ เหมาะแก่การใช้งาน จากกระบวนการแสดงออกของยีนใน แบคทีเรีย หรือ ยีสต์
- 1.2.3 เพื่อนำแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นมาได้ด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมไปใช้ทำ bio-imaging ด้วย โดยเทียบกับวิธีการมาตรฐานที่ใช้ polyclonal หรือ monoclonal antibody

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้จะทำ วิศวกรรมแอนติบอดีเฉพาะที่ได้จากคลังเฟจในรูปแบบสายเดี่ยว หรือ scFv จากห้องปฏิบัติการของหัวหน้าโครงการ จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการทำ bio-imaging กับเซลล์ หรือ โปรตีนในเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Confocal microscope ของ มทส เทียบกับวิธีการมาตรฐาน

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การทำภาพทางชีววิทยาให้ปรากฏ (bio-imaging) เป็นเทคโนโลยีที่ทำได้หลายวิธีขึ้นกับเป้าหมายที่ต้องการศึกษา และเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ เทคโนโลยีนี้ได้รับการพัฒนามากในช่วงเวลาไม่นานมานี้ เพื่อใช้ในการศึกษาสิ่งมีชีวิตได้ทุกระดับตั้งแต่ในระดับโมเลกุลองค์ประกอบในเซลล์ ระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ รวมไปถึงกลุ่มประชากร (จุลชีพ) ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาระบบของการทำงานของสิ่งมีชีวิตแบบองค์รวมที่ขึ้นกับเวลาและตำแหน่ง (spatiotemporal) ของสิ่งที่ต้องการศึกษา ณ เวลาใดเวลาหนึ่ง ซึ่งเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาตามสภาวะแวดล้อมภายนอก ซึ่งเป็นธรรมชาติขององค์ประกอบของชีวิตทุกชนิดที่ต้องการมีการปฏิสัมพันธ์ และอันตรกิริยาต่อกันตลอดเวลา เทคโนโลยี bio-imaging จึงเป็นแนวทางการศึกษาที่ใกล้เคียงความจริงในธรรมชาติที่จะช่วยเสริม หรือมาแทนที่การศึกษาแบบจำเพาะที่ละส่วน (reductionist) ซึ่งเป็นแนวทางหลักในการศึกษาทางชีววิทยาในศตวรรษที่ผ่านมา [6] ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเทคโนโลยีนี้และจะช่วยหาคำตอบทางชีววิทยาอีกหลายประการที่ยังไม่สามารถอธิบายได้ในปัจจุบัน และยังเป็นแนวทางใหม่ในการค้นหายาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นได้ในอนาคตอีกด้วย [1]

เทคโนโลยีการทำภาพทางชีววิทยาให้ปรากฏ ประกอบด้วยเทคโนโลยีที่หลากหลาย และเป็นพหุสาขา คือรวมทั้งด้าน ชีววิทยา ชีวเคมี เคมี และ ฟิสิกส์ เข้าด้วยกัน วิธีการที่ใช้ขึ้นกับโมเลกุลหรือระบบที่ต้องการศึกษา ตั้งแต่โมเลกุลที่เป็นพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด คือ โปรตีน DNA RNA ซึ่งต้องใช้เทคนิค เช่น X-ray diffraction crystallography, Magnetic Resonance, Cryo Electron Microscopy, Atomic Force Microscopy เป็นต้น ส่วนการศึกษาในระดับเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นเป้าหมายของโครงการวิจัยนี้ ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเป็นหลักในการวิเคราะห์ เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งของโมเลกุลหรืออวัยวะภายในเซลล์ที่ต้องการศึกษา ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้กันอยู่มากที่สุดในปัจจุบัน นอกจากนั้นแล้ว การแสดงภาพทางชีววิทยาของเซลล์ และเนื้อเยื่อ ยังอาจทำได้ด้วยเทคนิคอื่นเช่น

Synchrotron FTIR Sepctral Microscopy, Raman Spectroscopic เป็นต้น และท้ายสุด bio-imaging ยังรวมถึงการแสดงผลภาพสิ่งมีชีวิตเป็นระบบ ที่ซับซ้อน แบบ 3 มิติ ซึ่งต้องใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ซับซ้อน [6] ซึ่งอยู่นอกเหนือจากกรอบการวิจัยของโครงการนี้

แอนติบอดีที่เป็นปัจจัยสำคัญในงาน bio-imaging นั้น แทบทั้งหมดผลิตได้ด้วยวิธีการมาตรฐาน ทั้งที่เป็น polyclonal และ monoclonal antibody โดยส่วนแบ่งของมูลค่าการตลาดของแอนติบอดีในงานทาง bio-imaging นี้มีเป็นที่ ๒ รองจากการใช้เพื่อการรักษา อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ผลิตโดยวิธีการมาตรฐานนั้นมีข้อจำกัดหลายประการ และมีราคาสูงดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นแล้ว โครงการวิจัยนี้จึงเกิดขึ้นเพื่อใช้เทคนิควิศวกรรมแอนติบอดี ในการนำแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นด้วยเทคโนโลยีเพจไปพัฒนาต่อยอดวิธีการทางอณูชีววิทยาต่างๆชั้นสูงที่มีความก้าวหน้ามาเป็นลำดับ เพื่อการประยุกต์ใช้ในงานทาง bio-imaging ซึ่งในปัจจุบันยังมีรายความสำเร็จไม่มากนักโดยเฉพาะการวิจัยและพัฒนาในประเทศไทย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีการทำ antibody engineering นั้นค่อนข้างยากต้องใช้บุคลากร และเครื่องมือที่มีคุณภาพ อีกทั้งในทุกขั้นตอนต้องมี vector ที่มีคุณภาพในการผลิต และ/หรือ ทำวิศวกรรมแอนติบอดี ซึ่ง vector เหล่านี้ ส่วนมากไม่มีขายในท้องตลาด มักต้องพัฒนาขึ้นมาเองก่อนโดยเฉพาะ vector ที่มีคุณสมบัติที่ดี เนื่องจากแอนติบอดีส่วนใหญ่มักมีมูลค่าทางการตลาดที่สูงมากอีกทั้งกล้อง confocal fluorescent microscope ที่มีคุณภาพดี และผู้ที่มีความชำนาญในการใช้ก็ยิ่งหาได้ยากเช่นกัน

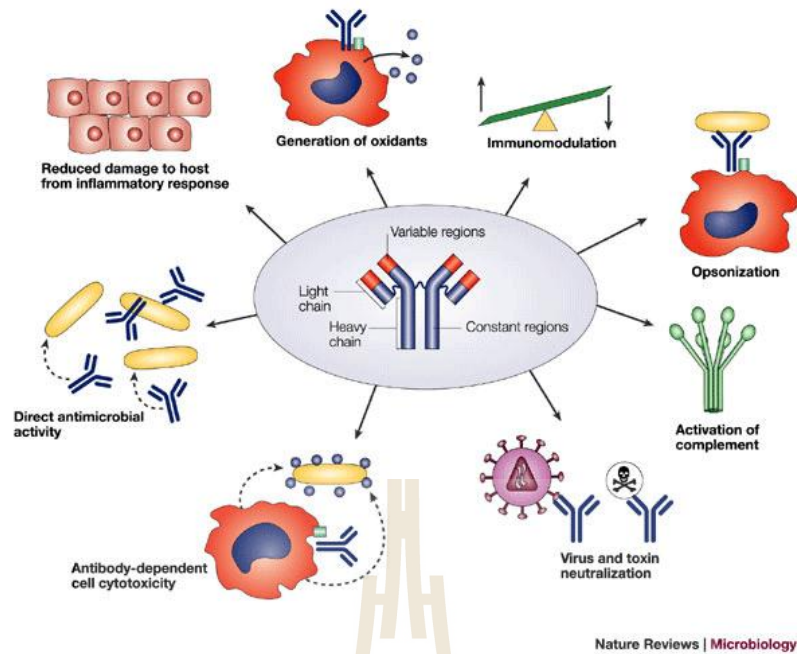
ด้วยกลุ่มงานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพบนผิวเพจของหัวหน้าโครงการได้ทำการค้นคว้าและพัฒนาเทคนิคการผลิต antibody ด้วยเทคโนโลยีเพจมาแล้วในระดับหนึ่ง จึงมีประสบการณ์มาพอควร อีกทั้งยังมีความมุ่งมั่นที่จะพัฒนาต่อยอดเทคนิควิศวกรรมแอนติบอดีแบบอื่นๆ เพื่อการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพที่หลากหลาย การประยุกต์ใช้เพื่องานด้าน bio-imaging เป็นงานที่น่าสนใจ และมีขั้นตอนสู่การนำไปใช้จริงไม่ยุ่งยากเท่าการทำแอนติบอดีเพื่อการรักษา อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ทั้งทางการแพทย์ เกษตร และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งยังสามารถรองรับเทคโนโลยีการวิเคราะห์แบบ high-throughput ที่จะเกิดขึ้นในอนาคต โครงการนี้จึงน่าจะมีช่วยในการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศให้ก้าวทันประชาคมโลก และเป็นผู้นำของอาเซียนได้ต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

แอนติบอดี (antibody) คือโปรตีนที่พบได้ในเลือด น้ำเหลือง และสารคัดหลั่งต่างๆ ในร่างกาย ของสัตว์มีกระดูกสันหลังมีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังกลไกสรุปได้ตามรูปที่ ๑ แอนติบอดีถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 โดย Emil von Behring และ Shibasaburo Kitasato [7] ซึ่งได้ทำการศึกษาทดลองและค้นพบว่าใน serum ของสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคคอตีบ (diphtheria) และ บาดทะยัก (tetanus) นั้น มีสารที่เรียกว่า “antitoxic activity” (ต่อมาได้เปลี่ยนไปใช้คำว่า antibody) ซึ่งมีความสามารถในการทำให้สัตว์ที่ไม่เคยมีภูมิคุ้มกันมาก่อนเกิดความต้านทานโรคในระยะ สั้นได้ antibody มีหน้าที่ในการไปจับกับสิ่งแปลกปลอมต่างๆที่เข้ามาในร่างกาย เช่น แบคทีเรีย ไวรัส หรือสารพิษต่างๆ เมื่อสิ่งแปลกปลอมถูก antibody จับแล้ว จะถูกทำลายความเป็นพิษ (neutralize) หรือถูกนำไปทำลายต่อด้วยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายต่อไป antibody เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกัน ในร่างกายที่เรียกว่าระบบ adaptive immune response คือเป็นระบบการตอบสนองของร่างกายโดย การสร้างภูมิคุ้มกันอย่างเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคต่างๆ ที่เข้ามาสู่ร่างกาย ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วการ ตอบสนองประเภทนี้ จะช่วยให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคในกรณีที่ได้รับเชื้อ ซ้ำอีก (protective immunity) อันที่จริงนอกจากเชื้อโรคต่างๆ แล้ว สิ่งแปลกปลอมอีกมากมายที่เข้าสู่ ร่างกายก็มีความสามารถกระตุ้นการสร้าง antibody ได้ รวมเรียกสารที่สามารถกระตุ้นให้สิ่งมีชีวิตผลิต antibody ได้ว่า antigen ซึ่งเป็นคำย่อมาจาก antibody generation

antibody มีชื่ออีกชื่อหนึ่งในทางชีวเคมีว่า immunoglobulin (หรือเรียกโดยย่อว่า Ig) เพราะ ประกอบด้วยโครงสร้างพื้นฐานคือ immunoglobulin domain ซึ่งประกอบด้วย β sheets 2 แผ่น เชื่อมต่อกันอยู่ด้วย disulfide bridge มีโครงสร้างเรียกว่า β barrel เพราะมีลักษณะคล้ายถัง antibody ในร่างกายมนุษย์มีหลายประเภท แต่มีโครงสร้างหลักที่คล้ายกันคือมีส่วนที่เป็นสายยาว heavy chain และสายสั้น light chain ในส่วนตรงปลายด้านบนเป็นส่วนที่มีความหลากหลายสูง มีหน้าที่ในการ จับกับเป้าหมายต่างๆ (antigen) ได้อย่างหลากหลายและเฉพาะเจาะจง เรียกส่วนนี้ว่า variable region หรือ V region [8]



รูปที่ ๑ กลไกการทำงานต่างๆ ของแอนติบอดีในร่างกาย [7] มีได้หลายทางตั้งแต่การจับทำลายจุลชีพก่อโรคโดยตรง (direct antimicrobial activity) ทำลายผ่านการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (antibody-dependent cell cytotoxicity) การยับยั้งไวรัสและสารพิษ (viral and toxin neutralization) กระตุ้นระบบ complement ชักนำให้เม็ดกิน ผ่านกระบวนการ opsonization รวมทั้งการช่วยปรับสมดุลการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย (immunomodulation) การกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวผลิต oxidants และช่วยการทำลายเซลล์ร่างกายจากปฏิกิริยาการอักเสบ (inflammatory response)

แอนติบอดี (antibody) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีคุณประโยชน์ต่อการค้นคว้าและวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงต่างๆ อย่างยิ่ง [9, 10] นอกจากนั้นแล้ว antibody ยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นสารตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูง [11-13] รวมทั้งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรค [11, 13-16] ทั้งนี้เพราะ antibody สามารถจับกับเป้าหมาย หรือแอนติเจน (antigen) ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นผลงานของธรรมชาติที่ผ่านการวิวัฒนาการมาหลายร้อยล้านปี หน้าที่หลักของ antibody ในสิ่งมีชีวิตคือการเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย [17] ซึ่งจากความเข้าใจในกลไกการทำงานของธรรมชาติในด้านนี้เอง จึงทำให้มนุษย์สามารถประยุกต์ใช้ความรู้ในการสร้างเป็นเทคโนโลยีการผลิต antibody ชนิดต่างๆ ซึ่งมีประโยชน์ทั้งในการศึกษาวิจัย และการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งการรักษาโรค ในขั้นต้น antibody สามารถผลิตได้จากการฉีดสาร antigen เข้าไปในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ เช่น กระจ่าง ม้า โค แพะ แล้วสกัดเอา antibody ซึ่งมีลักษณะเป็นโพลีโคลนอล (polyclonal antibody) ออกมาจากซีรัม [10] ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการผลิต antibody อีกชนิดหนึ่งคือ monoclonal antibody [18] วิธีการทั่วไปที่ใช้ในการผลิต monoclonal antibody นั้น ทำได้โดยการฉีดแอนติเจน (antigen) เข้าไปในหนูเพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อ antigen ชนิดนั้นๆ จากนั้นจึงใช้เทคนิคการสร้างเซลล์ผสม (hybridoma technology) เพื่อผลิตเป็น monoclonal antibody ชนิดต่างๆกัน เซลล์ผสมที่ถูกสร้างขึ้นให้มีความสามารถในการผลิต monoclonal antibody นั้น สามารถเก็บรักษาไว้ให้เป็น

แหล่งผลิต monoclonal antibody ที่มีเอกลักษณ์ในความจำเพาะเจาะจง (unique specificity) ได้ตลอดไป การผลิต monoclonal antibody ชนิดหนึ่งๆแต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลาานประมาณ ๔-๕ เดือนขึ้นไป และการลงทุนสูง ทั้งยังต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูง รวมทั้งยังต้องเกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองคือหนูอีกด้วย นอกจากการผลิต monoclonal antibody โดยวิธีการดั้งเดิมจะมีความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายที่สูงแล้ว ยังมีข้อจำกัดที่เกิดจากเทคโนโลยีนี้หลายอย่างเช่น ข้อจำกัดเกี่ยวกับชนิดของ antigen ที่จะใช้เพราะต้องเป็น antigen ที่ไม่เป็นพิษต่อหนูทดลอง และต้องไม่เป็น antigen ที่คล้ายกับ antigen ของหนู เช่น antigen ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในขั้นตอนของลำดับการวิวัฒนาการ (conserved antigens) หรือใช้ได้เฉพาะกับ antigen ที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ได้เท่านั้น รวมทั้งผลที่ได้จากการกระตุ้นหนูทดลองยังมีความแปรปรวนสูงขึ้นกับสุขภาพของหนูแต่ละตัว ข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือจำนวนชนิดของ antigen ที่จะใช้ในการสร้าง monoclonal antibody เพราะโดยปกติการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen แต่ละชนิดมักต้องใช้หนูทดลอง ๓-๕ ตัวขึ้นไป ในยุคปัจจุบันซึ่งเป็นยุคหลังการค้นพบลำดับยีนมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด (post-genomic era) ความสำคัญในการศึกษาวิจัยจึงมุ่งไปสู่การศึกษาการทำงานของยีนหรือโปรตีน (functional genomics หรือ proteomics) [19-25] ซึ่งการวิจัยเหล่านี้จำเป็นต้องเกี่ยวกับโปรตีนจำนวนมาก การสร้าง monoclonal antibody จำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีนหลายชนิดพร้อมๆกันโดยวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงเป็นไปได้ หรือต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

ด้วยข้อจำกัดข้างต้น จึงได้มีการพัฒนาเทคนิควิศวกรรมแอนติบอดีขึ้นมาเพื่อผลิตแอนติบอดีให้ง่ายขึ้น มีคุณสมบัติพิเศษที่ต้องการโดยไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง อาทิเช่น ได้แก่การนำ monoclonal antibody ที่ผลิตได้จากหนูไปปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมือนของมนุษย์ (humanization) [26, 27] เพื่อให้สามารถใช้ในการบำบัดโรคต่างๆ (human therapy) ปัจจุบันมี monoclonal antibody ที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายประเภทออกจำหน่ายแล้ว [28, 29] การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody เพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้นับวันจะมีความสำคัญและได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงเป็นการดีที่จะใช้เทคโนโลยีอื่นในการผลิต monoclonal antibody ที่ไม่ยุ่งยากและรวดเร็วกว่าวิธีการ hybridoma ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

เทคโนโลยีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำวิศวกรรมแอนติบอดีเพื่อผลิต antibody เพื่อการตรวจวิเคราะห์ และรักษาแนวใหม่ คือเทคโนโลยีเฟจ ซึ่งได้เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี ๒๕๓๓ [30] โดยในขั้นแรกเป็นการสร้างคลังของ antibody จากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย antigen แล้ว โดยทำการแสดงเฉพาะส่วนของ antibody ที่มีหน้าที่ในการจับคือ ส่วน Fab [31, 32] หรือสร้างเป็น antibody เส้นเดี่ยวที่มีเฉพาะส่วนที่มีหน้าที่ในการจับ เรียกว่าส่วน single chain variable fragments (form), scFv [30] ซึ่ง antibody เหล่านี้จะถูกแสดงบนโปรตีนที่ปกคลุมผิวชนิดตรง (pIII) พบว่ามีความสำเร็จจากการใช้คลังเหล่านี้ในการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen หลายชนิด [33-40] แต่ข้อจำกัดประการสำคัญของการใช้วิธีการนี้คือต้องทำการกระตุ้นสัตว์ทดลองก่อนจึงเป็นการเสียเวลา และยังเป็นคลังที่มีเฉพาะ antibody ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย antigen ที่ใช้ อย่างไรก็ตามความสำเร็จนี้นับเป็นเครื่องชี้ว่าสามารถ

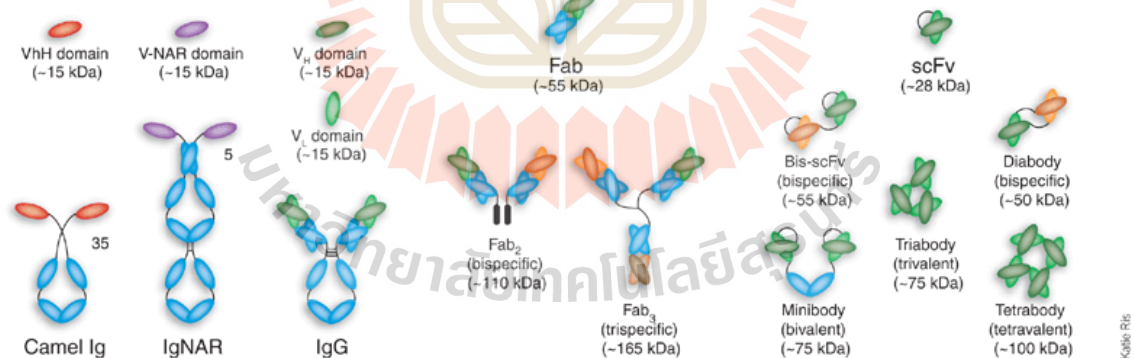
นำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวพลาสมาใช้ในการคัดเลือกและผลิต monoclonal antibody ที่มีความสามารถในการจับอย่างมีความเฉพาะเจาะจงสูงได้จริง

การพัฒนาที่สำคัญที่ทำให้การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีพลาสมาในการผลิต monoclonal antibody เป็นที่แพร่หลายและได้รับความสนใจเป็นอย่างสูงทั้งในงานวิจัยขั้นพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ 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 ที่ได้จากคลังชนิดทุติยภูมิ

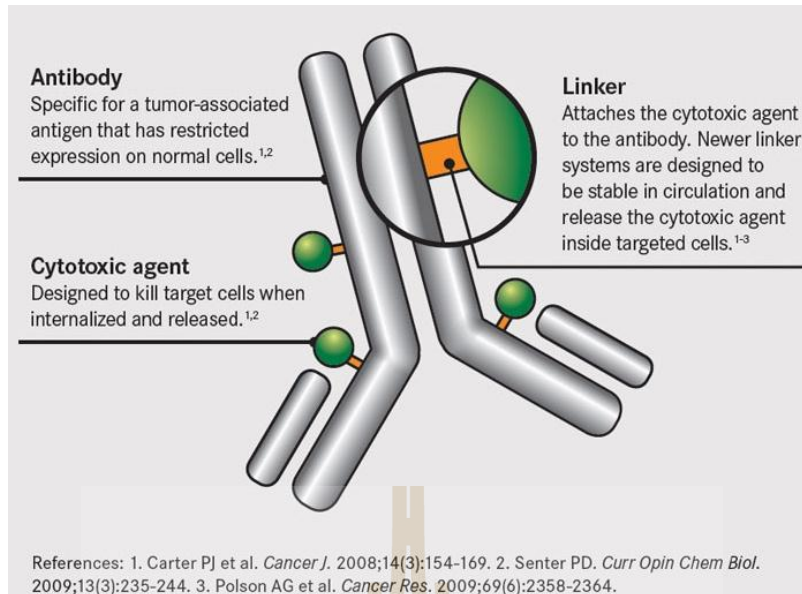
เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอีกอย่างหนึ่งที่มีประโยชน์ในการสร้าง antibody ให้มีคุณภาพสูงคือมีความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการจับสูง (high specificity และ affinity) คือการนำ antibody ที่คัดได้จากคลังมาพัฒนาเป็น monoclonal antibody ที่มีคุณภาพดีขึ้น (maturation) โดยใช้หลักการกำกับวิวัฒนาการ (directed evolution) [45, 46] ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การทำให้เกิดการกลายพันธุ์อย่างสุ่มด้วยเทคนิคทาง PCR ที่มีความแม่นยำต่ำ (error prone PCR) [47, 48] หรือการใช้เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ (DNA shuffling) [49-53] การปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งโดยการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการสร้าง antibody ที่มีความสามารถในการจับสูงมากขึ้นกว่าเดิมหลายเท่า ตัวอย่างเช่นพบที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับของ antibody บางประเภทได้ถึง ๑๐ เท่า ทำให้ได้ monoclonal antibody ที่มีความสามารถในการจับสูงถึง 10^{11} M^{-1} [54-56] ซึ่งสูงกว่าค่าที่จะได้จาก monoclonal antibody ที่ผลิตด้วยวิธีการเดิม (คือ 10^{10} M^{-1})

นอกจากการปรับปรุงคุณภาพในการจับแล้ว ยังสามารถใช้เทคโนโลยีนี้ในการปรับปรุงคุณสมบัติอื่นๆตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่นความสามารถในการทำงาน (function) ต่างๆ เช่นการกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) [57-64] หรือการใช้เป็นตัวกระตุ้นหรือตัวยับยั้ง (agonist หรือ antagonist) โปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆในเซลล์ [65, 66] นอกจากนั้นแล้วยังใช้ในการคัดเลือก antibody ที่ทนต่อสภาวะบางอย่างเช่น สภาวะกรด ด่าง หรือทนต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteinase) [67, 68] หรือที่สภาวะ reducing [48] รวมทั้งการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค (therapeutic use) [26, 69-77] หรือติดฉลาก (tag) [10, 78-82] เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ

การประยุกต์ใช้แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่สำคัญ และมีมูลค่าทางการตลาดสูงที่สุดในปัจจุบัน ซึ่งมีมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท คือการใช้สำหรับการวินิจฉัยและรักษาโรค (therapeutic antibody) จนถึงปัจจุบันมีแอนติบอดีที่ใช้ในการรักษาแล้วหลาย ๑๐ ชนิด และมีอีกหลาย ๑๐๐ ชนิดที่กำลังอยู่การทดลองทางคลินิก (clinical trial) ชั้นต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง [83] โดยรูปแบบของแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เป็นทั้งที่เป็นแอนติบอดีเต็มรูปแบบ (whole immunoglobulin) และชิ้นส่วนแอนติบอดีแบบต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ ๒ โดยชิ้นแอนติบอดีที่เป็นเฉพาะชิ้นส่วนแอนติบอดีขนาดเล็กจะประกอบด้วยส่วนของแอนติบอดีที่ยังมีความสามารถในการจับกับเป้าหมายอยู่ อาทิเช่น แบบ scFv แบบ Fab และแบบเส้นเดี่ยวที่เตรียมได้จากสัตว์ในตระกูลอูฐ และลามะ หรือปลาฉลาม [84] ข้อดีของแอนติบอดีชิ้นเล็กนี้คือ ผลิตได้ง่ายด้วยระบบการผลิตโปรตีนในแบคทีเรียหรือ ยีสต์ สามารถถูกดูดซึม และเข้าไปยังเซลล์เป้าหมายได้ดีกว่า อีกทั้งยังสามารถปรับแต่งพันธุกรรมให้มีคุณสมบัติเพิ่มขึ้นที่น่าสนใจได้อีกหลากหลาย อาทิเช่น ให้เชื่อมกับสารเรืองแสง หรือเอนไซม์ ทำให้เป็น bi- หรือ tri-specific (multimeric) antibody หรือให้เชื่อมกับยาหรือสารเคมีต่างๆ เพื่อการรักษาโรค เป็นต้น [85] เรียกแอนติบอดีรูปแบบเหล่านี้ว่า conjugated antibody ซึ่งอาจเชื่อมต่อกับ toxin หรือสารเคมีที่มีฤทธิ์ยังยั้งการทำงานของเซลล์ (cytotoxic agents) เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง ดังแสดงในรูปที่ ๓ งานวิจัยล่าสุดที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้คือรายงานการใช้แอนติบอดีจากลามะ ซึ่งเป็นแอนติบอดีสายเดี่ยวที่สามารถจับและทำลายเชื้อ rotavirus ไปแสดงออกในข้าว ทำให้ได้ผลผลิตเป็นเมล็ดข้าวที่มีแอนติบอดี ซึ่งจากการค้นคว้าวิจัยพบว่า หนูที่บริโภคนข้าวที่มีแอนติบอดีอยู่นี้ สามารถต้านทานการติดเชื้อ rotavirus ซึ่งทำให้เกิดโรคท้องร่วงรุนแรงและเฉียบพลันในเด็กได้ [86] ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าอาจนำข้าวชนิดนี้ไปใช้ป้องกันการเจ็บป่วย และตายด้วยโรคท้องร่วง ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในประเทศยากจนได้ดี



รูปที่ ๒ ภาพแสดงโครงสร้างชิ้นส่วนแอนติบอดีแบบต่างๆ [84] ในภาพแสดงแอนติบอดีแบบเต็มรูป ชนิด IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (IgG), ของสัตว์ตระกูลอูฐและลามะ (Camel Ig) และของปลาฉลาม (IgNAR) และลักษณะชิ้นส่วนของแอนติบอดีรูปแบบต่างๆ ได้แก่ แบบ Fab scFv ชิ้นส่วนโดเมนเดี่ยว (single-domain VH) รูปแบบต่างๆ คือ VH VhH และ V-NAR รวมทั้งชิ้นแอนติบอดีที่ประกอบจากหลายโมเลกุล (multimeric antibody) ได้แก่ bi-scFv diabodies triabodies และ tetrabodies



http://www.onclive.com/_media/_upload_image/ADC-elements-large.jpg

รูปที่ ๓ ส่วนประกอบต่างๆ ของ Antibody-Drug Conjugate (ADC) สำหรับรักษาโรคมะเร็ง ได้แก่ ๑) แอนติบอดีต้องจำเพาะกับ antigen ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง ซึ่งไม่มี หรือมีจำกัดในเซลล์ปกติ ๒) มีสารสำหรับทำลายเซลล์ (cytotoxic agent) เพื่อฆ่าเซลล์มะเร็งหลังจากถูกนำเข้าไปภายในและถูกปลดปล่อยออกมา ๓) ตัวเชื่อม (linker) ระหว่าง cytotoxin agent และ antibody โดยตัวเชื่อมใหม่ๆ จะถูกออกแบบให้คงทนเมื่ออยู่ในระบบไหลเวียนในร่างกาย แต่จะปลดปล่อยสารพิษต่อเซลล์เฉพาะเมื่อเข้าไปในเซลล์แล้ว

ในส่วนรายงานด้านการสร้าง recombinant antibody ให้เชื่อมต่อกับ fluorescent หรือ bioluminescent นั้นยังมีอยู่น้อยมาก โดยในกรณีของการเชื่อมกับ fluorescent นั้น ปัญหาสำคัญคือ การสร้างเป็นโครงสร้างโปรตีน fluorescent ที่สามารถเรืองแสงได้นั้น ต้องการสภาวะ reducing ภายในเซลล์ แต่แอนติบอดีต้องถูกหลั่งออกมานอกเซลล์จึงจะรวมตัวเป็นโครงสร้างที่ทำงานได้ [87] อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีรายงานการใช้วิธีการวิศวกรรมแอนติบอดีด้วยการตัดต่อแอนติบอดีส่วน CDR3 ลงไปในโครงสร้างโปรตีน GFP โดยตรงและพบว่าแอนติบอดียังสามารถจับกับเป้าหมายได้ แต่วิธีการนี้ค่อนข้างยากและอาจไม่สามารถใช้กับแอนติบอดีทุกชนิด โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องใช้ CDR1 และ CDR2 ในการจับกับเป้าหมาย [88] นอกจากนี้แล้วยังได้มีการพัฒนาตัวเชื่อมต่อ bioluminescent ประเภท flavin mononucleotide based fluorescent proteins (FbFPs) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ online แต่ยังไม่ได้นำมาใช้งานในลักษณะ bio-imaging [89] และยังมีตัวอย่างการใช้จำกัดอยู่ อย่างไรก็ตามตัวเชื่อมแบบ FbFPs นี้มีข้อดีเหนือ green fluorescent protein หลายประการ อาทิเช่น ทนต่อความเป็นกรดต่าง (pH 4-11) และอุณหภูมิ (ถึง 60°C) ไม่ต้องการ oxygen และสามารถเรืองแสงได้ไว [90] ระบบนี้จึงน่าสนใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ให้กว้างขวางยิ่งขึ้นในอนาคต [87]

บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

3.1 การผลิต และการวิเคราะห์ด้วย recombinant antibody ในรูปแบบ scFv-GFP

สารเคมี ชีววัตถุ และวิธีการทดลอง

Construction of expression vector for the production of fluorescent antibody conjugates

To construct of pWS-Green vector containing Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP), the EmGFP gene from pSERT/EmGFP (Invitrogen, USA) was amplified by PCR technique using two primers (EmGFPNcoIEcoRINotIFW: 5'-CTG TGC CCA TGG GAA TTC AAG CTT GCG GCC GCA GGT GGC GGA GGG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG-3' and EGFPFlag6HisXhoIRv: 5'-GCA CAG CTC GAG CTA GTG GTG GTG GTG GTG CTT GTC GTC ATC GTC TTT GTA GTC CCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3' in which containing the NcoI and XhoI restriction sites, respectively. And then the amplified product was digested with NcoI and XhoI, ligated into the expression vector pET15b which was cut using the same restriction enzymes. This resulted in the overexpression plasmid pWS-Green encoding C-terminal 6xHis and FLAG tagged recombinant EmGFP for further purification. The DNA sequence of the construct was confirmed by automated DNA sequencing (Macrogen, Korea).

Cloning and expression of scFv-EmGFP fusion proteins

To clone of IRA7c-scFv, 3E3-scFv and yZA8B2-scFv antibodies into pWS-Green, the scFv antibody genes were digested with the NcoI and NotI restriction enzymes and ligated into digested pWS-Green. This resulted in the expression vector scFv-pWS-Green encoding scFv linked EmGFP protein via (G)₄ linker and followed by 6xHis tag that easy to purify the recombinant protein. The fused protein is under control of T7 promoter and could be induced for the overexpression using IPTG. The DNA sequence of the constructs was determined with automated DNA sequencer.

To produce the scFv-EmEGP fusions, the pWS-Green vectors containing scFv genes were transformed into *E. coli* strain SHuffle B (*E. coli* C3029 (B cell)), Shuffle K12 (*E. coli* C3026 (K12)) (New England Biolabs, USA) and BL21 (DE3) to evaluate a suitable expression host. The fusion proteins were expressed according to a previously published method [91] with some modifications. A single colony of each *E. coli* harboring recombinant plasmid was inoculated in 5 ml LB media containing 100 µg/ml of ampicillin and cultured at 30 °C with shaking 250 rpm for overnight. Four mL of overnight culture were used to inoculate 400 ml of LB medium containing 100 µg/ml of ampicillin next day. Cells were cultured at 30 °C to OD₆₀₀ = 0.6, followed by induction

by adding 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 25°C for 16 h before harvesting the cells. The level of the Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP)-expressing *E. coli* was determined by a CytoFLEX S flow cytometer (Beckman Coulter, Germany) with 488 nm excitation and 523 emission wavelengths and the data were analysed using the Kaluza 1.2 software program (Beckman Coulter). For a control, the pET27b harboring scFv gene was also expressed in the same time for comparison of binding activity.

Purification of scFv-EmGFP fusion proteins

The cell pellets were harvested by centrifugation at 8000 rpm for 10 min, which were re-suspended in binding buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl and 20 mM imidazole, pH 7.9) with 1 mg/ml lysozyme. Cells were disrupted by intermittent sonication at 25% amplitude for 7 min on ice using 30s pulse and 30s break for cooling after adding 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The cell debris was removed by centrifugation at 15,000 x g for 20 min at 4°C, and the clear supernatant was applied directly into Ni-NTA column, pre-equilibrated with binding buffer. The column was washed with binding buffer. Finally, the fusion protein was eluted with elution buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl and 250 mM imidazole, pH 7.9). Fractions containing scFv-EmGFP fusion protein were pooled and exchanged by dialysis into PBS buffer, respectively at 4°C. The samples were collected and kept at 4°C. The soluble fraction and purity of the samples were assessed by denaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The purified protein were determined by Bradford method (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Gel electrophoresis and western blot analysis

The purified fusion proteins were analyzed by 12 % SDS-PAGE. Protein bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue R-250 (BioRad) [92]. The Precision Plus Protein Standard (10-250 kDa) from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, USA) was used as a molecular weight marker. Western blot was analyzed according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad Laboratories, USA). The proteins were electroblotted to PVDF membrane at 100 volts for 1.5 h at 4°C. Subsequently, the membrane was blocked for 1 h with 2% skim milk in 1xPBS (MPBS) at 4°C for overnight. The membrane was then washed 3 times with 1xPBS by rocking at room temperature for 1 min each time. After HisProbe-HRP conjugate (1:5000; ThermoFisher Scientific, USA) incubation for 1 h, the membrane was washed again. Finally, the protein target was visualized using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, USA).

Conventional ELISA

The fused IRA7c-scFv-EmGFP antibody was confirmed the binding activity by ELISA [93] For the bind activity of 3E3-scFv-EmGFP and yZA8B2-scFv-EmGFP were performed according to a previously published method [94-95]

Fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA)

Binding activity of each fusion antibodies was determined by FLISA that was modified from ELISA method . A black Nunc-Immuno 96 well plates were coated with 1 μg of AFB1-BSA in 1xPBS (3E3-scFv-EmGFP), 1 μg of ZEN-BSA in 1xPBS (yZA8B2-scFv-EmGFP), 0.1 IU of rabies virus vaccine 100 mM NaHCO₃, pH 8.5 (IRA7c-scFv-EmgFP). In this experiment, 1% BSA was used as a negative control. After incubation at 4 °C overnight, the plates were blocked with 2% MPBS at room temperature for 1 h, followed by washing 3 times with PBS. Fifty microliters of 4% MPBS and 100 μL of each fusion antibodies were added to each well and incubated at room temperature for 1 h. The wells were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST) and twice times with PBS. Finally, 100 μl of PBS were added into the plates. The fluorescence intensity was measured by a fluorescent microplate reader (ThermoFisher Scientific, USA). The excitation and emission wavelengths were 478-484 and 560-509 nm, respectively.

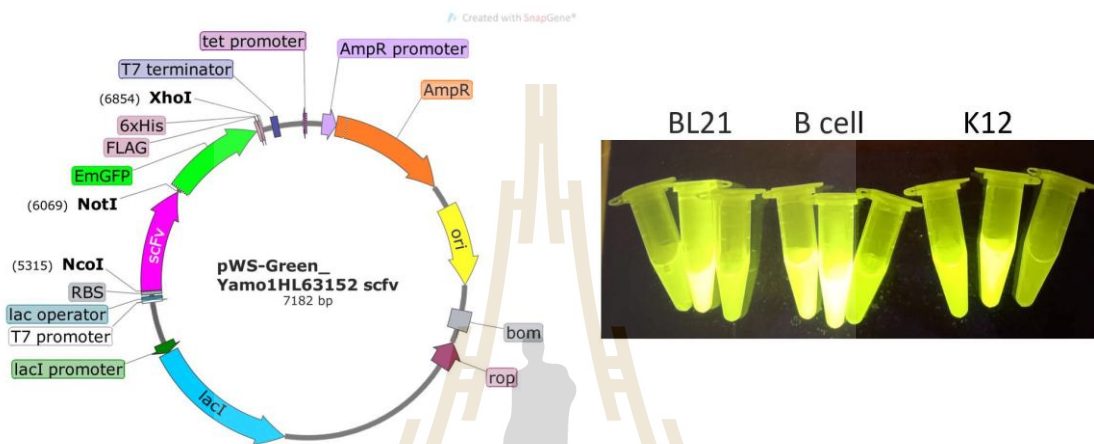
Competitive FLISA

To confirm the yZA8B2-scFv-EmGFP fusion antibody that can bind to free ZEN by competitive FLISA, inhibition FLISA was developed to determine the sensitivities and specificities of the yZA8B2-scFv-EmGFP fusion antibody. Two μg of ZEN-BSA, ZEN-OVA and ZEN-KLH were coated on a black Nunc-Immuno 96 well plate. The different yZA8B2-scFv-EmGFP dilutions were pre-incubated with varying concentrations of soluble ZEN. After incubation at 37 °C with shaking 300 rpm in dark for 30 min, the mixture was transferred to the coated plate and incubated for 1 h. The unbound antibodies were washed away 3 times with 0.05% PBST and 2 times with PBS. The wells were added 100 μl of PBS and measured the fluorescent signal with an excitation peak at 487-484 nm and an emission peak at 506-509 nm.

ผลการทดลอง

ผลแสดง Construction and expression of 152-GFP fusion protein.

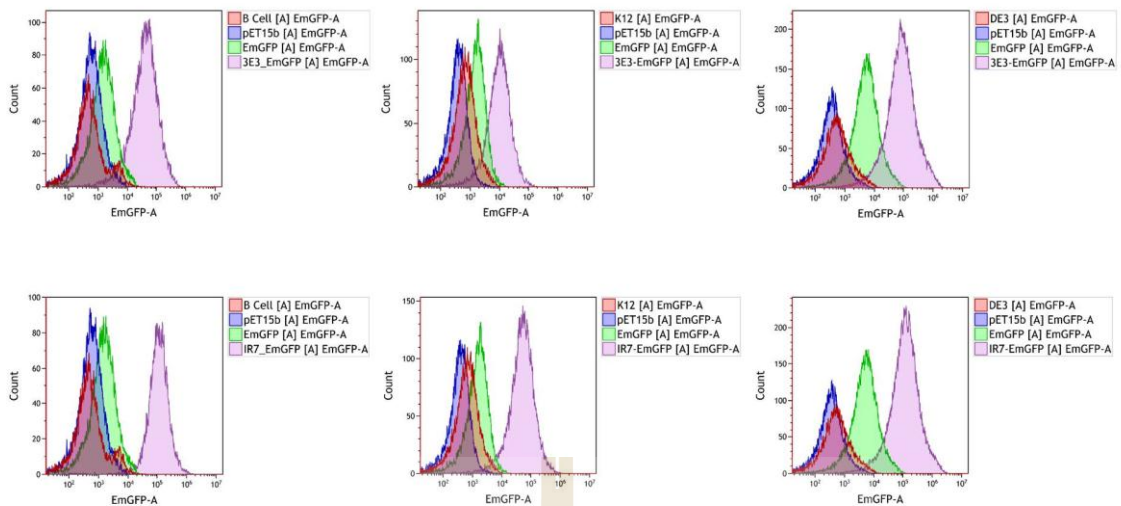
The scFv gene of clone 152 was subcloned into pWS-Green vector at NcoI and NotI restriction site and then these recombinant vector was transformed into various expression host including *E.coli* strain BL21(DE3), Engineered Shuffle B cell, and engineered *E. coli* K12. The scFv-GFP fusion protein was purified by HisTrap affinity column. The purified scFv-GFP proteins were observed under black light box.



รูปที่ ๔ เวกเตอร์ในการผลิต scFv-GFP และการผลิต scFv-GFP ในแบคทีเรียต่างๆ เวกเตอร์ pWS-Green-HL63152 (ซ้าย) ที่นำไป transform เข้าสู่ *E.coli* strain ต่างๆ (ภาพขวา) เพื่อผลิตเป็น scFv-GFP โคลน 152 ซึ่งจับแบบจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ผลแสดง Flow cytometry analysis of three *E. coli* (B cell, K12 and DE3) expressing scFv-EmGFP, EmGFP alone and pET15b by induction IPTG.

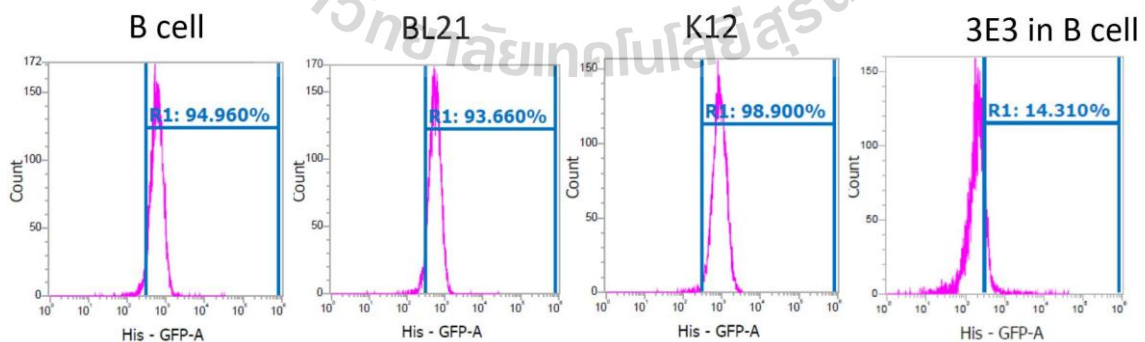
The scFv-GFP clone 3E3 and IR7 were expressed in *E.coli* strain B cell, K12 and DE3. The result show that the high intensity of expression level of scFv-emGFP were shown when expressed in the *E.coli* strain B cell and DE3 (pink peak). However, the emGFP alone are shown high intensity expression level in *E.coli* strain DE3 (Green peak) Therefore, it can conclude that the *E.coli* strain B cell is suitable for scFv-GFP expression as shown in Figure 5.



รูปที่ ๕ ผลการวิเคราะห์การผลิต scFv-GFP ใน *E.coli* strain ต่างๆ ด้วย Flow cytometer เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* strain B cell K12 และ DE3 (สีแดง) เวกเตอร์ pET15b ที่ถูก transform เข้าสู่ *E.coli* strain B cell K12 และ DE3 (สีน้ำเงิน) เวกเตอร์ pET15b ที่มียีน emGFP (สีเขียว) เวกเตอร์ pET15b ที่มียีน scFv-emGFP โคลน 3E3 (ภาพบน) และ IR7 (ภาพล่าง) ทั้งหมดถูก induction ด้วย IPTG และวิเคราะห์ผลการผลิต scFv-GFP ด้วย Flow cytometer

ผลแสดง Flow cytometry analysis of 152-GFP fusion protein against HL-60 target cells.

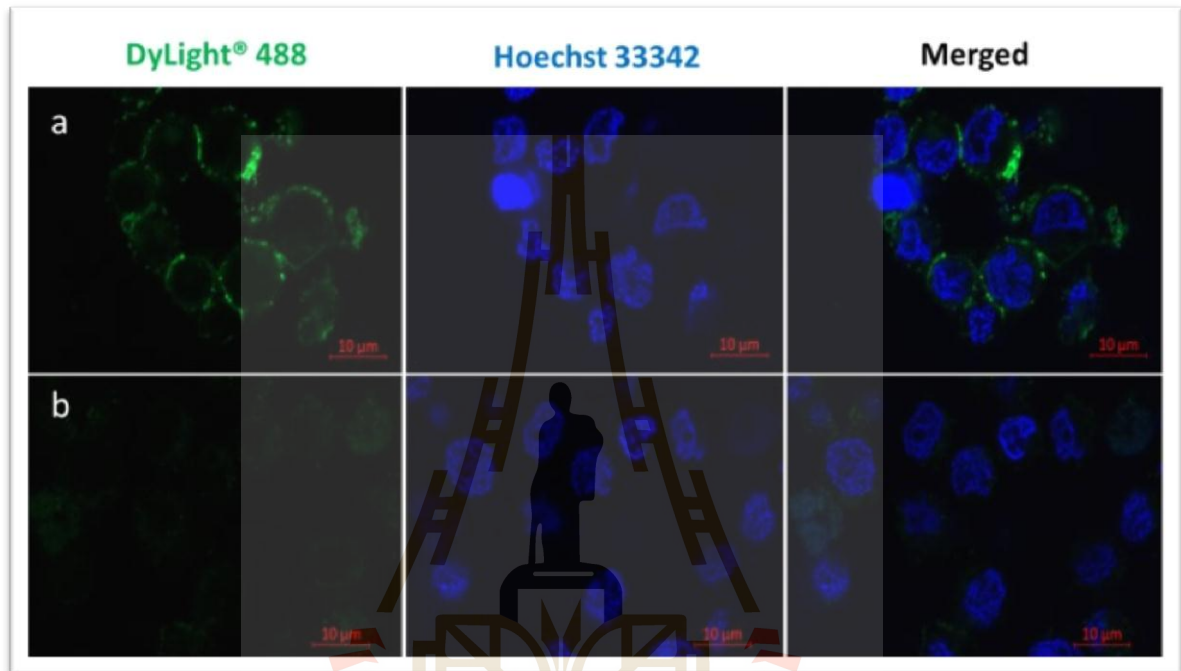
The purified scFv-GFP antibodies that produced by different expression hosts were tested binding activity by flow cytometry. The result showed that the binding activity of different hosts did not affect the binding to HL-60 target cells. 3E3 was used as an isotype control.



รูปที่ ๖ ผลการใช้ scFv-GFP โคลน 152 ที่ผลิตใน *E.coli* strain ต่างๆ ในการวิเคราะห์การจับกับเซลล์มะเร็ง ด้วย Flow cytometer

ผลแสดง Fluorescent staining of 152 scFv antibody to HL-60.

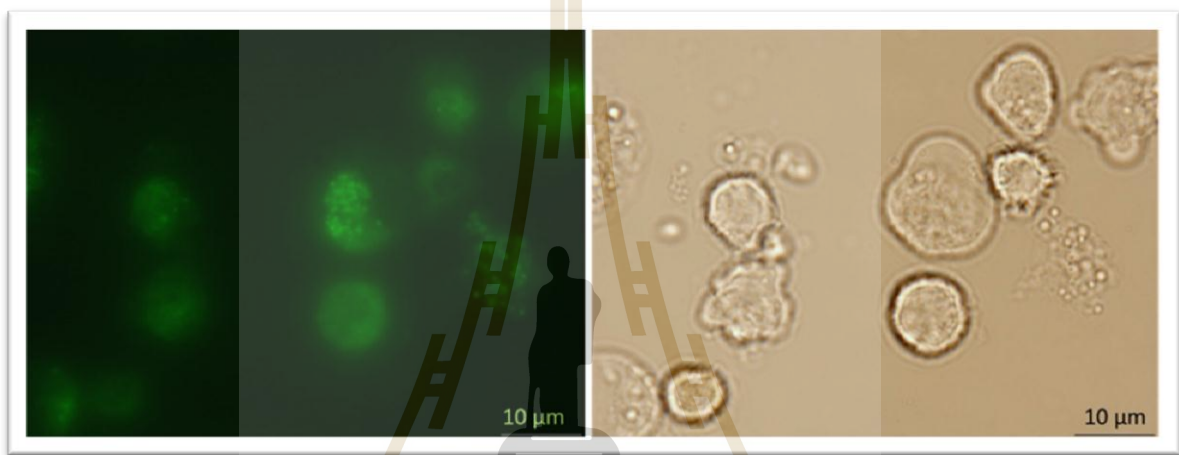
The HL-60 cells were stained with (a) 152 scFv antibody and (b) isotype control then cells were visualized under confocal microscope. The green signal was from anti-His dylight 488 (a secondary antibody). The blue signal was from DNA staining by Hoechst 33342. The exposure time and laser intensity were fixed in order to compare the signal between scFv and isotype control. The scFv antibody can bind to cell surface of HL-60.



รูปที่ ๗ ผลการวิเคราะห์ scFv-GFP โคลน 152 ในการจับกับเซลล์ HL60 ด้วย confocal microscope

ผลแสดง Fluorescent microscope showing the *in vitro* endocytosis of 152 scFv-EmGFP to HL-60 cells.

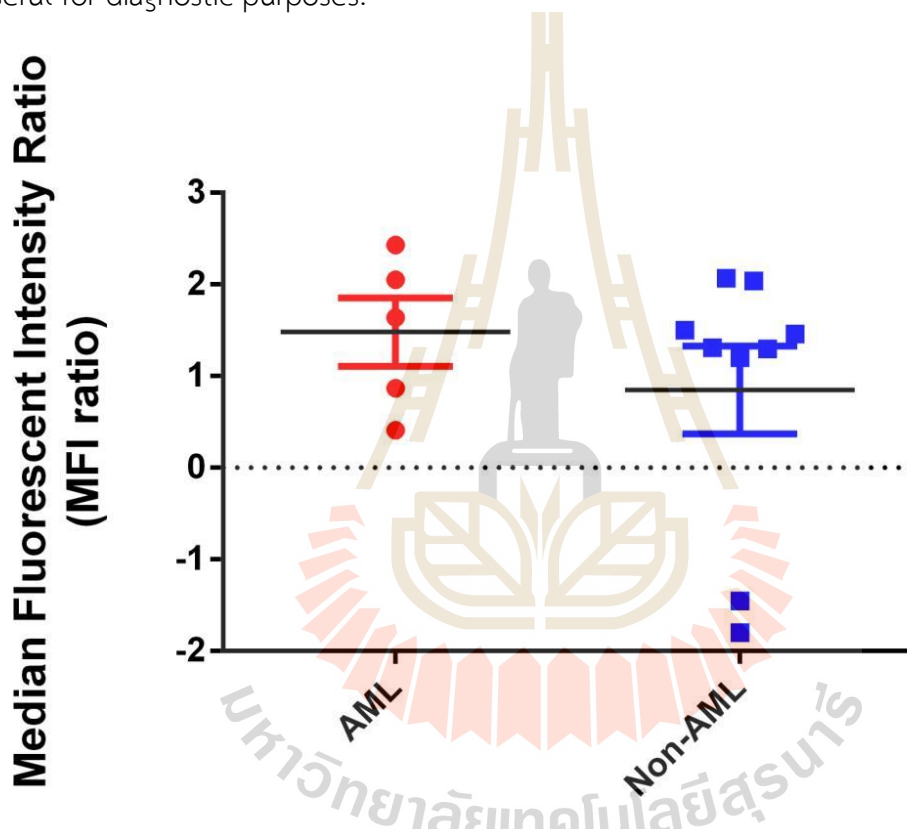
HL-60 cells were incubated for 2 h with 152 scFv-EmGFP fusion protein. Cells were observed under fluorescent microscope using GFP channel (left) and showed fluorescent signal (green dots) inside the cells. The bright field channel of the microscope (right) showed cells shape which comparable to fluorescent microscope. So, it demonstrated that scFv-GFP can internalize into the cell. This will be useful for drug delivery applications.



รูปที่ ๘ ผลการวิเคราะห์ scFv-GFP โคลน 152 ในการจับกับเซลล์ HL60 ด้วย Fluorescent microscope

ผลแสดง Flow cytometry analysis of 152-GFP to patient derived samples.

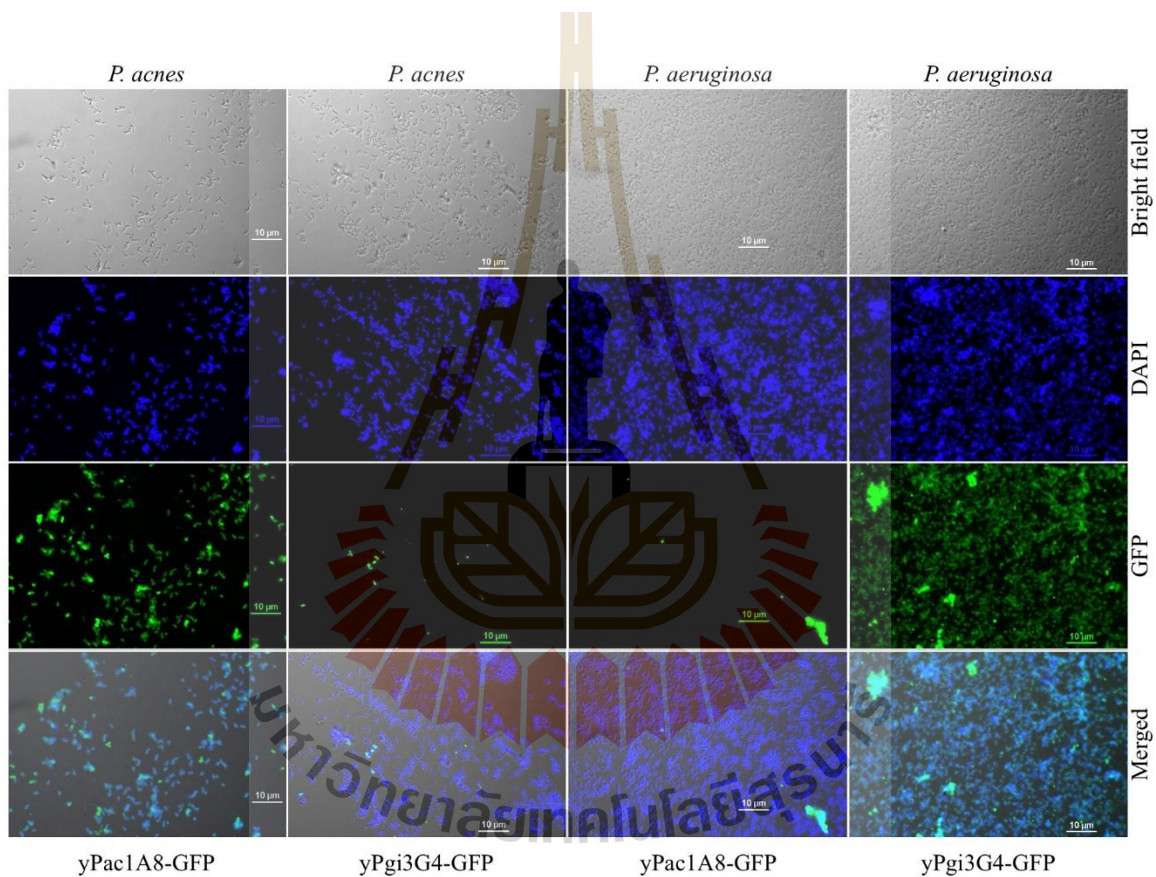
Bone marrow mononuclear cells of AML patients and non-AML patients were stained with 152-GFP antibody and analyzed by flow cytometer. Cells were gated by FSC-A and SSC-A. The gated cells were subsequence gated based on CD45-APC and SSC-A. The cell population were further acquired against 152-GFP. Median fluorescent intensity (MFI) ratio of AML bone marrow samples and non-AML leukemia bone marrow were plotted mean \pm SEM. The result demonstrated that the MFI ratio of 152-GFP in AML patient samples showed higher than Non AML samples. Therefore, it might be useful for diagnostic purposes.



รูปที่ ๙ ผลการวิเคราะห์ scFv-GFP โคลน 152 ในการจับกับเซลล์มะเร็ง AML ที่ได้มาจากเลือดคนไข้ ด้วย Flow cytometry

ผลแสดง Confocal microscopy of *Propionibacterium acnes* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Planktonic cells of *P. acnes* DMST 14916 and *P. aeruginosa* DMST 37186 were incubated with yPac1A8-GFP and yPgi3G4 scFv-GFP as indicated in the figure and counterstained with DAPI. In bright field panel, bacterial cells are seen. In DAPI panel, nucleoids of bacteria are blue. In GFP panel, *P. acnes* cells are stained green with yPac1A8-GFP and *P. aeruginosa* cells are stained green with yPgi3G4-GFP. Photos were taken by Plan Apo oil immersion objective of Nikon A1R confocal laser microscope at 100x magnification. Scale bars represent 10 μ m. The result demonstrated that the scFv antibody can bind to their own target in cultured bacteria.



รูปที่ ๑๐ ผลการวิเคราะห์ yPac1A8-GFP ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ด้วย Confocal microscopy

3.2 การผลิต และการวิเคราะห์ด้วย recombinant antibody ในรูปแบบ scFv-6xHis

จากผลการวิจัย ในขั้นตอนที่ ๑ ผู้วิจัยพบว่าแม้ recombinant antibody ในรูป scFv-GFP จะสามารถใช้ในการตรวจทำ bioimaging ได้เป็นอย่างดี แต่มีปัญหาในทางปฏิบัติเมื่อนำไปส่องด้วยกล้อง fluorescent confocal microscopy คือ สีสัญญาณสีเขียวจางเร็วมาก เนื่องจากแสง laser จากกล้องมีความเข้มสูง ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาการทำ bioimaging แบบ ๒ ชั้นแทน โดยผ่าน 6xHistidine เนื่องจากมีผู้พัฒนาตัวจับต่อ 6xHis อยู่แล้วหลายรูปแบบ ผลการวิจัยพบว่าได้ผลดี สามารถนำมาใช้ตรวจดูเซลล์ได้ โดยในการวิจัยนี้ได้ใช้เซลล์ แบคทีเรียหลายชนิดเป็นตัวอย่างแสดงประสิทธิภาพ มีรายละเอียดการดำเนินการวิจัยดังนี้

สารเคมี สารชีววัตถุ และวิธีการทดลอง (Materials and Methods)

Bacterial strains

Biopanning targets; *Propionibacterium acnes* DMST 14916 and *Pseudomonas aeruginosa* DMST 37186, were kindly provided by Dr. Griangsak Eumkeb, School of Sciences, Suranaree University of Technology, Thailand. Species identity of both strains were confirmed by 16S rRNA gene sequencing at Macrogen, Inc., South Korea. *Propionibacterium acnes* strains DSM 1897, DSM 16379, DSM 30738, DSM 30753 and DSM 30919 were kindly provided by Professor Dietmar Haltrich, Department of Food Science and Technology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna. *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Pseudomonas putida* TISTR 1522, and *Pseudomonas aeruginosa* strains TISTR 357, TISTR 781 and TISTR 1287 were purchased from Thailand Institute of Scientific and Technological Research. *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 442 and *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1101 were kindly provided by TISTR for academic research purpose. TG1 strain *Escherichia coli* and HB2151 strain *E. coli* were obtained from Medical Research Council (MRC) Laboratory, Cambridge, UK. SHuffle T7 B strain *E. coli* (NEB#C3029J, U.S.A) was purchased from New England Biolabs, U.S.A. The source of materials used were described elsewhere.

Affinity selection (biopanning) against *P. acnes* and *P. aeruginosa*

Biopanning antigen preparation

P. aeruginosa colonies were grown on LB broth and incubated overnight at 250 rpm, 37°C; while, *P. acnes* colonies, were cultured in BHI broth and incubated for 5 days at 37°C anaerobically in a GasPak system. Bacterial cells were washed with PBS two times and resuspended in PBS at the OD600 of 2.0. Cell suspensions were boiled for 1 h

in a water bath and protein concentration was determined by Bradford standard microtiter plate assay (BioRad#500-0006, California, U.S.A).

Biopanning procedure

Biopanning was carried out according to previously published protocol [87]. Maxisorp immunotube (Nalgene Nunc International, Denmark) was coated overnight at 4°C with 25 mg of boiled bacterial antigen in 100mM NaHCO₃ (pH8.5). The tube was blocked with 2% (w/v) skimmed milk protein in phosphate buffer saline (PBSM) before incubation with 1012 plaque forming units (pfu) of phage from Yamo I human phage display scFv library [88] in 2% PBSM. The tube was washed 5 times with 0.05% (v/v) Tween-20 in PBS (PBST), followed by 5 times with PBS. Then, the bound phages were eluted with 1 ug/ μ L of trypsin in PBS followed by 100 mM glycine-HCl (pH 2.0), and neutralization with 200 mM NaPO₄ (pH7.5). For the second and third round, eluted phages were pooled together, amplified, and purified by PEG precipitation as previously described [94].

Amplification of individual phage clone

Discrete colonies of *E. coli* TG1, infected with eluted phages from biopanning were randomly picked and cultured in U-shaped 96-well microplates (Nunclon delta surface, Thermo Fisher Scientific#163320, U.S.A), containing 100 μ L/well of 2xYT medium with 100 mg/mL ampicillin and 1.0% (w/v) glucose (2xYT-AmpGlu). The cultures were super-infected with helper phage KM13 to amplify the isolated phage as previously explained [95]. After incubation at 30°C with shaking at 250 rpm for 20 h, the phage containing supernatant, obtained after centrifugation of a deep-well plate, was used for monoclonal phage ELISA as described in the ELISA section.

DNA and amino acid sequence analysis of selected phage clones

Phagemids from selected ELISA-positive phage clones were prepared and sent for automated DNA sequence analysis as previously described [90]. Contig alignment of the sequences was performed using Vector NTI software (Thermo Fisher Scientific, U.S.A) and the aligned sequences were further analyzed with IgBLAST tool from National Center for Biotechnology Information [96] and IMGT/V-QUEST tool from international ImMunoGeneTics information system [97]. Three-dimensional structures of selected scFv

were generated by using SWISS-MODEL server from Swiss Institute of Bioinformatics [98] and PyMOL molecular visualization system from Schrödinger, LLC, U.S.A [99].

Small-scale production of soluble scFv from *E. coli* HB2151

Soluble scFv clones were produced from non-suppressor strain *E. coli* HB2151, which read the amber codon between scFv and genIII protein gene sequences in phagemid vector as a stop codon instead of glutamic acid in TG1 strain, as previously described [100]. The culture supernatant containing soluble scFv fragments was used for scFv ELISA against biopanning bacterial antigen as described in the ELISA section.

Production of hexa-histidine-tagged scFv (6xHis-tagged scFv)

Cloning and expression of scFv genes

The scFv genes against *P. acnes* and *P. aeruginosa* were cloned into pET-21d (+) expression vector and designated as pET21d+/yPac1A8 and pET21d+/yPgi3G4, respectively, as previously described [95]. The scFv genes were expressed in the cytoplasm of protease deficient *E. coli*, SHuffle T7 B strain (NEB#C3029J, U.S.A), according to previous publications [91, 102] with some optimization. Briefly, a colony streaked from -80°C stock of SHuffle *E. coli* C3029 harboring pET21d+/yPac1A8 or pET21d+/yPgi3G4 was inoculated into 5mL of Terrific Broth (TB: Tryptone 12g/L, yeast extract 24g/L, glycerol 4mL/L, 0.17M KH₂PO₄, and 0.72M K₂HPO₄) containing 100 mg/mL ampicillin and incubated overnight at 30°C with 225 rpm shaking. On the next day, a starter culture was transferred into 500 mL of fresh TB containing 100 mg/mL ampicillin and cultured at 30°C in a bench-top bioreactor system or in a baffled flask with 225 rpm shaking until OD₆₀₀ reached about 1.0. Protein expression was induced with 0.85 mM IPTG for 24 h at 25°C. The culture was cooled down on ice for 5 min and centrifuged at 3000g for 30 min at 4°C. The cell pellet was used directly for scFv purification or otherwise stored at -40°C.

Purification of hexa-histidine-tagged scFv

The 6xHis-tagged scFv was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC), using a gravity flow column containing Ni-NTA (Ni²⁺ nitrilotriacetic acid) agarose affinity chromatography matrix, following the company's manual (Qiagen#30230, Germany). The resin was washed with washing buffer (50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 100

mM imidazole, pH7.5) and scFv was eluted with elution buffer (50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH7.5). Desalting and buffer exchange was performed by dialysis overnight in SnakeSkin Dialysis Tubing with 10KDa MWCO (Thermo Fisher Scientific#68100, U.S.A) against cold PBS buffer at 4°C. Purity of eluted scFv was checked by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the purified soluble scFv concentration was determined by Bradford standard microtiter plate assay (BioRad#500-0006, California, U.S.A). The samples were kept at -80°C in 250 mg/mL BSA or at -40°C in 20% glycerol.

Western blot (WB) Analysis

WB of isolated scFv

Equal amount (1mg) of purified scFv (yPac1A8 and yPgi3G4) were heat-treated at 90°C for 10 min in SDS sample buffer containing β -mercaptoethanol. Then, samples were electrophoresed in 12.5% SDS-PAGE gel for 5 min at 50V followed by 90 min at 100V and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Cytiva#10600021, USA) by wet-blotting using Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Biorad#1703930, U.S.A) at 30V for 15 h at 4°C. To detect the scFv, the membrane was incubated with 10 mL of anti-histidine antibody-gold nanoparticle conjugate (Jena Bioscience# PS-110, Germany) for 3 h at room temperature with slight rocking. The scFv bands became visible to naked-eyes due to antibody mediated gold nanoparticle accumulation.

WB of bacterial targets using identified 6xHis-tagged scFv

About 30 mg of biopanning antigen preparation (*P. acnes* and *P. aeruginosa*) were used as samples. The SDS-PAGE and wet-blotting procedures were the same as above. After blocking with 3%BSA-TBST, the membrane was incubated in 2 mg/mL of 6xHis-tagged scFv (yPac1A8 and yPgi3G4) in TBST for 15 h at 4°C, followed by washing 3 times with TBST, 5 min each. It was then incubated with 1:5000 diluted HisProbe-HRP (a nickel (Ni²⁺)-activated derivative of horseradish peroxidase (Thermo Fisher Scientific#15165, USA) in blocking buffer for 1 h at room temperature with slight rocking, followed by washing 3 times with TBST. Finally, the protein band was detected by chemiluminescence, using Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare#RPN2232, UK). Image analysis was performed by CCD camera-based imaging, using ChemiDoc XRS Gel Documentation System (Bio-Rad, USA).

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Monoclonal phage ELISA

For phage ELISA, 5 mg of biopanning bacterial antigen in 100mM NaHCO₃ (pH8.5) was used as target and 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS as negative control. The phage ELISA was performed as previously described [102]. Phage clones which showed OD value of at least two times higher than those of negative control were selected for confirmation.

scFv ELISA against biopanning bacterial antigen

For scFv ELISA, 2 mg of biopanning bacterial antigen in 100mM NaHCO₃ (pH8.5) was used as target and 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS as negative control. Supernatant containing soluble scFv fragments (150 mL/well) was used as primary detection agent. HisProbe-HRP (Thermo Fisher Scientific#15165, USA) diluted at 1:5000 in PBS was used as secondary detection agent. The ELISA procedure was the same as monoclonal phage ELISA.

scFv ELISA against whole cell bacteria

For Propionibacterium species, colonies streaked from -80°C stock on BHI agar were inoculated into BHI broth and incubated for 5 days at 37°C anaerobically, in case of *P. acnes* and at 30°C in case of *P. acidipropionici* and *P. freudenreichii*. For Pseudomonas species, colonies streaked from -80°C stock on LB agar were inoculated into LB broth and incubated overnight at 250 rpm at 37°C in case of *P. aeruginosa* and at 30°C in case of *P. fluorescens* and *P. putida*. Broth cultures were washed with PBS for two times and cells were resuspended in PBS. OD600 of cell suspensions were adjusted to 2.0. Heat-inactivation was done in water bath for 30 min at 60°C. Heat-inactivated bacteria were used for whole cell ELISA.

To check specificity of 6xHis-tagged scFv, heat-inactivated bacteria (10⁹ cells/mL) was used as target. Purified hexa-histidine-tagged scFv (10 mg/mL) was used as primary detection agent and HisProbe-HRP as secondary detection agent. ELISA procedure was the same as above except that immobilization step was performed overnight at 37°C.

Checkerboard Titration

To optimize the scFv ELISA and to determine the limit of detection of recombinant scFv, ELISA plate was coated with serial dilutions of heat-inactivated bacterial suspension from row A to F, where row A had the highest (10^9 cells/mL) bacterial concentration while row F had the lowest (10⁴ cells/mL). ELISA procedure was carried out as described above except that the wells were incubated with six different dilutions of scFv in duplicate format from column 1 to 12, where column 1 and 2 had the highest scFv concentration (yPac1A8 scFv 10 mg/mL or yPgi3G4 scFv 40 mg/mL) while column 11 and 12 had the lowest (yPac1A8 scFv 0.1 mg/mL or yPgi3G4 scFv 1.0 mg/mL).

Flow Cytometry

A bacterial colony was suspended in 900 μ L PBS and 300 μ L of it was diluted with PBS to 1mL and was centrifuged at 2000g for 5 min. The cells were resuspended in 1mL of 1%BSA-0.1%PBST, blocked for 30 min at room temperature, and washed for two times with PBS. The cells were incubated with specific 6xHis-tagged scFv (200 mg/mL) for 1 h at room temperature. *P. acnes* cells were exposed to yPac1A8 scFv and *P. aeruginosa* cells to yPgi3G4 scFv. After two times PBS washing, the cells were stained with 1:500 dilution of Dylight 488-labelled anti-hexa-histidine mouse monoclonal antibody (Abcam#ab117512, UK) in PBS for 1 h in a dark place at room temperature. The cells were washed with PBS for two times and resuspended in 500 μ L PBS containing 2 μ L of 1.0 mg/mL PI (Propidium Iodide) solution (Thermo Fisher Scientific#A28993, USA). Sample reading was performed using Invitrogen Attune NXT Acoustic Focusing 3-Laser System Cytometer (Thermo Fisher Scientific# P3566, USA).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

CLSM of planktonic bacteria

About 1mL of broth culture was centrifuged (3000 g, 5 min), washed with PBS for two times and resuspended in PBS. About 5 mL of that was spread into a smear on a glass slide and dried completely at 37°C. The smear was fixed with 4%PFA (paraformaldehyde) in PBS (pH 7.4) for 30 min, blocked with 1%BSA-300 mM glycine-0.1% PBST for 30 min, treated with 2 mg of 6xHis-tagged scFv for 1 h, incubated with 1:500 dilution of Dylight 488-labelled anti-hexa-histidine mouse monoclonal antibody

(Abcam#ab117512, UK) in PBS for 1 h, and counterstained with 300 mM DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) for 5 min. The smear was washed three times with PBS between above steps. The stained smear was covered with slow fade gold mountant (Invitrogen#S36936, U.S.A) and examined with confocal microscope (Nikon A1R, Japan).

CLSM of bacterial biofilms

Bacterial biofilm was grown by placing autoclaved glass coverslips at air-liquid interface of broth cultures [103]. The incubation time for *P. acnes* and *P. aeruginosa* biofilms were 5 days anaerobically in GasPak system and overnight aerobically, respectively. Before staining, biofilm was washed with PBS for three times and dried completely at 37°C. The staining procedure was the same as above except that 20 µg of 6xHis-tagged scFv was used. One set of biofilms was used for crystal violet staining.

Transmission electron microscopy (TEM)

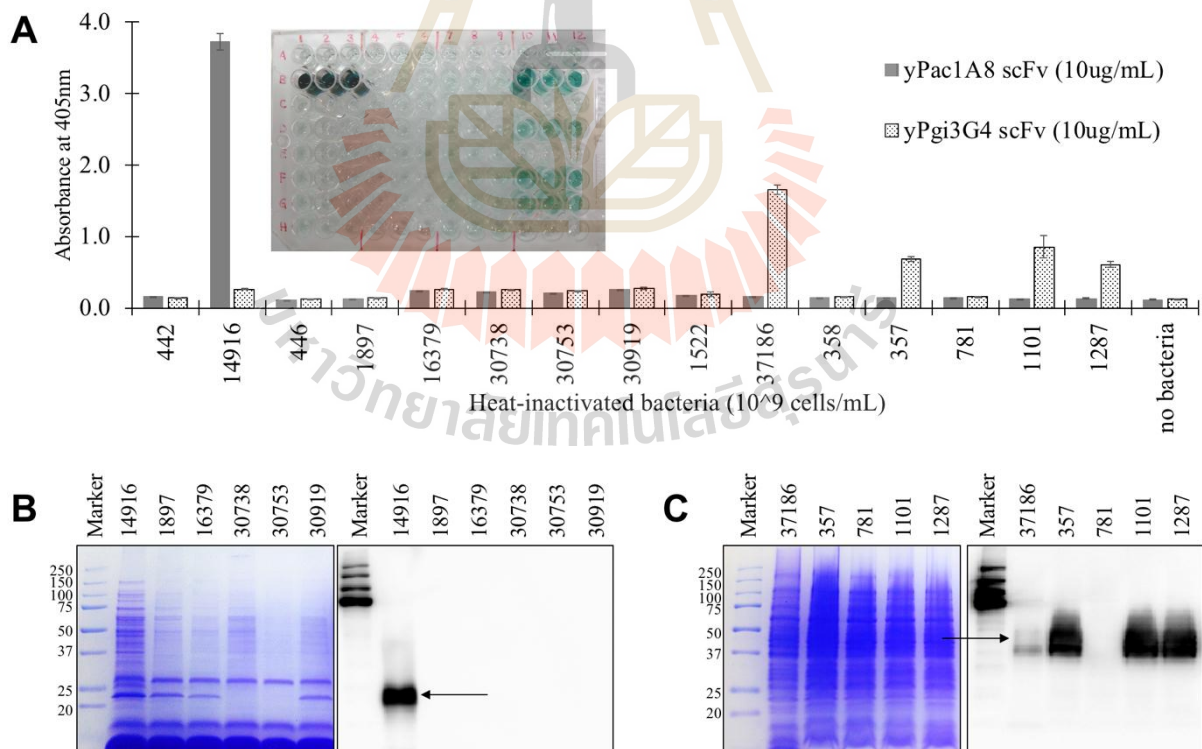
The procedure was carried out in a microcentrifuge tube. Bacteria in broth culture were centrifuged at 3000g for 5 min, washed with 0.85% NaCl, resuspended in PBS, fixed with 4%PFA (pH 7.4) in PBS for 30 min at room temperature. After washing with PBS two times, the bacteria were blocked with 1%BSA-300mM glycine in 0.1% PBST for 30 min at room temperature, followed by two times PBS washing. Then, 50 µg of 6xHis-tagged scFv in PBS was added and incubated for 60 min at room temperature. After washing 2 times with PBS, 1:20 dilution of 10 nm Ni-NTA nanogold (Nanoprobes#2084, U.S.A) in 0.05%TBST containing 1%BSA was added and incubated for 30 min at room temperature followed by TBST-BSA washing for two times. Then, the samples were resuspended in PBS, dehydrated by graded ethanol dehydration method and polymerized in LR White medium grade resin and accelerator (EMS#14380, U.S.A) in BEEM embedding capsule (EMS#69911-01, U.S.A) by cold curing method. Finally, ultra-thin sections were examined with transmission electron microscope (Hitachi Hi-Tech HT7700, Japan).

ผลการทดลอง

ผลแสดง Cross-reactivity analysis of 6xHis-tagged scFv by whole-cell ELISA and WB

Binding activity of yPac1A8 and yPgi3G4 scFv were determined by whole-cell ELISA on plate coated with indicated bacteria (A): *Propionibacterium acidipropionici*

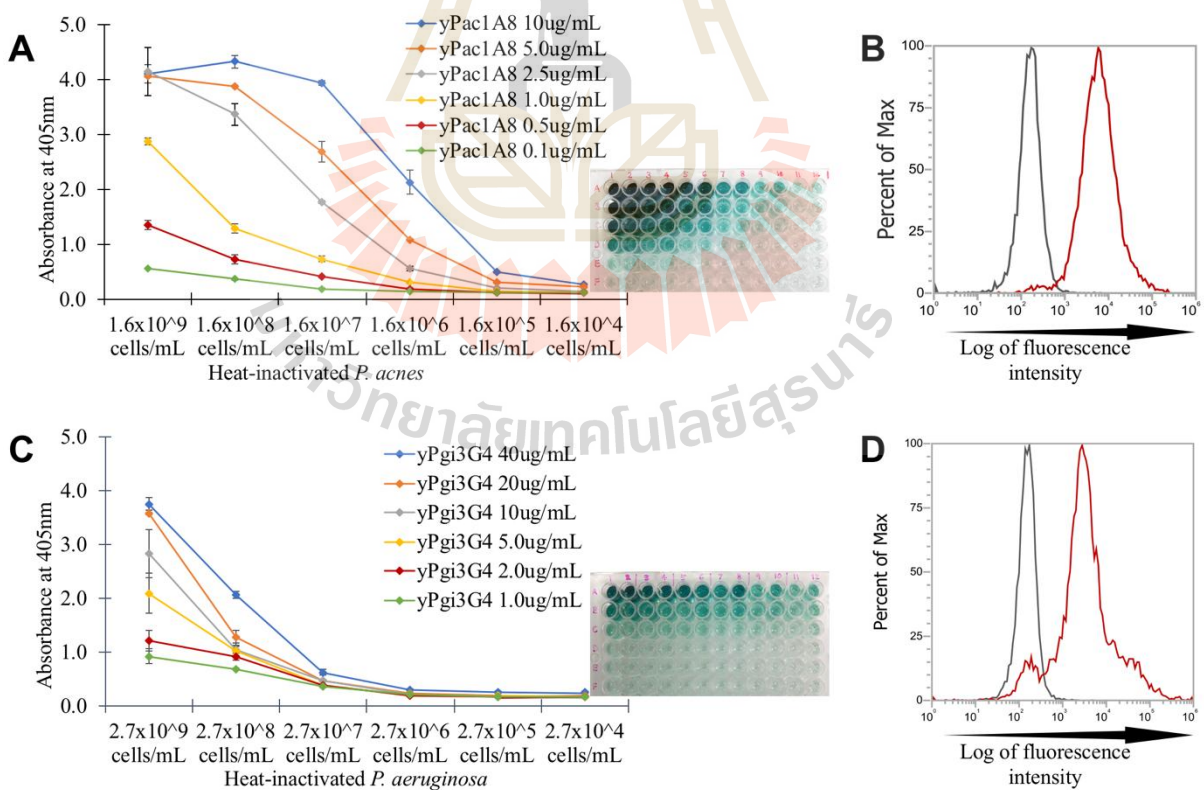
TISTR 442, *P. acnes* DMST 14916, *P. freudenreichii* TISTR 446, *P. acnes* strains DSM 1897, DSM 16379, DSM 30738, DSM 30753, DSM 30919, *Pseudomonas putida* TISTR 1522, *P. aeruginosa* DMST 37186, *P. fluorescens* TISTR 358, *P. aeruginosa* strains TISTR 357, TISTR 781, TISTR 1101, TISTR 1287, and wells without immobilized bacteria. The bars represent the average OD values of triplicate samples and error bars represent the standard error of the mean. Picture of ELISA plate is shown in the inset. (B) SDS-PAGE and WB of boiled antigen preparation of *P. acnes* strains immunoblotted with yPac1A8 scFv: DMST 14916, DSM 1897, 16379, 30738, 30919: Coomassie Brilliant Blue-stained SDS-PAGE gel. *P. acnes* antigen located between 20 and 25kDa (arrow pointed) was detected by yPac1A8 scFv. (C) SDS-PAGE and WB of boiled antigen preparation of *P. aeruginosa* strains immunoblotted with yPgi3G4 scFv as indicated. DMST 37186, TISTR 357, 781, 1101, 1287: *P. aeruginosa* antigen located between 37 and 50kDa (arrow pointed) was detected by yPgi3G4 scFv. Precision Plus All Blue Prestained Protein Standards (BioRad#1610373, U.S.A) was used as a molecular weight marker.



รูปที่ ๑๑ ผลการวิเคราะห์ cross-reactivity ของ scFv โคลน yPac1A8 และ yPgi3G4 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และ *P. aeruginosa*

ผลแสดง Checkerboard titration and flow cytometry analysis.

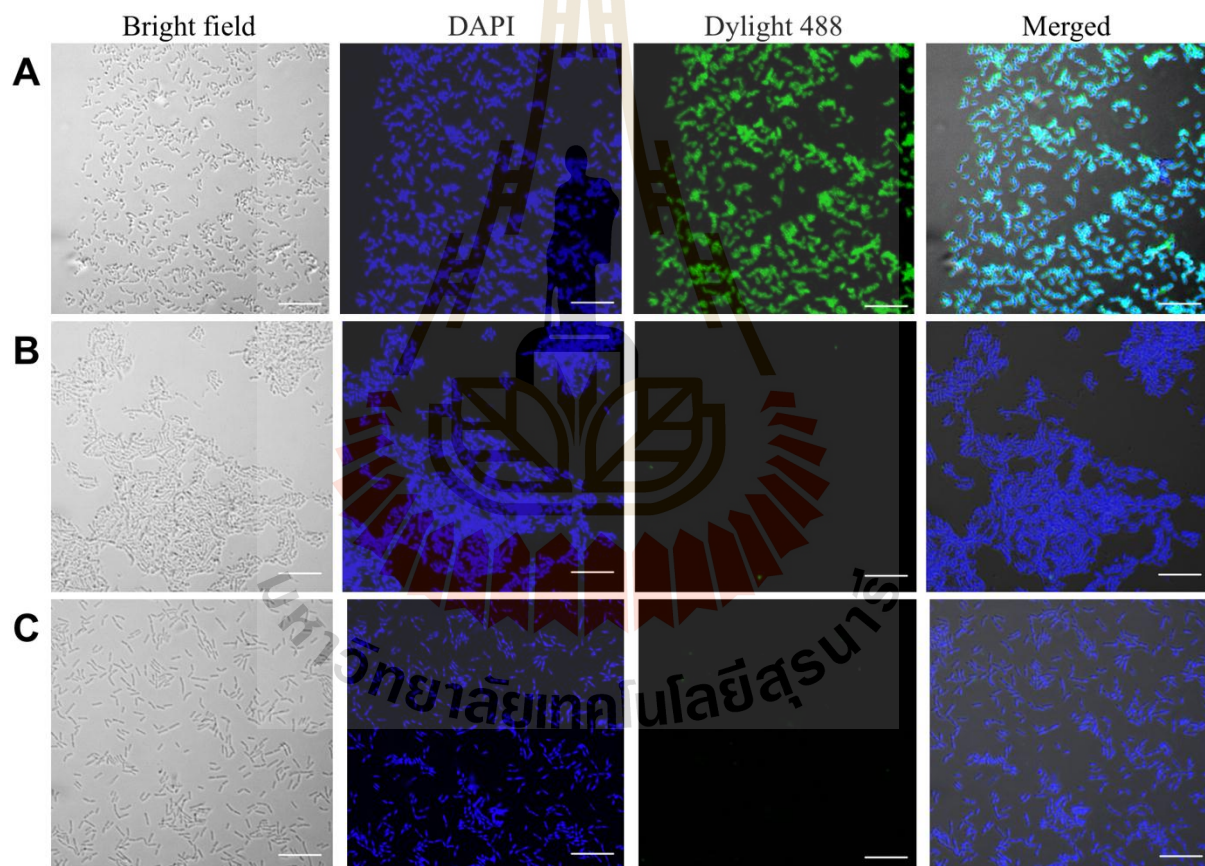
Limit of detections of yPac1A8 for *P. acnes* DMST 14916 (A) and yPgi3G4 for *P. aeruginosa* DMST 37186 (C) scFv were determined by checkerboard titration of whole-cell ELISA, using dilution series of scFv and serial dilutions of bacteria as indicated. The lines represent the average absorbance values of duplicate samples and error bars represent the standard error of the mean. Flow cytometry analysis of yPac1A8 (B) and yPgi3G4 scFv (D) to alive *P. acnes* DMST 14916 and *P. aeruginosa* DMST 37186, respectively. Reactivity of 6xHis-tagged scFv is indicated by red line. Secondary antibody alone is indicated by black line. For yPac1A8, the highest scFv concentration tested (10 mg/mL) could detect 1.6×10^5 cells/mL and the lowest scFv concentration tested (0.1mg/mL) could detect 1.6×10^9 cells/mL. For yPgi3G4, the limit of detection was at 1.6×10^7 cells/mL. These results indicated that the binding affinity of scFv clone yPac1A8 to its *P. acnes* target was higher than those of the clone yPgi3G4 against its target bacteria.



รูปที่ ๑๒ ผล checkerboard titration และ Flow cytometry ของ scFv โคลน yPac1A8 และ yPgi3G4 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และ *P. aeruginosa*

ผลแสดง CLSM of *Propionibacterium* species.

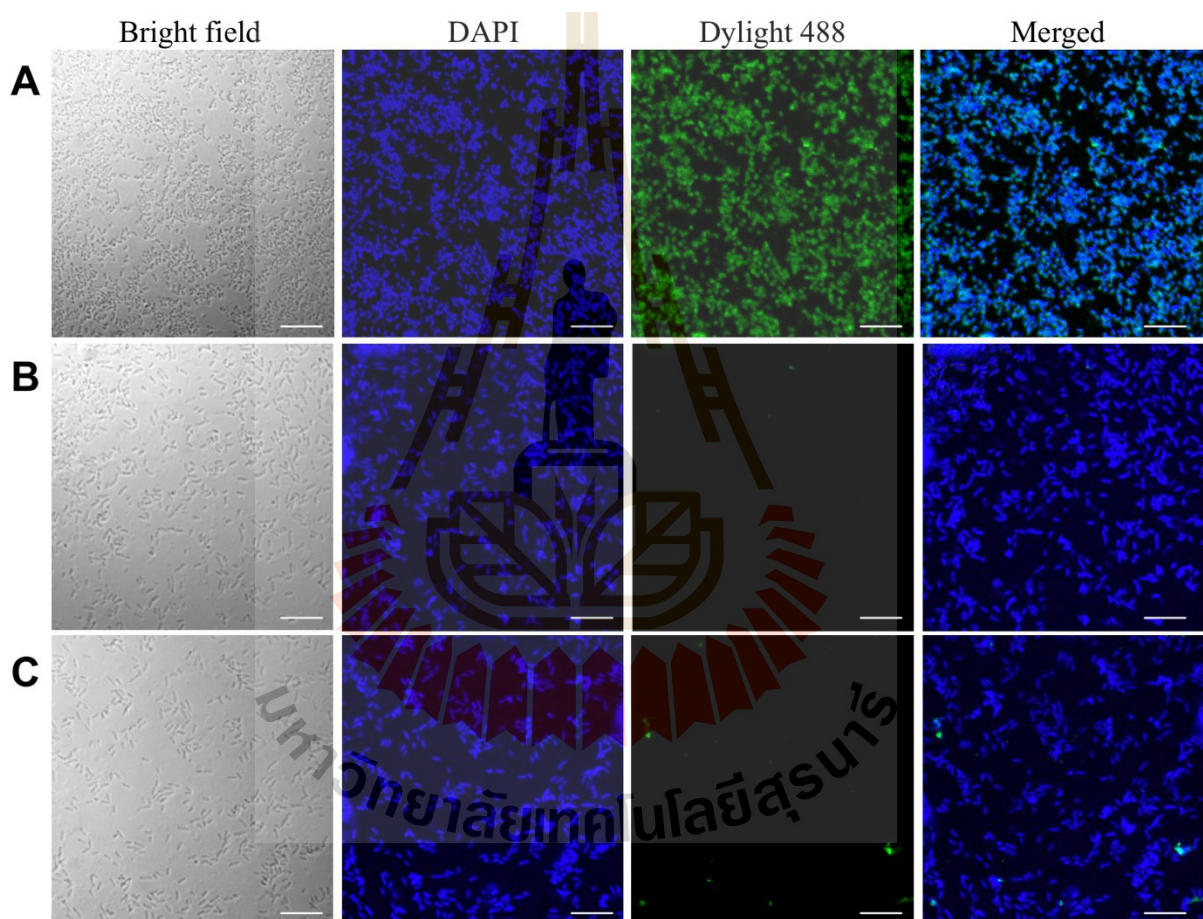
P. acnes DMST 14916 (A), *P. acidipropionici* TISTR 442 (B), and *P. freudenreichii* TISTR 446 (C) were incubated with yPac1A8 scFv, detected by Dylight 488-labelled anti-hexa-histidine mouse monoclonal antibody, and counterstained with DAPI. Photos were taken by Plan Apo oil immersion objective of Nikon A1R confocal laser microscope at 100x magnification. Scale bar represents 10um. In bright field panel, individual bacterial cells were seen. In DAPI panel, nucleoids of bacteria were stained blue. In Dylight 488 panel, only *P. acnes* DMST 14916 were stained green. The result demonstrated that the yPac1A8 scFv antibody can bind to *P. acnes* DMST 14916 and did not cross-reactivity with other *P. acnes* strains.



รูปที่ ๑๓ ผลการวิเคราะห์ของ scFv โคลน yPac1A8 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium* species ด้วย Confocal microscopy

ผลแสดง CLSM of *Pseudomonas* species.

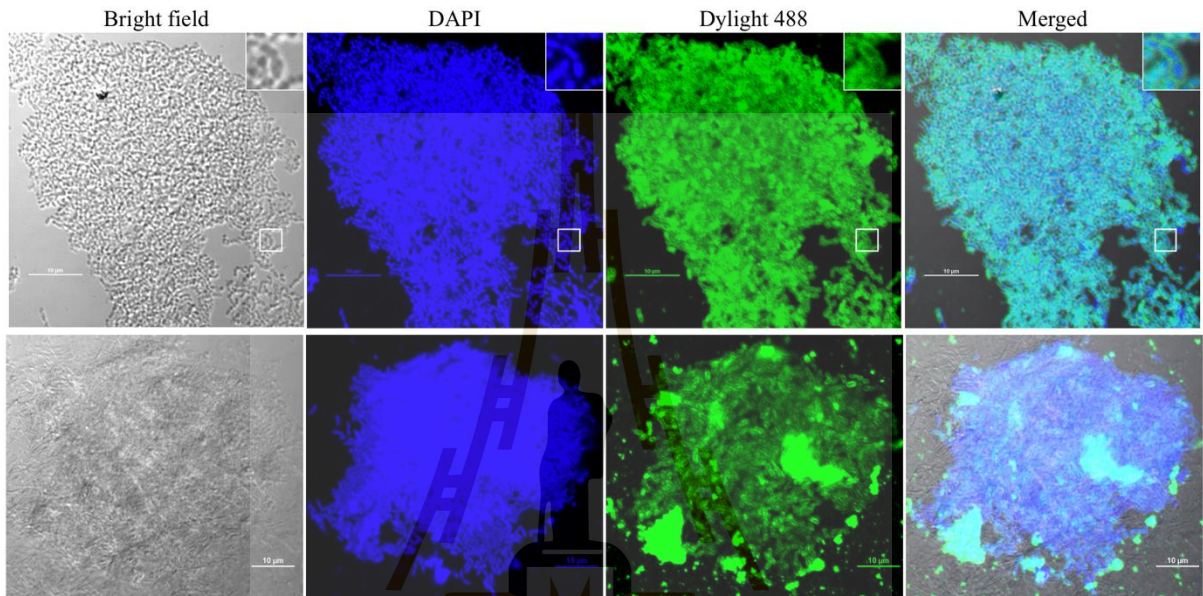
Photos of *P. aeruginosa* DMST 37186 (A), *P. putida* TISTR 1522 (B), and *P. fluorescens* TISTR 358 (C) were taken at same specifications as Fig 13 but incubated with yPgi3G4 scFv. Scale bar represents 10 μm . In bright field panel, bacterial cells are seen. In DAPI panel, nucleoids of bacteria are blue. In Dylight 488 panel, only *P. aeruginosa* is green. The result demonstrated that the scFv antibody can bind to *P. aeruginosa* DMST 37186 and did not cross-reactivity with other *P. aeruginosa* strains.



รูปที่ ๑๔ ผลการวิเคราะห์ของ scFv โคลน yPgi3G4 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* species ด้วย Confocal microscopy

ผลแสดง CLSM of *P. acnes* and *P. aeruginosa* biofilms.

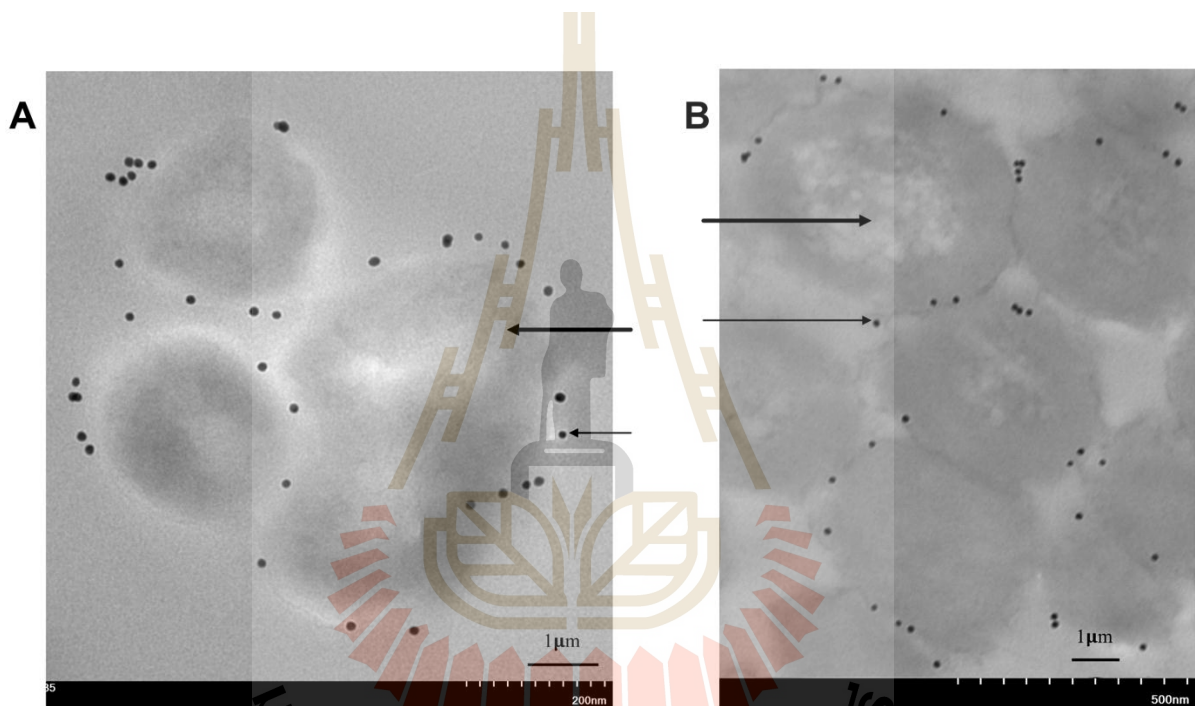
Biofilms of *P. acnes* DMST 14916 (upper panel) and *P. aeruginosa* DMST 37186 (lower panel) were detected by yPac1A8 and yPgi3G4 scFv, respectively. Scale bar represents 10 μ m. In Dylight 488 panel, *P. acnes* bacilli are zoomed up in insets. The result demonstrated that the scFv antibody can bind to their own target (*P. acnes* DMST 14916 and *P. aeruginosa* DMST 37186) in biofilms.



รูปที่ ๑๕ ผลการวิเคราะห์ของ scFv โคลน yPac1A8 และ yPgi3G4 ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และ *P. aeruginosa* ด้วย Confocal microscopy

ผลแสดง TEM of *P. acnes* and *P. aeruginosa*.

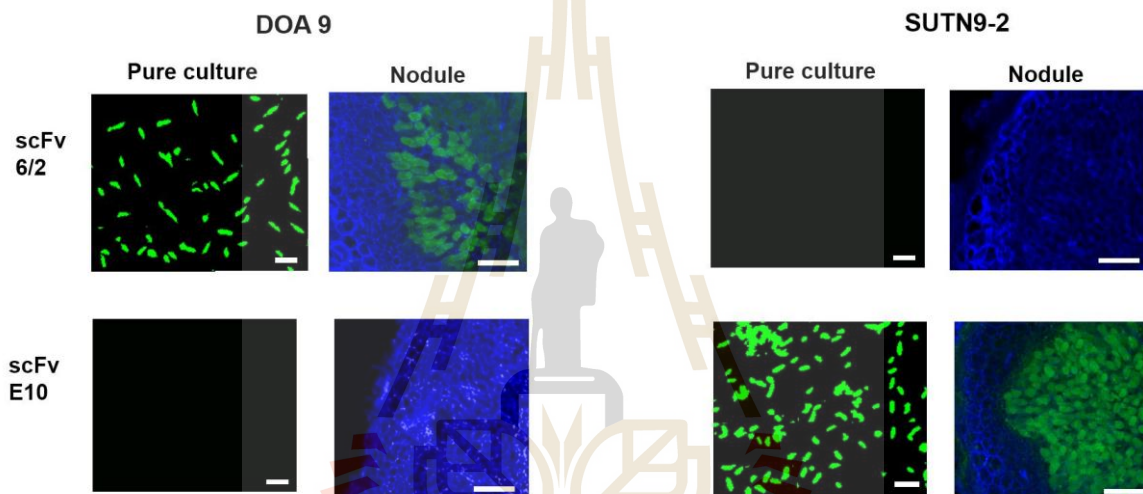
Four *P. acnes* DMST 14916 cells (A) and six *P. aeruginosa* DMST 37186 cells (B) were treated with yPac1A8 and yPgi3G4 scFv, respectively. Photos were taken by Hitachi Hi-Tech HT7700 transmission electron microscope at x25.0k magnification with Zoom-1 lens mode at accelerating voltage 80.0kV. Scale bar represents 1.0 μm . Big round structures are bacterial cells (thick arrows) and small dense black dots are 10 nm Ni-NTA nanogold particles (thin arrows). This result show that the scFv antibody can bind to the bacterial surface.



รูปที่ ๑๖ ผลการวิเคราะห์การจับกับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และ *P. aeruginosa* ของ scFv โคลน yPac1A8 และ yPgi3G4 ด้วย TEM

ผลแสดง Confocal microscopy images of immunofluorescence staining for Bradyrhizobium strains

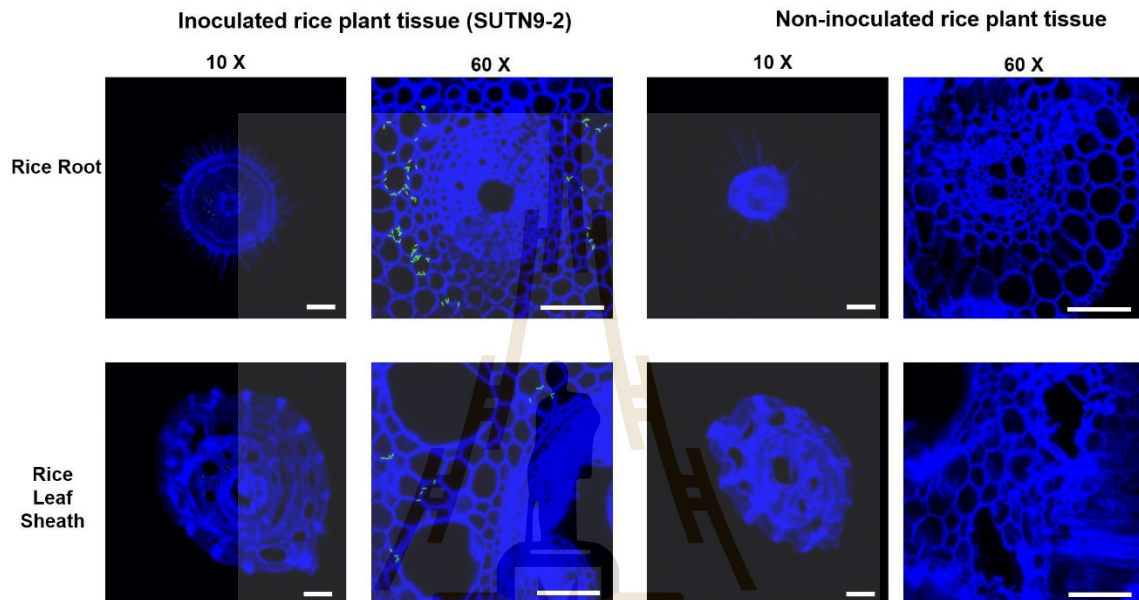
SUTN9-2 and DOA9 prepared from pure culture and plant nodules. The bacterial samples were stained with two different scFv antibodies, i.e., E10 and 6/2. Green spot indicated the green fluorescent staining of scFv antibody, using secondary antibody conjugated to anti-His Dylight 488. Plant cell walls were stained with a blue fluorophore (Calcofluor white M2R) and emitted blue color. The bacteroid are shown as green spots inside a blue plant cavity. Scale bar is 10 μm at 60X magnification, and 100 μm at 10X magnification for pure culture and nodule samples, respectively. This method can use to distinguish this *Bradyrhizobium* strain to another strains in the plant nodules.



รูปที่ ๑๗ ผลการวิเคราะห์การจับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bradyrhizobium* SUTN9-2 และ DOA9 ของ scFv โคลน E10 และ 6/2 ด้วย Confocal microscopy

ผลแสดง Confocal laser scanning micrographs of rice root and leaf sheath inoculated with SUTN9-2.

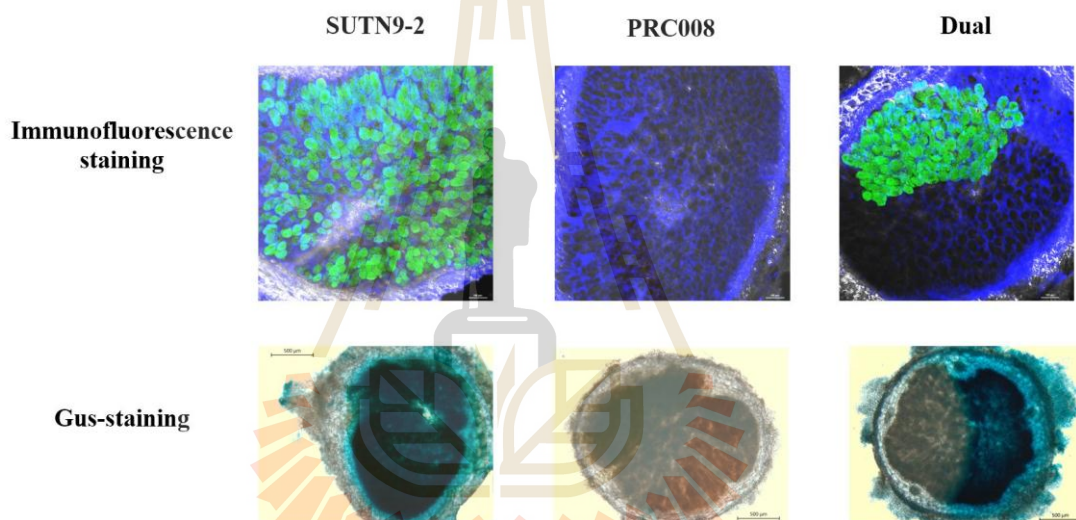
Cross-section of the tap root and leaf sheath above the stem base were examined. Scale bar is 50 μm at 60X magnification, and 100 μm at 10X magnification. The result show that the scFv can apply to detect the endophytic *Bradyrhizobium* bacteria inside the rice plant.



รูปที่ ๑๘ ผลการวิเคราะห์การจับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bradyrhizobium* SUTN9-2 ที่อยู่ในราก และ ส่วนเปลือกลำต้นของข้าว (leaf sheath) ของ scFv โคลน E10 ด้วย Confocal laser scanning micrographs

ผลแสดงการวิเคราะห์ Nodule occupancy.

Nodule phenotype after co-inoculation with SUTN9-2 (wild type) and PRC008 (wild type) for immunofluorescence staining, and with SUTN9-2 (Gus-tagged strain) and PRC008 (wild type) for Gus staining. Green spots indicated the green fluorescent staining of scFv E10 antibody, using secondary antibody conjugated to anti-His Dylight 488. Blue color indicated Gus staining of SUTN9-2 (SUTN9-2 Gus reporter gene-tagged strain) using the substrate: X-Gluc. Scale bar is 100 μm and 500 μm at 10X magnification for immunofluorescence staining and Gus-staining, respectively. The result show that this scFv can use to investigate the specific *Bradyrhizobium* without using GMO based method (Gus staining).



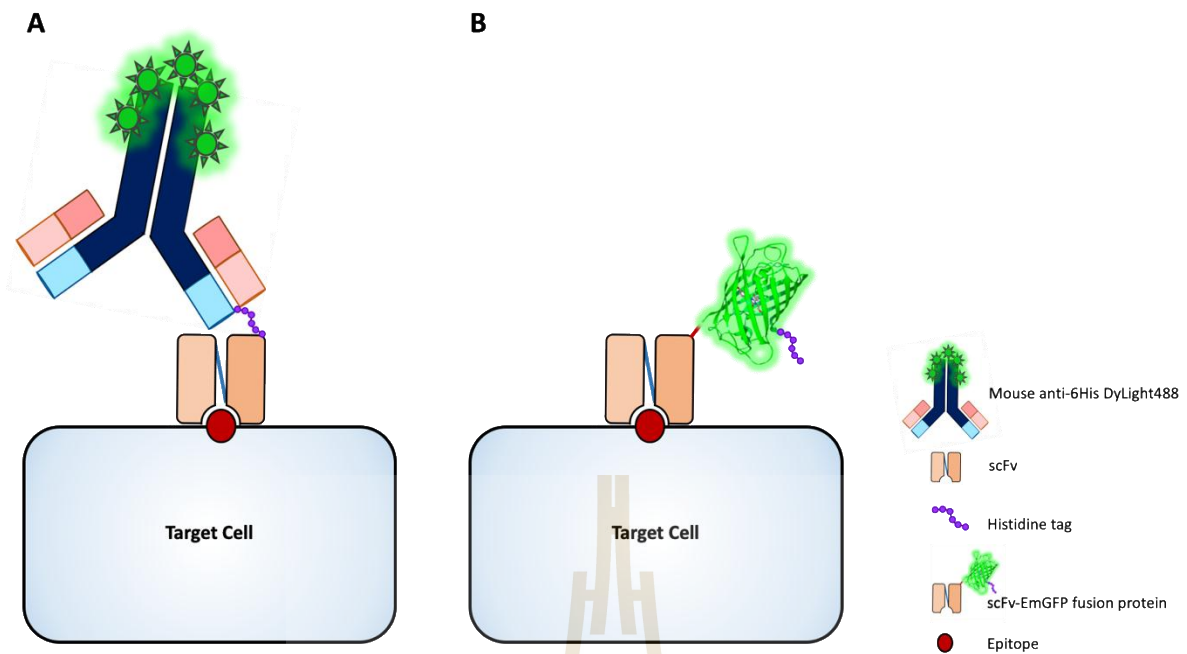
รูปที่ ๑๙ ผลการวิเคราะห์การจับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bradyrhizobium* SUTN9-2 ที่อยู่ใน Nodule ของ scFv โคลน E10 ด้วย immunofluorescence staining

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการวิจัยสรุปได้ว่าผู้วิจัยสามารถ พัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) ในการผลิตแอนติบอดีสำหรับ ทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏ (bio-imaging) ได้สำเร็จ โดยได้ทำการพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้างเวกเตอร์สำหรับผลิตแอนติบอดี ให้ยีนของแอนติบอดีแบบสายเดี่ยว (scFv) เชื่อมต่อกับโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (scFv-GFP) จากนั้น นำไปผลิตในแบคทีเรีย อี โคไล ๓ ชนิด คือ BL21, K1 และ SHuffle B cell พบว่า สามารถผลิตได้ดี และสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการใช้วิธีการโครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะ (Immobilized metal affinity chromatography, IMAC) จากนั้นนำไปใช้ ทำให้ภาพทางชีววิทยาปรากฏ บนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และเซลล์ล์แบคทีเรีย แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เรืองแสง (Confocal Fluorescent Microscope) พบว่าใช้ได้ดี โดยในเซลล์มะเร็งนั้นสามารถใช้ดูได้ทั้งตอนที่จับกับด้านนอกเซลล์ และเมื่อเคลื่อนเข้าไปในเซลล์ (endocytosis) ซึ่งการใช้ scFv-GFP ย้อมเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ทำให้สามารถดูการเคลื่อนที่ของสารผ่านเซลล์นั้น ถือเป็นข้อได้เปรียบที่สำคัญ แต่อย่างไรก็ตามมีปัญหาคือสีจาง (fade) เร็วมาก หากต้องการถ่ายภาพให้เห็นโครงสร้างเซลล์ที่ชัดเจน จึงได้ลองปรับวิธีการตรวจสอบ โดยการใช้แอนติบอดีเรืองแสงจับกับ กรดอะมิโน ฮิสตีดีน ๖ ตัวต่อกันที่ติดอยู่ด้านท้าย (6xHis, hexahistidine tag) แทน พบว่าได้ผลดีมาก โดยการใช้ recombinant antibody ทั้งสองรูปแบบเพื่อการวิเคราะห์ สามารถสรุปดังแสดงในรูปที่ ๒๐ โดยนอกจากสามารถใช้ดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงแล้ว ยังสามารถใช้ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และตรวจสอบโปรตีนในเซลล์ด้วยวิธีการ western blot รวมทั้งสามารถใช้ตรวจสอบการจับกับผิวเซลล์ ด้วยวิธีการตรวจบนจานพลาสติก (ELISA) และเครื่องวัดแบบให้เซลล์ไหลผ่าน (Flow cytometry) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ต่อยอดในการศึกษาภาพทางชีววิทยาของเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อีกได้อีกอย่างกว้างขวาง ยกตัวอย่าง เช่น การติดตามการเข้าสู่เซลล์ของแอนติบอดี เป็นต้น



รูปที่ ๒๐ ภาพเล่าเรื่อง (infographic) สรุปงานวิจัยด้วยการวิเคราะห์โดยใช้ recombinant antibody ในรูปแบบ scFv-6xHis (รูป A) และ scFv-GFP (รูป B)

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Lang P, Yeow K, Nichols A, Scheer A. Cellular imaging in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5: 343-56
2. Yao, J., Yang, M., & Duan, Y. (2014). Chemistry, Biology, and Medicine of Fluorescent Nanomaterials and Related Systems: New Insights into Biosensing, Bioimaging, Genomics, Diagnostics, and Therapy. *Chemical Reviews*, 114(12), 6130-6178.
3. Zhang, D.-D., Liu, J.-M., Sun, S.-M., Liu, C., Fang, G.-Z., & Wang, S. (2019). Construction of persistent luminescence-plastic antibody hybrid nanoprobe for in vivo recognition and clearance of pesticide using background-free nanobioimaging. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(24), 6874-6883.
4. Fukunaga, K., Watanabe, T., Novitasari, D., Ohashi, H., Abe, R., & Hohsaka, T. (2018). Antigen-responsive fluorescent antibody probes generated by selective N-terminal modification of IgGs. *Chemical Communications*, 54(90), 12734-12737. doi:10.1039/C8CC07827K
5. Dolinar, RO, & Reilly, MS. (2013). The future of biological therapy: a pathway forward for biosimilars. *GaBI J*, 2(1), 36-40.
6. Howard GC, Brown WE, Auer M. *Imaging Life: Biological Systems from Atoms to Tissues*. Oxford University Press; 2014.
7. Casadevall A, Dadachova E, Pirofski LA. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 695-703.
8. ยมาภัย มมหาวิทยาลัย :นครราชสีมา .การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีเฟจ . เทคโนโลยีสุรนารี; ๒๕๕๑.
9. Harlow E, Lane D. *Using Antibodies : A Laboratory Manual : Portable Protocol*. 1 ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1998.
10. Howard GC, Kaser MR, editors. *Making and Using Antibodies: A Practical handbook*. 1 ed: CRC; 2006.
11. Borrebaeck CAK. Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunology Today.* 2000; 21: 379-82.
12. Laurino JP, Shi Q, Ge J. Monoclonal antibodies, antigens and molecular diagnostics: a practical overview. *Ann Clin Lab Sci.* 1999; 29: 158-66.
13. Waldmann TA. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science.* 1991; 252: 1657-62.
14. Maggon K. Monoclonal antibody "gold rush". *Curr Med Chem.* 2007; 14: 1978-87.
15. Reichert JM, Valge-Archer VE. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 349-56.

16. Stipsanelli E, Valsamaki P. Monoclonal antibodies: old and new trends in breast cancer imaging and therapeutic approach. *Hell J Nucl Med.* 2005; 8: 103-8.
17. Janeway AC, Travers, P., Walport, M., Shlomshik, J. M. . *Immunobiology* New York: Garland Publisher; 2008.
18. Albitar M, editor. *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* 1ed: Humana Press; 2007.
19. Eisenberg D, Marcotte EM, Xenarios I, Yeates TO. Protein function in the post-genomic era. *Nature.* 2000; 405: 823-6.
20. Liu B, Marks JD. Applying Phage Antibodies to Proteomics: Selecting Single Chain Fv Antibodies to Antigens Blotted on Nitrocellulose. *Analytical Biochemistry.* 2000; 286: 119-28.
21. Rudert F, Ge L, Ilag LL. Functional genomics with protein-protein interactions *Biotechnology Annual Review.* Volume 5 ed: Elsevier; 2000. p. 45-86.
22. Siegel RW, Allen B, Pavlik P, Marks JD, Bradbury A. Mass spectral analysis of a protein complex using single-chain antibodies selected on a peptide target: applications to functional genomics. *Journal of Molecular Biology.* 2000; 302: 285-93.
23. Sidhu SS. Phage display: increasing the rewards from genomic information. *Drug Discovery Today.* 2001; 6: 936.
24. Liu B, Huang L, Sihlbom C, Burlingame A, Marks JD. Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display. *Journal of Molecular Biology.* 2002; 315: 1063-73.
25. Sapan CV, Reisner HM, Lundblad RL. Antibody therapy (IMiG): evaluation of the use of genomics and proteomics for the study of immunomodulation therapeutics. *Vox Sang.* 2007; 92: 197-205.
26. Almagro JC, Fransson J. Humanization of antibodies. *Front Biosci.* 2008; 13: 1619-33.
27. Clark M. Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? *Immunol Today.* 2000; 21: 397-402.
28. Khandare JJ, Minko T. Antibodies and peptides in cancer therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2006; 23: 401-35.
29. Schrama D, Reisfeld R, Becker J. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5: 147-59.
30. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* 1990; 348: 552-4.
31. Chang CN, Landolfi NF, Queen C. Expression of antibody Fab domains on bacteriophage surfaces. Potential use for antibody selection. *J Immunol.* 1991; 147: 3610-4.
32. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 4133-7.

33. Bugli F, Graffeo R, Sterbini FP, Torelli R, Masucci L, Sali M, et al. Monoclonal antibody fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice. *Toxicon*. 2008; 51: 547-54.
34. Burton DR, Barbas CF, 3rd, Persson MA, Koenig S, Chanock RM, Lerner RA. 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*. 1991; 88: 10134-7.
35. Cai X, Garen A. 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*. 1995; 92: 6537-41.
36. Clackson T, Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Winter, G. . Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*. 1991; 352: 624-8.
37. Graus YF, de Baets MH, Parren PW, Berrih-Aknin S, Wokke J, van Breda Vriesman PJ, et al. 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*. 1997; 158: 1919-29.
38. Kramer RA, Marissen WE, Goudsmit J, Visser TJ, Clijsters-Van der Horst M, Bakker AQ, et al. The human antibody repertoire specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries. *Eur J Immunol*. 2005; 35: 2131-45.
39. Lee MS, Lee JC, Choi CY, Chung J. Production and characterization of monoclonal antibody to botulinum neurotoxin type B light chain by phage display. *Hybridoma (Larchmt)*. 2008; 27: 18-24.
40. Shaw I, O'Reilly A, Charleton M, Kane M. Development of a High-Affinity Anti-Domoic Acid Sheep scFv and its Use in Detection of the Toxin in Shellfish. *Anal Chem*. 2008.
41. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*. 1991; 222: 581-97.
42. Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, et al. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J*. 1994; 13: 692-8.
43. Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, Sargent P, Lindquist E, Schier R, et al. 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*. 1998; 95: 6157-62.

44. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 433-55.
45. Hoogenboom HR. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* 1997; 15: 62-70.
46. O'Brien PM, Aitken R, editors. *Antibody Phage Display.* Totowa, New Jersey: Humana Press; 2002.
47. Fromant M, Blanquet S, Plateau P. Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1995; 224: 347-53.
48. Martineau P. Error-prone polymerase chain reaction for modification of scFvs. *Methods Mol Biol.* 2002; 178: 287-94.
49. Cramer A, Cwirla S, Stemmer WP. Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat Med.* 1996; 2: 100-2.
50. Fermer C, Andersson I, Nilsson K, Nilsson O. Specificity rescue and affinity maturation of a low-affinity IgM antibody against pro-gastrin-releasing peptide using phage display and DNA shuffling. *Tumour Biol.* 2004; 25: 7-13.
51. Korpimäki T, Rosenberg J, Virtanen P, Lamminmäki U, Tuomola M, Saviranta P. Further improvement of broad specificity hapten recognition with protein engineering. *Protein Eng.* 2003; 16: 37-46.
52. Proba K, Worn A, Honegger A, Plückthun A. Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J Mol Biol.* 1998; 275: 245-53.
53. Zhang XX, Deng Q, Zhang SY, Liu J, Cai Q, Lu ZM, et al. Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library. *J Med Virol.* 2003; 71: 511-7.
54. Schier R, Bye J, Apell G, McCall A, Adams GP, Malmqvist M, et al. Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol.* 1996; 255: 28-43.
55. Schier R, McCall A, Adams GP, Marshall KW, Merritt H, Yim M, et al. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol.* 1996; 263: 551-67.
56. Yang WP, Green K, Pinz-Sweeney S, Briones AT, Burton DR, Barbas CF, 3rd. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol Biol.* 1995; 254: 392-403.
57. Burtrum D, Zhu Z, Lu D, Anderson DM, Prewett M, Pereira DS, et al. A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2003; 63: 8912-21.

58. Dauvillier S, Merida P, Visintin M, Cattaneo A, Bonnerot C, Dariavach P. Intracellular single-chain variable fragments directed to the Src homology 2 domains of Syk partially inhibit Fc epsilon RI signaling in the RBL-2H3 cell line. *J Immunol.* 2002; 169: 2274-83.
59. Gejima R, Tanaka K, Nakashima T, Hashiguchi S, Ito Y, Yoshizaki K, et al. Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling. *Hum Antibodies.* 2002; 11: 121-9.
60. Kovaleva M, Bussmeyer I, Rabe B, Grotzinger J, Sudarman E, Eichler J, et al. Abrogation of viral interleukin-6 (vIL-6)-induced signaling by intracellular retention and neutralization of vIL-6 with an anti-vIL-6 single-chain antibody selected by phage display. *J Virol.* 2006; 80: 8510-20.
61. Li Y, Li H, Wang MN, Lu D, Bassi R, Wu Y, et al. Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody. *Blood.* 2004; 104: 1137-44.
62. Paz K, Brennan LA, Iacolina M, Doody J, Hadari YR, Zhu Z. Human single-domain neutralizing intrabodies directed against Etk kinase: a novel approach to impair cellular transformation. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4: 1801-9.
63. Piloto O, Levis M, Huso D, Li Y, Li H, Wang MN, et al. Inhibitory anti-FLT3 antibodies are capable of mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and reducing engraftment of acute myelogenous leukemia blasts in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 2005; 65: 1514-22.
64. Willemsen RA, Ronteltap C, Chames P, Debets R, Bolhuis RL. T cell retargeting with MHC class I-restricted antibodies: the CD28 costimulatory domain enhances antigen-specific cytotoxicity and cytokine production. *J Immunol.* 2005; 174: 7853-8.
65. Rowley MJ, O'Connor K, Wijeyewickrema L. Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. *Biotechnol Annu Rev.* 2004; 10: 151-88.
66. Xie MH, Yuan J, Adams C, Gurney A. Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv. *Nat Biotechnol.* 1997; 15: 768-71.
67. Kristensen P, Winter G. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold Des.* 1998; 3: 321-8.
68. Pedersen JS, Otzen DE, Kristensen P. Directed evolution of barnase stability using proteolytic selection. *J Mol Biol.* 2002; 323: 115-23.
69. Benhar I. Design of synthetic antibody libraries. *Expert Opin Biol Ther.* 2007; 7: 763-79.

70. Booy EP, Johar D, Maddika S, Pirzada H, Sahib MM, Gehrke I, et al. Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006; 54: 85-101.
71. Hale G. Therapeutic antibodies--delivering the promise? *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58: 633-9.
72. Jolliffe LK. Humanized antibodies: enhancing therapeutic utility through antibody engineering. *Int Rev Immunol*. 1993; 10: 241-50.
73. McCarron PA, Olwill SA, Marouf WM, Buick RJ, Walker B, Scott CJ. Antibody conjugates and therapeutic strategies. *Mol Interv*. 2005; 5: 368-80.
74. Mitra A, Nan A, Line BR, Ghandehari H. Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Curr Pharm Des*. 2006; 12: 4729-49.
75. Reilly RM. Radioimmunotherapy of solid tumors: the promise of pretargeting strategies using bispecific antibodies and radiolabeled haptens. *J Nucl Med*. 2006; 47: 196-9.
76. Santos AD, Padlan EA. Development of more efficacious antibodies for medical therapy and diagnosis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998; 60: 169-94.
77. Stowell CP. Therapy with immunoglobulin: applications for monoclonal antibodies. *J Infus Nurs*. 2006; 29: S29-44.
78. Buscombe JR. The future of infection imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2006; 50: 99-103.
79. Carter P, Merchant AM. Engineering antibodies for imaging and therapy. *Curr Opin Biotechnol*. 1997; 8: 449-54.
80. Filpula D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Eng*. 2007; 24: 201-15.
81. Teillaud JL. Engineering of monoclonal antibodies and antibody-based fusion proteins: successes and challenges. *Expert Opin Biol Ther*. 2005; 5 Suppl 1: S15-27.
82. Van de Wiele C, Revets H, Mertens N. Radioimmunoimaging. *Advances and prospects*. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2004; 48: 317-25.
83. Dillman RO. Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm*. 2011; 26: 1-64.
84. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*. 2005; 23: 1126-36.
85. Sassoon I, Blanc V. Antibody-Drug Conjugate (ADC) Clinical Pipeline: A Review. *Methods Mol Biol*. 2013; 1045: 1-27.
86. Tokuhara D, Rholvarez B, Mejima M, Hiroiwa T, Takahashi Y, Kurokawa S, et al. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J Clin Invest*. 2013.
87. Drepper T, Eggert T, Circolone F, Heck A, Krauss U, Guterl JK, et al. Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol*. 2007; 25: 443-5.

88. Wang R, Xiang S, Zhang Y, Chen Q, Zhong Y, Wang S. Development of a functional antibody by using a green fluorescent protein frame as the template. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 4126-37.
89. Siepert EM, Gartz E, Tur MK, Delbruck H, Barth S, Buchs J. Short-chain fluorescent tryptophan tags for on-line detection of functional recombinant proteins. *BMC Biotechnol.* 2012; 12: 65.
90. Mukherjee A, Walker J, Weyant KB, Schroeder CM. Characterization of flavin-based fluorescent proteins: an emerging class of fluorescent reporters. *PLoS One.* 2013; 8: e64753.
91. Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories.* 2012; 11: 1-16
92. He, F. (2011). Laemmli-sds-page. *Bio-protocol* Bio101: e80
93. Pruksametanan, N., Yamabhai, M., & Khawplod, P. (2012). Selection of single chain human monoclonal antibody (scFv) against Rabies virus by phage display technology. Paper presented at the 2012 IEEE 6th International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NANOMED).
94. Rangnoi K, Jaruseranee N, O'Kennedy R, Pansri P, Yamabhai M. One-step detection of aflatoxin-B1 using scFv-alkaline phosphatase-fusion selected from human phage display antibody library. *Mol biotechnol.* 2011; 49: 240-9.
95. Sompungaa P, Pruksametananana N, Rangnoia K, Choowongkomonb K, Yamabhai M. Generation of human and rabbit recombinant antibodies for the detection of Zearalenone by phage display antibody technology. *Talanta.* 2019; 201: 397-405.
96. Miethe S, Meyer T, Wohl-Bruhn S, Frenzel A, Schirrmann T, Dubel S, et al. Production of single chain fragment variable (scFv) antibodies in *Escherichia coli* using the LEX bioreactor. *J Biotechnol.* 2013; 163: 105-11.
97. Brochet X, Lefranc M-P, Giudicelli Vr. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Research.* 2008; 36: W503–W8.
98. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research.* 2018; 46: W296-W303.
99. Schrödinger L. The PyMOL Molecular Graphics System. 1.3 ed.
100. Rangnoi K, Choowongkomon K, O'Kennedy R, Ruker F, Yamabhai M. Enhancement and Analysis of Human Antiaflatoxin B1 (AFB1) scFv Antibody-Ligand Interaction Using Chain Shuffling. *J Agric Food Chem.* 2018; 66: 5713-22.

101. Bezabeh B, Fleming R, Fazenbaker C, Zhong H, Coffman K, Yu XQ, et al. Insertion of scFv into the hinge domain of full-length IgG1 monoclonal antibody results in tetravalent bispecific molecule with robust properties. *MAbs*. 2017; 9: 240-56.
102. Vu NX, Pruksametanan N, Srila W, Yuttavanichakul W, Teamtisong K, Teaumroong N, et al. Generation of a rabbit single-chain fragment variable (scFv) antibody for specific detection of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 in both free-living and bacteroid forms. *PLOS ONE*. 2017: 1-21.
103. Schlapp G, Scavone P, Zunino P, Hartel S. Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach. *J Microbiol Methods*. 2011; 87: 234-40.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร

ผลงานวิจัยนี้ เป็นส่วนหนึ่งของทุนสนับสนุนแก่คณาจารย์ที่มีผลผลิตด้านวิจัยสูงเพื่อจ้างนักวิจัยเต็มเวลาคุณวุฒิปริญญาโท (Full-time Master Researcher) จำนวน 2 คน คือ นางสาวณัชชา พงกษา เมธานันท์ และนางสาวเพ็ญสุตา สมภูงา ที่ได้เป็นผู้ช่วยวิจัยหลักในการทำวิจัยนี้ อีกทั้ง เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาเอก จำนวน 4 คน คือ นายวิษณุ ศรีลา นางสาวจิตติมา สัมพันธ์อภัย Miss Kyaut Kay Khaing และ Miss Thae Thae Min



ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน

ผลงานจากโครงการนี้ ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ ดังนี้

- ก. งานประชุมระดับนานาชาติ
- ข. ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ
ยังไม่มี แต่กำลังอยู่ในระหว่างการเตรียมตีพิมพ์ ๒ เรื่อง
- ค. สิทธิบัตร
มีการยื่นจดสิทธิบัตร จำนวน ๓ เรื่อง
 ๑. เลขที่ยื่นจด 1901004141 เรื่อง “ชิ้นส่วนแอนติบอดีมนุษย์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมชนิดเส้นเดี่ยว (scFv) สำหรับการตรวจวิเคราะห์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยชนิดเฉียบพลัน (HL-60 AML cell)
 ๒. เลขที่ยื่นจด 1901005235 เรื่อง “แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes*”
 ๓. เลขที่ยื่นจด 1901005236 เรื่อง “แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*”



ประวัติผู้วิจัยหลัก

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ ๘ มกราคม ๒๕๑๐ เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ ๑๙ จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๒ แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา ๑ ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี ๒๕๓๖ ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา ๙ เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษา ระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. ๒๕๔๑ จากนั้นในปี พ.ศ. ๒๕๔๓-๒๕๔๕ ได้ทุนไปทำ postdoctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. ๒๕๔๖-๒๕๔๗ ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Institute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธ์รัฐเยอรมัน. สมรสกับ ศ.ดร. ดิฐธมา หาลทิช เมื่อวันที่ ๑๖ สิงหาคม ๒๕๔๗ และมีบุตร ๑ คน ชื่อ ด.ญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช เริ่มปฏิบัติงานที่ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีตั้งแต่ ปี พ.ศ. ๒๕๔๒ ดำรงตำแหน่งหัวหน้าสาขาวิชาในระหว่างปี พ.ศ. ๒๕๕๓ - ๒๕๖๒ ปัจจุบันเป็นศาสตราจารย์ และหัวหน้าห้องปฏิบัติการอนุเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอนุ (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) รวมทั้งการศึกษา กลไกออกฤทธิ์ของชีววัตถุต่อกระบวนการภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ เคยได้รับรางวัลพนักงานดีเด่นสายวิชาการ ประจำปี ๒๕๕๖ ด้านการวิจัย และรางวัลเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ประจำปี ๒๕๖๑ ผลงานวิจัยตามฐานข้อมูล ISI web of Sciences มีทั้งหมด ๔๐ เรื่อง มีจำนวน citation ๑๑๓๖ เรื่อง มี ค่า h-index ๑๗ ผลงานวิจัยตามฐานข้อมูล Scopus มีทั้งหมด ๖๑ เรื่อง มีจำนวน citation ๒๑๐๙ มี ค่า h-index ๒๒ ผลงานวิจัยตามฐานข้อมูล Google scholar มีทั้งหมด ๖๖ เรื่อง มีจำนวน citation ๒๙๘๕ มี ค่า h-index ๒๔ มี นักศึกษา ปริญญาโทที่ศึกษาจบไปแล้ว ๙ คน นักศึกษาปริญญาเอก ๗ คน