รหัสโครงการ SUT 1-102-46-36-09

รายงานการวิจัย

การสร้างเพปไทด์แอนติบอดี้สำหรับการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน

(Peptide Antibodies for Recombinant Proteins Detection)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT 1-102-46-36-09

รายงานการวิจัย

การสร้างเพปไทด์แอนติบอดี้สำหรับการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน

(Peptide Antibodies for Recombinant Proteins Detection)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร. พิชญา ตระการรุ่งโรจน์

สาขาวิชาเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รศ.ดร. เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546-2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม/2549

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ.2546-2548 ทั้งนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ ดร.จันทรกานต์ พิภพมงคล ณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ช่วยดำเนินการเรื่องการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS และท้ายสุดขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ เจ้าหน้าที่สถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยี-การเกษตร ที่ช่วยดำเนินงานด้านการเงินและบัญชีของโครงการนี้

บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการศึกษาความเป็นไปได้ของการตั้งศูนย์ผลิตเพปไทด์และแอนติบอดีในประเทศไทย รวมทั้งการผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจหาริคอมบิแนนท์โปรตีน ทั้งนี้ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการจัดตั้งศูนย์ดังกล่าวนั้น ได้จัดเตรียมสถานที่ในการทดลองที่ห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ขั้นตอนในการทดลองจะเริ่มจากการออกแบบเพปไทด์โดยพิจารณาจากโครงสร้างของโปรตีนที่สนใจ จากนั้นเพปไทด์เหล่านี้จะถูกสังเคราะห์เป็นขั้นตอนตามวิธี Fmoc solid-phase synthesis ทั้งนี้ผลที่ได้จากการศึกษา พบว่าประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เพปไทด์ยังไม่อยู่ในระดับที่เพียงพอที่จะสามารถรองรับงานวิจัยด้านการผลิตแอนติบอดีได้ เนื่องด้วยข้อจำกัดหลายด้านเทคนิค และด้านต้นทุนภายใต้ขอบเขตของโครงการวิจัยนี้ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาแล้วการจัดตั้งศูนย์การผลิตเพปไทด์ยังไม่คุ้มทุนที่จะทำได้ในเวลานี้

สำหรับการผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบริคอมบิแนนท์โปรตีนนั้น สามารถทำได้โดยการเชื่อมโมเลกุลของเพปไทด์เข้ากับโปรตีนที่ใช้เป็นตัวพาก่อนที่จะฉีดเข้าไปยังกระต่าย ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสามารถผลิตแอนติบอดีสำหรับโปรตีน BGal1 และ BGal2 ได้ โดยที่แถบของโปรตีนสามารถบ่งชี้ได้จากเทคนิค western blots หรือ immunolocalization เป็นที่น่าสังเกตว่าความบริสุทธิ์และความแรงในการเข้าจับของแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเหมือนกับที่คาดไว้สำหรับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีแอนติเจนหลายตัว อย่างไรก็ตามแอนติบอดีได้แสดงประโยชน์ในการใช้ตรวจหาริคอมบิแนนท์ฟิวชันโปรตีนในตัวอย่างสกัดจากเซลล์ *E.coli* รวมทั้งในระหว่างกระบวนการแยกสารบริสุทธิ์ และยังใช้ตรวจหาโปรตีนในเนื้อเยื่อข้าวโดยการทำ immunostaining ได้อีกด้วย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This research was aimed to study the possibility in establishing a facility of peptide and anti-peptide antibody production center in Thailand, and to produce antibodies to aid in detection and characterization of recombinant proteins. To evaluate a potentiality in establishing a facility for peptide and antibody production, a small peptide synthesis laboratory was set up at Suranaree University of Technology. First, the peptides for this work were designed based on sequences of the proteins for which antibodies were to be developed. Then the target peptides were manually synthesized using the batch-wise Fmoc solid-phase synthesis method. Results from this study showed that optimal level of efficiency in peptide synthesis to fully support antibody production could not be reached. By considering limitations of this research project both in technical and economical aspects, setting up a local facility for this purpose is not considered as cost-effective at the present time.

The second part of this research project is to produce antibodies to aid in detection and characterization of recombinant proteins. Useful antibodies could be generated by coupling peptides to carrier proteins and injecting the peptide-carrier protein complex into rabbits. Protein bands could be identified in the western blots of proteins produced from each of the proteins. In addition, the antibodies gave a specific labeling of cells and tissues in immunolocalization experiments. It might be noted that the purity and strength of the antibodies was not as high as one might expect for antibodies against proteins with multiple antigens. None-the-less, the antibodies did prove useful in detection of recombinant fusion proteins in E. *coli* extracts and during purification, as well as in detection of the proteins in rice tissues by immunostaining.

สารบัญเรื่อง

		หน้า
กิติกรรมประกาศ		ก
บทคัดย่อภาษาไทย		ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ค
สารบัญเรื่อง		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญภาพ		ฉ
สารบัญแผนภาพ		ช
คำอธิบายสัญลักษณ์		ญ
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
	1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	8
	1.3. ขอบเขตของการวิจัย	8
	1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	8
บทที่ 2	วิธีดำเนินการวิจัย	9
	2.1. การออกแบบเพปไทด์เป้าหมาย	9
	2.2. การสังเคราะห์เพปไทด์	13
	2.3. วิธีการสังเคราะห์เพปไทด์	21
	2.4. การผลิตแอนติบอดี	23
บทที่ 3	ผลการทดลองและบทวิเคราะห์	27
	3.1. ผลการทดลองและบทวิเคราะห์เรื่องการสังเคราะห์เพปไทด์	27
	3.2. ผลการทดลองและบทวิเคราะห์เรื่องการผลิตแอนติบอดี	75
บทที่ 4	บทสรุป	83
บรรณานุกรม		85
ประวัติผู้วิจัย		87

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2-1 เพปไทด์ที่ออกแบบขึ้นเพื่อใช้ผลิตแอนติบอดี 12
ตารางที่ 2-2 หมู่ปกป้องที่ตำแหน่ง side chain ที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ 17
ตารางที่ 3-1 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยา ELISA สำหรับเทคนิค immunoreactivity กับ เพปไทด์ BGal1 ของกระต่าย M1 75
ตารางที่ 3-2 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยา Immunoreactivity ของซีรัมกระต่าย M4 M5 และ M6 ซึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเพปไทด์ BGal2 78

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1-1 แบบแผนการสังเคราะห์ตามแบบ Merrifield 7
ภาพที่ 1-2 แบบแผนการสังเคราะห์โดยใช้วิธี FMoc Solid Phase Synthesis 8
ภาพที่ 2-1 การเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Bgal1 และ Bgal2 (Amino acid alignment) 11
ภาพที่ 2-2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์ 15
ภาพที่ 3-1 โครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ rBGlu1-1n2 35
ภาพที่ 3-2 โครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ rBGlu1-2 42
ภาพที่ 3-3 โครงสร้างทางเคมี และโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ rbgal2 50
ภาพที่ 3-4 โครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ RiceSFR2.1 59
ภาพที่ 3-5 โครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ 8mers 62
ภาพที่ 3-6 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยา ELISA กับเพปไทด์ BGal1 ในช่วงก่อนการกระตุ้น (1)และหลังการกระตุ้น (2-7) ในกระต่าย M1 75
ภาพที่ 3-7 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในตัวอย่างเลือดกระต่ายต่อแอนติเจน BGal2 ซึ่งได้มาจากการเชื่อมต่อระหว่างเพปไทด์ BGal2 กับโปรตีนตัวพา (A) กระต่าย M5 (B) กระต่าย M4 (C) กระต่าย M6 77
ภาพที่ 3-8 การทดสอบด้วยเทคนิค Dot blot ของปฏิกริยา immunoreactivity โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 79
ภาพที่ 3-9 แสดงแผ่นเจล 10% SDS-PAGE (A) และ immunoblot (B) ของโปรตีน BGal2 ที่ผลิตในเซลล์เจ้าบ้าน E.coli สายพันธุ์ Origami B โดยการใช้พลาสมิด pET32a เป็นพาหะ หลังจากผ่านการแยกบริสุทธิ์มาแล้ว 3 ขั้นตอน โดยใช้ตัวอย่างในการรันเจล 5 μg 81
ภาพที่ 3-10 แสดง 10% S S-PAGE เจล (A) และ immunoblot (B) และ (C) โปรตีนรวมที่สกัดจากข้าวที่มีอายุ 7 วันและ 1 เดือน 82

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1-1 ขั้นตอนในการสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ตามวิธี solid-phase synthesis 6
แผนภาพที่ 2-1 การสังเคราะห์ตามแบบแผน Fmoc-solid phase peptide synthesis 14
แผนภาพที่ 2-2 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกรดอะมิโนเข้ากับ wang resin ตามด้วยการทำให้เพปไทด์หลุดออกจากเรซิน 16
แผนภาพที่ 2-3 กลไกในการเกิดปฏิกิริยาของการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc 16
แผนภาพที่ 2-4 กลไกในการสร้างพันธะโดยใช้รีเอเจนต์ในกลุ่ม carbodiimide 19
แผนภาพที่ 2-5 กลไกในการสร้างพันธะเพปไทด์โดยใช้รีเอเจนต์ในกลุ่มเกลือ uranium และ phosphonium 19
แผนภาพที่ 2-6 ปฏิกิริยาของ Kaiser test 20
แผนภาพที่ 3-1 การเชื่อม Fmoc-Asp(OtBu)-OH เข้ากับ wang resin 27
แผนภาพที่ 3-2 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-NH_2 บนเรซิน 28
แผนภาพที่ 3-3 ลำดับขั้นตอนในการสังเคราะห์จนได้เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-NH_2 บนเรซิน 29
แผนภาพที่ 3-4 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน 30
แผนภาพที่ 3-5 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln (Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-NH_2 บนเรซิน 31
แผนภาพที่ 3-6 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-Gln(Trt)-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน 32
แผนภาพที่ 3-7 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Gly-NH_2 บนเรซิน 33
แผนภาพที่ 3-8 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Gly-Lys(Boc)-NH_2 บนเรซิน 34
แผนภาพที่ 3-9 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-NH_2 บนเรซิน 36
แผนภาพที่ 3-10 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr (tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-NH_2 บนเรซิน .. 37

แผนภาพที่ 3-11 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน 38
แผนภาพที่ 3-12 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)- Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Ala-NH_2 บนเรซิน 39
แผนภาพที่ 3-13 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln (Trt)-Asp(O-tBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Ala-Pro-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-NH_2 บนเรซิน 40
แผนภาพที่ 3-14 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(O-tBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Pro-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Gly-Cys(Trt)-NH_2 บนเรซิน 41
แผนภาพที่ 3-15 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-NH2 บนเรซิน 43
แผนภาพที่ 3-16 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-NH2 บนเรซิน 44
แผนภาพที่ 3-17 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน 45
แผนภาพที่ 3-18 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน 46
แผนภาพที่ 3-19 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc) Ala-Gly-Ser (tBu)-Gly-Met-Val-NH_2 บนเรซิน 47
แผนภาพที่ 3-20 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc) Ala-Gly-Ser (tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-NH_2 บนเรซิน 48
แผนภาพที่ 3-21 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc) Ala-Gly-Ser(tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-NH_2 บนเรซิน 49
แผนภาพที่ 3-22 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-Ser(tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Cys(Trt)-NH_2 บนเรซิน 50
แผนภาพที่ 3-23 การต่อเชื่อมกรดอะมิโน Leucine เข้ากับ wang resin 51
แผนภาพที่ 3-24 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-NH_2 บนเรซิน ... 52
แผนภาพที่ 3-25 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-NH_2 บนเรซิน 53
แผนภาพที่ 3-26 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-NH_2 บนเรซิน 54

แผนภาพที่ 3-27 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Arg(Mtr)-NH_2 บนเรซิน 55
แผนภาพที่ 3-28 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Arg(Mtr)-Glu (OtBu)-Gln(Trt)-NH_2 56
แผนภาพที่ 3-29 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Arg(Mtr)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Pro-NH_2 บนเรซิน 57
แผนภาพที่ 3-30 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Pro-Cys(Trt)-NH_2 บนเรซิน 58
แผนภาพที่ 3-31 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-NH_2 บนเรซิน 60
แผนภาพที่ 3-32 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน 61
แผนภาพที่ 3-33 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-NH_2 บนเรซิน 63
แผนภาพที่ 3-34 การต่อกรดอะมิโน serine เข้ากับ wang resin 64
แผนภาพที่ 3-35 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-NH_2 บนเรซิน 65
แผนภาพที่ 3-36 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน 66
แผนภาพที่ 3-37 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-NH_2 บนเรซิน 67
แผนภาพที่ 3-38 การต่อกรดอะมิโน Fmoc-Phe-OH เข้ากับ wang resin 68
แผนภาพที่ 3-39 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Phe-Lys(Boc)-Ile-Fmoc บนเรซิน 69
แผนภาพที่ 3-40 การเกิดขึ้นของสารประกอบ diketopiperazine 71
แผนภาพที่ 3-41 การเกิดพันธะ disulfide ในเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน cystein 72
แผนภาพที่ 3-42 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ methionine เป็น methionine sulfoxide 72
แผนภาพที่ 3-43 ปฏิกิริยาแสดงการเกิด ornithine 72
แผนภาพที่ 3-44 ปฏิกิริยาของการเกิด δ-lactam 73
แผนภาพที่ 3-45 การเกิดหมู่ α- and β-aspartyl ในเพปไทด์ 73
แผนภาพที่ 3-46 กลไกในการเกิด aspartimide 73

คำอธิบายสัญลักษณ์

Boc	tert-butyloxycarbonyl
BOP	(benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichloromethane
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	dimethylformamide
EDC	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide
Fmoc	*N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl
HBTU	O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
Mtr	4-methoxy-2,3,6-trimethyl-benzenesulfonyl
Pmc	2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulfonyl
TBTU	O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate
tBu	tertiary-butyl
TEA	triethylamine
TFA	trifluoroacetic acid
Trt	triphenylmethyl

ตัวอย่างการเรียกชื่อกรดอะมิโน

Fmoc-Ala-OH	Fmoc-L-Ala
Fmoc-Leu-OH	Fmoc-L-Leu
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Fmoc-(O-tert-butyl)-L-Ser
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Fmoc-(O-tert-butyl)-L-Thr
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-Asp-4-tert-butyl ester
Fmoc-Arg(Mtr)-OH	N_{α}-Fmoc-N_{ω}-(4-methoxy-2,3,6-trimethyl-benzenesulfonyl)-L-Arg

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

1.1.1 แอนติบอดี (Antibody)

แอนติบอดีเป็นโปรตีนที่สร้างจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลแปลกปลอม และเป็นเครื่องมือที่มีความสำคัญทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาของเซลล์ การผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใดโปรตีนหนึ่งนั้นทำให้สามารถบ่งชี้โปรตีนชนิดเป้าหมายที่ผสมอยู่กับโปรตีนตัวอื่นได้ด้วยเทคนิคเวสเทอร์นบลอทอิมมูโนวิเคราะห์ (Western blot immuno detection) นอกจากนั้นยังสามารถใช้ตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค immunosorbant assay (ELISA) หรือ radioimmune assay (RIA) หรือเพื่อเป็นการบ่งชี้ตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีนในเซลล์เนื้อเยื่อโดยเทคนิค immunomicroscopy (Coligan et al., 1999) การที่แอนติบอดีมีโครงสร้างที่จำเพาะนั้นยังนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนได้ด้วย การนำเพปไทด์ที่เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนมาใช้เป็นแอนติเจนนั้นเป็นวิธีที่สะดวกในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนนั้นเป้าหมาย (Doolittle, 1978) ดังนั้นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ (anti-peptide antibody) จึงเป็นเครื่องมือที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อใช้ในการตรวจหาโปรตีน isoform ต่างๆ และศึกษาการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ทั้งในระบบธรรมชาติ (native system) และระบบรีคอม-บิแนนท์ (recombinant system)

1.1.2 การผลิตแอนติบอดี

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่สนใจนั้นผลิตได้โดยการฉีดโมเลกุลแปลกปลอม (foreign molecule) เข้าไปยังสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โดยเรียกโมเลกุลเหล่านั้นว่าเป็นแอนติเจน จากนั้นระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) จะตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไปโดยสร้างแอนติบอดีขึ้น (ผลิตโดยบี-ลิมโฟไซต์ที่จำเพาะ) โดยแอนติบอดีที่สร้างขึ้นเหล่านั้นจะสามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ และถูกปล่อยเข้าสู่ระบบกระแสเลือด แม้ว่าในช่วงแรกของการกระตุ้น (initial immunization) ระบบภูมิคุ้มกันจะมีการผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณเล็กน้อย แต่จะสามารถผลิตแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมากสำหรับการกระตุ้นในครั้งต่อไปเนื่องจากผลของการจดจำได้ของระบบภูมิคุ้มกัน (immune memory) ระบบดังกล่าวนี้เป็นประโยชน์ในการนำมาสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเป้าหมาย เช่น โปรตีนที่ต้องการจะศึกษา อย่างไรก็ตาม ในระบบภูมิคุ้มกันมีอิมมูโนโกลบูลิน (immuno globulin) หลายชนิดที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อแอนติเจน แต่โดยส่วนใหญ่แล้วเฉพาะ

อิมมูโนโกลบูลิน ชนิดจี (IgG) ที่นำมาใช้ในการศึกษา และยังสามารถนำมาแยกให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีการแยกบริสุทธิ์ขั้นพื้นฐานที่ใช้กับโปรตีนทั่วไป (การตกตะกอนโปรตีน และการการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี) หรือใช้การจับแบบจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนจี หรือโปรตีนเอ (Andrew and Titus, 1977)

โดยทั่วไปแล้ว มีแอนติบอดี 2 ชนิดที่นำมาใช้กันคือ แบบโพลีโคลนอล (polyclonal antibody) และ แบบโมโนโคลนอล (monoclonal antibody) โดยโพลีโคลนอลแอนติบอดีเป็นส่วนผสมของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากสัตว์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วได้มาจากเลือด หรือไข่แดงของไก่ (Cooper and Paterson, 1995) แอนตีซีรัมนี้จะประกอบไปด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนหลากหลายชนิดทั้งที่สัตว์ได้รับมาและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเป้าหมายที่ใช้ในการทดลอง โดยผลิตจากทีเซลล์ (T-cell) ที่มีส่วนของอิพิโทป (epitope) ที่มีความจำเพาะแตกต่างกันไป สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นผลิตมาจากเซลล์ immortal hybridomas ซึ่งได้มาจากที-เซลล์ที่มีความจำเพาะ โดยทำการคัดเลือกเฉพาะที่ทำปฏิกริยากับแอนติเจนที่สนใจเท่านั้น เซลล์เหล่านี้สามารถขยายจำนวนได้ภายนอกสิ่งมีชีวิต (in vitro cell culture) หรือในช่องท้องของหนู (peritineal cavity) เพื่อให้เกิดการสะสมของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่สนใจในของเหลวที่อยู่ในช่องท้อง ทั้งนี้ยีนของแอนติบอดียังสามารถโคลนขึ้นได้เพื่อใช้ผลิตแอนติบอดีหรือทำการดัดแปลงยีนโดยใช้ระบบรีคอมบิแนนท์ (recombinant system)

แม้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะมีข้อดีในเรื่องของความจำเพาะและการขยายจำนวน (scalability) แต่ว่าในกระบวนการผลิตแล้วโพลีโคลนอลแอนติบอดีนั้นสามารถผลิตได้ง่ายกว่า และมีต้นทุนต่ำ อีกทั้งยังสามารถผลิตได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปทำงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์โปรตีน การทำให้แอนติบอดีมีความจำเพาะมากยิ่งขึ้นสามารถทำได้โดยนำมาผ่านการแยกบริสุทธิ์โดยเทคนิค immunoaffinity โดยการจับอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่สนใจ หรือการใช้เทคนิคการดูดซับ ตัวอย่างเช่น แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ผลิตในเซลล์ *E.coli* จะถูกดูดซับโดยโปรตีนที่จำเพาะที่อยู่ในเซลล์ที่แตกแล้ว (*E.coli* lysate) ส่วนแอนติบอดีตัวอื่นที่จำเพาะต่อโปรตีนของ *E.coli* ก็จะถูกกำจัดไป

1.1.3 การประยุกต์ใช้แอนติบอดีในการตรวจจับและการอธิบายลักษณะของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

ในระหว่างขั้นตอนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนนั้น การตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนมีความสำคัญมาก ดังนั้นแอนติบอดีที่ทำหน้าที่ในการจดจำโปรตีนจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการตรวจหาดังกล่าว (Cicek and Esen, 1999) ในระหว่างการผลิตโปรตีนนั้นอาจจะมีข้อสงสัยได้หากโปรตีนนั้นถูกสร้างขึ้นเพียงปริมาณเล็กน้อย หรืออาจไม่ได้สร้างขึ้นเลย โดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้

เทคนิคการทำ SDS-PAGE ในการตรวจหาโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้จะใช้ได้ผลดีในกรณีที่โปรตีนมีการแสดงออกในปริมาณมาก หรือเป็นโปรตีนที่มีขนาดจำเพาะที่แตกต่างออกไปจากโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านเท่านั้น อนึ่งการตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity assay) ก็เป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีความไวต่อการตรวจหาโปรตีนเช่นกัน แต่ถ้าโปรตีนมีค่าแอคติวิตีต่ำจะทำให้ไม่สามารถแยกออกจากแอคติวิตีของโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านได้ (Ketudat Cairns et al., 2000) นอกจากนั้น โปรตีนที่สร้างขึ้นอาจมีโครงสร้างที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive form) ซึ่งในกรณีดังกล่าวจะมีปัจจัยที่ต้องศึกษาแตกต่างไปจากกรณีที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเลย ดังนั้นการทดสอบสารสกัดจากเซลล์ (cell extract) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ (media) โดยการทำเทคนิคอิมมูโนวิเคราะห์ (immunoblot analysis) หรือ immunoassay นั้นจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการวิเคราะห์ตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งเทคนิค immunoblotting อาจใช้เพื่อตรวจสอบความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (heterogeneity) ของสารละลายโปรตีนจากการเกิดการดัดแปลงภายโมเลกุลของโปรตีนภายหลังการแปลรหัส (postranstlational modification) ในระบบรีคอมบิแนนท์ ยกตัวอย่างเช่น การเกิดไกลโคซิเลชั่น (glycosylation) หรือการย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ (anti-peptide antibody) ยังช่วยในการปรับแต่งสภาวะในการปรับปรุงคุณภาพของโปรตีน เช่น การลดปริมาณการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีน fibrilligen ในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* (Pearson et al., 1999) ในความเป็นจริงแล้วแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ affinity tag ยังใช้ประโยชน์เพื่อแยกบริสุทธิ์โปรตีนได้อีกด้วย เช่น His6-tag หรือ FLAG tags ซึ่งนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน อย่างไรก็ตามแอนติบอดีเหล่านี้มีแนวโน้มในการนำมาใช้ประโยชน์น้อยลง ในกรณีที่เกิดการย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) แล้วส่วนที่เป็น tag นั้นหลุดออกไปด้วย ดังนั้นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่เราสนใจนั้นมีข้อดีกว่าและยังนำมาใช้ประโยชน์ในการจดจำโปรตีนที่สนใจออกจากโปรตีนตัวอื่นได้อีกด้วย

นอกจากการนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนรวมทั้งคุณภาพของโปรตีนแล้ว แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ (anti-peptide antibody) ยังสามารถใช้ทำเทคนิคimmunoaffinity เพื่อแยกบริสุทธิ์โปรตีนออกจากแหล่งรีคอมบิแนนท์หรือแหล่งจากธรรมชาติ (Katoh et al., 1997) หรือถ้าแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อไอโซไซม์ (isozyme) ชนิดใดชนิดหนึ่งแล้วยังนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์หาแหล่งที่อยู่ของไอโซไซม์นั้น ๆ ในเนื้อเยื่อได้ (tissue distribution and cellular location) เพื่อเป็นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับหน้าที่ของแต่ละไอโซไซม์ (isozyme)ในสิ่งมีชีวิต (Cicek and Esen, 1998; da Cruz y Silva et al., 1999; Broawn et al., 1998; Mosckovitz et al., 1993)

1.1.4 การใช้เพปไทด์เป็นแอนติเจน

การใช้เพปไทด์เป็นแอนติเจนนั้น มีการนำมาใช้ตั้งใหญ่แล้วตั้งแต่ปี 1980 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับของโปรตีน (protein sequence) (Lerner et al., 1981; Doolittle, 1987) ลำดับของโปรตีนมาจากการหาลำดับโปรตีนหรือ DNA (protein/or DNA sequencing) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของแอนติเจนว่าส่วนใดของโปรตีนที่ยื่นออกมาข้างนอก (โดยการทำ hydropathy analysis) รวมทั้งคุณสมบัติอื่นๆ ของ antigenicity ของโปรตีนธรรมชาติ (native protein) และโปรตีนที่เสียสภาพ (denatured protein) (Kyte and Doolittle, 1982) โดยการทำเปรียบเทียบลำดับโปรตีนที่เราสนใจกับโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้อง (related protein) ด้วยการทำ multiple sequence analysis โดยส่วนที่ลำดับกรดอะมิโนเป็น highly conserved หรือ highly divergent sequence สามารถนำมาใช้ในการผลิตเพปไทด์แอนติเจนเพื่อสร้างเป็นแอนติบอดีที่ความจำเพาะทั่วไป (general) หรือที่มีความจำเพาะมาก (specific) ตามลำดับ ข้อสำคัญอีกประการหนึ่งคือลำดับโปรตีนของแอนติเจน (antigenic sequence) นั้นต้องแตกต่างไปจากโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านเพื่อเป็นการคัดเลือกเฉพาะการตอบสนองที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปแล้วลำดับโปรตีนที่แตกต่างออกไป (divergent sequence) จะให้แอนติบอดีที่มีประโยชน์สำหรับการตรวจหาโปรตีนในสิ่งมีชีวิต (in vivo) เนื่องจากสามารถใช้ในการบ่งชี้โครงสร้างจำเพาะของโปรตีนได้ (Brown et al., 1998; da Cruz e Silva et al., 1995) แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่สามารถเกิดปฏิกริยาข้ามพวก (cross reactive) ได้อาจมีประโยชน์ในการบ่งชี้โปรตีนที่มีลักษณะพื้น-ฐานทั่วไปในระบบรีคอมบิแนนท์ (recombinant system) หรือระบบธรรมชาติ (native system) (Cicek and Esen,1998) เมื่อไม่นานนี้มีการพัฒนาโปรแกรมที่ใช้ง่าย เช่น โปรแกรม Swiss-sProt PDBviewer เพื่อใช้หาโครงสร้างโปรตีนด้วยวิธี homology modeling โดยใช้โปรตีนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือใกล้เคียง (related protein) เป็นโครงสร้างต้นแบบทำให้สามารถหาส่วนที่เป็นที่ยื่นออกไปสู่ภายนอก (external loop) ในโปรตีนธรรมชาติ ได้อย่างง่ายดาย (Guex and Peutsch, 1997) ความรู้จาก homology modeling และการทำ sequence alignment เพื่อใช้ในการหาบริเวณที่ยื่นออกไปภายนอก (exposed loops) และเป็นตำแหน่งที่แตกต่างออกไปจากโปรตีนอื่นสามารถนำมาใช้ในการออกแบบเพปไทด์แอนติเจน

1.1.5 หลักการในการสังเคราะห์เพปไทด์

สารประกอบเพปไทด์ได้ถูกใช้ในการศึกษาวิจัยทางด้านเคมีและชีวเคมีอย่างกว้างขวาง โดยทั่วไปสารประกอบเพปไทด์อาจจะมีโครงสร้างเป็นโซ่ตรง โครงสร้างเป็นกิ่ง หรืออยู่ในรูปที่เป็นวงก็ได้ สารประกอบเพปไทด์นั้นอาจจะประกอบขึ้นจากกรดอะมิโนพื้นฐานทั้ง 20 ชนิด ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโนประเภทที่เรียกว่า alpha amino acids ที่มีคอนฟิกุเรชันเป็นแบบ L หรืออาจจะประกอบขึ้นจากโมเลกุลของกรดอะมิโนชนิดที่ไม่ธรรมดาก็ได้ การสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์สามารถทำ

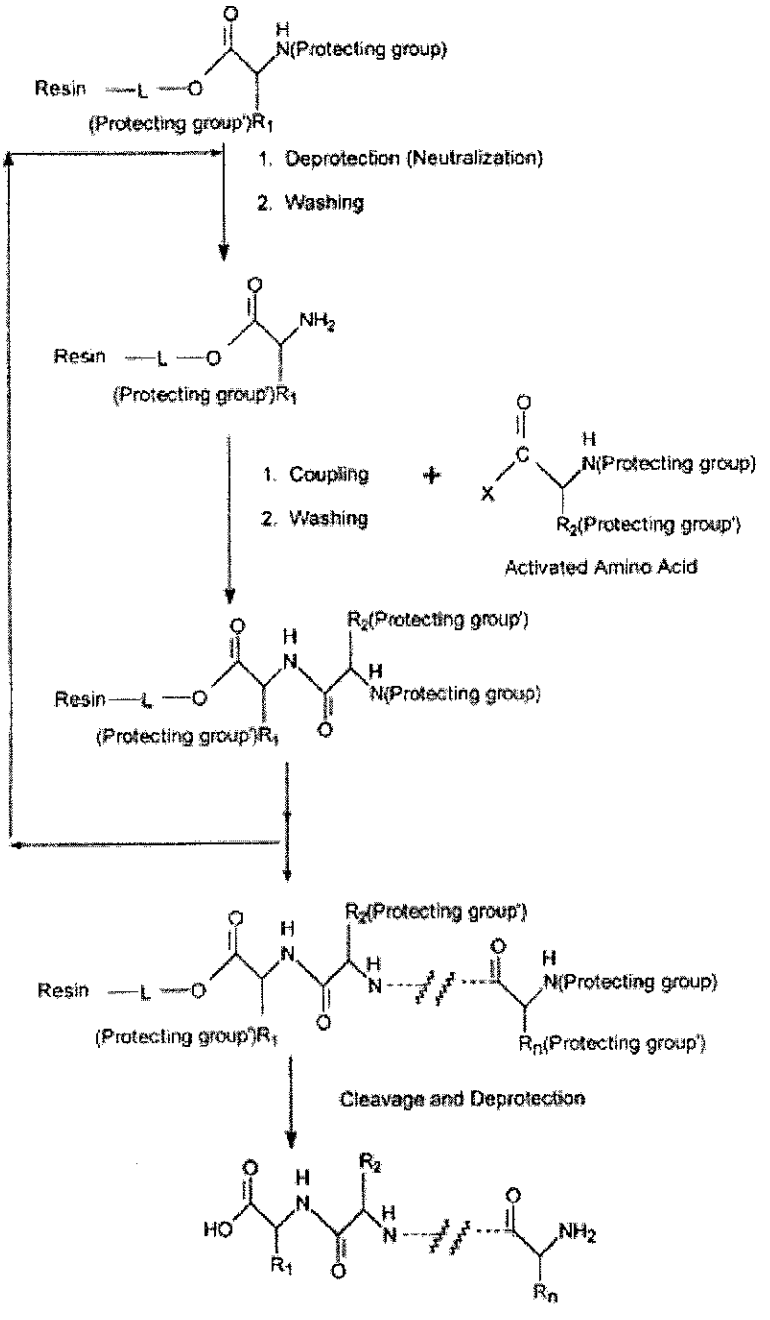
ได้ 2 แบบคือ การสังเคราะห์ในลักษณะสารละลาย หรือ solution-phase และการสังเคราะห์วิธี solid-phase

การสังเคราะห์เพปไทด์ในสารละลาย หรือ solution-phase นั้น เป็นวิธีการในการสังเคราะห์แบบดั้งเดิม ซึ่งมักจะใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ในปริมาณมาก ๆ หรือในกรณีที่จะต่อเชื่อมกรดอะมิโนชนิดที่ไม่ธรรมดา อย่างไรก็ตามข้อเสียของการสังเคราะห์โดยวิธีการนี้ คือ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างพันธะเพปไทด์เพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินไปแล้วให้เปอร์เซ็นต์ปริมาณของผลิตภัณฑ์สูง นอกจากนั้นความจำเป็นในการทำสารอินเทอร์มิเดียตให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะทำปฏิกิริยาในขั้นต่อ ๆ ไปก็เป็นความไม่สะดวกอีกอย่างหนึ่งของสารสังเคราะห์โดยวิธีนี้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการสังเคราะห์แบบ solid-phase (SPPS = Solid-Phase Peptide Synthesis) ขึ้นมา โดยมีผู้ริเริ่มคือ R. B. Merrifield ในปี 1963 ซึ่งวิธีการในการสังเคราะห์ก็ได้ถูกพัฒนาดัดแปลงต่อมา ซึ่งในปัจจุบันจัดได้ว่าเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว และยังสามารถใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ด้วย

หลักการในการสังเคราะห์ตามวิธี solid-phase peptide synthesis คือ การสร้างเพปไทด์บนเร-ซินซึ่งเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ วิธีนี้ทำให้รีเอเจนต์ส่วนที่เติมเกินมาสามารถถูกกำจัดออกได้โดยเพียงแค่การกรองและล้างเรซินที่มีเพปไทด์เกาะอยู่เท่านั้น ขั้นตอนในการสังเคราะห์เพปไทด์ ก็ไม่ยุ่งยาก โดยเริ่มจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนตัวแรกกับหมู่เชื่อมที่ยื่นมาจากเรซิน เพื่อสร้างพันธะโคเวเลนต์ หลังจากนั้นก็จะเป็นการสร้างพันธะเพปไทด์เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนตัวต่อ ๆ มา ตามที่แสดงในแผนภาพที่ 1-1

ในการเพิ่มกรดอะมิโนลงไปในสายเพปไทด์นั้น โดยทั่วไปแล้วจะเริ่มจากปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group, -COOH) ไปยังปลายด้านหมู่อะมิโน (amino group, $-NH_2$) ทั้งนี้ได้มีการพิสูจน์แล้วว่าการสังเคราะห์ตามลำดับขั้นตอนดังกล่าวนี้ จะทำให้เกิด racemization น้อยกว่าการสังเคราะห์ที่เริ่มจากปลายของหมู่อะมิโน โดยสรุปแล้วลำดับขั้นตอนของการสังเคราะห์เพปไทด์นั้นจะประกอบไปด้วย

1. การเชื่อมกรดอะมิโนตัวแรกกับเรซิน หรือ solid support
2. หมู่ปกป้องชั่วคราวของหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนตัวแรกจะถูกกำจัดออก เพื่อให้ได้หมู่อะมิโนอิสระ (free amino) ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวถัดไปได้
3. การสร้างพันธะเพปไทด์เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนตัวใหม่ หมุนเวียนกันเป็นลำดับขั้นตอนตามข้อ 2-3 ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้สายเพปไทด์ตามที่ต้องการ
4. เพปไทด์ที่ได้ก็จะถูกทำให้หลุดออกมาจากเรซินโดยใช้ cleaving reagents ซึ่งในขั้นตอนนี้จะกำจัดหมู่ปกป้องของ side chains ทั้งหมดออกไปในคราวเดียวกันด้วย

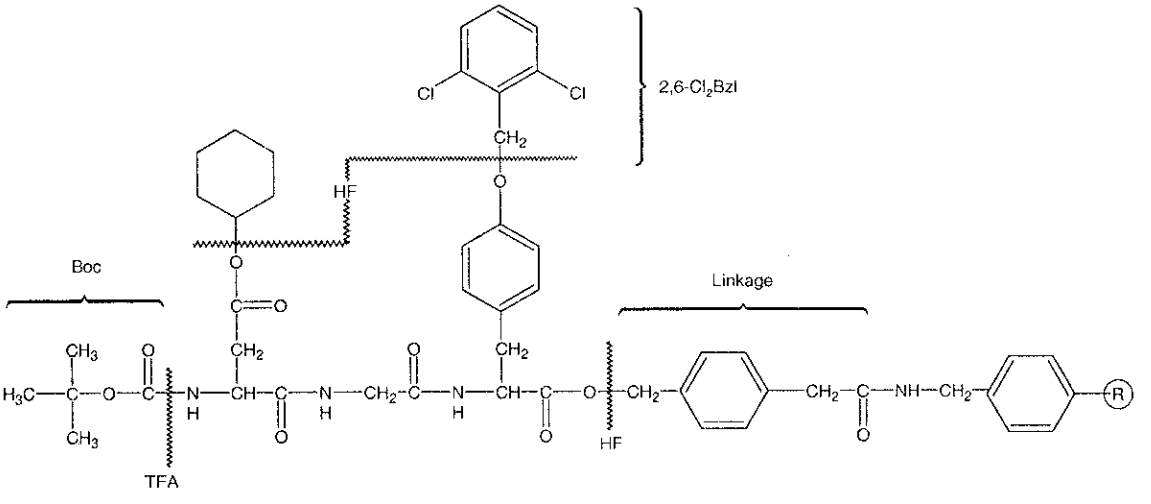


แผนภาพที่ 1-1 ขั้นตอนในการสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ตามวิธี solid-phase synthesis
(แหล่งที่มา: http://www.protein.iastate.edu/synthesis_fig1.html)

การเลือกใช้หมู่ปกป้อง (protecting group) ก็มีส่วนสำคัญในการสังเคราะห์เพปไทด์ ซึ่งในการสังเคราะห์เพปไทด์นิยมแบ่งหมู่ปกป้องออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ หมู่ปกป้องของหมู่อะมิโนในตำแหน่งแอลฟาไนโตรเจนซึ่งเรียกว่าหมู่ปกป้องชั่วคราว (temporary protecting group) ซึ่งจะต้องกำจัดออกทุกครั้งเพื่อสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนตัวถัดไป และหมู่ปกป้องของ side chain ที่

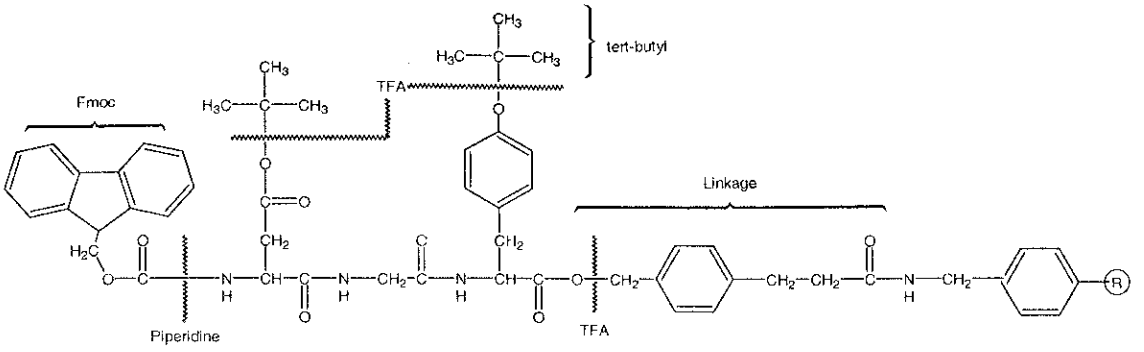
เรียกว่าหมู่ปกป้องถาวร (permanent protecting group) ซึ่งจะถูกกำจัดออกในขั้นตอนสุดท้ายพร้อมกันกับการทำให้เพปไทด์หลุดออกจากเรซิน

ทั้งนี้หมู่ปกป้องอะมิโนในตำแหน่งแอลฟาไนโตรเจนนั้น ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ ได้แก่ การใช้หมู่ปกป้อง tert-butyloxycarbonyl (Boc) และการใช้หมู่ปกป้อง 9-fluorenyl methyloxy carbonyl (FMoc) สำหรับระบบแรกที่ใช้หมู่ปกป้อง Boc- นั้น สามารถเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า standard Merrifield system หมู่ Boc- นี้จะมีความเสถียรในตัวทำละลายที่เป็นเบส และสามารถกำจัดออกได้อย่างรวดเร็วในสารละลายกรดแก่ เช่น trifluoroacetic acid (TFA) หมู่ปกป้องของหมู่อะมิโน side chain สำหรับการสังเคราะห์ในระบบนี้ จะใช้เป็นอนุพันธ์หมู่เอสเทอร์ อีเทอร์ และยูรีเทน ของ benzyl alcohol ซึ่งสามารถกำจัดออกได้โดยใช้ anhydrous hydrogen fluoride (HF) ที่ 0 °C หรือ trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA) ที่ 25 °C ดังแสดงในภาพที่ 1-1



ภาพที่ 1-1 แบบแผนการสังเคราะห์ตามแบบ Merrifield

สำหรับอีกระบบหนึ่งคือ การใช้หมู่ 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (FMoc) ดังแสดงในภาพที่ 1-2 ซึ่งการสังเคราะห์ในระบบนี้จะใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง และเป็นระบบที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน ดังนั้นสำหรับโครงการวิจัยนี้ จึงได้เลือกวิธีการนี้ในการสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ หมู่ FMoc นี้ซึ่งจะมีความเสถียรในสภาวะที่เป็นกรด และสามารถจะถูกกำจัดออกได้โดยใช้สารละลาย piperidine สำหรับหมู่ปกป้อง side chains จะใช้เป็นอนุพันธ์ เอสเทอร์ อีเทอร์ และยูรีเทน ของ tert-butanol ซึ่งสามารถกำจัดออกได้พร้อมกันกับปฏิกิริยาการทำให้เพปไทด์หลุดออกจากเรซิน โดยใช้ TFA และเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้ คาร์โบแคทไอออน (carbocation) ที่มีความไวต่อปฏิกิริยาซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อหมู่ปกป้องหลุดออกมาจาก side chain ทำปฏิกิริยากับเพปไทด์ที่ไม่มีหมู่ปกป้อง จึงต้องมีการใส่สารตัวจับไอออนเหล่านี้ ซึ่งเรียกว่า scavengers ลงไปด้วย



ภาพที่ 1-2 แบบแผนการสังเคราะห์โดยใช้วิธี FMoc Solid Phase Synthesis

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อเป็นการศึกษาในเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการตั้งศูนย์ในการสังเคราะห์เพป-ไทด์ และผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ (anti-peptide antibody) ในประเทศไทย

1.2.2 เพื่อผลิตแอนติบอดี ซึ่งช่วยในการตรวจสอบและระบุโครงสร้างของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 การศึกษาวิจัยเพื่อการสังเคราะห์เพปไทด์ ได้ออกแบบการศึกษาทดลองตามวัสดุอุปกรณ์ สถานที่ ห้องปฏิบัติการ รวมทั้ง เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ซึ่งสามารถจัดหาได้ ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเป็นหลัก ส่วนการวิเคราะห์โดยเทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS) ได้ทำการวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

1.3.2 ในโครงการวิจัยนี้ การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์จะได้ถูกผลิตขึ้นโดยมุ่งเน้นเพื่อนำไปใช้ในชุดโครงการร่วมที่จะทำการผลิตและวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ รวมทั้งปัญหาและอุปสรรคในการสังเคราะห์เพป-ไทด์สำหรับการผลิตแอนติบอดีซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อโปรตีน เพื่อใช้ในการตรวจสอบและศึกษาโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งข้อมูลในเบื้องต้นที่ได้นี้จะมีประโยชน์ต่อการนำไปพิจารณาเพื่อตั้งศูนย์ผลิตเพปไทด์และแอนติบอดีในประเทศไทยในอนาคต

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

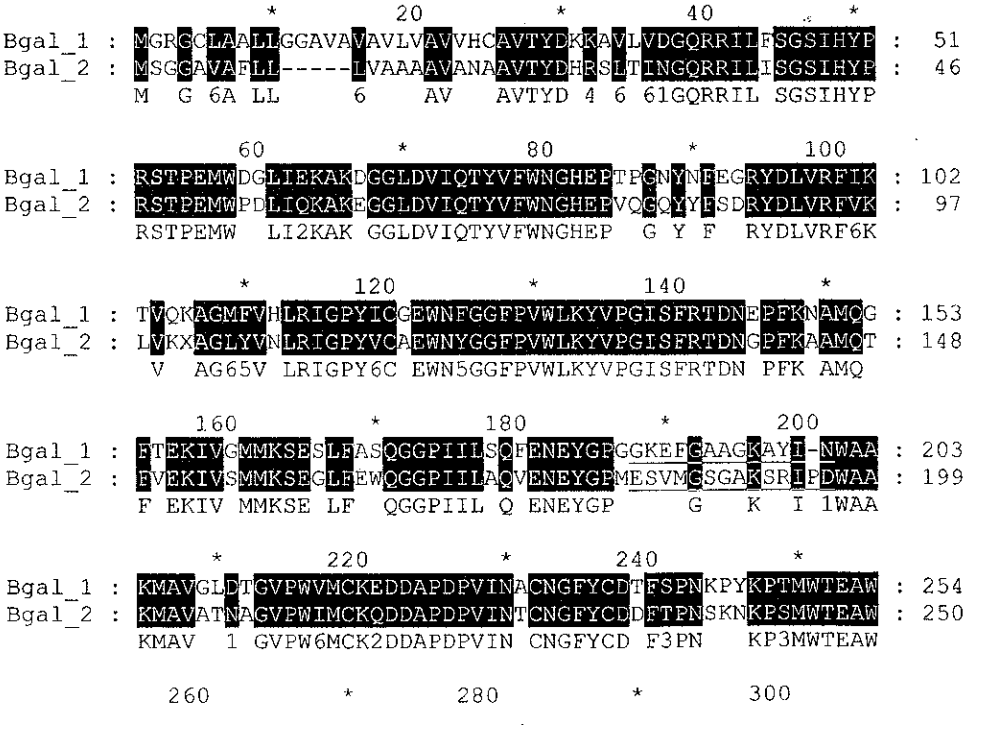
บทนี้จะกล่าวถึงระเบียบวิธีดำเนินการวิจัยของโครงการนี้ ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 3 ตอนใหญ่ ๆ โดยจะเริ่มจากการออกแบบเพปไทด์เป้าหมายที่ต้องการสังเคราะห์ ตามมาด้วยขั้นตอนและวิธีในการสังเคราะห์เพปไทด์ และท้ายสุดคือวิธีการและขั้นตอนที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดี

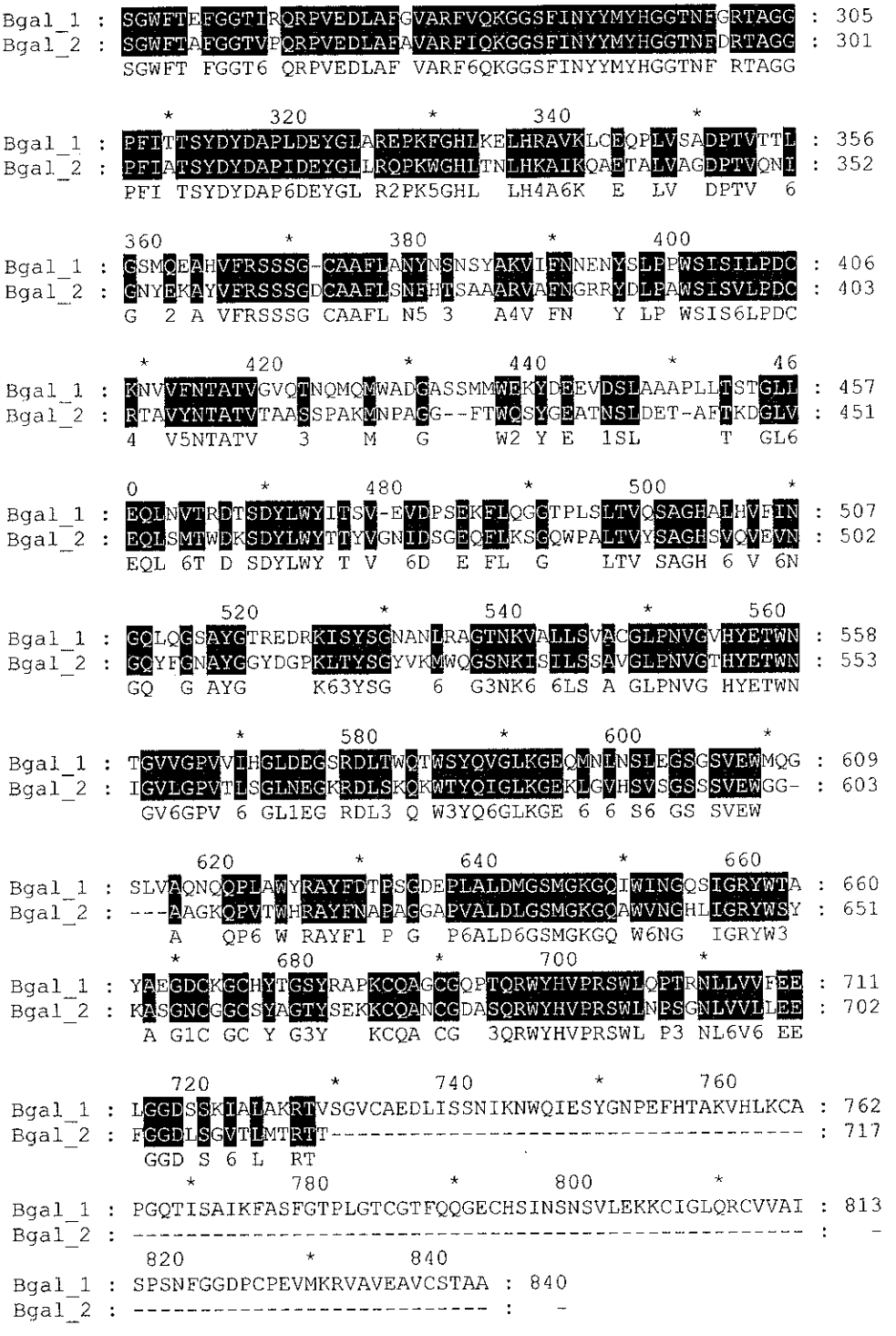
2.1 การออกแบบเพปไทด์เป้าหมาย

เพปไทด์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ออกแบบจากการวิเคราะห์ลำดับโปรตีน โดยการหากรดอะมิโนประมาณ 10-14 ตัว ที่มีคุณสมบัติเป็นพวกชอบน้ำ (hydrophilic) และเป็นบริเวณที่ไม่ถูกอนุรักษ์ไว้ (non-conserved region) ในกลุ่มโปรตีนเดียวกัน หลักการนี้บรรลุวัตถุประสงค์หลายประการคือ ประการแรก การที่เพปไทด์มีคุณสมบัติเป็นพวกชอบน้ำ (hydrophilic) และเป็นบริเวณที่ไม่ถูกอนุรักษ์ไว้ (non-conserved region) จึงเป็นส่วนที่อยู่บริเวณภายนอกโครงสร้างของโปรตีนมากกว่าที่จะถูกฝังตัวอยู่ด้านในโครงสร้างโปรตีนซึ่งโดยส่วนมากจะเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic region) และถูกอนุรักษ์ไว้ (conserved region) มากกว่า ดังนั้นการจดจำเพปไทด์จะเกิดขึ้นที่ตำแหน่งภายนอกโครงสร้างของโปรตีน ประการที่สอง เพปไทด์จะเป็นส่วนที่ถูกอนุรักษ์ไว้มากขึ้นถ้ามีคุณสมบัติเป็นพวกชอบน้ำ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเพปไทด์มีกรดอะมิโนที่มีขั้ว (charged amino acids) ที่กรดอะมิโนทุก 4-5 ตัว ประการที่สาม ลำดับกรดอะมิโนที่ไม่ถูกอนุรักษ์ไว้ จะทำให้แอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีนใดโปรตีนหนึ่งเท่านั้น มากกว่าจะเกิดการทำปฏิกริยาข้ามพวก (cross reaction) กับโปรตีนตัวอื่นในกลุ่มเดียวกัน การยืนยันว่าตำแหน่งของเพปไทด์นั้นอยู่บริเวณด้านนอกของโครงสร้างโปรตีนสามารถทำโดยเทคนิค homology modeling โดยใช้โปรตีนที่รู้โครงสร้างสามมิติแล้ว ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยใช้โปรแกรม Swiss PDB Viewer โดยการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่สนใจไปบนโครงสร้างที่รู้แล้ว อย่างไรก็ตาม สำหรับเอนไซม์เบต้ากาแล็คโตซิเดส (beta-galactosidase) นั้น ไม่ได้ทำโครงสร้าง modeling ไว้ เนื่องจากไม่มีโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ กลุ่ม 35 ที่ศึกษาไว้ตั้งแต่เริ่มโครงการ นอกจากนั้นโครงสร้างสามมิติที่มีการศึกษาไว้แล้ว ยังมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างออกไปมากจากเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มที่กลุ่มวิจัยนี้ได้ให้ความสนใจ ทำให้เป็นการยากที่จะได้โครงสร้าง model ที่น่าเชื่อถือ

ตัวอย่างของการออกแบบเพปไทด์ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2-1 โดยแสดงการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของ BGal1 และ BGal2 และตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้ไว้เป็นบริเวณที่ใช้ออกแบบเพปไทด์ ซึ่งกรดอะมิโน cystein, glycine หรือ glutamic acid ถูกใส่เพิ่มลงไปที่บริเวณปลาย $-NH_2$ (N-terminus) ของเพปไทด์เพื่อใช้เป็นตัวเชื่อม โดย cysteine จะต่อกับหมู่ maleinidobenzoyl-N-hydroxy- succini-

mide ester (MBS) ซึ่งจับอยู่กับกรดอะมิโนของโปรตีนตัวพา (carrier protein) และกรดอะมิโนที่เพิ่มเข้าไปนี้ยังเป็นตัวเพิ่มพื้นที่ให้เพปไทด์อยู่ห่างออกไปจากบริเวณพื้นผิวของโปรตีนตัวพา ในบางกรณีเพปไทด์จะถูกเชื่อมกับ glutaraldehyde-activated carrier protein แทน โดยในกรณีนี้ ทั้งหมู่อะมีนที่อยู่ด้านปลาย $-NH_2$ และกรดอะมิโน lysine ที่ถูกเติมเข้าที่ด้านปลาย $-NH_2$ จะนำมาใช้ สำหรับเพปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ภายใน (internal sequence) นั้น เพปไทด์จะต้องมีกรดอะมิ-โน lysine อิสระที่สามารถเชื่อมต่อกับหมู่แอลดีไฮด์ ของโปรตีนตัวพาได้ เพปไทด์ชนิดต่าง ๆ ที่ออก แบบขึ้นได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยมีเพปไทด์ 4 ตัวที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนภายในเอนไซม์ BGlu1 ในข้าว โดยเพปไทด์ BGlu1-ln1 และ BGlu1-ln2 ซึ่งนำมาเชื่อมต่อกับโปรตีนตัวพาด้วยกรดอะมิโน cysteine หรือ lysine สำหรับเพปไทด์ BGlu1-ln3 และ BGlu1-ln4 นั้น ใช้เพื่อเปรียบเทียบว่าลำดับเพปไทด์แบบใดสังเคราะห์ได้ดีกว่า และทดสอบความเป็น antigenicity รวมทั้งผลของการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนบางตำแหน่งของเพปไทด์ จากการออกแบบเพปไทด์ที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดนั้น คาดว่าเพปไทด์ตัวใดตัวหนึ่งจะสามารถใช้ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ BGlu1 ในข้าวที่มีค่าไทเทอร์ (titer) สูงได้ นอกจากนั้นแล้วยังมีเพปไทด์อีกตัวหนึ่งที่สร้างขึ้นจากลำดับโปรตีน sfr2 โดยโปรตีนนี้ไม่สามารถตรวจหาได้จากเทคนิค coumassie staining หรือ enzymatic assay ในระบบบรีคอมบิแนนท์ทั้งใน *E.coli* หรือ *Pichia pastoris* ดังนั้นจึงเป็นการดีที่จะผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจหาโปรตีนนี้ในขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์จากพืช หากโปรตีนนี้สามารถสร้างขึ้นในระบบบรีคอมบิแนนท์ ดังนั้นหลังการโดยรวมของการออกแบบเพปไทด์นั้นเหมือนกันทุกตัว ภาพที่ 2-1 แสดงการเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Bgal1 และ Bgal2 (Amino acid alignment) ซึ่งตัวหนังสือที่แสดงสีขาวบนพื้นหลังสีดำแสดงกรดอะมิโนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในโปรตีนกลุ่มเดียวกัน (conserved amino acid)





ภาพที่ 2-1 การเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Bgal1 และ Bgal2 (Amino acid alignment) โดยตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้ไว้แสดงลำดับของเพปไทด์ที่ใช้ในสร้างแอนติบอดี

ตารางที่ 2-1 ดังแสดงต่อไปนี้ แสดงเพปไทด์เป้าหมายที่ออกแบบมาเพื่อใช้ผลิตแอนติบอดีสำหรับโครงการวิจัยนี้

ตารางที่ 2-1 เพปไทด์ที่ออกแบบขึ้นเพื่อใช้ผลิตแอนติบอดี

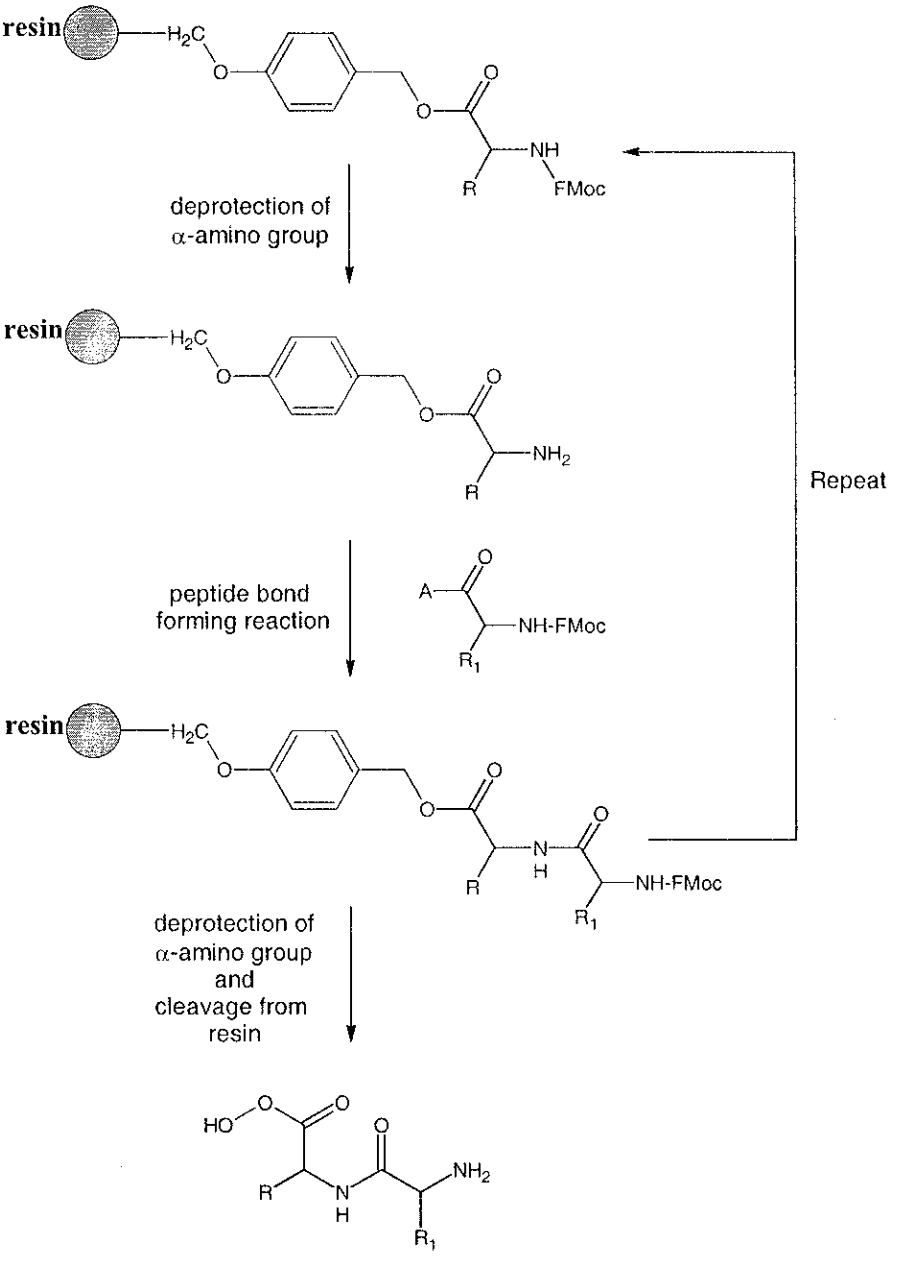
ชื่อเพปไทด์	โปรตีนแอนติเจน	ลำดับเพปไทด์ (จากด้านปลาย –NH_2 ไปด้านปลาย -COOH)	หมายเหตุ
rBgal1	rice Bgal1 beta-galactosidase	CEGKEFGAAGKAYIN	เชื่อมต่อโดยหมู่ซัลไฮดริล (-SH) ของ cysteine กับหมู่เอไมด์ที่ด้านปลาย –COOH ของโปรตีนตัวพา (malei-mide-activated carrier)
rBgal2	rice Bgal 2 beta-galactosidase	CGESVMGSGAKSRIPD	เชื่อมต่อโดยหมู่ซัลไฮดริล (-SH) ของcysteine กับหมู่เอไมด์ที่ด้านปลาย –COOH ของโปรตีนตัวพา (malei-mide-activated carrier)
rBGlu1-ln1	rice BGlu1 beta-glucosidase	CGKGQQLMQQTPTSYS	เชื่อมต่อโดยหมู่ซัลไฮดริล (-SH) ของ cysteine กับโปรตีนตัวพา (maleimide-activated carrier)
rBGlu1-ln2	rice BGlu1 beta-glucosidase	KGQQLMQQTPTSYSAD	เชื่อมต่อโดยหมู่เอมีนปฐมภูมิที่อยู่ด้านปลาย –NH_2 ของ lysine
rBGlu1-ln3	rice BGlu1 beta-glucosidase	CGDQPANLSRDQLRT	เชื่อมต่อโดยหมู่ซัลไฮดริล (-SH) ของ cysteine กับโปรตีนตัวพา (maleimide-activated carrier)
rBGlu1-ln4	rice BGlu1 beta-glucosidase	CGDQPANALSRDQLRDT	เชื่อมต่อโดยหมู่ซัลไฮดริล (-SH) ของ cysteine กับโปรตีนตัวพา (maleimide-activated carrier)

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

ชื่อเพปไทด์	โปรตีนแอนติเจน	ลำดับเพปไทด์ (จากด้านปลาย – NH_2 ไปด้านปลาย -COOH)	หมายเหตุ
Rice_SFR2.1	rice orthologue of sfr2	CPQERLRFWSDPDAEL	เชื่อมต่อโดยหมู่ซัลไฮดริล (-SH) ของกรดอะมิโน cysteine กับโปรตีนตัวพา (maleimide-activated carrier)

2.2 การสังเคราะห์เพปไทด์

ดังที่กล่าวมาแล้วในบทนำ วิธีการสังเคราะห์เพปไทด์นั้นได้ใช้ระบบ Fmoc-solid phase synthesis ซึ่งลำดับขั้นตอนในการสังเคราะห์เพปไทด์ได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 2-1 ซึ่งในขั้นตอนของการสังเคราะห์เพปไทด์นั้น N-terminal ของกรดอะมิโนที่มีหมู่ปกป้อง จะถูกทำให้เกาะติดกับ solid support หรือ เรซินโดยพันธะเอสเทอร์ โดยจะมีหมู่คาร์บอกซิลที่อิสระอยู่ที่ปลายอีกด้านหนึ่ง หลังจากที่ได้กำจัดหมู่ปกป้องออกไปแล้ว หมู่อะมีนนี้จะสร้างพันธะกับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวที่สอง ขั้นตอนในการสังเคราะห์จะเป็นไปตามลำดับขั้นตอนของการกำจัดหมู่ปกป้องและการสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนตัวถัด ๆ ไปจนกระทั่งได้เพปไทด์เป้าหมาย จากนั้นเพปไทด์จะถูกทำให้หลุดออกจากเรซิน

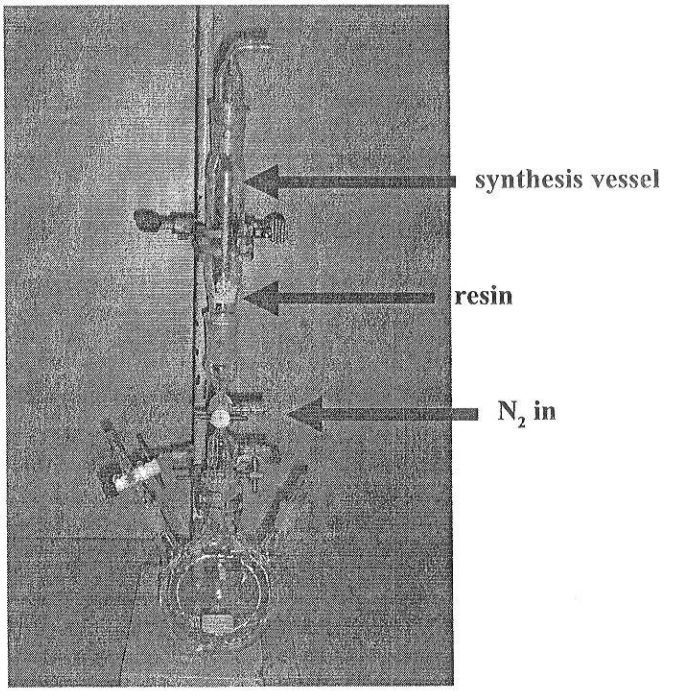


แผนภาพที่ 2-1 การสังเคราะห์ตามแบบแผน Fmoc-solid phase peptide synthesis

2.2.1 อุปกรณ์และขั้นตอนในการสังเคราะห์เพปไทด์

การสังเคราะห์เพปไทด์จะทำบนเรซิน ซึ่งวิธีในการสังเคราะห์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ได้แก่ การสังเคราะห์ทีละขั้นตอน (batch-wise) และ การสังเคราะห์แบบต่อเนื่อง (continuous-flow) ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีการสังเคราะแบบทีละขั้นตอน ทั้งนี้ด้วยพิจารณาถึงความสะดวกในการจัดเตรียมอุปกรณ์ งบประมาณ และปริมาณของเพปไทด์ที่จะสังเคราะห์ โดยอุปกรณ์ในการสังเคราะห์เพปไทด์ดังแสดงในภาพที่ 2-2 ซึ่งจะประกอบไปด้วย synthesis vessel ซึ่งจะมีก๊อกสาม

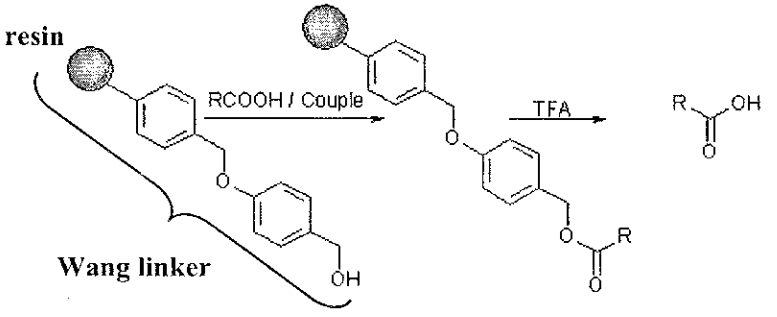
ทางเพื่อไขให้สารละลายลงไปยังขวดก้นกลมด้านล่างได้ ภายใน synthesis vessel จะบรรจุเรซิน ซึ่งเมื่อได้เติมตัวทำละลายและรีเอเจนต์ที่เหมาะสมแล้ว จะผ่านแก๊สไนโตรเจนเข้าไปทางด้านล่างของ synthesis vessel เพื่อทำให้เรซินเกิดการสั่นตัวเพื่อให้สารทำปฏิกิริยากันได้อย่างทั่วถึง เมื่อสิ้นสุดขั้นของการทำปฏิกิริยาแล้ว ของเหลวที่เหลืออยู่ใน synthesis vessel จะถูกดูดโดยปั๊มให้ลงมายังขวดที่รองรับอยู่ทางด้านล่าง



ภาพที่ 2-2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์

2.2.2 ตัวเชื่อม (Linkers)

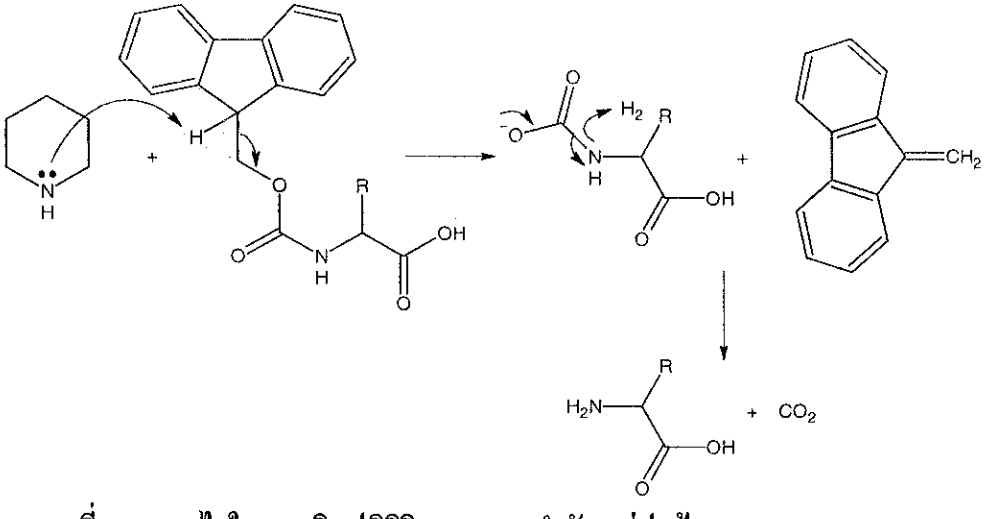
ตัวเชื่อมใช้ในการเชื่อมต่อระหว่างเรซินกับเพปไทด์ที่จะสังเคราะห์ นอกจากนั้นยังใช้เป็นหมู่ปกป้อง C-terminal ของหมู่คาร์บอกซิลในระหว่างการสังเคราะห์อีกด้วย ตัวเชื่อมของ Wang หรือ wang resin เป็นตัวที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ที่ใช้ระบบหมู่ปกป้องแบบ Fmoc โดยหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวแรกจะสร้างพันธะเชื่อมกับหมู่ไฮดรอกซิลของตัวเชื่อมจากเรซิน และเมื่อได้สังเคราะห์ตามลำดับขั้นตอนจนได้เพปไทด์เป้าหมายแล้ว เพปไทด์จะทำให้หลุดออกจากเรซินได้โดยใช้ TFA ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 2-2



แผนภาพที่ 2-2 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกรดอะมิโนเข้ากับ wang resin ตามด้วยการทำให้เพปไทด์หลุดออกจากเรซิน

2.2.3 หมู่ปกป้อง (Protecting groups)

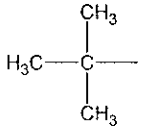
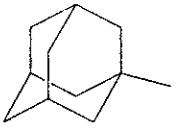
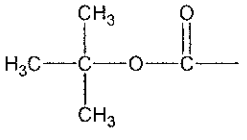
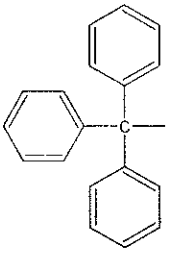
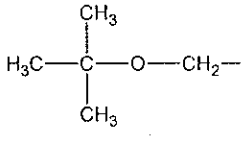
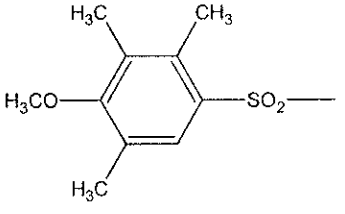
ดังที่ได้กล่าวแล้วในบทที่ 1 ว่าหมู่ปกป้องนั้นสามารแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ หมู่ปกป้องชั่วคราวที่ตำแหน่ง N^{α} ของกรดอะมิโน และหมู่ปกป้องถาวรที่ตำแหน่ง side chain โดยหมู่ปกป้องชั่วคราวที่จะใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ได้แก่ 9-fluorenyl- methyloxycarbonyl (Fmoc) โดยหมู่นี้สามารถถูกกำจัดโดยสารละลาย 20-50% piperidine ใน DMF ทุกครั้งเมื่อมีการสร้างพันธะเพปไทด์ในแต่ละขั้นตอน กลไกในการเกิดปฏิกิริยาของการกำจัดหมู่ Fmoc ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 2-3



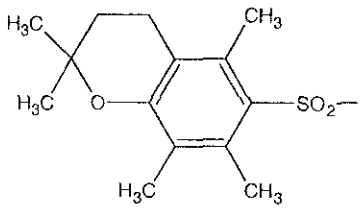
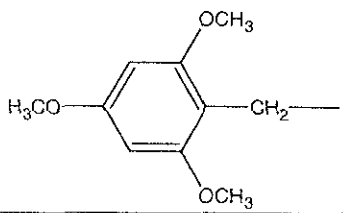
แผนภาพที่ 2-3 กลไกในการเกิดปฏิกิริยาของการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc

สำหรับหมู่ปกป้องถาวรที่ตำแหน่ง side chain นั้นมีเพื่อป้องกันปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการอันจะเกิดขึ้นได้ สำหรับการกำจัดหมู่ปกป้องชนิดนี้ จะทำในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเป็นการทำให้เพปไทด์หลุดออกจากเรซิน หมู่ปกป้องที่ตำแหน่ง side chain ที่นิยมใช้ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 หมู่ปกป้องที่ตำแหน่ง side chain ที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์

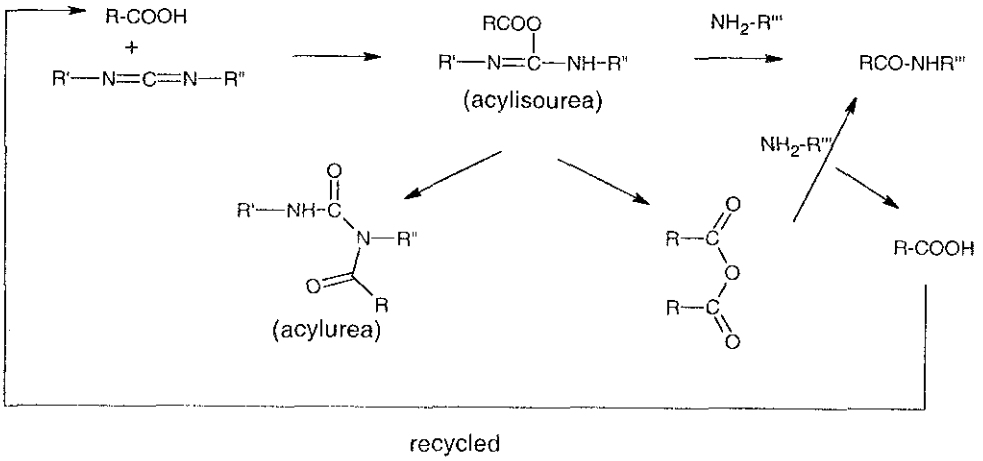
หมู่ปกป้อง	อนุพันธ์ของกรดอะมิโน เมื่อมีหมู่ปกป้องชนิดนี้	สภาวะที่เสถียร	รีเอเจนต์ที่ใช้ในการกำจัดออก
tert-butyl (tBu) 	Asp/Glu(OtBu)	base	TFA
	Ser/Thr/Tyr(tBu)		
1-adamantyl (1-Ada) 	Asp(O-1-Ada)	base	TFA
tert-butyloxycarbonyl (Boc) 	Lys(Boc)	base	TFA
	His(Boc)	piperidine	TFA
triphenylmethyl (Trt)	Cys(Trt)	piperidine	TFA, acetic acid
	Asn/Gln(Trt)	piperidine 1N HCl	TFA
tert-butoxymethyl 	His(Bum)	piperidine	TFA
4-methoxy-2,3,6-trimethyl-benzenesulfonyl (Mtr) 	Arg(Mtr)	piperidine	TFA

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

หมู่ปกป้อง	อนุพันธ์ของกรดอะมิโน เมื่อมีหมู่ปกป้องชนิดนี้	สภาวะที่เสถียร	รีเอเจนต์ที่ใช้ในการกำจัดออก
2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulfonyl (Pmc) 	Arg(Pmc)	piperidine	TFA
2,4,6-trimethoxymethyl (Tmob)	Asn/Gln(Tmob)	piperidine	TFA
	Cys(Tmob)	piperidine	TFA

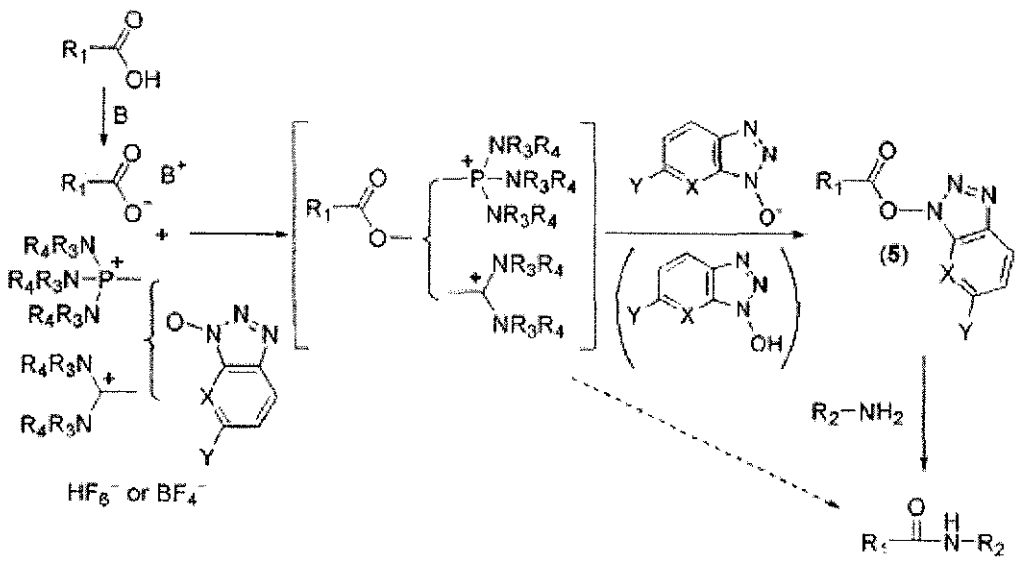
2.2.4 ปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์

ขั้นตอนแรกซึ่งสำคัญมากในการสังเคราะห์เพปไทด์วิธี solid-phase คือ การเชื่อมกรดอะมิโนตัวแรกเข้ากับเรซิน เพราะผลที่ได้จะเป็นตัวกำหนดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่จะเกิดขึ้น นอกจากนั้นขั้นตอนนี้ยังอาจเกิด by-products ที่ไม่ต้องการจากปฏิกิริยา acylation ของเรซินอีกด้วย ในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกรดอะมิโนตัวแรกเข้ากับเรซินนิยมใช้วิธีการสังเคราะห์แบบ symmetrical anhydride โดยใช้รีเอเจนต์ในกลุ่ม carbodiimide reagents เช่น DCC and EDC ทั้งนี้กลไกในการเกิดปฏิกิริยาได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 2-4 ในการทดลองสำหรับโครงการวิจัยนี้ พบว่าในกรณีซึ่งสารไม่สามารถละลายได้ดี หรือ เปอร์เซ็นต์ loading ของกรดอะมิโนบนเรซินต่ำ จะใช้รีเอเจนต์ในกลุ่มมเกลือ uranium และ phosphonium เช่น HBTU หรือ TBTU แทน



แผนภาพที่ 2-4 กลไกในการสร้างพันธะโดยใช้รีเอเจนต์ในกลุ่ม carbodiimide

เมื่อกรดอะมิโนตัวแรกได้ถูกเชื่อมต่อกับเรซินสำเร็จแล้ว หมู่ปกป้อง Fmoc จะถูกกำจัดออก ซึ่งจะให้หมู่ $-NH_2$ เพื่อให้พร้อมสำหรับปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนตัวถัดไปได้ ซึ่งสำหรับรีเอเจนต์ที่ใช้ได้แก่ รีเอเจนต์ในกลุ่ม carbodiimides หรือ กลุ่มเกลือ uranium และ phosphonium เช่น HBTU, TBTU และ BOP ซึ่งรีเอเจนต์ในกลุ่มหลังนิยมใช้กันมากในการสังเคราะห์เพปไทด์แบบ solid-phase เพราะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้มากกว่า กลไกในการเกิดปฏิกิริยาของรีเอเจนต์ในกลุ่มเกลือ uranium และ phosphonium ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 2-5



แผนภาพที่ 2-5 กลไกในการสร้างพันธะเพปไทด์โดยใช้รีเอเจนต์ในกลุ่มเกลือ uranium และ phosphonium

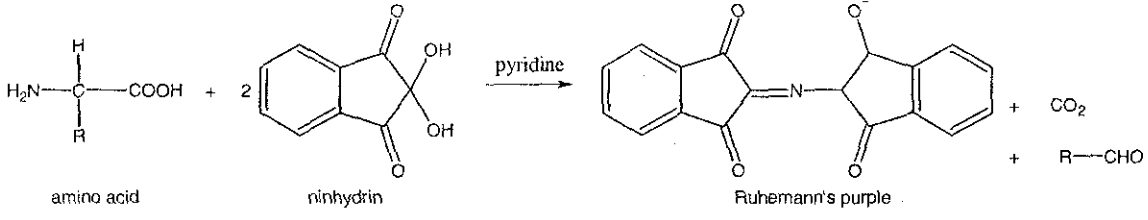
(ที่มา: www.unex.es/qoceres/COj2003,6.pdf)

2.2.5 การทำให้เพปไทด์หลุดออกจากเรซิน

หลังจากที่สังเคราะห์ได้เพปไทด์เป้าหมายแล้ว เพปไทด์สามารถถูกทำให้หลุดออกจากเรซินโดยใช้ TFA ในขั้นตอนนี้รีเอเจนต์ที่ใช้เป็นตัวจับไอออนบวก (cationic scavenger) ที่ได้จากหมู่ปกป้องและตัวเชื่อมจะต้องใส่ลงไปด้วย เพื่อป้องกันไม่ให้ไอออนบวกที่เกิดขึ้นนี้ทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ของเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ ตัวอย่างของรีเอเจนต์ที่ใช้จับไอออนบวกได้แก่ น้ำ phenol, 1,2-ethanedithiol (EDT) และ thioanisole โดยได้มีการใช้รีเอเจนต์เหล่านี้มาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสมเรียกว่า universal cleavage mixtures เช่น Reagent K ซึ่งประกอบไปด้วย TFA /thioanisole/ water/phenol/EDT ในอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 82.5:5:5:5:2.5 หรือ Reagent R ซึ่งประกอบด้วย TFA /thioanisole/ anisole/EDT ในอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 90:5:3:2

2.2.6 การวิเคราะห์โครงสร้างของเพปไทด์ที่ได้จากการสังเคราะห์

ในการวิเคราะห์ผลของการสังเคราะห์พันธะเพปไทด์นั้น ได้ใช้ทดสอบทางเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์ สำหรับวิธีทางเคมีที่ใช้คือ Kaiser test หรือ ninhydrin test ซึ่งจะให้สีฟ้าบนซิน หากมีหมู่ $-NH_2$ อยู่ ปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับ Kaiser test ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 2-6 (Stewart and Young, 1979) อย่างไรก็ตาม Kaiser test มักจะไม่ผล positive กับหมู่อะมีนทุติยภูมิ ดังเช่นที่อยู่ในกรดอะมิโน proline ดังนั้นในกรณีเช่นนี้ได้ใช้ Chloranil test แทน



แผนภาพที่ 2-6 ปฏิกิริยาของ Kaiser test

เทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) และ Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้นำมาใช้ในการยืนยันเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ว่าเป็นตัวที่ต้องการหรือไม่ ซึ่งเทคนิค LC-MS มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์ทั้งในด้านความบริสุทธิ์ และยืนยันโครงสร้างของเพปไทด์ โดยสารตัวอย่างได้ส่งไปวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร

2.3 วิธีการสังเคราะห์เพปไทด์

2.3.1 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

การสังเคราะห์เพปไทด์ได้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยห้องปฏิบัติการประกอบไปด้วยตู้ดูดควัน และเครื่องปรับอากาศเพื่อควบคุมอุณหภูมิและความชื้นในการสังเคราะห์ สภาวะการทดลองโดยเฉลี่ยอยู่ที่อุณหภูมิ 27-30°C และความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศมีค่าประมาณ 75% และจะสูงขึ้นในฤดูฝน

2.3.2. รีเอเจนต์ที่ใช้ในการสังเคราะห์

รีเอเจนต์และตัวทำละลายที่ใช้จะเป็น puriss หรือ purum grade ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ยกเว้นสาร piperidine ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน ส่วนเรซินที่ใช้คือ wang resin ที่มีค่าประสิทธิภาพ loading อยู่ที่ 1.1mM/g ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.3.3. ขั้นตอนของการสังเคราะห์เพปไทด์

A. การเตรียมเรซิน

ก่อนการสังเคราะห์จะต้องเตรียมเรซินที่ใช้โดยการนำไปทำให้บวมด้วยตัวทำละลาย DCM เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจะล้างและใช้ปั๊มดูดตัวทำละลายออกจนแห้ง เรซินที่เตรียมได้จะนำไปไว้ในโถดูดความชื้นข้ามคืน เพื่อกำจัดน้ำที่หลงเหลืออยู่

B. การทำปฏิกิริยาเชื่อมกรดอะมิโนตัวแรกเข้ากับเรซิน

ขั้นตอนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานี้คือ นำเรซินมาไว้ใน reaction vessel แล้วเติมตัวทำละลาย DMF ลงไปเพื่อทำให้เรซินอิ่มตัว จากนั้นใช้ปั๊มดูดเอาตัวทำละลายออกก่อนที่จะเติมสารละลายของกรดอะมิโนตัวแรก และรีเอเจนต์ DCC หรือ HBTU โดยจะต้องเติมสาร DMAP ลงไปด้วยเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น จากนั้นสารผสมจะถูกกวนด้วยแก๊ส N_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขั้นตอนการเติมรีเอเจนต์นี้จะทำซ้ำจนกระทั่งผลการวิเคราะห์โดย Kaiser และ/หรือ chloranil test ได้ยืนยันกรดอะมิโนตัวแรกได้ติดกับเรซินแล้ว

C. การกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc

หมู่ปกป้อง Fmoc จะถูกกำจัดโดยการนำเอาเรซินที่มีเพปไทด์ติดอยู่มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย piperidine เข้มข้น 20-50% ใน DMF โดยสารผสมนี้จะถูกกวนเป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่

จะใช้ปั๊มดูดตัวทำละลายออก ขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้นจะทำซ้ำจนกระทั่งได้ผล positive กับกับการทดสอบ Kaiser และ/หรือ chloranil test

D. ปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์

เรซินซึ่งมีเพปไท์ที่ปลายมีหมู่ $-NH_2$ จะถูกทำให้บวมด้วยตัวทำละลาย จากนั้นจะเติมสารละลายใน DMF ของ กรดอะมิโนซึ่งมีหมู่ปกป้อง Fmoc อยู่ที่ปลายของหมู่อะมิโน (ปริมาณ 1 eq) พร้อมทั้งรีเอเจนต์สำหรับการสร้างพันธะเพปไทด์ซึ่งได้แก่ HBTU (TBTU หรือ BOP) (ปริมาณ 1 eq) และ TEA (ปริมาณ 2 eq) ซึ่งมีปริมาตรโดยรวม 5 mLจากนั้นสารผสมได้ถูกกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาตั้งแต่ 1 ชั่วโมง จนถึงข้ามคืน ทั้งนี้ขึ้นกับผลการทดสอบโดยใช้ Kaiser และ/หรือ chloranil test ว่าได้มีการสร้างพันธะเพปไทด์ขึ้นหรือไม่ ซึ่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์เสร็จสมบูรณ์ ผลการทดสอบจะให้ผล negative กับรีเอเจนต์ทั้งสอง

E. การตรวจสอบผลของปฏิกิริยาการสร้างพันธะ

1. Kaiser Test

รีเอเจนต์สำหรับ Kaiser test เตรียมโดยการผสม สารละลาย ninhydrin ใน ethanol ที่มีความเข้มข้น 5% (w/v) สารละลาย phenolใน ethanol เข้มข้น 80% (w/v) และสารละลาย KCN ใน pyridine โดยการผสม 2 mL ของ 0.001 M KCN ใน 98 mL ของตัวทำละลาย pyridine ในการทดสอบผลนั้น จะใช้เรซินประมาณ 2-3 เกล็ดซึ่งได้ผ่านการล้างด้วย ethanol มาแล้วมาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมรีเอเจนต์ที่เตรียมไว้ข้างต้นอย่างละ 2 หยด หลังจากนั้นนำสารผสมที่ได้ไปทำให้ร้อนจนถึงอุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งผล positive แสดงถึงการมีหมู่ $-NH_2$ นั้นจะให้เรซินสีน้ำเงินตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนผล negative เรซินจะไม่เกิดการเปลี่ยนสี

2. Chloranil Test

รีเอเจนต์สำหรับ chloranil test นั้นจะเตรียมได้จากการผสมสารละลายของ p-chloranil ใน DMF ที่มีความเข้มข้น 2% (w/v) กับสารละลายของ acetaldehyde ใน DMF ที่มีความเข้มข้น 2% (v/v) การเตรียมเรซินสำหรับการทดสอบนั้นคล้ายคลึงกับการทดสอบแบบ Kaiser test แต่จะใส่สารละลายรีเอเจนต์ทั้งสองชนิดอย่างละ 1 หยด จากนั้นจะตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อดูผลการทดสอบ ซึ่งหากได้เรซินที่มีสีฟ้าก็จะบอกได้ถึงการมีอยู่ของหมู่ $-NH_2$

F. การทำให้เพปไทด์หลุดจากเรซิน

เมื่อสามารถสังเคราะห์เพปไทด์เป้าหมายตามที่ต้องการได้แล้ว เรซินซึ่งมีเพปไทด์เกาะอยู่จะนำมาล้างด้วย DMF ตามด้วย DCM รีเอเจนต์ซึ่งทำให้เพปไทด์หลุดออกจากเรซินได้แก่

Reagent K ซึ่งเป็นสารละลายผสมของ TFA/thioanisole/water/phenol/EDT ในอัตราส่วน 82.5:5:5:5:2.5 v/v โดยในการทดลองนั้นจะใช้รีเอเจนต์นี้ในปริมาณ 1 mL ต่อ 0.1 g ของเรซิน

ในปฏิกิริยาการทำให้เพปไทด์หลุดจากเรซินนั้น จะเติมรีเอเจนต์ K ลงไปในปริมาณที่เหมาะสมกับปริมาณของเรซิน จากนั้นจะกวนของผสมด้วยแก๊ส N_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยจะนำ filtrate ที่ได้ รวมทั้งสารละลายที่ได้จากการชะเรซินด้วย TFA โดยจะหยดสารละลายนี้ทีละหยดลงไปในจะ diethyl ether ที่เย็น เพื่อให้ได้ตะกอนสีขาวของเพปไทด์ตกลงมา ตะกอนที่ได้มานี้จะล้างด้วย diethyl ether เย็น เพื่อกำจัดพวก scavengers ที่ยังคงค้างอยู่ในตะกอนขาว เพปไทด์ที่ได้จากการสังเคราะห์นี้จะเก็บไว้ใน freezer จนกระทั่งพร้อมสำหรับการวิเคราะห์ด้วย LC-MS

2.4 การผลิตแอนติบอดี

2.4.1 การจับกันของเพปไทด์กับโปรตีนตัวพา (carrier protein)

เมื่อได้เพปไทด์แล้วจะนำมาแยกบริสุทธิ์โดยเทคนิค reverse-phase HPLC แล้วทำให้แห้ง แต่เนื่องจากความยุ่งยากและซับซ้อนในการสังเคราะห์เพปไทด์ ซึ่งจะได้กล่าวรายละเอียดในบทที่ 3 ดังนั้นเพปไทด์เริ่มต้นของ rBGal1 และ rBGal2 ที่จะนำมาใช้ในการผลิตแอนติบอดีจึงสั่งซื้อโดยตรงจากบริษัท Sigma Chemical Corporation เมือง St. Louis มลรัฐ Missouri ประเทศสหรัฐอเมริกา เพปไทด์จะถูกละลายในคอนจูเกตบัฟเฟอร์ (conjugated buffer) และเชื่อมกรดอะมิโน cysteine เข้ากับโปรตีนตัวพา (maleimide-activated SuperCarrier) ตามวิธีการที่ระบุไว้จากบริษัทผู้ผลิต จากนั้นทำการแยกเกลือ (desalted) ด้วยเทคนิคไดอะไลซีส (dialysis) เพื่อกำจัด EDTA และ sodium azide ออกจากบัฟเฟอร์ โดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นของ hapten (ซึ่งในกรณีนี้คือเพปไทด์) ควรเป็นแบบ molar excess ดังนั้นจึงใช้เพปไทด์และโปรตีนตัวพาที่ความเข้มข้น mass เท่ากัน ยกตัวอย่างเช่น เพปไทด์ 2 mg ละลายและผสมกับ 2 mg ของ โปรตีนตัวพา (activated carrier) และปล่อยให้ทำปฏิกริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยการกำจัดเกลือ (desalted) ในบางกรณีมีการใช้โปรตีนตัวพาเป็น glutaraldehyde-activated carrier เพื่อจับกับหมู่อะมีนที่ด้านปลาย $-NH_2$ หรือหมู่ epsilon อะมีนของกรดอะมิโน lysine โดยไม่ต้องใช้หมู่ cysteine ที่ถูกเติมที่ด้านปลาย $-NH_2$ ซึ่งในบางครั้งทำให้เกิดปัญหาเนื่องมาจากการเกิดปฏิกริยาออกซิไดเซชันเกิดการเข้าจับคู่กัน (dimerization) ของเพปไทด์ผ่านทางพันธะเพปไทด์ อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้เราใช้โปรตีนตัวพาเป็น maleimide-activated carrier

2.4.2 สัตว์ที่นำมาใช้ผลิตแอนติบอดี

แอนติบอดีผลิตโดยใช้กระต่ายขาวพันธุ์ประเทศนิวซีแลนด์ เนื่องจากง่ายในการทำการทดลองและมีขนาดเหมาะสมที่จะใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยหลักการแล้ว สัตว์หลายๆ

ชนิดก็สามารถนำมาใช้ได้ ยกตัวอย่างเช่น หนูไมซ์ หนูบ้าน และ หมู ซึ่งจะผลิตซีรัมได้ในปริมาณน้อย รวมไปจนถึงม้าและช้างซึ่งจะให้ซีรัมในปริมาณมากแต่ว่ามีความยุ่งยากและต้นทุนในการผลิตสูง โดยทั่วไปแล้วหนูไมซ์นั้นจะเหมาะสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยจะฆ่าหนูที่ได้รับการกระตุ้นแล้ว เพื่อทำการแยก บี-ลิวโคไซต์ (B-leukocutes) ออกมาจากม้ามแล้วรวมเข้ากับเซลล์ไมอีโลมา (myeloma) ของมนุษย์เพื่อให้ได้โคลนของ immortalized เซลล์ซึ่งสามารถผลิตแอนติบอดีบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว นอกจากนั้นโพลีโคลนอล IgY แอนติบอดีก็สามารถแยกออกจากไข่แดงของไข่ที่มาจากแม่ไก่ที่ถูกฉีดแอนติเจน อย่างไรก็ตาม เนื่องมาจากการระบาดของไข้หวัดนกระหว่างการทำงานวิจัยจึงไม่นำวิธีดังกล่าวมาใช้ ดังนั้นจึงเลือกกระต่ายขาวพันธุ์นิวซีแลนด์อายุ 3-7 เดือนมาใช้สำหรับฉีดแอนติเจน

2.4.3 การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีด

คอนจูเกตนำมาแยกบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Dextran gel filtration column chromatography โดยผสมกับสารละลาย Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 สำหรับการฉีดครั้งแรก (first injection) และใช้สารละลาย Freund's incomplete adjuvant สำหรับการฉีดกระตุ้นครั้งต่อไป (booster injection) การฉีดกระตุ้นครั้งแรกและการฉีดกระตุ้นทั้งสองครั้งนั้นจะฉีดเข้าที่ต้นขา เรียกว่า intramuscular injection และบริเวณผิวหนังด้านหลังคอเรียกว่า intradermal injection โดยจะฉีดห่างกัน 3 อาทิตย์ การฉีดครั้งแรกจะทำหลังจากเก็บตัวอย่างเลือดไปแล้ว 1 วันเพื่อใช้สำหรับตัวอย่างเลือดที่ยังไม่มีการกระตุ้น (preimmune serum)

2.4.4 การเก็บแอนติบอดีจากเลือด

เลือดกระต่ายถูกเก็บหนึ่งครั้งก่อนที่จะเริ่มฉีดกระตุ้น (pre-immune bleed) จากนั้น 10 วันหลังจากการฉีดแอนติเจนแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะจากเส้นเลือดใหญ่ที่ใบหู ซีรัมจะแยกออกจากเลือดโดยการปล่อยตัวอย่างเลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงหรือที่ 4 °C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการปั่นแยกคลอทเลือด (clotted blood) และเซลล์เม็ดเลือด (blood cell) ด้วยเครื่องเซนทริฟิวส์ที่ความเร็ว 5000 rpm และเก็บซีรัมจากส่วนบนของตะกอน (pelltet) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อจำกัดส่วนประกอบของเซลล์ที่แตกออกมา แล้วแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -30 °C

2.4.5 การทดสอบแอนติบอดี

การทดสอบค่า titer ของซีรัมกระต่ายสามารถทำโดยเทคนิค indirect ELISA โดยจับกับเพปไทด์อิสระ (free-peptide) และการทำเทคนิค dot blot analysis สำหรับ ELISA นั้นใช้เพลท

ขนาด 96 หลุมชื่อ activating a 96 well plate ซึ่งมีสารละลาย carbonate (50 mM $NaHCO_3/Na_2CO_3$, pH 9.5) เป็นบัฟเฟอร์ จากนั้นเคลือบด้วยเพปไทด์โดยการบ่มกับเพปไทด์ความเข้มข้น 5 mg/mL ใน PBS บัฟเฟอร์ ปริมาณ 100 µL แล้วกำจัดสารละลายส่วนเกินออก จากนั้นใส่สารละลาย TBST เพื่อป้องกันการเกิดการจับแบบไม่จำเพาะ (nonspecific binding site) สำหรับหลุมที่เป็นตัวทดลองควบคุมนั้นใส่แค่ blocking solution เท่านั้น แล้วล้างด้วย PBST บัฟเฟอร์ 4 ครั้ง จากนั้นแอนติซีรัม (1^{st} anti-body) ที่ถูกเจือจางแบบเป็นชุด (serial dilution) ดังนี้ 1:50 1:100 1:500 1:1000 และ 1:2000 ใส่ลงไปในหลุมต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างหลุมต่างๆด้วย PBST บัฟเฟอร์ 4 ครั้ง ต่อจากนั้นบ่มต่อด้วยแอนติบอดีตัวที่สอง (2^{nd} antibody) คือแอนติบอดีแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีกระต่ายโดยเชื่อมอยู่กับ horse radish peroxidase (HRP) ที่ความเข้มข้น 1:2000 dilution ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBST บัฟเฟอร์ 4 ครั้ง แล้วสุดท้ายเติมสับสเตรท 2,2-azinobis (3-ethybenzthiazolinesulfonic acid) (ABTS) ความเข้มข้น 1 mg/mL จำนวน 100 µL ใน 0.1 M citric acid ที่ pH 4.0 รวมกับ 0.0006% H_2O_2 และบ่มเป็นเวลา 5-10 นาทีจนกระทั่งเห็นสีเขียว หยุดปฏิกริยาด้วย sodium azide ความเข้มข้น 10 mM จำนวน 100 µL และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 405 nm ซึ่งค่าไทเทอร์ จะพิจารณาได้จากค่า dilution สูงสุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดที่ทำการวัดได้

แอนติบอดีที่ได้นำมาทดสอบด้วยเทคนิค dot blot โดยเริ่มจากวาดตารางบนแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech) เพื่อแสดงจุดในการหยดโปรตีน ใช้ไมโครปิเปตหยด โปรตีนจำนวน 10 mg (รีคอมบิแนนท์ BGal1 และ BGal2 หรือ เพปไทด์สังเคราะห์ หรือ เซลล์ lysate ของ *E.coli* เพื่อเป็นชุดทดลองควบคุม) ตรงกลางตารางโดยหยดอย่างช้าๆ เพื่อให้พื้นที่ที่สารละลายซึมออกไปน้อยที่สุด (ปกติแล้วมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 mm) และทำแผ่นเมมเบรนให้แห้งแล้วจุ่มด้วย 4% BSA ใน PBST บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะ (nonspecific binding) จากนั้นบ่มแผ่นเมมเบรนกับแอนติบอดีตัวแรก (BGal1 หรือ BGal2 แอนติบอดี) ที่ความเข้มข้น 1:5000 dilution เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST บัฟเฟอร์ 3 ครั้ง (ครั้งละ 5 นาที) จากนั้นบ่มต่อด้วยแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งเป็นแอนติบอดีแพะที่จำเจาะต่าแอนติบอดีกระต่ายที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ horse radish peroxidase ที่ความเข้มข้น 1:5000 dilution ใน PBST บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST และ PBS บัฟเฟอร์ 2 ครั้งเป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ แล้วบ่มต่อด้วยสารละลาย ECL เป็นเวลา 1 นาที แล้วห่อด้วย Saran-wrap (หลังจากกำจัดสารละลายส่วนเกินที่ยังเหลือออกให้หมดจากผิวหน้าเมมเบรน) แล้วนำไปประกบกับแผ่น x-ray film ในห้องมืด

2.4.4 การนำแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจหาโปรตีนรีคอมบิแนนท์

ในขั้นเริ่มแรกนั้น การทำ immuno blots นั้นใช้ซีรัมกระต่ายและตัวอย่างโปรตีนทั้งจากสารสกัด *E.coli* (cell extract) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีน BGal1 หรือพลาสมิดควบคุม รวมทั้งโปรตีนที่ถูกแยกบริสุทธิ์แล้วในขั้นสุดท้ายแล้วด้วยเทคนิค DEAE ion exchange chromatography นำมาผสมกับ 4X SDS-gel sample buffer นำตัวอย่างไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นโปรตีนที่เสียสภาพจะถูกแยกโดย 10% SDS-PAGE และทำ electroblotted ไปยังแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส Hybond-C (Amersham Biosciences) ด้วยเครื่อง semi-dry gel blotting system (Bio-Rad) แผ่น blot ถูกป้องกันด้วย 5% non-fat dry milk ใน PBST บัฟเฟอร์ (20 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl) pH 7.4 กับ 0.05% (v/v) Tween 20 ใน PBST บัฟเฟอร์ เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นบ่มด้วย BGal1 แอนติซีรัม ที่ความเข้มข้น 1:1000 dilution ใน blocking buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15 นาที 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน ECL western blotting detection reagents (Amersham Biosciences) ขั้นสุดท้ายนำไปประกบแผ่น X-ray เพื่อเพิ่มความจำเพาะของ immunoblot และยังเป็นการเตรียมแอนติบอดีสำหรับ immunolocalization ดังนั้น จึงทำการแยกบริสุทธิ์แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 โดยใช้เทคนิค Affinity chromatography ซึ่งเป็นเรซินที่ต่ออยู่กับเพปไทด์ BGal1 เตรียมได้โดยนำเพปไทด์ BGal1 จำนวน 4.6 mg มาเชื่อมกับเรซินชนิด cyanogens bromide activated resin จำนวน 1 กรัม ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต (Sigma) จากนั้นเจือจางแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 ใน PBS บัฟเฟอร์ ปริมาณ 3 mL แล้วใส่ลงไปในคอลัมน์ ล้างด้วย 20 mM PBS บัฟเฟอร์แล้วตามด้วย 20 mL Tris บัฟเฟอร์ (50 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 0.5 M NaCl) pH 8.0 และ 20 ml Tris บัฟเฟอร์ pH 9.0 และสุดท้าย 20 mL sodium phosphate บัฟเฟอร์ (50 mM sodium phosphate pH 6.3, 0.1% Tritron X-100, 0.5 M NaCl) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 20 ml glycine บัฟเฟอร์ pH 2.5 (50 mM glycine-HCl, pH 2.5, 0.1% Triton X-100, 0.15 M NaCl) และเก็บตัวอย่างใน 1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 9.0 ปริมาณ 4 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง จากนั้นกำจัดเกลือออกโดยการทำ desalted ด้วยคอลัมน์ prepacked Sephadex TM G-25 M (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Amersham Bioscience) สำหรับการทำ immunoblot นั้นใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 มาจากแยกบริสุทธิ์ข้างต้นแต่ใช้ที่ความเข้มข้น 1:1000 dilution แทนการใช้แอนติบอดีรวมที่ยังไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ (crude antiserum)

บทที่ 3
ผลการทดลองและบทวิเคราะห์

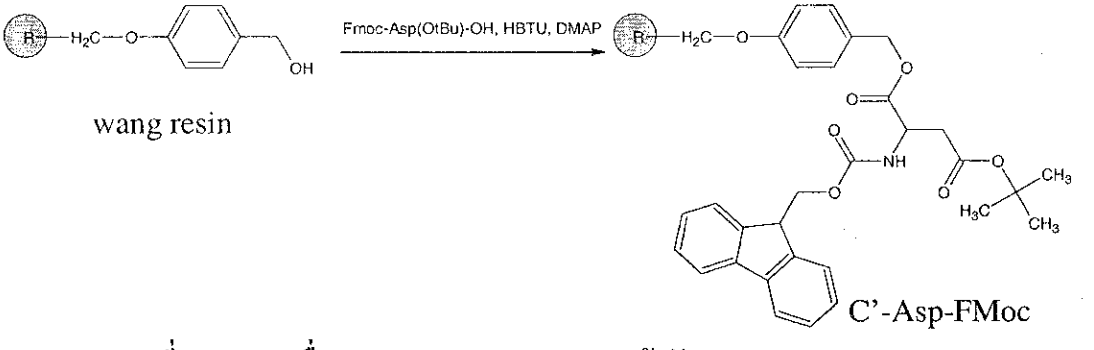
ในบทนี้จะกล่าวถึงผลการทดลองและการอภิปรายวิเคราะห์ผลที่ได้ทั้งในส่วนของการออกแบบและสังเคราะห์เพปไทด์เป้าหมายชนิดต่าง ๆ และการผลิตแอนติบอดี ซึ่งรายละเอียดวิธีการทดลองนั้นได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 2

3.1 ผลการทดลองและบทวิเคราะห์เรื่องการสังเคราะห์เพปไทด์

3.1.1 ผลการสังเคราะห์เพปไทด์

A. การสังเคราะห์เพปไทด์ rBGlu1-1n2; N'-Lys-Gly-Gln-Gln-Leu-Met-Gln-Gln-Thr-Pro-Thr-Ser-Tyr-Ser-Ala-Asp-C'

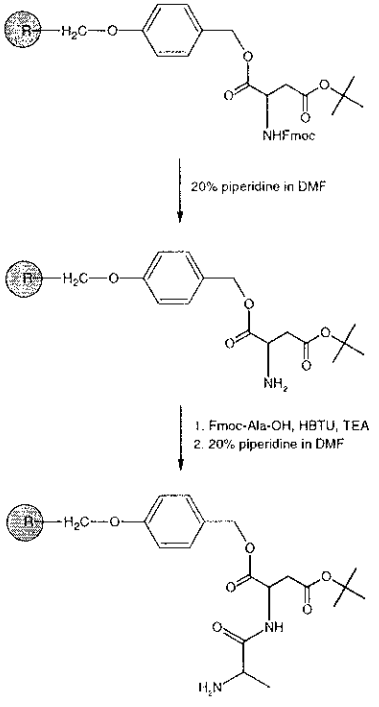
การต่อเชื่อมกรดอะมิโนตัวแรกเข้ากับ wang resin ทำได้โดยการเติมสารละลายในตัวทำละลาย DMF ของ Fmoc-Asp(OtBu)-OH พร้อมทั้งรีเอเจนต์ HBTU และ DMAP ลงไปให้ทำปฏิกิริยากับเรซินที่พร้อมจะทำปฏิกิริยาแล้ว ซึ่งปฏิกิริยานี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-1



แผนภาพที่ 3-1 การเชื่อม Fmoc-Asp(OtBu)-OH เข้ากับ wang resin

หลังจากที่ทดสอบโดย Kaiser test ว่าปฏิกิริยานั้นสมบูรณ์แล้ว จะไขรีเอเจนต์ที่เหลืออยู่ทิ้ง แล้วล้างเรซินด้วย DMF แล้ว ทำเรซินให้แล้วจึงทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc โดยใช้สารละลาย 20% piperidine ใน DMF เมื่อปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ปกป้องสมบูรณ์แล้ว ซึ่งจะผลทดสอบเป็น positive เมื่อทดสอบโดย Kaiser test เรซินที่มีกรดอะมิโนตัวแรกเกาะอยู่จะมีหมู่อะมิโนอิสระ (NH_2) ที่พร้อมจะทำปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์ต่อกับกรดอะมิโนตัวที่สองคือ Fmoc-Ala-OH ในการสังเคราะห์โดยใช้ HBTU และ TEA เป็นรีเอเจนต์ พบว่าปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์นี้สมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที จากนั้นหมู่ปกป้อง Fmoc จึงได้ถูกกำจัดออกโดยใช้สารละลาย

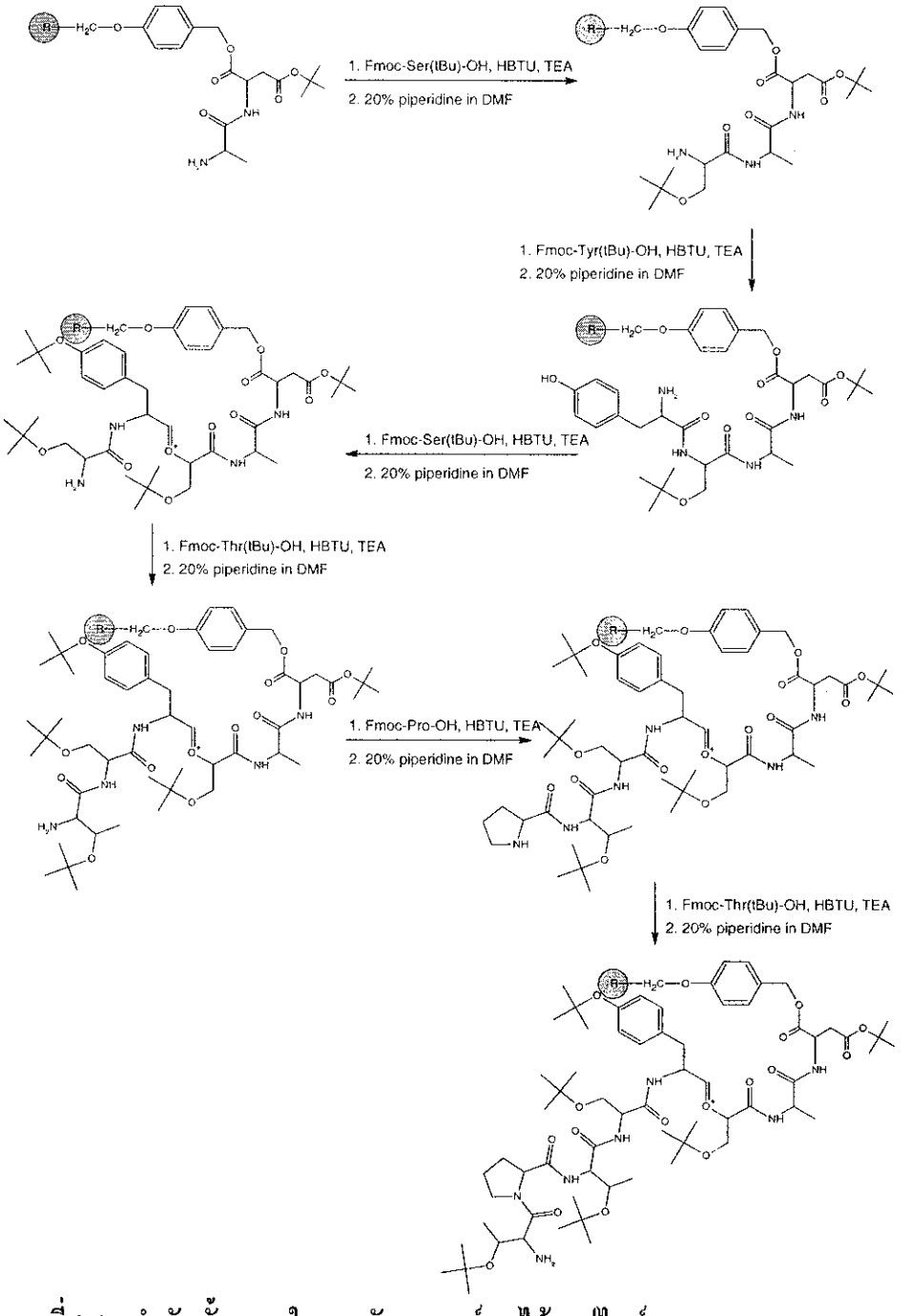
20% piperidine ใน DMF ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ เพปไทด์ที่อยู่บนเรซิน (resin-bound peptide) C'-Asp(OtBu)-Ala-NH ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-2



แผนภาพที่ 3-2 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-NH_2 บนเรซิน

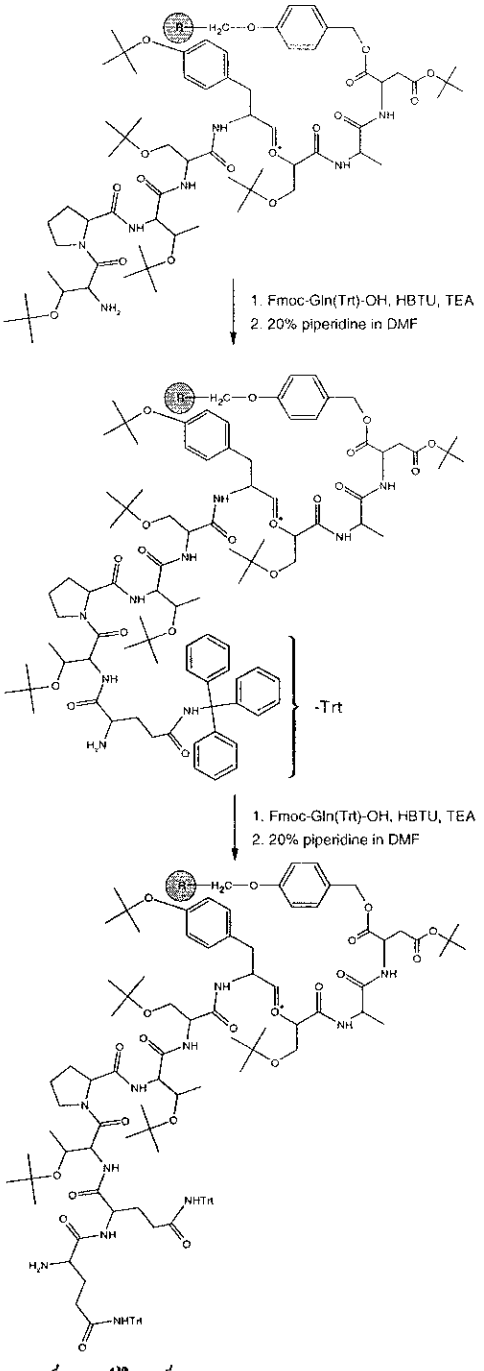
การสังเคราะห์เพปไทด์ดำเนินต่อไปโดยจะเริ่มจากการสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนตัวถัด ๆ มา โดยใช้วิธีการสังเคราะห์และรีเอเจนต์ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งกรดอะมิโนที่สร้างพันธะกับเพปไทด์ที่อยู่บนเรซินคือ Fmoc-Ser(tBu)-OH ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ที่อยู่บนเรซิน C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-NH_2 ตามด้วยการสร้างพันธะเพปไทด์กับ Fmoc-Tyr(tBu)-OH จากนั้นหมู่ Fmoc ได้ถูกกำจัดออกให้ เพปไทด์บนเรซินคือ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-NH_2 โดยเพปไทด์นี้จะทำปฏิกิริยาต่อกับ Fmoc-Ser(tBu)-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ให้เพปไทด์บนเรซินคือ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-NH_2 ขั้นต่อไปเป็นการสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนตัวถัดมา คือ Fmoc-Thr(tBu)-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งให้เพปไทด์บนเรซิน C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-NH_2 เป็นผลิตภัณฑ์ การสังเคราะห์ดำเนินต่อไปโดยการสร้างพันธะเพปไทด์กับ Fmoc-Pro-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ Fmoc ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์บนเรซินคือ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-NH_2 กรดอะมิโนตัวถัดมาที่มาเชื่อมต่อกับเพปไทด์นี้คือ Fmoc-Thr(tBu)-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ Fmoc ซึ่งจะเป็นผลิตภัณฑ์เป็น เพปไทด์บนเรซิน C'-

Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-NH_2 แผนภาพที่ 3-3 แสดงลำดับขั้น ในการสังเคราะห์มาจนถึงเพปไทด์นี้



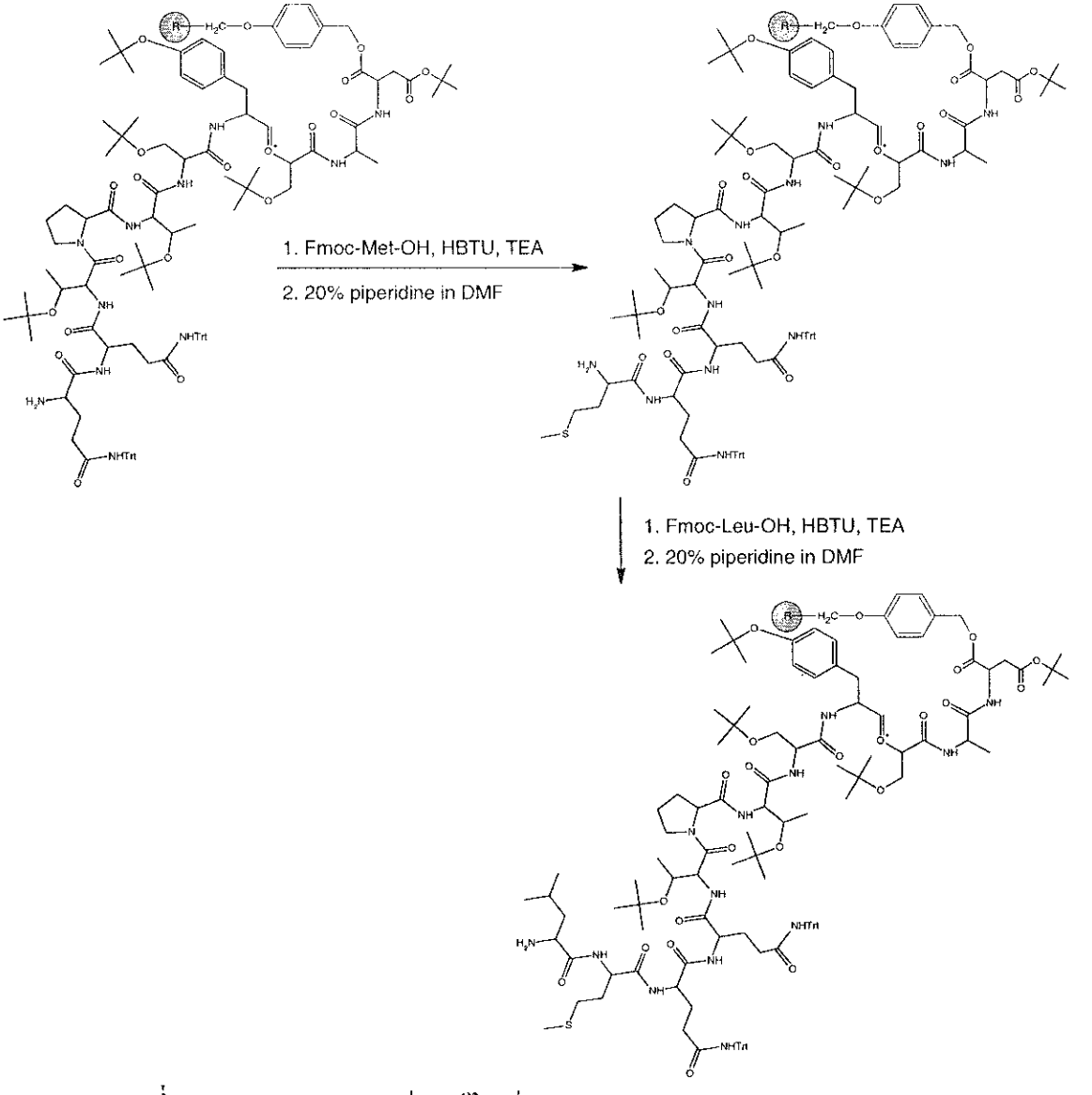
แผนภาพที่ 3-3 ลำดับขั้นตอนในการสังเคราะห์จนได้เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-NH_2 บนเรซิน

การสังเคราะห์ดำเนินต่อไปโดยการทำซ้ำขั้นตอนการสร้างพันธะเพปไทด์ และการกำจัด หมู่ปกป้อง Fmoc จนได้เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr (tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-4



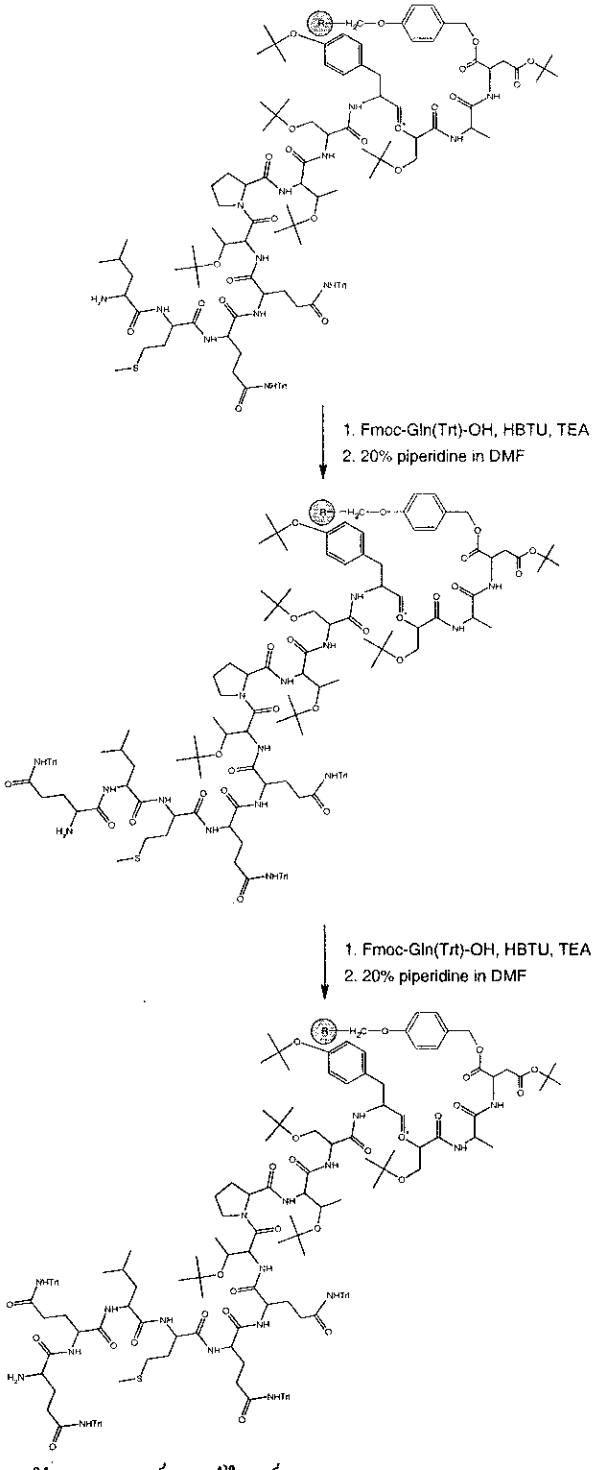
แผนภาพที่ 3-4 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน

ในขั้นตอนต่อมากรดอะมิโน Fmoc-Met-OH ได้เชื่อมต่อกับเพปไทด์บนเรซินซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็น C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln (Trt)-Met-NH_2 หลังจากได้กำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกไปแล้ว ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-5 และเพื่อเชื่อมกรดอะมิโนตัวถัดมากับเพปไทด์บนเรซิน Fmoc-Leu-OH ได้ทำปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์ ตามมาด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc จนได้ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr (tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln (Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-NH_2



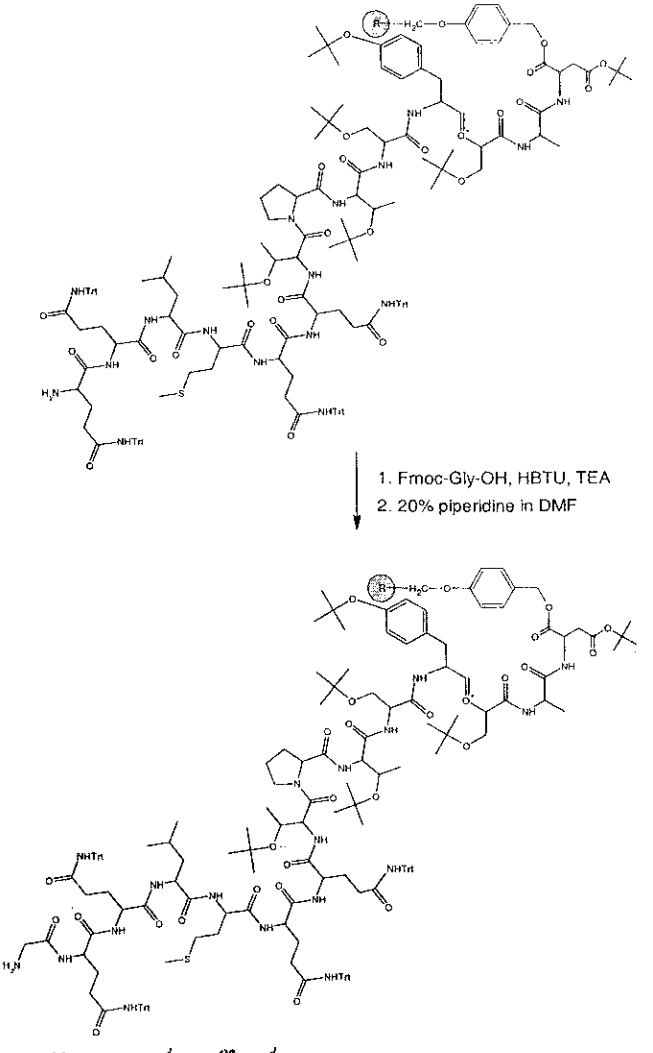
แผนภาพที่ 3-5 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln (Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-NH_2 บนเรซิน

ขั้นตอนในการสังเคราะห์ซึ่งประกอบไปด้วยการสร้างพันธะเพปไทด์และการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc นั้นได้ทำซ้ำอีก 2 ครั้งสำหรับ กรดอะมิโน Fmoc-Gln(Trt)-OH เพื่อให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-Gln(Trt)-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-6



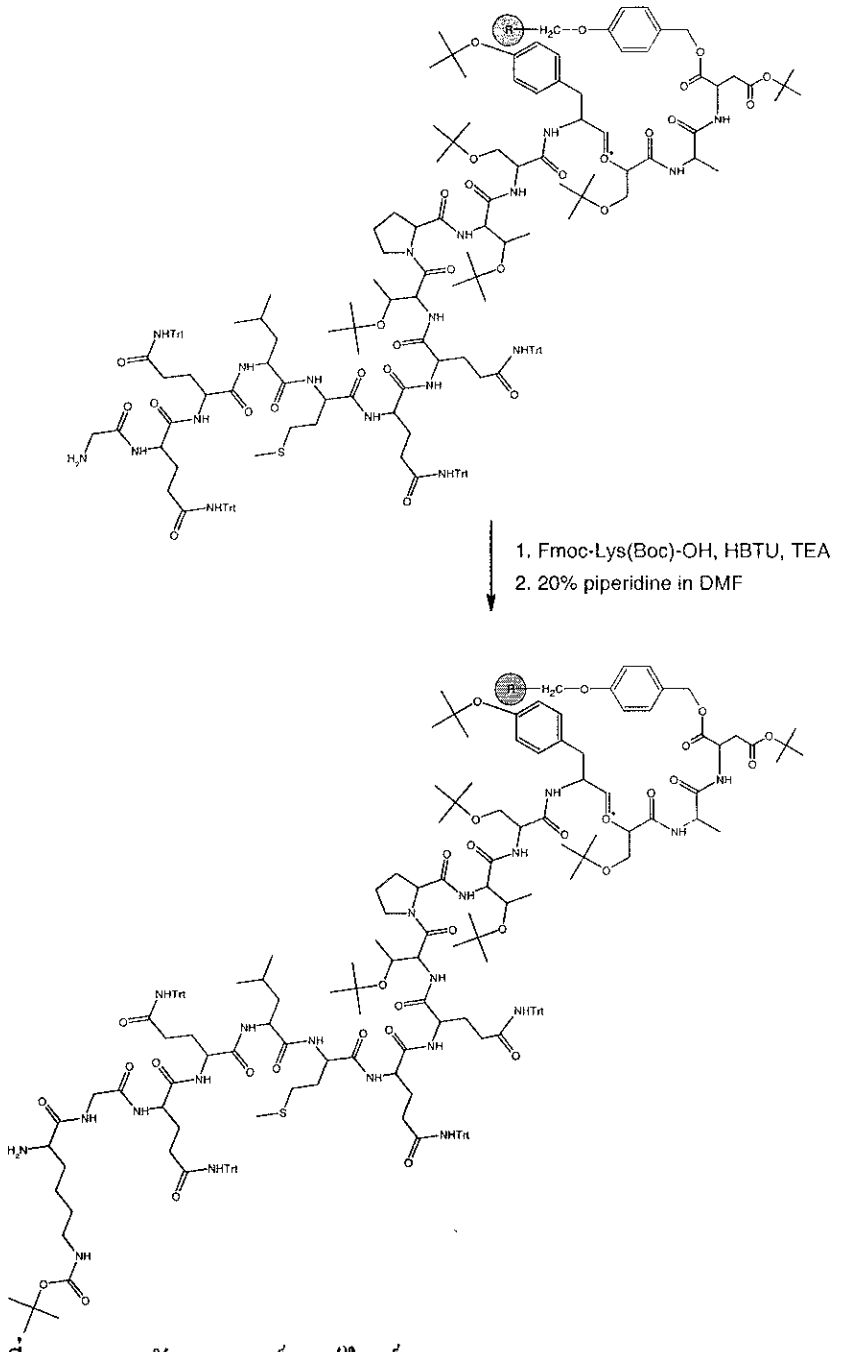
แผนภาพที่ 3-6 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-Gln(Trt)-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน

จากนั้นกรดอะมิโน Fmoc-Gly-OH ได้เชื่อมต่อกับเพปไทด์ที่อยู่บนเรซิน โดยวิธีในการสังเคราะห์ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu -Gln(Trt)-Gln(Trt)-Gly-NH_2 บนเรซิน โดยปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ที่กล่าวมานั้น ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-7



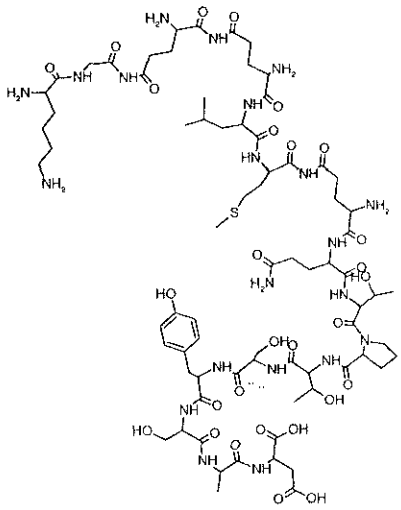
แผนภาพที่ 3-7 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Gly-NH_2 บนเรซิน

กรดอะมิโนตัวสุดท้ายที่นำมาเชื่อมต่อกับเพปไทด์บนเรซินคือ Fmoc-Lys(Boc)-OH โดยการสร้างพันธะเพปไทด์ ตามมาด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งได้ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu -Gln(Trt)-Gln(Trt)-Gly-Lys(Boc)-NH_2 บนเรซิน ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-8

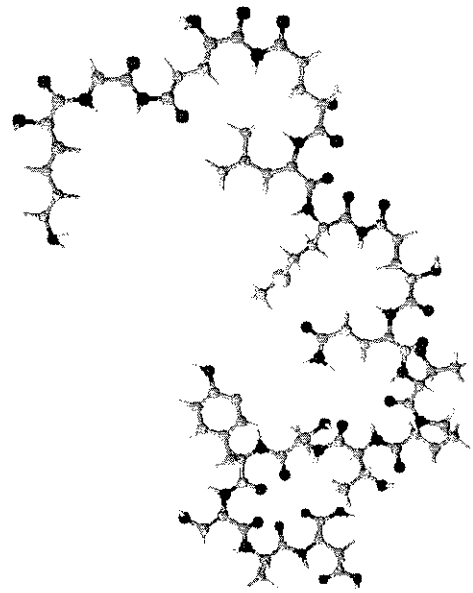


แผนภาพที่ 3-8 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-Leu-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Gly-Lys(Boc)- NH_2 บนเรซิน

จากนั้นเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ซึ่งคาดว่าจะเป็นเพปไทด์ rBGlu1-1n2 ได้ถูกทำให้หลุดออกจากเรซิน รวมทั้งหมู่ปกป้องของ side chain ได้ถูกกำจัดออกทั้งหมดโดยใช้รีเอเจนต์ K ซึ่งภาพที่ 3-1 แสดงถึงโครงสร้างทางเคมี รวมทั้งโครงแบบสามมิติของเพปไทด์นี้



rBGlu1-1n2



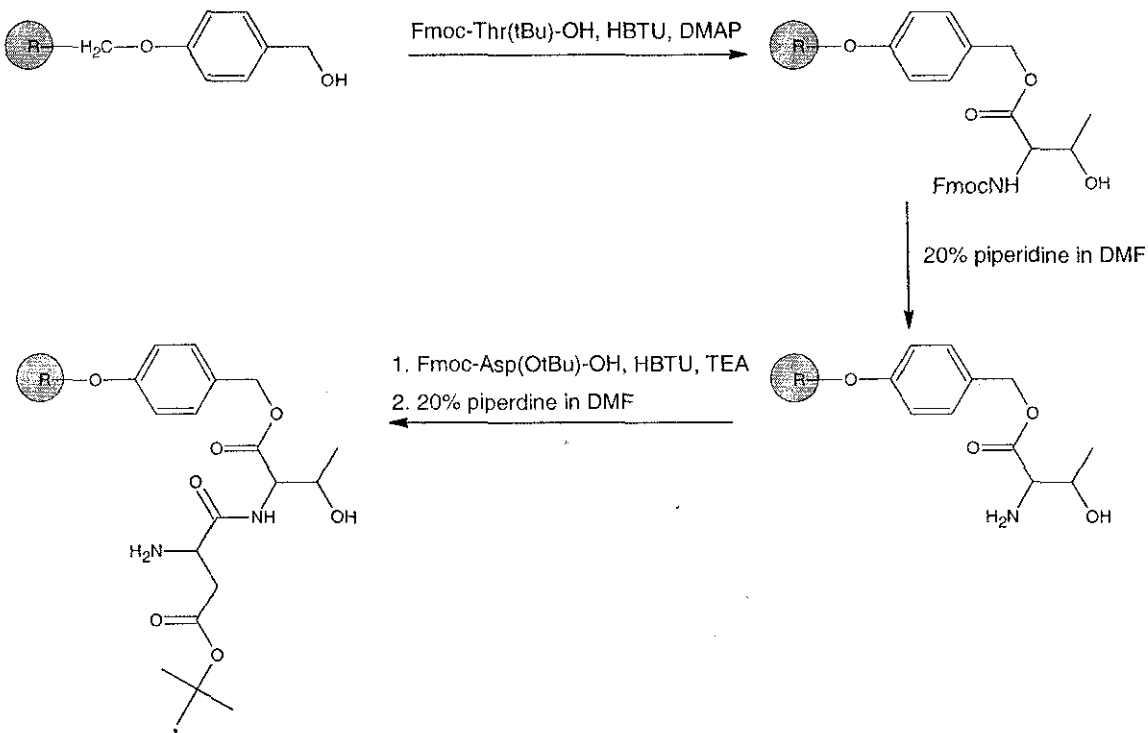
โครงแบบสามมิติของ rBGlu1-1n2

ภาพที่ 3-1 โครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ rBGlu1-1n2

เพปไทด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้นำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค LC-MS เพื่อยืนยันโครงสร้าง ซึ่งมวลโมเลกุลที่ตรวจสอบได้คือ 1782.81 D ซึ่งใกล้เคียงกับมวลโมเลกุลของเพปไทด์ rBGlu1-1n2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1782.96 D อย่างไรแบบแผนของ MS fragmentation ไม่ตรงกับเพปไทด์ที่ต้องการ ซึ่งผลในการวิเคราะห์นี้จะได้กล่าวต่อไปในบทวิเคราะห์ผลการทดลอง

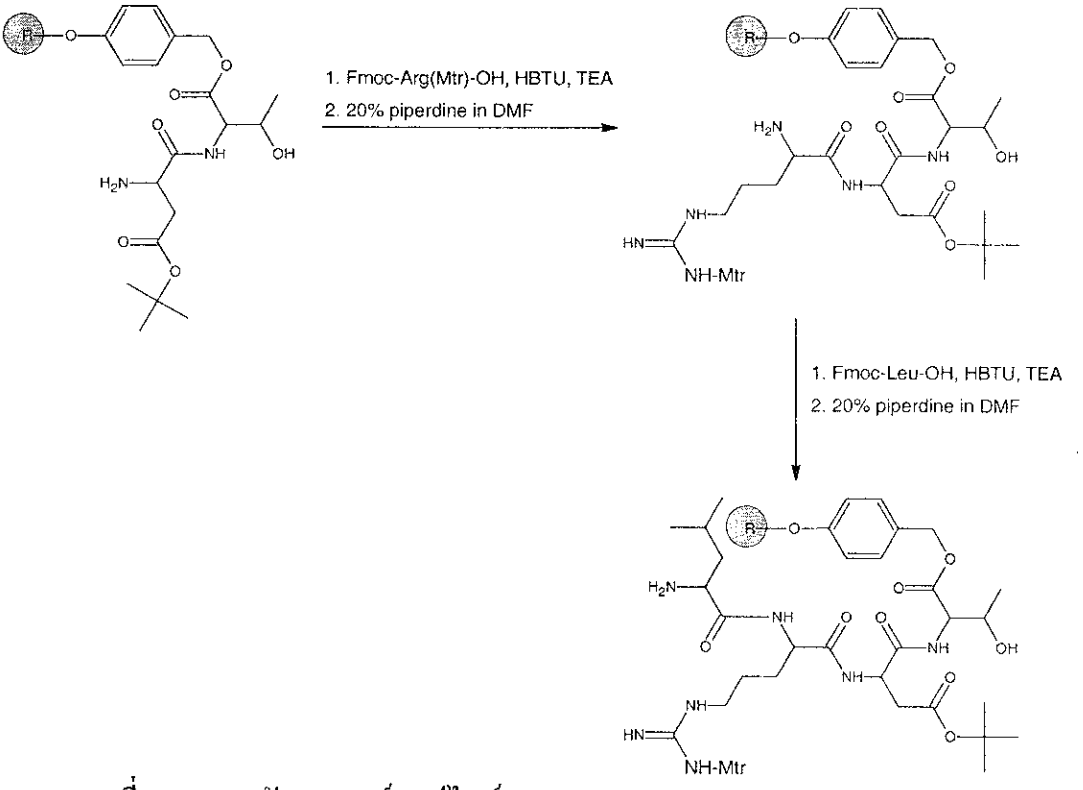
B. การสังเคราะห์เพปไทด์ rBGlu1-2; N'-Cys-Gly-Asp-Gln-Pro-Ala-Asn-Leu-Ser-Arg-Asp-Gln-Leu-Arg-Asp-Thr-C'

ลำดับขั้นตอนในการสังเคราะห์เพื่อให้ได้เพปไทด์เป้าหมายจะคล้ายคลึงกับการสังเคราะห์เพปไทด์ชนิดแรกในหัวข้อ 3.1.1 A ซึ่งจะเริ่มจากการเชื่อมต่อกรดอะมิโนตัวแรกซึ่งในกรณีของเพปไทด์ rBGlu1-2 ได้แก่ Fmoc-Thr(tBu)-OH เข้ากับ wang resin โดยใช้ HBTU and DMAP เป็นรีเอเจนต์ ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc โดยใช้สารละลาย 20% piperidine ใน DMF เพื่อให้ได้หมู่อะมีนอิสระที่พร้อมจะทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนตัวที่ 2 ซึ่งได้แก่ Fmoc-Asp(OtBu)-OH ซึ่งโดยลำดับการสังเคราะห์ที่เริ่มจากการสร้างพันธะเพปไทด์ ตามมาด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc จะได้ผลิตภัณฑ์คือ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-NH_2 บนเรซิน โดยในแผนภาพที่ 3-9 ได้แสดงปฏิกิริยาที่ได้กล่าวมาข้างต้น



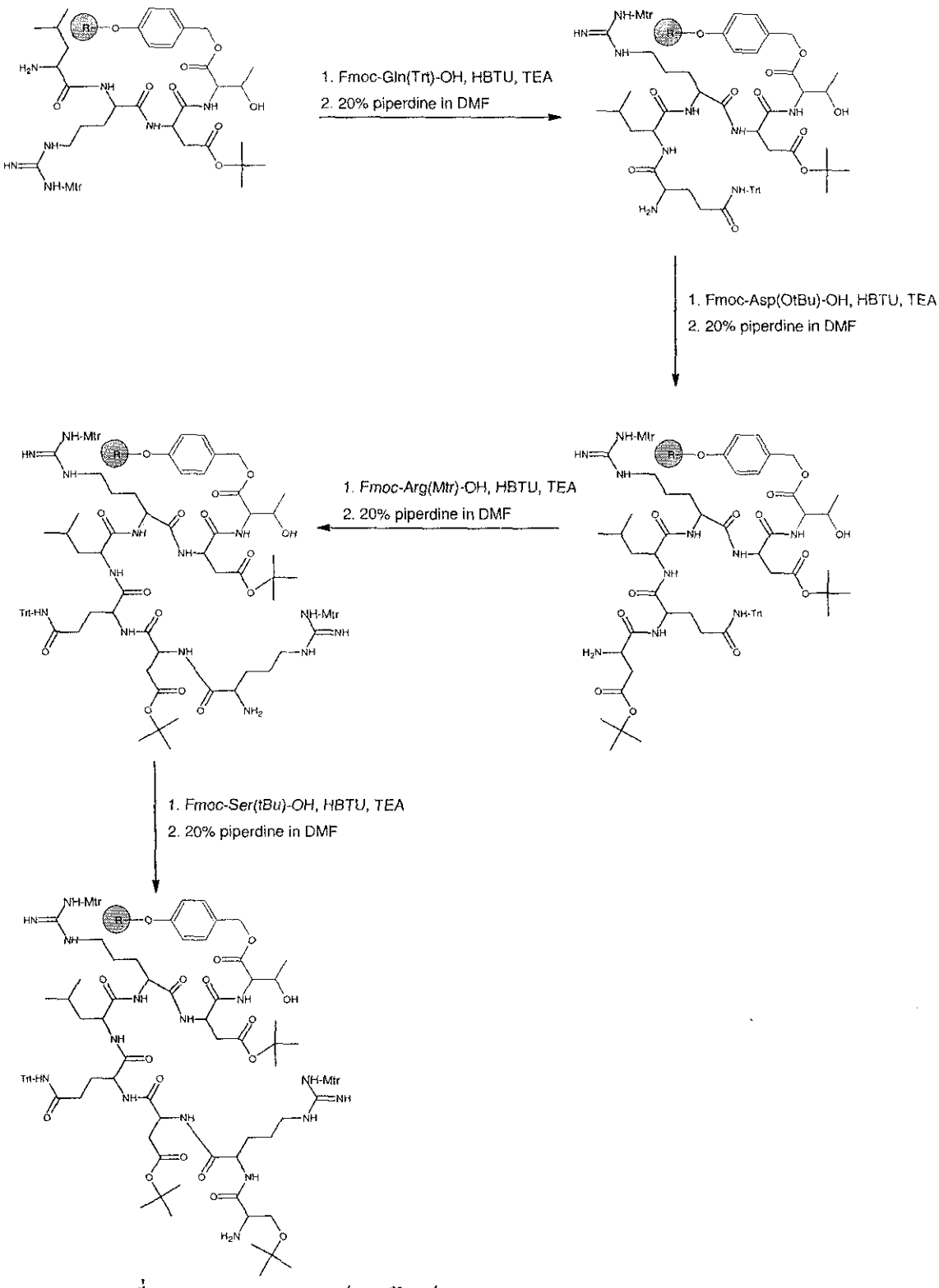
แผนภาพที่ 3-9 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-NH_2 บนเรซิน

ลำดับขั้นตอนในการสังเคราะห์และการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ไปอย่างต่อเนื่องกับกรดอะมิโนตัวถัดไปซึ่งได้แก่ Fmoc-Arg(Mtr)-OH และทำซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ได้เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-NH_2 บนเรซินเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับ Fmoc-Leu-OH และตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc และให้ผลิตภัณฑ์คือเพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-NH_2 บนเรซิน ซึ่งการสังเคราะห์จนถึงขั้นตอนนี้ ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-10



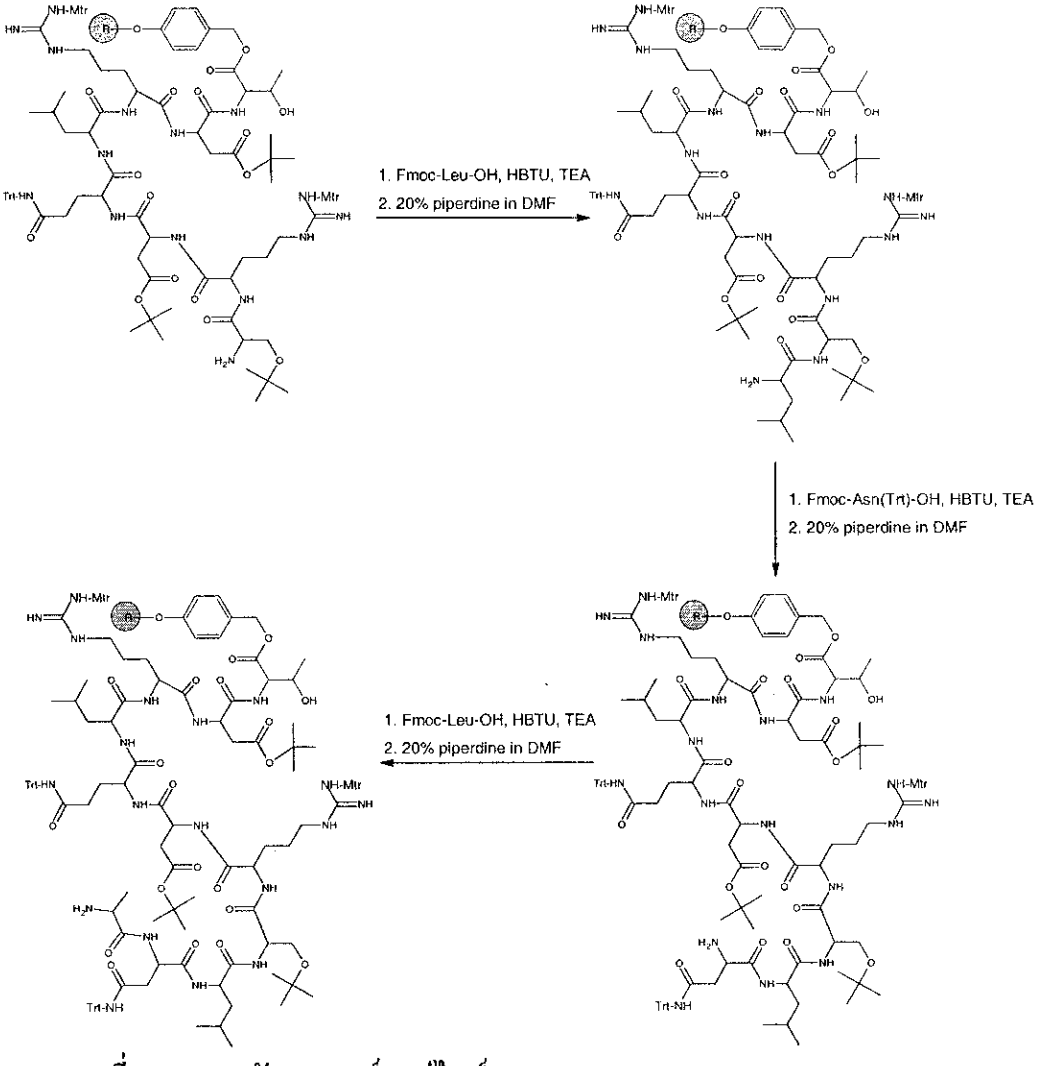
แผนภาพที่ 3-10 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr (tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-NH_2 บนเรซิน

เพปไทด์ที่ได้นี้จะนำมาทำปฏิกิริยาต่อกับ Fmoc-Gln(Trt)-OH ตามด้วยกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออก และให้ผลิตภัณฑ์คือ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-NH_2 และได้นำไปทำปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc กับกรดอะมิโนตัวถัด ๆ ไปคือ Fmoc-Asp(OtBu)-OH ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-NH_2 บนเรซิน ตามด้วยการทำปฏิกิริยากับ Fmoc-L-Arg(Mtr)-OH ให้เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-NH_2 โดยวงจรของปฏิกิริยาการสร้างเพปไทด์และการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ดำเนินต่อไปกับกรดอะมิโนFmoc-Ser(tBu)-OH ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-NH_2 ทั้งนี้การปฏิกิริยาการสังเคราะห์จนถึงขั้นตอนนี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-11



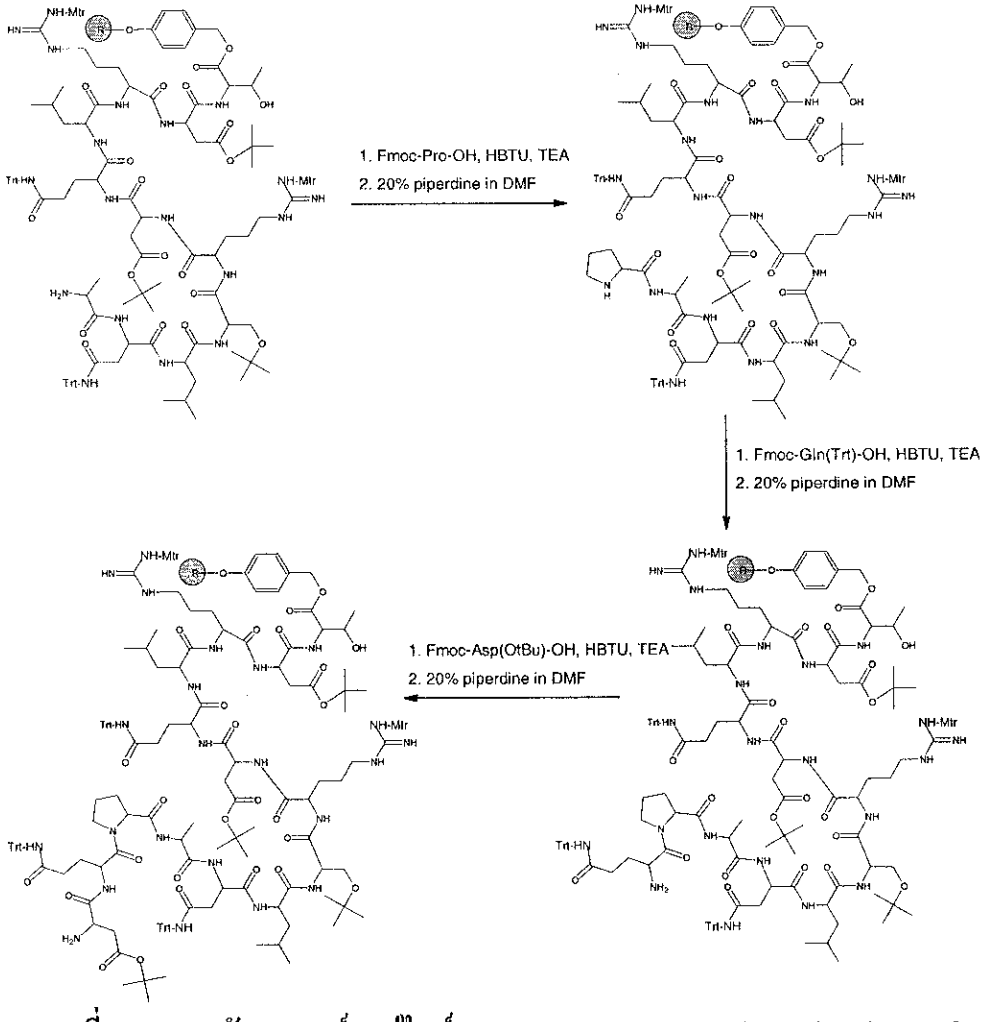
แผนภาพที่ 3-11 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน

กรดอะมิโนตัวถัดไปที่นำมาทำปฏิกิริยากับเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้คือ Fmoc-Leu-OH ซึ่งเมื่อผ่านขั้นตอนการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc จะให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-NH_2 บนเรซิน โดยเพปไทด์นี้จะทำปฏิกิริยาต่อกับ Fmoc-Asn(Trt)-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งจะให้เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-NH_2 บนเรซินเป็นผลิตภัณฑ์ จากนั้นโดยการสร้างพันธะเพปไทด์และการกำจัดหมู่ปกป้องของกรดอะมิโนตัวถัดไป ซึ่งได้แก่ Fmoc-Ala-OH จะให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Ala-NH_2 บนเรซิน ทั้งนี้ปฏิกิริยาต่าง ๆ จนได้เพปไทด์นี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-12



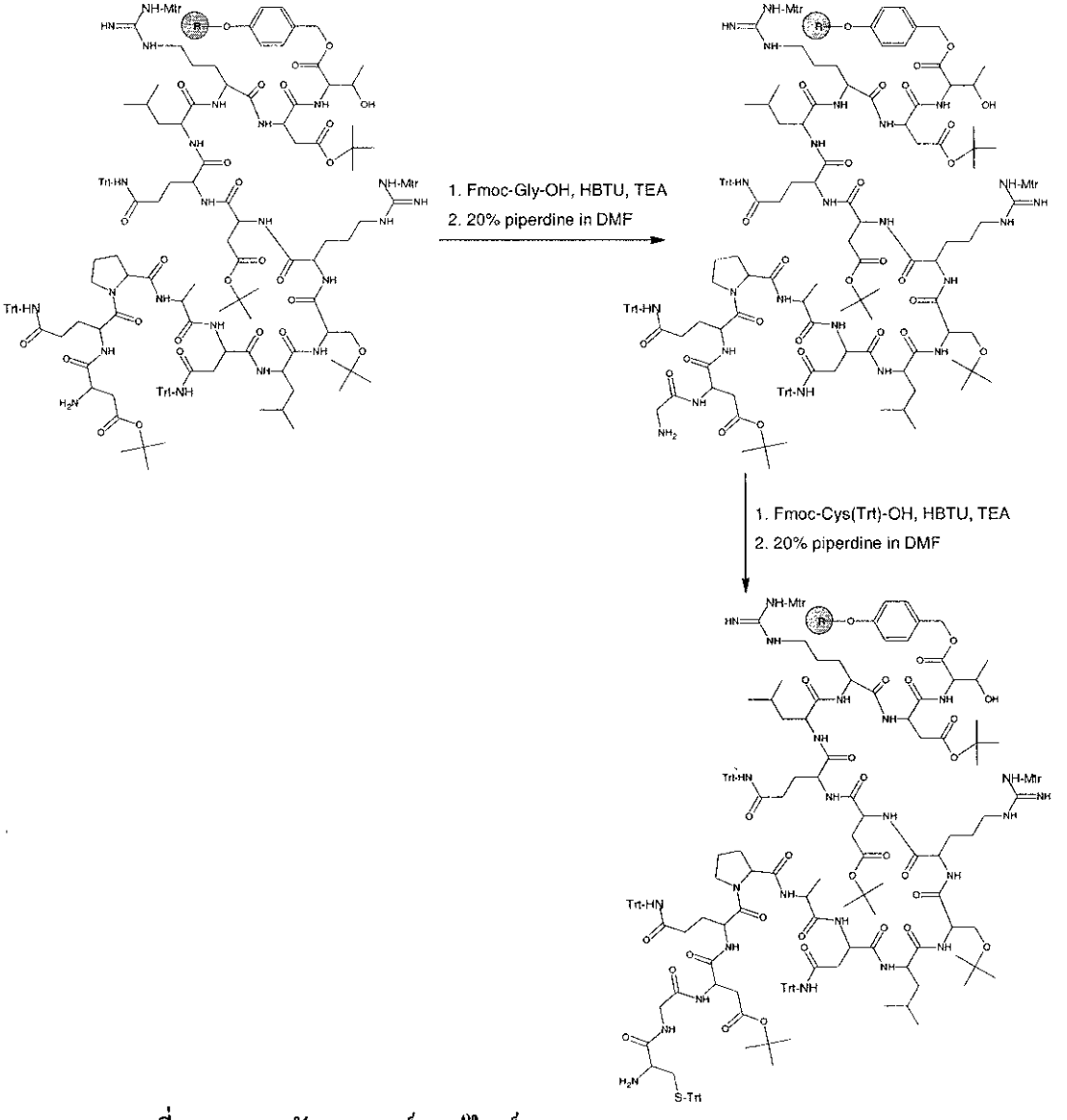
แผนภาพที่ 3-12 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)- Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Ala-NH_2 บนเรซิน

จากนั้นการปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์และการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ดำเนินต่อไปกับกรดอะมิโน Fmoc-Pro-OH ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(t-Bu)-Leu-Asn(Trt)-Ala-Pro-NH_2 บนเรซิน เมื่อเพปไทด์นี้ทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโน Fmoc-Gln(Trt)-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc จะให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Ala-Pro-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน สำหรับกรดอะมิโนตัวถัดมาที่นำมาทำปฏิกิริยาคือ Fmoc-Asp(OtBu)-OH โดยใช้วิธีการในการสังเคราะห์และการกำจัดหมู่ปกป้องดังที่กล่าวแล้วข้างต้น จะให้เพปไทด์บนเรซิน C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser (tBu)-Leu-Asn(Trt)-Ala-Pro-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-NH_2 เป็นผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องจนได้เพปไทด์นี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-13



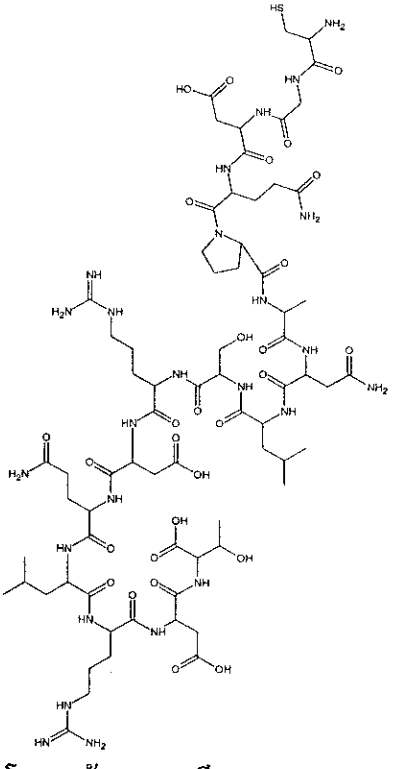
แผนภาพที่ 3-13 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln (Trt)-Asp(O-tBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Ala-Pro-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-NH_2 บนเรซิน

สำหรับกรดอะมิโนที่นำมาทำปฏิกิริยากับเพปไทด์ที่ได้ คือ Fmoc-Gly-OH ซึ่งหลังจากกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกแล้วจะได้เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Pro-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Gly-NH_2 บนเรซิน ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนตัวสุดท้ายคือ Fmoc-Cys(Trt)-OH และหมู่ Fmoc ได้ถูกกำจัดออกไปแล้วจะให้ผลิตภัณฑ์ คือเพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Pro-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Gly-Cys(Trt)-NH_2 บนเรซิน ซึ่งการปฏิกิริยานี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-14

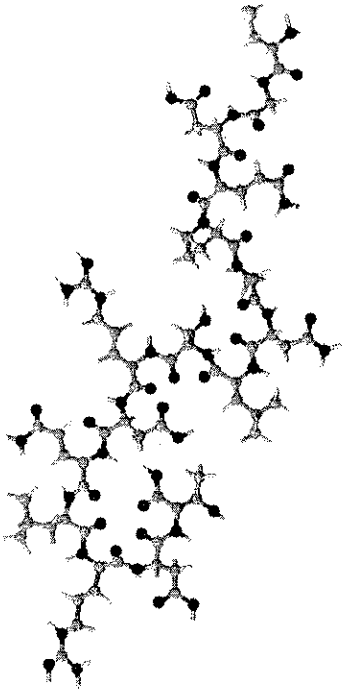


แผนภาพที่ 3-14 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Arg(Mtr)-Leu-Gln(Trt)-Asp(O-tBu)-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Pro-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Gly-Cys(Trt)-NH_2 บนเรซิน

เพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ซึ่งคาดว่าจะเป็นเพปไทด์ rBGlu1-2 ได้ถูกทำให้หลุดออกจากเร-ซิน พร้อมทั้งหมู่ปกป้องของ side chain ได้ถูกกำจัดออกในคราวเดียวกันโดยใช้รีเอเจนต์ K ทั้งนี้โครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของโมเลกุลเพปไทด์ rBGlu1-2 แสดงไว้ในภาพที่3-2



โครงสร้างทางเคมีของ rBGlu1-2



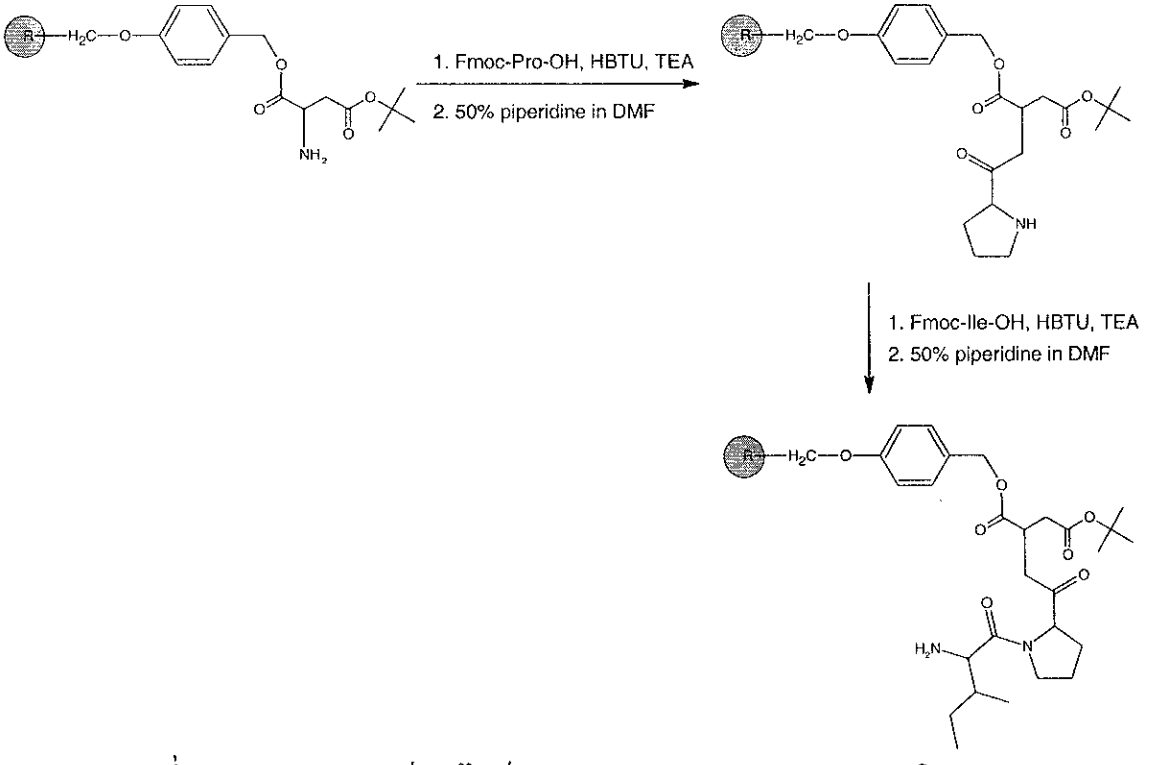
โครงแบบสามมิติ rBGlu1-2

ภาพที่ 3-2 โครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ rBGlu1-2

เมื่อนำเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS พบว่าค่ามวลโมเลกุลที่ได้ไม่สอดคล้องกับมวลโมเลกุลของเพปไทด์ rBGlu1-2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1788.93 D ซึ่งรายละเอียดจะได้กล่าวถึงในหัวข้อการวิเคราะห์ผลการทดลอง

C. การสังเคราะห์เพปไทด์ rbgal 2; N'-Cys-Gly-Glu-Ser-Val-Met-Gly-Ser-Gly-Ala-Lys-Ser-Arg-Ile-Pro-Asp-C'

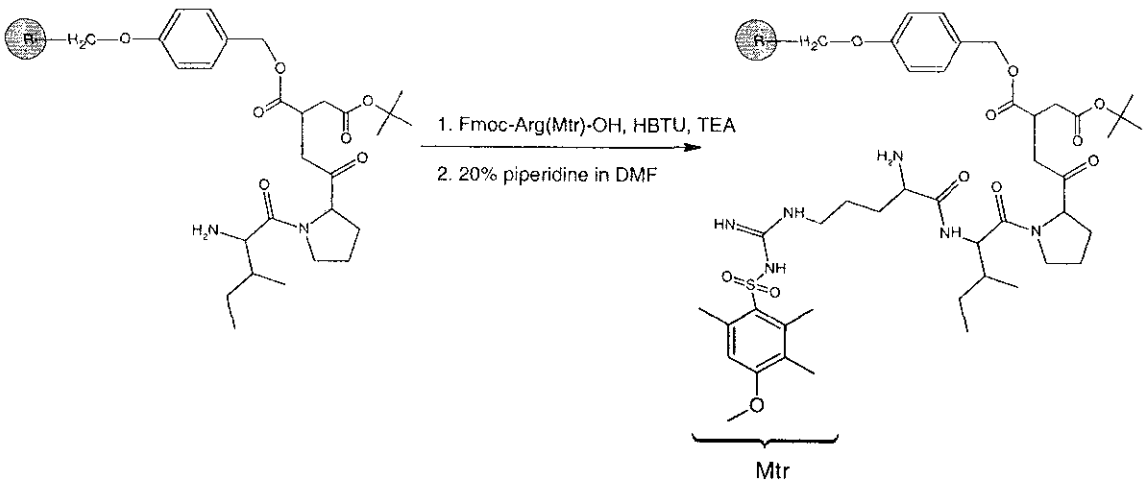
ขั้นตอนในการสังเคราะห์จะคล้ายคลึงกับการสังเคราะห์เพปไทด์ 2 ชนิดแรก สำหรับเพปไทด์ rbgal 2 นั้น จะเริ่มจากการเชื่อมกรดอะมิโน Fmoc-Asp(OtBu)-OH เข้ากับ wang resin โดยใช้ HBTU และ DMAP เป็นรีเอเจนต์ จากนั้นหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออกโดยใช้สารละลาย 20% piperidine ใน DMF จากนั้นกรดอะมิโนชนิดแรกได้สร้างพันธะเพปไทด์กับ Fmoc-Pro-OH โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เช่นเดียวกับปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งพันธะเพปไทด์ที่เกิดขึ้นสามารถยืนยันได้จากผลการทดสอบด้วย Kaiser และ chloronil test จากนั้นหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออกโดยใช้สารละลาย 50% piperidine ใน DMF และให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-NH_2 บนเรซิน จากนั้นเพปไทด์นี้ได้ทำปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์กับ Fmoc-Ile-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-NH_2 บนเรซิน ซึ่งปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องจนถึงขั้นตอนนี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-15



แผนภาพที่ 3-15 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-NH_2 บนเรซิน

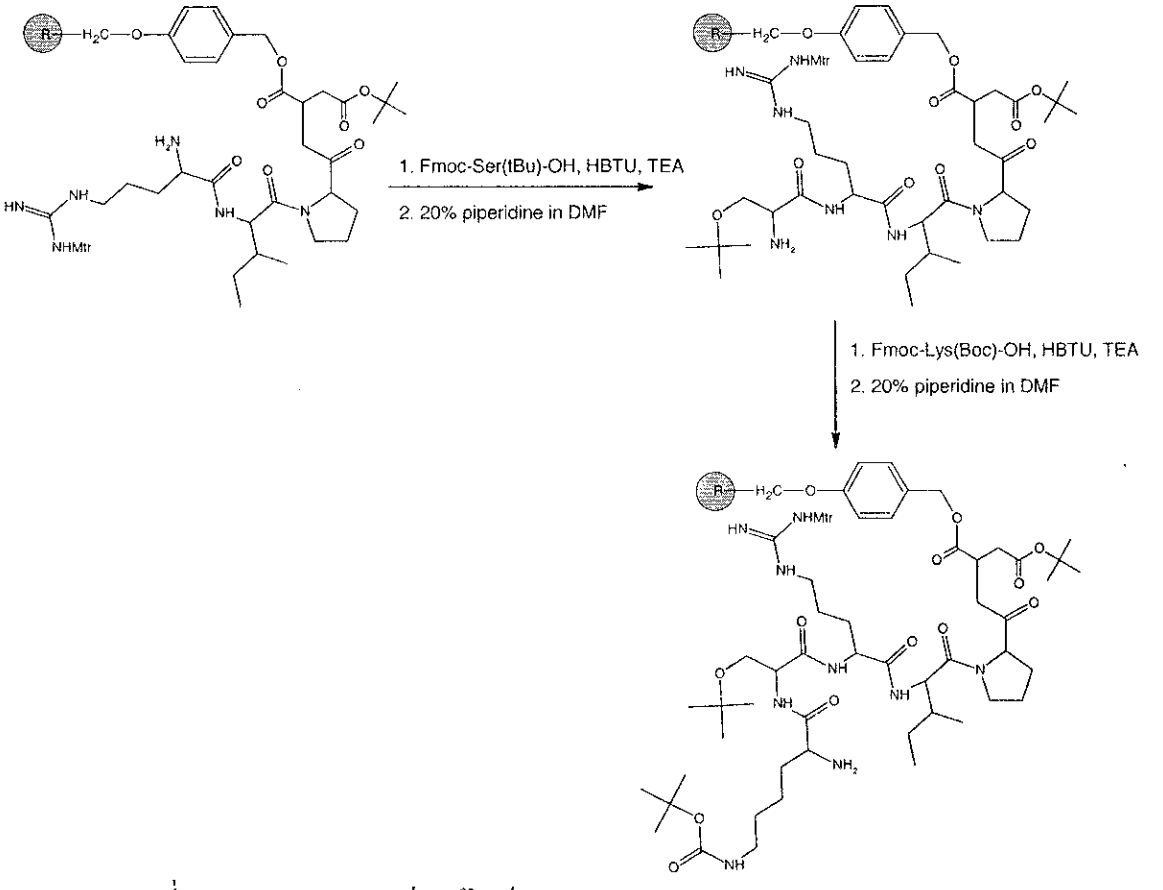
เพปไทด์บนเรซินได้นำมาสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนตัดถัดมาได้แก่ Fmoc-Arg(Mtr)-OH โดยใช้วิธีการในการสังเคราะห์ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งเมื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc

ออกไปโดยใช้สารละลาย 20% piperidine ใน DMF จะให้เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-NH_2 ดังแสดงในแผนภาพที่ 3-16



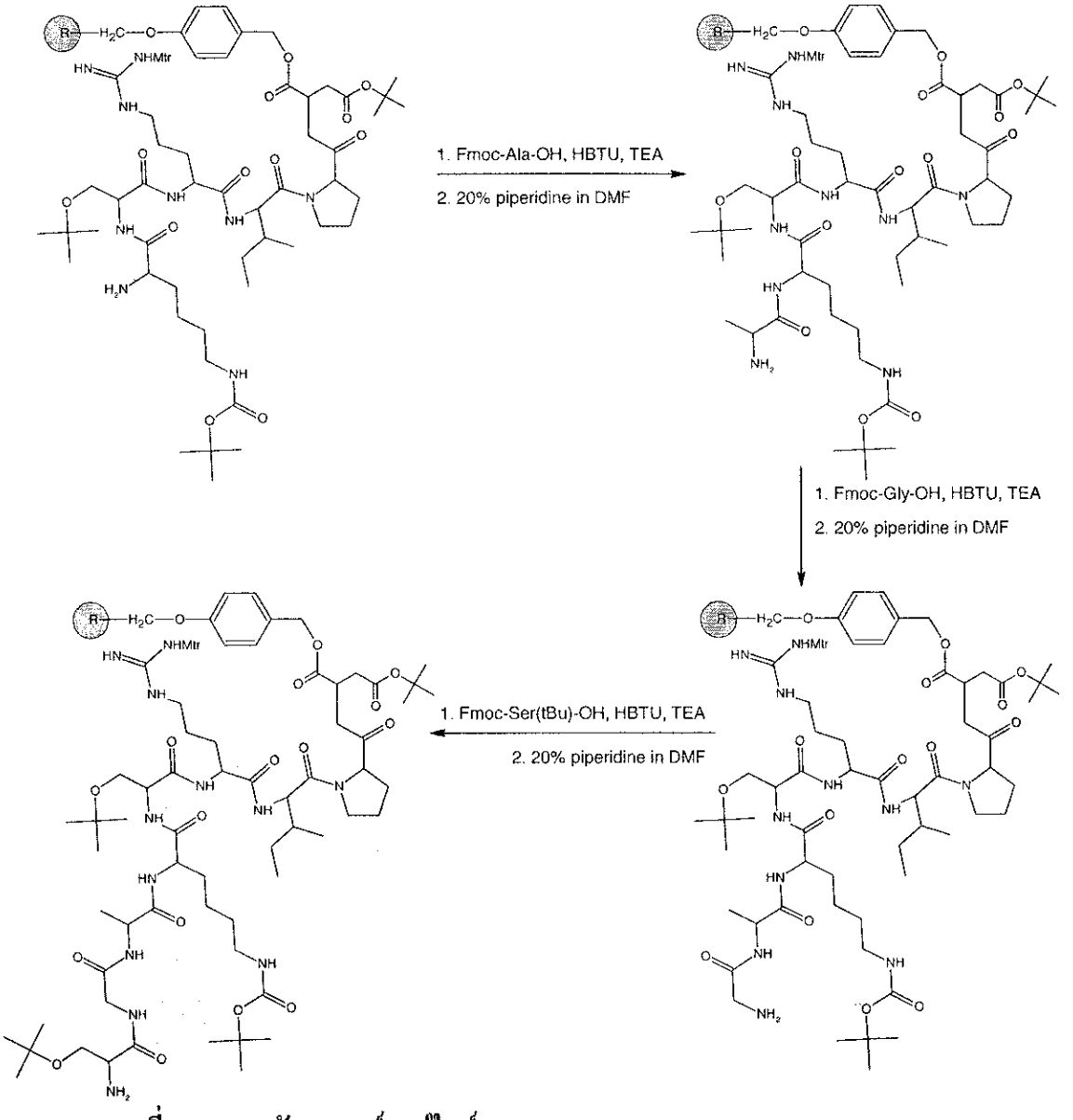
แผนภาพที่ 3-16 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-NH_2 บนเรซิน

การสังเคราะห์ได้ดำเนินต่อไปโดยการเชื่อมเพปไทด์บนเรซินกับกรดอะมิโน Fmoc-Ser (tBu)-OH จากนั้นกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน จากนั้นหมู่อะมิโนอิสระบนเพปไทด์ได้ทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์-บอกซิลของกรดอะมิโน Fmoc-Lys(Boc)-OH จากนั้นได้ทำการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออก และให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-NH_2 บนเรซิน (ดูแผนภาพที่ 3-17)



แผนภาพที่ 3-17 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน

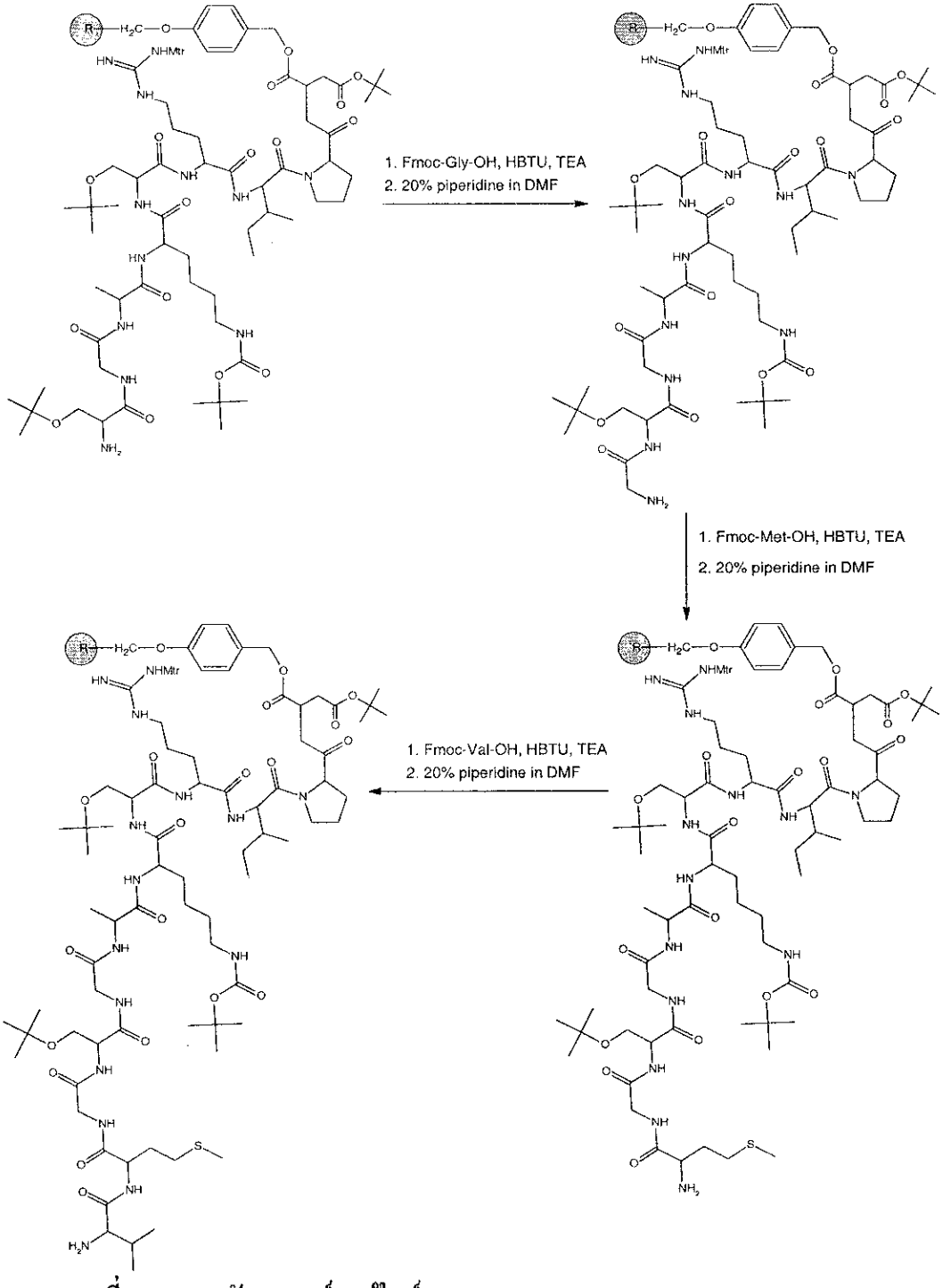
กรดอะมิโนตัวถัดไปที่นำมาทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับเพปไทด์บนเรซินคือ Fmoc-Ala-OH ซึ่งเมื่อพันธะเพปไทด์ได้ถูกสร้างขึ้นมา ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc จะให้เพปไทด์คือ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-NH_2 บนเรซิน เป็นผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้วงจรการสร้างพันธะเพปไทด์และการกำจัดหมู่ปกป้องได้ทำซ้ำกับกรดอะมิโน Fmoc-Gly-OH ซึ่งได้ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-NH_2 บนเรซิน จากนั้นเพปไทด์นี้ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโน Fmoc-Ser(tBu)-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งได้ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-18



แผนภาพที่ 3-18 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc) - Ala-Gly-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน

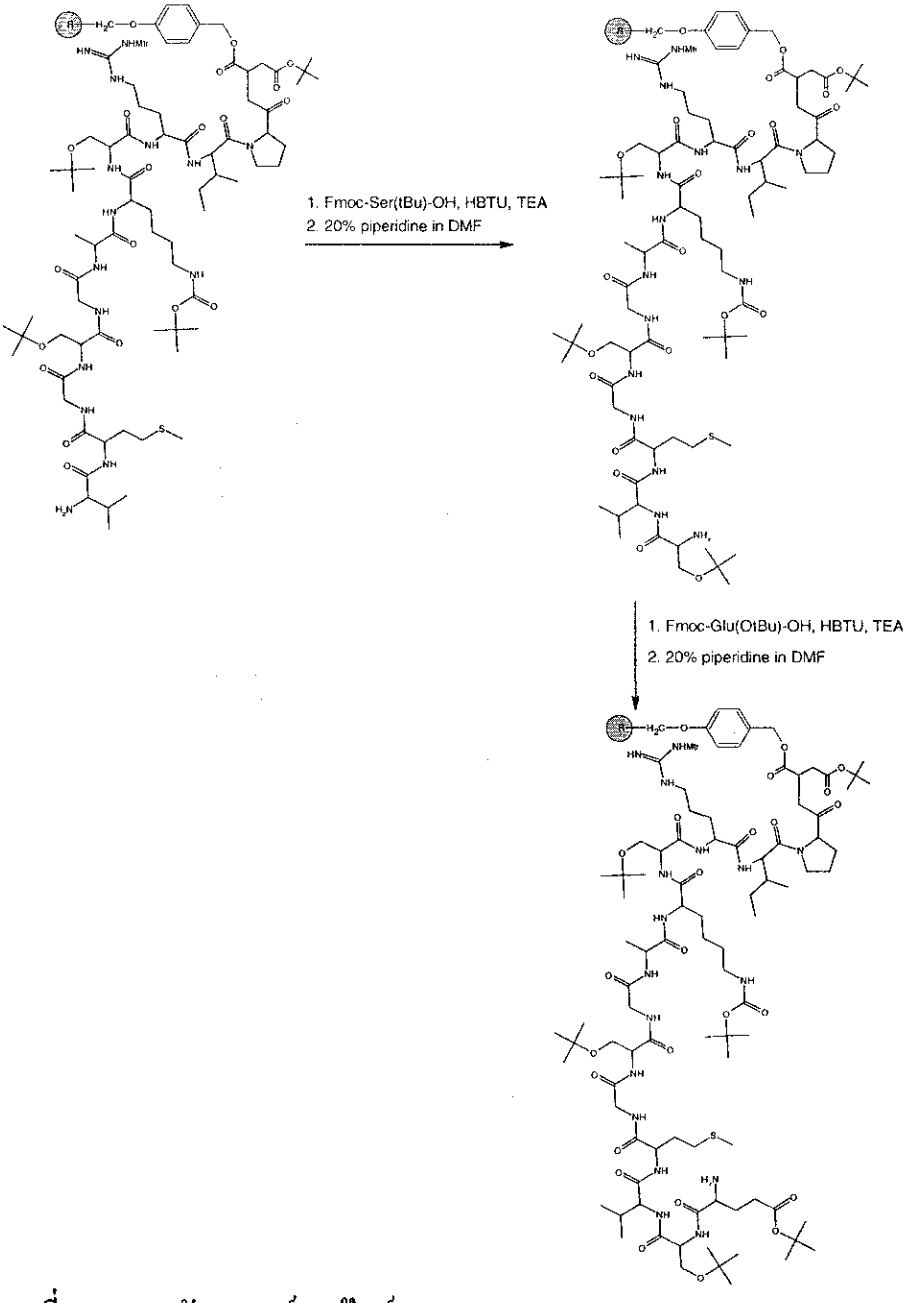
วงจรการสังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วยการสร้างพันธะเพปไทด์และการกำจัดหมู่ปกป้องFmoc ได้นำมาทำซ้ำกับกรดอะมิโน Fmoc-Gly-OH เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เพปไทด์บนเรซินคือ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-Ser(tBu)-Gly-NH_2 เพปไทด์ที่ได้มานี้ได้นำมาสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนตัวถัดมาคือ Fmoc-Met-OH ตามมาด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg (Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-Ser (tBu)-Gly-Met-NH_2 บนเรซิน ซึ่งปฏิกิริยาทั้งสองได้นำมาทำซ้ำตามลำดับขั้นตอนกับ Fmoc-Val-OH และให้เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg (Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-Ser

(tBu)-Gly-Met-Val-NH_2 บนเรซิน เป็นผลิตภัณฑ์ การสังเคราะห์จนถึงขั้นตอนนี้ได้แสดงไว้ใน แผนภาพที่ 3-19



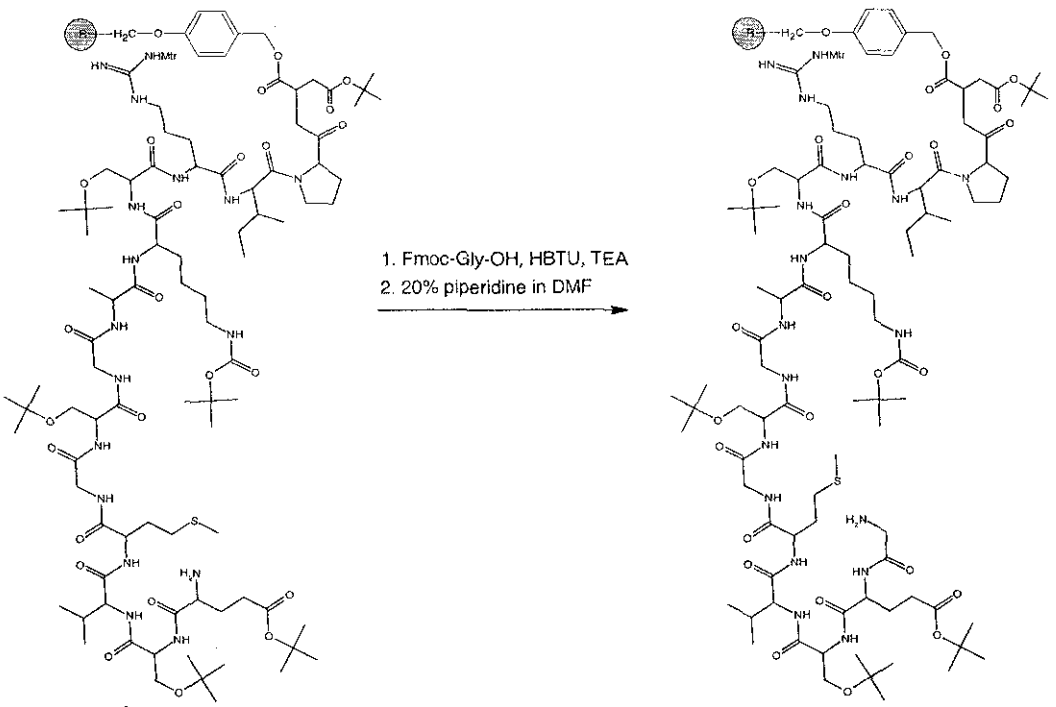
แผนภาพที่ 3-19 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc) - Ala-Gly-Ser (tBu)-Gly-Met-Val-NH_2 บนเรซิน

การสังเคราะห์เพปไทด์เป้าหมายได้ดำเนินต่อไป โดยการสร้างพันธะเพปไทด์เชื่อมต่อกับเพปไทด์บนเรซิน ซึ่งกรดอะมิโนตัวถัดไปคือ Fmoc-Ser(tBu)-OH ตามมาด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc) - Ala-Gly-Ser(tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน จากนั้นวงจรของการสร้างพันธะเพปไทด์และการกำจัดหมู่ Fmoc ได้ดำเนินต่อไปกับกรดอะมิโน Fmoc-Glu(OtBu)-OH และได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพป-ไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-Ser(tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-Glu(Ot- Bu)-NH_2 บนเรซิน การสังเคราะห์จนถึงขั้นตอนนี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-20



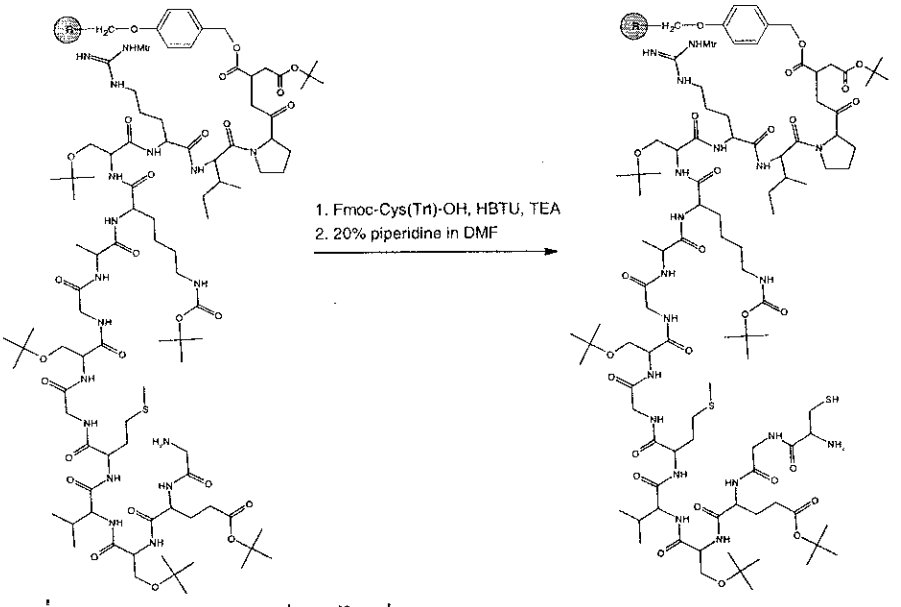
แผนภาพที่ 3-20 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc) - Ala-Gly-Ser (tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-NH_2 บนเรซิน

ในขั้นต่อมาพันธะเพปไทด์ได้ถูกสร้างขึ้นเพื่อเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนตัวถัดมา ซึ่งได้แก่ Fmoc-Gly-OH ตามมาด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc และให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Asp(O-tBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-Ser(tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-NH_2 บนเรซิน (ดูแผนภาพที่ 3-21)



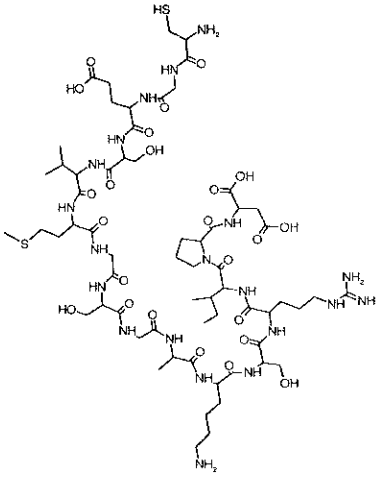
แผนภาพที่ 3-21 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc) - Ala-Gly-Ser(tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-NH_2 บนเรซิน

ในขั้นสุดท้าย เพปไทด์บนเรซินได้ทำปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนFmoc-Cys(Trt)-OH ซึ่งเมื่อได้กำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกไปแล้วจะให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Asp(OAsp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Gly-Ser(tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-Glu(O-tBu)-Gly-Cys(Trt)-NH_2 บนเรซิน ดังที่ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-22

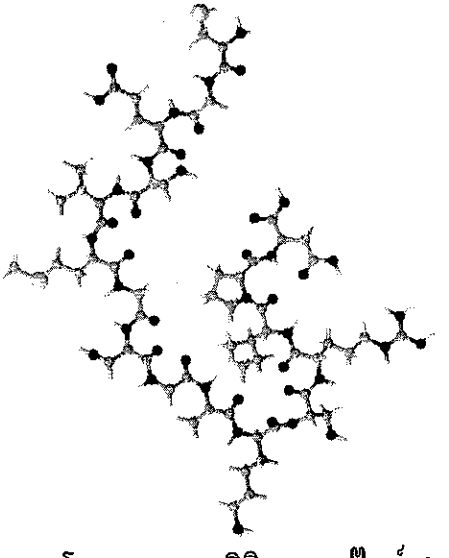


แผนภาพที่ 3-22 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Pro-Ile-Arg(Mtr)-Ser(tBu)-Lys(Boc) - Ala-Gly-Ser(tBu)-Gly-Met-Val-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Cys(Trt)-NH_2 บนเรซิน

เมื่อเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ถูกทำให้หลุดออกจากเรซินไปพร้อมกันกับการกำจัดหมู่ ปก- ป้องที่ side chain โดยใช้รีเอเจนต์ K แล้ว ได้ให้ผลิตภัณฑ์เป็นตะกอนขาวซึ่งคาดว่าจะเป็นเพป-ไทด์ rbgal 2 ทั้งนี้โครงสร้างทางเคมีพร้อมทั้งโครงแบบสามมิติของเพปไทด์นี้ ได้แสดงไว้ในภาพที่ 3-3 จากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค LC-MS ได้แสดงให้เห็นว่ามวลโมกุลของเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ไม่ตรงกับของ rbgal 2 (1593.84 D) ซึ่งจะได้สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองเพิ่มเติมในหัวข้อบทวิเคราะห์



โครงสร้างทางเคมีของเพปไทด์ rbgal 2

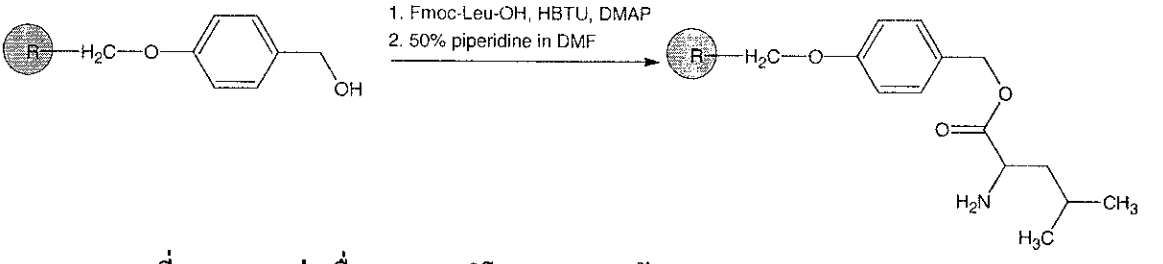


โครงแบบสามมิติของเพปไทด์ rbgal 2

ภาพที่ 3-3 โครงสร้างทางเคมี และโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ rbgal2

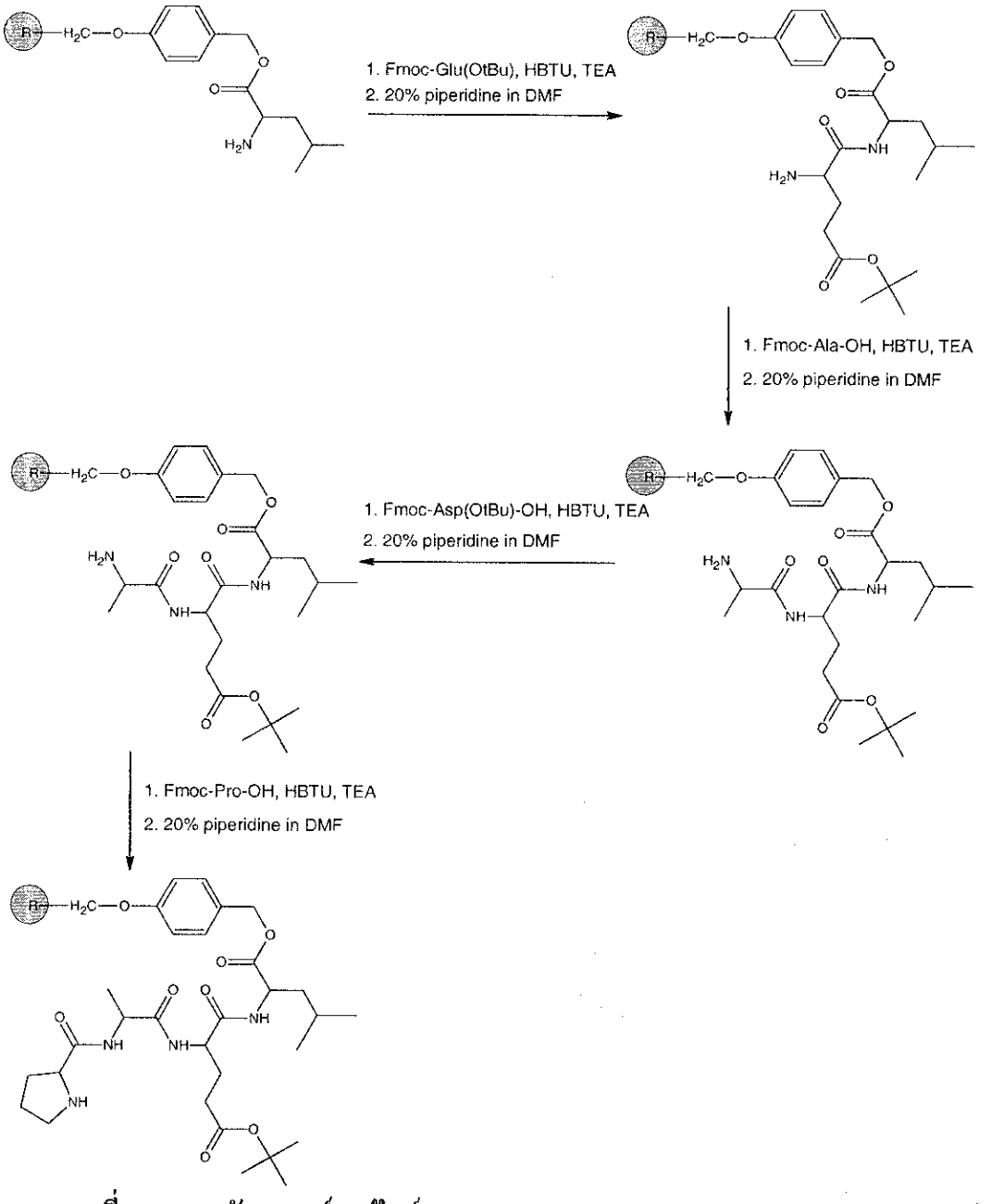
D. การสังเคราะห์เพปไทด์ RiceSFR2.1; N'-Cys-Pro-Gln-Glu-Arg-Leu-Arg-Phe-Trp-Ser-Asp-Pro-Asp-Ala-Glu-Leu-C'

กระบวนการสังเคราะห์เพปไทด์ RiceSFR2.1 เริ่มจากการต่อเชื่อมกรดอะมิโนจากปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลเข้ากับ wang resin ซึ่งในการทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้ใช้สารละลายของ Fmoc-Leu-OH ใน DMF ทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ HBTU และ DMAP ซึ่งหลังจากกวนปฏิกิริยาด้วยแก๊ส N_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นได้เติมสารละลาย 50% peperidine ใน DMF เพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ปฏิกิริยาที่กล่าวมาข้างต้นได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-23



แผนภาพที่ 3-23 การต่อเชื่อมกรดอะมิโน Leucine เข้ากับ wang resin

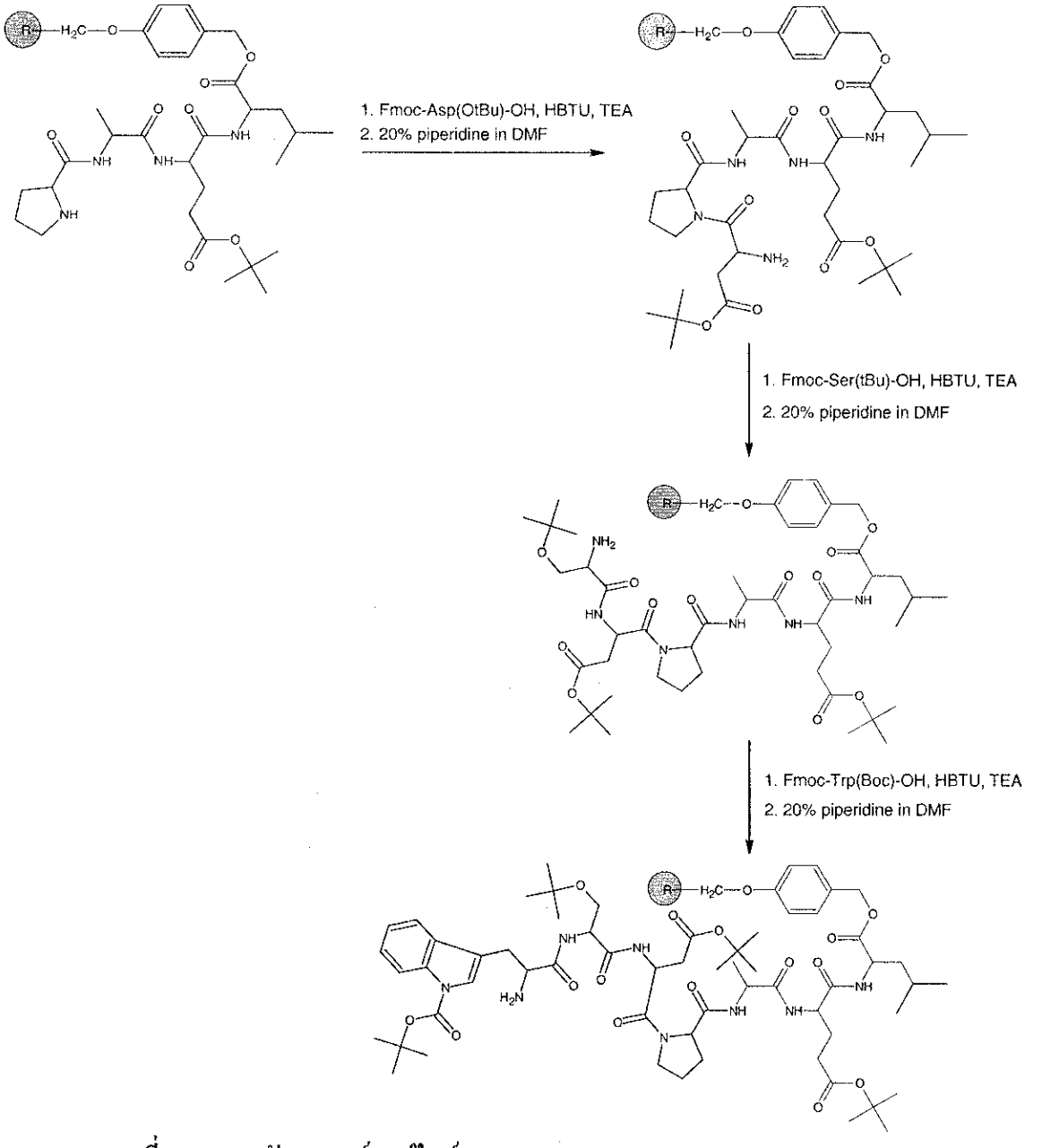
ในขั้นตอนต่อมา กรดอะมิโน Fmoc-Glu(OtBu)-OH ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโน leucine บนเรซิน โดยใช้รีเอเจนต์คือ HBTU และ TEA ในตัวทำละลาย DMF ซึ่งปฏิกิริยาได้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไป 9 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นได้ไขเอารี-เอเจนต์ที่เหลืออยู่ออก และล้างเรซินด้วย DMF แล้ว ได้เติมสารละลาย 20% piperidineใน DMF ลงไปเพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งปฏิกิริยาสมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-NH_2 บนเรซิน ซึ่งหมู่อะมิโนอิสระของเพปไทด์นี้ ได้ถูกนำมาสร้างพัน- ธะเพปไทด์เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนตัวถัดมาซึ่งได้แก่ Fmoc-Ala-OH และเมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้ว หมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกำจัดออก ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-NH_2 บน เรซิน วงจรการสังเคราะห์ได้ดำเนินต่อไปกับกรดอะมิโนตัวที่ 4 คือ Fmoc-Asp(OtBu)-OH ซึ่งหลังจากที่ได้กำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกไปแล้ว ได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-NH_2 บนเรซิน จากนั้นเพปไทด์ที่ได้นี้ถูกนำไปสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโน Fmoc-Pro-OH ตามมาด้วยปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-NH_2 บนเรซิน ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จนถึงขั้นตอนนี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-24



แผนภาพที่ 3-24 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-NH_2บนเรซิน

ในขั้นตอนต่อมาเพปไทด์บนเรซินถูกนำมาเชื่อมต่อกับกรดอะมิโน Fmoc-Asp(OtBu)-OH ตามด้วยปฏิกิริยากำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc และได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-NH_2 บนเรซิน ซึ่งเพปไทด์นี้ได้ทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโน Fmoc-Ser(tBu)-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc เป็นผลให้ได้เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser (tBu)-NH_2 บนเรซิน เป็นผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เพื่อเชื่อมเพปไทด์นี้กับกรดอะมิโนตัวถัดมาซึ่งได้แก่ Fmoc-Trp(Boc)-OH สารทั้งสองได้ถูกนำมาผ่านวงจรของการสัง- เคราะห์ทั้งสองขั้นตอนและได้ให้เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-

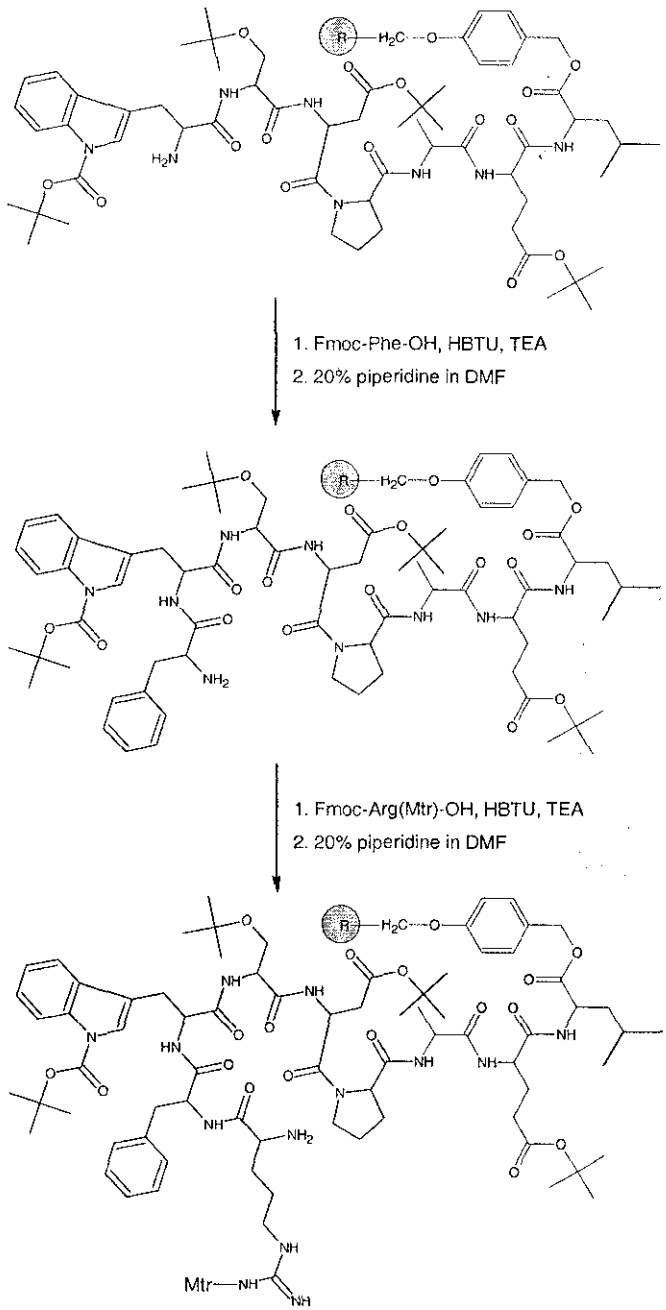
Asp(OtBu)-Ser (tBu)-Trp(Boc)-NH_2 บนเรซินเป็นผลิตภัณฑ์ การสังเคราะห์จนได้เพปไทด์นี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-25



แผนภาพที่ 3-25 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-NH_2 บนเรซิน

เพปไทด์บนเรซินได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาต่อกับ Fmoc-Phe-OH โดยวิธีสังเคราะห์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ตามมาด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-NH_2 บนเรซิน ในขั้นตอนต่อมา

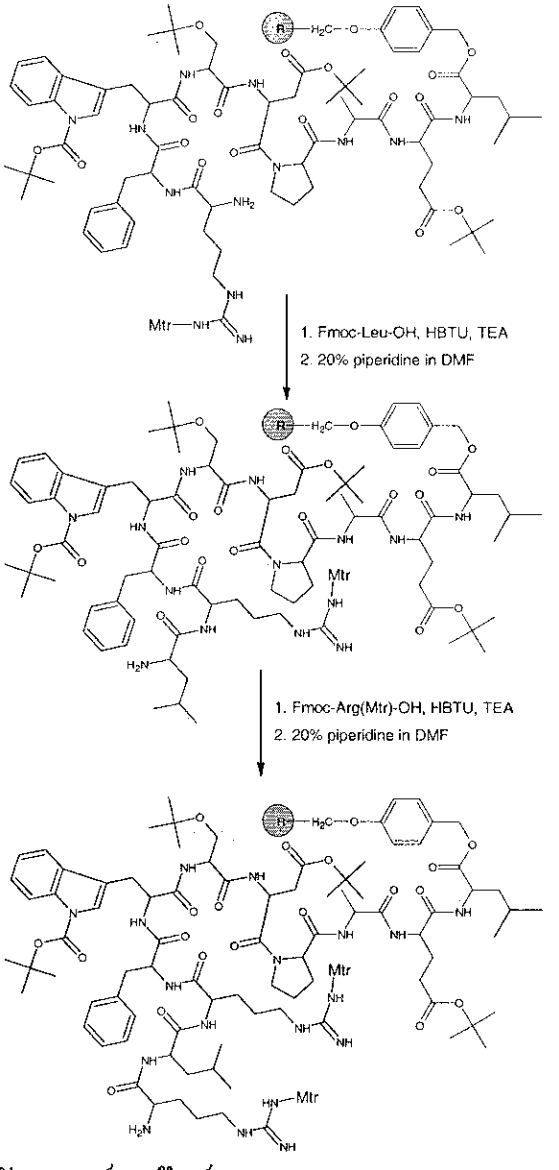
เป็นการเชื่อมเพปไทด์ที่ได้นี้มากับกรดอะมิโน Fmoc-Arg(Mtr)-OH ตามมาด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-NH_2 การสังเคราะห์จนถึงขั้นตอนนี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-26



แผนภาพที่ 3-26 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-NH_2 บนเรซิน

จากนั้นเพปไทด์บนเรซินนี้ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน Fmoc-Leu-OH ตามด้วยปฏิกิริยากำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งจะได้คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp (OtBu)-

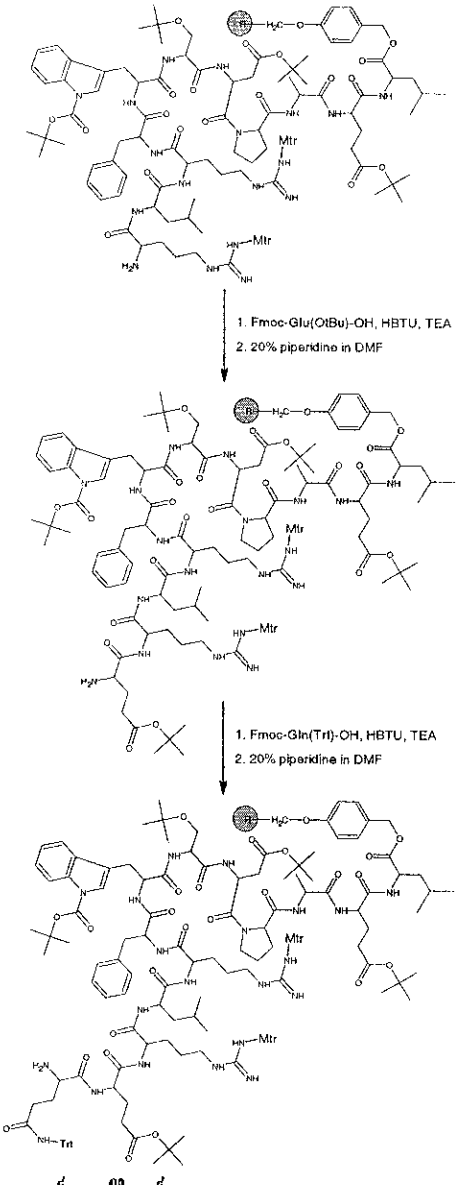
Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu(Mtr)-Leu-)-Trp(Boc)-Phe-Arg-NH_2 บนเรซิน และเมื่อเพปไทด์นี้ได้ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน Fmoc-Arg(Mtr)-OH โดยใช้วงจรของปฏิกิริยาการสังเคราะห์และการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ดังกล่าวมาข้างต้น จะได้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)- Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Arg(Mtr)-NH_2 บนเรซิน ดังแสดงไว้ในแผน- ภาพที่ 3-27



แผนภาพที่ 3-27 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Arg(Mtr)-NH_2 บนเรซิน

ทั้งนี้สายเพปไทด์ได้ถูกทำให้ยาวขึ้นโดยการเชื่อมเพปไทด์บนเรซินกับกรดอะมิโนตัวถัดมาซึ่งได้แก่ Fmoc-Glu(OtBu)-OH ซึ่งเมื่อได้กำจัดหมู่ปกป้องFmoc หลังจากปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์เสร็จสมบูรณ์แล้วจะได้เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-

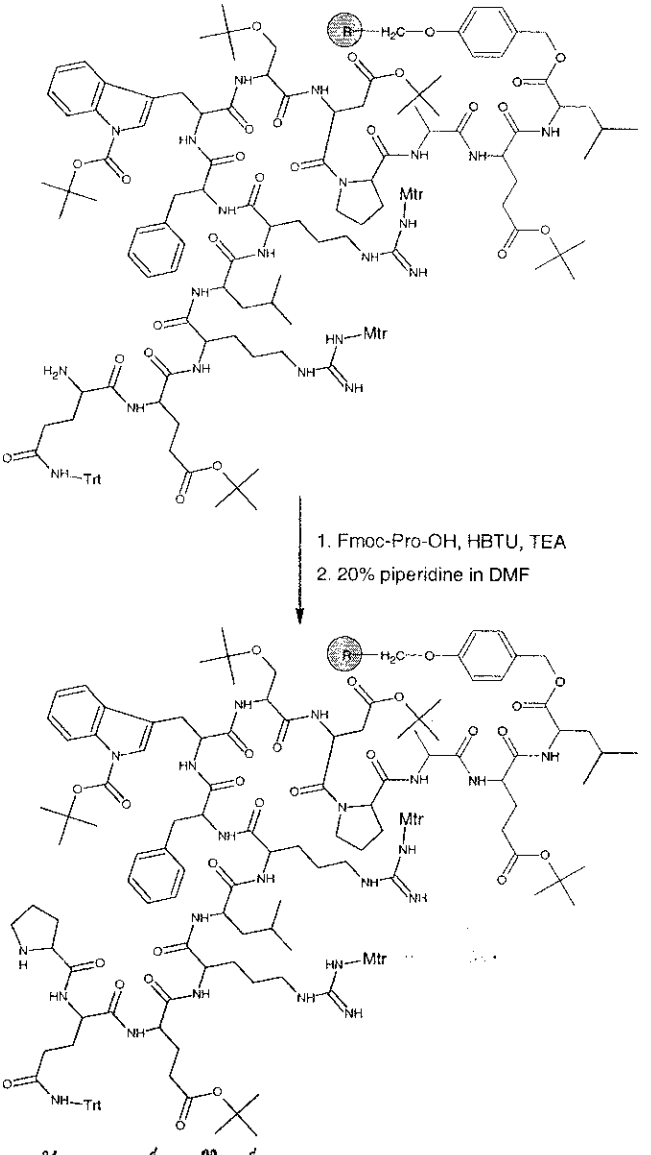
Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Arg(Mtr)-Glu(OtBu)-NH_2 บนเรซิน เป็นผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ในการสังเคราะห์ขั้นต่อมาเป็นการสร้างพันธะเพปไทด์เชื่อมต่อระหว่างเพปไทด์บนเรซินนี้กับ Fmoc-Gln(Trt)-OH ซึ่งหลังจากปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ และการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc เสร็จสมบูรณ์แล้วจะได้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(t-Bu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Arg(Mtr)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน ทั้งนี้แผนภาพที่ 3-28 ได้แสดงปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องจนถึงได้เพปไทด์นี้



แผนภาพที่ 3-28 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Arg(Mtr)-Glu (OtBu)-Gln(Trt)-NH_2

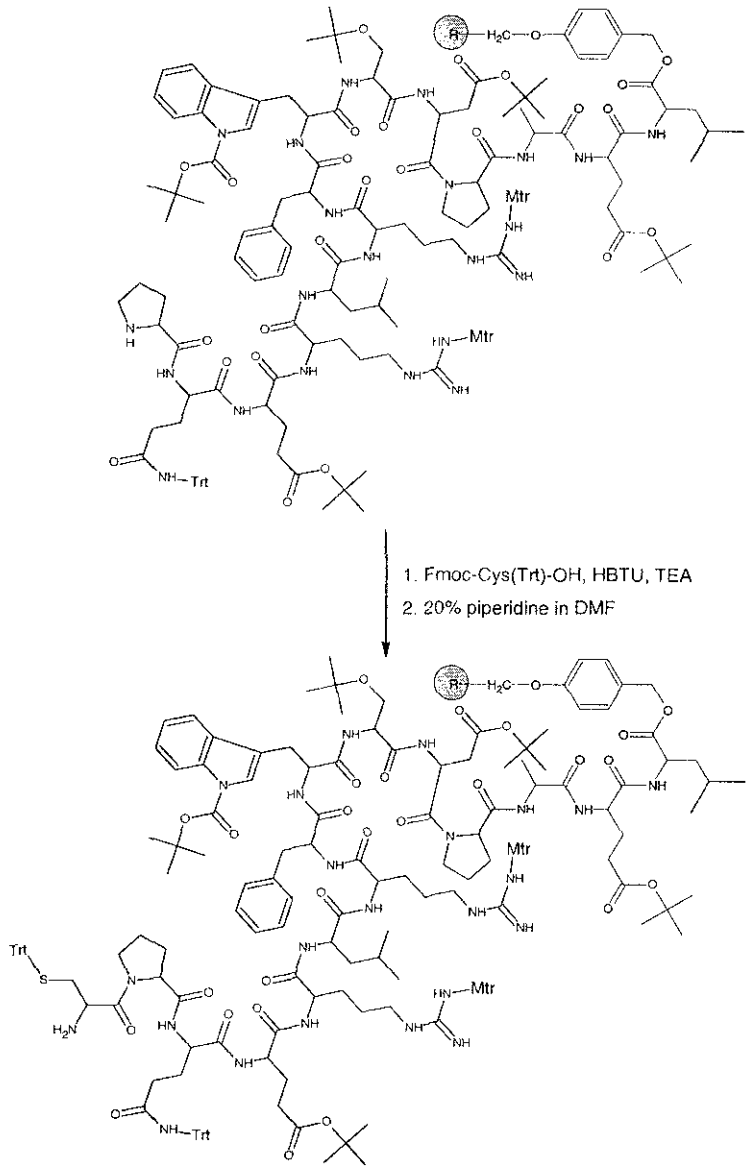
ดังแสดงในแผนภาพที่ 3-29 กรดอะมิโน Fmoc-Pro-OH ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาการสร้างกับเพปไทด์บนเรซิน และเมื่อหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออกแล้ว ได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพป-

ไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Glu (OtBu)- Gln(Trt)-Pro-NH_2 บนเรซิน



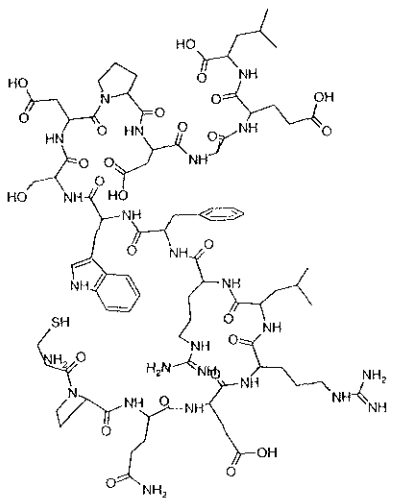
แผนภาพที่ 3-29 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Arg(Mtr)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Pro-NH_2 บนเรซิน

ในการสังเคราะห์ขั้นสุดท้าย เพปไทด์บนเรซินได้ถูกนำมาเชื่อมกับกรดอะมิโน Fmoc-Cys (Trt)-OH ตามด้วยปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(Ot-Bu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Glu(OtBu) -Gln(Trt)-Pro-Cys(Trt)-NH_2 บนเรซิน ดังแสดงในแผนภาพที่ 3-30

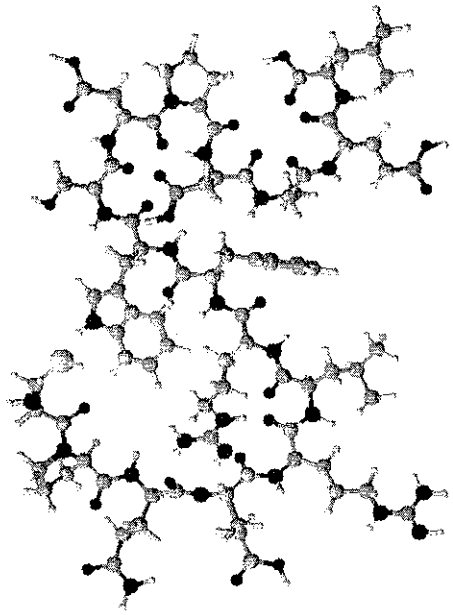


แผนภาพที่ 3-30 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Asp(OtBu)-Pro-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Phe-Arg(Mtr)-Leu-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Pro-Cys(Trt)-NH_2 บนเรซิน

เพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ถูกทำให้หลุดจากเรซินไปพร้อม ๆ กับการกำจัดหมู่ปกป้องบนside chain โดยใช้รีเอเจนต์ K ซึ่งโครงสร้างทางเคมีพร้อมทั้งโครงแบบสามมิติของเพปไทด์เป้าหมาย RiceSFR2.1 ได้แสดงไว้ในภาพที่ 3-4 และจากการตรวจสอบมวลโมเลกุลของเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้โดยเทคนิค LC-MS พบว่ามวลโมเลกุลที่ตรวจพบได้นั้น ไม่สอดคล้องกับมวลโมเลกุลของเพปไทด์ Rice-SFR2.1 (1962.20 D) รายละเอียดของผลการทดลองที่ได้จะได้กล่าวอย่างละเอียดในบทวิเคราะห์



โครงสร้างทางเคมีของเพปไทด์ RiceSFR2.1

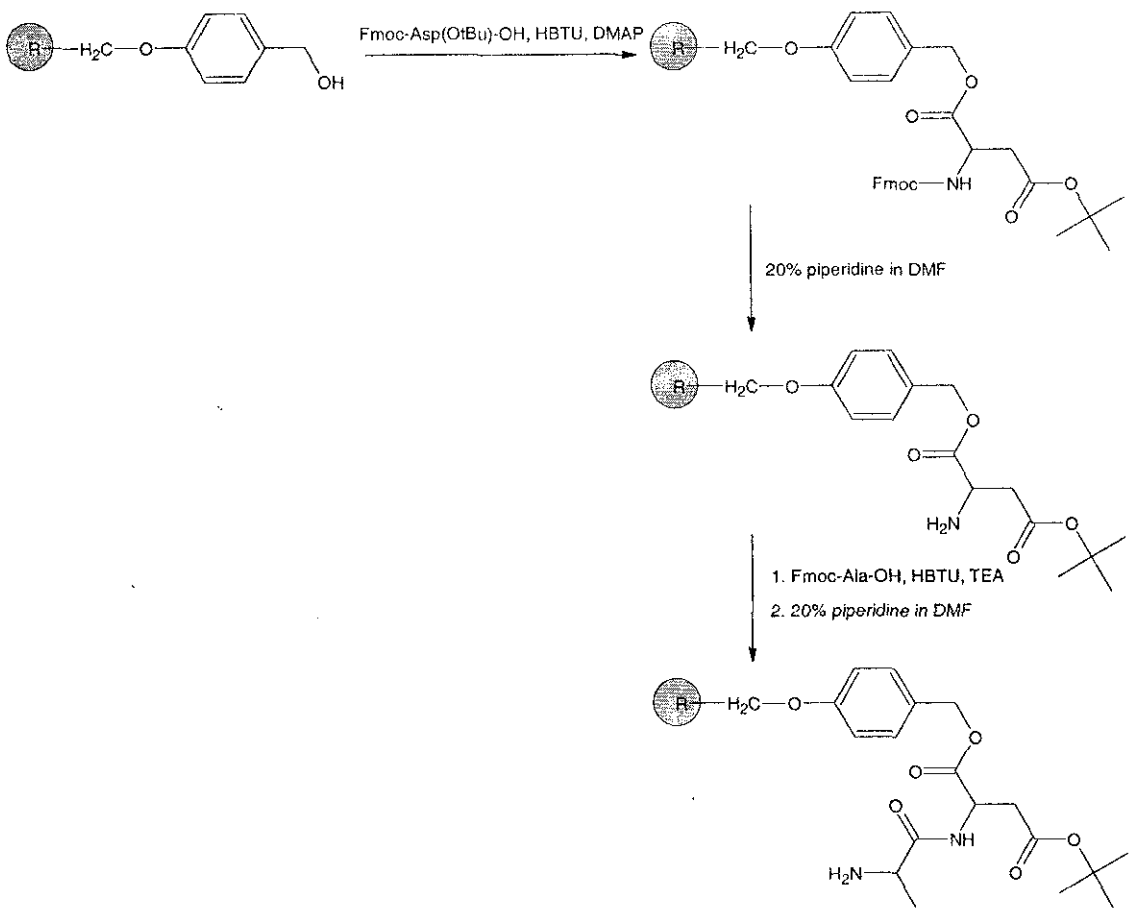


โครงแบบสามมิติของเพปไทด์ RiceSFR2.1

ภาพที่ 3-4 โครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ RiceSFR2.1

d. การสังเคราะห์เพปไทด์ 8mers; N'-Thr-Pro-Thr-Ser-Tyr-Ser-Ala-Asp-C'

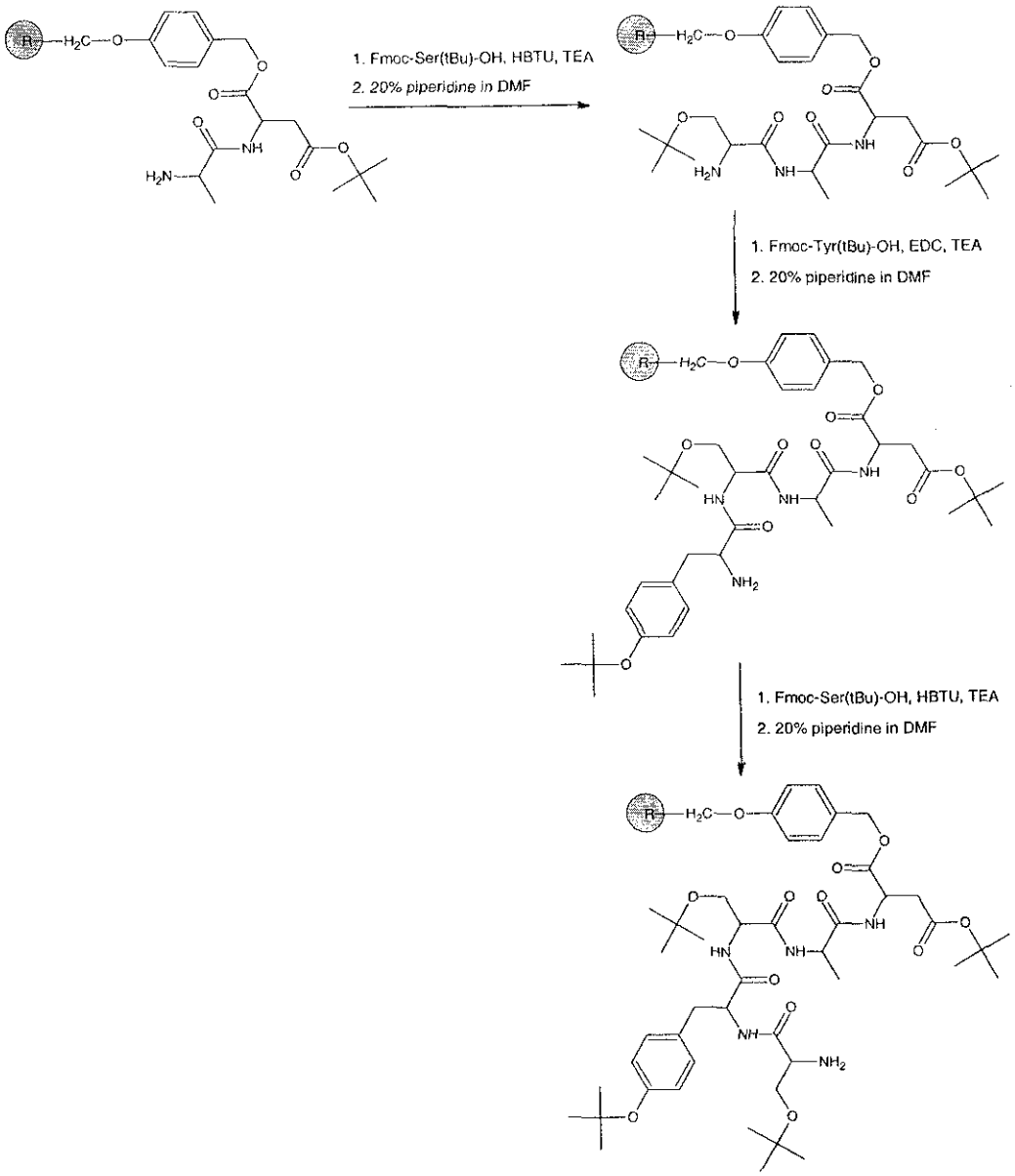
การสังเคราะห์เพปไทด์ 8mers เริ่มจากการเชื่อมกรดอะมิโน Fmoc-Asp(OtBu)-OH เข้ากับ wang resin โดยใช้ HBTU และ DMAP เป็นรีเอเจนต์ ในตัวทำละลาย DMF ปฏิกิริยานี้จะต้องทำซ้ำ 3 ครั้ง จึงสามารถตรวจพบได้ว่ากรดอะมิโนได้เชื่อมต่อกับเรซินแล้ว (แสดงในแผนภาพที่ 3-31) จากนั้นหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกทำให้หลุดออกจากปลายด้านหมู่อะมิโนโดยใช้สารละลาย 20% piperidine ใน DMF จากนั้นหมู่กรดอะมิโนบนเรซินได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์กับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน Fmoc-Ala-OH โดยใช้รีเอเจนต์คือ HBTU และ TEA ใน DMF (ดังเช่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้นกับเพปไทด์ 3.1.1 A-C) พบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกแล้ว ได้ให้เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-NH_2 บนเรซิน ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-31



แผนภาพที่ 3-31 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-NH_2 บนเรซิน

เพปไทด์ที่ได้บนเรซินได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโน Fmoc-Ser(tBu)-OH จากนั้นเมื่อหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออกแล้ว ได้ให้ผลิตภัณฑ์คือเพปไทด์

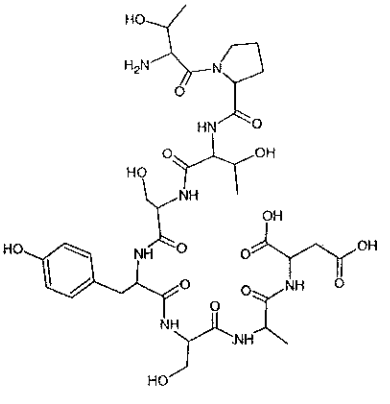
C'-Asp (OtBu)-Ala-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน การสังเคราะห์เพปไทด์เป้าหมายได้ดำเนินต่อไปโดยที่เพปไทด์บนเรซินนี้ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยา Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH โดยใช้ EDC และ TEA ในตัวทำละลาย DMF เป็นรีเอเจนต์ ซึ่งปฏิกิริยานี้ต้องทำซ้ำถึง 3 ครั้ง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จากนั้นหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออก และได้ให้เพปไทด์C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-NH_2 บน เรซินเป็นผลิตภัณฑ์ ในขั้นตอนต่อมาเป็นการทำปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโน Fmoc-Ser(tBu)-OH และการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งได้เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน เป็นผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์จนถึงขั้นตอนนี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-32



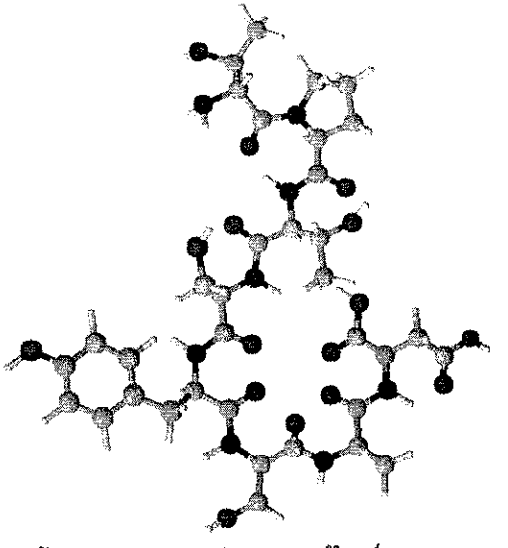
แผนภาพที่ 3-32 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน

ในขั้นตอนต่อมา กรดอะมิโน Fmoc-Thr(tBu)-OH ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับสายเส้นเพปไทด์บนเรซินโดยใช้ HBTU และ TEA ใน DMF เป็นรีเอเจนต์ เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว หมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออก ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-NH_2 บนเรซิน จากนั้น เพปไทด์นี้ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาต่อกับFmoc-Pro-OH ตามมาด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-NH_2 บนเรซิน และในขั้นตอนการสังเคราะห์ขั้นสุดท้าย กรดอะมิโน Fmoc-Thr(tBu)-OH ได้ถูกนำมาเชื่อมต่อกับเพปไทด์บนเรซิน ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc และได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-NH_2 บนเรซิน โดยปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-33

เพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ถูกทำให้หลุดออกจากเรซิน พร้อมทั้งกำจัดหมู่ปกป้องที่ตำแหน่ง side chain โดยใช้รีเอเจนต์ K ซึ่งโครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ 8mers ได้แสดงไว้ในภาพที่ 3-5



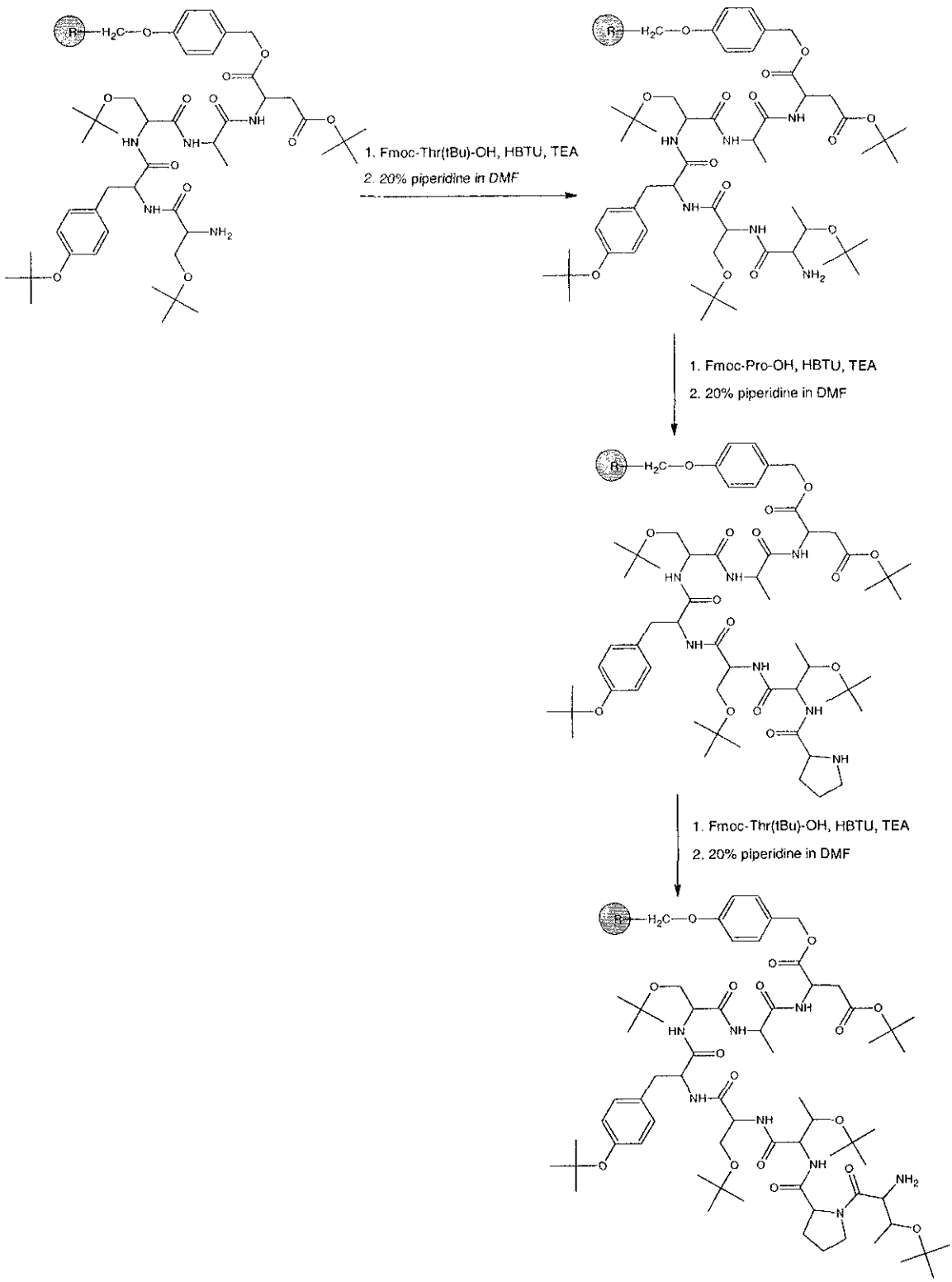
โครงสร้างทางเคมีของเพปไทด์ 8mers



โครงแบบสามมิติของเพปไทด์ 8mers

ภาพที่ 3-5 โครงสร้างทางเคมีและโครงแบบสามมิติของเพปไทด์ 8mers

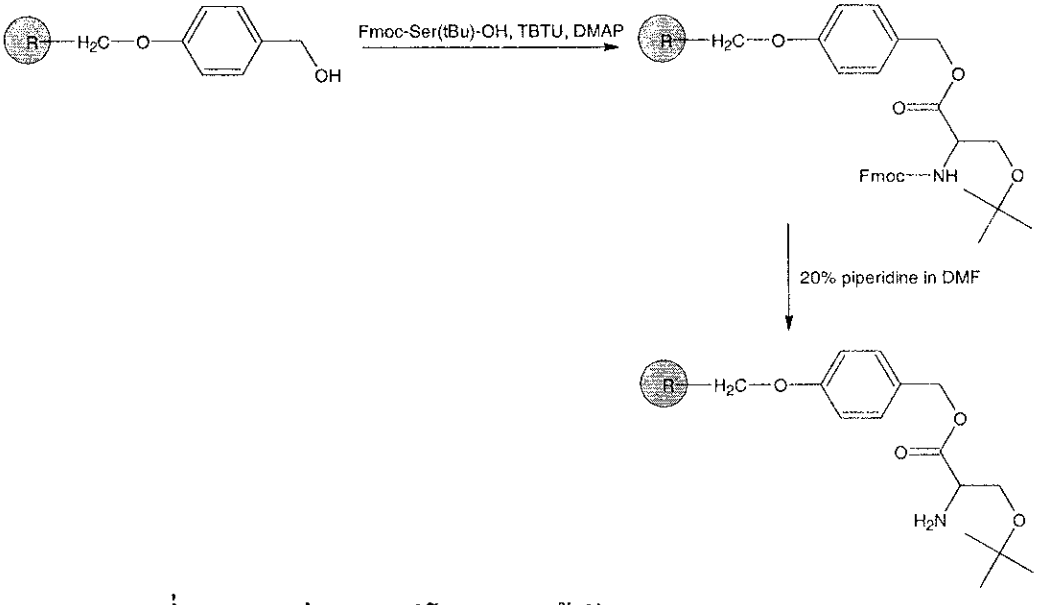
เมื่อนำเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยใช้เทคนิค LC-MS พบว่าสเปกตรัมที่ได้มีความซับซ้อนมากซึ่งทำให้ไม่สามารถระบุมวลโมเลกุลของเพปไทด์เป้าหมายได้ ซึ่งปัญหาและอุปสรรคจะได้กล่าวถึงอย่างละเอียดในหัวข้อการวิเคราะห์ผลการทดลอง



แผนภาพที่ 3-33 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Asp(OtBu)-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr (tBu)-Pro-Thr(tBu)-NH_2 บนเรซิน

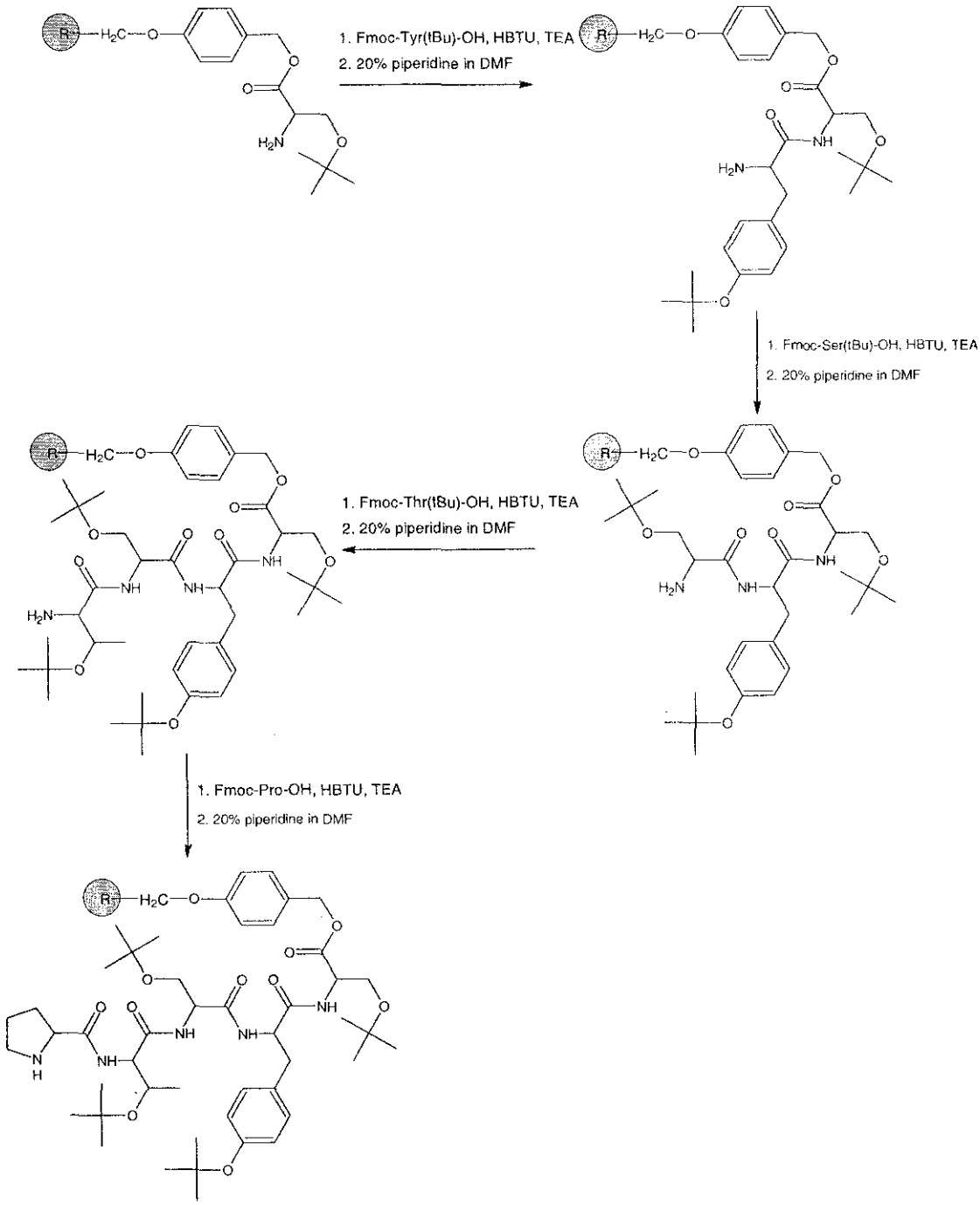
e. การสังเคราะห์เพปไทด์ rBGlu1-1n; N'-Cys-Gly-Lys-Gly-Gln-Gln-Leu-Met-Gln-Gln-Thr-Pro-Thr-Ser-Tyr-Ser-C'

การสังเคราะห์เพปไทด์ rBGlu1-ln เริ่มจากการต่อกรดอะมิโน Fmoc-Ser(tBu)-OH เข้ากับ wang resin โดยใช้ TBTU และ DMAP ในตัวทำละลาย DMF เป็นรีเอเจนต์ พบว่าปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออกโดยใช้สารละลาย 20% piperdine ใน DMF ปฏิกิริยาที่กล่าวมาข้างต้นได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-34



แผนภาพที่ 3-34 การต่อกรดอะมิโน serine เข้ากับ wang resin

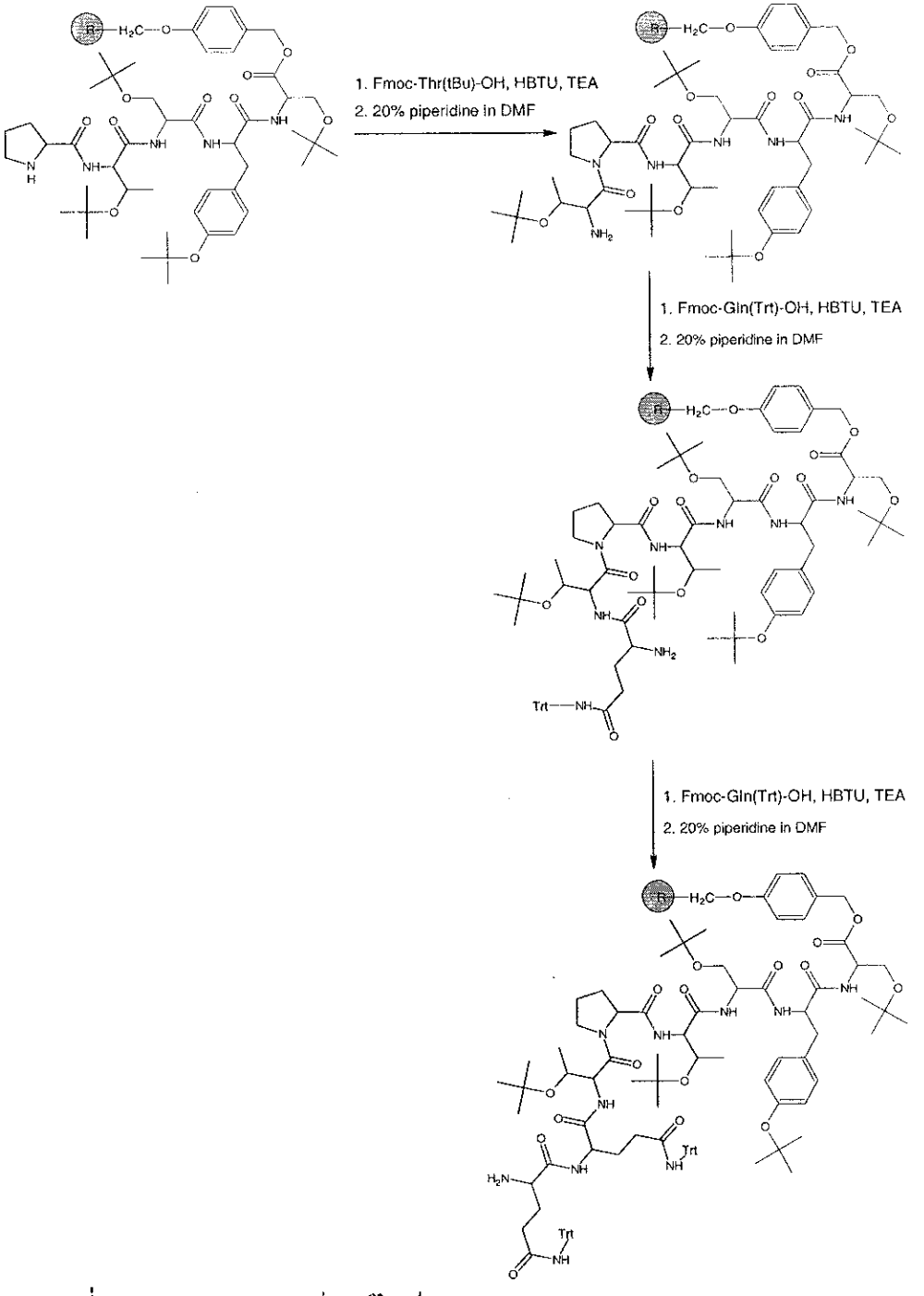
กรดอะมิโน serine บนเรซินได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์กับ Fmoc-Tyr(tBu)-OH โดยใช้ HBTU และ TEA เป็นรีเอเจนต์ ในตัวทำละลาย DMF ซึ่งได้ใช้เวลา 1 ชั่วโมง ปฏิกิริยาจึงจะสมบูรณ์ เมื่อตรวจสอบด้วย Kaiser และ chloranil test จากนั้นหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออกซึ่งได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-NH_2 บนเรซิน ในขั้นตอนต่อมา กรดอะมิโน Fmoc-Ser(tBu)-OH ได้ถูกนำมาเชื่อมต่อกับเพปไทด์บนเรซินนี้ ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-NH_2 บนเรซิน ทั้งนี้ กรดอะมิโนตัวถัดมาที่นำมาเชื่อมต่อกับเพปไทด์บนเรซิน คือ Fmoc-Thr(tBu)-OH ซึ่งเมื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกแล้วได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-NH_2 บนเรซิน ซึ่งเพปไทด์นี้ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์ต่อกับกรดอะมิโน Fmoc-Pro-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(t- Bu)-Thr(tBu)-Pro-NH_2 บนเรซิน โดยปฏิกิริยาในการสังเคราะห์จนถึงขั้นตอนนี้ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-35



แผนภาพที่ 3-35 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-NH_2 บนเรซิน

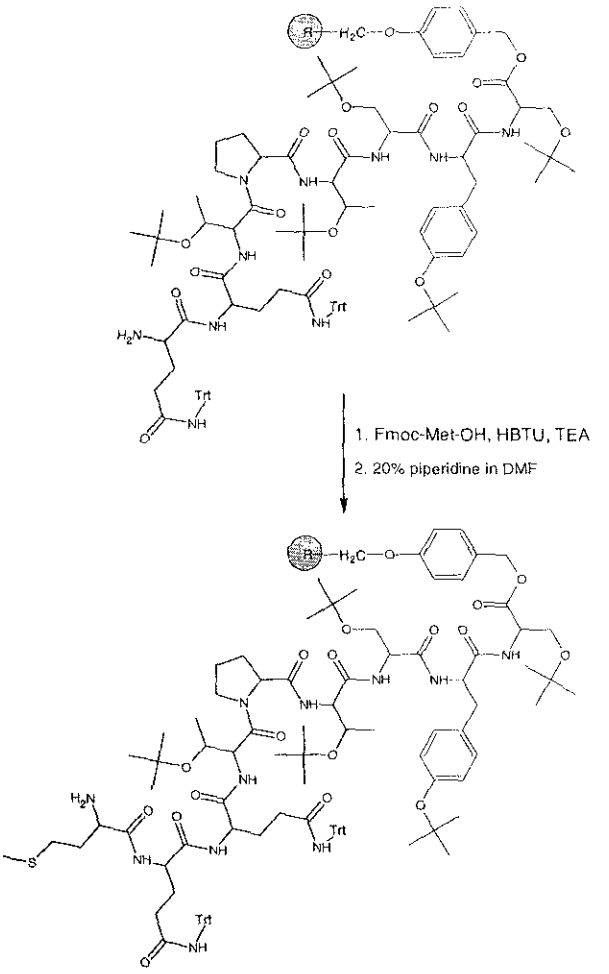
การสังเคราะห์ได้ดำเนินต่อไปโดยการเชื่อมเพปไทด์บนเรซินเข้ากับกรดอะมิโน Fmoc-Thr(tBu)-OH และตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งได้ให้เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(t-Bu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-NH_2 บนเรซิน เป็นผลิตภัณฑ์ จากนั้นได้นำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ Fmoc-Gln(Trt)-OH ตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ซึ่งวงจรของการสังเคราะห์นี้

ได้ทำซ้ำ 2 ครั้งเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln (Trt)-NH_2 บนเรซิน ซึ่งปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-36



แผนภาพที่ 3-36 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr (tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-NH_2 บนเรซิน

ในขั้นตอนต่อมา เพปไทด์บนเรซินที่ได้มานี้ ได้ถูกนำมาทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Met-OH ซึ่งเมื่อปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว หมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออก ซึ่งได้ให้ผลิตภัณฑ์คือเพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)- Met-NH_2 บนเรซิน ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-37



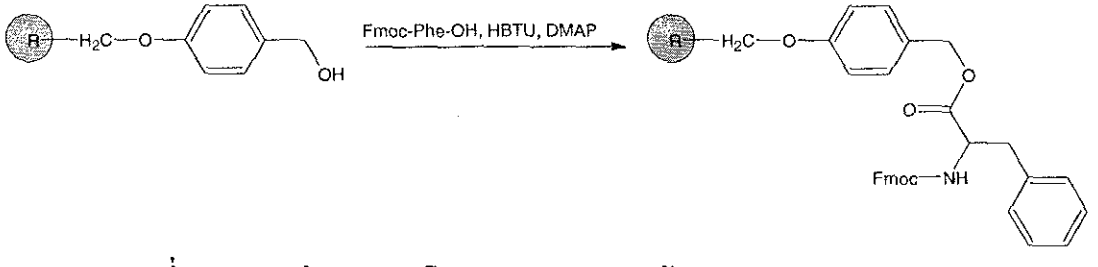
แผนภาพที่ 3-37 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Met-NH_2 บนเรซิน

หลังจากที่ได้พยายามใช้วิธีในการสังเคราะห์เพปไทด์ rBGlu1-1n แต่ก็ไม่สามารถสังเคราะห์เพปไทด์ชนิดนี้ได้ ทั้งนี้คาดว่าเนื่องมาจากปัญหาคุณภาพของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ และน้ำปริมาณมากที่เข้ามาปนเปื้อนในปฏิกิริยา ทำให้ปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ทั้งนี้ได้ทำการสังเคราะห์ซ้ำอีกครั้งตั้งแต่เริ่มแรก แต่ก็ได้ประสบปัญหาจากกปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ในเพปไทด์ C'-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Fmoc ไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีได้หมู่ $-NH_2$ อย่างไรก็ตามได้พยายามทำปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์ต่อกับกรดอะมิโนตัวถัดไปซึ่งได้แก่ Fmoc-Thr(tBu)-OH แต่ผลจากการตรวจสอบพบว่าไม่สามารถสร้าง

พันธะเพปไทด์ตามที่ต้องการได้ ดังนั้นจึงได้ยุติการทดลองเพื่อสังเคราะห์เพปไทด์ดังกล่าว ซึ่งรายละเอียดของปัญหาและอุปสรรคจะได้กล่าวโดยละเอียดในส่วนของบทวิเคราะห์

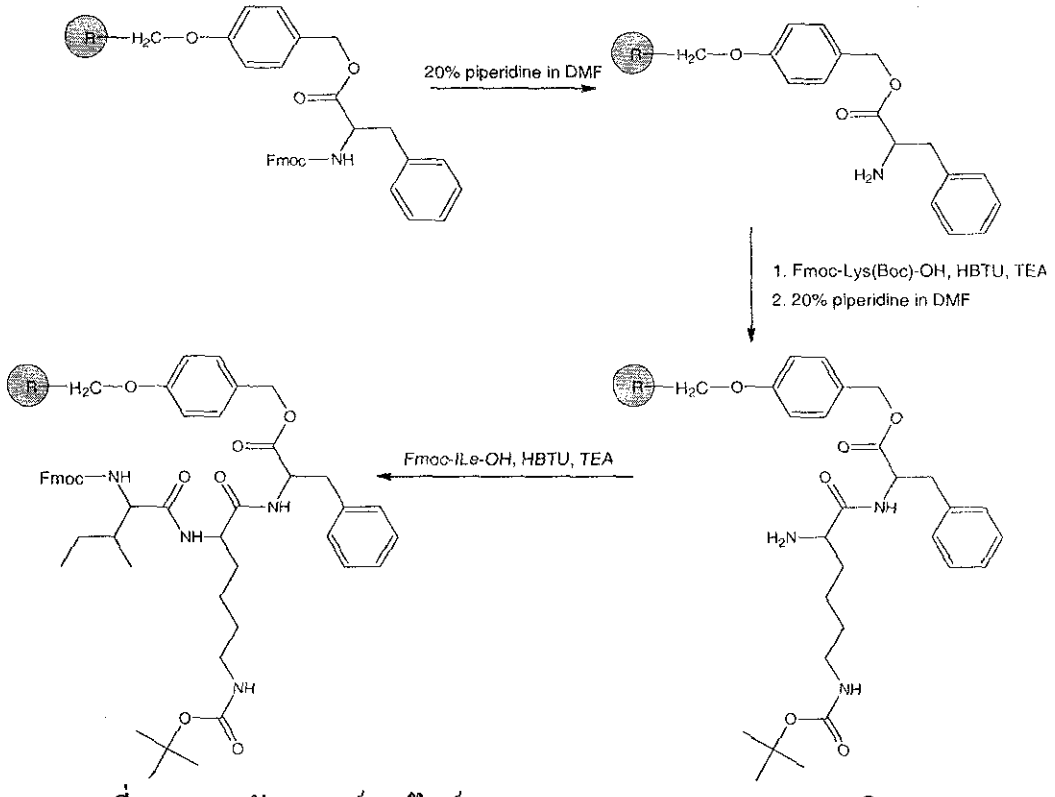
f. การสังเคราะห์เพปไทด์ BGAL1; N'-Cys-Ala-Pro-Gly-Gln-Tyr-Ile-Ser-Ala-Ile-Lys-Phe-C'

การสังเคราะห์ได้เริ่มจากการต่อเชื่อมกรดอะมิโน Fmoc-Phe-OH เข้ากับ wang resin โดยใช้ HBTU และ DMAP ในตัวทำละลาย DMF เป็นรีเอเจนต์ ดังแสดงในแผนภาพที่ 3-38 ในขั้นตอนนี้ต้องทำซ้ำหลายครั้ง เนื่องจากเมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้แล้วพบว่าระดับของกรดอะมิโนบนเรซินมีปริมาณต่ำมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของความเกะกะของโมเลกุลของกรดอะมิโน phenylalanine



แผนภาพที่ 3-38 การต่อกรดอะมิโน Fmoc-Phe-OH เข้ากับ wang resin

หลังจากที่ได้กำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกแล้ว ได้นำกรดอะมิโนตัวที่สองซึ่งได้แก่ Fmoc-Lys(Boc)-OH มาต่อเชื่อมกับกรดอะมิโนที่อยู่บนเรซิน โดยใช้ HBTU และ TEA ใน DMF เป็นรีเอเจนต์ซึ่งหลังจากที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว หมู่ปกป้อง Fmoc ได้ถูกกำจัดออก ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ เพปไทด์ C'-Phe-Lys(Boc)-NH_2 บนเรซิน จากนั้นเพปไทด์นี้ได้ทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนตัวถัดมาคือ Fmoc-Ile-OH โดยใช้วิธีในการสังเคราะห์เช่นเดียวกันกับที่กล่าวมาข้างต้น ปฏิกิริยานี้ได้ดำเนินไปเป็นเวลา 9 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องซึ่งได้ให้ผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์ C'-Phe-Lys(Boc)-Ile-Fmoc บนเรซิน ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-39



แผนภาพที่ 3-39 การสังเคราะห์เพปไทด์ C'-Phe-Lys(Boc)-Ile-Fmoc บนเรซิน

อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc นั้น พบว่าปฏิกิริยาไม่เกิดขึ้น ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย piperidine ใน DMF จนถึงที่ความเข้มข้น 55% (v/v) แล้วก็ตาม รวมทั้งได้ใช้เบสที่แรงขึ้นคือ DBU ใน DMF แต่การกำจัดหมู่ปกป้องFmoc นี้ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นจึงได้เริ่มทำการสังเคราะห์ใหม่ตั้งแต่ขั้นแรก แต่ก็ยังพบปัญหาเช่นเดียวกันกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นจึงได้ยุติการสังเคราะห์เพปไทด์ชนิดนี้ ทั้งนี้ผลการทดลองที่ได้จะได้อภิปรายเพิ่มเติมอีกครั้งในส่วนของบทวิเคราะห์

3.1.2. บทวิเคราะห์ผลการสังเคราะห์เพปไทด์

ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการทดลองการสังเคราะห์เพปไทด์ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการตั้งศูนย์ในการสังเคราะห์เพปไทด์ และการผลิตแอนติบอดีในประเทศไทย ซึ่งผลการศึกษาภายใต้ขอบเขตของงานวิจัยนี้ ได้แสดงให้เห็นว่าระดับความสามารถในการผลิตเพปไทด์เพื่อเป็นฐานสำคัญในการผลิตแอนติบอดีนั้น ยังไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพเพียงพอ ซึ่งปัญหาและอุปสรรคที่เกี่ยวข้องจะได้กล่าวดังต่อไปนี้

1. *ข้อจำกัดทางด้านเครื่องมือวิเคราะห์*

ในการสังเคราะห์เพปไทด์ ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดคือการตรวจสอบคุณภาพและโครงสร้างทางเคมีของเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ เพราะในปฏิกิริยาการสังเคราะห์เพปไทด์นั้นอาจมีปฏิกิริยาข้างเคียงที่สามารถเกิดขึ้น ถึงแม้ว่าในการศึกษานี้จะได้ใช้ Kaiser test และ chloranil test ในการตรวจสอบว่าปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างสมบูรณ์ในทุกขั้นตอนของการสังเคราะห์ แต่ผลจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค LC-MS กลับไม่สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์เพปไทด์ที่ต้องการ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัญหาในการสังเคราะห์ได้เกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์ หรือหลังจากที่เพปไทด์ได้ถูกทำให้หลุดออกจากเรซินแล้ว ทั้งนี้หากปัญหาเกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์ การตรวจสอบด้วยเทคนิค LC-MS แต่เนิ่น ๆ ก็จะสามารถแสดงให้เห็นถึงปัญหาหรือปฏิกิริยาข้างเคียงที่เกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์ได้ และจะเป็นการลดการสิ้นเปลืองของการใช้รีเอเจนต์และตัวทำละลายในการสังเคราะห์ด้วย ซึ่งด้วยข้อจำกัดด้านเครื่องมือในการวิเคราะห์ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทำให้ต้องส่งเพปไทด์ไปวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ หลังจากที่เพปไทด์ทั้งสายได้ถูกสังเคราะห์และทำให้หลุดออกจากเรซินแล้วเท่านั้น ดังนั้นหากไม่สามารถตรวจพบมวลโมเลกุลของเพปไทด์ที่ต้องการได้ การสังเคราะห์จะต้องเริ่มใหม่ตั้งแต่ต้น นอกจากนี้ในระหว่างการเก็บเพื่อรอการวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้างเคียงสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในรูปแบบปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุล หรือภายในโมเลกุลเดียวกัน ซึ่งจะเกิดเป็นสาร by-product ที่ไม่ต้องการ ทั้งนี้ปฏิกิริยาข้างเคียงที่เป็นไปได้ระหว่างหมู่ side chain ของกรดอะมิโนได้กล่าวไว้ ในหัวข้อปฏิกิริยาข้างเคียงที่สามารถเกิดขึ้นได้ในบทวิเคราะห์นี้

2. ปัญหาจากสภาวะในการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้นั้น เปอร์เซ็น yield ของผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งสาเหตุสำคัญของปัญหา เกิดจากความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ ณ สภาวะการทดลองสูง ทำให้ปริมาณน้ำที่เข้าไปในปฏิกิริยามาก ทั้งนี้เพื่อลดปริมาณน้ำที่สามารถเข้ามาทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ต่าง ๆ ได้เติม molecular sieves ลงไปในขณะทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ปัญหาความชื้นในอากาศนี้ ยังส่งผลต่อคุณภาพและอายุการใช้งานของรีเอเจนต์ ซึ่งจากการทดลองโดยเปรียบเทียบระหว่างรีเอเจนต์ที่เพิ่งเปิดใช้ พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ yield ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ที่สูงกว่ารีเอเจนต์ที่เปิดใช้

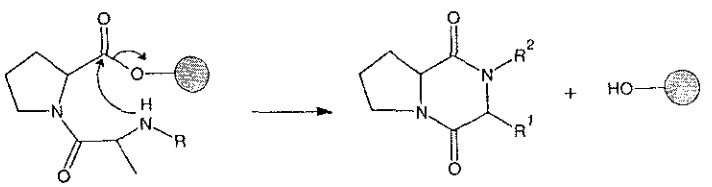
แล้วเพียงในเวลาไม่นานนัก ดังนั้นเพื่อยืดอายุการใช้งานของรีเอเจนต์ รีเอเจนต์ต่าง ๆ จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ที่ -3°C to 5°C และนำมาเก็บไว้ในโถเก็บความชื้นอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยา

3. ธรรมชาติของเพปไทด์ที่ต้องการสังเคราะห์

โครงสร้างทางเคมีของเพปไทด์ และกรดอะมิโนเป็นส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่มีหมู่ side-chains ขนาดใหญ่ เช่น Fmoc-Tyr(tBu)-OH และ Fmoc-Phe-OH จะสามารถสร้างพันธะเพปไทด์ได้ช้า ทั้งนี้เนื่องจาก steric effect นอกจากนั้นปัญหาที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของการสังเคราะห์แบบ solid-phase peptide syntheses คือ การเข้ามารวมกลุ่มกัน (aggregation) ของสายเส้นเพปไทด์ซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งภายในโมเลกุลเดียวกัน และระหว่างโมเลกุล ซึ่งทำให้กระบวนการที่ตัวทำละลายล้อมรอบเรซิน (salvation) เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ นอกจากนั้นยังทำให้เรซินเกิดการหดตัว ซึ่งทำให้รีเอเจนต์ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเพปไทด์ได้ เป็นผลให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์และการกำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc เกิดขึ้นได้ช้า จนถึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้เลย ทั้งนี้ปัจจัยที่น่าจะทำให้เกิดการเข้ามารวมกลุ่มกันของเพปไทด์นั้นมาจาก พันธะไฮโดรเจนและ hydrophobic forces ทั้งภายในโมเลกุลเดียวกัน และระหว่างโมเลกุล โดยทั่วไปการเข้ามารวมกลุ่มกันของสายเส้นเพปไทด์นี้มักจะเกิดมากหากเพปไทด์ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน alanine, valine, leucine, isoleucine, asparagine, glutamine, และ serine

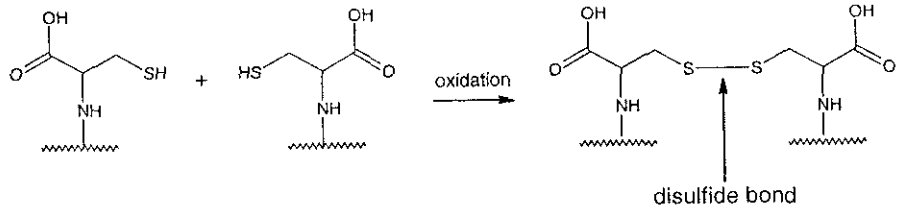
4. ปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) ที่สามารถเกิดขึ้นได้

ปฏิกิริยาข้างเคียงสามารถเกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์เมื่อได้กำจัดหมู่ปกป้องของ side chain ออกไปแล้ว ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่มักจะเกิดขึ้นได้แก่ ปฏิกิริยาที่ให้สาร diketopiperazine เป็นผลิตภัณฑ์ ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-40 ซึ่งสารdiketopiperazine เป็น by-product ที่พบบ่อยในปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนที่หมู่ side chains มีขนาดใหญ่



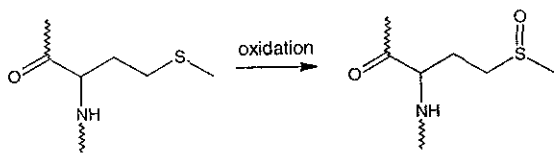
แผนภาพที่ 3-40 การเกิดขึ้นของสารประกอบ diketopiperazine

นอกจากนั้นหลังจากที่เพปไทด์ได้ถูกทำให้หลุดออกจากเรซินแล้ว หมู่ side chain สามารถเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น หมู่ side chain ของกรดอะมิโน tyrosine สามารถเกิดปฏิกิริยา alkylation โดยหมู่ปกป้องที่หลุดออกมาจาก side chain หรือ กรดอะมิโน cystein สามารถเกิดปฏิกิริยาสร้างพันธะ disulfide bonds ภายในโมเลกุลเดียวกัน เกิดเป็นสารประกอบที่เป็นวง หรืออาจเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลเกิดเป็น oligomers ได้ ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-41

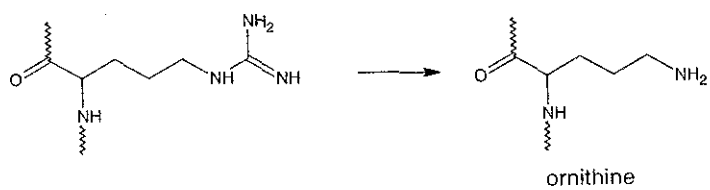


แผนภาพที่ 3-41 การเกิดพันธะ disulfide ในเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน cystein

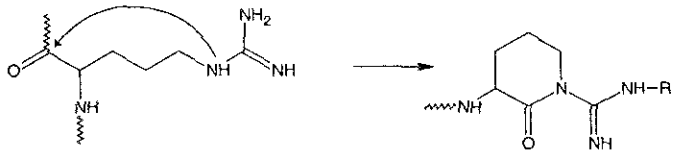
นอกเหนือจากปฏิกิริยาที่กล่าวมาข้างต้น เพปไทด์ที่ไม่มีหมู่ปกป้องที่ side chain สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เช่น เพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน methionine สามารถถูกออกซิไดซ์ได้เป็น methionine sulfoxide ในระหว่างขั้นตอนการกำจัดหมู่ปกป้องดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-42 สำหรับปฏิกิริยาข้างเคียงอื่น ๆ ได้แก่ ปฏิกิริยาที่ side chain ของ argenine สามารถทำปฏิกิริยาให้ ornithine จากการ protonation หรือสามารถเกิดเป็น δ-lactam จากการเข้าทำปฏิกิริยาของ N^{δ} อะตอมดังที่ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-43 และ 3-44 ตามลำดับ



แผนภาพที่ 3-42 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ methionine เป็น methionine sulfoxide

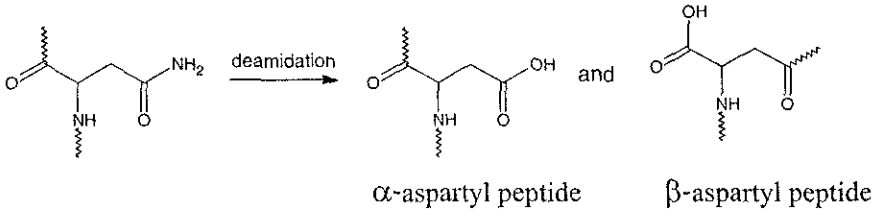


แผนภาพที่ 3-43 ปฏิกิริยาแสดงการเกิด ornithine



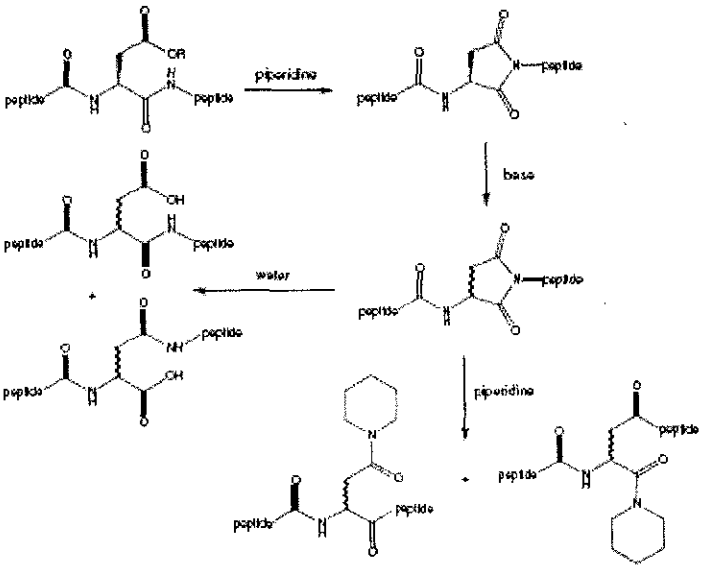
แผนภาพที่ 3-44 ปฏิกิริยาของการเกิด δ-lactam

สำหรับเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน asparagine นั้น ปฏิกิริยา deamidation และปฏิกิริยาการเกิด aspartimide มักจะเป็นปัญหาที่พบบ่อยในการสังเคราะห์เพปไทด์ โดยที่ปฏิกิริยา deamidation สามารถเกิดได้ในสภาวะที่มีน้ำเข้ามาในปฏิกิริยา ซึ่งทำให้เกิดเป็นหมู่ α- และ β-aspartyl ดังแสดงในแผนภาพที่ 3-45



แผนภาพที่ 3-45 การเกิดหมู่ α- and β-aspartyl ในเพปไทด์

ปฏิกิริยาข้างเคียงอีกชนิดหนึ่งได้แก่ ปฏิกิริยาของเพปไทด์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน aspartic acid โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Asp(OtBu)-X เมื่อ X = Gly, Asn(Trt), Ser, และ Thr ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร aspartimides โดยทั่วไปปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นมากตามเวลาที่ต้องใช้ในการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ปกป้อง Fmoc โดยใช้สาร piperidine หรือ DBU in the deprotection cycle ทั้งนี้กลไกในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3-46



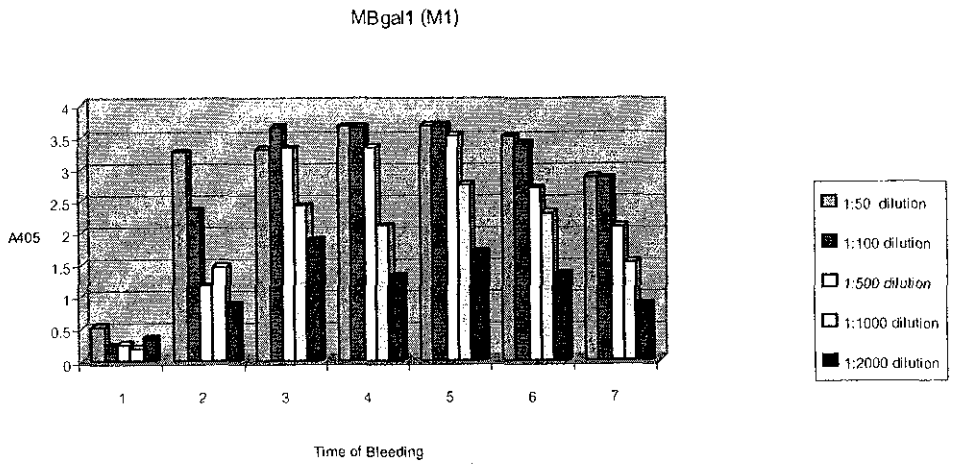
แผนภาพที่ 3-46 กลไกในการเกิด aspartimide

นอกเหนือจากปัญหาที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยทางด้านเทคนิค และทางเคมีของการสังเคราะห์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น ปัญหาที่สำคัญอีกประการคือ การขาดพนักงานวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ทางด้านเคมีด้านการสังเคราะห์เพปไทด์ ซึ่งจะต้องทำหน้าที่ประจำในการสังเคราะห์เพปไทด์เป้าหมายเพื่อนำไปผลิตแอนติบอดี และเนื่องจากการสังเคราะห์เพปไทด์นี้จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณมาก แนวทางการกำจัดของเสียทางเคมีอย่างมีประสิทธิภาพก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ต้องได้รับความสนใจและจะต้องมีการวางแผนเพื่อรองรับให้ดีกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน

จนถึงปัจจุบันการสั่งซื้อเพปไทด์สังเคราะห์จากต่างประเทศเพื่อนำมาผลิตเป็นแอนติบอดีดูเหมือนจะเป็นแนวทางที่ดีกว่าการตั้งศูนย์เพื่อสังเคราะห์เพปไทด์ในประเทศ ซึ่งเต็มไปด้วยข้อจำกัดต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทั้งนี้หากปัญหาต่าง ๆ ได้รับการแก้ไข และมีกลุ่มการวิจัยในสาขาดังกล่าวที่ใหญ่เพียงพอ การมีศูนย์สังเคราะห์เพปไทด์ในประเทศก็จะมีความเป็นไปได้มากขึ้น และจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการส่งเสริมการวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้องได้เป็นอย่างดี

3.2 ผลการทดลองและบทวิเคราะห์เรื่องการผลิตแอนติบอดี

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อบริเวณเร่งของ BGal1 และ BGal2 ถูกสร้างขึ้น โดยซีรัมจากกระต่ายถูกเก็บทั้งก่อนและหลังการฉีดแอนติเจน และนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA



ภาพที่ 3-6 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยา ELISA กับเพปไทด์ BGal1 ในช่วงก่อนการกระตุ้น (1) และหลังการกระตุ้น (2-7) ในกระต่าย M1

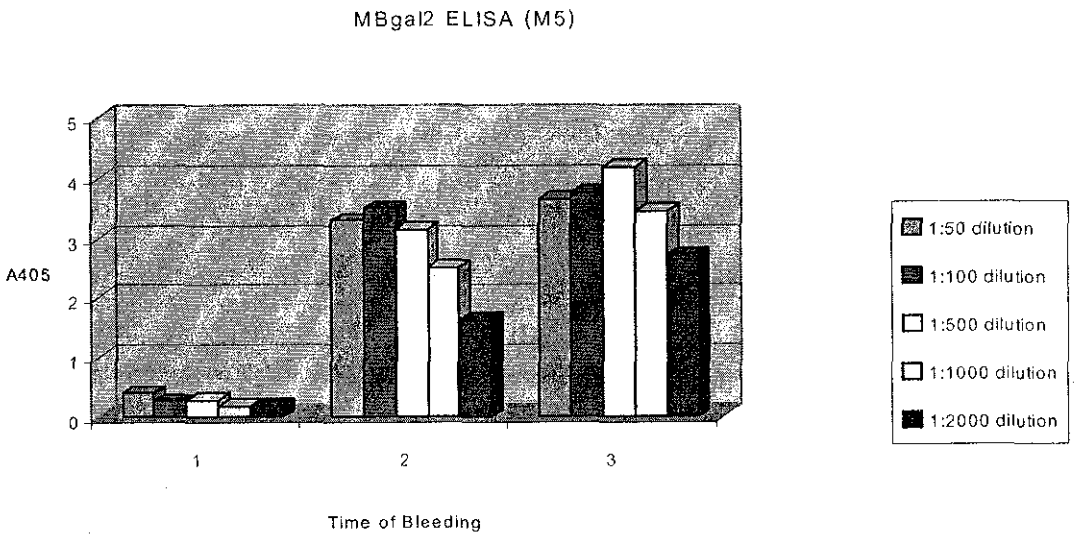
ตารางที่ 3-1 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยา ELISA สำหรับเทคนิค immunoreactivity กับเพปไทด์ BGal1 ของกระต่าย M1

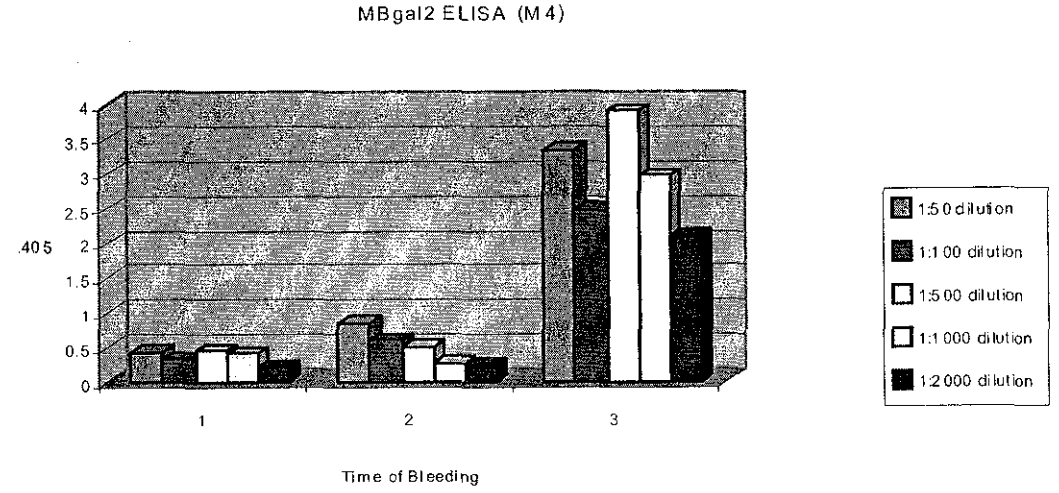
dilution	Pre	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
1:50	0.544	3.252	3.297	3.664	**3.677**	3.509	2.875
1:100	0.252	2.354	3.64	3.649	**3.677**	3.405	2.857
1:500	0.261	1.175	3.317	3.334	**3.526**	2.701	2.1
1:1000	0.194	1.466	2.415	2.11	2.752	2.304	1.528
1:2000	0.369	0.903	1.891	1.329	1.694	1.342	0.879

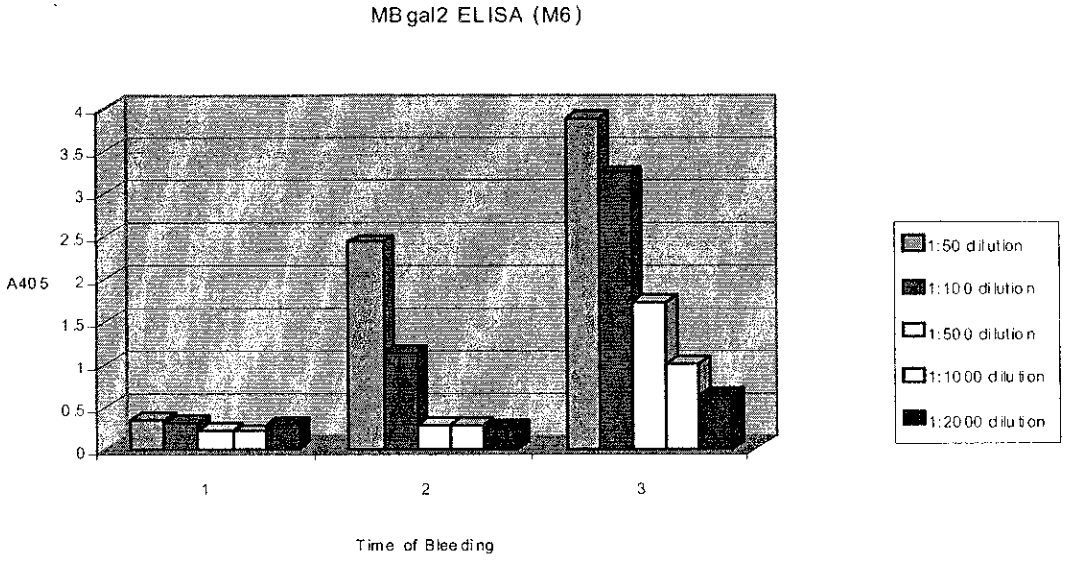
จากการทำการวิเคราะห์หาค่าไตเตอร์ (titer determination) แสดงดังตารางที่ 3-1 และภาพที่ 3-6 พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 จากกระต่าย M1 ภายหลังการกระตุ้นครั้งที่ 4 ดูเหมือนว่าจะมีค่าไตเตอร์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 1:50-1:500 โดยใช้แอนติบอดีตัวที่สองซึ่งเป็น goat anti-rabbit IgG monoclonal antibody ที่เชื่อมอยู่กับ horseradish peroxidase ที่มีค่า dilution ที่ 1:5000 จะเห็นได้ว่าค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 ของซีรัมที่ได้จาก

การกระตุ้นครั้งที่ 4 นี้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าค่าของตัวอย่างอื่นที่ใช้ค่าไตเตอร์เดียวกัน แม้ว่าค่าที่วัดได้จะมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกันก็ตาม

สำหรับโปรตีน BGal2 แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal2 นั้นพบในกระต่าย 3 ตัวและค่าไตเตอร์ที่เหมาะสมคือ 1:500 ซึ่งพบในซีรัมจากการกระตุ้นครั้งที่ 2 ในกระต่าย M4 และ M5 ดังที่แสดงในกราฟของภาพที่ 3-7 และตารางที่ 3-2







ภาพที่ 3-7 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในตัวอย่างเลือดกระต่ายต่อแอนติเจน BGal2 ซึ่งได้มาจากการเชื่อมต่อระหว่างเพปไทด์ BGal2 กับโปรตีนตัวพา (A) กระต่าย M5 (B) กระต่าย M4 (C) กระต่าย M6

ตารางที่ 3-2 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยา Immunoreactivity ของซีรัมกระต่าย M4 M5 และ M6 ซึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเพปไทด์ BGal2

Mbgal2 (M4)

dilution	Pre	1st	2nd
1:50	0.411	0.856	3.334
1:100	0.318	0.6	2.475
1:500	0.439	0.49	**3.893**
1:1000	0.404	0.265	2.961
1:2000	0.212	0.226	2.087

Mbgal2 (M5)

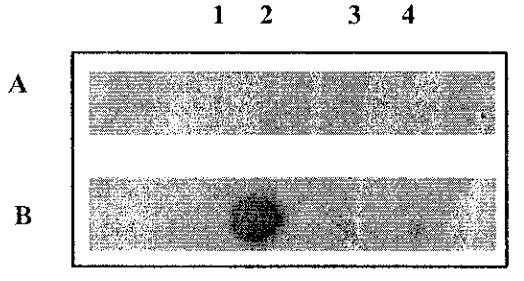
dilution	Pre	1st	2nd
1:50	0.404	3.284	3.646
1:100	0.27	3.487	3.742
1:500	0.286	3.132	**4.176**
1:1000	0.185	2.502	3.442
1:2000	0.186	1.622	2.72

Mbgal2 (M6)

dilution	Pre	1st	2nd
1:50	0.342	2.419	**3.881**
1:100	0.294	1.114	3.231
1:500	0.218	0.276	1.703
1:1000	0.192	0.275	0.982
1:2000	0.282	0.232	0.604

A. การวิเคราะห์ Dot blot ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1

เพื่อหาความจำเพาะของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 ทำโดยหยดตัวอย่างปริมาณ 10 µgของ lysozyme โดยเพปไทด์ BGal1และโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวลงบนแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส จากนั้นบ่มกับ (A) ซีรัมที่ได้จากกระต่ายก่อนการฉีดกระตุ้น (preimmune serum) (B) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 โดยความเข้มของจุดพบมากในตัวอย่างที่เป็นเพปไทด์ของ BGal1 แต่ไม่พบจุดในตัวอย่างโปรตีน lysozyme ซึ่งบ่งชี้ว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นมีความจำเพาะต่อโปรตีน BGal1 เท่านั้น ส่วนในตัวอย่างโปรตีนที่สกัดจากข้าว (rice extract) และส่วนที่ไม่ละลายน้ำที่อยู่กับผนังเซลล์ (insoluble cell-wall-bound) พบจุดเล็กน้อยแต่ยังมีค่ามากกว่าตัวอย่างที่ใช้ซีรัมที่ได้ก่อนการฉีดกระตุ้น (preimmune serum) ซึ่งบ่งชี้ว่าแอนติบอดีสามารถเข้าจับกับโปรตีน BGal1 ที่มีอยู่ในข้าว



ภาพที่ 3-8 การทดสอบด้วยเทคนิค Dot blot ของปฏิกริยา immunoreactivity โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1

1 = โปรตีน Lysozyme จำนวน 10 ไมโครกรัม (ชุดทดลองควบคุมแบบให้ผลเป็นลบ)

2 = เพปไทด์สังเคราะห์ BGal1 (ชุดทดลองควบคุมแบบให้ผลเป็นบวก)

3 = สารสกัดจากข้าวที่งอกได้ 5 วัน ปริมาณ 10 ไมโครกรัม

4 = สารสกัดจากข้าวที่งอกได้ 5 วันในส่วนที่เป็นพวกจับอยู่กับผนังเซลล์ ปริมาณ 10 ไมโครกรัม

A = ซีรัมของกระต่าย M1 ก่อนได้รับการฉีดกระตุ้น (1:500 dilution)

B = ซีรัมของกระต่าย M1 ที่ได้รับการกระตุ้นครั้งที่ 3 (1:500 dilution)

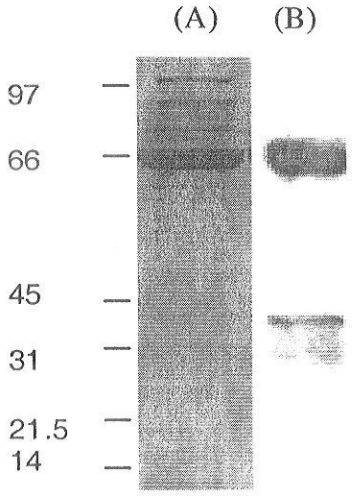
หมายเหตุ แอนติบอดีตัวที่สองใช้ที่ 1:2000 dilution

B. การทำวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot

รีคอมบิแนนท์โปรตีน BGal1 ถูกนำมาแยกบริสุทธิ์แบบไม่สมบูรณ์ (partially purified) จาก *E.coli* ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เพื่อผลิตโปรตีน ด้วยกระบวนการ 3 ขั้นตอนดังนี้ (1) DEAE ion-exchange chromatography (2) hydrophobic interaction บน butyl sepharose และ (3) gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex G-200 นำโปรตีน BGal1 ที่ผ่านแยกบริสุทธิ์มาบางขั้นตอน

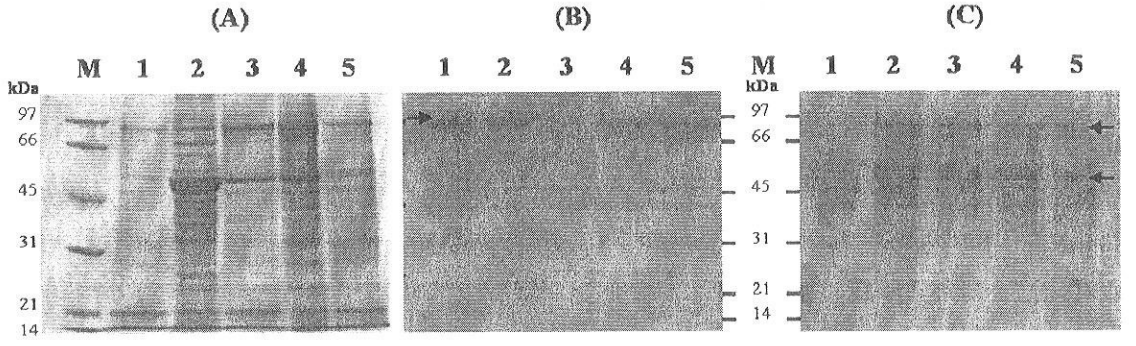
แล้วตามข้างต้นมาวิเคราะห์การทำปฏิกริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่จับกับแอนติบอดีมีขนาด 66 kD แม้ว่าโปรตีนบางส่วนขนาดประมาณ 30 kD ก็สามารถจับกับแอนติบอดีได้แต่ก็พบในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งโปรตีนขนาดเล็กนี้อาจเกิดจากปฏิกริยาการย่อยสลายของโปรตีน (proteolytic degradation) ดังนั้นจึงมีการเตรียมโปรตีนครั้งที่ 2 ให้เร็วขึ้นเพื่อลดการย่อยสลายของโปรตีนโดยเริ่มจากการแยกด้วยเทคนิค immobilized metal affinity chromatography โดยมี Ni ยึดติดอยู่กับเรซิน (QIAGEN, Hilden, Germany) ตามด้วยเทคนิค DEAE ion-exchange chromatography ในครั้งนี้พบว่าแถบโปรตีนส่วนใหญ่ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีมีขนาด 96 kD ในขณะที่แถบโปรตีนที่มีขนาด 66 kD ที่สังเกตเห็นในการแยกบริสุทธิ์โปรตีนครั้งแรกนั้นพบในปริมาณที่น้อยกว่า ส่วนแถบโปรตีนขนาด 30 kD นั้นไม่สามารถทำปฏิกริยากับแอนติบอดี จากผลการทดลองนี้รวมกับข้อมูลจากการทำ tryptic digest และการวิเคราะห์โดยเทคนิค mass spectrometry แสดงให้เห็นว่า แถบโปรตีนขนาด 96 kD และ 66 kD นั้นประกอบด้วยส่วนที่เป็น thioredoxin tag และส่วนที่เป็นบริเวณเร่งของโปรตีน BGal1 ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 30 kD จะมีแต่ส่วนที่เป็น thioredoxin tag และชิ้นส่วนเล็กน้อยของโปรตีน BGal1เท่านั้น จากผลการทำ western blot ทั้งสองครั้งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่สร้างขึ้นนั้นเป็นประโยชน์ในการตรวจหาโปรตีนที่มีส่วนที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกริยา ซึ่งบริเวณดังกล่าวถูกใช้ในการออกแบบเพปไทด์เพื่อใช้ผลิตแอนติบอดี

รีคอมบิแนนท์โปรตีน BGal2 ที่เชื่อมอยู่กับ thioredoxin นั้นถูกเตรียมจากส่วนสกัดหยาบของเซลล์ *E.coli* ที่เป็นส่วนที่ไม่ละลาย เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวจะผลิตออกมาในรูปที่เป็น inclusion body แถบโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีขนาดประมาณ 75-80 kD นั้นเป็นโปรตีนที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้ผลิตขึ้น ซึ่งแถบดังกล่าวจะไม่พบในชุดทดลองควบคุม ซึ่งพบเพียงแต่แถบโปรตีนของส่วนที่เป็น thioredoxing tag ส่วนแถบโปรตีนขนาด 75-80 kD นั้นทำปฏิกริยาได้กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal2 แม้จะเกิดความผิดพลาดเกี่ยวกับลำดับเพปไทด์เล็กน้อย ดังนั้นเราก็ประสบความสำเร็จในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน BGal2 เพื่อใช้สำหรับตรวจหาโปรตีนที่สร้างขึ้นจาก recombinant DNA technology



ภาพที่ 3-9 แสดงแผ่นเจล 10% SDS-PAGE (A) และ immunoblot (B) ของโปรตีน BGal2 ที่ผลิตในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ Origami B โดยการใช้พลาสมิด pET32a เป็นพาหะ หลังจากผ่านการแยกบริสุทธิ์มาแล้ว 3 ขั้นตอน โดยใช้ตัวอย่างในการรันเจล 5 µg

ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่าถึงความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีที่สามารถจดจำโปรตีนที่สนใจในพืช จึงได้ทำการสกัดโปรตีนจากพืชจากเนื้อเยื่อพืชที่แตกต่างกันจาก seedling ข้าวที่มีอายุ 7 วัน และข้าวที่มีอายุ 1 เดือน เพื่อนำมาทดสอบหาแถบการเกิดปฏิกริยา immunoreaction ด้วยเทคนิด immunoblotting ดังที่แสดงในรูปภาพที่ 3-10 แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal1 สามารถตรวจหาแถบโปรตีนที่มีขนาด 90 kD จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของราก และหน่อที่มีอายุ 7 วัน และ กาบใบ (leaf sheath) ที่มีอายุ 1 เดือน สำหรับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BGal2 นั้น สามารถจดจำแถบโปรตีนขนาด 80, 55 และ 45 kD ในเนื้อเยื่อสกัดจากราก และหน่อที่มีอายุ 7 วัน ส่วนกาบใบและแผ่นใบที่มีอายุ 1 เดือน ซึ่งจากงานวิจัยของ Chantarangsee et al. 2007 ยังแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าแอนติบอดีเหล่านี้สามารถนำมาย้อมสีส่วนของเมล็ด, seedling root และ เนื้อเยื่อของหน่อได้อย่างแตกต่างกัน แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ในการนำแอนติบอดีมาใช้ทำ immunostaining กับเนื้อเยื่อของพืช ในอนาคตแอนติบอดีเหล่านี้ยังสามารถนำมาใช้สำหรับทำ immunomicroscopy ได้อีกด้วย



ภาพที่ 3-10 แสดง 10% S S-PAGE เจล (A) และ immunoblot (B) และ (C) โปรตีนรวมที่สกัดจากข้าวที่มีอายุ 7 วันและ 1 เดือน โดยแต่ละ lane ใช้ตัวอย่างโปรตีน 25 ไมโครกรัม (A) เจลที่ย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue (Lane M) แถบโปรตีนขนาดมาตรฐาน (Lane 1) โปรตีนรวมที่สกัดจากรากข้าวที่มีอายุ 1 เดือน (Lane 2) โปรตีนรวมที่สกัดจากกาบใบข้าวที่มีอายุ 1 เดือน (Lane 3) โปรตีนรวมที่สกัดจากส่วนแผ่นใบที่มีอายุ 1 เดือน (Lane 4) โปรตีนรวมที่สกัดจากรากข้าวที่มีอายุ 7 วัน และ (Lane 5) โปรตีนรวมที่สกัดจากส่วนหน่อของข้าวที่มีอายุ 7 วัน สำหรับแผ่น immunoblot ที่ตรวจจับด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อบริเวณเร่งของโปรตีน แสดงดังรูป (B) สำหรับ BGal1 และ (C) สำหรับ BGal2 โดยตัวอย่างในแต่ละ Lane เหมือนกับที่แสดงไว้ในรูป (A) ในการทำเทคนิค western blot แสดงให้เห็นแถบโปรตีน 90 kD สำหรับโปรตีน BGal1 (B) ตามขนาดโปรตีนเต็มสาย (full-length) ที่คาดหมายไว้ ในขณะที่โปรตีน BGal2 แสดงแถบโปรตีนที่ขนาด 50-55 kD และแถบโปรตีนอื่นๆ ที่มีขนาดประมาณ 80 kD ในส่วนใบ, หน่อ และ seedling root (C, Lane 2-5) และที่ขนาด 45 kD ใน maure root (C, Lane 1) รูปภาพที่แสดงนำมาจาก Chantarangsee et al., 2007.

บทที่ 4

บทสรุป

โครงการนี้ได้ทำการศึกษาวิจัยเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการจัดตั้งศูนย์การสังเคราะห์เพปไทด์และผลิตแอนติบอดีในประเทศไทย โดยได้ทำการศึกษาทดลอง ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเพปไทด์เป้าหมายได้ถูกออกแบบขึ้นโดยการพิจารณาจากลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนซึ่งสอดคล้องสำหรับการผลิตแอนติบอดี ซึ่งเพปไทด์ที่ได้ทำการสังเคราะห์ประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่าง 10-14 ตัว ที่มีลักษณะที่ชอบน้ำ และมีความเฉพาะเจาะจงต่อ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแอนติบอดี

ในส่วนของการสังเคราะห์เพปไทด์นั้น ได้ใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์แบบ Fmoc solid-phase synthesis ทั้งนี้ผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ยังไม่เพียงพอที่จะเป็นฐานเพื่อการผลิตแอนติบอดี เนื่องจากข้อจำกัดทั้งในด้านเทคนิคและด้านงบประมาณดำเนินการ ทั้งนี้ปัญหาและอุปสรรคในการผลิตเพปไทด์คุณภาพสูงนั้น นอกจากความซับซ้อนทางด้านเคมีของการสังเคราะห์เพปไทด์แล้ว ยังขาดกระบวนการในการตรวจวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ รวมทั้งการนักเทคนิคที่มีความรู้ความชำนาญในการดำเนินการสังเคราะห์อีกด้วย และถึงแม้ว่าอุปกรณ์ในการสังเคราะห์นั้นสามารถสั่งทำได้ในประเทศไทย แต่สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์นั้นมีราคาสูง เนื่องจากจะต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งในการสังเคราะห์นั้นจะต้องทำปฏิกิริยาซ้ำหลายครั้ง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์และให้ได้ เปอร์เซ็นต์ yield สูงขึ้น

สำหรับการผลิตแอนติบอดีนั้น เมื่อได้เพปไทด์ที่ต้องการแล้ว ก็จะนำมาสร้างแอนติบอดีโดยเริ่มจากการนำมาต่อกับโปรตีนตัวพา จากนั้นจะฉีด complex ระหว่างเพปไทด์และโปรตีนตัวพาเข้าไปในกระต่าย โดยมีกระต่าย 2 ตัวที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน BGal1 และอีกตัวสำหรับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน BGal2 แอนติบอดีเหล่านี้จะต้องนำมาแยกให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำไปใช้ทำเทคนิค western blot หรือ immunolocalization เพื่อให้ได้ผลที่น่าเชื่อถือและเป็นการลด background ซึ่งแถบโปรตีนนั้นสามารถบ่งชี้ได้โดยวิธี western blot นอกจากนั้นแอนติบอดียังมีความจำเพาะในการติดฉลากเซลล์และเนื้อเยื่อในการทำ immunolocalization เป็นที่น่าสังเกตว่าความบริสุทธิ์และความแรงในการเข้าจับของแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเหมือนกับที่คาดไว้สำหรับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีแอนติเจนหลายตัว แต่ก็ไม่แปลกมากนักสำหรับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ (Doolittle, 1987) อย่างน้อยแอนติบอดีก็ยืนยันให้เห็นถึงประโยชน์ในการใช้ตรวจหาริคอมบิแนนท์ฟิวชันโปรตีนในตัวอย่างสกัดจากเซลล์ *E.coli* รวมทั้งในระหว่างกระบวนการแยกสารบริสุทธิ์ และยังใช้ตรวจหาโปรตีนในเนื้อเยื่อข้าวโดยการทำ immunostaining ได้อีกด้วย

ในปัจจุบันต้นทุนในการสังเคราะห์เพปไทด์ในประเทศไทยยังมีราคาสูงมาก ทั้งนี้ดูเหมือนว่าการสั่งซื้อเพปไทด์จากต่างประเทศน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่า แต่กระนั้นก็ตามการสั่งซื้อเพปไทด์ในประเทศไทยนั้นยังไม่ค่อยสะดวกนักเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงในซื้อผ่านบริษัทภายในประเทศ และยังมีความยุ่งยากในการนำเข้าเพปไทด์โดยไม่ต้องผ่านทางบริษัทเหล่านั้น ส่วนการนำเข้าแอนติบอดีที่ผลิตจากต่างประเทศยิ่งมีค่าใช้จ่ายสูงและยุ่งยากยิ่งขึ้นไปอีก อย่างไรก็ตามหากในอนาคตการศึกษาวิจัยทางด้านนี้มีการขยายวงกว้างออกไป อาจจะเป็นไปได้ที่จะสามารถมีการผลิตแบบเต็มกระบวนการในในประเทศไทยเพื่อความสะดวกมากยิ่งขึ้น ก็จะมีประโยชน์เป็นอย่างยิ่งที่จะตั้งศูนย์การสังเคราะห์เพปไทด์และผลิตแอนติบอดีในประเทศ

บรรณานุกรม

Andrew, S. M., and Titus, J.A. 1997. Purification of immunoglobulin G. In Current Protocols in Immunology. Coligan, J.E., Krusisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., and Strober, W. eds. John Wiley & Sons Inc., pp 2.7.1-2.7.12.

Brown CD, Barnes K, Turner AJ. 1998. Anti-peptide antibodies specific to rat endothelin-converting enzyme-1 isoforms reveal isoform localisation and expression. FEBS Lett. 424. 183-7.

Cicek, M. and Esen, A. 1999. Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) β-glucosidase in E. coli. Biotechnol. Bioeng. 63. 392-400.

Cooper, H.M. and Paterson, Y. 1995. Production of polyclonal antisera. Current Protocols in Immunology. Coligan, J.E., Krusisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., and Strober, W. eds. John Wiley & Sons Inc. pp. 2.4.1-2.4.9.

Doolittle, R.F. 1987. Of URFs and ORFs. College Press, Mill Valley, CA, USA 128 pgs.

Geux, N. and Preusch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. Electrophoresis. 18. 2714-2723.

Hornbeck, P.A. 1991. Assays for antibody production. Current Protocols in Immunology. Coligan, J.E., Krusisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., and Strober, W. eds. John Wiley & Sons Inc. pp. 2.1.1-2.1.22.

Katoh S, Terashima M, Miyaoku K.Purification of alpha-amylase by specific elution from anti-peptide antibodies. Appl Microbiol Biotechnol. 47. 521-4.

Ketudat-Cairns, J., Champattanachai, V., Srisomsap, C., Wittman-Liebold, B., Thiede, B., and Svasti, J. 2000 Sequence and expression of Thai rosewood β-glucosidase/β-fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein. J. Biochem. 128. 999-1008.

Lerner, R.A., Green, N., Alexander, H., Liu, F-T., Sutcliffe, J.G., and Shinnick, T.M. 1981. Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitus B virus

genome elicit antiboies reactive with the native envelope protein of Dane particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78. 3404-3407.

Madisen L, Farrand AL, Lioubin MN, Marzowski J, Knox LB, Webb NR, Lim J, Purchio AF. 1989. Expression and characterization of recombinant TGF-beta 2 proteins produced in mammalian cells. DNA. 8. 205-12.

Mosckovitz R, Yan N, Heimer E, Felix A, Tate SS, Udenfriend S. 1993. Characterization of the rat neutral and basic amino acid transporter utilizing anti-peptide antibodies. Proc Natl Acad Sci USA. 90. 4022-6.

Murray BP, Edwards RJ, Murray S, Singleton AM, Davies DS, Boobis AR. 1993. Human hepatic CYP1A1 and CYP1A2 content, determined with specific anti-peptide antibodies, correlates with the mutagenic activation of PhIP. Carcinogenesis. 14. 585-92.

Pearson DL, Reimonenq RD, Pollard KM. 1999. Expression and purification of recombinant mouse fibrillarin. Protein Expr Purif. 17. 49-56.

Schnolzer, JM., Alewood, P., Jones, A., Alewood, D., and Kent, S.B. 1992. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Int. J. Peptide Protein Res. 40. 180-193.

Schulz-Utermoehl T, Mountfield RJ, Madsen K, Jorgensen PN, Hansen KT. 2000. Selective and potent inhibition of human CYP2C19 activity by a conformationally targeted antipeptide antibody. Drug Metab Dispos. 28. 715-7.

Stewart, J.M. and Young, J.D. 1984. Solid Phase Peptide Synthesis. 2nd Edition. Pierce Chemical Company, Rockford Illinois, USA. 176 pg.

Tam, J.P. 1988. Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of high-density multiple antigenic peptide system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 85. 5409-5413.

ประวัติผู้วิจัย

1. **ผศ.ดร.พิชญา ตระการรุ่งโรจน์**

ผศ. ดร.พิชญา ตระการรุ่งโรจน์ ปัจจุบันเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประวัติการศึกษา: ปริญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง (เหรียญทอง) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และปริญญาดุษฎีบัณฑิตจาก University of Arizona ประเทศสหรัฐอเมริกา

ผลงานวิจัยตีพิมพ์:

- Ali, M.A.; Bates, R.B.; Crane, Z.D.; Dicus, C.W.; Gramme, M.R.; Hamel, E.; Marcischak, J.; Martinez, D.S.; McLure, K.J.; Nakkiew, P.; Pettit, G.R.; Stessman, C.C.; Sufi, B.A.; Yarick, G.V. Dolastatin 11 Conformations, Analogues and Pharmacophore *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4138.
- Punopas, K.; Eumkeb, G.; Chitsomboon, B.; Nakkiew, P. The Study of Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants in Lamiaceae Family. *Suranaree J. Sci Tech* **2004**, *11*, 52-59.
- Bates, R. B.; Cai, S.; Cantor, R. S.; Carducci, M. D.; Irvine, A. K.; Jiorle, B. V.; Nakkiew, P.; Setzer, W. N.; Trinh, L.N. Agatholic Acid. *Acta Cryst.* **2003**, E59, o97-o98.
- Setzer, W. N.; Vogler, B.; Bates, R. B.; Schmidt, J. M.; Dicus, C. W.; Nakkiew, P.; Haber, W. A. HPLC-NMR/HPLC-MS Analysis of the Bark Extract of *Stauranthus perforatus*. *Phytochem. Anal.* **2003**, *14*, 54-59.
- Bates, R. B.; Hamel, E.; Moore, R. E.; Nakkiew, P.; Pettit, G. R.; Sufi, B.A. Lyngbyastatin 1 and Ibu-epilyngbyastatin 1: Synthesis, Stereochemistry and NMR Line-broadening *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1824-1829.
- Gosse, B.; Gnabre, J.; Bates, R. B.; Dicus, C. W.; Nakkiew, P.; Huang, C. Antiviral Saponins from *Tieghemella heckellii J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1942-1944.
- Setzer,W. N.; Setzer, M.C.; Peppers, R. L.; McFerrin,M. B.; Meehan, E.J.; Chen, L.; Bates, R. B.; Nakkiew, P.; Jackes B. R. Triterpenoid Constituents in the Bark of *Balanops australiana*. *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 809-812.
- Setzer, W. N.; Setzer, M. C.; Bates, R. B.; Nakkiew, P.; Jackes, B. R.; Chen, L.; McFerrin, M. B.; Meehan, E. J. Antibacterial Hydroxycinnamyl Esters from *Piper canium* from

Paluma, North Queensland, Australia. The Crystal and Molecular Structure of (+)-Bornyl Coumarate. *Planta Med* **1999**, *65*, 747.

2. **รศ.ดร. James R. Ketudat-Cairns**

รศ.ดร.James R. Ketudat-Cairns เป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประวัติการศึกษา ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิตจาก University of Puget Sound ประเทศสหรัฐอเมริกา และปริญญาดุษฎีบัณฑิตจาก University of California, San Diego ประเทศสหรัฐอเมริกา

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ (Selected Publictions):

- Chuenchor W, Pengthaisong S, Yuvaniyama J, Opassiri R, Svasti J and Ketudat Cairns JR. 2006. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of rice BGlu1 ß-glucosidase with and without 2-deoxy-2-fluoro-ß-D-glucoside Inhibitor Acta Crystallographica Section F 62 , 798-801.
- Toonkool P, Metheenukul P, Sujiwattanarat P, Paiboon P, Tongtubtim N, Ketudat-Cairns M, Ketudat-Cairns J, Svasti, J. 2006. Expression and purification of dalcochinase, a ß-glucosidase from Dalbergia cochinchinensis Pierre, in yeast and bacterial hosts. Protein Expression and Purification 48, 195-204.
- Wattanasirichaigoon D, Svasti J, Cairns JRK, Tangnararatchakit K, Visudtibhan A, Keeratichamroen S, Ngiwsara L, Khowsathit P, Onkoksoong P, Lekskul A, Mongkolsiri D, Jariengprasert C, Thawil C, Ruencharoen S. 2006. Clinical and molecular analysis of an extended family with Fabry disease. J Med Assoc Thai. 89 (9), 1528-1535
- Chuankhayan P, Hua Y, Svasti J, Sakdarat S, Sullivan PA, and Ketudat Cairns JR. 2005. Purification of an Isoflavonoid 7-O-ß-apiosyl-glucoside ß-glycosidase and its substrates from Dalbergia nigrescens Kurz. Phytochemistry 66, 1880-1889.
- Ketudat Cairns JR, Keeratichamroen S, Sukcharoen S, Champattanachai V, Ngiwsara L, Lirdprapamongkol K, Liammongkolkul S, Srisomsap C, Surarit R, Wasant P and Svasti J. 2005. The molecular basis of mucopolysaccharidosis type 1 in two Thai patients. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 36, 1308-1312.
- Opassiri R, Hua Y, Wara-Aswapati O, Akiyama T, Svasti J, Esen A, and Ketudat Cairns JR. 2004. ß-Glucosidase, exo-ß-glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlu1. Biochemical Journal 379 , 125-131.

- Opassiri R, Ketudat Cairns JR, Akiyama T, Wara-Aswapati O, Svasti J, and Esen A. 2003. Characterization of a rice ß-glucosidase gene highly expressed in flower and germinating shoot. Plant Science 165 , 627-638.
- Kaomek M, Mizuno K, Fujimua T, Sriyotha P, Ketudat Cairns JR. 2003. Cloning, Expression and Characterization of an anti-fungal chitinase from Leucaena leucocephala de Wit. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 67, 667-676.
- Champattanachai V, Ketudat Cairns, JR, Shotelersuk V, Kerratichamreon S, Sawangareetrakul P, Srisomsap C, Kaewpaluek V, Svasti J. 2003. Novel mutations in a Thai patient with methylmalonic acidemia. Molecular Genetics and Metabolism 79, 300-302.
- Svasti S, Yodsowon B, Sriphanich R, Winichagoon P, Boonkhan P, Suwanban T, Sawangareetrakul P, Srisomsap C, Ketudat-Cairns J, Svasti J, Fucharoen S. 2001. Association of Hb Hope [ß136(H14)Gly –› Asp] and Hb H disease. Hemoglobin 25, 429-435.
- Ketudat Cairns JR, Champattanchai V, Srisosap C, Thiede B, Wittman-Liebold B, Svasti J. 2000. Sequence and expression of Thai rosewood ß-glucosidase/ß-fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein. Journal of Biochemistry 128, 999-1008.
- Ketudat Cairns JR, Chantarangsee M, Chaiwangrad S, Phawong J. 1999. Primary structure-based screening for glycosyl hydrolases in Thai plants. Thai Journal of Biotechnology 1, 20-30.
- Svasti J, Srisomsap C, Surarit R, Techasakul S, and Ketudat-Cairns JR. 1998. Characterization of a novel rotenoid-ß-glucosidase and its natural substrate from Thai rosewood. Journal of Pure and Applied Chemistry 70 (11),
- http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/svasti.html.
- Cairns JR, Price PA. 1994. Direct demonstration that the vitamin K-dependent bone Gla protein is incompletely ß-carboxylated in humans. Journal of Bone and Mineral Research 9, 1989-1997.
- Cairns JR, Williamson MK, Price PA. 1991. Direct identification of ß-carboxyglutamic acid in the sequencing of vitamin K-dependent proteins. Analytical Biochemistry 199, 93-97.

Awards และ Research Awards:

- Young Investigator Development Research Grant, The Thailand Research Fund, 1996-1999.
- BGJ Research Grant from the Thailand Research Fund, 2000-2003
- Scientific and Engineering Research Development Grant, The National Science and Technology Development Agency, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), 2003-2006.
- Basic Research Grant, The Thailand Research Fund, 2004-2007.
- National Synchrotron Research Center Research Grant, 2006-2008
- Royal Golden Jubilee Grants (6 to date) The Thailand Research Fund.
- SUT/NSRC Research Grants, 3 as primary investigator, to date.