รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. **แผนงานวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. **โครงการวิจัย** : เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อวิจัยพัฒนาพืชและจุลินทรีย์ในสภาวะโลกร้อน

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การตรวจสอบการแสดงออกของไซโคลฟิลินและนีโอมายซินฟอสโฟทรานสเฟอเรสทูด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Verification of Cyclophilin and Neomycin Phosphotransferase II (NPT II) by Phage Display Technique

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	**สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	**สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสุภาวดี ง้อเหรียญ	**สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ** :

บทคัดย่อ

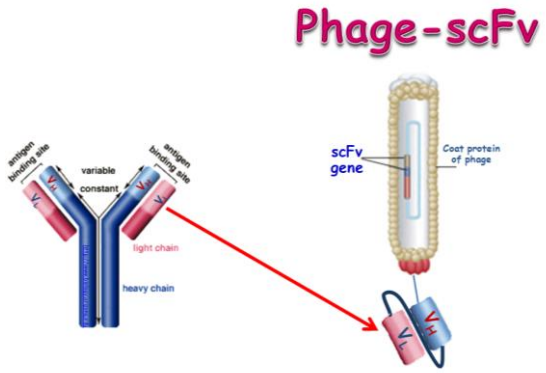
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (phage display technique) เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดกว่าการใช้เทคนิคดั้งเดิม สามารถใช้กับแอนติเจนได้หลากหลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library) จากหนูเม้าส์ที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้น เพื่อนำมาคัดเลือก Phage-scFv ที่จำเพาะต่อโปรตีนไซโคลฟิน (CyP) และนีโอมายซินฟอสโฟทรานสเฟอเรสทู (NPT II) โดยใช้ชุดไพรเมอร์ดัดแปลงโคลนยีน VH และ VL จาก B cell ของหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c จำนวน 5 ตัว นำยีน VH และ VL เชื่อมต่อกันเพื่อสร้างเป็นชิ้น single chain variable fragment (scFv) ด้วยเทคนิค overlap extension PCR และโคลนเข้ากับเวคเตอร์ pCANTAB 5e (*Amersham Pharmacia Biotech*, UK) ถ่ายฝากเข้าสู่แบคทีเรีย สามารถคำนวณขนาดของ Phage-scFv library ได้เท่ากับ 1.64 X 10^{10} นำ Phage-scFv library ที่ได้ทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีนด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR) พบว่า Phage-scFv library ที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีน NPT II และ Cry1Ab ได้

Abstract

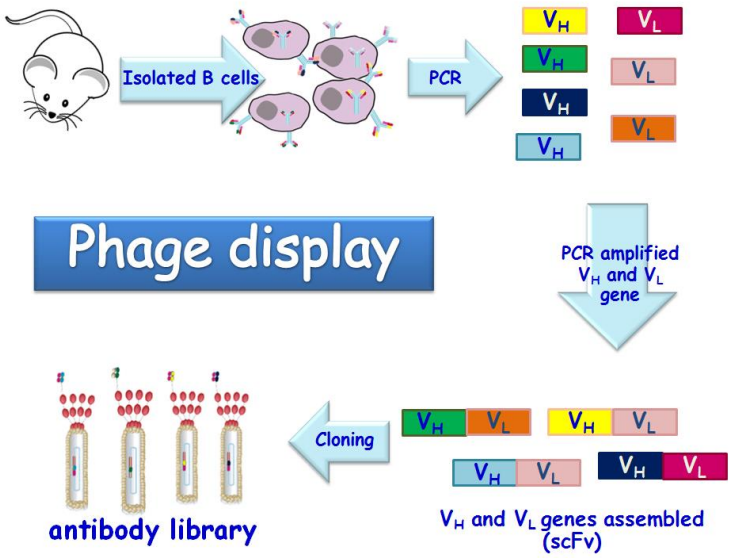
Phage display technology has become an established technique used to produce specific antibodies by circumventing immunization and consequently could facilitate the geneation of antibodies that are difficult or impossible to gain through conventional methods. This study has been created of the naïve phage scFv library and used for selection of scFv against cyclophilin and neomycin phosphotransferase II. The scFv were generated by recombining heavy chain and light chain variable regions. The full length scFv fragments were assembled in a process making use of all possible combinations of heavy and light chains, which was cloned into a plasmid vector from pCANTAB5e (*Amersham Pharmacia Biotech*, UK). The resulting scFv gene repertoire was cloned to form a sized library composed of 1.64 X 10^{10} individual clones. Binding affinities of the phage scFv library to proteins were determined using Surface Plasmon Resonance (SPR). A biacore sensorgrams showing phage scFv can bind to NPT II and Cry1Ab protein.

6. **คำนำ** :

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (phage display technique) สามารถทำได้โดยการใช้เทคโนโลยีการตัดต่อยีน ในการเชื่อมต่อแอนติบอดีที่มีเฉพาะส่วนของ variable fragment ของ V_L และ V_H ซึ่งมีการเชื่อมต่อกันด้วยสายเปปไทด์สั้นๆ เข้ากับโปรตีนที่เป็นส่วนปกคลุมของผิวฟาจ (capsid) เรียกโมเลกุลแอนติบอดีชนิดนี้ว่า ฟาจแอนติบอดี หรือ Phage scFv โดยทั่วไปมักเชื่อมต่อด้านอะมิโน (N terminal) ของโปรตีนปกคลุม pVIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 2500 ชิ้น หรือ pVIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 5 ชิ้น (ภาพที่ 1 และ 2) ซึ่งคลังแอนติบอดีที่ดีควรมีความหลากหลายของส่วนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจน (binding site) ของแอนติอบดีที่แตกต่างกัน ประมาณ 10^{9-11} ชนิด ซึ่งแอนติบอดีประเภทนี้ ยังคงคุณสมบัติการเกาะจับกับแอนติเจน (affinity) และความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อแอนติเจน สูงเทียบเท่ากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเทคนิคไฮบริโดมา (Hybridoma)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของฟาจแอนติบอดี (Phage antibody) ที่โคลนจากยีนเฉพาะส่วนของ variable fragment ของ light chain (V_L) และ heavy chain (V_H) ของแอนติบอดี



ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการผลิตคลังแอนติบอดีด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (phage display technique) จากหนู

ข้อดีของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยี phage display คือ สะดวก และประหยัดกว่าการใช้เทคนิคดั้งเดิม เพราะใช้เวลาน้อยกว่า ใช้เงินน้อยกว่า ใช้แรงงานและความชำนาญน้อยกว่า และข้อสำคัญคือไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง สามารถใช้กับแอนติเจนได้หลากหลายชนิดกว่า เพราะสามารถใช้กับแอนติเจนที่เป็นพิษ

ต่อสัตว์ แอนติเจนที่คล้ายกับโปรตีนในสัตว์ทดลอง หรืออาจใช้เซลทั้งเซลเป็นแอนติเจนก็ได้ นอกจากนั้นแล้วยังสามารถใช้กับแอนติเจนที่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้ (nonimmunogenic antigen) สามารถใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนจำนวนมาก ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในงานด้าน proteomics ในปัจจุบัน สามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเหมือนของคน (humanized antibody) เพื่อใช้ในการรักษาโรค (therapeutic antibody) สามารถปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามต้องการ เช่นมีความสามารถในการจับ หรือความจำเพาะเจาะจงสูงขึ้น หรือทนต่อสภาวะต่างๆ และสามารถนำไปผลิตเป็นจำนวน มากได้ง่าย ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยทั่วไป เพื่อใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (http://www.sut.ac.th/iat/biotech/montarop/phd)

จากคุณสมบัติของแอนติบอดีที่มีจำเพาะต่อแอนติเจนสูง จึงนิยมนำแอนติบอดีมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ในทางการแพทย์ใช้แอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรค ส่วนทางการเกษตรสามารถใช้แอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยโรคพืชได้เช่นกัน และยังใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนสารเคมีในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรได้ด้วย ในงานด้านการวิเคราะห์โปรตีนอื่นๆ สามารถนำแอนติบอดีมาสกัดบริสุทธิ์โปรตีนเป้าหมาย นอกจากนี้งานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมหรือการตัดต่อยีนเข้ามาช่วยในการสร้างพันธุ์พืชใหม่ๆ ที่เรียกว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรมหรือพืชจีเอ็ม [Genetically Modified (GM) Plant] โดยการตัดต่อรหัสพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปใส่ในอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ประโยชน์ของเทคโนโลยีนี้ทำให้เกิดการพัฒนาสายพันธุ์ชนิดใหม่ สามารถปรับปรุงคุณภาพสายพันธุ์พืชใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพทางโภชนาการ ต้านทานโรค แมลง และสารกำจัดวัชพืช รวมถึงพันธุ์พืชที่มีความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ยีนไซโคลฟิลิน (Cyclophilin, CyPs) เป็นโปรตีนประเภท เปปติดิลโพรพิล ซิส-ทรานส์ ไอโซเมอเรส(PPIases) ที่พบได้ทั่วไปในเซลล์ของออร์แกนเนลที่ศึกษาทั้งในเซลล์โปรคาริโอต และยูคาริโอต เป็นยีนที่ เกี่ยวข้องกับการสร้างระบบภูมิคุ้มกันและยับยั้งขบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ พืช ซึ่งช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้น เช่น การได้รับ ผลกระทบจากโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่ ไม่เหมาะสมอื่นๆ

ในการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยตรวจสอบยีนเป้าหมายที่สอดแทรกอยู่ในโครโมโซมพืช ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา ทำโดยการสกัดสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมของพืช แล้วย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis แล้วใช้เทคนิค Southern blotting ย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นเมมเบรน เพื่อตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มียีน เป้าหมายอยู่โดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) นอกจากนี้อาจตรวจหายีนเป้า หมายบนโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค พีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ได้อีกวิธีหนึ่ง (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2557)

การคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน จำเป็นต้องตรวจสอบผลผลิตของยีนเป้าหมาย นั่นคือ โปรตีน เพื่อเป็นการยืนยันว่า ยีนเป้าหมายมีการแสดงออกของยีนได้ในต้นพืช การตรวจสอบโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีน นิยม

ใช้เทคนิคทางซีรั่มวิทยา โดยอาศัยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายเป็นตัวตรวจ วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ ELISA และ Western blotting

นอกจากการคัดเลือกโปรตีนจากยีนเป้าหมายแล้ว ยังสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนเครื่องหมาย ที่ถูกถ่ายยีนเข้าไปในต้นพืชได้ด้วย เช่น ยีนนีโอมายซินฟอสโฟทรานสเฟอเรสทู (neomycin phosphotransferase II : NPT II) ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้ต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบ นิยมใช้เทคนิคทางซีรั่มวิทยา เช่น ELISA ทำให้การคัดเลือกต้นพืชมีควาสะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

ปัจจุบันฟาจแอนติบอดีมีการนำใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ทางการแพทย์ Pereira และคณะ (1997) ใช้ฟาจแอนติบอดีสำหรับการวินิจฉัยแอนติเจนบนผิวเซลล์ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถแยกออกจากโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ นอกจากนี้ ได้มีผลิตฟาจแอนติบอดีต่อสารพิษจากทะเล ชนิด Palytoxin ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษในมนุษย์ Garet และคณะ (2010) ได้ใช้ฟาจแอนติบอดีในเทคนิคทางซีรั่มวิทยาพัฒนาการตรวจสอบสารพิษ Palytoxin ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำในหอย

Liu และคณะ (2014) คัดเลือกฟาจแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสโรคของปลา ได้แก่ เชื้อ infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) และ เชื้อ spring viraemia of carp virus (SVCV) (Liu *et al*., 2013) เพื่อใช้ในการพัฒนาการวินิจฉัยโรค นอกจากจะใช้ฟาจแอนติบอดีในการวินิจฉัยและตรวจสอบโรคแล้ว Hubert และคณะ ในปี 2014 ยังใช้ฟาจแอนติบอดีในการแยกโปรตีนเป้าหมายให้บริสุทธิ์ด้วย

ทางด้านการเกษตร มีการใช้ฟาจแอนติบอดีเป็นตัวตรวจสารพิษจากเชื้อรา ชนิด zearalenone ที่ปนเปื้อนในข้าวฟ่าง (Edupuganti, *et al*., 2013) และ ในปี 2012 Wang และคณะ ผลิตฟาจแอนติบอดีจากคลังแอนติบอดีที่ได้จากมนุษย์ เพื่อใช้ตรวจสอบโปรตีน Cry1C ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารที่ผลิตจากพืชดัดแปลงพันธุกรรม นอกจาการตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายที่อยู่พืชดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว ยังสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนเครื่องหมาย เช่น McKenzie และคณะ (2000) ได้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ NPTII ตรวจสอบต้นพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน NPTII

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ทำการผลิตคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library) โดยสร้างจาก B cell ของหนูเม้าส์ที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้น เพื่อนำมาคัดเลือก Phage-scFv ที่จำเพาะต่อโปรตีน CyP และ NPT II และนำ Phage-scFv ที่ได้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมต่อไป

7. **วิธีดำเนินการ** :

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีและเอนไซม์

1.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองซื้อมาจากบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย

1.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermantas
- สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker

1.3 เอนไซม์

- Fast digest Sfi I (Fermantas, USA)
- Fast digest Not I (Fermantas, USA)
- T4 ligase (Fermantas, USA)
- GoTaq polymerase (Promega, USA)

2. จุลินทรีย์ พลาสมิด และอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 แบคทีเรีย

- แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21
- แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TG1
- แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์HB2151

2.2 พลาสมิด

- พลาสมิดลูกผสมของยีนไซโคลฟิลิน จากงานวิจัยของคุณสุภาวดี ง้อเหรียญ
- พลาสมิดลูกผสมของยีน NPT II จากงานวิจัยของคุณพงศกร สรรค์วิทยากุล

- พลาสมิด pCANTAB5e (*Amersham Pharmacia Biotech*, UK)

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

- อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 2xYT (Himedia, India)

3. เครื่องมือ

3.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems)

3.2 อุปกรณ์การอ่านภาพและบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์

3.3 เครื่อง Spectophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)

3.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ควบคุมอุณหภูมิ

3.5 ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมแอนติเจน

1.1. โปรตีนรีคอมบิแนนท์ไซโคลฟิลิน (rCYP)

นำพลาสมิดลูกผสมที่มียีนไซโคลฟิลินจากงานวิจัยของคุณสุภาวดี ง้อเหรียญ ถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Rosetta) ด้วยวิธีการ heat shock transformation เลี้ยงเชื้อบนอาหาร LB ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นยีนอยู่โดยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 สาย คือ ไพรเมอร์ T7- primer และ T7 Reverse- primer นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วย วิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Rosetta) ที่ผลิตโปรตีนไซโคฟิลิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2YT ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว 2YT ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่อจนเซลล์เจริญมีค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 เติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.0 mM เลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลาอย่างน้อย 6-8 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย purification buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 8.0) ในอัตราส่วนบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตรต่อตะกอนเซลล์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 มิลลิลิตร เติม lysozyme

ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มบนน้ำแข็ง นาน 30 นาที ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี freeze-thaw แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใส (crude extract) ที่มีโปรตีนมาวิเคราะห์ขนาดของโปรตีน rCyP ที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ใช้ 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel ใน Tris-glycine buffer (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) ใช้ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เมื่อครบเวลานำมาย้อมสีด้วยสารละลาย Coomassie blue (Fermentas, USA)

นำ crude extract ที่สกัดได้ มาผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 6.3) 10-20 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 4.5) เพื่อปล่อย rCyP ออกจากคอลัมน์ เก็บสารละลายโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาเป็นส่วนๆ ส่วนละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 10-20 ส่วน แล้วนำไปหาค่าความเข้มข้นโปรตีนด้วยการวัดค่า OD_{280} และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ rCyP ด้วยวิธี SDS-PAGE ใน 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel

1.2.โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NPT II

นำพลาสมิดลูกผสมของยีน NPT II จากงานวิจัยของคุณพงศกร สรรค์วิทยากุล ถ่ายฝากเข้าเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Rosetta) ด้วยวิธีการ heat shock transformation นำเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีน NPT II เลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2YT ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว 2YT ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่อจนเซลล์เจริญมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 เติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลาอย่างน้อย 6-8 ชั่วโมง วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1 นำไปหาค่าความเข้มข้นโปรตีนด้วยการวัดค่า OD_{280} และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ NPT II ด้วยวิธี SDS-PAGE ใน 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel

2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (Phage Display Technology)

2.1.การเตรียมคลังของฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library)

2.1.1. ออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีนของส่วนแปรผัน (variable domain) ของทั้ง heavy และ light chain (VH และ VL) ของแอนติบอดีจากหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Zhou et al. (1994) โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ เพิ่มชิ้นส่วนของยีน VH โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 ชุด คือ Mouse VH forward และ Mouse VH reverse และอีกส่วนคือเพิ่มชิ้นส่วนของยีน VL โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 ชุด คือ Mouse VL forward และ

Mouse VL reverse โดยมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I สำหรับโคลนเข้าเวคเตอร์ pCANTAB 5e อยู่ที่ปลาย 5' ของ Mouse VH forward และ Mouse VL reverse ตามลำดับ และเพิ่มส่วน linker sequence ที่ปลาย 5' ของ Mouse VH reverse และ Mouse VL forward เพื่อใช้เชื่อมต่อระหว่างยีน VH และ VL ลำดับของกรดอะมิโน ของ linker sequence คือ GSTSGSGKPGSGEGSTKG ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน VH และ VL จากหนู

Mouse VH forward primers (5'⟶3')	
MKV-FOR 1	GGCCCAGCCGGCC ATG GCC GATGTGAAGCTTCAGGAGTC
MHV-BACK4	GGCCCAGCCGGCC ATG GCC CAGGTTACTCTGAAAGAGTC
MHV-BACK11	GGCCCAGCCGC ATG GCC CAGGTGCAGCTGAAGSAGTC
MHV-BACK12	GGCCCAGCCGGCC ATG GCC GAGGTCCAGCTGCARCARTC
MHV-BACK13	GGCCCAGCCGGCC ATG GCC GAGGTGAAGCTGGTGGARTC
Mouse VH reverse primers (5'⟶3')	
MHV-FOR1	ACCAGAGCCGC GCCGCCGCTACCACCACCACCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT
MHV-FOR2	ACCAGAGCCGCCGCCGCCGCTACCACCACCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT
Mouse VL forward primers (5'⟶3')	
MKV-BACK1	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGATGTTTTGATGACCCAAACT
MKV-BACK6	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGATATTGTGCTAACTCAGTCT
MKV-BACK9	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAAATTGTTCTCACCCAGTCT
MKV-BACK10	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGATATTGTGATRACSCAG
MKV-BACK11	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGACATTGTGMTGACCCARTCT
MKV-BACK12	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAYATCCAGMTGACWCAGACT
Mouse VL reverse primers (5'⟶3')	
MKV-FOR1	GCGGCCGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTG
MKV-FOR2	GCGGCCGCCCGTTTTATTTCCAGCTTGGT
Primers for generation of scFv genes in SOE-PCR (5'⟶3')	
SOE-BACK	GGCCCAGCCGGCCATG
SOE-FOR	GCGGCCGCCCGTTT
S = G/C, **R** = G/A, **K** = G/T, **M** = A/C, **Y** = C/T, **W** = A/T, **H** = A/C/T, **B** = C/G/T, **V** = A/C/G, **D** = A/G/T, and **N** = A/T/G/C.	

2.1.2. สกัด total RNA จากม้ามหนู

สกัด Total RNA จากม้ามโดยใช้ ชุดสกัด FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen, Taiwan) นำม้ามหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c อายุประมาณ 1 เดือน จำนวน 5 ตัว ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาบดกับไนโตรเจนเหลวในโกร่งให้ ละเอียด จากนั้นเติม FARB Buffer 350 ไมโครลิตรและ β-Mercaptoethanol 3.5 ไมโครลิตร.ต่อน้ำหนักม้าม 30 มิลลิกรัม ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 20G ดูดขึ้นลง จำนวน 10 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายใส่ใน Filter Column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายใสใส่หลอดทดลองใหม่ จากนั้นเติม 1 เท่าปริมาตรร ของ 70 % RNase-free ethanol ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายลงใน FARB Mini Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส จากนั้นเติม Wash Buffer 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที นำ FARB Mini Column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัด ethanol จากนั้นเติมน้ำ Rnase Dnase free 50 ไมโครลิตรลงใน FARB Mini Column เพื่อชะอาร์เอ็นเอออกจากคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 2 นาที เก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

2.1.3. การสร้าง cDNA ของ VH และ VL

นำ total RNA จากข้อ 2.1.2 เปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยใช้ชุด SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) โดยผสมของปฏิกิริยาดังนี้ total RNA 5 ไมโครกรัม, 50 ไมโครโมลาร์ oligo$(dT)_{20}$, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยวางลงบนน้ำแข็งนาน 1 นาที จากนั้นเติม 1X First-Strand Buffer, 0.1 โมลาร์ DTT 1 ไมโครลิตร, RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร และ 200 ยูนิต SuperScript™ III RT ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บ cDNA ไว้ที่ - 20 °C

2.1.4. โคลนยีน VH และ VL ด้วยเทคนิค PCR

นำ cDNA จากข้อ 2.1.3 ใช้เป็นแม่แบบในการสร้างยีนของแอนติบอดีทั้งส่วน VH และ VL ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix *(Promega, USA)* และ ใช้ชุดไพรเมอร์จากตารางที่ 1 (Mouse VH forward, Mouse VH reverse, Mouse VL forward และ Mouse VL reverse) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30

วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล

2.1.5. การสร้างเป็นชิ้น scFv

นำชิ้นส่วนยีน VH และ VL (จากข้อ 2.1.4) เชื่อมต่อกัน ซึ่งจะเรียกยีนส่วนนี้ว่า single chain variable fragment (scFv) ด้วยเทคนิค PCR ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ยีน VH และ VL ในปริมาณที่เท่ากัน 600-800 ng, 1X PCR buffer, 2 มิลลิโมล $MgCl_2$, 80 ไมโครโมลาร์ dNTPs, 2.5 ยูนิต *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา assemble ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 15 รอบ ของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) จากนั้นเติมไพรเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์ (ประกอบด้วย SOE-BACK 0.2 ไมโครโมลาร์ และ SOE-FOR 0.2 ไมโครโมลาร์) แล้วทำปฏิกิริยา PCR ต่ออีก 30 รอบ นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และสกัดบริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Kit (Fermentas, USA) จากนั้นเก็บ DNA ที่เตรียมได้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการเชื่อม scFv เข้ากับ vector (ligation) ต่อไป

2.1.6. เชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pCANTAB 5e และถ่ายฝากเข้าแบคทีเรีย TG1

นำชิ้นส่วนยีน scFv (จากข้อ 2.1.5) ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ยีน scFv 20 นาโนกรัม, 1X Fast Digest buffer, 1 ไมโครลิตร Fast Digest *Sfi* I และ 1 ไมโครลิตร Fast Digest *Not* I บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และนำเวคเตอร์ pCANTAB 5e (*Amersham Pharmacia Biotech*, UK) ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I เช่นเดียวกับยีน scFv ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล หลังจากนั้นนำยีน scFv และเวคเตอร์ pCANTAB 5e ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I แล้ว มาเชื่อมต่อกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย ยีน scFv ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I 10 นาโนกรัม, pCANTAB 5e ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I 10 นาโนกรัม, 1x Rapid Ligation Buffer, 5 ยูนิต T4 DNA ligase (Thermo Scientific,USA) บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำพลาสมิดลูกผสม ถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ TG1 ด้วยวิธีการ heat shock transformation เลี้ยงเชื้อบนอาหาร SOBAG (20 g Bacto-tryptone, 5g Yeast Bacto extract, 0.5 g NaCl, 0.01 $MgCl_2$, 0.1 M Glucose, 100 ug/ml Ampicillin) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำโคโลนีเดี่ยวที่

เจริญบนอาหารตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นยีนอยู่โดยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 สาย คือ ไพรเมอร์ SOE-BACK และ SOE-FOR นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล จากนั้นทำการคำนวณขนาดของคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library) โดยการนับจำนวนของ recombinant bacteria ที่โตบนจานเลี้ยง SOBAG ที่ โดยการเจือจางเซลล์ทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ประมาณ 4-5 ครั้งก่อนที่จะนำไปเกลี่ย (spread) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนับจำนวนโคโลนี คำนวณหาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดในคลัง

2.2.การเตรียม helper phage

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ TG1 ในอาหารเหลว 2YT ที่เติม 2 เปอร์เซ็นต์ Glucose และAmpicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2YT-AG) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ย้ายเชื้อลงในอาหารเหลว 2YT-AG เลี้ยงเชื้อต่อจนเซลล์เจริญอยู่ในช่วง log phase เติม helper phage M13K07 ลงในเซลล์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 2YT ที่เติม Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2YT-AK) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใส ตกตะกอน helper phage ด้วยสารละลาย PEG/NaCl [200 g PEG (MW 8,000), 146.1 g NaCl] อัตรา 1 ส่วน ต่อน้ำใส 5 ส่วน กวนเบาๆ บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกตะกอนฟาจโดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอน helper phage ด้วย PBS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2.3. การขยายจำนวนคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library)

นำเซลล์ recombinant bacteria จากข้อ 2.1.6 เลี้ยงในอาหารเหลว 2YT-AG ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 3.2 ละลายตะกอน Phage-scFv library ด้วยสารละลาย blocking (3 % skim milk, 0.01% NaN_3, 0.1 % Triton X-100) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที

2.4. ทดสอบการจับกันของ Phage-scFv library **ที่ผลิตได้กับ recombinant NPT II และโปรตีนอื่นๆ ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR)**

นำโปรตีน NPT II เคลือบลงบน Sensor Chip NTA *(GE Healthcare, Sweden*) จากนั้นนำ Sensor Chip NTA ที่เคลือบด้วยโปรตีนแล้ว เข้าในเครื่อง Biacore X-100 *(GE Healthcare, Sweden*) ฉีด Phage-scFv library จากข้อ 2.3 เข้าในเครื่อง Biacore X-100 ตรวจดู sensorgram การจับกันของ Phage-scFv และโปรตีนเป้าหมาย นำโปรตีนชนิดอื่นทดสอบการจับของ Phage-scFv

เวลา และสถานที่ทำการทดลอง

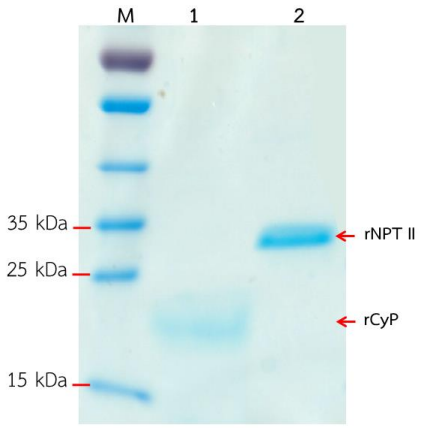
ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 (2 ปี)
สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

8. **ผลการทดลองและวิจารณ์** :

8.1. การเตรียมแอนติเจน

ทำการถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสม เข้าในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(Rosetta) คัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม และทดสอบการแสดงออกของยีน ไซโคฟิลินและ NPT II โดยชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วย SDS-PAGE พบว่า มีการแสดงออกของแถบโปรตีนขนาดประมาณ 18.4 และ 29 กิโลดาลตันตามลำดับ โปรตีนที่ได้นี้ คือ ไซโคฟิลินและ NPT II ที่เกิดจากการแสดงออกร่วมกันระหว่าง 6x His tag และ ไซโคฟิลินและ NPT II ซึ่งแถบโปรตีนขนาดดังกล่าวไม่ปรากฏในกลุ่มควบคุม (เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(Rosetta (ภาพที่ 3)

สำหรับการสกัด rCYP และ rNPT II ให้บริสุทธิ์นั้น ทำการสกัดโดยอาศัยคุณสมบัติการเป็น Histidine tagged protein นำไปผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ความเข้มข้นของ rCYP และ rNPT II ที่วัดด้วยวิธี Bradford assay ได้ปริมาตรโปรตีนทั้งหมด 6.12 และ 6.37 มิลลิกรัม จากอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 1 ลิตร ตามลำดับ

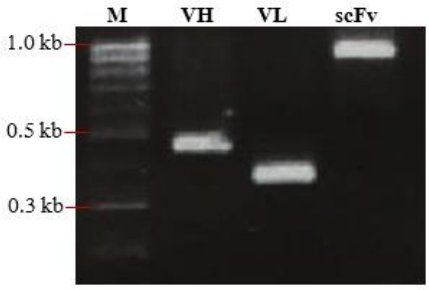


ภาพที่ 3 ปริมาณของ rCYP และ rNPT II ที่ผลิตได้จากเซลล์ *E. coli* หลังจากชักนำด้วย IPTG (lane 1 และ 2) แยกขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE

8.2.การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (Phage Display Technology)

8.2.1. การเตรียมคลังของฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library)

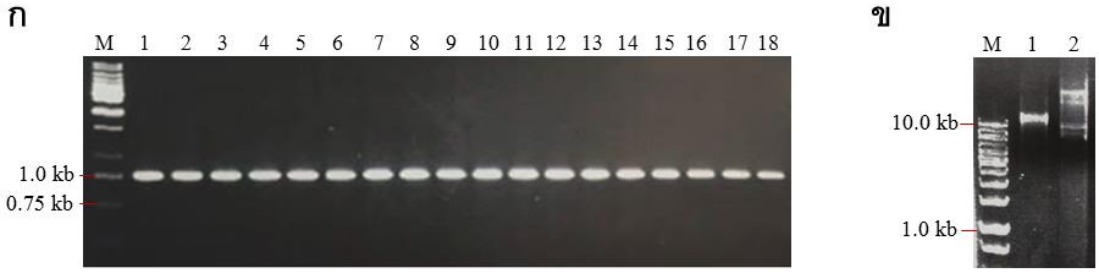
จากการออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการโคลนยีนของ VH และ VL โดยไพรเมอร์นี้ดัดแปลงจากรายงานของ Zhou et al. (1994) ซึ่งเหมาะสำหรับการโคลนยีนของทั้ง VH และ VL ที่ได้จากหนูจากหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน จากรายงานมีการใช้ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน VH (forward primer 10 เส้น และ reverse primer 4 เส้น) และ VL (forward primer 9 เส้น และ reverse primer 4 เส้น) จำนวน 40 และ 36 คู่ ตามลำดับ จึงได้ทำการดัดแปลงไพรเมอร์โดยใช้ รหัส IUPAC nucleotide code แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่มีความแตกต่าง ซึ่งวิธีนี้ ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายจากเดิม โดยลดจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ เพียง 10 และ12 คู่ สำหรับโคลนยีน VH (forward primer 5 เส้น และ reverse primer 2 เส้น) และยีน VL (forward primer 6 เส้น และ reverse primer 2 เส้น) ตามลำดับ และไพรเมอร์ทั้ง 22 คู่ ยังคงมีประสิทธิภาพในการโคลนยีน VH และ VL โดยเมื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR สามารเพิ่มปริมาณยีน VH และ VL ได้ โดยยีนมีขนาดประมาณ 400 และ 340 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 4) เช่นเดียวกับรายงานของ Okamoto et al. (2004) และ Wang et al. (2000) ซึ่งทดสอบการใช้ชุดไพรเมอร์โคลนยีน VH และ VL จากเซลล์ไฮบริโดมาของหนู จากนั้นใช้เทคนิค overlap extension PCR เชื่อมต่อยีน VH และ VL เพื่อสร้างเป็นส่วนของยีน scFv โดยอาศัย linker sequence (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) ที่อยู่บริเวณปลายของยีน VH และ VL ทำการเพิ่มส่วนของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I ทาง 5’ และ *Not* I ทาง 3’ ของยีน scFv โดยใช้ไพรเมอร์ SOE-BACK และ SOE-FOR โดยยีน scFv มีขนาดประมาณ 750 เบส (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงส่วน variable heavy (VH) และ variable light (VL) และสายแอนติบอดีสายเดี่ยว (scFv)

เมื่อได้ยีน scFv ซึ่งมีส่วนประกอบของ ยีน VH และ VL นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I และ *Not* I และนำไปเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pCANTAB 5e ถ่ายฝากเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TG1 ตรวจสอบยีน scFv ในแบคทีเรียที่มีเวคเตอร์ลูกผสม (คลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment :Phage-scFv library) ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SOE-F และ SOE-R พบว่า ใน Phage-scFv library มียีน scFv ขนาดประมาณ 750 bp (ภาพที่ 5ก) และเมื่อนำมาสกัดเวคเตอร์ลูกผสม เทียบกับเวคเตอร์ pCANTAB 5e พบว่า เวคเตอร์ลูกผสมมีขนาดใหญ่กว่า pCANTAB 5e (ภาพที่ 5ข) แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีน scFv ที่สอดแทรกเข้าในเวคเตอร์ pCANTAB 5e จากนั้นทำการคำนวณขนาดของ Phage-scFv library ด้วยวิธีการนับจำนวนของ recombinant bacteria ที่โตบนอาหารแข็ง โดยการเจือจางเซลล์ทีละ 10 เท่า (10 fold dilution) จึงนำไปเกลี่ย (spread) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ พบว่า สามารถคำนวณขนาดของ Phage-scFv library ที่ค่าความเจือจาง 10^{10} มีขนาด 1.64 X 10^{10} clone/ml

การเพิ่มจำนวน Phage-scFv โดยใช้ฟาจตัวช่วย (helper phage: M13K07) เข้าไปเจริญในแบคทีเรียที่มี Phage-scFv library โดยการส่งผ่านดีเอ็นเอเข้าไป โดย helper phage เหล่านี้จะช่วยในการสร้างโปรตีนที่ใช้ในการประกอบเป็น Phage-scFv ภายในเซลล์แบคทีเรีย หลังจากนั้นสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย PEG เพื่อสร้างเป็นคลังของเฟจที่สมบูรณ์

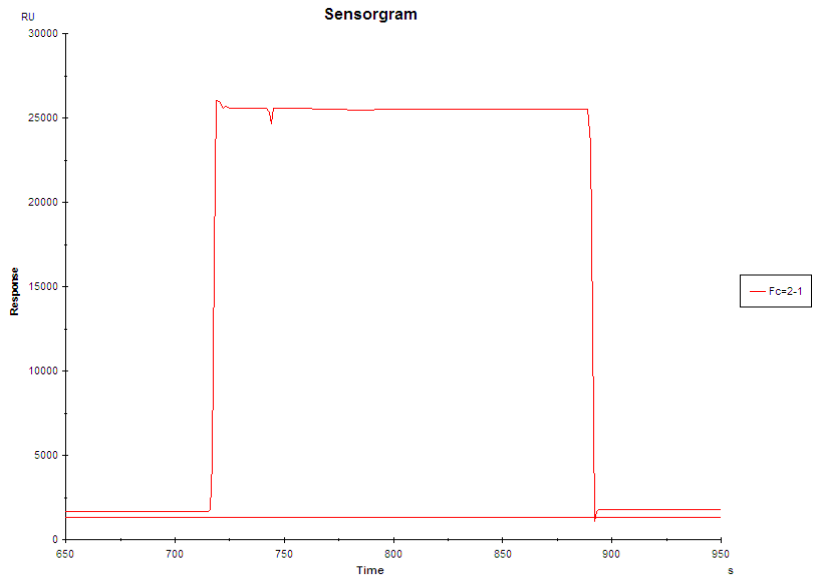


ภาพที่ 5 (ก) ตรวจสอบยีน scFv ในคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment :Phage-scFv library (lane 1-16) เทียบกับเวคเตอร์ลูกผสมที่มียีน scFv (lane 17) ด้วยเทคนิค PCR
(ข) เวคเตอร์ลูกผสม (Phage-scFv library) (lane 1) เทียบกับ เวคเตอร์ pCANTAB 5e (lane 2)

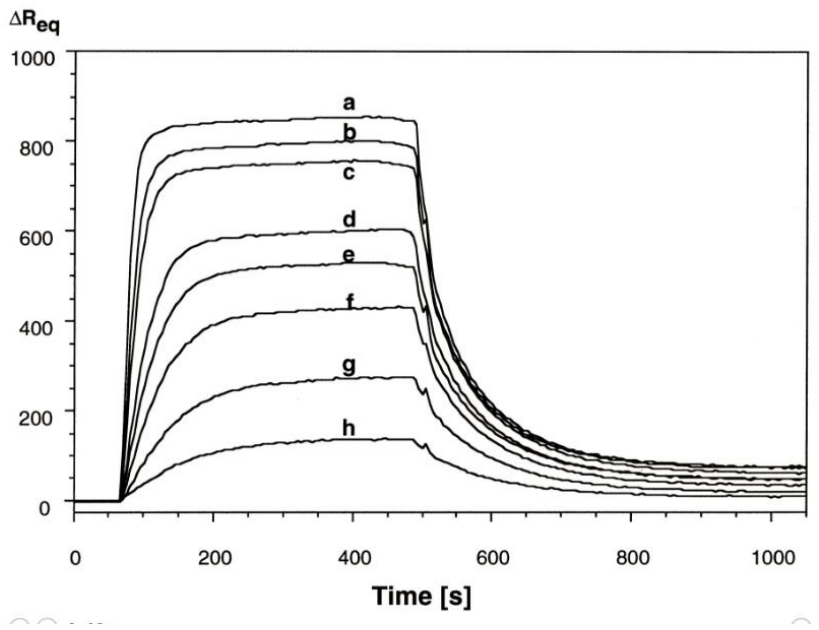
8.2.2. ทดสอบการจับกันของ Phage-scFv library ที่ผลิตได้กับ recombinant NPT II และโปรตีนอื่นๆ ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR)

ทดสอบการจับกันของ Phage-scFv library ที่ผลิตได้กับ rNPT II ด้วยเทคนิค SPR ด้วยเครื่อง Biacore X-100 ผลจาก sensorgram (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่ามีการจับกันของโปรตีนเกิดขึ้น จากลักษณะของเส้นกราฟที่เกิดขึ้น โดยพบว่าเส้นกราฟสูงขึ้น เมื่อมีการฉีด Phage-scFv library เข้าในระบบ และเส้นกราฟคงที่ จนได้ทำการชะ Phage-scFv library ออก ซึ่งเส้นกราฟลักษณะเช่นนี้ เป็นลักษณะของแอนติบอดีจับกับแอนติเจนแบบจำเพาะเจาะจง ซึ่งเป็นการจับที่แน่นกว่าการจับกันของโปรตีนกับโปรตีนทั่วไป ซึ่งลักษณะ sensorgram สอดคล้องกับงานวิจัยที่ใช้เครื่อง Biacore ในการตรวจสอบการจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจน เช่น Schneider *et. al*. (1997) ทำการตรวจสอบ binding kinetics ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี MoAb34 กับฮอร์โมน ERYTHROPOI-ETIN (EPO) โดยใช้ Biacore (ภาพที่ 7) และ รายงานของ Christine *et. al*. (2012) ใช้เครื่อง Biacore ในการหาค่า Kinetics และ affinity ของการจับกันระหว่าง human Dickkopf protein 1 (DKK1) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี DS4 (ภาพที่ 8)

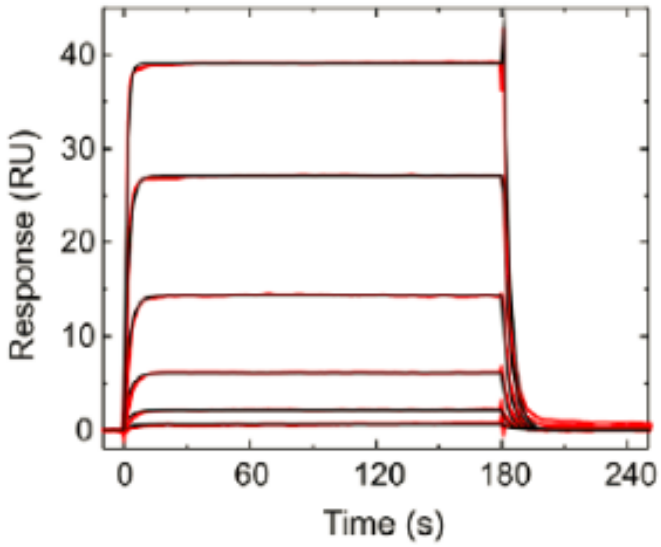
นอกจากนี้ ยังนำ Phage-scFv library ที่ผลิตได้ทดสอบการจับกับโปรตีนอื่นๆ ได้แก่ recombinant Cry1Ab (rCry1Ab) จาก sensorgram พบว่า Phage-scFv สามารถจับกับโปรตีน rCry1Ab ได้เช่นเดียวกัน(ภาพที่ 9) นั่นแสดงให้เห็นว่า Phage-scFv library ที่ผลิตได้ มีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีนได้



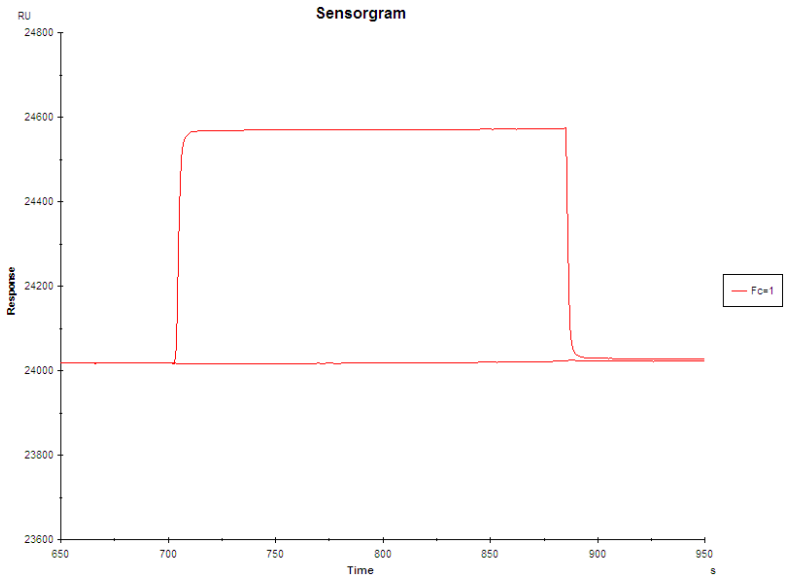
ภาพที่ 6 Biacore sensorgram แสดงการจับกันของ Phage-scFv และ rNPT II



ภาพที่ 7 Biacore sensorgram จากรายงานของ Schneider *et. al*. (1997) แสดงการตรวจสอบ binding kinetics ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี MoAb34 กับฮอร์โมน ERYTHROPOIETIN (EPO) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Biacore



ภาพที่ 8 Biacore sensorgram จากรายงานของ Christine *et. al*. (2012) แสดงการหาค่า Kinetics และ affinity ของการจับกันระหว่าง human Dickkopf protein 1 (DKK1) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี DS4



ภาพที่ 9 Biacore sensorgram แสดงการจับกันของ Phage-scFv และ rCry1Ab

9. **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ** :

1. ชุดไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน ส่วน variable ของ heavy chain (VH) และส่วน variable ของ light chain (VL) ซึ่งดัดแปลงให้มีจำนวนไพรเมอร์น้อยลง แต่ยังคงประสิทธิภาพในการโคลนยีน VH และ VL จากหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c ได้ ซึ่งทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ ซึ่งแต่เดิมใช้ไพรเมอร์จำนวนมากในการโคลนยีน

2. Phage-scFv library ได้รับการสังเคราะห์เป็นผลสำเร็จ เป็นคลังฟาจชนิด Naïve ซึ่งใช้แหล่งพันธุกรรมจากม้ามของหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c ที่ไม่เคยได้รับการฉีดกระตุ้น จำนวน 10 ตัว ชิ้นส่วน scFv สร้างมาจากส่วน variable ของ VH และส่วน variable ของ VL เชื่อมต่อกันด้วย linker sequence: GSTSGSGKPGSGEGSTKG และ Phage-scFv library ที่ผลิตได้มีขนาด 3.28 X 10^{12}

3. ทดสอบคุณสมบัติการจับของ Phage-scFv library กับแอนติเจนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค SPR โดยใช้เครื่อง Biacore X-100 พบว่า Phage-scFv library สามารถจับกับโปรตีน NPT II และ Cry1Ab ได้

10. **การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :**

จากงานวิจัยครั้งนี้ เป็นการสร้าง Phage-scFv library ซึ่งเป็นชนิด Naïve library เพราะสร้างจาก B cell (ม้าม) ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนใดๆมาก่อน จึงทำให้ Phage-scFv library มีแอนติบอดีค่อนข้างหลากหลาย ดังนั้น สามารถใช้ Phage-scFv library จากงานวิจัยนี้ ในการคัดหา Phage-scFv ที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดใหม่ๆ ได้ทันที โดยไม่ต้องผลิต Phage-scFv library ใหม่ ทำให้ลดเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน ซึ่งส่งผลให้การพัฒนางานวิจัยที่ใช้แอนติบอดีมีความรวดเร็วขึ้น

11. **คำขอบคุณ** :

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. รัชนี ฮงประยูร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้คำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณ คุณวัชรินทร์ ศรีประยูร ที่ช่วยงานในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

12. **เอกสารอ้างอิง** :

หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2557. http://www.rdi.ku.ac.th/GMOS/GMOs2/2_1/index4.htm. 4/6/2014

Christine, B., Y. N. Abdiche, D. M. Stone, S. Collier, K. C. Lindquist, A. C. Pinkerton, J. Pons and R. Arvind. 2012. Exploring the Dynamic Range of the Kinetic Exclusion Assay in Characterizing Antigen-Antibody Interactions. PloS one. 7. e36261. DOI: 10.1371/journal.pone.0036261.

Edupuganti, S. R., O. P. Edupuganti and R. O'Kennedy. 2013. Generation of anti-zearalenone scFv and its incorporation into surface plasmon resonance-based assay for the detection of zearalenone in sorghum. Food Control. 34: 668-674.

Garet, E., A.G. Cabado, J.M. Vieites and Á. González-Fernández. 2010. Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: Palytoxin. Toxicon**. 55:** 1519–1526.

Gordon, A. J., B .J. Thomas and P. H. S .Reynolds. 1992. Localization of Sucrose Synthase in Soybean Root Nodules. New Phytol. 122:35-44.

http://www.sut.ac.th/iat/biotech/montarop/phd, 24/6/57.

Hubert, A., Y. Mitani, T. Tamura, M. Boicu and I. Nagy. 2014. Protein complex purification from *Thermoplasma acidophilum*using a phage display library. J. Microbiological Methods**.** 98: 15–22.

Isabel, G., I. Arenas, I. Benite, J. M. Rios, B. Becerril, R. Grande, J. C. Almagro, A. Bravo and M. Sobero′n. 2006. Specific Epitopes of Domains II and III of Bacillus *thuringiensis* Cry1Ab toxin in involed in the Sequential Interaction with Cadherin and Aminopeptidase-N Receptors in *Manduca sexta*. http://www.jbc.org/cgi/doi/ 10.1074/jbc.M604721200.

Liu, H., X. Zheng, X. Shi, L. Yu, P. Jia, J. Wang, J. He, W. Lan, H. Liu and Z. Wu. 2014. Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against infectious haematopoietic necrosis virus from mouse phage display library. J. Virological Methods. 205 : 61–67.

Liu, H., X. Zheng, F. Zhang, L. Yu, X. Zhang, H. Dai, Q. Hua, X. Shi, W. Lan, P. Jia, L. Yuan and H. Liu. 2013. Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against spring viraemia of carp virus from mouse phage display library. J. Virological Methods. 194:178–184.

Luara, M. K., A. A. Lukowiak, S. F. Garczynski, R. J. McNall, P. Youngman and M. J. Adang. 1998. Phage Display of a Biologically Active *Bacillus thuringiensis* Toxin. Applied and Enviromental Microbiology 64(8):2995-3003.

McKenzie, M. J., V. Mett and P. E. Jameson. 2000. Modified ELISA for the detection of neomycin phosphotransferase II in transformed plant species. Plant Cell Reports. 19 : 286–289

Newsted, W. J., R. N. Chibbar and F. George. 1991. Effect of Low Temperature Stress on the Expression of Sucrose Synthetase in Spring and Winter Wheat Plants. Development of a Monoclonal Antibody Against Wheat Germ Sucrose Synthetase. Biochem. Cell Biol. 69: 36-41.

Pereira, S., H. Maruyama, D. Siegel, P. Van Belle, D. Elder, P. Curtis and D. Herlyn. 1997. A model system for detection and isolation of a tumor cell surface antigen using antibody phage display. J. Immunological Methods. 203:11-24.

Schneider, H., W. Chaovapong, D. J. Matthews, C. Karkaria, , R. T. Cass, H. Zhan, M. Boyle, T. Lorenzini, S. G. Elliott, and L. B. Giebel. 1997. Homodimerization of Erythropoietin Receptor by a Bivalent Monoclonal Antibody Triggers Cell Proliferation and Differentiation of Erythroid Precursors. *Blood,* 89: 473-482.

Sun D., S. Hongyan, C. Jianfei, S. Da, Z. Qinghe, Z. Hong, L. Shengwang , W. Yunfeng, Q. Huaji and F. Li. 2012. Generation of a Mouse scFv Library Specific for Porcine Aminopeptidase N Using the T7 Phage Display System. J. Virological Methods 182: 99-103.

Wang, Y., X. Zhang, C. Zhang, Y. Liu and X. Liu. 2012. Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries. Toxicon. 60:1290–1297.

Wittich, P.E. and D. Vreugdenhil. 1998. Localization of sucrose synthase activity in developing maize kernels by in situ enzyme histochemistry. J. Experimental Botany, 49:1163–1171

13. **ภาคผนวก** :

ภาคผนวก ก

การสกัดพลาสมิด
โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะตามที่ระบุสำหรับพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว รอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปสกัดพลาสมิดตามวิธีการดังต่อไปนี้

1. ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
2. เติม Lysis Solution ลงในสารละลายข้อ 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แลวกลับ หลอดเบาๆ 4-6 ครั้ง เพื่อผสมให้เข้ากัน
3. เติม Neutralization Solution ลงในสารละลายข้อ 2 ปริมาตร 350 ไมโครลิตรแลวกลับ หลอดเบาๆ ทันที 4-6 ครั้ง
4. นำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ใช้ไมโครไปเปตดูดสารละลายใสในข้อ 4 ใสลงใน GeneJET™ spin column
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง
7. ล้าง GeneJET™ spin column ด้วย Wash Solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แลว นำไปปั่น เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง
8. ล้าง GeneJET™ spin column ด้วย Wash Solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แลว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
9. เทของเหลวในข้อ 8 ทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำ ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ออกจาก Column
10. นำ GeneJET™ spin column ไปวางในหลอด microcentrifuge ใหม่ แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ GeneJET™ spin column เพื่อละลาย ดีเอ็นเอออกมา บ่ม 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

ภาคผนวก ข

การตรวจขนาดดีเอ็นเอดวยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

1. เตรียม agarose gel 0.8 % ใน 1X TBE buffer
2. อุ่นให้เจลละลาย รอให้เย็นพอที่มือจับได้
3. เทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล แลววาง comb รอให้เจลแข็งประมาณครึ่งชั่วโมง วางถาดเจลลงใน chamber เท 1xTBE ให้ท่วมเจล แลวจึงดึง comb ออก
4. load ดีเอ็นเอตัวอย่างเปรียบเทียบกับ DNA/*Hind* III marker
5. แยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟา 120 โวลต์ ตั้งเวลา 30 นาที
6. แกะเจลออกจากถาดนำไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide 0.5 M เป็นเวลา 5 นาที เพื่อย้อมสีแถบดีเอ็นเอ
7. นำเจลลงแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้างสีส่วนเกินออก เป็นเวลา 10 นาที
8. ตรวจการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยใช้เครื่อง Gel Document

ภาคผนวก ค

การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส
(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis : SDS-PAGE)

การเตรียมเจล

1. ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้าด้วยกันคั่นดวย spacers ล็อคให้แนบติดกันด้วย clamp แล้วขัน สกรูให้แน่นวางลงใน casting stand
2. เตรียมสารละลายเจล 8% โดยผสมสารต่อไปนี้ ตามลำดับ คนเบาๆให้เข้ากัน แต่ยังไม่ต้องเติม TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) กับ ammonium persulfate

น้ำปราศจากไอออน	4.6	มิลลิลิตร
30% acrylamide monomer solution	2.7	มิลลิลิตร
1.5 M Tris buffer pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	6	ไมโครลิตร

3. เติม TEMED กับ ammonium persulfate แลวเขย่าวนเบาๆ ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ
4. ใช้ไปเปตดูดสารละลายเจลใส่ลงที่มุมแผ่นแก้ว จากนั้นค่อยๆหยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ใหเจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที
5. เตรียม stacking gel monomer โดยผสมสารต่อไปนี้

น้ำปราศจากไอออน	2.7	มิลลิลิตร
30% acrylamide monomer solution	0.67	มิลลิลิตร
1.0 M Tris buffer pH 6.8	0.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.04	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.04	มิลลิลิตร
TEMED	4	ไมโครลิตร

6. เทน้ำที่ปิดหน้าเจลออก ซับให้แห้งด้วยกระดาษ
7. ดูดสารละลายเจลใส่ลงระหว่างแผ่นแก้ว เสียบ comb เพื่อให้เกิดช่อง (well)
8. ทิ้งไว้จนกว่าเจลจะแข็ง ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที
9. เอา comb ออก ระวังอย่าให้เจลขาด เติม Tank buffer ลงใน chamber

การทำอิเลคโตรโฟรีซิส

1. ใส่สารตัวอย่างที่ผสมกับ 2x sample buffer แลวหยอดลงในแต่ละช่องของเจล
2. ต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เสียบปลั๊กต่อกับเครื่องจาย กระแสไฟฟ้า
3. ตั้งกระแสไฟฟ้าไว้ที่ 120 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง สำหรับเจล 1 แผ่น
4. ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อ tracking dye ลงมาถึงด้านล่าง
5. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber เอา spacers ออก แล้วใช้ spatula งัดแผ่นแก้วเบาๆ เจลจะติดอยู่ที่แผ่นแก้วข้างหนึ่ง ค่อยๆเทเจลลงในถาดย้อม

การเตรียมสีย้อม PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas, USA)

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในเจล นำไปเข้า microwave ด้วยไฟแรง นาน 1 นาที เขย่าต่อ 5 นาที เทน้ำทิ้ง
2. ทำซ้ำข้อ 1 จำนวน 3 ครั้ง
3. เติม PageBlue™ Protein Staining Solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเข้า microwave ด้วยไฟแรง นาน 30 วินาที เขย่าต่อ 20 นาที เทสารละลายทิ้ง
4. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง