ส่วน ข

บทที่ 1 บทคัดย่อ

247521

โครงการวิจัยเรื่อง: การใช้คลังฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีของมนุษย์เพื่อผลิตแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลที่เป็นโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์สำหรับลบล้างพิษจากสัตว์ทะเล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2552

จำนวนเงิน 4,570,000 บาท (สี่ล้านห้าแสนเจ็ดหมื่นบาทถ้วน)

ระยะเวลาวิจัย หนึ่งปี ตั้งแต่ วันที่ 8 กันยายน พ.ศ. 2552 ถึง วันที่ 7 กันยายน พ.ศ. 2553

หน่วยงาน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน และ ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการฯ ชื่อ: ศาสตราจารย์ ดร. (นาง) วันเพ็ญ ชัยคำภา
สังกัด: คณะเวชศาสตร์เขตร้อน และ ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์: 02-4196497 โทรสาร: 02-4196491
อี-เมล์: tmwcc@mahidol.ac.th; tmwcc@yahoo.com

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ: ดร. (นาย) นิทัศน์ สุขรุ่ง
   สังกัด: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
   โทรศัพท์: 02-4196621 โทรสาร: 02-4196644
   อี-เมล์: sinsru@mahidol.ac.th
2. ชื่อ: ผศ. ดร. (นางสาว) พจนีย์ ศรีมาโนชญ์
   สังกัด: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
   โทรศัพท์: 02-9869213 ต่อ 7265-6 โทรสาร: 02-5165379
   อี-เมล์: srimanote_p@y7mail.com; psrimanote01@yahoo.com.au
3. ชื่อ: ดร. (นางสาว) นิตยา อินทราวัฒนา
   สังกัด: ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
   โทรศัพท์: 02-3549100 ต่อ 1592 โทรสาร: 02-6435583
   อี-เมล์: tmniw@mahidol.ac.th
4. ชื่อ: รองศาสตราจารย์ ดร. (นาย) มนัส จงสงวน
   สังกัด: ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์: 02-3549100 ต่อ1593 โทรสาร: 02-6435583

อี-เมล์: tmmcs@mahidol.ac.th

247521

การวิจัยนี้ได้รับการรับรองการทำวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล หนังสือรับรองเลขที่ ๐๐๙/๒๕๕๓

คณะผู้วิจัยได้จัดหาปลาปักเป้าที่จับจากทะเลไทย คือ **อ่าวไทย** ได้แก่จากสะพานปลา จังหวัดชลบุรี ๒๑ ตัว เป็นปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) ๒ ตัว และปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*L. spadicius*) ๑๙ ตัว จังหวัดระยอง ๕๕ ตัว เป็นปลาปักเป้าหลังเขียว ๑๑ ตัว และปลาปักเป้าหลังน้ำตาล ๔๔ ตัว และจังหวัดสมุทรสาคร ๔๙ ตัว เป็นปลาปักเป้าหลังเขียว ๕ ตัว และปลาปักเป้าหลังน้ำตาล ๔๔ ตัว และ **ทะเลอันดามัน** ได้แก่จากสะพานปลา จังหวัดสตูล ๓๐ ตัว เป็นปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) ๒๘ ตัว และปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) ๒ ตัว ได้ทำการชำแหละ แยกอวัยวะ/เนื้อเยื่อ คือ ตับ ทางเดินอาหาร เนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ กล้ามเนื้อ และหนัง ชั่งน้ำหนักแต่ละส่วนของปลาแต่ละตัว แล้วนำไปสกัดเอาสารพิษเทโทรโด (tetrodotoxin; TTX) ด้วยกรดอะซีติกความเข้มข้น ๐.๑ เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ก่อนนำไปทดสอบว่า สารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อใด จากปลาตัวใด มีสารพิษที่ทำให้หนูไมซ์ทดลองสายพันธุ์ไอซีอาร์ เพศผู้ น้ำหนักตัวประมาณ ๒๐ กรัม เกิดอาการป่วยและตาย ด้วยวิธีที่ทดลองในหนูไมซ์ (mouse bioassay) พบว่าไม่สามารถฉีดสารสกัดจากหนังปลาเข้าทดสอบในหนูไมซ์ได้เพราะสารสกัดจากหนังปลามีลักษณะเป็นเจลาติน

ปลาปักเป้าหลังเขียวเพียง ๑ ตัว จากจำนวนทั้งหมด ๑๘ ตัว (ร้อยละ ๕.๕๖) และปลาปักเป้าหลังน้ำตาล ๑ ตัวจากทั้งหมด ๑๐๗ ตัว (ร้อยละ ๐.๙๓) มีสารพิษที่ทำให้หนูทดลองตาย ดังนั้นจำนวนปลาจาก**อ่าวไทย**ที่มีสารพิษจึงมีร้อยละ ๑.๖ คือมีพิษจำนวน ๒ ตัวจากทั้งหมด ๑๒๕ ตัว ส่วนปลาปักเป้าเขียวจุด ๒๘ ตัว และปลาปักเป้าลายร่างแห ๒ ตัว จาก**ทะเลอันดามัน**มีสารพิษทุกตัว (ร้อยละ ๑๐๐) แม้จะมาจากฝูงปลาต่างฝูงและจับต่างเวลากัน

ได้ศึกษาปริมาณของสารพิษในอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าที่มีพิษ เทียบเป็นหน่วยของสารพิษ โดยถือว่า หนึ่งหน่วย (mouse lethal unit; 1 MU) คือปริมาณสารพิษในสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าที่ทำให้หนูทดลองน้ำหนักตัวประมาณ ๒๐ กรัม ตายภายใน ๓๐ นาทีหลังฉีดสารทดสอบปริมาตร ๐.๕ มิลลิลิตร เข้าช่องท้อง พบว่า ปลาปักเป้าหลังเขียวจากอ่าวไทยตัวเดียวที่มีสารพิษนั้นมีปริมาณสารพิษมากที่สุดในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นๆ ของปลาตัวเดียวกัน คือในน้ำหนักเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์หนึ่งกรัมมีสารพิษ จำนวน ๒๓.๑๒ หน่วย รองลงมาคือตับมีสารพิษ ๔.๑๖ หน่วยต่อเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม กระเพาะอาหารลำไส้มีสารพิษ ๒.๔๖ หน่วยต่อเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม และกล้ามเนื้อมีสารพิษจำนวน ๒.๒๔ หน่วยต่อเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม ปลาปักเป้าหลังน้ำตาลจากอ่าวไทยตัวเดียวที่พบว่ามีพิษ พบพิษเฉพาะในตับจำนวน ๔.๐ หน่วยต่อน้ำหนักเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม ส่วนปริมาณของสารพิษในอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าที่จับมาจากทะเลอันดามัน พบว่าปลาปักเป้าเขียวจุดซึ่งปลาทุกตัวมีพิษนั้นมีปริมาณของสารพิษในอวัยวะ/เนื้อเยื่อมากกว่าของปลาปักเป้าหลังเขียวจากอ่าวไทยมาก กล่าวคือในตับซึ่งพบสารพิษมากที่สุด

247521

มีปริมาณสารพิษเฉลี่ยสูงถึง ๖๖.๖๘ หน่วยต่อน้ำหนักตับหนึ่งกรัม รองลงมาคืออวัยวะสืบพันธุ์ กระเพาะอาหารและลำไส้ และกล้ามเนื้อ ซึ่งมีปริมาณสารพิษเฉลี่ย ๖๔.๗ ๒๑.๖๔ และ ๑๓.๗๔ หน่วยต่อน้ำหนักเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม ตามลำดับ สำหรับปลาปักเป้าลายร่างแหที่ได้มาจากทะเลอันดามันมีขนาดเล็กมาก มีปริมาณสารพิษต่อน้ำหนักหนึ่งกรัมของกล้ามเนื้อ กระเพาะอาหารและลำไส้ และ ตับ ๔ หน่วยต่อเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม ๓.๑๖ หน่วยต่อเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม และ ๒ หน่วยต่อเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม ตามลำดับ โดยไม่พบว่ามีสารพิษในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งการที่ปลาปักเป้าลายร่างแหจากทะเลอันดามันมีปริมาณสารพิษน้อยมากและไม่พบพิษในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์นั้น อาจเป็นเพราะยังเป็นปลาอายุน้อยและอวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่พัฒนาเต็มที่ คณะผู้วิจัยได้พยายามหาปลาปักเป้าลายร่างแหโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เป็นปลาเจริญเต็มวัยมาเพิ่มเติม แต่ไม่สามารถหาได้เนื่องจากชาวประมงไม่สามารถจับปลาสายพันธุ์นี้ได้อีกเลยในช่วงเวลาของการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้สกัดสารพิษเทโทรโดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าที่มีสารพิษทุกตัว กำหนดชื่อว่าสารพิษที่สกัดจากปลาปักเป้า หรือ pTTX แล้วนำไปศึกษาเปรียบเทียบมวลของสารพิษกับสารพิษเทโทรโดมาตรฐาน (standard TTX) หรือ sTTX ที่ซื้อจากบริษัทซิกมาและเออาร์ซี ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยวิธีเอชพีแอลซี (HPLC) และ แมสสเปคโตรเมทรี (mass spectrometry) พบว่า pTTX มีมวลโมเลกุลและแมสสเปคตรา (mass spectra) เหมือนกับสารพิษเทโทรโดมาตรฐาน (standard tetrodotoxin; sTTX) ทุกประการ คือมี m/z 319.10 และ m/z 319.75 นอกจากนี้ยังพบอะนาลอกส์ (analogs) ของสารพิษเทโทรโดที่อยู่ในสารสกัดจากปลาปักเป้าที่จับจากทะเลไทยเช่นเดียวกับที่พบใน sTTX ด้วย คือ 5- และ/หรือ 11-deoxy-TTX และ anhydro-TTX และ/หรือ 6-epianhydro-TTX ที่มีมวลโมเลกุล m/z 304 และ m/z 302 ตามลำดับ รวมทั้งมีอะนาลอกส์อื่นๆ ด้วย คือ 4-epi-TTX (m/z 284), 6,11 dideoxy-TTX (m/z 288), trideoxy-TTX ที่สูญเสีย H^+ ไปสองอะตอม (m/z 270)

คณะผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคฟาจดิสเพลย์เพื่อคัดเลือกฟาจที่บนผิวของอนุภาคของฟาจมีแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวที่จับจำเพาะกับ sTTX และ pTTX และมียีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีนั้นๆ ในจีโนมของฟาจ ออกจากคลังฟาจที่แสดงแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวที่คณะผู้วิจัยได้สร้างเอาไว้ก่อนแล้วด้วยวิธีฟาจไบโอแพนนิง โดยใช้ sTTX และ pTTX เป็นแอนติเจนในการคัดเลือกฟาจ จากนั้นได้นำฟาจเหล่านี้แต่ละโคลน (clones) เข้าสู่แบคทีเรียชนิดเอชเชอริเชียโคไล หรือเรียกย่อว่า อีโคไล สายพันธุ์ที่เหมาะสม เพื่อให้แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวที่จับจำเพาะกับ sTTX และ pTTX ออกมา จากการคัดเลือกฟาจและการนำฟาจเข้าสู่อีโคไล คณะผู้วิจัยมีอีโคไลที่ถูก ทรานซฟอร์มด้วยฟาจมิดที่คัดเลือกด้วย sTTX จำนวน ๒ โคลนที่สามารถผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ที่จับกับสารพิษเทโทรโดมาตรฐาน ให้ชื่อว่าโคลน เอส ๑๖ และ เอส ๓๕ และมีอีโคไลที่ถูก ทรานซฟอร์มด้วยฟาจมิด ที่คัดเลือกด้วยสารพิษเทโทรโดที่สกัดจากปลาปักเป้า (pTTX) จำนวน ๙ โคลนที่ผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวที่จับกับสารพิษเทโทรโดที่สกัดจากปลาปักเป้า ให้ชื่อว่า โคลนพี ๑ พี ๒ พี ๔ พี ๕ พี ๖ พี ๘ พี ๙ พี ๑๑ และพี ๑๒

คณะผู้วิจัยได้ศึกษารูปแบบของสายดีเอ็นเอที่เป็นรหัสพันธุกรรมของแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวของอีโคไลที่ถูกทรานซฟอร์มด้วยฟาจมิดทั้ง ๑๑ โคลนด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment

247521

length polymorphism; RFLP) จากการตัดสายดีเอ็นเอที่เป็นรหัสพันธุกรรมของแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวของอีโคไลที่ถูกทรานซฟอร์มด้วยฟาจมิดทั้ง ๑๑ โคลนด้วยเอนโดนิวคลีเอสชนิดเอ็มวาหนึ่ง (*Mva*I) พบว่าสายดีเอ็นเอที่เป็นรหัสพันธุกรรมของแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวของอีโคไลทั้ง ๑๑ โคลนมีความแตกต่างกัน ๘ แบบ ให้ชื่อว่า แบบเอ ถึง แบบเอช โดยโคลนเอส ๑๖ เป็นแบบเอ โคลนเอส ๓๕ และ พี ๑๑ ซึ่งเหมือนกันเป็นแบบบี โคลนพี ๑ เป็นแบบซี โคลนพี ๒ และพี ๘ ซึ่งเหมือนกันเป็นแบบดี โคลนพี ๔ เป็นแบบอี โคลนพี ๕ เป็นแบบเอฟ โคลนพี ๖ และ พี ๙ ซึ่งเหมือนกันเป็นแบบ จี และโคลนพี ๑๒ เป็นแบบเอช การที่โคลนต่างๆ มีสายดีเอ็นเอที่เป็นรหัสพันธุกรรมของแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวต่างแบบกันอาจเป็นเพราะชนิดของกรดอะมิโนในส่วนที่ไม่ใช่คอมพลีเมนทาริทีดีเทอร์มินนิง (ซีดีอาร์ CDRs) ของแอนติบอดี (ส่วนเฟรมเวิค หรือ FRs) หรือกรดอะมิโนในส่วนเอสดีอาร์ (SDRs) ที่อยู่ในบริเวณซีดีอาร์ต่างกัน แอนติบอดีจากทุกโคลนจับกับสารพิษเทโทรโดได้เหมือนกันแต่อาจจับที่หมู่อะตอมที่ต่างกันหรือความแน่นของการจับของแอนติบอดี (affinity) จากแต่ละโคลนกับ สารพิษเทโทรต่างกัน คณะผู้วิจัยได้ศึกษาและแสดงลำดับของนิวคลีโอไทด์และ ถอดรหัสนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนของซีดีอาร์และอิมมูโนกลอบูลินส์เฟรมเวิคของยีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีสายเดี่ยวของโคลนเอส ๑๖ และโคลนเอส ๓๕ ด้วยแล้ว

แต่เนื่องจากการผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวที่จับกับสารพิษเทโทรโดจากอีโคไลที่ถูกทรานซฟอร์มด้วยฟาจมิดนั้นได้ปริมาณแอนติบอดีน้อยมาก คณะผู้วิจัยจึงทำการซับโคลน (subclone) ยีนของแอนติบอดีสายเดี่ยวเข้าสู่ระบบพลาสมิดชนิดพีอีที ๒๓ บีพลัส (pET23b^{+}) และใช้อีโคไลสายพันธุ์บีแอล ๒๑ ดีอี ๒๓ [BL21 (DE23)] ในการผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวแทน และทำการแยกแอนติบอดีสายเดี่ยวบริสุทธิ์ออกจากลัยเซท (lysate) ของอีโคไลด้วยแอฟฟินิทีเรซิน

คณะผู้วิจัยได้ผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยว (HuScFv) ที่จับเฉพาะกับสารพิษเทโทรโดจากโคลนเอส ๑๖ และ เอส ๓๕ ที่บริสุทธิ์ในปริมาณมาก แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการลบล้างพิษของสารพิษเทโทรโดที่สกัดจากปลาปักเป้า (pTTX) ในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์จากระบบประสาทนิวโรสองเอ (neuro-2a) ซึ่งเป็นเทคนิคที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นเอง พบว่าแอนติบอดีจากโคลนเอส ๑๖ และเอส ๓๕ ปริมาณ ๒.๕ ไมโครกรัม สามารถลบล้าง (neutralized) สารพิษ TTX ปริมาณ ๒๐๐ นาโนโมลาร์ ได้ร้อยละ ๙๕.๑๕ และ ๖๗.๐๘ ตามลำดับ

เมื่อผสมสารพิษเทโทรโดบริสุทธิ์ จากปลาปักเป้า (pTTX) ปริมาณ ๑.๕ MU หรือ ๐.๓ ไมโครกรัม กับแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวจากโคลนเอส ๑๖ (๖๐ ไมโครกรัม) (จำนวนโมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยว : สารพิษ = ๒.๓๒ : ๑) ก่อนฉีดเข้าช่องท้องของหนูไมซ์ ซึ่งเป็นวิธีทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีแบบมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก พบว่าแอนติบอดีจากโคลนเอส ๑๖ สามารถยืดเวลาตายของหนูไมซ์จาก ๘.๐๒ $\pm$ ๐.๐๘ นาทีในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแอนติบอดี เป็น ๑๓.๙๕ $\pm$ ๑.๔๙ นาที ในกลุ่มที่ได้รับแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยว ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p < ๐.๐๐๐๑) ส่วนหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับแอนติบอดีจากโคลนเอส ๓๕ (๑๐๐ ไมโครกรัม) ผสมกับสารพิษ pTTX ๑ MU หรือ ๐.๒ ไมโครกรัม (จำนวนโมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยว : สารพิษ =๕.๔๒ : ๑) พบว่า

247521

แอนติบอดีจากโคลนเอส ๓๕ สามารถยืดเวลาตายของหนูไมซ์ จาก ๑๙.๑๙ ± ๑.๘๔ นาที เป็น ๒๔.๓๕ ± ๒.๘๒ นาทีในกลุ่มที่ไม่ได้รับแอนติบอดี ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p = ๐.๐๒๘)

เมื่อให้หนูทดลองกินสารพิษเทโทรโด พบว่าแม้จะให้หนูทดลองกิน pTTX ในปริมาณมากถึง ๑๐ MU ของเมื่อฉีดเข้าช่องท้อง ก็ไม่สามารถทำให้หนูทดลองตายได้

จึงได้ทำการฉีดสารพิษเทโทรโดเข้าช่องท้อง และหลังจากนั้น ๒ นาทีฉีดแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวจากโคลนเอส ๑๖ เข้าช่องท้อง ปริมาณ ๓๐๐ ไมโครกรัมในพีบีเอส ๕๐๐ ไมโครลิตร พบว่าสามารถยืดเวลาการตายของหนูทดลองออกไป ๑๓ นาทีเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ไม่ได้รับแอนติบอดี

เมื่อลดปริมาณสารพิษ pTTX ที่ใช้ฉีดเข้าช่องท้องของหนูไมซ์ลงเหลือ ๐.๕ MU (๐.๑๘ ไมโครกรัม) และฉีดแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวจากโคลนเอส ๑๖ เข้าช่องท้อง ปริมาณ ๕๖.๘๓ ไมโครกรัมในพีบีเอส ๕๐๐ ไมโครลิตร (อัตราส่วนแอนติบอดีต่อสารพิษ ๖.๒๐ : ๑) พบว่าหนูทดลองที่ได้รับแอนติบอดีรอดชีวิตทุกตัว ส่วนหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแอนติบอดีตายทั้งหมดโดยเวลาตายเฉลี่ยของหนูในกลุ่มนี้คือ ๔๔.๑๗ ± ๕.๘๕ นาที

จากกิจกรรมและผลการวิจัยสรุปได้ว่าสามารถผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวชนิดโมโนโคลนาลที่เป็นโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์จากคลังของฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีของมนุษย์ และแอนติบอดีดังกล่าวสามารถลบล้างพิษของสารพิษเทโทรโดและอะนาลอกส์ได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในหนูทดลอง

ผลงานโดยสรุป

1. คณะผู้วิจัยได้เตรียมเอกสารให้ วช. เพื่อยื่นขอจดสิทธิบัตรแล้ว 1 เรื่อง คือ “แอนติบอดีสายเดี่ยวชนิดโมโนโคลนาลที่เป็นโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์สำหรับลบล้างพิษเทโทรโด”
2. คณะผู้วิจัยส่ง Manuscript เพื่อขอรับการตีพิมพ์ในวารสาร TOXOCON แล้ว 1 เรื่อง คือ “A Revisit to Toxic Marine Puffer Fish in Thailand Seas and Their Indigenous Tetrodotoxin and Analogs”
3. กำลังเตรียม Manuscript อีก 1 เรื่องคือ “Human ScFv that blocks sodium ion channel activity of tetrodotoxin”
4. มีนักศึกษาระดับปริญญาเอกและปริญญาโทเข้าร่วมในการวิจัย 2 คนคือ
   - นางสาวมนต์รัตน์ จุลเนตร หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิทยาภูมิคุ้มกัน หลักสูตรนานาชาติ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยนักศึกษาได้รับค่าเล่าเรียนและเงินเดือนจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
   - นางสาวฐิติยา สัมมาเทศน์ หลักสูตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาภูมิคุ้มกัน หลักสูตรนานาชาติ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ABSTRACT

247521

Research Title: Application of human antibody phage display library for production of fully human monoclonal antibodies that neutralize marine toxins

Financial Support: Annual budget of Thailand fiscal year 2009 at the sum of Baht 4,570,000

Project Duration: One year (From September 8th, 2009 to 7th September, 2010)

Responsible Institutions: Faculty of Tropical Medicine and Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Research Team:

Principal investigator: Professor Dr. (Mrs.) Wanpen Chaicumpa

Affiliation: Faculty of Tropical Medicine and Department of Parasitology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Tel.: 02-4196497; Fax: 02-4196491

E-mail: tmwcc@mahidol.ac.th; tmwcc@yahoo.com

Co-investigators:

1. Dr. (Mr.) Nitat Sookrung

   Affiliation: Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

   Tel.: 02-4196621; Fax: 02-4196644

   E-mail: sinsru@mahidol.ac.th

2. Assistant Professor Dr. (Ms.) Potjanee Srimanote

   Affiliation: Graduate Program, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus

   Tel.: 02-9869213 ext 7265-6; Fax: 02-5165379

   E-mail: srimanote_p@y7mail.com; psrimanote01@yahoo.com.au

3. Dr. (Ms.) Nittaya Indrawattana

   Affiliation: Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

   Tel.: 02-3549122 ext 1592; Fax: 02-6435583

   E-mail: tmniw@mahidol.ac.th

4. Associate Professor Dr. (Mr.) Manas Chongsa-nguan

   Affiliation: Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

   Tel.: 02-3549100 ext 1593; Fax: 02-6435583

   E-mail: tmmcs@mahidol.ac.th

247521

This research received official approval from the Siriraj Animal Care and Use Committee (SI-ACUC), Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University (COA no. 009/2553)

A total of 155 puffer fish caught from Gulf of Siam and Andaman seas were studied. The fish from the Gulf of Siam included 21 fish from fish landing port at Chonburi province (2 *Lagocephalus lunaris* and 19 *L. spadicius*), 55 fish landed at Rayong province (11 *L. lunaris* and 44 *L. spadicius*) and 59 fish landed from Samutsakorn province (5 *L. lunaris* and 44 *L. spadicius*). There were 30 fish from Andaman seas which landed at Satun province including 28 *Tetraodon nigroviridis* and 2 *Arothron reticulais.* Organs and tissues of individual fish including livers, reproductive tissue, gastro-intestinal tissue and muscles were separately collected and weighed. Tetrodotoxin (pTTX) was extracted from individual samples by using 0.1% acetic acid (w/v) except from the skin which could not be extracted due to gelatoin of the preparations after heating in acetic acid. Each preparation was screened for the presence of pTTX by injecting individual samples intraperitoneally (i.p.) into male ICR mice of ~20 grams body weight. In the presence of the toxin mice died within 30 minutes after the injection. It was found that only 1 of 18 (5.56%) *L. lunarius* from the Gulf of Siam conferred mouse lethality. Liver extract of 1 of 107 (0.93%) *L. spadicius* collected from the Gulf of Siam killed the injected mice. Thus the incidence of puffer fish that contained pTTX from the Gulf of Siam was 2 of 125 (1.6%). All (100%) of the fish from Andaman seas, *i.e.,* 28 of 28 *T. nigroviridis* and 2 of 2 *A. reticularis*, were found to harbor the pTTX and caused death of all of the injected mice.

The pTTX in various organs/tissues of the fish was quantified into mouse lethal units per gram of the organ/tissue. One mouse lethal unit (1 MU) was the smallest amount of the toxin that caused death of the i.p. injected ~ 20 g mouse within 30 minutes. For the only one *L. lunarius* from the Gulf of Siam that contained pTTX, the highest amount of the pTTX was found in the reproductive tissue (23.12 MU/g) while the liver contained 4.16 MU/g, the digestive tissue contained 2.46 MU/g and the muscles contained 2.24 MU/g. There was pTTX only in liver of the *L. spadicius* (4.0 MU/g). For the *T. nigroviridis* from Andaman seas, it was found that the liver, the reproductive tissue, the digestive tissue and the muscles contained pTTX (average), in falling amounts: 66.88, 64.70, 21.64 and 13.74 MU/g, respectively. For the *A. reticularis*, no pTTX was found in the reproductive tissue but was found in low amounts, *i.e.,* 4.0, 3.16 and 2.0 MU/g in muscles, gastrointestinal tissue and liver, respectively. The small amounts of pTTX in the *A. reticularis* might be due to the fact that the fish were too small as they were probably young fish as their reproductive tissues were not fully developed; thus they accumulated only small amounts of TTX in tissues other than the reproductive tissue.

The pTTX from puffer fish was subjected to HPLC and mass spectrometry in comparison with a standard TTX (sTTX) purchased from Sigma Chemical Co. and American Radiolabeled Company (ARC), MO, USA. It was found that both sTTx and pTTX showed identically the presence of TTX with m/z 319.75 and m/z 319.10, which were detected readily at about 12 minutes after injecting the sTTX and the pTTX into the HPLC columns. Moreover the sTTX also contained TTX analogs with m/z 304 (5- and/or 11-deoxy-TTX), m/z 302 (anhydro-TTX and/or 6-epianhydro-TTX) and m/z 284 (4-epi-TTX). The pTTX not only also cotained TTX analogs with m/z 304 (5- and/or 11-deoxy-TTX), m/z 302 (anhydro-TTX and/or 6-epianhydro-TTX) and m/z 284 (4-epi-TTX) as those of the sTTX but extracts of some toxic puffers contained additionally m/z 288 (6,11-dideoxy-TTX) and m/z 270 (trideoxy-TTX which have lost $2H^+$

atoms). Overall results indicated that pTTX from pufferfish of the Thailand seas contained identical TTX and analogs to the commercialized sTTX with additional TTX fragmented analogs.

The sTTx and pTTX were used as antigens in phage bio-panning for selecting phage clones that display human single chain antibody fragments (HuScFv) on the phage surface. The phages that bound to the bio-panning antigens were introduced into a non-suppressor *E. coli* that could express soluble HuScFv. The HuScFv from individual *huscfv*-phagemid transformed *E. coli* were tested for specific binding to both sTTX and pTTX by indirect ELISA. Two and 9 transformed *E. coli* clones derived from phage bio-panning using sTTX and pTTX as the panning antigens, respectively, were obtained. They were designated clones s16 and s35 from bio-panning with the sTTX and clones p1, p2, p4, p5, p6, p8, p9, p11 and p12 from bio-panning with the pTTX.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the *huscfv* sequences coding for HuScFv of the selected 11 transformed *E. coli* clones were studied using *Mva*I restriction endonuclease. It was found that the 11 clones revealed 8 different DNA banding patterns of the *huscfv* sequences which were designated patterns A-H. The clone s16 had pattern A; clones s35 and p11 had similarly pattern B; clone p1 had pattern C; clones p2 and p8 had similarly pattern D; clone p 4 had pattern E; clone p5 had pattern F; clones p6 and p9 had similarly pattern G; and clone p12 had pattern H. The difference of the *huscfv* banding patterns of the clones might be attributable to the amino acid differences in the immunoglobulin framework sequences (FRs) or in the sequence determining regions (SDRs) of the CDRs. TTX specific-HuScFv derived from different phage clones might bind to different chemical groups of the TTX molecule or they might have different affinity to the target epitope. The nucleotide sequences coding for CDRs and immunoglobulin frameworks and deduced amino acids of the *huscfv* from clones s16 and s35 have been determined.

Because large amount of HuScFv was needed in the neutralization assay, thus *huscfv* from each of the interesting transformed *E. coli* clone was produced by subcloning the *huscfv* into pET23b^{+} plasmid and the recombinant plasmid was introduced into competent BL21 (DE3) *E. coli.* The recombinant plasmid-transformed *E. coli* was induced to express HuScFv which was then purified by using Ni-NTA column and various concentrations of imidazole solutions.

The purified HuScFv of clones s16 and s35 were tested in a cell based TTX neutralization assay using *ex vivo* neuro-2a cell culture. It was found that human ScFv of clone s16 and clone s35 at 2.5 μg could neutralize 95.19 and 67.08% of 200 nM of pTTX, respectively.

When the HuScFv of clone s16 (60 μg) was mixed with 1.5 MU or 0.3 μg of pTTX (antibody : pTTX = 2.32 : 1) before injecting intraperitoneally into mice, the HuScFv of s16 could delay the death time from 8.02 ± 0.08 minutes of the mice that did not receive the s16 HuScFv to 13.95 ± 1.49 minutes in mice that received the antibody ($p < 0.0001$). Similarly, HuScFv of clone s35 (100 μg) which was mixed with 200 nM pTTX (antibody : pTTX = 5.42 : 1) and injected intraperitoneally to mice could delay the death time from 19.19 ± 1.84 minutes of mice which did not received the antibody to 24.35 ± 2.82 minutes of mice that received HuScFv s35 treated-pTTX ($p = 0.028$).

Experimental mice could tolerate more than 10 MU of oral pTTX.

Mice injected intraperitoneally with 1 MU of pTTX followed 2 minutes later by intraperitoneal administration of 300 μg of HuScFv of clone s16 in 900 ml PBS had a delayed death time by 13 minutes compared to mice that did not receive the antibody.

Mice injected intraperitoneally with 0.9 MU (0.18 μg) of pTTX followed by injecting intraperitoneally with 96.83 μg of s16 HuScFv (molecular ratio of s16 HuScFv : TTX 6.20 : 1) in 900 μl PBS survived the intoxication while control mice that received only PBS were all dead at 44.17 ± 9.89 minutes after the TTX injection.

In conclusion, human ScFv that binds specifically to tetrodotoxin has been produced successfully by using the previously constructed human antibody phage display library. The ScFv neutralizes tetrodotoxin and analogs in cell based-assay and in TTX intoxicated mice.

Project Output

1. Patent application entitled: Human single chain antibody fragments that neutralize toxicity of tetrodotoxin
2. Manuscript submitted for publication in TOXICON entitled: A revisit to toxin marine puffer fish in Thailand seas and their indigenous tetrodotoxin and analogs
3. Manuscript in preparation entitled: Human ScFv that blocks sodium ion channel activity of tetrodotoxin
4. Two graduate students participated the research activity of this project, namely
    - Miss Monrat Chulanetra, Ph. D. Program in Immunology, International course, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University. Monrat is a Royal Golden Jubilee Ph. D. Scholar of the Thailand Research Fund (TRF).
    - Miss Thitiya Summatate, M. Sc. Program in Immunology, International course, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

คำสำคัญ (Key words)

Affinity chromatography, anti-E tag, affinity resin, antibody, antidote, bio-panning, BL21 (DE23) *E. coli*, bovine serum albumin (BSA), cell based-assay, DEAE Sepharose, enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA), *Escherichia coli* (*E. coli*), E-tag, HB2151 *E. coli*, high performance liquid chromatography, HPLC, human antibody phage display library, human ScFv, *huscfv*, ion exchange chromatography, keyhole limpet hemocyanin (KLH), mouse bioassay, mouse lethal unit, Neuro-2a, pET23b^{+}, phage bio-panning, phagmid, phage rescue, phage transfection, puffer fish, *scfv*, single chain antibody, sodium ion channel, subtractive bio-panning, tetrodotoxin (TTX), therapeutic antibody, tetrodotoxin analog, TTX-neutralizing antibody, Western blotting, 6x His-tag

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้าที่
ส่วน ก	1
โครงการวิจัยเรื่อง	1
คณะผู้วิจัย	1
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)	2
ส่วน ข	3
บทที่ 1 บทคัดย่อ (Abstract)	3
คำสำคัญ (Key words)	12
สารบัญตาราง (List of Tables)	17
สารบัญภาพ (List of Illustrations)	18
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (List of Symbols and Abbreviations)	21
บทที่ 2 บทนำ	23
บทที่ 3 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	27
1. สารพิษจากทะเล (marine toxins) และการได้รับพิษจากอาหารทะเล (marine intoxication)	27
2. สารพิษ Tetrodotoxin (TTX)	27
3. Therapeutic antibodies	30
บทที่ 4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยฯ	36
บทที่ 5 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	37
กิจกรรมการวิจัยของส่วนที่หนึ่ง: การผลิตโมเลกุล HuScFv ที่จำเพาะต่อ Tetrodotoxin	38
กิจกรรมข้อที่หนึ่ง: การเตรียม Tetrodotoxin (TTX) จากปลาปักเป้า เพื่อใช้ในการคัดเลือกฟาจที่มีความเฉพาะต่อ tetrodotoxin	38
กิจกรรมข้อที่สอง: การตรวจความปนพิษ ของ Tetrodotoxin ที่สกัดได้ด้วยวิธี Mouse bio-assay และศึกษามวลโมเลกุลด้วย HPLC	40
2.1 การศึกษาการกระจายของ TTX ในอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้า	40
2.2 การศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างโมเลกุลของ TTX มาตรฐาน (sTTX) และ TTX ที่สกัดจากปลาปักเป้าจากทะเลไทย (pTTX) ด้วยวิธี HPLC และ LC-MS/MS	40

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 25 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247521
เลขเรียกหนังสือ

	หน้าที่
กิจกรรมข้อที่สาม: การคัดเลือกฟาจที่จำเพาะต่อ TTX และการเพิ่มปริมาณการผลิตฟาจ	43
3.1 การเตรียม Human antibody phage display library	43
3.2 การใช้ sTTX เป็นแอนติเจนใน bio-panning	43
3.3 การใช้ TTX ที่สกัดได้จากปลาปักเป้าที่จับจากทะเลไทย (pTTX) เป็นแอนติเจนใน bio-panning	48
3.4 ศึกษา Restriction fragment length polymporphism (RFLP) ของ DNA sequences ที่เป็นรหัสของแอนติบอดีของมนุษย์ (*huscfv*) เพื่อดูความหลากหลายของแอนติบอดี	51
กิจกรรมข้อที่สี่: การผลิตและเตรียมโมเลกุล HuScFv ที่จับจำเพาะกับ tetrodotoxin ให้บริสุทธิ์จาก *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* แต่ละ clones	52
4.1 การย้าย *huscfv* จาก phagemid เข้าสู่ pET23b^{+} และ transformed เข้าสู่ BL21 (DE23) *E. coli*	52
4.2 การ purify HuScFv โดยใช้ Ni-NTA resin ใน denaturing condition	52
กิจกรรมการวิจัยของส่วนที่สอง:	53
การประเมินคุณสมบัติของ HuScFv จาก phagemid transformed *E. coli* ในการลบล้างพิษของ tetrodotoxin	
กิจกรรมข้อที่ห้า: การทดสอบคุณสมบัติและความสามารถของ HuScFv จาก phagemid-transformed *E. coli* ในการลบล้างความเป็นพิษ ของ TTX	53
5.1 ความสามารถของ HuScFv จาก transformed *E. coli* ในการลบล้างความเป็นพิษของ TTX จากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell based assay)	53
5.2 ความสามารถของ HuScFv จาก *huscfv*-phagemid transformed *E. coli* ในการลบล้างความเป็นพิษของ TTX จากการทดสอบในหนูทดลอง (HuScFv mediated-TTX neutralization in mice)	56
บทที่ 6 ผลการวิจัย (Results) และบทที่ 7 อภิปรายและวิจารณ์ผล (Discussion)	58
ผลของกิจกรรมการวิจัยส่วนที่หนึ่ง: การผลิตโมเลกุล HuScFv ที่จำเพาะต่อ Tetrodotoxin	58

	หน้าที่
ผลการวิจัยของกิจกรรมการวิจัยข้อที่หนึ่ง:	58
การเตรียม Tetrodotoxin (TTX) จากปลาปักเป้า เพื่อใช้ในการคัดเลือกฟาจที่มีความเฉพาะต่อ tetrodotoxin	
1.1 ตัวอย่างปลาปักเป้า	58
1.2 การสกัดเอาสารพิษ Tetrodotoxin (TTX) จากอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้า	68
ผลการวิจัยของกิจกรรมข้อที่สอง:	68
การตรวจความเป็นพิษของสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าแต่ละตัว	
2.1 การตรวจความเป็นพิษของสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าแต่ละตัว โดยวิธี Mouse bioassay	68
2.2 การตรวจหาสารพิษ TTX ในสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าแต่ละตัว (pTTX) โดยวิธี HPLC และ LC-MS/MS เปรียบเทียบกับสารพิษ tetrodotoxin มาตรฐาน (sTTX)	74
ผลการวิจัยของกิจกรรมการวิจัยข้อที่สาม:	87
การทำ Phage bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ใน human antibody phage display library ที่ display HuScFv ที่มีความเฉพาะต่อ TTX	
3.1 ผลการทำ Bio-panning โดยใช้ sTTX-KLH เป็น panning antigen	87
3.2 ผลการการตรวจหา *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* ที่สามารถสร้าง HuScFv ได้	91
3.3 การตรวจความสามารถของ HuScFv ที่ expressed จาก *huscfv*-positive *E. coli* clones ในการจับกับ sTTX ด้วยวิธี indirect ELISA	93
3.4 ผลการใช้ TTX ที่สกัดได้จากปลาปักเป้าที่จับจากทะเลไทย (pTTX) เป็นแอนติเจนใน bio-panning	100
3.5 การตรวจสอบ restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ DNA sequences ที่เป็นรหัสแอนติบอดีของมนุษย์ (*huscfv*) เพื่อดูความหลากหลายของแอนติบอดี	105
3.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และและลำดับกรดอะมิโนของโคลน s16 และ s35	105

หน้าที่

ผลการวิจัยของกิจกรรมข้อที่สี่: 108

การผลิตและเตรียมโมเลกุล HuScFv ที่จับจำเพาะกับ TTX ให้บริสุทธิ์จาก *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* clones ที่สนใจ

4.1 ผลการ purified HuScFv จาก pET23b^{+} transformed BL21 (DE3) *E. coli* ด้วย Ni-NTA affinity resin 108

ผลการวิจัยของกิจกรรมการวิจัยของส่วนที่สอง: 112

การประเมินคุณสมบัติของ HuScFv จาก phagemid transformed *E. coli* ในการลบล้างพิษของ tetrodotoxin

ผลของกิจกรรมข้อที่ห้า: 112

การทดสอบคุณสมบัติและความสามารถของ HuScFv จาก phagemid-transformed *E. coli* ในการลบล้างความเป็นพิษของ TTX

5.1 ความสามารถของ HuScFv จาก transformed *E. coli* ในการลบล้างความเป็นพิษของ TTX จากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell based assay) 112

5.2 ความสามารถของ HuScFv จาก *E. coli* clone ในการลบล้างความเป็นพิษของ TTX จากการทดสอบในหนูทดลอง 115

บทที่ 8 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 116

บทที่ 9 บรรณานุกรม 120

บทที่ 10 ภาคผนวก 126

ส่วน ค ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย 146

สารบัญตาราง (List of Tables)

		หน้าที่
ตารางที่ 1:	จำนวน และ Scientific names ของปลาปักเป้า แยกตามชื่อทะเล และจังหวัดที่คณะผู้วิจัยไปซื้อมาได้	59
ตารางที่ 2:	แสดงจำนวนของปลาปักเป้าที่มีพิษต่อหนูทดลอง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ของจำนวนปลาที่จับได้จากทะเลไทยที่นำมาทดสอบ	69
ตารางที่ 3.1:	แสดงปริมาณของสารพิษ TTX ที่สกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของ ปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) ที่จับมาได้จากอ่าวไทย	71
ตารางที่ 3.2:	แสดงปริมาณของสารพิษที่สกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลา ปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) ที่จับมาจากทะเลอันดามัน	72
ตารางที่ 3.3:	แสดงปริมาณของสารพิษที่สกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลา ปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) ที่จับจากทะเลอันดามัน	73
ตารางที่ 4:	Authentic TTX and analogs in standard TTX and livers of the puffer species in this study	86

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

		หน้าที่
Diagram 1:	แสดงขั้นตอนการสกัด Tetrodotoxin (TTX) จากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้า	35
รูปที่ 1:	ตัวอย่างปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) จากจังหวัดสมุทรสาคร	60
รูปที่ 2:	ตัวอย่างปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) จากจังหวัดระยอง	61
รูปที่ 3:	ตัวอย่างปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*Lagocephalus spadiceus*) จากจังหวัดสมุทรสาคร	62
รูปที่ 4:	ตัวอย่างปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*Lagocephalus spadiceus*) จากจังหวัดระยอง	63
รูปที่ 5:	ตัวอย่างปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) จากจังหวัดสตูล	64
รูปที่ 6:	ตัวอย่างปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) จากจังหวัดสตูล	65
รูปที่ 7:	ปลาปักเป้า species ต่างๆ ที่มีในประเทศไทยและเคยมีรายงานว่ามีพิษ	66
รูปที่ 8:	ผลการวิเคราะห์ Standard tetrodotoxin ด้วย LC-MS/MS	75
รูปที่ 9:	แสดง Structures ของ tetrodotoxin และ some analogs ที่มักอยู่ด้วยกันเป็น mixture ใน puffer-fish	76
รูปที่ 10:	Chemical structure of tetrodotoxin (TTX) and its analogs	77
รูปที่ 11:	ผลการวิเคราะห์ Standard tetrodotoxin (A) และสารพิษที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลาปักเป้า (B)	79
รูปที่ 12:	Fragmentation ion profile ของ 6,11-dideoxytetrodotoxin จากการวิเคราะห์สารพิษที่สกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าหลังเขียว (*L. lunaris*) ที่จับจากอ่าวไทยด้วย HPLC	81
รูปที่ 13:	ผลการวิเคราะห์สารพิษที่สกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*L. spadiceus*) ที่จับจากอ่าวไทยด้วย HPLC	83
รูปที่ 14:	ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigrovildis*) ที่จับจากทะเลอันดามันด้วย HPLC	84
รูปที่ 15:	ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) ที่จับจากทะเลอันดามันด้วย HPLC	85
รูปที่ 16:	โครงสร้างโมเลกุลของ Tetrodotoxin มาตรฐาน (sTTX)	88

หน้าที่

รูปที่ 17: PCR products ของ *huscfv* ที่ amplified จาก representative phagemid-transformed HB2151 *E. coli* colonies 90

รูปที่ 18: ผลของ Western blot analysis เพื่อตรวจหา HuScFv ใน lysates จากตัวแทน *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* clones 92

รูปที่ 19: ผลของ Polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อแสดง protein bands ของ sTTX-BSA และ BSA-BSA conjugates เทียบกับ non-conjugated proteins 94

รูปที่ 20: แสดงรูปการวิเคราะห์ TTX-BSA conjugate โดย non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ในการศึกษาของ Zhou *et al.* (2009) 95

รูปที่ 21: ผลของ ELISA แสดงค่า optical density (OD) ที่ A_{405nm} เพื่อแสดงการจับของ HuScFv จาก *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* กับ sTTX-BSA conjugate เปรียบเทียบกับ HuScFv จาก clone เดียวกันที่จับกับ BSA-BSA conjugate 97

รูปที่ 22: แสดงผลของ Indirect ELISA ของ HuScFv (purified ด้วย DEAE Sepharose resin) จากตัวแทน *huscfv*-phagemid transformed *E. coli* clone no. s35 ในการจับกับ sTTX 99

รูปที่ 23: PCR products ของ *huscfv* ที่ amplified จาก phagemid-transformed-HB2151 *E. coli* colonies จำนวน 15 colonies ที่ได้มาจาก bio-panning กับ pTTX 102

รูปที่ 24: ผลของ ELISA แสดงค่า optical density (OD) ที่ A_{450nm} เพื่อแสดงการจับของ HuScFv จาก *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* 104

รูปที่ 25: แสดง Restriction fragment length polymorphism ของ *huscfv* sequences จาก *E. coli* clones no. s16, s35, p1, p2, p4, p5, p6, p8, p9, p11 และ p12 106

รูปที่ 26: Nucleotide and deduced amino acid sequences of clones s16 and s35 107

รูปที่ 27: ผลของ Western blot analysis เพื่อตรวจหา HuScFv ใน fractions ต่างๆ ที่ได้จากการ purify HuScFv จาก lysate ของ *huscfv*-pET23b^{+} vector transformed *E. coli* clone ด้วย Ni-NTA affinity resin โดยใช้ mouse anti-6xHis monoclonal antibody เป็น detection reagent 109

รูปที่ 28: แสดง HuScFv ใน fractions ต่างๆ ที่ eluted ออกมาจาก Ni-NTA affinity resin ด้วย various concentrations of imidazole ใน SDS-PAGE ที่ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 dye 110

หน้าที่

รูปที่ 29: ผล Western blot analysis เพื่อตรวจหา HuScFv ก่อนและหลังการ refolding 111

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (List of Symbols and Abbreviations)

สัญลักษณ์/คำย่อ	Term
$^{\circ}C$	Degree (s) Celsius
$\times g$	Specific gravity of centrifugation force
µg	Microgram (s)
µl	Microliter (s)
A	Absorbance
Å	Angstrom (s)
Ab	Antibody (-ies)
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid)
AP	Alkaline phosphatase
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium
bp	Base pairs
BSA	Bovine serum albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue (dye/stain)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CDR (s)	Complementarity determining region (s) of immunoglobulin molecule
CL	Constant domain of light chain
CH1	Constant domain-1 of heavy chain
CH2	Constant domain-2 of heavy chain
CH3	Constant domain-3 of heavy chain
CH4	Constant domain-4 of heavy chain
DNA	Deoxyribonucleic acid
E. coli	*Escherichia coli*
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FR (s)	Immunoglobulin framework (s)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สัญลักษณ์/คำย่อ	Term
H	Heavy chain
huscfv/HuScFv	Human single chain antibody (gene/protein)
Ig	Immunoglobulin (s)
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
L	Light chain
LB-AG	Luria-Bertani-Ampicillin-Glucose
M	Molar (s)
LD50	Lethal dose-50
MAb	Monoclonal antibody (-ies)
min	Minute (s)
ml	Milliliter (s)
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MU	Mouse lethal unit (s)
m/z	Mass to charge ratio
NC	Nitrocellulose membrane
PAb	Polyclonal antibody (-ies)
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
scfv/ScFv	Single chain antibody (gene/protein)
SDRs	Sequence determining region (s)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis
SOE-PCR	Splice overlapped extension PCR
TTX	Tetrodotoxin
VH	Variable heavy chain domain
VL	Variable light chain domain
v/v	Volume by volume
w/v	Weight by volume