



บทที่ 6 ผลการวิจัย (Results)

และ

บทที่ 7 อภิปรายและวิจารณ์ผล (Discussion)

1. ผลการขอรับการรับรองการทำวิจัยในสัตว์

ได้ทำแบบฟอร์มเพื่อขอรับการรับรองการใช้สัตว์ในงานวิจัย (เอกสารหมายเลข 1) และได้รับการรับรองการทำวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล การรับรองเลขที่ 009/2553 เอกสารแนบหมายเลข 2

2. ได้จัดหาและจัดซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ สารเคมี และอุปกรณ์ และติดต่อประสานงานสำหรับกิจกรรมการวิจัย แล้ว

ผลของกิจกรรมการวิจัยส่วนที่หนึ่ง: การผลิตโมเลกุล HuScFv ที่จำเพาะต่อ Tetrodotoxin

ผลการวิจัยของกิจกรรมการวิจัยข้อที่หนึ่ง:

การเตรียม Tetrodotoxin (TTX) จากปลาปักเป้าเพื่อใช้ในการคัดเลือกฟาจที่มี ความเฉพาะ ต่อ tetrodotoxin

1.1 ตัวอย่างปลาปักเป้า

คณะผู้วิจัยได้ติดต่อซื้อปลาปักเป้าทั้งหมด 6 ครั้ง ในระหว่างเดือนเมษายน – กันยายน พ.ศ. 2552 (เริ่มดำเนินการก่อนได้รับอนุมัติทุนวิจัยและเงินอุดหนุนฯ) คือปลาปักเป้าจากอ่าวไทย ได้แก่ จากสะพานปลาจังหวัดชลบุรี 21 ตัว จากสะพานปลาจังหวัดระยอง 55 ตัว และจากสะพานปลา จังหวัดสมุทรสาคร 49 ตัว และจากทะเลอันดามัน ได้แก่ จากสะพานปลาจังหวัดสตูล 30 ตัว รวมมีตัวอย่าง ปลาปักเป้าทั้งหมด 155 ตัว (ตารางที่ 1) ในปลาปักเป้า 155 ตัวนี้ สามารถจำแนก สปีชีส์เป็น 4 สปีชีส์ คือ

ปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) จำนวน 18 ตัว (จากจังหวัดชลบุรี จำนวน 2 ตัว จากจังหวัดระยอง จำนวน 11 ตัว และจากจังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 5 ตัว)

ปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*Lagocephalus spadiceus*) จำนวน 107 ตัว (จากจังหวัดชลบุรี จำนวน 19 ตัว จากจังหวัดระยอง จำนวน 44 ตัว และจากจังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 44 ตัว)

ปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) จากจังหวัดสตูล จำนวน 28 ตัว และ

ปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) จากจังหวัดสตูล จำนวน 2 ตัว เป็นที่สังเกต ชัดเจนว่าปลาปักเป้าลายร่างแห สองตัวนี้มีขนาดเล็กมาก น่าจะยังไม่ใช่ปลาที่โตเต็มที่

ตารางที่ 1: จำนวน และ Scientific names ของปลาปักเป้า แยกตามชื่อทะเลและจังหวัดที่คณะผู้วิจัยไปซื้อมาได้

ชื่อทะเล	จังหวัด	จำนวนปลา แยกตาม Scientific names (ชื่อไทย)				รวม (ตัว)
		<i>Lagocephalus lunaris</i> (ปลาปักเป้า หลังเขียว)	<i>Lagocephalus spadiceus</i> (ปลาปักเป้า หลังน้ำตาล)	<i>Tetraodon nigroviridis</i> (ปลาปักเป้า เขียวจุด)	<i>Arothron reticularis</i> (ปลาปักเป้า ลายร่างแห)	
อ่าวไทย	ชลบุรี	2	19	-	-	21
	ระยอง	11	44	-	-	55
	สมุทรสาคร	5	44	-	-	49
อันดามัน	สตูล	-	-	28	2*	30
รวม (ตัว)		18	107	28	2	155

* คณะผู้วิจัยพยายามจัดหาปลา *Arothron reticularis* เพิ่ม แต่ได้รับแจ้งจากชาวประมงว่าหายากและจับไม่ได้อีกเลย แสดงว่าปลาปักเป้าสายพันธุ์นี้มีน้อยในทะเลอันดามัน

รูปที่ 1-6 แสดงลักษณะปลาปักเป้า species ต่างๆ ที่จัดหามาสำหรับงานวิจัยนี้ ส่วนปลาปักเป้า species ต่างๆ ในประเทศไทยที่เคยมีรายงานว่ามิพิษได้แสดงไว้ใน รูปที่ 7



รูปที่ 1: ตัวอย่างปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) จากจังหวัดสมุทรสาคร



รูปที่ 2: ตัวอย่างปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) จากจังหวัดระยอง



รูปที่ 3: ตัวอย่างปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*Lagocephalus spadiceus*) จากจังหวัดสมุทรสาคร



รูปที่ 4: ตัวอย่างปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*Lagocephalus spadiceus*) จากจังหวัดระยอง



รูปที่ 5: ตัวอย่างปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) จากจังหวัดสตูล



รูปที่ 6: ตัวอย่างปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) จากจังหวัดสตูล



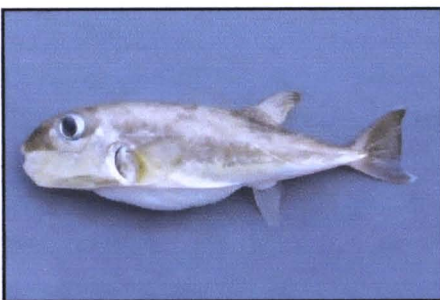
ปลาปักเป้าเหลืองทอง (*Xenopterus naritus*)



ปลาปักเป้าหลังดำ (*Lagocephalus scleratus*)

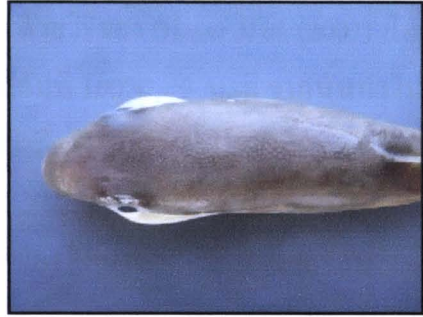


ปลาปักเป้าหลังเรียบ (*Lagocephalus inermis*)

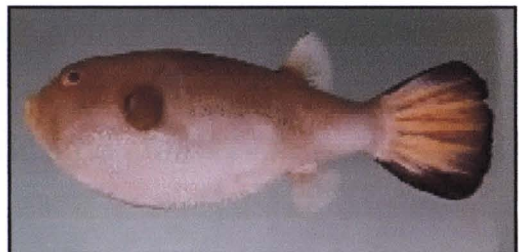
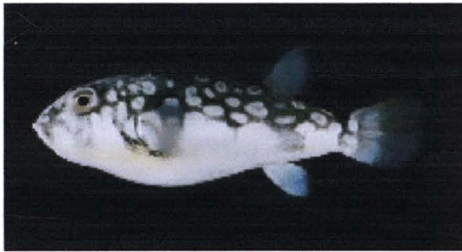


ปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*Lagocephalus spadiceus*)

รูปที่ 7: แสดงลักษณะของปลาปักเป้า species ต่างๆ ที่มีในประเทศไทยและเคยมีรายงานว่ามียพิษ
 ที่มา: โอภาส ชามะสนธิ์ คู่มือจำแนกชนิดและการศึกษาความเป็นพิษของปลาปักเป้า
 ทะเลวงศ์ Tetraodontidae ในน่านน้ำไทย วารสารการประมง ก.ย.-ต.ค. 2550;
 60(5): 430-4. และ www.fishbase.com



ปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*)



ปลาปักเป้าลายหินอ่อน (*Chelonodon patoca*)

ปลาปักเป้าหางไหม้ (*Arothron immaculatus*)

รูปที่ 7 (ต่อ): ปลาปักเป้า species ต่างๆ ที่มีในประเทศไทยและเคยมีรายงานว่ามีพิษ

1.2 การสกัดเอาสารพิษ Tetrodotoxin (TTX) จากอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้า

ชั่งน้ำหนักปลาแต่ละตัว ก่อนนำไปชำแหละเพื่อแยกอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ ดับทางเดินอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ กล้ามเนื้อ และหนัง นำแต่ละส่วนไปชั่งน้ำหนัก ตัดอวัยวะ/เนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบด จากนั้นสกัดเอาสารพิษ tetrodotoxin ด้วยวิธีของ Diener *et al.* (2007) โดยผสมเนื้อเยื่อของปลากับ 0.1% acetic acid (w/v) แล้วนำไปต้มที่ 100°C, 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 11,000 × g, 5°C, 10 นาที เก็บส่วนใส ก่อนนำไปทดสอบว่ามีสารพิษหรือไม่โดยวิธี mouse bioassay (Diener *et al.*, 2007)

หมายเหตุ ไม่สามารถสกัดสารพิษ TTX จากหนังปลาได้เพราะเมื่อโดนความร้อน หนังปลาเปลี่ยนสภาพเป็นสารคล้ายเจลาติน

ผลการวิจัยของกิจกรรมข้อที่สอง:

การตรวจความเป็นพิษของสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าแต่ละตัว

2.1 การตรวจความเป็นพิษของสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าแต่ละตัว โดยวิธี

mouse bioassay (Diener *et al.*, 2007)

ได้วิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดจากปลาปักเป้าที่เตรียมได้จากกิจกรรมการวิจัยข้อที่หนึ่งในหนูไมซ์ สายพันธุ์ไอซีอาร์ (ICR mice) ซึ่งเป็น outbred mice เพศผู้ น้ำหนัก ~20 กรัม อายุ 3-4 สัปดาห์ ที่ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม โดยฉีดสารสกัดจากปลาปักเป้าแต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 ml เข้าช่องท้องของหนูไมซ์แต่ละตัว จากนั้นสังเกตอาการของการได้รับพิษ (lethal potency) จากอวัยวะ/เนื้อเยื่อจากแต่ละตัวอย่าง

อาการของหนูไมซ์ที่ได้รับพิษจากปลาปักเป้า มีดังนี้

เริ่มใช้ขาหลังถูบริเวณไหล่หรือปาก เดินลำบาก ขาลาก อ่อนแรง หายใจหอบถี่ ตกใจง่าย กระโดดและชักกระตุก หมดความรู้สึก และตายในที่สุด

ซึ่งจากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าเพียงบางตัวเท่านั้นที่ทำให้หนูทดลองตาย และสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าบางตัวไม่ทำให้หนูทดลองเกิดอาการเจ็บป่วยใดๆ ซึ่งจากการทดสอบทำให้ทราบว่าปลาตัวใด species ใด อวัยวะ/เนื้อเยื่อใด มีพิษหรือไม่ และถ้ามี มีมากน้อยเพียงใดอย่างคร่าวๆ จากนั้นนำสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อที่มีสารพิษไปทดสอบเพื่อหาจำนวน mouse lethal units (MU) ตามวิธีของ Diener *et al.* (2007)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนของปลาปักเป้าที่มีพิษต่อหนูทดลอง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนปลาปักเป้าที่นำมาทดสอบ (เปอร์เซ็นต์ความชุกของปลาปักเป้าที่มีพิษที่จับจากทะเลของประเทศ ไทย)

ตารางที่ 2: แสดงจำนวนของปลาปักเป้าที่มีพิษต่อหนูทดลอง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนปลาที่จับได้จากทะเลไทยที่นำมาทดสอบ

ทะเลที่จับ ปลาปักเป้า	จังหวัด	% (จำนวนปลาแต่ละสปีชีส์ที่มีพิษ / จำนวนปลาที่ทดสอบ)				% (จำนวนปลาที่มีพิษทั้งหมด / จำนวนปลาที่ทดสอบทั้งหมด)
		<i>Lagocephalus lunaris</i> (ปลาปักเป้าหลังเขียว)	<i>Lagocephalus spadiceus</i> (ปลาปักเป้าหลังน้ำตาล)	<i>Tetraodon lineatus</i> (ปลาปักเป้าเขียวจุด)	<i>Arothron reticularis</i> (ปลาปักเป้าลายร่างแห)	
อ่าวไทย	ชลบุรี	0 (0/2)	0% (0/19)	-	-	0 (0/21)
	ระยอง	0 (0/11)	0% (0/44)	-	-	0 (0/55)
	สมุทรสาคร	20 (1/5)	2.27% (1*/44)	-	-	4.08 (2/49)
อันดามัน	สตูล	-	-	100% (28/28)	100% (2/2) **	100 (30/30)
รวม		5.56 (1/18)	0.93 (1/107)	100 (28/28)	100 (2/2)	20.65 (32/155)

* พบว่ามีพิษเฉพาะสารที่สกัดจากตับ ส่วนสารที่สกัดจากอวัยวะอื่นๆ ไม่พบความเป็นพิษจากการทดสอบด้วยวิธี mouse bioassay

** ไม่พบพิษในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์

จะเห็นได้ว่าอัตราที่ปลาปักเป้าจากอ่าวไทยมี TTX นั้นน้อยมาก คือปลาปักเป้าหลังเขียวที่มีทั้งหมด 18 ตัว มีเพียงตัวเดียว (5.56%) ที่มีพิษ และปลาปักเป้าหลังน้ำตาลจำนวน 107 ตัว ก็พบว่ามีพิษเพียงตัวเดียว (0.93%) และพบพิษเฉพาะในระดับเท่านั้น ในขณะที่ปลาปักเป้าที่จับมาจากทะเลอันดามันทุกตัว (100%) มีสารพิษ คือปลาปักเป้าเขียวจุดทั้งหมด 28 ตัว และปลาปักเป้าลายร่างแห 2 ตัว บ่งชี้ว่าแบคทีเรียและสาหร่ายที่ปลาปักเป้าในทะเลอันดามันกินมีการผลิตและสะสมสารพิษเอาไว้มาก

ตารางที่ 3.1-3.3 แสดงตัวอย่างของความเป็นพิษจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าที่จับจากอ่าวไทยและทะเลอันดามัน โดยคำนวณปริมาณ TTX ในแต่ละตัวอย่างเป็น mouse lethal unit (MU) คือน้ำหนักเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม โดย 1 MU คือปริมาณสารพิษที่ทำให้หนูทดลองตายภายในเวลา 30 นาทีหลังฉีดสารพิษเข้าช่องท้อง จะเห็นว่าสารพิษในสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อที่ต่างกัน ปลาปักเป้าตัวเดียวกันมีปริมาณพิษไม่เท่ากันแม้จะสกัดมาจากการใช้อัตราส่วนของอวัยวะ/เนื้อเยื่อ: 0.1% acetic acid (w/v) เท่ากันและฉีดในปริมาตรที่เท่ากันคือ 0.5 ml

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณของสารพิษที่สกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) ที่จับจากอ่าวไทย และซื้อมาจากสะพานปลาจังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งเป็นตัวเดียวที่มีสารพิษ พบว่าสารสกัดจากอวัยวะสืบพันธุ์มีปริมาณสารพิษมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากตับ กระเพาะอาหารและลำไส้ และกล้ามเนื้อ ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณของสารพิษที่สกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) ที่จับมาจากทะเลอันดามัน และซื้อมาได้จากสะพานปลา จังหวัดสตูล พบว่าในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าเขียวจุดที่จับมาจากทะเลอันดามันมีปริมาณสารพิษมากกว่าในปลาปักเป้าหลังเขียวหลายเท่า โดยมีสารพิษมากที่สุดในตับ ตามมาด้วย อวัยวะสืบพันธุ์ ทางเดินอาหาร และกล้ามเนื้อ ตามลำดับ สำหรับตับของปลาปักเป้าหลังน้ำตาลที่เป็นอวัยวะเดียวจากปลาปักเป้าหลังน้ำตาลตัวเดียวที่มีพิษ ไม่ได้แสดงปริมาณของสารพิษ

ตารางที่ 3.3: แสดงปริมาณของสารพิษที่สกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) ที่จับมาจากทะเลอันดามัน และซื้อมาได้จากสะพานปลา จังหวัดสตูล พบว่าในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าลายร่างแหที่จับมาจากทะเลอันดามันมีปริมาณสารพิษน้อยในทุกเนื้อเยื่อเมื่อเทียบกับปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) ที่จับมาจากทะเลอันดามันและซื้อมาจากสะพานปลาเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะปลาปักเป้าลายร่างแหสองตัวนี้อายุน้อยเพราะตัวเล็กมาก

จากงานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) ที่จับได้มากจากทะเลอันดามันมีอัตราการมีพิษสูงถึงร้อยละร้อย คือปลาปักเป้าเขียวจุดทุกตัวมีพิษ รวมทั้งมีพิษในเนื้อเยื่อต่างๆ ในปริมาณมากด้วย ผู้บริโภคจึงควรหลีกเลี่ยงการบริโภคปลาปักเป้าที่จับมาจากทะเลอันดามัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาปักเป้าเขียวจุด

ตารางที่ 3.1: แสดงปริมาณของสารพิษ TTX ที่สกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) ที่จับมาได้จากอ่าวไทย ซ้อมมาจากสะพานปลา จังหวัดสมุทรสาคร ที่มีเพียงตัวเดียวที่มีพิษและทำให้หนูไมซ์ตาย เมื่อฉีดสารสกัดเข้าช่องท้องของหนูไมซ์ ตัวละ 0.5 ml

ชนิดของอวัยวะ/เนื้อเยื่อ ที่ใช้สกัดเอาสารพิษ	Lethal potency ของสารพิษ Mouse lethal units (MU) per gram of tissue
กล้ามเนื้อ	2.24
ตับ	4.16
กระเพาะอาหารและลำไส้	2.46
อวัยวะสืบพันธุ์	23.12

ตารางที่ 3.2: แสดงปริมาณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารพิษที่สกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) ที่จับมาจากทะเลอันดามัน และซื้อมาได้จากสะพานปลา จังหวัดสตูล จำนวน 5 ตัว เมื่อนิโคตตินสกัดเข้าสู่ช่องท้องของหนูไมซ์ ตัวละ 0.5 ml

ชนิดของอวัยวะ/เนื้อเยื่อ ที่ใช้สกัดเอาสารพิษ	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Lethal potency ของสารพิษ คำนวณเป็น Mouse lethal units (MU) per gram of tissue จากปลาจำนวน 5 ตัว
กล้ามเนื้อ	13.74 ± 8.38
ตับ	51.76 ± 46.08
กระเพาะอาหารและลำไส้	21.64 ± 21.69
อวัยวะสืบพันธุ์	26.75 ± 36.82

ตารางที่ 3.3: แสดงปริมาณของสารพิษที่สกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) ที่จับจากทะเลอันดามัน และซื้อมาได้จากสะพานปลา จังหวัดสตูล (หนึ่งตัวจากสองตัว) เมื่อนิโคตตินสกัดเข้าช่องท้องของหนูแต่ละตัวในปริมาตร 0.5 ml

ชนิดของอวัยวะ/เนื้อเยื่อ ที่ใช้สกัดเอาสารพิษ	Lethal potency ของสารพิษ คำนวณเป็น Mouse lethal units (MU) per gram of tissue
กล้ามเนื้อ	4.02
ตับ	2.08
กระเพาะอาหารและลำไส้	3.16
อวัยวะสืบพันธุ์	ไม่พบความเป็นพิษ

2.2 การตรวจหาสารพิษ TTX ในสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าแต่ละตัว (pTTX) โดยวิธี HPLC และ LC-MS/MS เปรียบเทียบกับสารพิษ tetrodotoxin มาตรฐาน (sTTX)

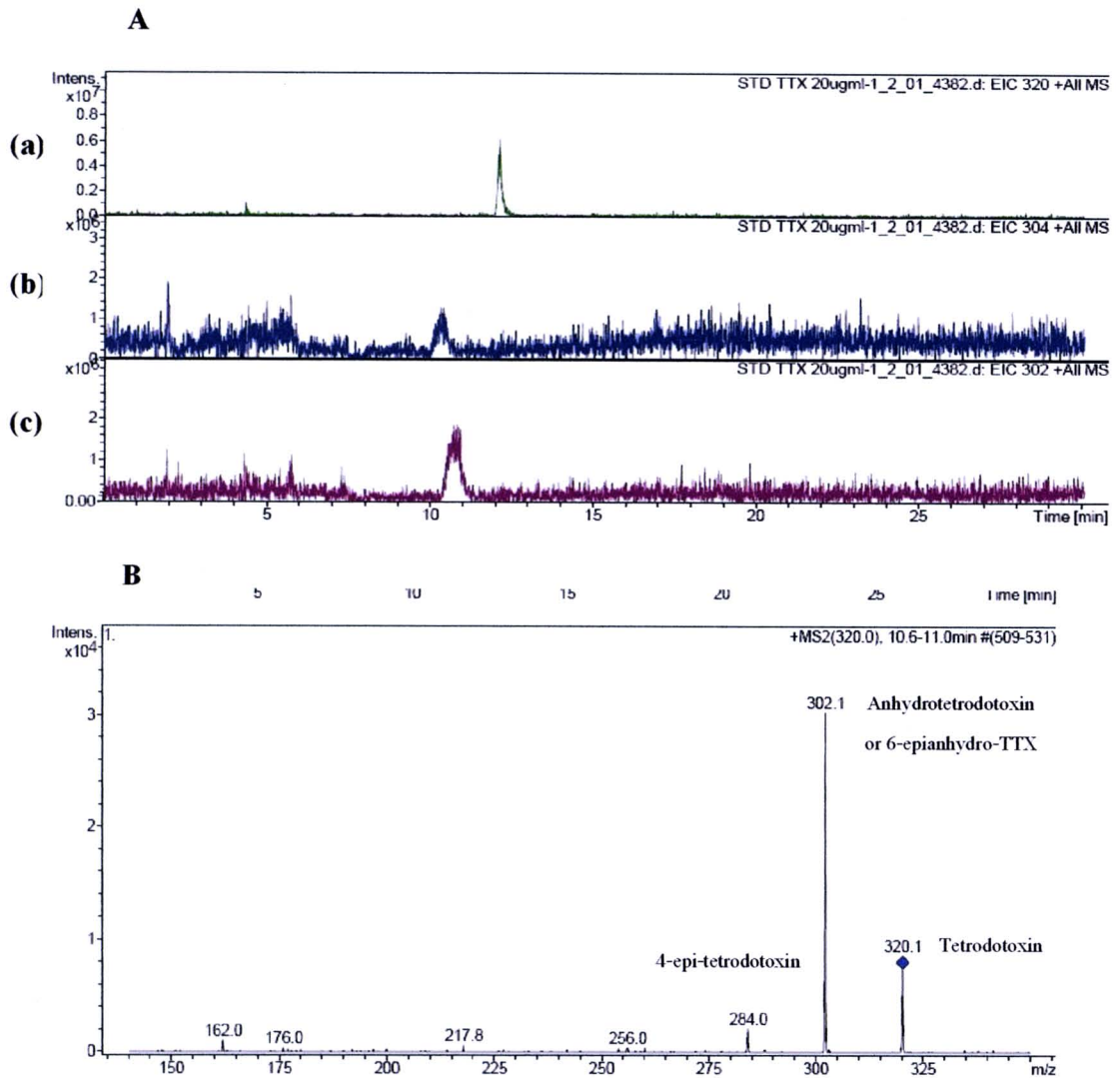
คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบ TTX ที่สกัดจากปลาปักเป้าจากทะเลไทย (pTTX) กับ สารพิษ tetrodotoxin มาตรฐาน (sTTX) ด้วยวิธี HPLC และ LC-MS/MS พบว่าระบบและ condition ดังกล่าวข้างต้นในข้อ 2.2 ของบทที่ 5 สามารถตรวจพบสารพิษ sTTX ได้ดี (รูปที่ 8) กล่าวคือ ในการวิเคราะห์ด้วย SIM (Selected ion monitoring) mode หลังจากฉีด sTTX ผ่าน column แล้ว sTTX ถูก แยกผ่าน column จนเข้าสู่ detector (mass spectrometer) สามารถเห็น peak ของ sTTX (m/z 320) ที่ เวลาประมาณ 12 นาที ดังแสดงใน รูปที่ 8A(a)

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ sTTX ยังพบสารที่มี m/z 304 และ m/z 302 อยู่ใน sTTX ที่ถูก แยกผ่าน column จนเข้าสู่ detector เวลา ~10 และ ~11 นาทีตามลำดับ [รูปที่ 8A(b) และ (c)] ซึ่ง น่าจะเป็น 5- และ/หรือ 11-deoxytetrodotoxin และ anhydrotetrodotoxin และ/หรือ 6-epianhydro-TTX เพราะมี mass spectra ตรงกับ 5- และ/หรือ 11-deoxytetrodotoxin (m/z 304) และ anhydrotetrodotoxin และ/หรือ 6-epianhydro-TTX (m/z 302)

และเมื่อวิเคราะห์ sTTX (m/z 320) ด้วย multiple reaction monitoring (MRM) mode พบว่า sTTX ให้ fragmentation ion profile ดังแสดงใน รูปที่ 8B โดยมี product ion m/z 284 (4-epi-TTX) ในปริมาณน้อยที่สุด m/z 302 (anhydro-TTX หรือ 6-epianhydro-TTX) ในปริมาณสูงที่สุด และ m/z 320 (TTX) ในปริมาณพอสมควร

แสดงว่า TTX มาตรฐานที่ซื้อมาจากบริษัท Sigma Chemical Company, USA มี mixture ของ TTX และ analogs คือ anhydro-TTX และ/หรือ 6-epianhydro-TTX (m/z 302) และ 5-deoxy-TTX และ/หรือ 11-deoxy-TTX (m/z 304) ซึ่งตรงกันกับข้อมูลที่เคยมีมาก่อนว่า TTX มักอยู่ร่วมกับ analogs อื่นๆ ในลักษณะของ mixture (Nakamura and Yasumoto, 1985; Yotsu-Yamashita, 2001) และ TTX แตกตัวเป็น anhydro-TTX (m/z 302) และ 4-epi-TTX (m/z 284) ด้วย ซึ่งเหมือนกับผลการศึกษาของ Horie *et al.* (2002)

โปรดดู chemical structures ของ TTX, 11-deoxy-TTX, anhydro-TTX, 4-epi-TTX และ analogs อื่นๆ ของ TTX ใน รูปที่ 9 และ 10 จากรายงานของ Horie *et al.* (2002) และ Diener *et al.* (2007) ซึ่งพบว่า TTX และ analogs มักอยู่ร่วมกันเป็น mixture ใน puffer fish

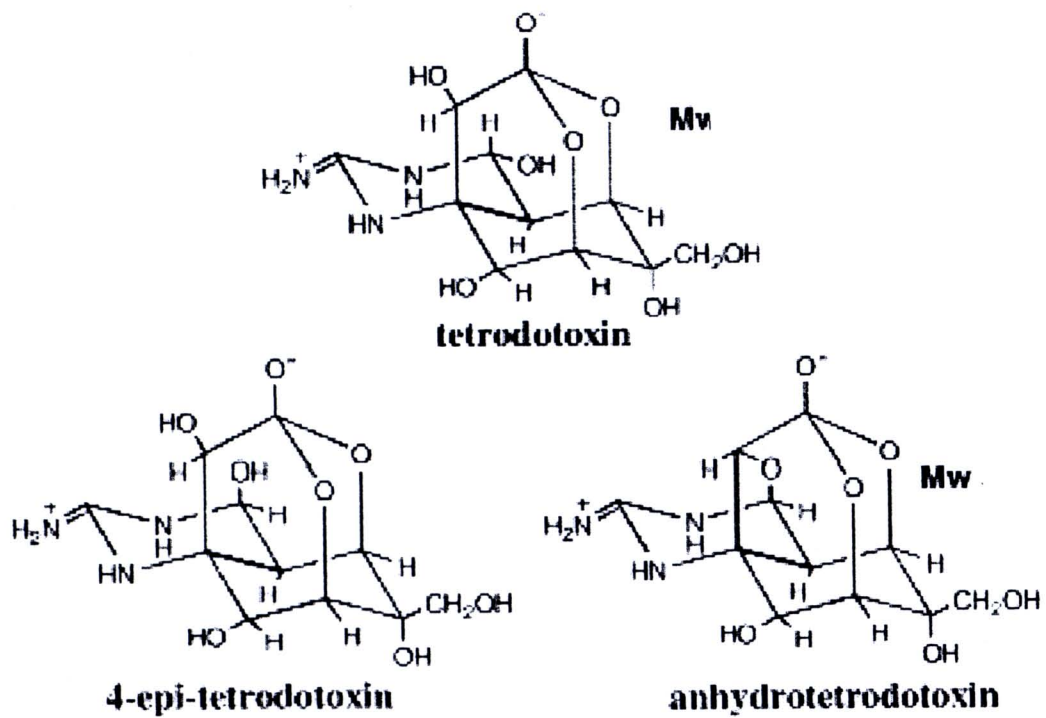


รูปที่ 8: ผลการวิเคราะห์ Standard tetrodotoxin ด้วย LC-MS/MS

(A) การวิเคราะห์ standard tetrodotoxin ด้วย SIM mode

- (a) ผลการตรวจหา tetrodotoxin พบ tetrodotoxin (m/z 320.1) ที่เวลาประมาณ 12 นาที
- (b) พบสารที่มี m/z 304 (5-deoxytetrodotoxin และ/หรือ 11-deoxy-TTX) ที่เวลาประมาณ 10 นาที
- (c) พบสารที่มี m/z 302 (anhydrotetrodotoxin และ/หรือ 6-epianhydro-TTX) ที่เวลาประมาณ 11 นาที

(B) Fragmentation ion profile ของ standard tetrodotoxin (m/z 320) จาก Figure 8A (a) ประกอบด้วย smallest peak at m/z 284 (4-epi-tetrodotoxin), highest peak at m/z 302 (anhydrotetrodotoxin และ/หรือ 6-epianhydro-TTX) และ moderate peak at m/z 320 (tetrodotoxin)

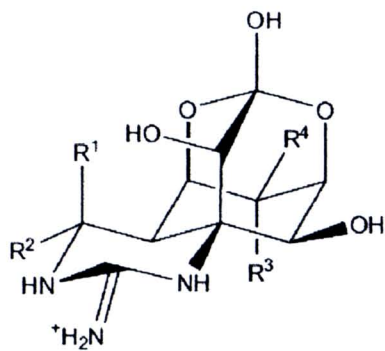


รูปที่ 9: แสดง Structures ของ tetrodotoxin และ some analogs ที่มักอยู่ด้วยกันเป็น mixture ใน puffer fish (Horie *et al.*, 2002)

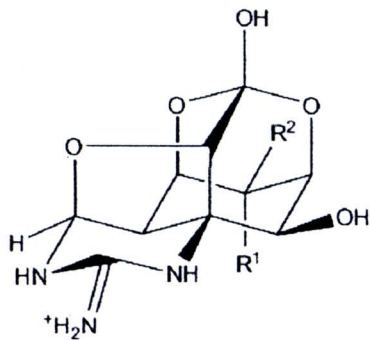
Tetrodotoxin $m/z \sim 320$

Anhydrotetrodotoxin $m/z \sim 302$

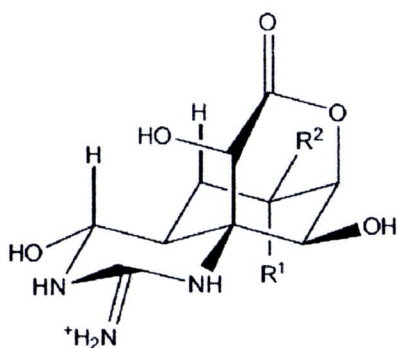
4-epi-tetrodotoxin $m/z \sim 284$



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	[M+H] ⁺
TTX	H	OH	OH	CH ₂ OH	320
4-epiTTX	OH	H	OH	CH ₂ OH	320
6-epiTTX	H	OH	CH ₂ OH	OH	320
11-deoxyTTX	H	OH	OH	CH ₃	304
norTTX-6(S)-ol	H	OH	OH	H	290
norTTX-6(R)-ol	H	OH	H	OH	290
norTTX-6, 6-diol	H	OH	OH	OH	306



	R ¹	R ²	[M+H] ⁺
anhydroTTX	OH	CH ₂ OH	302
6-epianhydroTTX	CH ₂ OH	OH	302



	R ¹	R ²	[M+H] ⁺
5-deoxyTTX	OH	CH ₂ OH	304
trideoxyTTX	H	CH ₃	272

รูปที่ 10: Chemical structure of tetrodotoxin (TTX) and its analogs (Diener *et al.*, 2007)



อย่างที่ดีเมื่อวิเคราะห์สารสกัดจากปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) ด้วยวิธีเดียวกัน กลับตรวจไม่พบสารพิษในตัวอย่างสารที่สกัดจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาที่เตรียมตัวอย่างโดยวิธีที่ 1 ดังกล่าวข้างต้น ได้ (ทดลองใช้สารสกัดจากกล้ามเนื้อเนื่องจากมี total yield ของสารสกัดจากกล้ามเนื้อมากกว่าจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ของปลาดังเดียวกัน) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีนี้ทำให้ตัวอย่างเจือจางมากไป และ/หรืออาจมีสารอื่นเช่น โพรตีน ไขมัน ปนเปื้อนมากเกินไป จนทำให้เครื่อง mass spectrometer ไม่สามารถ detect peak ของสารพิษจากตัวอย่างปลาปักเป้าที่ถูก elute ออกมาจากคอลัมน์ ตามเวลาที่ตรงกันกับที่ tetrodotoxin มาตรฐาน (sTTX) ออกจากคอลัมน์ ได้

เนื่องจากปัญหาที่พบดังกล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนวิธีการเตรียมสารสกัดจากปลาปักเป้าจากวิธีเดิมมาเป็นวิธีที่คิดแปลงจาก Kono *et al.* (2008) โดยใช้ activated charcoal ในการช่วย concentrated สารพิษ ดังกล่าวในข้อ 2.2 (ค) ของ บทที่ 5 จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ตามข้อ 2.2 (ง) ของ บทที่ 5

เครื่อง LC-MS ที่ใช้สำหรับตัวอย่างที่เตรียมโดยวิธีที่ 2 นี้เป็นเครื่อง HPLC ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้แก่เครื่อง LC: DGU-12AM degasser, LC-10AD liquid chromatography, SCL-10A system controller (Shimadzu, Duisburg, Germany) MS: LC-MS-2010 single quadrupole mass spectrometer ESI source (Shimadzu, Duisburg, Germany) การที่ต้องเปลี่ยนเครื่องก็เพราะเครื่องที่คณะวิทยาศาสตร์ไม่ว่าง

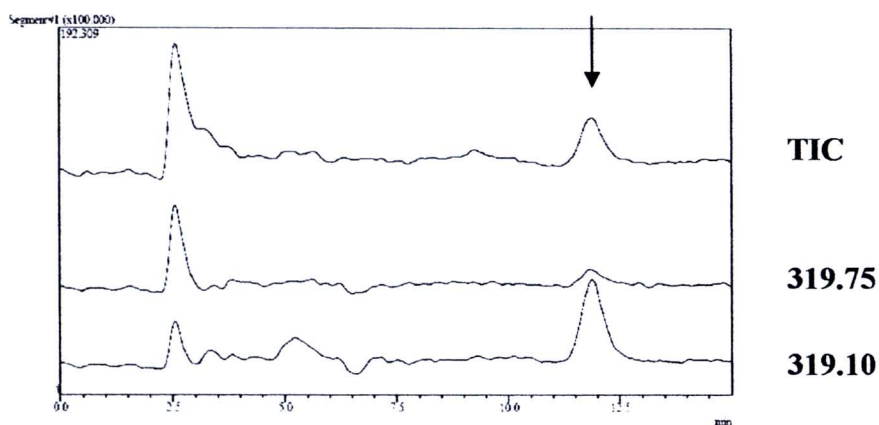
คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ ZIC-HILIC (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 150 × 2.1 mm แบบเดิม

การวิเคราะห์ เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ในรูปแบบของ Gradient analysis แบบเดิมโดย eluents ที่ใช้ได้แก่ 10 mM ammonium formate และ 10 mM formic acid ในน้ำ (eluent A) และ 80% acetonitrile และ 20% ของน้ำโดยมี 5 mM ammonium formate และ 2 mM formic acid ผสมอยู่ (eluent B) กลับไม่สามารถตรวจพบสารพิษมาตรฐานได้ จึงได้เปลี่ยนเป็นรูปแบบของการวิเคราะห์เป็น Isocratic analysis ตามวิธีของ Wang *et al.* (2008) คือใช้ 5 mM ammonium formate และ 5 mM formic acid ในน้ำเป็น eluent A และใช้ 5 mM ammonium formate และ 5 mM formic acid ใน 90% acetonitrile เป็น eluent B โดยตั้งค่า flow rate ไว้ที่ 0.2 ml/min และตั้งค่าการ elute เอาสารออกโดยใช้ 30% ของ eluent A ส่วนที่เหลือเป็น eluent B

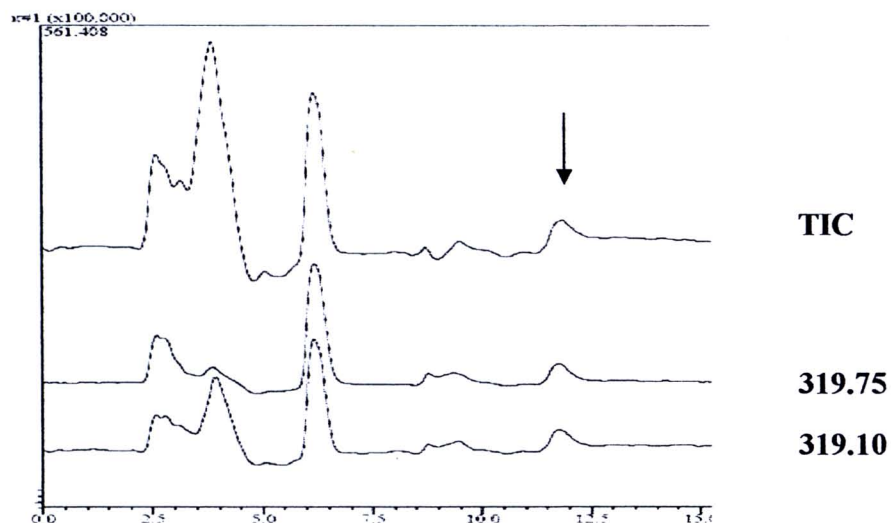
ผลการวิเคราะห์ (ด้วยเครื่อง HPLC ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เครื่องไม่สามารถทำ Fragmentation ion profile ได้)

พบสารพิษ sTTX (รูปที่ 11) เมื่อวิเคราะห์ด้วย SIM mode โดยหลังจากฉีด sTTX เข้าสู่ระบบ LC-MS แล้ว sTTX ถูกแยกโดย column เข้าสู่ detector (mass spectrometer) สามารถตรวจพบ peaks ของ TTX (m/z 319.10 และ m/z 319.75) ใน sTTX ที่เวลาประมาณ 12 นาที (รูปที่ 11)

A



B

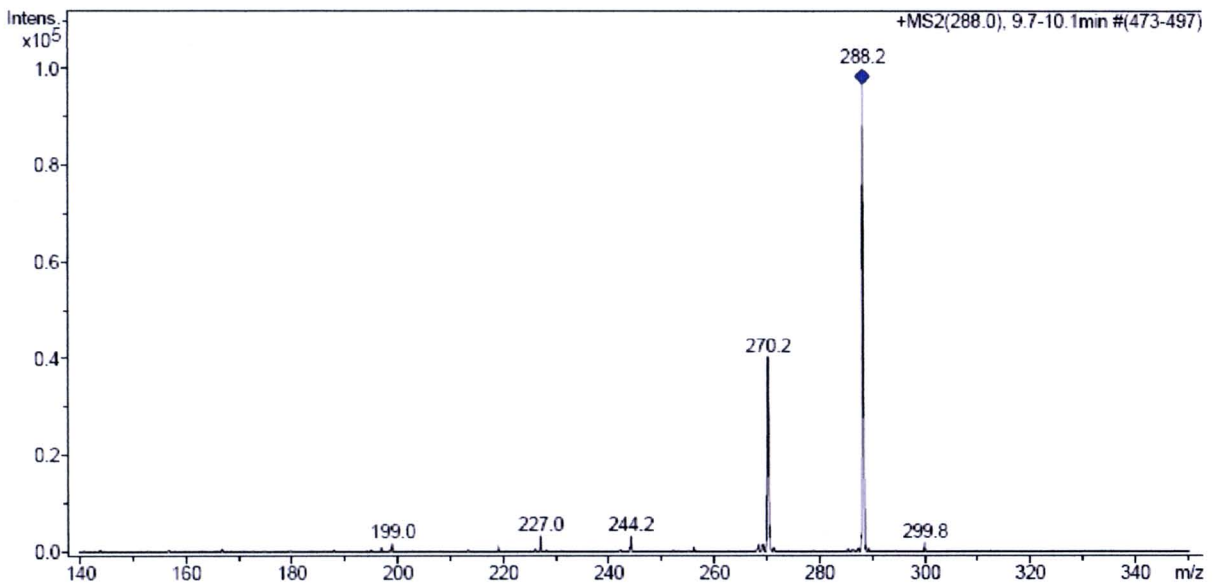


รูปที่ 11: ผลการวิเคราะห์ Standard tetrodotoxin (A) และสารพิษที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาปักเป้าหลังเขียวที่จับจากอ่าวไทย (B) ด้วย SIM mode ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พบสารที่มี m/z 319.10 และ 319.75 ทั้งใน standard tetrodotoxin (A) และ สารพิษที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลาปักเป้าหลังเขียวที่จับจากอ่าวไทย (B) ที่เวลาประมาณ 12 นาที (arrows)

TIC, Total ion chromatogram

ผลการนำสารสกัดจากเนื้อเยื่อของปลาปักเป้าหลังเขียว (*Largocephalus lunaris*) จับจากอ่าวไทย ได้มาจากสะพานปลา จังหวัดสมุทรสาคร ที่เตรียมด้วยการใช้ activated charcoal ช่วยในการ concentrate สารพิษก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย SIM mode พบว่าสามารถตรวจพบ peaks ของ pTTX (m/z 319.10 และ m/z 319.75) ในสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลาปักเป้าหลังเขียว (*Largocephalus lunaris*) ที่เวลาประมาณ 12 นาที เช่นเดียวกับใน sTTX (รูปที่ 12)

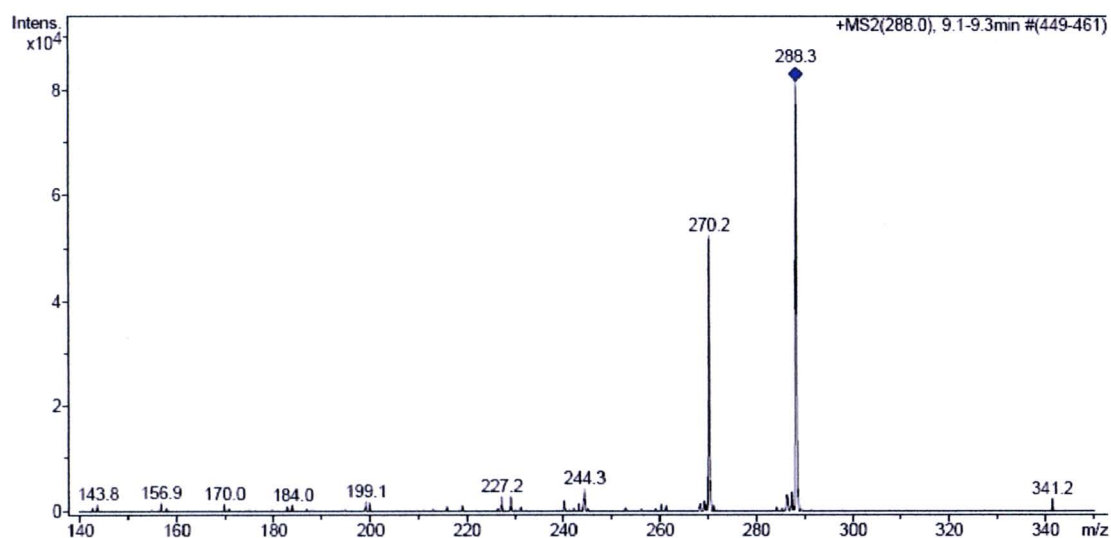
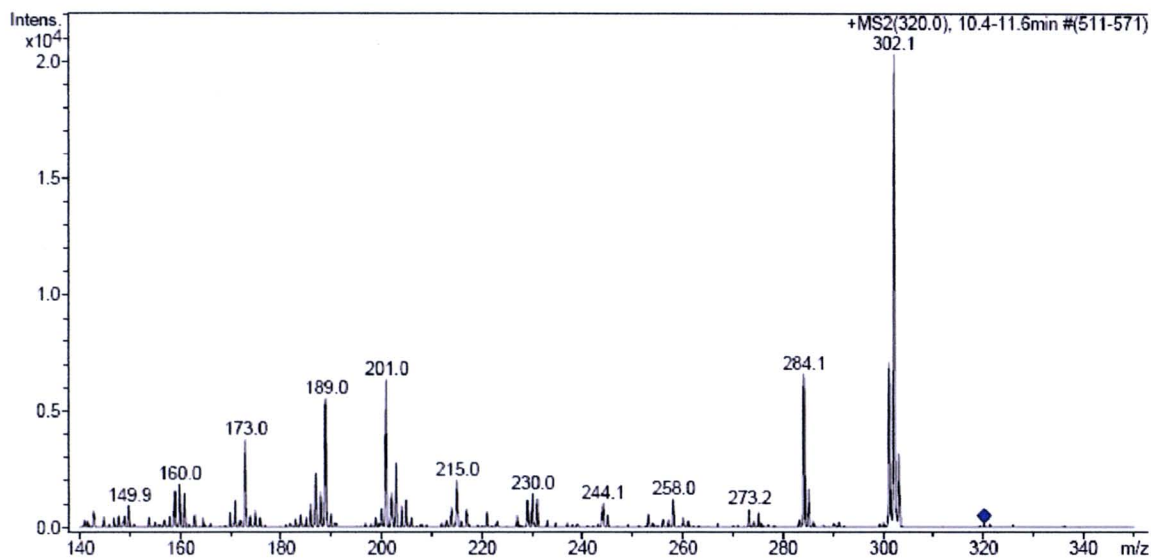


รูปที่ 12: Fragmentation ion profile ของสารที่มี m/z 288 ซึ่งเป็น analog ชนิดหนึ่งของ authentic tetrodotoxin คือ 6,11-dideoxytetrodotoxin ออกมาที่เวลา 9.7-10.1 นาที จากการวิเคราะห์สารพิษที่สกัดจากเนื้อเยื่อของปลาปักเป้าหลังเขียว (*L. lunaris*) ที่จับจากอ่าวไทยด้วย HPLC

พบว่าสารพิษที่มี m/z 288 สามารถแตกตัวเป็น m/z 270 ที่คาดว่าเป็น trideoxyTTX ที่ H ion หลุดออกไป 2 ions

ผลการวิเคราะห์ pTTX จากปลาปักเป้าสายพันธุ์อื่น คือ ปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*Lagocephalus spadiceus*) ปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) และปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) ที่จับจากทะเลอันดามัน ได้มาจากสะพานปลา จังหวัดสตูล แสดงไว้ในรูปที่ 13-15 ตามลำดับ พบว่าสามารถตรวจพบ peak ของ pTTX (m/z 320) ในสารสกัดจากตัวอย่าง เนื้อเยื่อของปลาปักเป้าหลังน้ำตาล ปลาปักเป้าเขียวจุดและปลาปักเป้าลายร่างแหได้เช่นเดียวกัน และสามารถแตกตัวเป็น m/z 302 คือ anhydrotetrodotoxin หรือ 6- epianhydro-tetrodotoxin) ได้ทุกตัวอย่าง

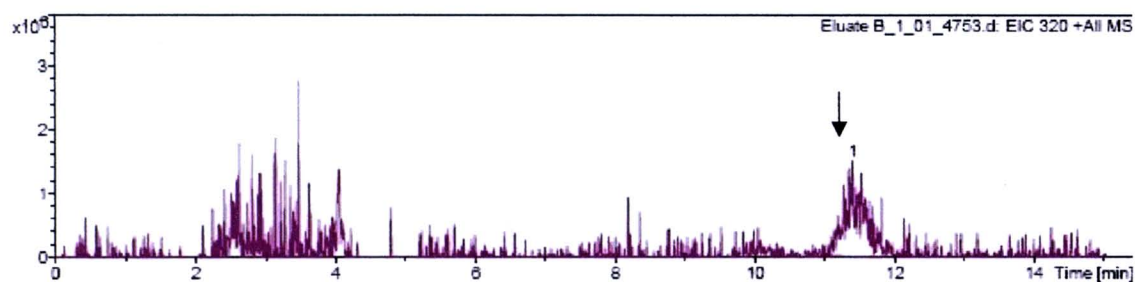
ตารางที่ 4 สรุปผลการวิเคราะห์สารพิษ TTX และ analogs ใน sTTZ และ pTTX



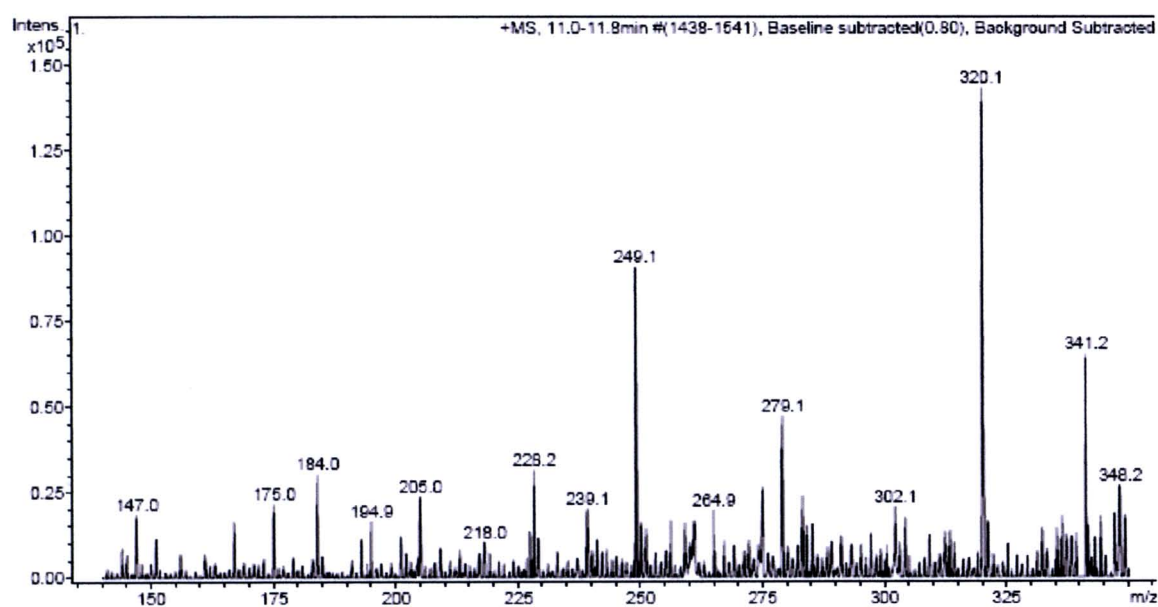
รูปที่ 13: ผลการวิเคราะห์สารพิษที่สกัดจากเนื้อเยื่อของปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*L. spadiceus*) ที่จับจากอ่าวไทย พบว่ามี authentic TTX (m/z 320) ออกมาที่เวลา 10-12 นาที และมี m/z 288 ออกมาที่เวลาประมาณ 9 นาทีหลังฉีดตัวอย่าง

- (A) แสดง Fragmentation ion profile ของ tetrodotoxin (m/z 320) ที่ออกมาที่เวลา 10-12 นาที พบว่า TTX ได้แตกตัวเป็น m/z 302 (anhydrotetrodotoxin หรือ 6-epianhydrotetrodotoxin) และมี m/z 284 (4-epitetrodotoxin) เล็กน้อย และเหลือเป็น authentic TTX น้อยมาก
- (B) แสดง Fragmentation ion profile ของ m/z 288 หรือ 6,11-dideoxytetrodotoxin ซึ่งสามารถแตกตัวเป็น m/z 270 ที่คาดว่าเป็น trideoxyTTX ที่ H ion หลุดออกไป 2 ions

A



B



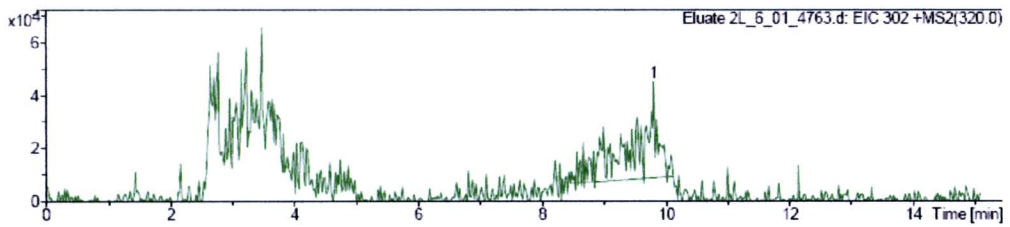
รูปที่ 14: ผลการวิเคราะห์สารพิษที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) ที่จับจากทะเลอันดามัน จังหวัดสตูล ด้วย SIM mode ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

(A) ตรวจพบ tetrodotoxin (m/z 320.1) ที่เวลาประมาณ 11 นาที (arrow)

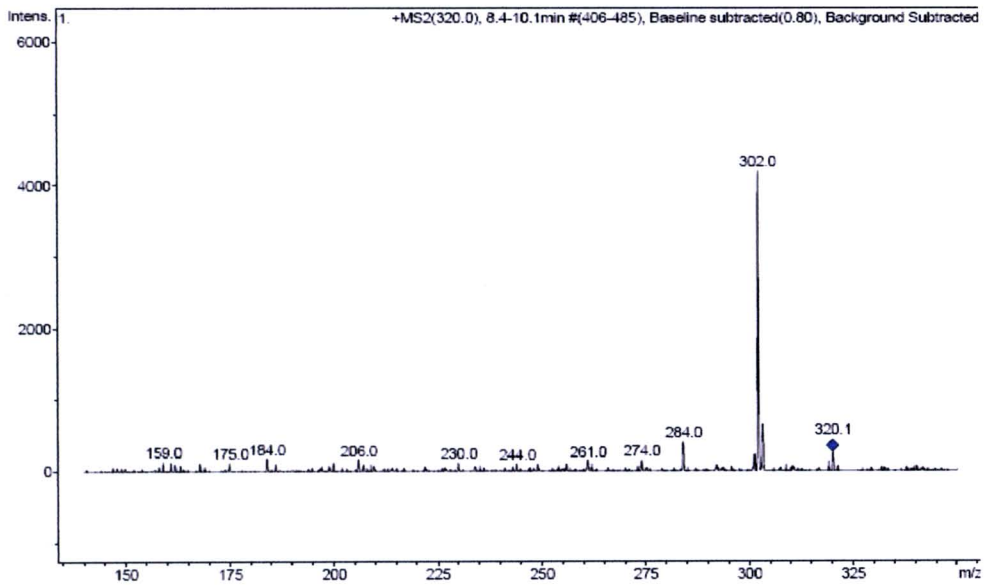
(B) Total ion profile ของสารที่ออกมาที่เวลา 11-11.8 นาที จาก Figure 12A

พบ tetrodotoxin (m/z 320) และสารที่มี m/z 302 (anhydrotetrodotoxin และ/หรือ 6-epianhydro-tetrodotoxin)

A



B



รูปที่ 15: ผลการวิเคราะห์สารพิษที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) ที่จับจากทะเลอันดามัน จังหวัดสตูล ด้วย SIM mode ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (tandem mass spectrometry)

(A) ผลการตรวจหา tetrodotoxin ที่เวลา 8.4 ถึง 10.1 นาที พบ tetrodotoxin (m/z 320.1)

(B) Fragmentation ion profile ของ tetrodotoxin (m/z 320) จาก Figure 13A พบว่า TTX แตกตัวเป็น m/z 302 (anhydrotetrodotoxin และ/หรือ 6-epianhydrotetrodotoxin) และมี m/z 284 (4-epitetrodotoxin) เล็กน้อย

ตารางที่ 4 Authentic TTX and analogs in standard TTX and livers of the puffer species in this study

Preparation	Authentic TTX (<i>m/z</i> ~320)	5-Deoxy-and/or 11- deoxy-TTX (<i>m/z</i> 304)	Anhydro-and/or 6- epi-anhydro-TTX (<i>m/z</i> 302)	6,11 Dideoxy-TTX (<i>m/z</i> 288)	4-epi-TTX (<i>m/z</i> 284)	Trideoxy-TTX which had lost 2 atoms of H ⁺ (<i>m/z</i> 270)
Standard TTX	+	+	+	-	-	-
Liver of <i>L. lunaris</i> *	-	-	-	+	-	+
Liver of <i>L. spadiceus</i>	+	-	+	+	+	+
Liver of <i>T. nigroviridis</i>	+	-	+	-	-	-
Liver of <i>A. reticularis</i>	+	-	+	-	+	-

* Muscle of this toxic *L. lunaris* contained authentic TTX (*m/z* 319.75 and *m/z* 319.10) (รูปที่ 11)

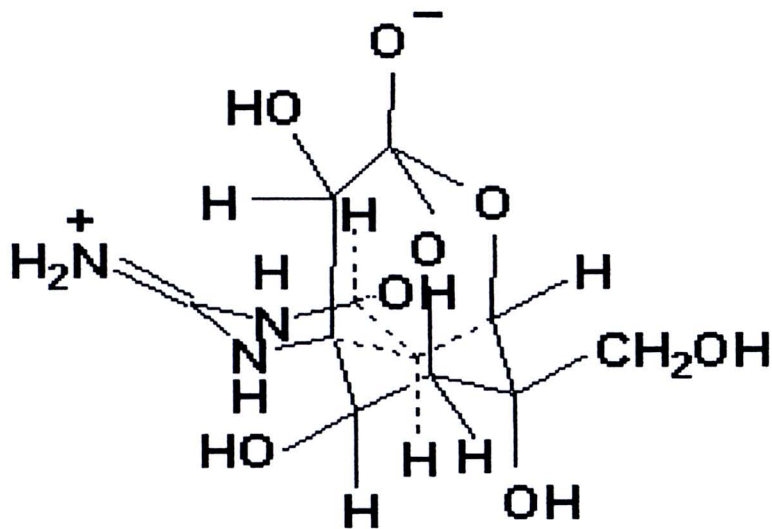
ผลการวิจัยของกิจกรรมการวิจัยข้อที่สาม:

การทำ Phage bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ใน human antibody phage display library ที่ display HuScFv ที่มีความเฉพาะต่อ TTX

แม้ว่า TTX ที่สกัดจากปลาปักเป้าที่จับจากทะเลไทย (pTTX) จะเหมือนกับ sTTX แต่คณะผู้วิจัยก็ใช้ทั้ง sTTX และ pTTX ในการทำ bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv ที่จับกับ TTX

3.1 ผลการทำ bio-panning โดยใช้ sTTX-KLH เป็น panning antigen (โปรดดูวิธีทำ bio-panning ในข้อ 3.2 ของบทที่ 5)

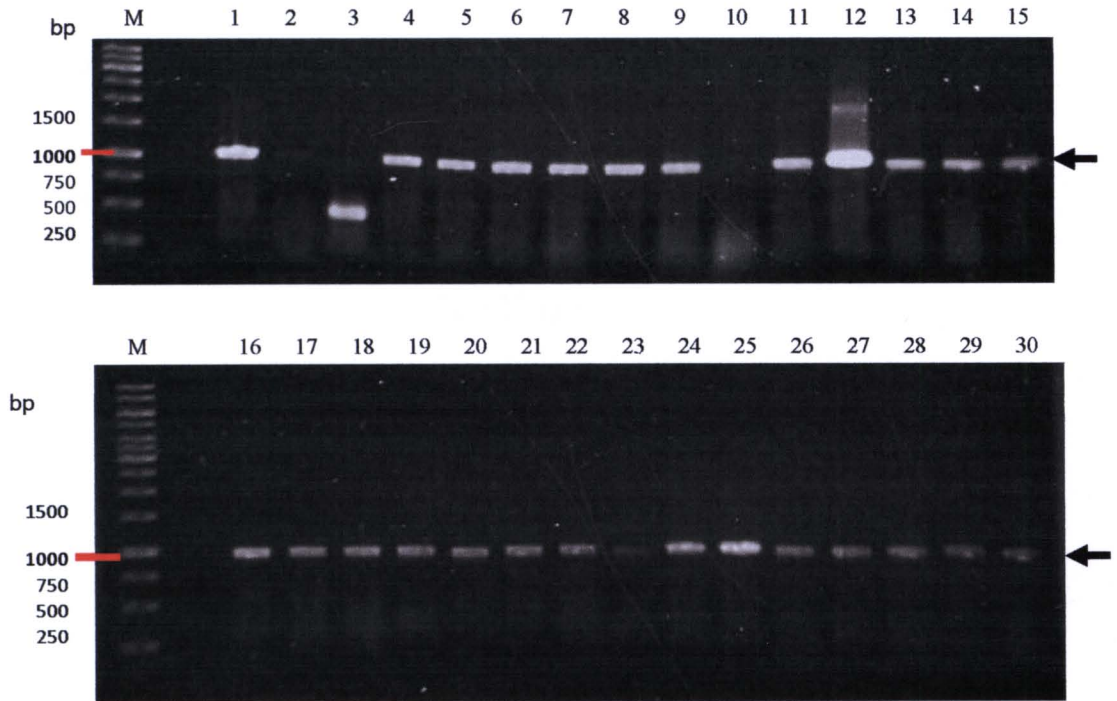
Tetrodotoxin มาตรฐาน (sTTX) จาก Sigma Chemical Co., MO, USA มีโครงสร้างดังแสดงไว้ใน รูปที่ 16 แต่ละโมเลกุล ($C_{11}H_{17}N_3O_8$) มีน้ำหนัก (MW) 319.27 ดัลตัน ซึ่งเหมือนกับ tetrodotoxin มาตรฐาน (sTTX) ที่ซื้อจาก American Radiolabeled Chemicals Inc. (ARC), MO, USA



TETRODOTOXIN

รูปที่ 16: โครงสร้างโมเลกุลของ Tetrodotoxin มาตรฐาน (sTTX) ที่ซื้อจาก Sigma Chemical Co., MO, USA ซึ่งมีโครงสร้างและ molecular weight เหมือนกับ tetrodotoxin มาตรฐาน (sTTX) ที่ซื้อจาก American Radiolabeled Chemicals Inc (ARC)., MO, USA คือ C₁₁H₁₇N₃O₈ และ MW ~319.27 และมี mass spectra เหมือนกับ pTTX จากปลาปักเป้าที่จับมาจากทะเลไทย

หลังจากนำ sTTX-KLH bound phages ไป transfected เข้า *E. coli* แล้ว ได้สุ่มเลือก phagemid transformed-*E. coli* colonies ที่ grew บน selective LB-AG agar plate (ข้อ 3.2.4 ของบทที่ 5) ไปตรวจหา transformed *E. coli* colonies ที่มี *huscfv* insert (ตามวิธีในข้อ 3.2.5 ของบทที่ 5) จาก transformed *E. coli* ที่ picked มาจาก LB-AG plate จำนวน 99 colonies แล้วนำแต่ละ colonies ไปใช้เป็น PCR templates จากนั้นวิเคราะห์ PCR amplicons โดย 1% agarose gel electrophoresis และ ethidium bromide staining พบว่ามีจำนวน 67 clones ที่มี *huscfv* insert (68%) ดังแสดงตัวแทนใน รูปที่ 17



รูปที่ 17: PCR products ของ *huscfv* ที่ amplified จาก representative phagemid-transformed HB2151 *E. coli* colonies จำนวน 30 colonies (lanes 1-30) โดยใช้ *R1* และ *R2* primers แล้ววิเคราะห์ผลด้วยการ run amplified products ใน 0.1% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย Ethidium bromide

Lanes M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

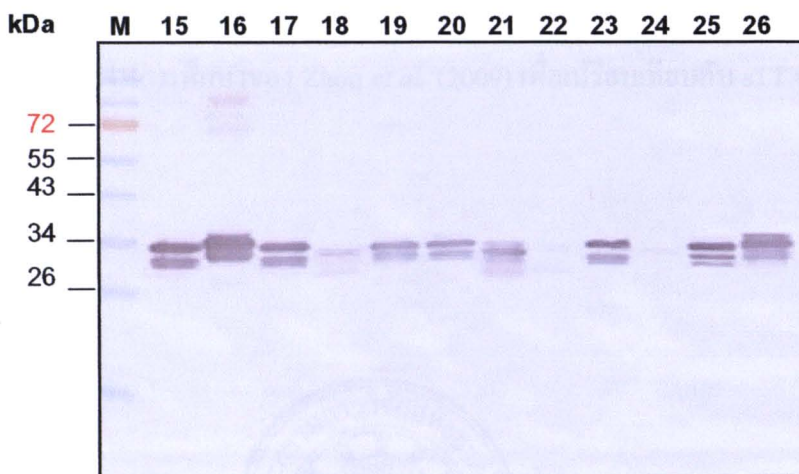
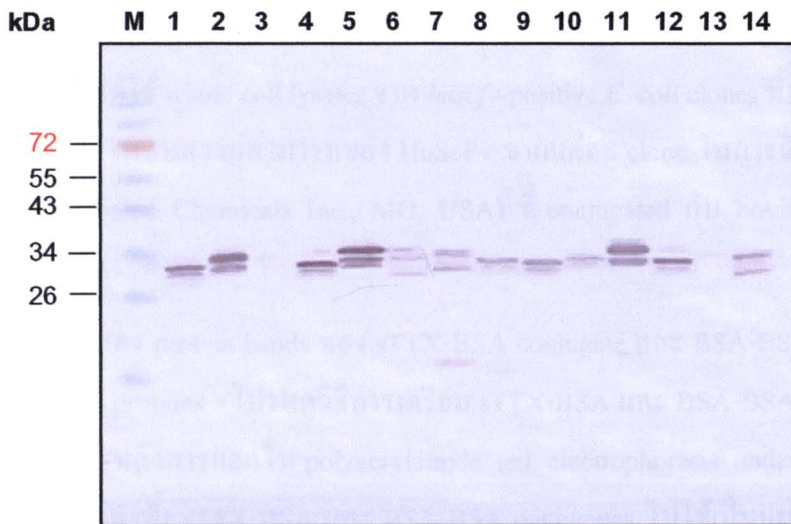
Lanes 1, 4-9 and 11-30 were positive for *huscfv* at ~1,000 bp (arrows)

ตัวเลขด้านซ้ายมือของทั้งสองบล็อกแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)

3.2 ผลการตรวจหา *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* ที่สามารถสร้าง HuScFv ได้ (โปรดดูวิธีการในข้อ 3.3.6 ของบทที่ 5)

HB2151 *E. coli* clones ที่ carried *huscfv*-phagemid vector ทั้ง 67 clones ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ว่าสามารถสร้างโมเลกุล HuScFv ได้หรือไม่ ด้วยการวิเคราะห์หา HuScFv ใน *E. coli* whole cell lysates ด้วยวิธี Western blot analysis ดังขั้นตอนและวิธีการที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.2.6 ของบทที่ 5

จาก Western blot analysis พบว่ามี *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* จำนวน 44 clones จาก 67 *huscfv*-positive clones (44%) ที่สามารถ express soluble HuScFv ได้ ดังแสดงตัวแทนของ HuScFv producing-*E. coli* clones ใน รูปที่ 18



รูปที่ 18: ผลของ Western blot analysis เพื่อตรวจหา HuScFv ใน lysates จากตัวแทน *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* clones จำนวน 26 clones (lanes 1-26) พบว่าทุกโคลนสามารถ expressed HuScFv ได้ (expected sizes of the HuScFv are ~27-34 kDa) แต่มี 22 clones ที่สามารถ expressed HuScFv ได้มาก (lanes 1, 2, 4-12, 14-21, 23, 25 และ 26).

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดง Molecular masses (kDa) ของโปรตีน

Lanes M, Standard protein molecular mass markers

Multiple (triplet/doublet) HuScFv bands are: immature HuScFv with signal peptide (uppermost bands); mature HuScFv (lower bands) and degradative products of the principal proteins (diffuse/other bands).

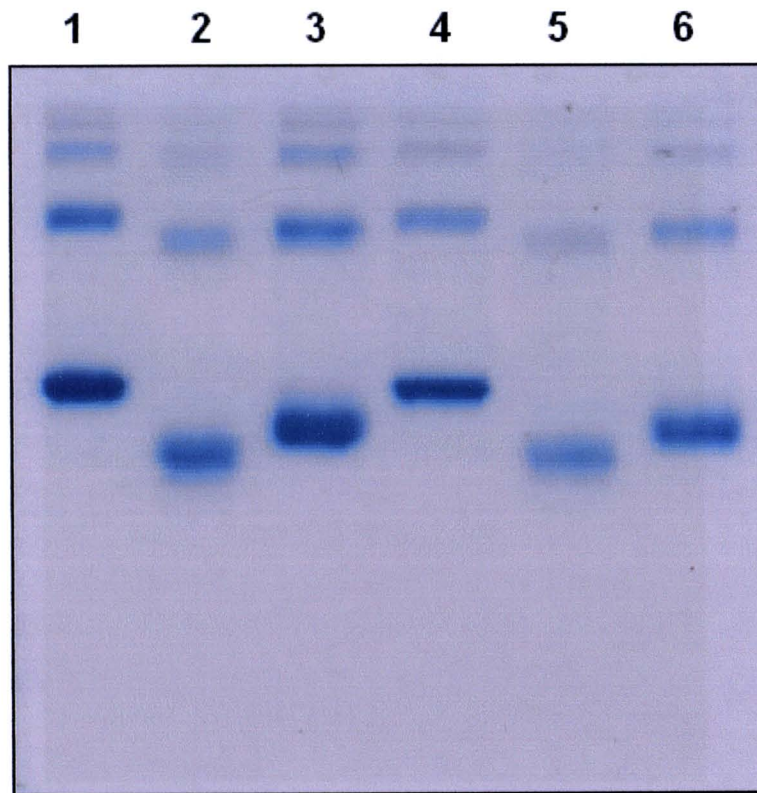
3.3 การตรวจความสามารถของ HuScFv ที่ expressed จาก *huscfv*-positive *E. coli* clones ในการจับกับ sTTX ด้วยวิธี indirect ELISA (โปรโตคอลวิธีทำในข้อ 3.2.6 ของบทที่ 5)

คณะผู้วิจัยได้ใช้ whole cell lysates จาก *huscfv*-positive *E. coli* clones ที่สามารถ expressed HuScFv ได้ มาตรวจสอบความสามารถของ HuScFv จากแต่ละ clone ในการจับกับ sTTX (ARC American Radiolabeled Chemicals Inc., MO, USA) ที่ conjugated กับ bovine serum albumin (BSA) (sTTX-BSA)

รูปที่ 19 แสดง protein bands ของ sTTX-BSA conjugate และ BSA-BSA conjugate เทียบกับ non-conjugated proteins (โปรโตคอลวิธีการเตรียม sTTX-BSA และ BSA-BSA conjugates ในข้อ 3.2.6 ของบทที่ 5) หลังการแยกใน polyacrylamide gel electrophoresis under native condition (native gel) และได้้นำทั้ง sTTX-BSA และ BSA-BSA conjugates ไปใช้เป็นแอนติเจนใน indirect ELISA เพื่อหา HuScFv ใน lysates ของ *huscfv* positive-*E. coli* clones ที่จับจำเพาะกับ TTX

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





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

Molecular weight markers are not shown as the electrophoresis was done in non-denaturing condition; thus the standard proteins were not accurately resolved

Lane 1, BSA (4 μg in 5 μl)

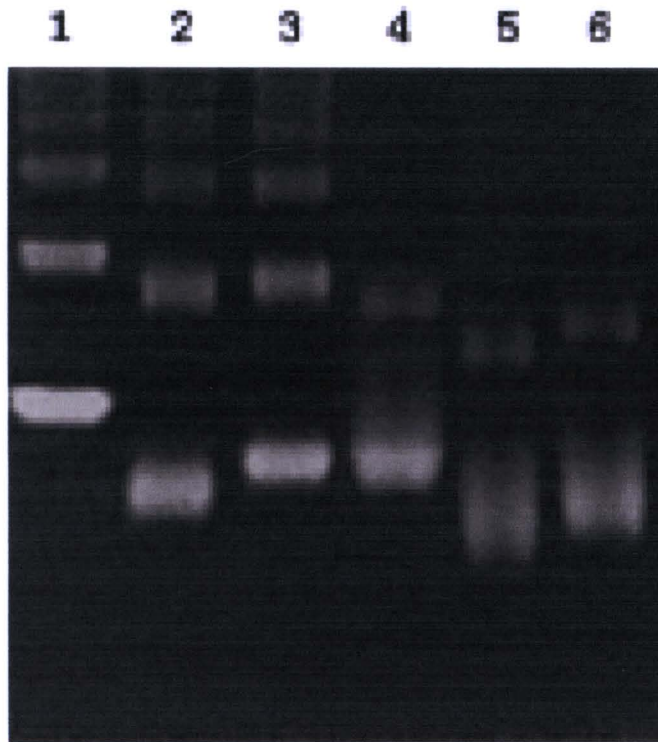
Lane 2, BSA-BSA conjugate (4 μg in 5 μl)

Lane 3, sTTX-BSA conjugate (4 μg in 5 μl)

Lane 4, BSA (2 μg in 2.5 μl)

Lane 5, BSA-BSA conjugate (2 μg in 2.5 μl)

Lane 6, sTTX-BSA conjugate (2 μg in 2.5 μl)



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

Molecular weight markers are not shown as the electrophoresis was done in non-denaturing condition; thus the standard proteins were not accurately resolved

Lane 1, BSA

Lane 2, Formaldehyde-treated BSA

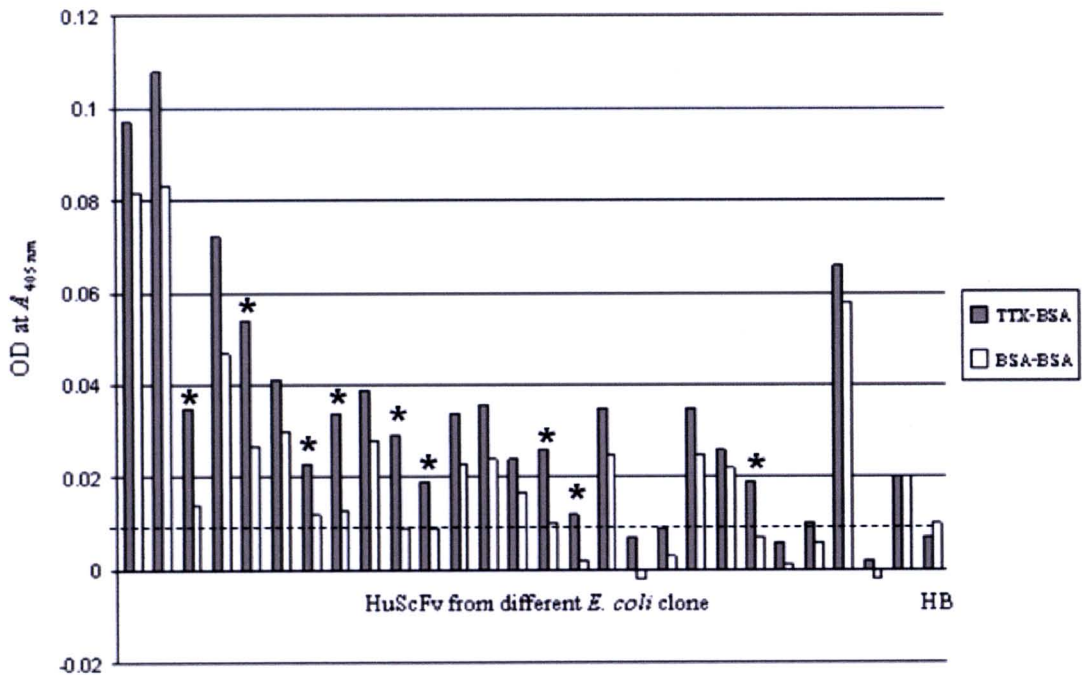
Lane 3, Tetrodotoxin-BSA

Lane 4, Ovalbumin (OVA)

Lane 5, Formaldehyde-treated OVA

Lane 6, TTX-OVA

ผลของ indirect ELISA แสดงใน รูปที่ 21 พบว่าจากการทดสอบ *huscfv*-positive transformed HB2151 *E. coli* clones จำนวน 27 clones มี 9 clones ที่ให้ผลบวก คือมี HuScFv ที่จับจำเพาะกับ TTX โดยให้ OD ที่ $A_{405\text{nm}}$ มากกว่า lysate ของ original HB2151 (HB) และ OD ที่ $A_{405\text{nm}}$ สูงกว่าที่จับกับ BSA-BSA conjugate >1.5 เท่า (clones ที่มีเครื่องหมาย * ใน รูปที่ 21)



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

Positive *E. coli* clone (*) ได้แก่ clone ที่ lysate ให้ ELISA signal สูงกว่า lysate ของ original HB2151 (HB) และสูงกว่า OD ของ clone เดียวกันที่จับกับ BSA-BSA conjugate กว่า 1.5 เท่า

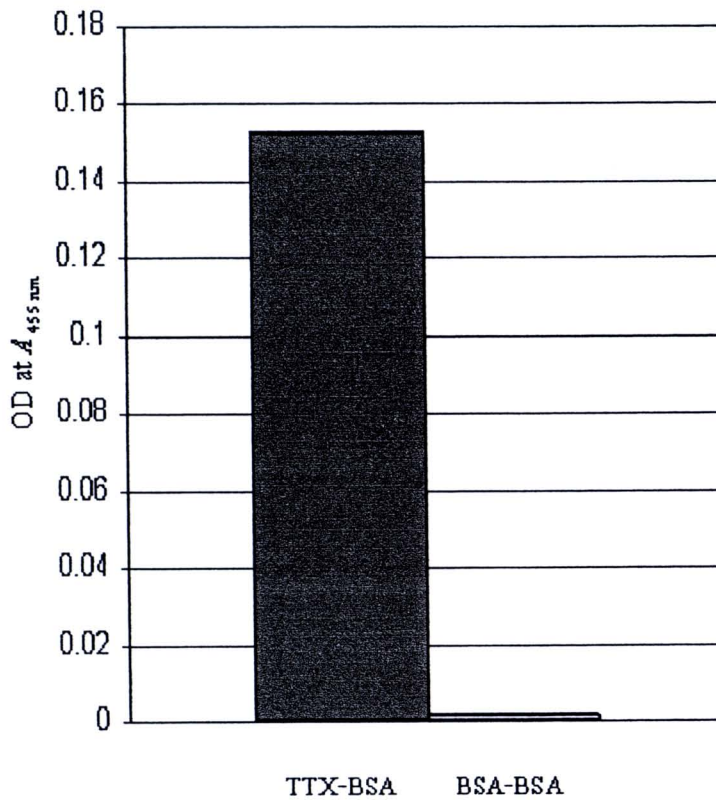
HB, lysate of original HB2151 *E. coli* (background binding ของ *E. coli* lysate หรือ negative HuScFv control)

อย่างไรก็ดีเมื่อทำซ้ำ พบว่าบางครั้งไม่มี ELISA signal เกิดขึ้น คณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่าน่าจะเกิดจากวิธีการ immobilize antigen (sTTX-BSA) ที่จับกับผิวของ ELISA plate ไม่แน่นพอ (โปรดดูวิธี immobilize แอนติเจนในข้อ 3.2.6 ของบทที่ 5) จึงได้ทดลองหาวิธี immobilize antigen ด้วยวิธีที่ 2 คือการ immobilize แอนติเจนโดยใช้ poly-L-lysine ช่วยในการ pre-coat wells ใน ELISA plate ด้วยวิธีการดังนี้

เจือจาง 0.1% poly-L-lysine (Sigma Chemical Company, USA) ให้เป็น 0.05% poly-L-lysine ด้วย deionized distilled water จากนั้นเติม 0.05% poly-L-lysine ลงในแต่ละหลุมของ ELISA strip (Costar, USA) หลุมละ 100 μ l นำ strip ไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างแต่ละหลุม ด้วย PBS ปริมาตร 250 μ l สามครั้ง ครั้งละ 1 นาที แล้วเติม sTTX-BSA conjugate หรือ BSA-BSA conjugate ปริมาตร 100 μ l ลงในหลุมที่ pre-coated ไว้แล้วด้วย poly-L-lysine เก็บ strip ไว้ที่อุณหภูมิ 25°C, 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างแอนติเจนส่วนเกินที่ไม่จับกับพื้นผิวของ ELISA wells ออกด้วย PBST แล้วเติม blocking buffer (1% BSA ใน PBS) ปริมาตร 150 μ l ลงไปในแต่ละหลุม เก็บ strip ไว้ที่ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา คูด blocking buffer ออกให้หมดแล้วล้าง wells ด้วย PBST ก่อนนำไปใช้ทดสอบหา HuScFv จาก *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* ที่สามารถจับจำเพาะกับ TTX ได้ต่อไปด้วยวิธี indirect ELISA

HuScFv ที่ใช้ในการทดสอบการจับกับ immobilized sTTX-BSA/BSA-BSA ที่ถูก immobilized ไว้ใน ELISA wells โดยการใช้ poly-L-lysine ช่วยให้จับกับ well surface เป็น HuScFv จาก *huscfv*-positive *E. coli* whole cell lysates ที่ผ่านการทำให้โมเลกุลแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วย ion exchange chromatography คือ DEAE Sepharose resin จากนั้น HuScFv ที่ purified ด้วย DEAE Sepharose resin ได้ถูกนำไปเติมลงใน ELISA wells ที่ coated ไว้แล้วด้วย sTTX-BSA ด้วยการใช้ poly-L-lysine เป็น linker โดยมี BSA-BSA conjugate เป็น control antigen ส่วนกรรมวิธีของ indirect ELISA ทำเหมือนกับ indirect ELISA ในข้อ 3.2.6 ของบทที่ 5 แต่เปลี่ยน substrate จาก ABTS เป็น TMB substrate

ผลของ indirect ELISA เพื่อตรวจหา DEAE Sepharose resin purified HuScFv ที่จับกับ sTTX ที่ immobilized ใน ELISA wells ด้วย poly-L-lysine พบว่ามีจำนวน 2 clones คือ clones no. s16 และ s35 ที่จับจำเพาะกับ sTTX รูปที่ 22 แสดงผลของ indirect ELISA ของ clone no. s35



รูปที่ 22: แสดงผลของ Indirect ELISA ของ HuScFv (purified ด้วย DEAE Sepharose resin) จาก ตัวแทน *huscfv*-phagemid transformed *E. coli* clone no. s35 ในการจับกับ sTTX ที่ immobilized ใน ELISA wells ด้วย การใช้ poly-L-lysine เป็น linker เทียบกับผลการจับ ของ HuScFv จาก clone เดียวกัน กับ control antigen (BSA-BSA conjugate)

สรุปได้ว่าการทำ bio-panning โดยใช้ sTTX เป็น bio-panning antigen มี *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* clones ที่สามารถผลิต HuScFv และ HuScFv จับจำเพาะกับ sTTX แล้ว จำนวน 2 clones คือ clones no. s16 และ s35

3.4 ผลการใช้ TTX ที่สกัดได้จากปลาปักเป้าที่จับจากทะเลไทย (pTTX) เป็นแอนติเจนใน bio-panning

นอกจากการใช้ sTTX เป็น bio-panning antigen แล้ว คณะผู้วิจัยยังทำการคัดเลือก *huscfv*-positive phage clones จาก human antibody phage display library โดยใช้ tetrodotoxin จากปลาปักเป้าที่จับจากทะเลไทย (pTTX) เป็น bio-panning antigen ด้วย ซึ่งรายละเอียดของการวิจัยมีดังต่อไปนี้

3.4.1 การเตรียมแอนติเจน

ได้เตรียม antigen เพื่อ coat plate สำหรับทำ bio-panning ดังนี้ นำ crude TTX ที่ extracted จากตับของปลาปักเป้าสายพันธุ์ *Lagocephalus lunaris* มาทำให้เจือจาง 1:4 ด้วย 0.1% acetic acid จากนั้นนำไปกรองด้วย filter 0.45 μm แล้วนำไปผ่าน SPE C₁₈ cartridges (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) ที่ถูก equilibrated ไว้แล้วด้วย methanol และ sterile deionized distilled water การนำไปผ่าน SPE C₁₈ cartridges นี้ก็เพื่อกำจัดโปรตีนบางส่วนและไขมันออก เก็บสารสกัดจากปลาที่ผ่านออกมาจาก SPE C₁₈ cartridges (Horie *et al.*, 2002) เพื่อนำไปใช้เป็น bio-panning antigen ต่อไป

เตรียม Control (subtractive) antigen คือ เนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าสายพันธุ์เดียวกัน แต่ไม่พบความเป็นพิษเมื่อทดสอบด้วยวิธี mouse bioassay ที่จับมาได้พร้อมกันกับตัวที่มีพิษ โดยจะใช้ control (subtractive) antigen นี้สำหรับ remove phage clones ที่ display HuScFv ที่จับกับเนื้อเยื่อปกติของปลาปักเป้าออกไปจากคลังฟาจ ก่อนนำคลังฟาจ (subtractive phage library) ไปใช้ในการทำ bio-panning กับ TTX ที่สกัดจากตับของปลาปักเป้า (pTTX)

3.4.2 การ immobilize แอนติเจน

ทำการปรับปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าที่มีพิษ (test antigen) และที่ไม่มีพิษ (control antigen) ที่ผ่าน SPE C₁₈ cartridges แล้วให้เท่ากัน (20 $\mu\text{g/ml}$) จากนั้นนำ test และ control antigens แต่ละ preparations ไปใส่ในหลุมของ ELISA plate (Costar, USA) ปริมาตร 100 μl /หลุม แล้วนำ plate ไป incubated ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้าง coated wells ด้วย PBS สามครั้ง แล้วเติม blocking buffer (3% BSA ใน PBS) ปริมาตร 150 μl ลงไปในแต่ละหลุมที่ coated ไว้ นำ plate ไปเก็บที่ 25°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูด blocking buffer ออกให้หมดแล้วล้าง wells ด้วย PBS สามครั้ง

3.4.3 การทำ subtractive bio-panning ด้วยสารสกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าที่ตรวจไม่พบสารพิษ

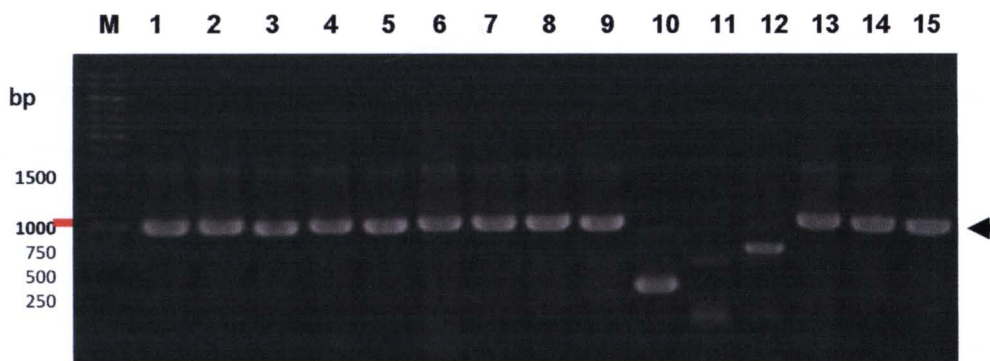
นำ suspension ของ HuScFv phage display library จากข้อ 3.1 ของบทที่ 5 ปริมาตร 100 μ l ไปเติมลงในหลุมที่ coated ด้วยสารสกัดของเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าสายพันธุ์ *Lagocephalus lunaris* ที่ตรวจไม่พบสารพิษ ด้วยวิธี mouse bioassay (control/subtractive antigen) ตามที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.2 ของบทที่ 5 นำ plate ไป incubated ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว คัดเก็บ phages ที่ไม่จับกับ control/subtractive antigen เพื่อนำไปทำ bio-panning กับสารสกัดของเนื้อเยื่อตับของปลาสายพันธุ์ *Lagocephalus lunaris* ที่มีสารพิษ tetrodotoxin (test antigen) ต่อไป

3.4.4 การทำ bio-panning ต่อ pTTX ที่สกัดจากปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) (test antigen)

นำ phages ที่ผ่านการทำ subtractive bio-panning กับสารสกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาที่ตรวจไม่พบสารพิษ (control/subtractive antigen) จากข้างต้นเติมลงในหลุมที่ coated ไว้ด้วยสารสกัดจากเนื้อเยื่อตับของ *Lagocephalus lunaris* ที่มีสารพิษ tetrodotoxin (pTTX or test antigen) ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำ plate ไป incubated ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วคัดของเหลวออกจาก wells ให้หมดทุก wells ล้าง wells ด้วย PBS สิบครั้ง แล้วล้างด้วย PBS-Tween-20 (PBST) อีกสิบครั้งเพื่อกำจัด unbound phages ออกให้หมด จากนั้นเติม log phase culture ของ competent non-suppressor HB2151 *E. coli* ปริมาตร 100 μ l ลงใน wells ที่ล้างเอา unbound phages ออกหมดแล้วทุก wells นำ plate ไปเก็บที่ 37°C เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วเก็บ *E. coli* ออกจาก wells นำ aliquot ประมาณ 50 μ l ไป spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด LB-AG agar plate เพื่อทำการคัดเลือก phagemid-transformed HB2151 *E. coli* clones ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ เก็บ plate ไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ข้ามคืนจนเห็น *E. coli* colonies ซึ่งก็คือ phagemid-transformed *E. coli* colonies ส่วน *E. coli* preparation ที่เหลือจากการ spread ลงบน LB-AG plate นำไปเก็บเป็น glycerol stock ไว้ที่ -70°C

3.4.5 การตรวจกรองหา phagemid-transformed-HB2151 *E. coli* ที่มี *huscfv* insert

การตรวจกรองหา Phagemid-transformed-HB2151 *E. coli* ที่มี *huscfv* insert ใช้วิธี PCR เช่นเดียวกับการตรวจกรองหา *huscfv*-positive phagemid transformed *E. coli* ที่ได้มาจากการทำ bio-panning ด้วย sTTX ที่กล่าวมาแล้วใน ข้อ 3.2.5 ของบทที่ 5 พบว่าจาก phagemid-transformed-HB2151 *E. coli* ที่นำมา screened จำนวน 15 clones มี *huscfv*-positive *E. coli* จำนวน 12 clones (80%) ดังแสดงใน รูปที่ 23



รูปที่ 23: PCR products ของ *huscfv* ที่ amplified จาก phagemid-transformed-HB2151 *E. coli* colonies จำนวน 15 colonies ที่ได้มาจาก bio-panning กับ pTTX (lanes 1-15) โดยใช้ *R1* และ *R2* primers แล้ววิเคราะห์ผลด้วยการ run amplified products ใน 0.1% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide พบว่ามี *huscfv* amplicons ที่ขนาดถูกต้องคือ ~1,000 bp (arrow) จำนวน 12 clones (lanes 1-9 and 13-15)

Lanes M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

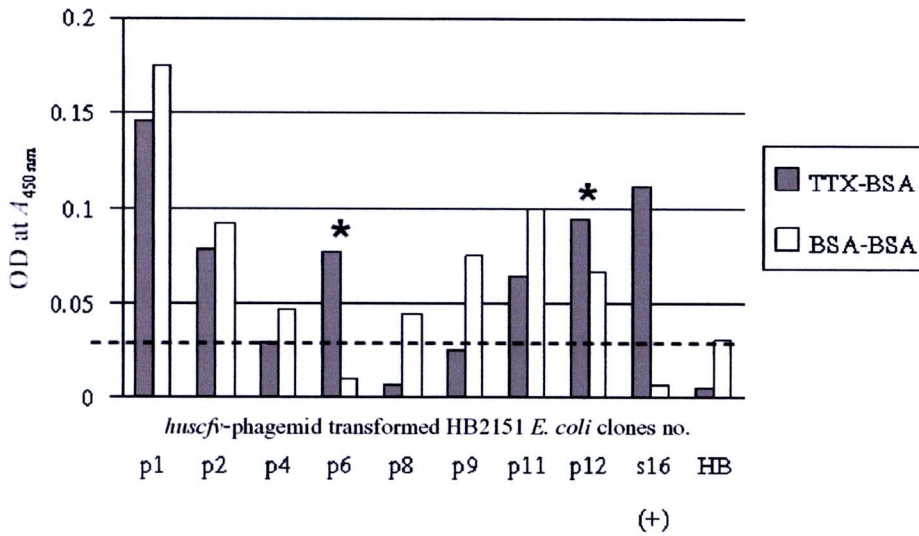
ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน bp

3.4.6 การตรวจหา *huscfv*-phagemid transformed-HB2151 *E. coli* ที่สามารถผลิต HuScFv ได้

การตรวจหา *huscfv*-phagemid transformed-HB2151 *E. coli* ที่สามารถผลิต HuScFv ได้ทำการตรวจด้วย Western blot analysis เช่นเดียวกับการตรวจหา *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* ที่ได้มาจากการทำ bio-panning ด้วย standard tetrodotoxin ที่กล่าวมาแล้วใน ข้อ 3.2.6 ของบทที่ 5 พบว่าจาก 12 clones ของ *huscfv*-positive *E. coli* clones ที่นำมาทดสอบ มี 9 clones (60%) ที่สามารถ express HuScFv ได้ คือ clones no. p1, p2, p4, p5, p6, p8, p9, p11 และ p12 (ไม่ได้แสดงรูปเพราะ HuScFv bands เหมือนกันกับที่แสดงไว้ในรูปที่ 16)

3.4.7 การตรวจความสามารถของ HuScFv ที่ expressed จาก *huscfv*-positive *E. coli* clones ในการจับกับ sTTX ด้วยวิธี indirect ELISA

ใช้วิธีเดียวกันกับที่บรรยายไว้แล้วในข้อ 3.2.6 ของบทที่ 5 พบว่าจาก *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* ที่สามารถ express HuScFv ได้ จำนวน 9 clones มี 2 clones ที่สามารถจับกับ sTTX ได้ คือ clones no. p6 และ p12 (รูปที่ 24)



รูปที่ 24: ผลของ ELISA แสดงค่า optical density (OD) ที่ $A_{450\text{nm}}$ เพื่อแสดงการจับของ HuScFv จาก *huScFv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* (จากการ bio-panning กับ pTTX) กับ sTTX-BSA conjugate เปรียบเทียบกับ HuScFv จาก clone เดียวกันที่จับกับ BSA-BSA conjugate

Positive *E. coli* clone (*) ได้แก่ clones no. p6 และ p12

s16, Positive control; HuScFv that can bind to sTTX

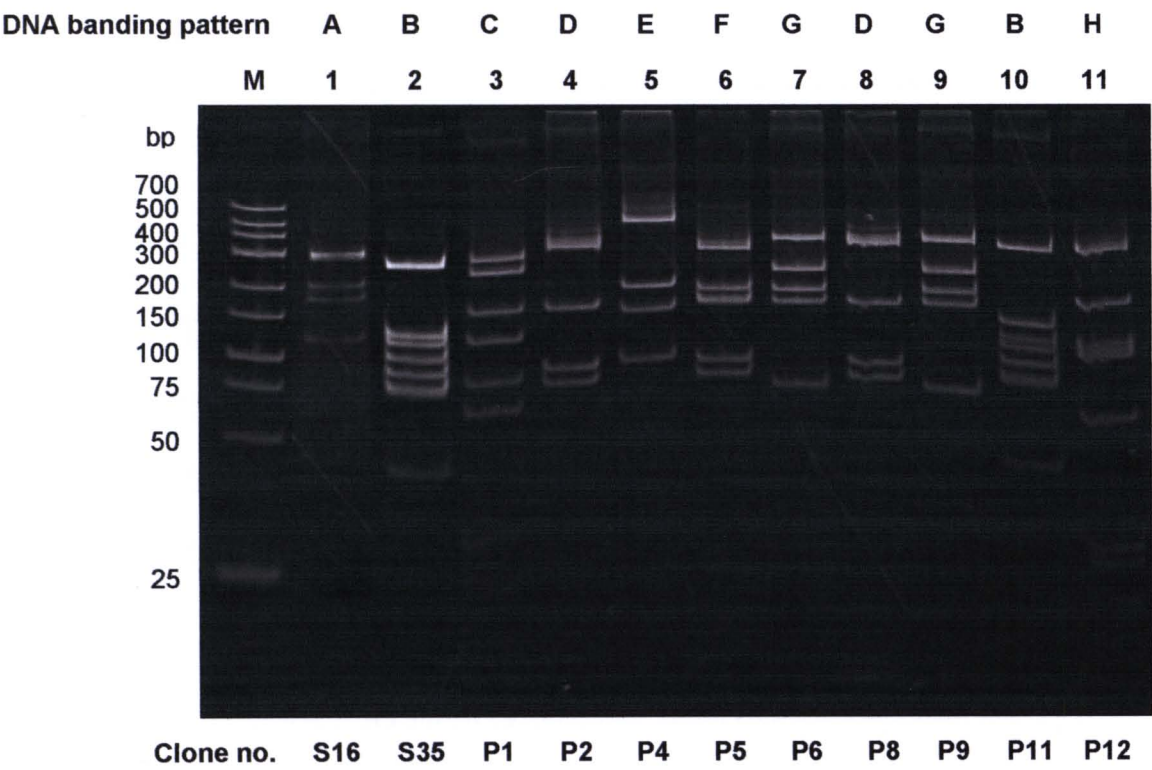
HB, lysate of original HB2151 *E. coli* (background binding ของ *E. coli* lysate หรือ negative HuScFv control)

3.5 การตรวจสอบ restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ DNA sequences ที่เป็นรหัสแอนติบอดีของมนุษย์ (*huscfv*) เพื่อดูความหลากหลายของแอนติบอดี

รูปที่ 25 แสดง restriction fragment length polymorphism ของ *huscfv* sequences จาก sTTX specific-*E. coli* clones no. s16 และ s35 และ *huscfv* sequences จาก pTTX specific-*E. coli* clones no. p1, p2, p4, p5, p6, p8, p9, p11 และ p12 เมื่อตัดด้วย *MvaI* endonuclease เพื่อแสดงความหลากหลายของ *huscfv* sequences พบว่า *huscfv* sequences จาก 11 clones มี DNA banding patterns ต่างกัน 8 patterns ให้ชื่อว่า แบบ A-H

3.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของโคลน s16 และ s35

รูปที่ 26 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากสายนิวคลีโอไทด์ของโคลน s16 และ s35 พร้อมทั้งแสดงส่วน immunoglobulin frameworks และ CDRs



รูปที่ 25: แสดง Restriction fragment polymorphism ของ *huscfv* sequences จาก *E. coli* clones no. s16, s35, p1, p2, p4, p5, p6, p8, p9, p11 และ p12 (lanes 1-11 ตามลำดับ) เมื่อตัดด้วย *MvaI* endonuclease

Lane M, 100 bp DNA ladder

พบว่า *huscfv* sequences จากทั้ง 11 clones มี RFLP ต่างกัน 8 แบบ ให้ชื่อว่าแบบ A-H คือ clones no. s16 (pattern A, lane 1), s35 และ p11 (pattern B, lanes 2 and 10), p1 (pattern C, lane 3), p2 และ p8 (pattern D, lanes 4 and 8), p4 (pattern E, lane 5), p5 (pattern F, lane 6), p6 และ p9 (pattern G, lanes 7 and 9), และ p12 (pattern H, lane 11)

A

VH

```

<----- FR1 -----> <----- CDR1 ----->
S16 GAGGTCCAGCTGCTACCTCTGGAGCAGAGGTGAAAGAGCCCGGGAGTCTCTGAGATCTCTGTAAGGTTCT GATACAGCTTTACCACTACTCG
S35 GAGGTCCAGCTTTGTGCACTCTGGGCTGAGGTGAAAGAGCTCGGGCCTCAGTGAAGTTTCTTGCAAGGTTCT GATACAGCTCTACTAGTTATCAA

<----- FR2 -----> <----- CDR2 -----> <----- FR3 ----->
S16 ATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGCTCGAGTGGATGGGATC ATCTATCTGTGTACTCTGTATCC AGTACAGCCCTCTCCAGGGC
S35 GTGCATGGGTGCGCCAGGCGCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGCGG ATCACTCTGACAGTGTATCC ATATTGTCTCAGAGTTCACAGGGC

<----- FR3 -----> <----- CDR3 ----->
S16 CAGGTCAACATCTCAGCGACAGTCCATCAGCACCGCTACCTGTCAGTGGAGCAGCTGAGGCTCGGACACCGCATGTATTACTGT GCGAGATTA
S35 AGAGTCTCATTTGGTAGGGACATCTCGGACACAGCTACATGACCTGATAGTACCTGAGACCTGAAGACACGCTGTGTACTACTGT GCGAGA---

<----- CDR3 -----> <----- FR4 ----->
S16 AGCTCCATTACTATGTTTCGGAGTATTTCACGGTATGAGGTC TGGGSCCAAGGACCCAGGTCACCGTCTCTCTCA
S35 -----GGTACTT-----GCAACTGTTTC-----GACCTT TGGGSCCAAGGACCTGAGTCAACCGTCTCTCTCA

<----- PEPTIDE LINKER ----->
S16 GGTGGCGGTGGCTCGGCGGTGGTGGTGGTGGGCGGATCT
S35 GGTGGCGGTGGCTCGGCGGTGGTGGTGGTGGGCGGATCT

```

VL

```

<----- FR1 -----> <----- CDR1 ----->
S16 AACATCGTGTATGACCTCTCCAGCTCTCCCTGCTGTCTCTGCGCGAGGAGGAGCCACCATGACCTGCAAGTCTAGC CAGAGTGTATTTCCAGCTCC
S35 GATATTGTGTATGACCTCTCCAGCTCTCCCTGCTGTCTCTGCGCGAGGAGGAGCCACCATGACCTCTGCAAGTCTAGT CAGAGTGTATTTCCAGCTCC

<----- CDR1 -----> <----- FR2 -----> <----- CDR2 -----> <----- FR3 ----->
S16 GACATAGGAGCTCC TTAGCTTGATACCAAGAAACCAAGCCAGCTCTTAAGTGTCTATTAC TGGGATCT ACCCGGAGATCGGGGTCTCTGAC
S35 ATGAGTATACATAT TTGATTTGGTACTCGAGAAACCTGGCTGGCGCCAGGCTCTCATCTAT GATGATCTC AAGAGGAGCCATGGATCTCCAGAGC

<----- FR3 -----> <----- CDR3 ----->
S16 CGATTTCAGTGGCAGCGGCTCTGGGACAGATTTCACTCTCAGCATCAGCAGCTGAGGCTGAGATGTAGAGTGTATATCTCT CAGCACTATATAGC
S35 AGTTTCAGTGGCAGCGGCTCTGGGACAGATTTCACTCTCAGCATCAGCAGCTGAGGCTGAGATGTAGAGTGTATATCTCT CAGCACTATATAGC

<----- CDR3 -----> <----- FR4 ----->
S16 AGTCCGTACACT TTGGGCGAGGAGGACCAAGCTGGAATCAAA
S35 TCACCGCTCACT TTCGGCGAGGAGGACCAAGCTGGAATCAAA

```

B

VH

```

<----- FR1 -----> <----- CDR1 -----> <----- FR2 -----> <----- CDR2 -----> <----- FR3 ----->
S16 EVQLVQSGAEVKKPQESLKISCKGS GYSFTSYN IGWVRQMPGKGLEWMMGI IYPGDSIT RYSPFQGGVITISADKISISTAYLQWSSLEASDTAMYYC
S35 QVQLVQSGAEVKKPQASVIVSKKAS GYVTSYQ VHWVRQAPGQRLWMMGR INTSDDT ILSQRFQGRVLIGRDTISANTAYMDLSSLRPEDTAVYYC

<----- CDR3 -----> <----- FR4 -----> <----- peptide linker ----->
S16 ARLSSNYGSGSYFHGMDV WQGGTITVTSS GGGGSGGGGSGGGG
S35 AR-----GYFANNPDL WQGGTITVTSS GGGGSGGGGSGGGG

VL
<----- FR1 -----> <----- CDR1 -----> <----- FR2 -----> <----- CDR2 -----> <----- FR3 ----->
S16 NIVMTQSPDLSAVSLGERATMNCSS QSVFSSSDNRNS LAWYQKPGQPPKVLII WAS TRESGVDFRFGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYC
S35 DIVMTQSPPLSLPTPEGPASISCRSS QSLLSNGY-NY LDWYLQKPLAPRLII DAS KRATGIPDFRFGSGSGTDFTLTINRVEPEFAVYYC

<----- CDR3 -----> <----- FR4 ----->
S16 QHYYSPTT PQGGTKLEIK
S35 QYQSSPLT PQGGTKLEIK

```

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

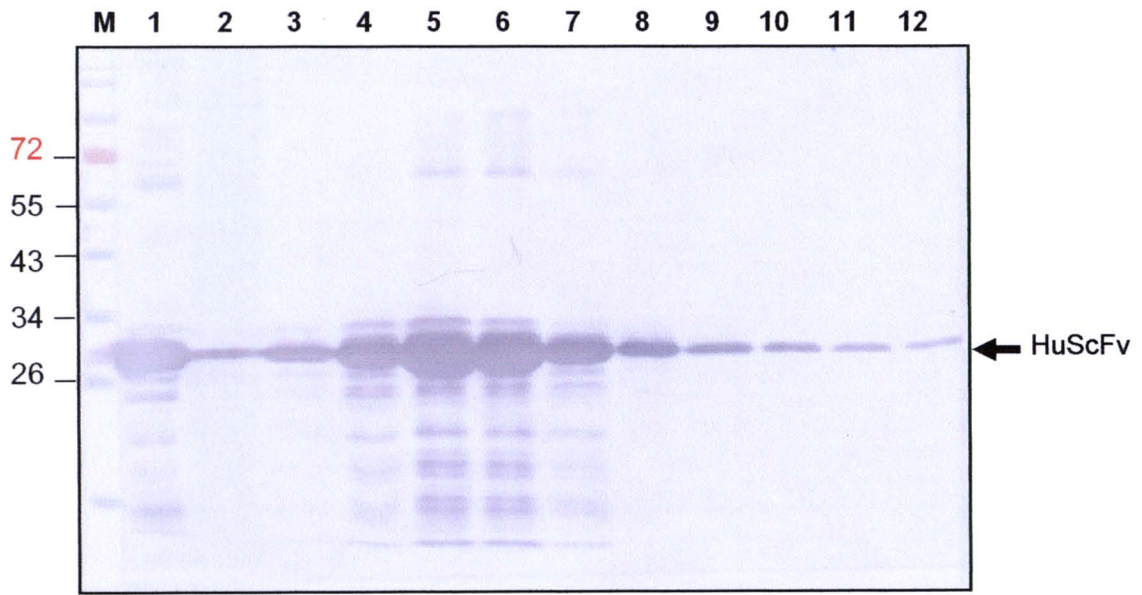
- (A) Nucleotide sequences แสดง immunoglobulin frameworks (FRs) และ complementarity determining regions (CDRs) และ peptide linker (อักษรสีแดง) ของ clones s16 และ s35 ตัวอักษรที่ป้ายสีเหลืองแสดง nucleotides ที่เหมือนกันของโคลน s16 และ s35
- (B) Deduced amino acid sequences of clones s16 and s35 แสดง immunoglobulin frameworks (FRs) และ complementarity determining regions (CDRs) และ peptide linker (อักษรสีแดง)
- “|” แสดง identical amino acids; “:” แสดง conserved amino acid substitutions; และ “.” แสดง semiconserved amino acid substitutions)

ผลการวิจัยของกิจกรรมข้อที่สี่:

ผลิตและเตรียมโมเลกุล 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

คณะผู้วิจัยได้ทำการ subcloned *huscfv* sequences จาก *huscfv*-phagemid transformed-HB2151 *E. coli* ไปยัง pET23b⁺ แล้วนำ *huscfv*-pET23b⁺ vector เข้าสู่ BL21(DE3) *E. coli* ดังกล่าวแล้วในข้อ 4.1 ของบทที่ 5 คณะผู้วิจัยได้นำ *huscfv*-pET23b⁺ transformed-BL21(DE3) *E. coli* ไป inoculated ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด LB broth ปริมาตร 200 ml ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ (ampicillin, 100 µg/ml) แล้วนำไป incubated ที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm จนได้ OD ที่ A_{600nm} ประมาณ 0.4-0.5 จึงทำการเติม IPTG เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.05 mM จากนั้น ทำการ incubated พร้อมเขย่าที่ 37°C ต่ออีก 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อ *E. coli* โดยนำ culture ไปปั่นที่ความเร็ว $4,000 \times g$, 4°C เป็นเวลา 20 นาที ดูดน้ำใสทิ้ง และเติม lysis buffer ปริมาตร 20 ml ลงใน bacterial pellet ผสมให้เข้ากันเป็น homogeneous suspension แล้วนำไปกวนด้วย magnetic stirrer แล้วนำไปปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ที่มี crude HuScFv preparation ไว้ นำ crude HuScFv ไป purified โดยใช้ Ni-NTA resin ก่อนนำไปประเมินประสิทธิภาพการจับล้างพิษ tetrodotoxin ต่อไป รูปที่ 27 และ รูปที่ 28 แสดง HuScFv ใน fractions ต่างๆจากการ purified ด้วย Ni-NTA affinity resin ส่วนรูปที่ 29 แสดง purified HuScFv ก่อนและหลัง refolding



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

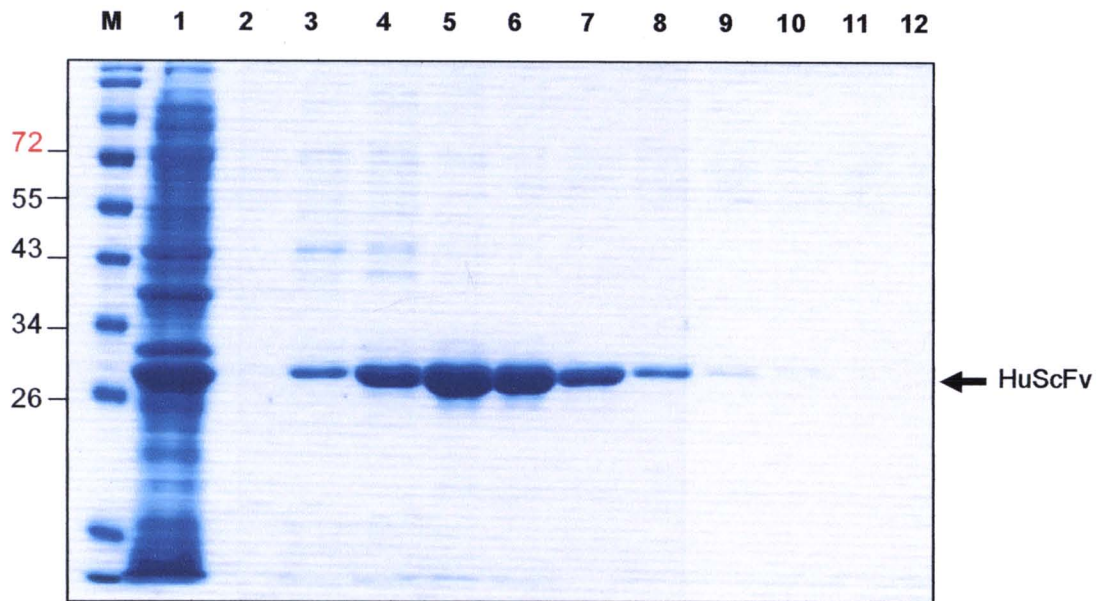
Lane M, Standard protein molecular mass marker

Lane 1, Ni-NTA unbound fraction (flow through)

Lanes 2-11, Eluted fractions from Ni-NTA column using different imidazole concentrations (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 และ 450 mM, respectively)

Lane 12, Wash fraction before eluting with imidazole

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดง Protein molecular masses (kDa)



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

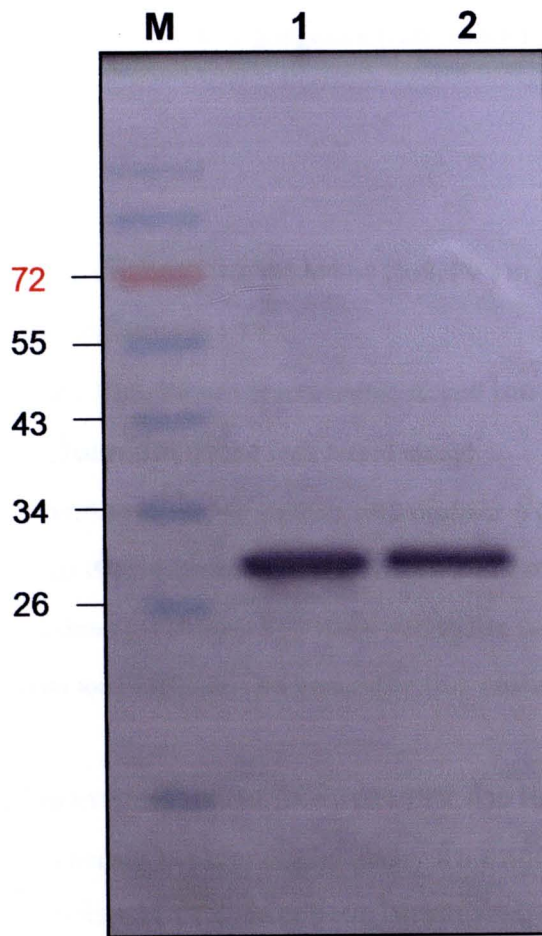
Lane M, Standard protein molecular mass marker

Lane 1, Ni-NTA unbound fraction (flow through)

Lanes 2-11, Eluted fractions from Ni-NTA column using different imidazole concentrations (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 และ 450 mM, respectively)

Lane 12, Wash fraction before eluting with imidazole

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดง Protein molecular masses (kDa)



รูปที่ 29: ผล Western blot analysis เพื่อตรวจหา HuScFv ก่อนและหลังการ refolding (lanes 1 and 2 ตามลำดับ)

Lane M, Standard protein molecular mass marker

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดง Protein molecular masses (kDa)



กิจกรรมการวิจัยของส่วนที่สอง:

การประเมินคุณสมบัติของ HuScFv จาก phagemid transformed *E. coli* clones ในการลดล้างพิษของ tetrodotoxin

ผลของกิจกรรมข้อที่ห้า:

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

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

สารที่ใช้ในการทดลองนี้คือ Veratridine และ ouabain ซึ่งมีฤทธิ์เสริมกันในการนำไอออนของโซเดียม (sodium ion) เข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นมาก ทำให้เซลล์บวม และตายในที่สุด แต่เมื่อมีสารพิษ TTX ซึ่งมีฤทธิ์ปิดกั้น sodium ion channel อยู่ร่วมกับ veratridine และ ouabain ด้วย จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการนำ sodium ion เข้าสู่เซลล์โดย veratridine และ ouabain ทำให้ยับยั้งการบวมและตายของเซลล์ได้

สำหรับการศึกษาการลดล้างความเป็นพิษของ TTX ด้วย HuScFv ที่ผลิตมาจากการคัดเลือก HuScFv display phage clones ด้วย phage display library นั้น มีหลักการคือถ้าหาก HuScFv สามารถจับและลดล้างความเป็นพิษของ TTX ได้จะส่งผลให้เซลล์ที่ exposed ต่อ TTX + veratridine + ouabain บวมและตายเนื่องจากฤทธิ์ของ veratridine และ ouabain ที่ไม่มี TTX มาขัดขวางเพราะ TTX ถูกยับยั้งโดย HuScFv

ก. ผลของ Veratridine และ ouabain ต่อ mouse neuroblastoma cells

ภายหลังจากเติม 0.05 mM veratridine และ 1.0 mM ouabain อย่างละ 50 μ l ลงในเซลล์ทุกหลุม (กลุ่มควบคุมที่ใช้ในการทดลองข้อนี้คือเซลล์ที่เติม DMSO เข้มข้น 4% ปริมาตร 50 μ l แทน veratridine และ medium ที่ถูกเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้น 95.14% ปริมาตร 50 μ l แทน ouabain) แล้วนำเซลล์ไปบ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจหาจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยการย้อมด้วย neutral red หลังจากสกัดสีออกจากเซลล์แล้วนำไปอ่านค่า OD ที่ A_{540nm} (ค่าของ a) ได้เท่ากับ 0.147 ± 0.009 เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิตพบว่ามีเซลล์รอดชีวิตคิดเป็น 40.95% ของเซลล์ในกลุ่มควบคุมซึ่งมี OD ที่ A_{540nm} ของกลุ่มควบคุม (ค่าของ b) เท่ากับ 0.359 ± 0.095 ดังนั้นจำนวนเซลล์ที่ OD 0.359 ± 0.095 จึงเป็น OD ที่เซลล์รอดชีวิตเมื่อไม่มี veratridine และ ouabain

a, ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ veratridine และ ouabain = 0.147 ± 0.009

b, ค่า OD ของเซลล์ที่บ่มกับ diluents ของ veratridine และ ouabain หลังจากหักลบ

background cell death ออกไปแล้ว $= 0.359 \pm 0.095$

ข. การปิดกั้น Sodium ion channel ของ TTX เพื่อช่วยชีวิต (rescue) เซลล์จากฤทธิ์ของ veratridin และ ouabain

ทำโดยผสมยูเรีย 1 M ใน 50% cell culture medium กับ pTTX ที่มีความเข้มข้น 400 nM ในปริมาตรที่เท่ากัน (100 μ l) เก็บไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมออกไปให้หมด แล้วเติมของผสมดังกล่าวข้างต้นปริมาตร 100 μ l ลงในเซลล์แต่ละหลุม จากนั้นเติม 0.05 mM veratridine และ 1.0 mM ouabain ปริมาตร อย่างละ 50 μ l ลงไป นำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจหาเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยการย้อมด้วยสีย้อมเซลล์ neutral red หลังจากสกัดสีออกจากเซลล์แล้วนำไปอ่านค่า OD ที่ A_{540nm} (ค่าของ c) ได้ค่า OD เท่ากับ 0.472 ± 0.108 (มากกว่าค่า b หรือ 0.359 ± 0.009 ซึ่งเป็น OD สูงสุดของเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากหักลบ background cell death ออกไปแล้ว) ซึ่งจะถูกนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปกป้องเซลล์ของ tetrodotoxin ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การปกป้องเซลล์ของ 200 mM TTX $= (c-a) / (b-a) \times 100 = 100\%$

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ veratridine และ ouabain (a) กับเซลล์ที่บ่มกับ pTTX ก่อนเติม veratridine และ ouabain (c) โดยวิธีทางสถิติ independent *t*-test พบว่าค่าเฉลี่ยของเซลล์ทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.009$)

ค. การศึกษาประสิทธิภาพของ HuScFv ในการลดล้างความเป็นพิษของ tetrodotoxin

นำ purified HuScFv จาก clone s16 และ s35 (test) หรือ irrelevant HuScFv (antibody control) (50 μ g/ml) ปริมาตร 100 μ l ไปผสมกับ pTTX ความเข้มข้น 400 nM ปริมาตร 100 μ l เก็บไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมของผสม (HuScFv แต่ละความเข้มข้นกับ pTTX) ปริมาตร 100 μ l ลงในเซลล์แต่ละหลุม และเติม 0.05 mM veratridine และ 1.0 mM ouabain ปริมาตร อย่างละ 50 μ l ลงไป นำเซลล์ไปบ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจหาจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยการย้อมด้วยสี neutral red หลังจากสกัดสีออกจากเซลล์แล้วนำไปอ่านค่า OD ที่ A_{540nm} (ค่าของ d และ e) จากนั้นนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ HuScFv ที่สามารถยับยั้งการปกป้องเซลล์ของ TTX (200 nM) ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ HuScFv ที่สามารถยับยั้งไม่ให้ TTX (200 nM) ปกป้องเซลล์จากฤทธิ์ของ veratridine และ ouabain (HuScFv สามารถ neutralize TTX ได้):

$$= 100 - [(c-a) \times (d-a) \div (c \times (e-a))] \times 100$$

ผลการทดลองพบว่า

ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ HuScFv จากโคลน s16 + pTTX (molecular ratio ของ HuScFv:TTX = 4.54 : 1) + veratridine + ouabain ในข้อ ค. (high cell death because the TTX was inhibited by HuScFv) มีค่า $d = 0.155 \pm 0.007$

ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ HuScFv จากโคลน s35 + pTTX (molecular ratio ของ HuScFv : TTX = 4.24 : 1) + veratridine + ouabain ในข้อ ค. (high cell death because the TTX was inhibited by HuScFv) มีค่า $d = 0.203 \pm 0.044$

ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ irrelevant HuScFv + pTTX (molecular ratio ของ HuScFv : TTX = 4.65 : 1) + veratridine + ouabain ในข้อ ค. (ค่าของ e) = 0.264 ± 0.060 (most cells were rescued by the TTX because the TTX was inhibited, “minimally” if there were any, by the irrelevant HuScFv)

จากการคำนวณโดยใช้ OD ที่ A_{540nm} ของ a, b, c, d และ e พบว่า

1. ความเข้มข้นของ HuScFv จากโคลน s16 ปริมาณ 2.5 μ g ที่ใส่ในหลุมทดสอบ สามารถยับยั้งไม่ให้ 200 nM pTTX ปกป้องเซลล์จากฤทธิ์ของ veratridine + ouabain ได้ 95.15% และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย d จากโคลน s16 (0.155 ± 0.007 ปกป้องเซลล์ได้ 95.15%) กับค่า e ของ irrelevant HuScFv + pTTX + veratridine + ouabain (0.264 ± 0.060 ปกป้องเซลล์ได้ 31.07%) โดยวิธี independent *t*-test พบว่าค่าเฉลี่ยของเซลล์ทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.005$) แสดงว่า จาก HuScFv โคลน s16 ปริมาณ 2.5 μ g ที่ใส่ในหลุมทดสอบ สามารถยับยั้งไม่ให้ 200 mM pTTX ปกป้องเซลล์จากฤทธิ์ของ veratridine + ouabain ได้ และดีกว่า irrelevant HuScFv อย่างมีนัยสำคัญ

2. ความเข้มข้นของ HuScFv จากโคลน s35 ปริมาณ 2.5 μ g ที่ใส่ในหลุมทดสอบ สามารถยับยั้งไม่ให้ 200 mM pTTX ปกป้องเซลล์จากฤทธิ์ของ veratridine + ouabain ได้ 67.08 % แต่เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี independent *t*-test ระหว่างของค่าเฉลี่ย d จากโคลน s35 (0.203 ± 0.044 ที่ยับยั้ง 200 mM TTX ไม่ให้ปกป้องเซลล์ได้ 67.08 %) กับ e ของ irrelevant HuScFv + pTTX + veratridine + ouabain (0.264 ± 0.060 ที่ยับยั้ง 200 mM TTX ไม่ให้ปกป้องเซลล์ได้ 31.07%) พบว่า ค่าเฉลี่ยของเซลล์ทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($p = 0.076$) แม้จะดูเหมือนว่าค่า d จากโคลน s35 จะน้อยกว่า ค่า e (HuScFv จากโคลน s35 ยับยั้ง 200 mM TTX ไม่ให้ปกป้องเซลล์ได้มากกว่า irrelevant HuScFv) ก็ตาม

แสดงว่า HuScFv จากโคลน s35 neutralize 200 mM TTX ได้ไม่ดีเท่า HuScFv โคลน s16 เมื่อใช้ปริมาณ 2.5 μ g เท่ากัน (molecular ratio ของ s16 HuScFv : TTX = 4.54 : 1 และ molecular ratio ของ s35 HuScFv : TTX = 4.24 : 1) ซึ่งเป็นไปได้ว่า HuScFv จาก s16 และ s35 จับที่โมเลกุลของ TTX ที่หมู่ ions ที่ตำแหน่งต่างกัน หรือมี affinity ไม่เท่ากัน (HuScFv จากโคลน s16 และ s35 มี *huscFv* sequences และ RFLP patterns ต่างกัน) ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ HuScFv จากโคลน s16 สำหรับการทดสอบ *in vivo* TTX neutralization ต่อไป

จากการที่ HuScFv จากโคลน s35 (molecular ratio ของ HuScFv : TTX = 4.24 : 1) ไม่สามารถ neutralize TTX ได้ดีกว่า irrelevant HuScFv (background antibody control หรือ non-

specific neutralization) อย่างชัดเจนหรือมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.076$) จึงควรทดสอบ HuScFv จากโคลน s35 ปริมาณมากขึ้น (molecular ratio ระหว่าง HuScFv : TTX มากขึ้น) เพื่อให้เห็นความแตกต่างในการ neutralize TTX ระหว่าง HuScFv จากโคลน s35 และ irrelevant HuScFv

5.2 ความสามารถของ HuScFv จาก *E. coli* clone ในการลดความเป็นพิษของ TTX จากการทดสอบในหนูทดลอง (HuScFv mediated-TTX neutralization in mice)

5.2.1 วิธีมาตรฐาน คือ incubate HuScFv/control กับ TTX ก่อนนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนูทดลอง คือ หนูไมซ์ ICR เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 20 กรัม กลุ่มละ 6 ตัว

พบว่า HuScFv จากโคลน s16 (60 μ g) ที่บ่มกับสารพิษ pTTX (1.5 MU or 0.3 μ g) (จำนวนโมเลกุล s16 HuScFv : pTTX = 2.32 : 1) สามารถยืดเวลาตายของหนูไมซ์จาก 8.02 ± 0.80 นาทีในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแอนติบอดี เป็น 13.95 ± 1.49 นาที ในกลุ่มที่ได้รับแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยว ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี independent *t*-test แล้วพบว่า HuScFv จากโคลน s16 สามารถทำให้ pTTX-toxicated mice ตายช้าลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า $p < 0.0001$)

ส่วนแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวจากโคลนเอสจากโคลน s35 (100 μ g) ที่บ่มกับสารพิษ pTTX (1.5 MU or 0.3 μ g) (จำนวน โมเลกุล s35 HuScFv : pTTX = 5.42) พบว่า สามารถยืดเวลาตายของหนูไมซ์ จาก 19.19 ± 1.84 นาทีในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแอนติบอดี เป็น 24.35 ± 2.82 นาทีในกลุ่มที่ได้รับ s35-HuScFv อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า $p = 0.028$)

5.2.2 วิธีเลียนแบบการได้รับพิษก่อนแล้วได้รับแอนติบอดีทีหลัง

คณะผู้วิจัยได้ป้อน pTTX ปริมาณต่างๆแก่หนูทดลอง แต่พบว่าแม้จะให้ pTTX ในปริมาณมากถึง 10 MU ของเมื่อนำฉีดเข้าช่องท้อง ก็ไม่สามารถทำให้หนูตายได้

คณะผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาเป็นฉีด 1.5 MU (0.3 μ g) pTTX ให้หนูทดลองก่อน (หนูกลุ่มละ 4 ตัว) และหลังจากนั้น 2 นาที หนูได้รับ s16-HuScFv (180 μ g) (molecular ratio s16-HuScFv : TTX เท่ากับ 6.96 : 1) ในสารละลาย PBS 900 μ l โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เวลาตายเฉลี่ยของหนูในกลุ่มนี้ คือ 26.59 ± 10.47 นาที ซึ่งยืดเวลาตายจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแอนติบอดี (เวลาตายเฉลี่ย 12.75 ± 2.24 นาที) ประมาณ 13.84 นาที

เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Independent *t*-test แล้วพบว่า HuScFv จากโคลน s16 สามารถทำให้ pTTX-toxicated mice ตายช้าลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า $p = 0.037$)

เมื่อลดปริมาณของ pTTX ที่ฉีดเข้าช่องท้องเป็น 0.9 MU (0.18 μ g) แล้วฉีด HuScFv จาก clone s16 เข้าช่องท้อง (96.83 μ g) (HuScFv : TTX + 6.20 : 1) พบว่าหนูที่ได้รับแอนติบอดีรอดชีวิตทั้งหมดในขณะที่หนูที่ได้รับ PBS ตายทั้งหมดในเวลา 44.17 ± 9.89 นาที