

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. วางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้นในการเก็บข้อมูล ออกแบบและสังเคราะห์ oligonucleotide primers สำหรับ amplify human thymic stromal lymphopoietin gene จัดซื้อน้ำยา และสารเคมีสิ้นเปลืองสำหรับห้องปฏิบัติการ
2. ทำการเพาะเลี้ยง lung epithelial cell line ทำการสกัด mRNA และเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR
3. ทำการเพิ่มปริมาณ human thymic stromal lymphopoietin gene ด้วยวิธี PCR ที่ optimize condition แล้ว
4. ทำการ clone amplicon เข้าสู่ cloning vector ตรวจสอบความถูกต้องของ gene insert ที่ตัดออกมาจาก cloning vector แล้ว subclone gene ดังกล่าวเข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม
5. ทำการ transfect *E. coli* ด้วย expression vector จากข้อ 12.4 และคัดเลือก transformant(s) ที่เหมาะสม
6. ทำการ express recombinant human thymic stromal lymphopoietin protein จาก transformant(s) และทำการ purify โปรตีน (recombinant human thymic stromal lymphopoietin protein)
7. ทำ Bio-panning เพื่อคัดเลือก phages ที่ display HuScFv ที่จับกับ recombinant human thymic stromal lymphopoietin โดยนำ recombinant protein ที่เตรียมได้มาตรึงบนผิวของหลุมใน ELISA plate แล้วนำ human antibody phage library ใส่ลงใน plate ดังกล่าว ซึ่ง phages ที่ display HuScFv จำเพาะต่อ human thymic stromal lymphopoietin จะจับกับ recombinant human thymic stromal lymphopoietin ในหลุมของ ELISA plate ส่วน phages ที่ไม่จับจะถูกกำจัดออกโดยการล้างหลายๆครั้ง จากนั้น elute เอา human thymic stromal lymphopoietin bound phages ไปเพิ่มจำนวนในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์พิเศษ
8. ทำการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ recombinant human thymic stromal lymphopoietin จากเซลล์แบคทีเรียซึ่งถูก infect ด้วย phages ที่คัดเลือกได้ในข้อที่ 7
9. ทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับ human thymic stromal lymphopoietin โดยเทคนิคทาง immunological assay
10. ทำการ purify แอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการด้วยเทคนิคที่เหมาะสม เช่น ใช้ affinity resin, gel filtration, ion exchange
11. ทดสอบประสิทธิภาพของ therapeutic fully human monoclonal antibodies ที่ผลิตขึ้นในการยับยั้งการทำงานของ human thymic stromal lymphopoietin ใน cell culture
12. เขียนรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน และ
ห้องปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

ระยะเวลาที่ใช้ในการ ทำการวิจัย 2 ปี

ปีที่ 1

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ	เดือนที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. วางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้นในการเก็บข้อมูล ออกแบบและสังเคราะห์ oligonucleotide primers สำหรับ amplify human TSLP gene จัดหา human lung epithelial cell line และจัดซื้อน้ำยา และสารเคมีสิ้นเปลืองสำหรับห้องปฏิบัติการ												
2. ทำการเพาะเลี้ยง human lung epithelial cells ทำการสกัด mRNA และเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR												
3. Optimize condition แล้วทำการเพิ่มปริมาณ human TSLP gene ด้วยวิธี PCR ที่ optimize condition												
4. ทำการ clone amplicon เข้าสู่ cloning vector ตรวจสอบความถูกต้องของ gene insert ที่ตัดออกมาจาก cloning vector แล้ว subclone gene ดังกล่าว เข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม												
5. ทำการ transfect <i>E. coli</i> ด้วย expression vector และคัดเลือก transformant(s) ที่เหมาะสม												
6. ทำการ express recombinant human TSLP จาก transformant(s) และทำการ purify โปรตีน (recombinant human TSLP)												

ปีที่ 2

กิจกรรม	เดือนที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. เก็บกู้คลังฟาจจาก stock และเตรียมฟาจสำหรับทำ Bio-panning และทำการ bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv												
2. ทำการกระตุ้นการสร้าง HuScFv จากเซลล์แบคทีเรียซึ่งถูก transfect ด้วย individual phage clones												
3. ทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับ human thymic stromal lymphopoietin โดยเทคนิคทาง immunological assay												
4. ทำการ purify แอนติบอดีจากแต่ละโคลนของแบคทีเรียให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการด้วยเทคนิคที่เหมาะสม												
5. ทดสอบประสิทธิภาพของ Therapeutic fully human monoclonal antibodies ที่ผลิตขึ้น ในการยับยั้งการทำงานของ human thymic stromal lymphopoietin ใน cell culture												
6. เขียนรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ และเขียน manuscripts												