

ผลการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การวางแผนปฏิบัติการวิจัย

1. การสั่งซื้อวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และครุภัณฑ์สำหรับการวิจัย
ผู้วิจัยได้เลือก จัดหา และจัดซื้อน้ำยา สารเคมีสิ้นเปลือง วัสดุ และอุปกรณ์ต่างๆ
สำหรับการวิจัยทั้งหมดแล้ว
2. ออกแบบ oligonucleotide primers สำหรับ genes ที่ encode human thymic
stromal lymphopoietin (TSLP) protein
คณะผู้วิจัยได้ออกแบบ oligonucleotide primers สำหรับ genes ที่ encode
human thymic stromal lymphopoietin gene (ตารางที่ 4.1) จาก gene sequence ที่
มีอยู่ในฐานข้อมูล (รูปที่ 4.1) ซึ่งผู้วิจัยพบว่า gene ดังกล่าวจะมีขนาดประมาณ 489 bp
(full length)

ตารางที่ 4.1 แสดง oligonucleotide primers สำหรับการ amplify human thymic stromal
lymphopoietin (TSLP) gene ในการศึกษาครั้งนี้

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'-3')
TSLP-ISF1-HinDIII-F	5'ACAAGCTTATGTTCCCTTTTGCCTTAC3'
TSLP-XhoI-R	5'TGCTCGAGCTGTTGTTTCAGTAAAGGTC3'

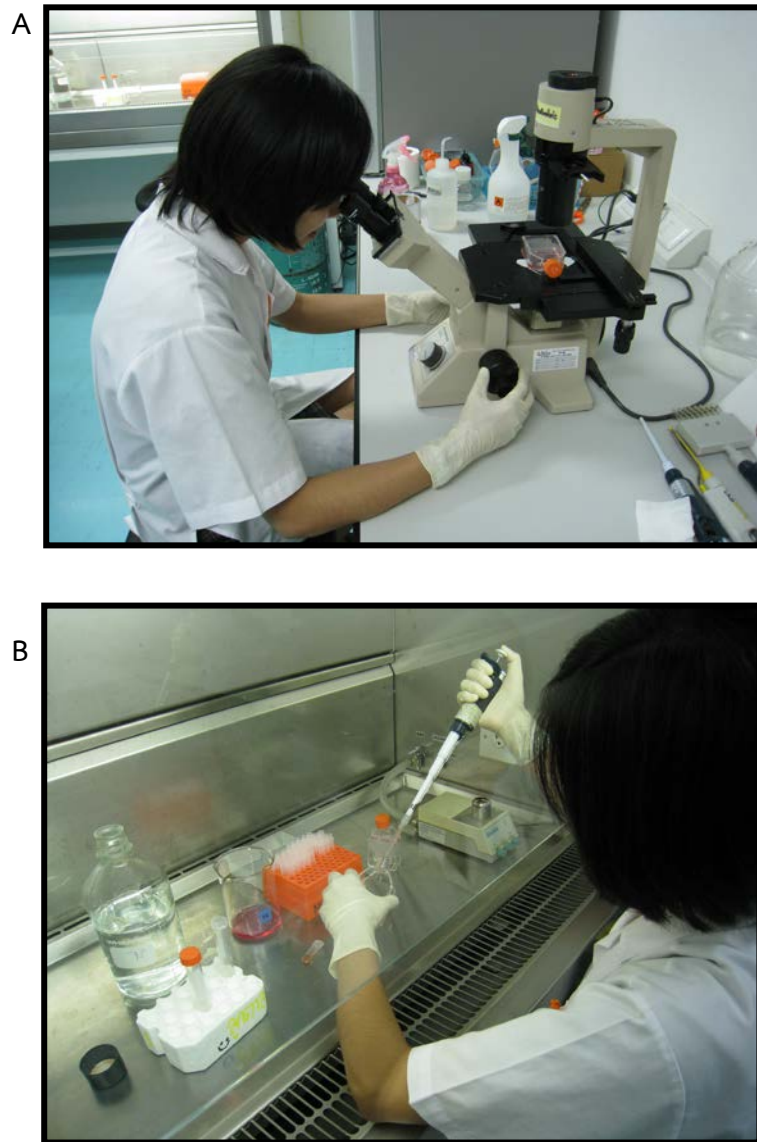
```
1 atgttccctt ttgccttact atatgttctg tcagtttctt tcaggaaaat cttcatctta
61 caacttgtag ggctgggtgt aacttacgac ttcactaact gtgactttga gaagattaaa
121 gcagcctatc tcagtactat ttctaaagac ctgattacat atatgagtgg gacccaaaagt
181 accgagttca acaacaccgt ctcttgtagc aatcggccac attgccttac tgaaatccag
241 agcctaacct tcaatcccac cgccggctgc gcgtcgctcg ccaaagaaat gttcgccatg
301 aaaactaagg ctgccttagc tatctggtgc ccaggctatt cggaaactca gataaatgct
361 actcaggcaa tgaagaagag gagaaaaagg aaagtcacaa ccaataaatg tctggaacaa
421 gtgtcacaat tacaaggatt gtggcgctgc ttcaatcgac ctttactgaa acaacagtaa
```

รูปที่ 4.1 แสดง nucleotide sequences ของ human thymic stromal lymphopoietin gene
ที่มีรายงานในฐานข้อมูล (GenBank accession no. NM 033035)

กิจกรรมที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยง lung epithelial cell line ทำการสกัด mRNA และเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR

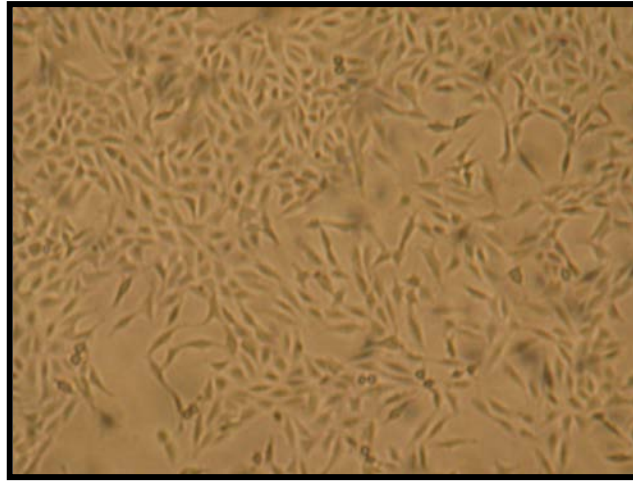
1. การเพาะเลี้ยง lung epithelial cell line

คณะผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยง human lung epithelial cell line (A549) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium (MEM) ที่เติม 10% Fetal Calf Serum (FCS) ในขวดเลี้ยงเซลล์พลาสติกขนาด 75 ตารางเซนติเมตร และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้น ณ อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 48-36 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนจนเต็มพื้นที่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จะทำการเก็บเซลล์ (trypsinization) เพื่อเพิ่มจำนวนในขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วล้างเซลล์โดยเติมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 มล. เพื่อทำการล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนที่เหลือ แล้วเติม 0.025% Trypsin ปริมาตร 5 มล. ทำการบ่มเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที เมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (รูปที่ 4.2) จะพบว่า human lung epithelial cell line ลอยอยู่ใน suspension จากนั้นนำ cell suspension ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มล. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ซึ่ง lung epithelial cell จะตกตะกอนลงสู่ก้นหลอดเหวี่ยงส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์เพื่อกำจัด trypsin ออกด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (0.01 M PBS, pH 7.4) ทำการปั่นล้างเซลล์อีกครั้ง เทน้ำใสส่วนบนทิ้งแล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นแบ่ง cell suspension ใส่ขวดเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ นำขวดเพาะเลี้ยงไปบ่มเพาะในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้น ณ อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ (รูปที่ 4.3)

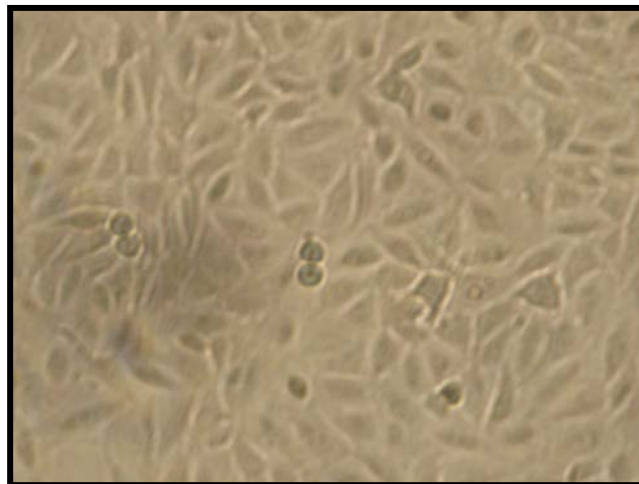


รูปที่ 4.2 แสดงขั้นตอนการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับในการสังเกตลักษณะของเซลล์ (A) และขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ (B)

A



B



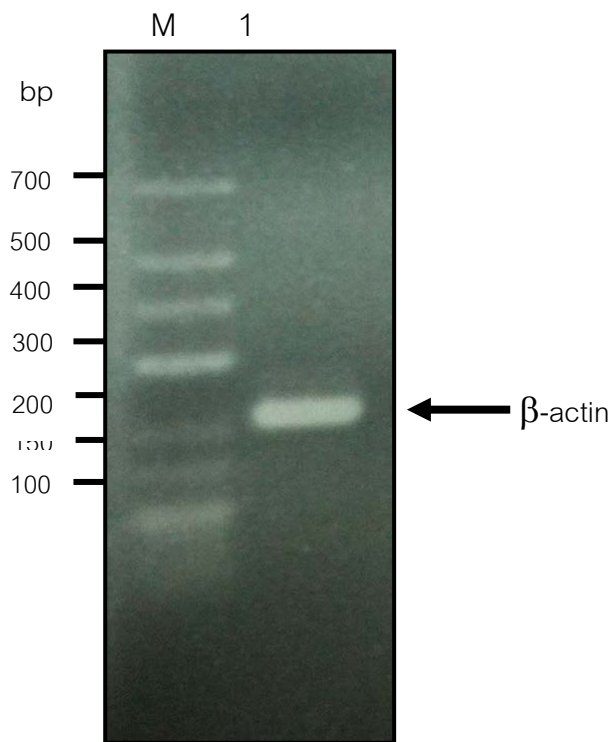
รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของ human lung epithelial cell line (A549)
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X (A) และ 40X (B)

2. การสกัด total RNA และเตรียม cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR

คณะผู้วิจัยได้สกัด Total RNA จาก lung epithelial cell line ที่เพาะเลี้ยงไว้ โดยใช้ RNA extraction kit (Flavogen) ตามคำแนะนำในคู่มือที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ เก่าออก ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำการเก็บเซลล์ด้วยวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว หลังจากปั่นล้างเซลล์ เพื่อกำจัด trypsin ออก เติม lysis solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 400 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 1 นาที นำ cell suspension ใส่ลงใน purification column ที่ใส่ไว้ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มล. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 1 นาที ย้าย purification column ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม wash solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน column ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 1 นาที เติม DNase solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นเติม DNase Wash Solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างอีก 1 ครั้ง แล้วย้าย column ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม elution solution ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 1 นาที total RNA จะอยู่ในส่วนน้ำใสในหลอดทดลอง ทำการ วัดปริมาณความเข้มข้นของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เมื่อพบว่า total RNA มีคุณภาพดีตามต้องการ จึงนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา Revert AidTM H Minus First Strand cDNA synthesis (Fermentas) ซึ่งประกอบด้วยสารเตรียม PCR mixture และ Thermal cycles ดังต่อไปนี้

Ingredient	Volume (μl)
5X Reaction Buffer	4
10 mM dNTP (each)	2.0
Oligo primer	1.0
RiboLock RNase Inhibitor	1.0
Template RNA	5.0 (3 μg)
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase	1.0
DEPC water	6.0

นำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดย บ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที นำ cDNA ที่เตรียมขึ้นมาตรวจสอบคุณภาพโดยการ amplify house keeping gene ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ β -actin gene ในการทดสอบ พบว่าสามารถ amplify β -actin gene (ขนาดประมาณ 250 bp) ได้จาก cDNA ที่เตรียมขึ้น (รูปที่ 4.4) ผู้วิจัยจึงใช้ cDNA ที่เตรียมขึ้นในการ amplify thymic stromal lymphopoietin gene ต่อไป



รูปที่ 4.4 PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ human β -actin-coding sequence ในการ amplify gene เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ cDNA ที่ผลิตขึ้น

Lane M, Low range DNA marker

Lanes 1, human β -actin amplicon

- วิเคราะห์โดย 1% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide
- ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)
- ลูกศรชี้ β -actin gene amplicon ที่ขนาด 250 bp

กิจกรรมที่ 3 ทำการเพิ่มปริมาณ human thymic stromal lymphopoietin gene ด้วยวิธี PCR ที่ optimize condition แล้ว

1. ศึกษา PCR conditions ที่เหมาะสมสำหรับการ amplify thymic stromal lymphopoietin gene

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ human thymic stromal lymphopoietin gene ผู้วิจัยได้ใช้ gradient PCR เพื่อหาอุณหภูมิสำหรับ annealing ที่เหมาะสมที่สุด ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ของแต่ละ gene ประกอบด้วยการเตรียม PCR mixture และ Thermal cycles ดังต่อไปนี้

A. PCR mixture (25 μ l)

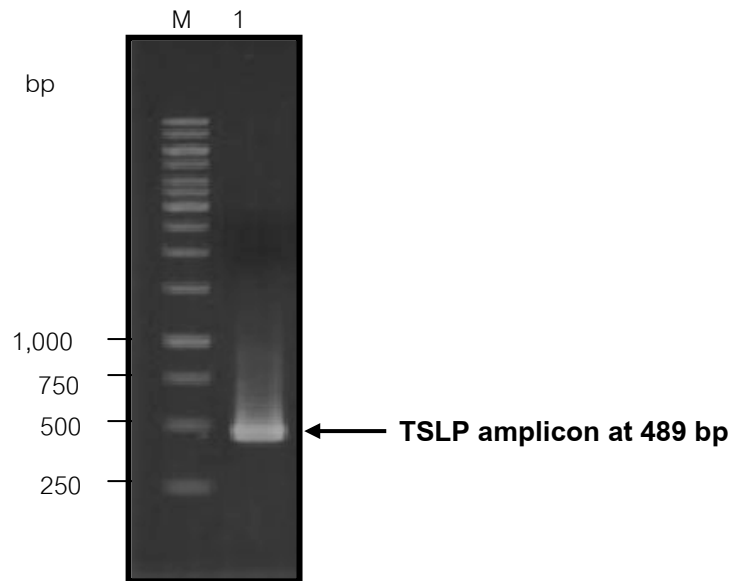
Ingredient	Volume (μ l)	Final concentration
Sterile ultra-pure distilled water (UDW)	16.8	-
10x PCR buffer	2.5	1x
25 mM $MgCl_2$	1.5	1.5 mM
2.5 mM dNTP (each)	2.0	0.2 mM
Primer F (20 μ M)	0.5	0.4 μ M
Primer R (20 μ M)	0.5	0.4 μ M
cDNA	1.0	-
DNA polymerase (5 units / μ l)	0.2	1 unit

B. Thermal cycles

First Denaturation	at 94°C for 5 minutes
30 Cycles of Denaturation,	at 94°C for 30 seconds
Annealing,	at 50°C - 60°C for 30 seconds
and Extension	at 72°C for 40 seconds
Final Extension	at 72°C for 7 minutes

ผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยได้ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ Annealing ที่ให้ PCR amplicons มากที่สุดจากการทดสอบข้างต้นคือ 55°C เพื่อเพิ่มปริมาณ human TSLP gene ดังแสดงผลในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ human TSLP-coding sequence ในการ amplify gene ให้ได้ปริมาณมากพอ

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lanes 1, human TSLP amplicon

- วิเคราะห์โดย 1 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide
- ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)
- ลูกศรชี้ TSLP gene amplicon ที่ขนาด 489 bp

กิจกรรมที่ 4 ทำการ clone amplicon เข้าสู่ cloning vector ตรวจสอบความถูกต้องของ gene insert ที่ตัดออกมาจาก cloning vector แล้ว subclone gene ดังกล่าวเข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม

ได้ทำการ clone TSLP amplicon เข้าสู่ cloning vector และนำ recombinant vector เข้าสู่ *E. coli* host เพื่อเก็บเป็น gene stock ดังนี้

นำ amplified DNA ที่ได้จากกิจกรรมที่ 3 มาเชื่อมต่อกับ cloning vector (pGem-T easy vector) โดยใช้เอนไซม์ ligase และ incubated ที่ 4°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง นำ ligation mixture ไป transformed เข้าสู่ competent *E. coli* host cells โดยใช้วิธี heat-shock transformation จากนั้นนำ transformed *E. coli* preparation ไป spread บน selective agar plate (LB agar ที่เติม ampicillin) และ incubated ที่ 37°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

Screened หา transformed *E. coli* clones ที่ carry recombinant plasmid ที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ TSLP gene พบว่า transformed *E. coli* ที่เลือกมา มี genes เป้าหมาย ทุก clones

จากนั้นสกัด recombinant plasmid ออกจาก transformed *E. coli* clone โดยวิธี alkaline lysis และตรวจลำดับ nucleotides ด้วยการทำ DNA sequencing ทั้งนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของ PCR amplified-DNA sequence ว่าเป็น sequences ของ gene เป้าหมายจริง คือ TSLP gene (รูปที่ 4.6)

กิจกรรมที่ 5 ทำการ transfect *E. coli* ด้วย expression vector และคัดเลือก transformant(s) ที่เหมาะสม

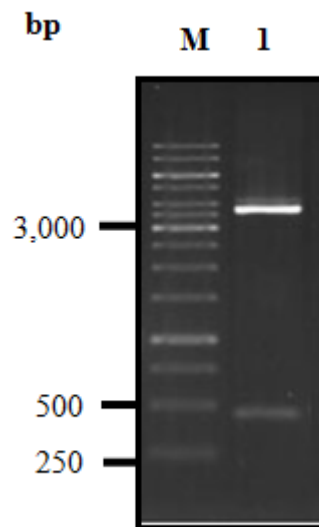
นำ recombinant plasmid จาก transformed *E. coli* clone ที่เลือกได้ไปตัดด้วย เอนไซม์ HindIII และ XhoI ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonucleases) ทำการ subclone เข้าสู่ pET23b vector (protein expression vector) (รูปที่ 4.7) จากนั้นนำ recombinant plasmids ไปใส่ใน competent *E. coli* หลังจากนั้นเลือก *E. coli* transformants ที่เหมาะสม นำไปเพาะเลี้ยงแล้วทำการ induced ให้สร้างโปรตีนเป้าหมายต่อไป (รูปที่ 4.8)

```

atgttcccttttgccttactatatgttctgtcagtttctttcaggaaaatcttcatctta
M F P F A L L Y V L S V S F R K I F I L
caacttgtagggctgggtgttaacttacgacttcactaactgtgactttgagaagattaaa
Q L V G L V L T Y D F T N C D F E K I K
gcagcctatctcagtactatcttctaaagacctgattacatatatgagtgaggacaaaagt
A A Y L S T I S K D L I T Y M S G T K S
accgagttcaacaacaccgtctcttgtagcaatcggccacattgccttactgaaatccag
T E F N N T V S C S N R P H C L T E I Q
agcctaaccttcaatcccaccgccggctgcgcgtcgctcgccaaagaaatgttcgccatg
S L T F N P T A G C A S L A K E M F A M
aaaactaaggctgccttagctatctgggtgcccgaggctattcggaactcagataaatgct
K T K A A L A I W C P G Y S E T Q I N A
actcaggcaatgaagaaggagagaaaaaggaaagtcacaaccaataaatgtctggaacaa
T Q A M K K R R K R K V T T N K C L E Q
gtgtcacaattacaaggattgtggcgctcgcttcaatcgacctttactgaaacaacagtaa
V S Q L Q G L W R R F N R P L L K Q Q -

```

รูปที่ 4.6 แสดง Nucleotide and deduced amino acid sequences of *TSLP* of this study



รูปที่ 4.7 Recombinant plasmid ที่สกัดจาก transformed *E. coli* clone ที่ carry gene coding for TSLP หลังตัดด้วย restriction endonucleases วิเคราะห์โดย run amplified products ใน 1 % agarose gel electrophoresis และ ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lane 1, DNA ของ plasmid (band บน) และ TSLP gene insert (band ล่าง)

- ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)



รูปที่ 4.8 แสดงผลการนำ recombinant plasmid ที่คัดเลือกได้ว่ามี *TSLP* เข้าสู่ protein expression host, *i.e.* BL21DE3 *E. coli*

กิจกรรมที่ 6 ทำการ express recombinant human thymic stromal lymphopoietin protein จาก transformant(s) และทำการ purify โปรตีน (recombinant human thymic stromal lymphopoietin protein)

Induce การผลิต recombinant TSLP protein ใน *E. coli* host

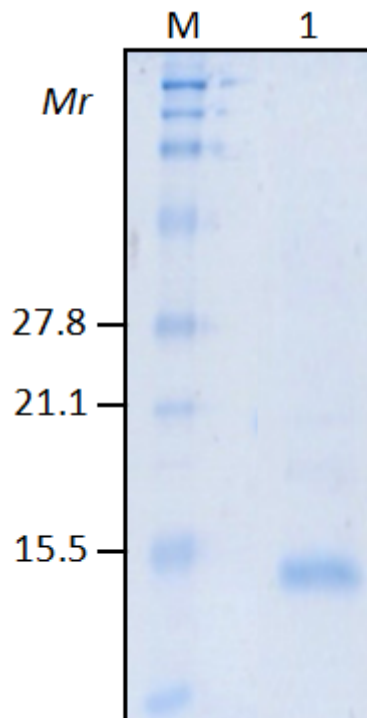
ในการเตรียม TSLP recombinant protein คณะผู้วิจัยได้นำ *E. coli* clone ซึ่ง carry recombinant protein expression vector ซึ่งมี recombinant gene insert ไป grow ใน medium ที่เหมาะสมซึ่งมียาปฏิชีวนะผสมอยู่แล้ว incubated with shaking ที่ 37°C จนได้ log phase ของ *E. coli* culture จากนั้นเติม IPTG ลงไปเพื่อกระตุ้น *E. coli* cells ให้เกิดการ express โปรตีนที่ต้องการ ทำการเลี้ยง *E. coli* cells ต่อไปอีก 4 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ *E. coli* cells โดยการทำ การปั่นที่ความเร็วรอบ 4,000 x g เป็นเวลา 20 นาที

สกัด recombinant TSLP protein ออกจาก whole cell homogenate ของ *E. coli* cells

นำ *E. coli* pellet ที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง ultrasonic disintegrator ซึ่งจะ เรียก preparation ที่ได้ว่า *E. coli* homogenate จากนั้นนำ *E. coli* homogenate ไปปั่นที่ ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 20 นาที นำโปรตีนที่ได้ทั้งสองส่วนไปตรวจสอบหา recombinant protein โดยใช้วิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis

การ Purify recombinant protein ออกจาก *E. coli* homogenate โดยใช้ affinity resin

ผู้วิจัยทำการ purify recombinant TSLP protein โดยใช้ affinity resin และสามารถ purify recombinant TSLP protein ซึ่งมีขนาดประมาณ 15 kDa ออกจากโปรตีนอื่นๆ ของ *E. coli* ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการ identify โปรตีนนี้ด้วยวิธี mass spectrometry แล้ว โดยจะรายงานผลการศึกษาในรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์



รูปที่ 4.9 SDS-PAGE pattern ของ affinity column purified-recombinant TSLP ที่เตรียมจาก transformed *E. coli* ย้อมด้วยสี CBB G250
 Lane M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range
 Lane 1, SDS-PAGE pattern ของ recombinant TSLP (TSLP at ~ 15 kDa)
 - ตัวเลขด้านซ้ายมือคือ Protein molecular weights in kDa

กิจกรรมที่ 7 เก็บกู้คลังฟาจจาก stock และเตรียมฟาจสำหรับทำ Bio-panning และทำการ bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv

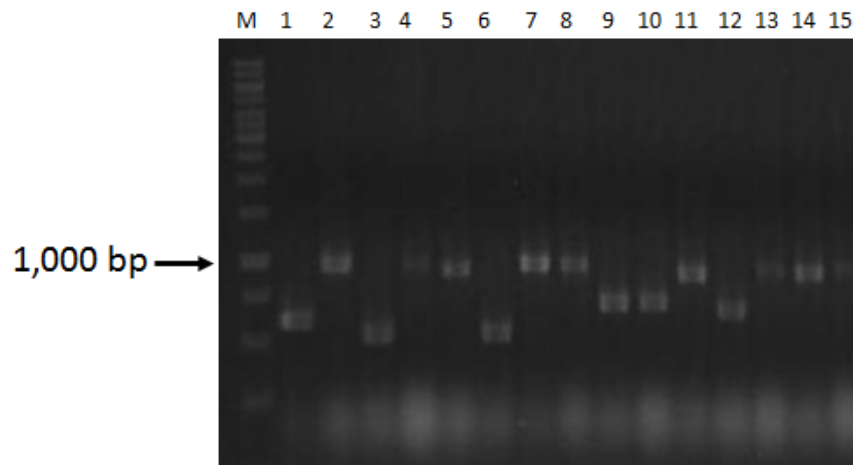
ทำการเก็บกู้คลังฟาจจาก stock (จากผลการวิจัยในปีที่ผ่านมา) โดยนำคลังฟาจมาทำการเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียชนิด *E. coli* ทำการ purify ฟาจเพื่อใช้ในขั้นตอนการทำ Bio-panning

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

การตรึงแอนติเจน: เริ่มจากนำ recombinant human thymic stromal lymphopoietin protein (TSLP) ที่เตรียมได้มาเจือจางใน coating buffer ให้แอนติเจนมีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$ แล้วตรึงบนผิวของหลุมใน ELISA plate โดยเติมสารละลายดังกล่าว 100 μl /หลุม แล้วเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง แล้วล้างแอนติเจนที่ติดกับ solid surface ออกจากหลุมดังกล่าวด้วย washing buffer (PBS-T) จากนั้นทำการ block พื้นผิวหลุมที่ไม่มีแอนติเจนตรึงอยู่โดยการเติม 200 μl 3% BSA แล้ว incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างหลุมด้วย washing buffer

Bio-panning: นำ human antibody phage display library ใส่ลงในหลุมที่ coat ไว้แล้วกับแอนติเจน จากนั้น incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างหลุมด้วย washing buffer phages ที่มีความจำเพาะต่อ recombinant human thymic stromal lymphopoietin protein จะจับกับ TSLP protein ที่ถูกตรึงไว้ ส่วน phages ที่ไม่มีความจำเพาะต่อ TSLP protein จะถูกกำจัดออกโดยการล้างหลายๆ ครั้ง จากนั้นเติม log phase HB2151 *E. coli* ลงไปในแต่ละหลุม ตั้ง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ phages transfect เข้า *E. coli* cells แล้วทำการคัดเลือก phage transfecting *E. coli* โดยนำ HB2151 *E. coli* ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (agar) ที่มียา ampicillin ผสมอยู่ใน agar โดย incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง transfecting *E. coli* ซึ่งมี *huScFv*-phages จะสามารถโตบนอาหารดังกล่าวได้ จากนั้น สุ่มเลือกโคโลนี (single colony) ของ transfecting *E. coli* เพื่อตรวจสอบ *HuScFv* gene และการแสดงออกต่อไป

หลังจากการทำ Bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display human ScFv ที่มีความเฉพาะต่อ TSLP protein จาก human antibody phage display library แล้ว ได้ทำการย้าย phages เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน HB2151 *E. coli* ซึ่ง transfecting *E. coli* นี้สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มี ampicillin ผสมอยู่ได้ ทำการสุ่มคัดเลือกโคลน transfecting *E. coli* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจำนวน 192 โคลน ไปดำเนินการตรวจสอบ *huScFv* gene ด้วยวิธี PCR พบว่า 49 โคลนมี *huScFv* gene ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 แสดงตัวอย่างผลการเพิ่มจำนวน *huscfv* ใน recombinant phagemids ที่คัดเลือก โคลน no. 2, 4, 5, 7, 8, 11, 13-15 แสดง transfected *E. coli* ที่มี *huscfv* gene อยู่ (ขนาด 1,000 bp)

กิจกรรมที่ 8 ทำการกระตุ้นการสร้าง HuScFv จากเซลล์แบคทีเรียซึ่งถูก transfect ด้วย individual phage clone

การเตรียม Lysates จาก *huscfv*-phagemid transformed-HB2151 *E. coli*

1. ทำการ picked single colony ของ *huscfv*-phagemid transformed-HB2151 *E. coli* บน replica plate แต่ละ colony ใส่ลงใน LB-AG broth ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

2. เติม overnight culture จากข้อ (1) ปริมาตร 100 μ l ลงใน LB-A broth ปริมาตร 10 ml และนำไปเพาะเลี้ยงแบบเดิมเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

3. เติม 1 mM IPTG ปริมาตร 10 μ l ลงใน bacterial culture แต่ละหลอด แล้วเลี้ยงเชื้อแบบเดิม เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

4. ปั่นเก็บ bacterial cells ที่ 3,500 x g ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 20 นาที

5. ทำการ resuspended bacterial cells ใน PBS

6. นำ *E. coli* suspension ไปทำให้แตกด้วยวิธี sonication แล้วนำ homogenate ที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนจากแต่ละหลอดเก็บไว้เป็น *E. coli* whole cell lysates

การวิเคราะห์หา HuScFv ใน *E. coli* whole cell lysates ด้วยวิธี Western blot analysis

1. แยกโปรตีนใน lysates ของ *E. coli* แต่ละ preparations ด้วย 12% SDS-PAGE ย้ายแถบโปรตีนจาก SDS-PAGE gel ไปไว้บน nitrocellulose membrane (NC) แล้ว blocked unoccupied sites บน NC ด้วย 3% BSA จากนั้นล้างเอา excess BSA ออก

2. Incubated โปรตีนบน NC กับ 1:3,000 diluted mouse anti-E-tag monoclonal antibody (primary antibody ต่อ E-tagged-HuScFv) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

3. หลังจากนั้นล้าง excess mouse anti-E-tag monoclonal antibody บน NC ออกด้วย 0.05% Tween-20 ใน PBS, pH 7.4 (PBST) แล้ว incubated NC ใน 1:3,000 diluted goat anti-mouse immunoglobulins ที่ถูกติดฉลากด้วย alkaline phosphatase (AP) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

4. ล้าง excess goat anti-mouse immunoglobulins-AP บน NC ออกด้วย PBST จากนั้น incubated NC ใน 0.15 M Tris pH 9.6 เป็นระยะเวลา 15 นาที

5. ใส่ substrate ของ AP คือ freshly prepared working solution ของ commercial BCIP/NBT (KPL, USA) ลงใน tray ที่มี NC แล้วเก็บ tray ไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที

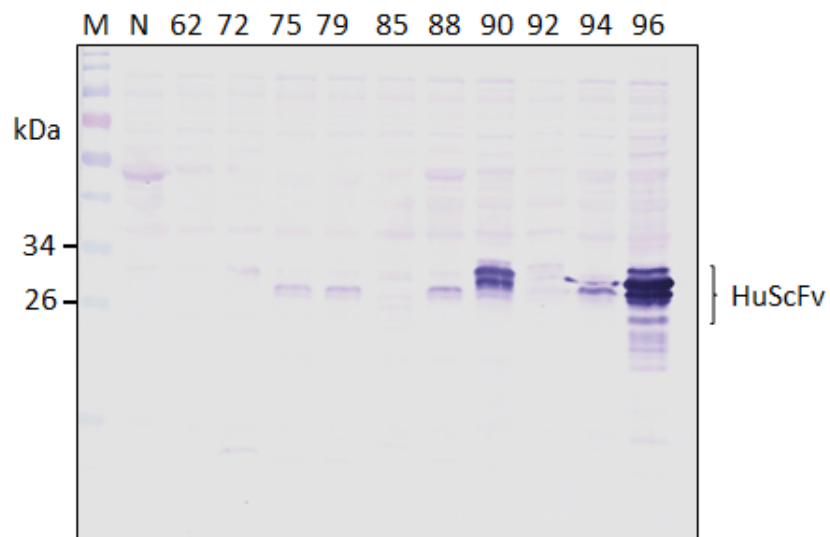
6. หยุดปฏิกิริยาของ AP และ substrate โดยการล้าง NC หลายๆ ครั้งด้วยน้ำกลั่น

7. อ่านผลโดยสังเกตว่ามีแถบสีปรากฏตรงบริเวณ ~25-35 kDa หรือไม่ โดยแถบสีที่ปรากฏอาจเป็น single band, doublet หรือ multiple bands ก็ได้ ซึ่งเมื่อมีแถบสีปรากฏก็แสดงว่า transformed *E. coli* ที่ carry *huscfv* clone นั้นๆ สามารถผลิต HuScFv ได้

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

คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถของ selected HB2151 *E. coli* clones ในการผลิตโมเลกุล HuScFv พบว่า จาก HB2151 *E. coli* จำนวน 49 clones ที่นำมาวิเคราะห์การสร้างโมเลกุล HuScFv พบว่ามีทั้งหมด 20 โคลนสามารถสร้าง HuScFv ได้ คือ clone no. 5, 9, 10, 22, 24, 25, 34, 35, 37, 41, 44, 70, 75, 76, 79, 82, 88, 90, 94 และ 96 ซึ่ง HuScFv ที่ผลิตขึ้นมีขนาดประมาณ *Mr* 25-30 kDa หลังจากการวิเคราะห์ความสามารถของ selected HB2151 *E. coli* clones ในการผลิตโมเลกุล HuScFv คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยนชื่อโคลนใหม่เป็น โคลนที่ 1-20 ตามลำดับเพื่อให้่ายต่อการเรียกชื่อโคลนในขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 4.11 แสดงตัวอย่าง HuScFv ที่ผลิตจาก selected HB2151 *E. coli* clones ซึ่งมีขนาดประมาณ *Mr* 25-30 kDa



รูปที่ 4.11 แสดงตัวอย่าง Western blot analysis ของ HuScFv จาก HB2151 *E. coli* clones

Lane M, Prestained protein marker

Lane N, Negative control (whole cell homogenates ของ HB2151 *E. coli* ที่ไม่มี HuScFv plasmid)

Whole cell homogenates (lysates) ของ HB2151 *E. coli* clones no. 75, 79, 88, 90, 94 และ 96 สามารถผลิต HuScFv ได้ โดยมีขนาดประมาณ 25-30 kDa และ

Whole cell homogenates ของ HB2151 *E. coli* clones no. 62, 72, 85 และ 92 ไม่สามารถผลิต HuScFv ได้

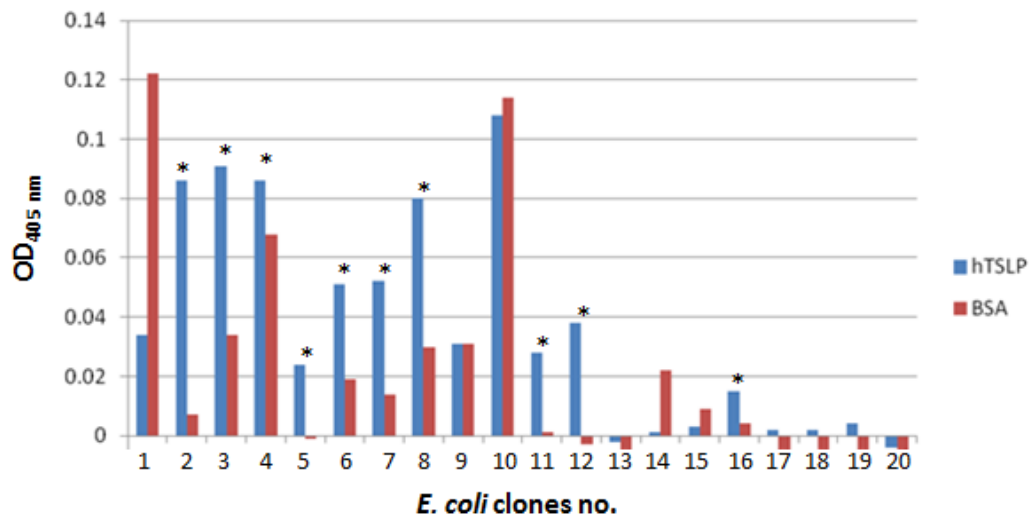
กิจกรรมที่ 9 ทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับ human thymic stromal lymphopoietin โดยเทคนิคทาง immunological assay

การผลิต HuScFv จาก HB2151 *E. coli* clones ที่สามารถผลิต HuScFv ได้ในระดับ small scale production

นำ selected HB2151 *E. coli* clones แต่ละโคลนไป inoculated ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด LB broth ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ (ampicillin, 100 µg/ml) แล้วนำไป incubated ที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่า ที่ 250 rpm จนได้ log phase cultures (OD_{600nm} ประมาณ 0.4-0.5) จากนั้นเติม IPTG แล้ว incubated พร้อมเขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นเหนี่ยวนำให้ *E. coli* สังเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย (HuScFv) จากนั้นทำการปั่นเพื่อเก็บเชื้อจากส่วนตะกอน นำไป sonicate แล้วปั่นเอา supernatants หรือ *E. coli* lysates (crude HuScFv) เก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับ human thymic stromal lymphopoietin โดยเทคนิค ELISA

คณะผู้วิจัยนำ crude HuScFv ที่เตรียมจาก transformed *E. coli* clones จำนวน 20 clones ที่คัดเลือกได้มาจากการทำ phage biopanning โดยใช้ human thymic stromal lymphopoietin เป็นแอนติเจน และให้ผลบวกในการตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (HuScFv) จากกิจกรรมที่ 2 ไปทดสอบการจับของ HuScFv ดังกล่าว ต่อ human thymic stromal lymphopoietin protein ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามี crude HuScFv ใน lysates ของ transformed *E. coli* จำนวน 10 clones คือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ให้ผลบวกใน indirect ELISA คือให้ค่า OD_{405nm} ต่อโปรตีน human thymic stromal lymphopoietin สูงกว่าค่าที่ได้จาก BSA background control อย่างน้อย 2 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.12



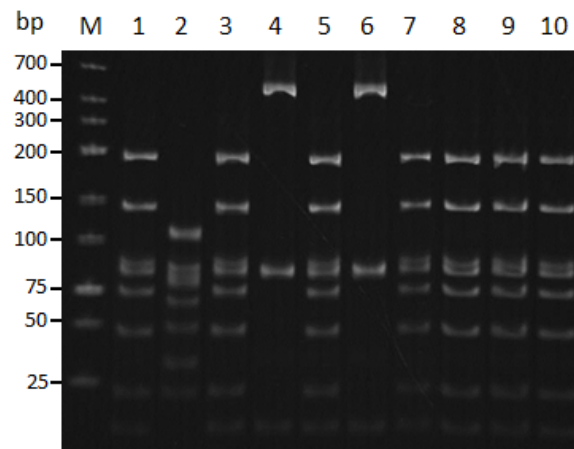
รูปที่ 4.12 แสดงค่า OD_{405nm} ของ ELISA ของ HuScFv ใน lysates ของ *E. coli* 20 clones ต่อ TSLP-(test antigen) coated wells เปรียบเทียบกับ BSA-(antigen control) coated wells พบว่ามี 10 clones ให้ผลบวกในการทดสอบ คือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16

ศึกษา Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ DNA sequences ที่เป็นรหัสของแอนติบอดีของมนุษย์ (*huscfv*) เพื่อดูความหลากหลายของแอนติบอดี

เพื่อตรวจสอบ sequence diversity ของ TSLP-*huscfv* คณะผู้วิจัยได้นำ *huscfv* amplicons ที่ได้ทำการ amplify จาก *E. coli* clones ทั้ง 10 clones ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MvaI* แล้วนำไปวิเคราะห์โดยการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อดู RFLP patterns ของ *huscfv* amplicons จากแต่ละ transformed *E. coli* clones ซึ่งหาก RFLP patterns ของ *huscfv* amplicons จากแต่ละ transformed *E. coli* clones ที่ได้จากการทำ bio-panning ด้วยแอนติเจนเดียวกัน มีจำนวน RFLP patterns ยิ่งมากก็จะยิ่งแสดงว่า HuScFv จาก transformed *E. coli* ที่ทดสอบมีความหลากหลายสูง และน่าจะจับกับ epitopes บน TSLP ที่ต่างกันหรืออย่างน้อยก็มี affinity ต่อ epitope ต่างกัน

จากการทำ *MvaI*-RFLP ของ TSLP-*huscfv* จากแต่ละ transformed *E. coli* clone จำนวน 10 clones พบว่าให้รูปแบบ RFLP ที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 patterns คือ patterns 1 ได้แก่ clones no. 2, 4, 6, 8, 11, 12 และ 16 patterns 2 ได้แก่ clone no. 3 และ patterns 3 ได้แก่ clones no. 5 และ 7 แสดงว่า TSLP-*huscfv* จากแต่ละ transformed *E. coli* clone ที่ได้มีความหลากหลาย

ตัวอย่าง RFLP patterns แสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดง Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ *huscfv* sequences ที่ได้จากการทำ bio-panning โดยใช้ TSLP เป็น panning antigen จำนวนทั้งหมด 3 patterns ดังนี้ patterns 1: clones no. 2, 4, 6, 8, 11, 12 และ 16 ตามลำดับ patterns 2: clone no. 3 และ patterns 3: clones no. 5 และ 7 ตามลำดับ
Lane M, Low range DNA ladder
Lanes 1-10, Clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ตามลำดับ
ตัวเลขด้านซ้ายมือคือ DNA sizes in bp

กิจกรรมที่ 10 ทำการ purify แอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการด้วยเทคนิคที่เหมาะสม เช่น ใช้ affinity resin, gel filtration, ion exchange

นำ selected HB2151 *E. coli* clones แต่ละโคลนไป inoculated ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด LB broth ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ (ampicillin, 100 µg/ml) แล้วนำไป incubated ที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่า ที่ 250 rpm จนได้ log phase cultures (OD_{600nm} ประมาณ 0.4-0.5) จากนั้นเติม IPTG แล้ว incubated พร้อมเขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นเหนี่ยวนำให้ *E. coli* สังเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย (HuScFv) จากนั้นทำการปั่นเพื่อเก็บตะกอน นำ bacterial cells pellet ไป sonicate แล้วปั่นเอา supernatants จากนั้นทำการ purify แอนติบอดีโดยใช้ Ni-NTA affinity column นำ purify HuScFv แต่ละโคลนไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ human thymic stromal lymphopoietin ในขั้นตอนต่อไป

คณะผู้วิจัยพบว่าสามารถ purify HuScFv จาก selected HB2151 *E. coli* clones ทั้ง 10 โคลน คือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 โดย HuScFv ที่ผลิตขึ้นมีขนาดประมาณ Mr 25-30 kDa

กิจกรรมที่ 11 ทดสอบประสิทธิภาพของ therapeutic fully human monoclonal antibodies ที่ผลิตขึ้นในการยับยั้งการทำงานของ human thymic stromal lymphopoietin ใน cell culture

การทดสอบกิจกรรมชีวภาพของ human thymic stromal lymphopoietin ใน cell culture

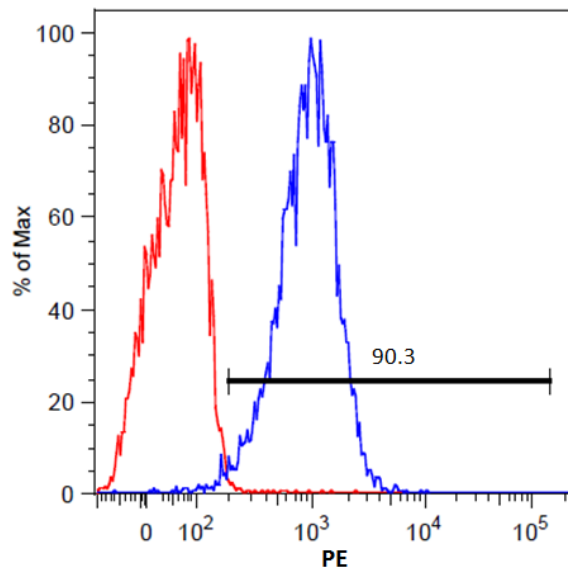
คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบกิจกรรมชีวภาพของ human thymic stromal lymphopoietin ที่ผลิตขึ้นใน cell culture โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการแยก Myeloid dendritic cell จากเลือดของคนปกติ โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้ เก็บเลือดจากคนปกติมาทำการแยก peripheral blood mononucleated cell (PBMC) ด้วย Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) จากนั้นนำ PBMC มาแยก Myeloid dendritic cell โดยใช้ Human Myeloid DC Enrichment kit (STEMCELL Technologies) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบ purity ของเซลล์โดยใช้ Flow cytometry โดยตรวจดู surface marker บนผิวเซลล์ที่สำคัญคือ CD11c⁺

จากการเตรียม Myeloid Dendritic cell ด้วยวิธีข้างต้น และตรวจสอบ purity ของเซลล์โดยใช้ Flow cytometry พบว่าสามารถเตรียม Myeloid dendritic cell ซึ่งมี CD11c บนผิวได้บริสุทธิ์ถึง 90.3% ดังแสดงในรูปที่ 4.14

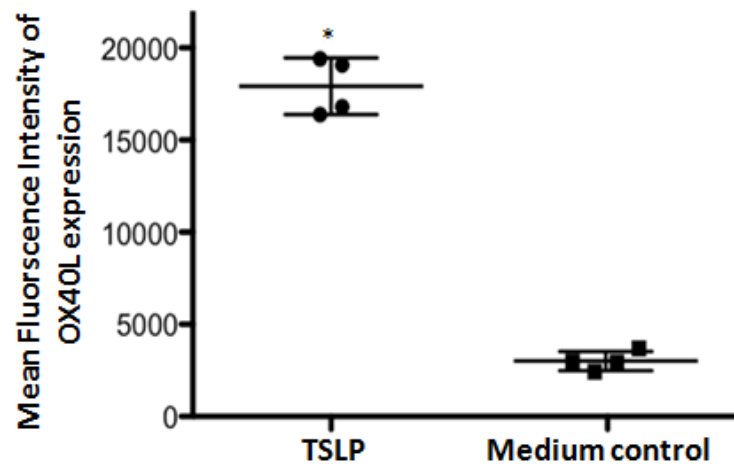
คณะผู้วิจัยนำ Myeloid dendritic cell ที่เตรียมไว้มาแบ่งเซลล์ลงใน 96 well plate โดยแต่ละหลุมจะมีจำนวนเซลล์ 5×10^4 เซลล์ ใน Yssel's medium 200 µl ที่มี TSLP 15 ng/ml ทำการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบ surface marker บนผิวเซลล์ที่จะแสดงออกหลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TSLP คือ OX40L เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นซึ่งจะไม่แสดง OX40L บนผิว

รูปที่ 4.15 แสดง Mean fluorescence intensity ของ OX40L ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TSLP เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น พบว่า Mean fluorescence intensity ของ OX40L ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นมีค่าสูงกว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้น แสดงว่า human thymic stromal lymphopoietin ที่ผลิตขึ้นมี biological activity คณะผู้วิจัยจะทำการทดสอบแบบ

เดียวกันนี้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ human thymic stromal lymphopoietin ด้วย anti-TSLP ทั้ง 10 โคลนต่อไป



รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณเซลล์ที่มี CD11c⁺ (เส้นสีน้ำเงิน) เมื่อเปรียบเทียบกับ isotype control (เส้นสีแดง)



รูปที่ 4.15 แสดง Mean fluorescence intensity ของ OX40L ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TSLP เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น

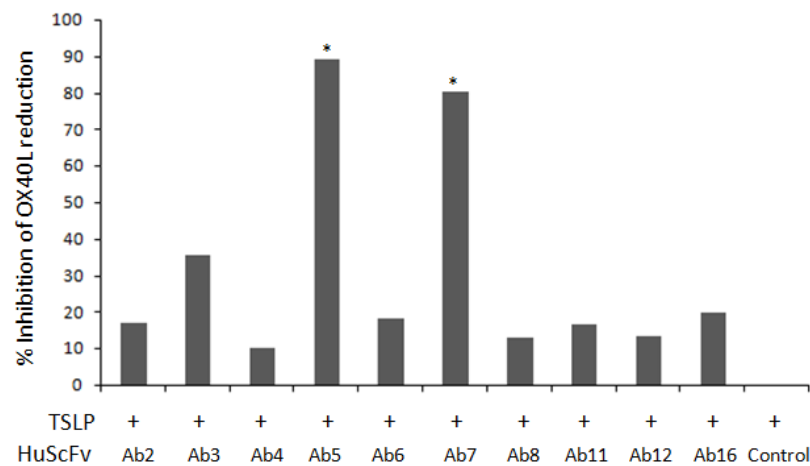
การทดสอบประสิทธิภาพของ therapeutic fully human monoclonal antibodies ที่ผลิตขึ้นในการยับยั้งการทำงานของ human thymic stromal lymphopoietin ใน cell culture

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ human monoclonal antibodies ที่ผลิตขึ้นทั้ง 10 โคลนคือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ในการยับยั้งหน้าที่ของ TSLP โดยการผสม antibodies (20 µg/ml) แต่ละโคลนกับ TSLP ก่อน จากนั้นนำไปใส่ใน well ที่มี Myeloid dendritic cell อยู่ ทำการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบ OX40L บนผิวเซลล์ที่จะแสดงออกหลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TSLP เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น

รูปที่ 4.16 แสดงประสิทธิภาพของ human monoclonal antibodies แต่ละโคลนในการยับยั้งหน้าที่ของ TSLP จะเห็นได้ว่า human monoclonal antibodies โคลนที่ 5 และ 7 แสดง Percent inhibition สูงที่สุดคือ 89 และ 80% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มี monoclonal antibodies และโคลนที่ 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12 และ 16 แสดง Percent inhibition เพียง 10-35% เท่านั้น จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า human monoclonal antibodies โคลนที่ 5 และ 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ TSLP

กิจกรรมที่ 12 เขียนรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ผลและจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์แล้ว



รูปที่ 4.16 แสดงประสิทธิภาพของ human monoclonal antibodies clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ในการยับยั้งหน้าที่ของ TSLP เปรียบเทียบกับกลุ่ม control (Medium alone)