49355201 : MAJOR : BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES
KEY WORDS : PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN/ PHAGE DISPLAY/ SC Fv ANTIBODY
PAKKHAPONG SONGTHONG : SELECTION AND CHARACTERIZATION OF SINGLE CHAIN Fv ANTIBODY SPECIFIC TO PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN USING PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. WISIT TANGKEANGSIRISIN, Ph.D. AND ASST.PROF. SIRIPAN LIMSIRICHAIKUL, Ph.D.. 105 pp.

Prostate specific antigen (PSA) level in serum correlates with prostate diseases; thus, it has been used as a marker for monitoring benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. PSA screening method has been developed for more accurate detection. Monoclonal antibody (mAb) has been used to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). “Phage Display” is a technology for mAb selection; because, this technology is rapid, easy, low cost, and a high affinity antibody selection. The purpose of this study is to select single chain Fv (scFv) antibody from Tomlinson I+J library, which was developed to large diversity of antibody by MRC laboratory. The selected scFv from panning is used for further characterization.

The in vitro selection result shows that the positive clones are enriched in round 4 of panning. Four hundred clones are randomly screened for scFv expression. There are 11 clones that can express scFv antibody specific to PSA. The diversity analysis shows that all clones have an identical DNA fingerprint pattern; this result indicates that there are no variations of all clones. The scFv clone is additionally analyzed for DNA sequencing and purified by Ni^{2+} column. The DNA sequence result finds one amber stop codon (TAG) between V_H genes. The TAG is transferred to GAG by site-directed mutagenesis. The scFv purification using Ni^{2+} column shows the impurity of scFv antibody for further characterizations.

The transformation of scFv construct to Fab construct is considered for more stability and higher affinity of antibody. Fab is purified by Protein G chromatography; it shows the purity of Fab antibody for further studies, including detection limit, cross reactivity, and affinity determination. In conclusion, this study can select the potential scFv and Fab antibody against to PSA. In the future, the characterizations will be improved for more efficient diagnostic tool of PSA detection.

Student’s signature ……

Thesis Advisor’s signature ……

49355201 : สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ

คำสำคัญ : พีเอสเอ / เฟจดิสเพลย์ / sc Fv แอนติบอดี

ภัคพงศ์ ทรงทอง : การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของ Single Chain Fv แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน Prostate Specific Antigen โดยใช้เทคโนโลยีเฟจดิสเพลย์. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ. ดร.วิสิฐ ตั้งเกียงศิริสิน และ ผศ. ดร.สิริพรรณ ลิ้มศิริชัยกุล. 105 หน้า.

ระดับพีเอสเอ (Prostate Specific Antigen, PSA) ในซีรัมมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในต่อมลูกหมาก พีเอสเอจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงของการเกิดโรคต่อมลูกหมากโตและมะเร็งต่อมลูกหมาก ในปัจจุบันการตรวจระดับพีเอสเอในซีรัมถูกพัฒนาให้สามารถตรวจสอบระดับพีเอสเอได้แม่นยำมากขึ้นโดยโมโนโคลนัลแอนติบอดีถูกนำมาใช้เป็นตัวพัฒนาการตรวจสอบพีเอสเอด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเทคโนโลยีเฟจดิสเพลย์เป็นหนึ่งในวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกโมโนโคลนัลแอนติบอดีเนื่องจาก รวดเร็ว สะดวก ลดค่าใช้จ่าย และสามารถคัดเลือกแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงได้ จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการคัดเลือกโมโนโคลนัลแอนติบอดีรูปแบบ single chain Fv (scFv) ที่จำเพาะต่อพีเอสเอของมนุษย์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ Tomlinson I+J library ซึ่งถูกพัฒนาโดย MRC Laboratory ให้มี scFv แอนติบอดีที่หลากหลาย โดยแอนติบอดี scFv ที่ถูกคัดเลือกจากการ panning จะถูกนำไปศึกษาคุณลักษณะต่อไป

จากผลการคัดเลือกด้วยวิธี panning พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของโคลนที่จำเพาะต่อพีเอสเอในรอบที่สี่ของการ panning จึงทำการสุ่มคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจำนวน 400 โคลนมาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดี ผลการศึกษาพบว่ามีจำนวน 11 โคลนที่สร้างแอนติบอดี scFv ต่อพีเอสเอ และเมื่อศึกษาความหลากหลายของโคลนพบว่าโคลนที่คัดเลือกได้มีรูปแบบของ DNA fingerprint เหมือนกัน จึงคัดเลือกตัวแทนมาหนึ่งโคลนเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมถึงการแยกบริสุทธิ์ของแอนติบอดี scFv ด้วยคอลัมน์ Ni^{2+} จากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามี amber stop codon (TAG) ภายในยีน V_H ผู้วิจัยจึงเปลี่ยน TAG ดังกล่าวเป็น GAG codon ด้วยวิธี site-directed mutagenesis อย่างไรก็ตามการแยกบริสุทธิ์ของแอนติบอดี scFv ด้วยคอลัมน์ Ni^{2+} พบว่าความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อ

การเปลี่ยนโครงสร้างของ scFv ไปเป็น Fab เพื่อเพิ่มความคงตัว และความสามารถในการจับกับแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดี Fab ที่ถูกแยกบริสุทธิ์ด้วย Protein G chromatography มีความบริสุทธิ์พอที่จะนำไปทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของพีเอสเอที่แอนติบอดีสามารถตรวจสอบ ความสามารถในการจับอย่างจำเพาะของแอนติบอดี และวัดแรงของการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนได้ การศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือกแอนติบอดี scFv และ Fab ที่จำเพาะต่อพีเอสเอ ซึ่งการศึกษาคุณลักษณะเหล่านี้ของแอนติบอดี Fab เพื่อใช้ตรวจวัดพีเอสเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....