

## ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตของโครงการวิจัยนี้คือ การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจในการค้นหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงและจับได้ดีกับสาร haptens โดยใช้สาร Aflatoxin ซึ่งเป็นสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) เป็นตัวแทนสารประเภท hapten เพราะเป็นสารซึ่งปนเปื้อนมากในธัญพืชที่เป็นอาหารของทั้งคนและสัตว์ เพื่อเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้กับสารอื่นๆต่อไป โดยในการค้นหา (select) antibody นั้นจะใช้คลังของฟาจที่ได้สร้างขึ้นเองในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยหลัก และจากต่างประเทศ (Cambridge Antibody Technology, CAT) เป็นแหล่งในการค้นหา ซึ่ง antibody จากคลังที่จะใช้จะมีโครงสร้างเป็น ScFv โดยในโครงการวิจัยนี้จะได้ทำการพัฒนาวิธีการในการค้นหาฟาจที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพสูงที่สุด จากนั้นจะได้ทำการผลิตให้เป็นโมเลกุล ScFv ที่มีความเหมาะสม เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาเป็นสารตรวจสอบ หรือสารที่ใช้ในการรักษาต่อไป โดยหลังจากที่สามารถค้นหาฟาจที่แสดง ScFv ที่มีความจำเพาะเจาะจงแล้ว จะได้ทำการผลิตให้ได้เป็นเฉพาะส่วน ScFv antibody โดยการนำไปสร้างจากแบคทีเรีย *E. coli* ที่เหมาะสม รวมทั้งจะได้สร้างเป็นโมเลกุลของ ScFv antibody ที่เชื่อมอยู่กับ enzyme Alkaline phosphatase (AP) และ 6xHistidine หรือ ScFv-AP-6xHis conjugate ด้วย โดยจะได้ทำการตรวจสอบความสามารถของ antibody ในการจับกับสารพิษด้วยเทคนิค ELISA ทั้งความไวในการจับ (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (cross-reactivity) นอกจากนั้นแล้วยังจะได้ทำการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุล ScFv ที่ผลิตขึ้นมาได้ โดยเฉพาะในส่วน hyper-variable regions หรือ complementarity-determining regions (CDRs) ที่มีหน้าที่ในการจับกับ antigen เพื่อความเข้าใจในหลักการมีอันตรกิริยา (interaction) ระหว่าง antigen-antibody โดยจะทำการศึกษาจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ที่ควบคุมการสร้าง ScFv ด้วยวิธีการทาง bioinformatics

## ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

Antibody คือ สารที่ผลิตโดยระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการจับกับ antigen หลากหลายชนิดได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยส่วนของ antibody ที่มีหน้าที่ในการจับ (antigen binding site) นี้อยู่ตรงส่วนปลายของโมเลกุล ที่ประกอบด้วยส่วน heavy และ light chain ประกอบด้วย 6 hypervariable loops เชื่อมต่อกันด้วย beta-sheet ให้เกิดเป็นพื้นผิวที่มีความเหมาะสมในการจับกับ antigen ต่างๆได้อย่างเหมาะสม โดยทั้งรูปร่าง และ functional group ของ amino acids ที่ประกอบกันเป็นพื้นผิว antigen binding site นี้ จะเป็นตัวกำหนดความจำเพาะเจาะจงในการจับกับ antigen ชนิดต่างๆ (Janeway et al., 2005) โดยสมมติฐานของโครงการวิจัยนี้คือ เราสามารถแบ่งประเภทของพื้นผิวของ antigen binding site ได้ ออกเป็น 3 ประเภท ตามขนาดของ antigen ได้แก่ 1) พื้นผิวแบบ planar สำหรับ antigen ขนาดใหญ่ เช่น protein 2) พื้นผิวแบบ groove สำหรับ antigen ขนาดกลาง เช่น peptide หรือ carbohydrate และ 3) พื้นผิวแบบ cavity สำหรับ antigen ขนาดเล็ก เช่น hapten ดังนั้นโครงสร้างของ antibody ที่สามารถจับกับ hapten อย่างเฉพาะเจาะจงนั้นน่าจะมีพื้นผิวที่เป็น cavity จากสมมติฐานนี้จึงอาจอธิบายได้ว่าในทำไมบางครั้งจึงมีปัญหาในการผลิตให้ได้เป็น antibody ที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงในการใช้เป็นสารตรวจสอบการปนเปื้อนของสารประเภท haptens ได้ ทั้งนี้เป็นเพราะในการเตรียม antibody โดยการฉีด hapten เพื่อไปกระตุ้นสาร antibody ในสัตว์ทดลองนั้น ต้องทำการเชื่อม hapten กับโปรตีนนำส่ง (carrier) ก่อน เรียกว่า conjugated antibody ดังนั้น antibody ที่สัตว์สร้างขึ้นจึงมักจะจับกับ ทั้ง ส่วน hapten และส่วนของ carrier ซึ่งมีขนาดกว้าง และเข้ากันได้ดีกับพื้นผิวแบบ planar หรือ groove เมื่อนำ antibody เหล่านี้มาใช้ตรวจวัด haptens ที่เป็นโมเลกุลอิสระที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรจริง จึงเกิดปัญหาคือไม่สามารถจับได้ดีพอ เพราะสาร hapten โมเลกุลอิสระมีขนาดเล็กกว่ามาก (Persson et al., 2006; Yau et al., 2003) ซึ่งปัญหาเหล่านี้สามารถแก้ไขได้โดยใช้เทคโนโลยีฟาจ เพราะใช้หลักการในการค้นหา antibody ที่แตกต่างออกไปคือใช้การค้นหาความสามารถในการมีอันตรกิริยา (affinity selection) ในหลอดทดลองโดยไม่ต้องพึ่งระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ นอกจากนั้นแล้วยังสามารถใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น DNA shuffling (Cramer et al., 1996) ในการพัฒนาคุณสมบัติให้เหมาะสมขึ้นได้อีกด้วย

ความหลากหลาย (diversity) ของโมเลกุล antibody ที่มีความสามารถในการจับกับ antigen ได้อย่างมากมายนั้นเกิดขึ้นในธรรมชาติจากการจัดเรียงและเชื่อมต่อของส่วนของยีนที่มีหน้าที่สร้างโมเลกุล antibody (immunoglobulin genes) อย่างสลับซับซ้อนในเม็ดเลือดขาว ซึ่งได้แก่ ความหลากหลาย (combinatorial diversity) จากการเชื่อมต่อ (rearrangement) ของยีนส่วน V (D) J ของทั้ง heavy และ light chains ความหลากหลายตรงรอยต่อ (junctional diversity) และการกลายพันธุ์ในส่วนของ V gene (somatic mutations) ในระหว่างการพัฒนาของ B cell (B cell maturation) ซึ่งในทางทฤษฎีแล้วจะสามารถมีความหลากหลายได้ถึง  $10^9$ - $10^{10}$  (Abbas et al., 2005) จากความรู้เกี่ยวกับกลไกการสร้างโมเลกุล antibody ที่มีความหลายในธรรมชาตินี้เองจึงทำให้เราสามารถสร้างคลังของ antibody ที่มีความหลากหลายสูงได้ โดยการสกัดเอา mRNA จากเม็ดเลือดขาวที่เป็น mature lymphocyte และมียีนที่ควบคุมการสร้าง antibody ที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ กันมาแสดงบนโปรตีนบนผิวฟาจ จากนั้นจึงทำการคัดหาฟาจที่แสดง antibody ที่สามารถจับกับ antigen ที่ต้องการได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยใช้วิธีการคัดหาความสามารถในการจับกันระหว่าง antigen และ antibody (affinity selection) ในห้องทดลอง ซึ่งคลังของฟาจที่นำมาใช้จะมี antibody ที่มีพื้นผิวครอบคลุมทั้ง 3 แบบ

จากทฤษฎี และสมมุติฐานดังกล่าวข้างต้น จึงมีความน่าจะเป็นไปได้สูงว่าจะสามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการผลิต antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อสารปนเปื้อนทางการเกษตร ซึ่งจะสามารถพัฒนาต่อยอดไปเป็นชุดตรวจสอบทางการเกษตรได้ต่อไป

## วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการที่จะใช้ในการคัดหาแอนติบอดีนั้น จะใช้วิธีการคัดเลือกจากความสามารถในการมีอันตรกิริยา (affinity selection) ของฟาจ โดยวิธีการ bio-panning มาตรฐานที่ใช้ในเทคโนโลยีการแสดงผลโปรตีนบนผิวฟาจทั่วไป (Kay et al., 1996; O'Brien and Aitken, 2002) โดยจะทำการทดลองคัดเลือกทั้งบนจาน ELISA และ immuno-tube ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ , และ  $37^{\circ}\text{C}$  โดยจะทำการคัดเลือกประมาณ 1-3 รอบ เพื่อให้ได้แอนติบอดีจากฟาจประมาณ 10-40 ชนิด โดยจะใช้ conjugated haptens ที่สามารถซื้อได้ จากบริษัท เช่น Sigma ส่วนการ elute นอกจากจะทำการ elute โดยวิธีการมาตรฐานแล้ว ยังจะทำการ elute โดยใช้ free haptens ด้วย เพราะมีรายงานว่า การ elute ด้วยวิธีนี้จะทำให้ได้ antibody ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกว่าในการนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ (Moghaddam et al., 2001) โดยจะใช้วิธีการ ELISA เป็นวิธีการในการตรวจสอบคุณสมบัติการมีอันตรกิริยา (affinity และ specificity) โดยจะทดสอบความสามารถในการจับของ antibody ใน 3 รูปแบบ คือ 1) antibody ที่อยู่บนผิวฟาจ 2) จี้น free ScFv ซึ่งสามารถผลิตได้โดยการนำฟาจไป infect *E.coli* strain HB2151 (Kay et al., 1996; O'Brien and Aitken, 2002) และ 3) ScFv ที่เชื่อมอยู่กับ Alkaline phosphatase และ 6xHistidine (ScFv-AP6xHis) เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นตัวตรวจที่สะดวก (Yamabhai and Kay, 1997) และง่ายต่อการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยวิธีการ affinity chromatography (QIAexpress™, Qiagen, Germany)

การตรวจสอบโดยวิธีการ ELISA เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของ antibody ที่ได้พัฒนาขึ้นว่ามีความเหมาะสมในการที่จะพัฒนาต่อยอดไปเพื่อผลิตชุดตรวจสอบหรือไม่นั้น จะทำการตรวจสอบทั้ง ก) ความจำเพาะเจาะจง (cross reactivity) และ ข) ความไวในการจับ (sensitivity) โดยวิธี Direct Competitive ELISA, Indirect Competitive ELISA, หรือ Sandwich ELISA แล้วแต่ความเหมาะสม (Gee et al., 1996) โดยจะทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเหล่านี้กับ polyclonal และ monoclonal antibody ที่เตรียมได้จากวิธีมาตรฐานดั้งเดิมด้วย (conventional method)

นอกจากกิจกรรมดังกล่าวข้างต้น โครงการวิจัยนี้จะได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ (structure-function relationship) ของ Antibody ที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจที่คัดหามาได้ด้วย โดยวิธีการศึกษานั้นจะทำได้โดย

การหาลำดับเบสของ DNA ที่ทำหน้าที่สร้างชิ้น ScFv โดยจะทำการสกัด DNA แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี จากนั้นจะได้นำข้อมูลนี้มาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของ antibody ต่อไป โดยใช้ software ทาง bioinformatics ท้าไปที่หาได้จากฐานข้อมูลทาง internet เช่น NCBI, EXPASY รวมทั้งโดย software สำหรับการศึกษ โครงสร้างของ antibody โดยเฉพาะคือ program WAM (Whitelegg and Rees, 2000)

สถานที่ที่จะใช้ในการดำเนินการวิจัยคือห้องปฏิบัติการที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ใหญ่มาก คือประกอบไปด้วยแอนติบอดีประมาณ  $10^{9-11}$  ชนิดอยู่ด้วยกัน (Griffiths et al., 1994; Vaughan et al., 1996) ชนิดในที่นี้หมายถึงลักษณะของส่วนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจน (binding site) ที่แตกต่างกัน คลังที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นมีหลายประเภท โดยแต่ละคลังก็มีความแตกต่างกันในด้านต่างๆ เช่น ความแตกต่างในชนิดของโปรตีนปกคลุมผิวที่ใช้แสดงแอนติบอดี (pIII หรือ pVIII) แหล่งที่มาของ RNA ที่จะใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง โครงสร้างของแอนติบอดีที่ใช้แสดง (แบบ Fab หรือ ScFv) ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการสร้างคลัง (plasmid หรือ phagemid) พันธุ์ (strain) ของแบคทีเรียที่ใช้ในการเลี้ยงฟาจ หรือขั้นตอนการตัดต่อยีนเข้าไปในตัวฟาจ ทั้งนี้ นักวิจัยกลุ่มใดจะใช้วิธีการไหนนั้นขึ้นอยู่กับความชำนาญ ประสบการณ์ และวัสดุที่มีอยู่ นอกจากนี้แล้วในปัจจุบันยังมีความพยายามในการสร้างคลังจากเส้นดีเอ็นเอสังเคราะห์อีกด้วย (synthetic oligonucleotide) (Barbas et al., 1992; Hoogenboom et al., 1991) คลังชนิดนี้จะมีประโยชน์สูงในงานวิจัยที่ใช้หุ่นยนต์ทำงาน เช่น ในการวิจัยที่เกี่ยวกับ proteomics (Lueking et al., 1999).

เทคนิคอีกชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมในการสร้างแอนติบอดีให้มีคุณภาพสูงคือมีความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการจับสูง (high specificity และ affinity) คือการนำแอนติบอดีที่คัดได้จากคลังมาพัฒนาให้เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณภาพดีขึ้น (maturation) โดยใช้หลักการกำกับวิวัฒนาการ (directed evolution) (Hoogenboom, 1997) ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การทำให้เกิดการกลายพันธุ์อย่างสุ่มด้วยเทคนิคทาง PCR ที่มีความแม่นยำต่ำ (error prone PCR) หรือการใช้เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ (DNA shuffling) (Cramer et al., 1996) การปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโดยการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการสร้างแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับสูงมากขึ้นกว่าเดิมหลายเท่า ตัวอย่างเช่น พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับของแอนติบอดีชนิดหนึ่งได้ถึง 10 เท่า ทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับสูงถึง  $10^{11} M^{-1}$  ซึ่งสูงกว่าค่าที่จะได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตด้วยวิธีการเดิม (คือ  $10^{10} M^{-1}$ ) (Schier et al., 1996; Yang et al., 1995) นอกจากการปรับปรุงคุณภาพในการจับแล้ว ยังสามารถใช้เทคโนโลยีนี้ในการปรับปรุงคุณสมบัติอื่นๆตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่น ความสามารถในการทำงาน (function) ต่างๆ เช่น การกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) (Mani et al., 1998; Poul et al., 2000) หรือการใช้เป็นตัวกระตุ้นหรือตัวยับยั้ง (agonist หรือ antagonist) โปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆในเซลล์ (Xie et al., 1997) นอกจากนี้แล้วยังใช้ในการคัดเลือกแอนติบอดีที่ทนต่อสภาวะบางอย่าง เช่น สภาวะกรด ค่าง หรือทนต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteinase) (Yang et al., 1995) หรือที่สภาวะ reducing (Proba et al., 1998) รวมทั้งการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค (therapeutic use) (Clark, 2000; Gavilondo and Larrick, 2000; Merluzzi et al., 2000) หรือติดฉลาก (tag) (Carter and Merchant, 1997; Hughes-Jones et al., 1994; Huston and George, 2001; Wu and Yazaki, 2000; Zamora et al., 1994) เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ

จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ชัดเจนว่าการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีประโยชน์มาก ดังจะได้สรุปไว้เป็นข้อๆดังนี้

1. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีฟาจ สะดวก และประหยัดกว่าการใช้เทคนิคดั้งเดิม เพราะใช้เวลาน้อยกว่า ใช้เงินน้อยกว่า ใช้แรงงานและความชำนาญน้อยกว่า และข้อสำคัญคือไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง
2. สามารถใช้กับแอนติเจนได้หลากหลายชนิดกว่า เพราะสามารถใช้กับแอนติเจนที่เป็นพิษต่อสัตว์ แอนติเจนที่คล้ายกับโปรตีนในสัตว์ทดลอง หรืออาจใช้เซลล์ทั้งเซลล์เป็นแอนติเจนก็ได้ นอกจากนี้แล้วยังสามารถใช้กับแอนติเจนที่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้ (nonimmunogenic antigen)
3. สามารถใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนจำนวนมาก ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในงานด้าน proteomics ในปัจจุบัน
4. สามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเหมือนของคน (humanized antibody) เพื่อใช้ในการรักษาโรค (therapeutic antibody)