การคัดเลือกโมเลกุลนาโนบอดีที่มีความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลิน อี ด้วยเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ

Screening of Nanobody Specific to Immunoglobulin E by Phage Display and Biopanning

ดวงดาว แซ่ฉั่ว เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล และ ชมดาว สินธุวณิชย์*

Duangdow Saechou, Kiattawee Choowongkomon and Chomdao Sinthuvanich*

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

**Corresponding author, E-mail: chomdao.si@ku.th*

บทคัดย่อ

โรคภูมิแพ้ชนิดที่ 1 หรือ โรคภูมิแพ้ เป็นการตอบสนองสารก่อภูมิแพ้ของระบบภูมิคุ้มกันโดยมีตัวกลางที่จดจำสารก่อภูมิแพ้ คือ อิมมูโนโกลบูลิน อี เมื่อร่างกายได้รับสารก่อภูมิแพ้ทำให้ระดับอิมมูโนโกลบูลิน อี ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการจับแล้วส่งสัญญาณต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ ดังนั้นอิมมูโนโกลบูลิน อี ในกระแสเลือดจึงเป็นตัวบ่งชี้สำหรับโรคภูมิแพ้ชนิดที่ 1 การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน อี ในกระแสเลือด ต้องอาศัยโมเลกุลจับจำเพาะจึงจะสามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่แม่นยำและมีความไวสูงได้ งานวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกโมเลกุลที่จำเพาะต่อ อิมมูโนโกลบูลิน อี เพื่อใช้ตรวจสอบปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน อี ในกระแสเลือด โดยใช้เทคนิคการแสดงโปรตีนทางผิวฟาจและเทคนิคการคัดเลือกทางชีวภาพ จากการคัดเลือกนาโนบอดีซึ่งเป็นโมเลกุลจับจำเพาะด้วยเทคนิค ELISA พบนาโนบอดี จำนวน 10 โคลน คือ B41 B49 B50 B59 B78 B93 B94 B95 B98 และ B100 ที่จำเพาะกับ อิมมูโนโกลบูลิน อี ของมนุษย์ เมื่อทำการผลิตนาโนบอดีทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค Immunoblot พบว่ามีแถบโปรตีนขนาดประมาณ 15 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าเป็นโมเลกุลนาโนบอดี โคลนที่ได้สามารถนำไปพัฒนาเป็นโมเลกุลจับจำเพาะเพื่อบ่งชี้ถึงอาการแพ้ที่เกิดจากโรคภูมิแพ้ต่อไป

คำสำคัญ: *โรคภูมิแพ้ชนิดที่ 1 อิมมูโนโกลบูลิน อี เทคนิคการแสดงโปรตีนทางผิวฟาจ เทคนิคการคัดเลือกทางชีวภาพ*

Abstract

Type I hypersensitivity or allergy is a hypersensitivity reaction of the immune system mediated by immunoglobulin E (IgE) that recognized allergen. Upon exposure to allergens, when IgE level in the blood increases, it triggers cells in the immune system resulting in the inflammation. Therefore, IgE level in the blood can

เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

be used as a marker for type I hypersensitivity. To develop methodology for accurate and sensitive measurement of IgE level in blood, molecule recognizing IgE is required. In this study, we performed phage display and bio-panning techniques to screen and select nanobodies that are specific to IgE. The selected clones were evaluated using an indirect monoclonal enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). After the selection through bio-panning, 10 clones showed strong binding including B41, B49, B50, B59, B78, B93, B94, B95, B98, and B100. The positive clones were expressed, and nanobodies were analyzed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot. The expected band showed a molecular weight of 15 kDa corresponding to the size of nanobody.

Keywords: *Type I hypersensitivity, immunoglobulin E, phage display, bio-panning*

1. บทนำ

โรคภูมิแพ้ชนิดที่ 1 เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันร่างกายตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ เช่น อาหารทะเล พืชตระกูลถั่ว และยา เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการอักเสบของผิวหนังและอวัยวะต่าง ๆ อาการที่สังเกตได้คือ ผื่นแดง บวม คัน คัดจมูก ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการป้องกันหรือรักษาให้หายขาด หากแต่สามารถทดสอบการแพ้โดยการทดสอบผิวหนังแบบสะกิด การทดสอบผิวหนังแบบแผ่นแปะ หรือการวัดระดับ อิมมูโนโกลบูลิน อี ในกระแสเลือด ซึ่งหากมีปริมาณมากกว่า 240 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะบ่งชี้ได้ว่ามีอาการแพ้และเสี่ยงต่อการเป็นโรคภูมิแพ้ชนิดที่ 1 (Amarasekera, 2011)

อิมมูโนโกลบูลิน อี เป็นแอนติบอดีในระบบภูมิคุ้มกันร่างกายชนิดจดจำอย่างจำเพาะและเป็นตัวกลางในการส่งสัญญาณทำให้เกิดการอักเสบ โดยเมื่อร่างกายได้รับสารก่อภูมิแพ้ เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสร้างอิมมูโนโกลบูลิน อี ที่จำเพาะต่อสารก่อภูมิแพ้นั้น ๆ ร่างกายได้รับสารก่อภูมิแพ้ในครั้งถัดไป อิมมูโนโกลบูลิน อี ที่จำเพาะจะถูกสร้างให้มีจำนวนมากขึ้นแล้วส่งสัญญาณให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปลดปล่อยแกรนูลซึ่งบรรจุสาร เช่น ฮีสทามีน ส่งผลให้เกิดกระบวนอาการอักเสบ โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลิน อี ประกอบด้วยส่วนที่จดจำสารก่อภูมิแพ้ คือส่วน antigen binding fragment (Fab) และส่วนที่จดจำและส่งสัญญาณให้กับตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว คือ ส่วน Crystallizable fragment (Fc) (Sutton, et al., 2019) ดังนั้นระดับอิมมูโนโกลบูลิน อี จึงเป็นตัวบ่งชี้การอักเสบเนื่องมาจากการแพ้ในโรคภูมิแพ้ชนิดที่ 1

ในปัจจุบันมีการตรวจสอบ อิมมูโนโกลบูลิน อี ของมนุษย์โดยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ หากแต่โมเลกุลแอนติบอดีราคาสูง มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และกระบวนการผลิตแอนติบอดีมีความซับซ้อน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโมเลกุลที่เรียกว่านาโนบอดี ซึ่งเป็นโมเลกุลแอนติบอดีขนาดเล็ก นาโนบอดีมีขนาดประมาณ 15 กิโลดาลตัน พัฒนามาจากแอนติบอดีบริเวณ antigen binding fragment (Fab) จากเลือดสัตว์จำพวกอูฐ โครงสร้างมีเฉพาะส่วนสายโซ่หลัก (V_{HH}) โดยมีคุณสมบัติจับจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมายเช่นเดียวกับแอนติบอดี ละลายน้ำได้ดี มีความเสถียร ทนต่ออุณหภูมิสูง สามารถพัฒนาใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ทางยาและทางการแพทย์ (Bannas, et al., 2017)

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

เทคนิคการแสดงออกโปรตีนทางผิวฟาจ เป็นเทคนิคการเติมยีนนาโนบอดีเข้าไปหน้ายีนแสดงออกโปรตีนบริเวณพื้นผิวของฟาจ โดยคลังยีนนาโนบอดีจะถูกสร้างให้มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนบริเวณจับกับโมเลกุลเป้าหมายแล้วแสดงออกร่วมกับโปรตีนบริเวณพื้นผิวฟาจ ในการคัดเลือกโมเลกุลนาโนบอดีจะอาศัยเทคนิคการคัดเลือกทางชีวภาพซึ่งเป็นการคัดเลือกฟาจที่มีการจับจำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายจากคลังนาโนบอดี ในการคัดเลือกแต่ละรอบ ฟาจที่แสดงออกนาโนบอดีที่จับจำเพาะจะถูกนำไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย สายพันธุ์ TG1 การคัดเลือกใช้หลักการจับอย่างแข่งขันเพื่อคัดเลือกนาโนบอดีที่จับอย่างจำเพาะกับโปรตีนเป้าหมาย (Lee, et al., 2007) งานวิจัยจึงอาศัยเทคนิคการแสดงออกโปรตีนทางผิวฟาจและการคัดเลือกทางชีวภาพ เพื่อคัดเลือกโมเลกุลนาโนบอดีที่มีความจำเพาะต่อ อิมมูโนโกลบูลิน อี ของมนุษย์ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ อิมมูโนโกลบูลิน อี ในกระแสเลือดที่แม่นยำและมีความไวสูงต่อไป

2. วัตถุประสงค์

คัดเลือกโมเลกุลนาโนบอดีที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลิน อี โดยเทคนิคการคัดเลือกทางชีวภาพและการแสดงออกโปรตีนทางพื้นผิวฟาจเพื่อพัฒนาเป็นโมเลกุลจับจำเพาะของอิมมูโนโกลบูลิน อี ในกระแสเลือดอันเนื่องมาจากโรคภูมิแพ้ชนิดที่ 1

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกทางชีวภาพ (Bio-panning)

ตรึงโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลินอี บริเวณ Crystallizable fragment (Fc) (บริษัท Sino Biological ปักกิ่ง,จีน) ปริมาณ 0.3 ไมโครกรัม ที่ละลายในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนไมโครเวลเพลทชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทิ้งส่วนใสที่ไม่ถูกตรึงบนแพลท เติม bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ล้างหลุมด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมคลังนาโนบอดีชื่อ Domain antibody phagemid library (บริษัท Source Bio Science นอตทิงแฮม, อังกฤษ) เจือจางให้มีความเข้มข้น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างฟาจที่ไม่จับด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่มี Tween 20 ร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร จำนวน 10 ครั้ง หลังจากนั้นชะฟาจที่มีความจำเพาะโดยเติมบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 2.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นทำการชะฟาจที่จับกับอิมมูโนโกลบูลิน อี ให้หลุดออก ต่อมาเติมบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 9.5) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เพื่อปรับให้สารละลายเป็นกลาง นำฟาจที่มีความจำเพาะเพิ่มจำนวนโดยบ่มกับ *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 ให้มีความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 เติมฟาจนาโนบอดี ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีเดี่ยวแต่ละโคโลนีเลี้ยงในอาหารชนิดเหลว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนโดยเติม Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสมาทดสอบความจำเพาะโดยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3.2 การทดสอบการจับจำเพาะเบื้องต้นโดยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ตรึงโมเลกุลโดยเติมอิมมูโนโกลบูลินอี บริเวณ Crystallizable fragment ปริมาณ 0.1 ไมโครกรัม ใน 100 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ บนไมโครเวลเพลทชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทิ้งส่วนใสที่ไม่ถูกตรึงบนแพลท เติม bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ล้างหลุมด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแต่ละโคโลนีหลังจากเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนนาโนบอดีลงแต่ละหลุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 100 โคโลนี บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ทิ้งส่วนที่ไม่จับและล้างหลุมด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่มี Tween 20 ร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดี Mouse anti-Myc IgG-biotin (บริษัท Thermo Fisher Scientific วอลแทม, สหรัฐอเมริกา) ตามด้วย ExtrAvidin®Peroxidase (บริษัท Sigma Aldrich เซนต์หลุยส์, สหรัฐอเมริกา) เติมสารตั้งต้น 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (Thermo Fisher Scientific วอลแทม, สหรัฐอเมริกา) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

3.3 การผลิตโปรตีนนาโนบอดีใน Escherichia coli สายพันธุ์ HB2151

ในการผลิตโปรตีนในปริมาณมาก (large scale) เริ่มจากนำโคโลนีที่มีความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลิน อี เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 ให้มีความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6-0.7 ปริมาตร 1 ลิตร หลังจากนั้นเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนโดยเติม Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแตกตะกอนเซลล์ด้วยเทคนิค periplasmic extraction โดย เติมบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.03 โมลาร์ (pH 8.0) ที่มีกรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอาเซติก (EDTA) ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์และซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที ปั่นที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส กรองส่วนใสด้วยเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน เก็บฟาจนาโนบอดีที่ -20 องศาเซลเซียส

3.4 การผลิตโปรตีนนาโนบอดีใน Escherichia coli สายพันธุ์ BL21 (DE3)

หลังจากที่ได้ฟาจนาโนบอดีที่มีความจำเพาะ จึงทำการโคลนยีนจากโคโลนีที่มีความจำเพาะเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) จากนั้นทำการผลิตโปรตีนในปริมาณมากขึ้น โดยเลี้ยงโคโลนีที่มียีนนาโนบอดีใน *E. coli* สายพันธุ์

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

BL21(DE3) ให้มีความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 ปริมาตร 1 ลิตร หลังจากนั้นเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนโดยเติม Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแตกตะกอนเซลล์ด้วยเทคนิคแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียง (sonication) เติมบัฟเฟอร์แตกเซลล์ที่มีทริสไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 8.0) กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอาเซติก (EDTA) ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์และ ไลโซไซม์ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียง 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส กรองส่วนใสด้วยเมมเบรน 0.22 ไมครอน เก็บฟาจนาโนบอดีที่ -20 องศาเซลเซียส

3.5 การวิเคราะห์โปรตีนนาโนบอดีโดยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และเทคนิค Immunoblot

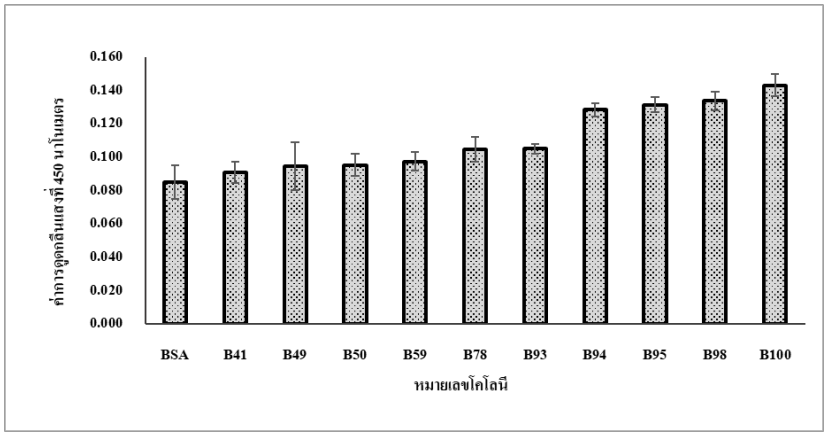
วิเคราะห์นาโนบอดีด้วย 12% gel SDS-PAGE ที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นทำการย้อมโปรตีนโดย InstantBlue® Protein Stain เพื่อสังเกตรูปแบบและขนาดของแถบโปรตีน หลังจากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยังเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส ตามด้วยเติม bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ทริสไกลซีนที่มีที่มี Tween 20 ร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง เติม anti-histidine-HRP (บริษัท Thermo Fisher Scientific วอลแทม, สหรัฐอเมริกา) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ทริสไกลซีนที่มี Tween 20 ร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง เติมสารตั้งต้นแล้ววิเคราะห์ผลโดยเครื่องถ่ายภาพเจลโหมดอัลตราไวโอเลต

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การทดสอบการจับจำเพาะเบื้องต้นโดยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หลังจากการคัดเลือกทางชีวภาพ (Bio-panning)

การคัดเลือกทางชีวภาพเป็นเทคนิคการคัดเลือกโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย โดยในงานวิจัยคัดเลือกร่วมกับเทคนิคการแสดงออกนาโนบอดีทางผิวฟาจ หลังจากการคัดเลือกโดยเทคนิคการคัดเลือกทางชีวภาพนำโคโลนี จำนวน100 โคลน มาทำการทดสอบการจับจำเพาะด้วยเทคนิค ELISA พบว่ามี 10 โคลน คือ B41 B49 B50 B59 B78 B93 B94 B95 B98 และB100 ที่แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร สูงกว่าโปรตีนมาตรฐาน คือ Bovine serum albumin จึงทำการทดสอบทั้ง 10 โคลนอีกครั้ง 3 ซ้ำ แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ดังรูปที่ 1 จากนั้นสกัดพลาสมิด วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม IMGT/V-QUEST the international (ImMunoGeneTics information system®, online) พบว่า โคลนที่ 93 และ 98 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าจะมีการจับอย่างจำเพาะต่อ อิมมูโนโกลบูลิน อี บริเวณ Crystallizable fragment จากการคัดเลือกโดยเทคนิคข้างต้นจำเป็นต้องอาศัย *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในติดเชื้อฟาจมิดจากคลังนาโนบอดีแล้วทำการผลิตนาโนบอดี เพื่อวิเคราะห์การจับจำเพาะด้วยเทคนิค ELISA และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนาโนบอดี

เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต



รูปที่ 1 การทดสอบการจับจำเพาะเบื้องต้นระหว่างโคลนนาโนบอดีและอิมมูโนโกลบูลิน อี บริเวณ fragment crystallizable (Fc) โดยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

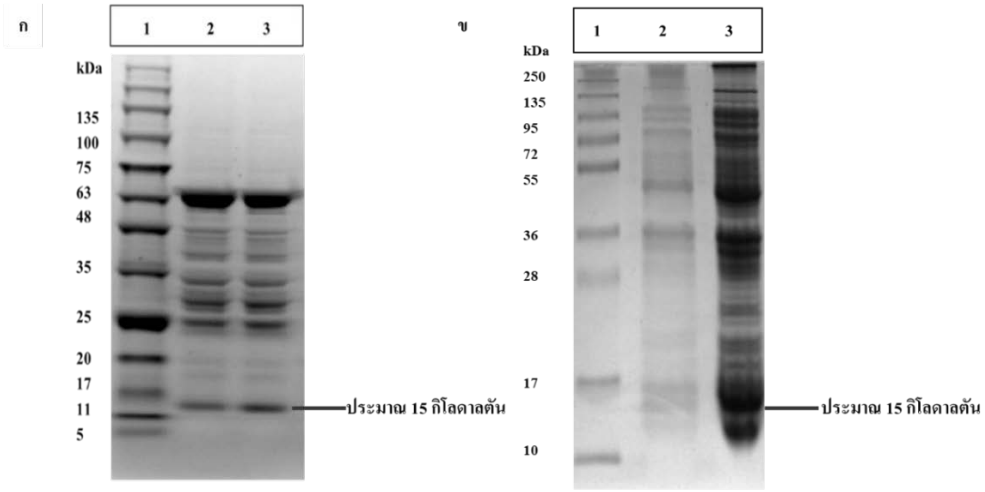
4.2 การแสดงออกโปรตีนใน Escherichia coli สายพันธุ์ HB2151 และ Escherichia coli สายพันธุ์ BL21(DE3) และวิเคราะห์นาโนบอดีโดยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และเทคนิค Immunoblot

หลังจากคัดเลือกโดยเทคนิคการคัดเลือกทางชีวภาพพบโคลนที่มีความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลิน อี คือ B93 และ B98 นำฟาจที่บรรจุดีเอ็นเอฟาจมิด (pR2) มียีนนาโนบอดีโคลนที่ B93 และ B98 ถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 ซึ่งเป็นเจ้าบ้านที่มีลักษณะจำเพาะในการถูกติดเชื้อโดยฟาจที่บรรจุดีเอ็นเอฟาจมิด (pR2) มียีนนาโนบอดี และมีความสามารถในการผลิตโปรตีน จากนั้นเหนี่ยวนำให้มีการผลิตนาโนบอดีบริเวณระหว่างผนังเยื่อหุ้มเซลล์ ทำการแตกเซลล์ และวิเคราะห์แถบโปรตีนหยาบนาโนบอดีด้วย 12 % SDS-PAGE ได้รูปแบบแถบโปรตีนดังรูปที่ 2ก ซึ่งคาดว่าแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 15 กิโลดาลตันคือนาโนบอดี อย่างไรก็ตามการผลิตโปรตีนด้วย *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 ดีเอ็นเอฟาจมิดข้างต้นจากคลังนาโนบอดีไม่มีฉลากที่เหมาะสมสำหรับการติดตามและการทำบริสุทธิ์ ทำให้โปรตีนที่ผลิตขึ้นยากต่อการทำบริสุทธิ์และไม่สามารถติดตามด้วยเทคนิค Immunoblot

E. coli สายพันธุ์ BL21(DE3) เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนให้ได้ในปริมาณมากในระบบพลาสมิด pET ผู้วิจัยจึงทำการดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนาโนบอดี โคลนที่ B98 โดยการเติมฉลากฮิสทีดีนที่ปลายเอมีนเพื่อประโยชน์ในการทำบริสุทธิ์และการติดตามด้วยเทคนิค immunoblot จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิด pET28-Fc_B98 ที่มียีนนาโนบอดีโคลนที่ 98 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โดยผู้วิจัยเลือกโคลนที่ B98 ซึ่งเป็นโคลนที่คาดว่าน่าจะมีการจับจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลิน อี ได้ดี เนื่องจากเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค ELISA พบว่าโคลนที่ B98 มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าโคลนที่ B93 ในการผลิตโปรตีนใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โดยเหนี่ยวนำให้มีการผลิตนาโนบอดีบริเวณระหว่างผนังเยื่อหุ้มเซลล์ ทำการแตกเซลล์ และวิเคราะห์แถบโปรตีนหยาบนาโนบอดีโดย 12 %

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

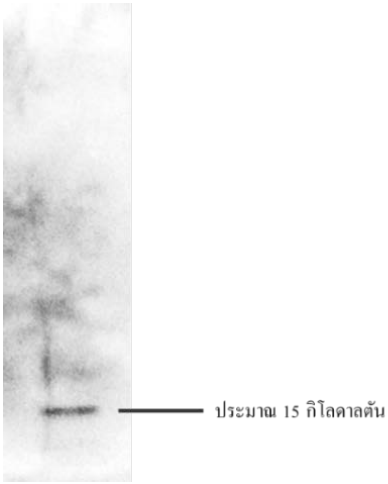
SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 15 กิโลดาลตัน ดังรูปที่ 2ข ซึ่งเป็นขนาดของนาโนบอดี จึงคาดว่าการถ่ายโอนยีนสำเร็จและสามารถผลิตนาโนบอดีด้วย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และ *E. coli* สายพันธุ์ HB2151



รูปที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์รูปแบบแถบโปรตีนจากโปรตีนหยาบของนาโนบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE ก.) เลนที่ 1 แสดงโปรตีนเครื่องหมาย เลนที่ 2 และ 3 แสดงโปรตีนที่ผลิตใน *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 โคลนที่ 93 และโคลนที่ 98 ตามลำดับ ข.) เลนที่ 1 แสดงโปรตีนเครื่องหมาย เลนที่ 2 แสดงโปรตีนที่ผลิตใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โคลนที่ 98 ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน เลนที่ 3 แสดงโปรตีนที่ผลิตใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โคลนที่ 98

ในการวิเคราะห์โปรตีนนาโนบอดีที่ผลิตใน *E. coli* สายพันธุ์ HB2151และผลิตใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) พบว่ารูปแบบโปรตีนหยาบมีความแตกต่างกันใน 2 สายพันธุ์ หากแต่มีแถบโปรตีนที่คาดว่าเป็นโนบอดีเช่นเดียวกันที่ขนาด 15 กิโลดาลตัน ดังนั้นเพื่อยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีนจึงทำการวิเคราะห์นาโนบอดีจากโคลน B98 ที่ผลิตด้วย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ด้วยเทคนิค Immunoblot พบว่ามีแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 15 กิโลดาลตัน ที่จำเพาะกับแอนติบอดีที่จดจำฉลากฮีสติดีน ดังรูปที่ 3

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564
เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต



รูปที่ 3 แสดงแถบโปรตีนหยาบนาโนบอดีผลิตใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โคลนที่ 98 วิเคราะห์โดยเทคนิค Immunoblot

E. coli สายพันธุ์ BL21 (DE3) ในระบบพลาสมิด pET ที่มีการผลิตนาโนบอดีที่ติดฉลากฮีสติดีนสามารถติดตามผลโดยเทคนิค Immunoblot แต่ *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 ในระบบฟาจจากคลังนาโนบอดี มีฉลาก myc และ VSV-G มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ผลโดยเทคนิค ELISA หากแต่ไม่สามารถติดตามผลโดยเทคนิค Immunoblot ได้ จึงทำให้มีการเปลี่ยนระบบการแสดงออกโปรตีนนาโนบอดีรวมถึงการเปลี่ยนสายพันธุ์แบคทีเรียในการผลิตโปรตีน

5. สรุปผลการศึกษา

จากการคัดเลือกนาโนบอดีที่จำเพาะกับโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน อี ของมนุษย์ จำนวน 100 โคลน ด้วยเทคนิคการแสดงออกโปรตีนทางผิวฟาจและการคัดเลือกทางชีวภาพ พบนาโนบอดีโคลน B98 ที่คาดว่าจะจับจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลิน อี โดยวิเคราะห์การจับจำเพาะเบื้องต้นด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเมื่อถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ผลิตโปรตีน วิเคราะห์โดยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค Immunoblot พบแถบโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นนาโนบอดีซึ่งมีขนาดประมาณ 15 กิโลดาลตัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงประสบความสำเร็จในการคัดเลือกโคลนที่มียีนของนาโนบอดีและสามารถถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อการผลิตโปรตีนได้ นาโนบอดีที่มีความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลิน อี สามารถนำไปพัฒนาเป็นโมเลกุลตรวจวัด อิมมูโนโกลบูลิน อี เพื่อใช้ในทางการแพทย์ หรือ การวิจัยต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณทุน Thailand Research Fund (grant number MSD61I0027) และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต

7. เอกสารอ้างอิง

Amarasekera, M. (2011). Immunoglobulin E in Health and Disease. Asia Pacific *Journal of allergy and Immunology, 1*(1), 12-15.

Bannas, P., Hambach, J., and Koch-Nolte, F. (2017). Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies as Antitumor Therapeutics. Frontiers in Immunology, 8(1603)

ImMunoGeneTics information system®. (Online). Analyse your IG (or antibody) or TR nucleotide sequences. Retrieved, From http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest)

Lee, C. M., Iorno, N,. Sierro, F., and Christ, D. (2007). Selection of Human Antibody Fragments by Phage Display. *Nature Protocols, 2*(11), 3001-3008.

Sutton, B. J., Davies, A. M,. Bax, H. J., and Karagiannis, S. N. (2019). Ige Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation. *Antibodies (Basel, Switzerland), 8*(1), 19.

เผยแพร่ออนไลน์: ลิขสิทธิ์ © 2559-2564 มหาวิทยาลัยรังสิต