

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง: โครงการคัดเลือกหาอนุภาคฟาจตรวจจับที่จำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของรอยโรคมะเร็งปากมดลูกโดยใช้คลังของฟาจดิสเพลย์

: Selection of Specific Binding Phage to Cervical Cancer Biomarkers by using Phage Display Library

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศ. ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

ผู้ร่วมวิจัย

รศ. นพ. สมชัย นีรุตติศาสน์

รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล

นางสาว น้ำฝน เข้มทองเจริญ

นาย อังคาร จารุจารีต

นายพงษ์ศักดิ์ สาระภักดี

นายสันติ รัตนวารินทร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Faculty of Medicine Chulalongkorn University (MED CU)

ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ

National Electronics and Computer Technology Center (NECTEC)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 และ พ.ศ. 2556 โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาโมเลกุลตรวจจับ (Molecular probe) ที่จำเพาะกับ โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker) ของรอยโรคมะเร็งปากมดลูก โดยใช้เทคโนโลยีของฟาจดีสเพลย์สำหรับการ พัฒนาอนุภาคฟาจดีสเพลย์ที่มีความไวและความจำเพาะใกล้เคียงกับการใช้โมเลกุลแอนติบอดีในการตรวจรอย โรคมะเร็งปากมดลูกระยะต่างๆ การดำเนินงานของโครงการได้ผลสำเร็จตามแผนงาน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ จากหน่วยงานและบุคลากรที่ให้การสนับสนุนการดำเนินการในด้านต่างๆ ของโครงการดังรายละเอียดต่อไปนี้

- สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัย
- คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการสนับสนุนเครื่องมือ สถานที่ ตลอดจนบุคลากรใน โครงการการวิจัย และอุปกรณ์สำหรับดำเนินงานวิจัย
- ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำหรับการสนับสนุนเครื่องมือ สถานที่ ตลอดจน บุคลากรในโครงการการวิจัย และอุปกรณ์สำหรับดำเนินงานวิจัย
- แพทย์ พยาบาล และเจ้าหน้าที่ประจำหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทย ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ผลสำเร็จส่วนหนึ่งของโครงการนี้ ได้นำไปศึกษาต่อยอดการประยุกต์ใช้โดยอาศัยงบวิจัยส่วนหนึ่งจากทุน รัชดาภิเษกสมโภชคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ โครงการวิจัยโรคมะเร็ง คลัสเตอร์ สุขภาพ ทุนมหาวิทยาลัยแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ การสนับสนุน ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่างๆ อันเป็นปัจจัย สำคัญยิ่งต่อความสำเร็จของโครงการวิจัยนี้

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเทคนิคการตรวจรักษาระดับโมเลกุลโดยการตรวจหาโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (biomarker) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยแอนติบอดีได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการตรวจคัดกรองและการตรวจวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูกเพื่อใช้ในการตรวจยืนยันการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะในการตรวจหาเซลล์ที่มีความผิดปกติในระยะเริ่มต้นซึ่งการพัฒนาเทคนิคนี้มีข้อจำกัดที่สำคัญที่ต้องอาศัยกระบวนการผลิตแอนติบอดีที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ผลผลิตควบคุมได้ยาก และราคาต้นทุนการผลิตสูง ทำให้ไม่สามารถนำเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในงานตรวจรักษาได้อย่างแพร่หลาย อีกทั้งข้อจำกัดเรื่องขนาดของโมเลกุลที่ใหญ่รวมถึงความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้โมเลกุลแอนติบอดีไม่ได้รับความนิยมสำหรับประยุกต์ใช้ในการขนส่งโมเลกุลนำสัญญาณสำหรับการตรวจวินิจฉัยหรือขนส่งยาในร่างกายมนุษย์ โครงการนี้จึงทำการพัฒนาเปปไทด์จับจำเพาะต่อรอยโรคมะเร็งปากมดลูกขึ้น โดยใช้ฟาจดิสเพลย์ไลบรารีในการสแกนหาเปปไทด์จับจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของมะเร็งปากมดลูกทูเมอร์สับเพรสเซอร์โปรตีนพีซิกซ์ทีนและโทโพโรไอโซเมอร์ทูแอลฟา ผลคัดเลือกได้เปปไทด์ที่เมื่อตรวจสอบเปรียบเทียบกับลำดับเปปไทด์ในฐานข้อมูลพบว่าเปปไทด์ที่ได้ทั้งหมดเป็นเปปไทด์ที่พบค้นพบใหม่และไม่ใช่เปปไทด์ที่เกิดจากความผิดพลาดของกระบวนการคัดเลือกพื้นฐานที่มักพบได้ในงานสแกนหาเปปไทด์จับจำเพาะ เมื่อผ่านการทดสอบเปรียบเทียบความสามารถในจับกับโปรตีนเป้าหมายของอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ที่ได้ทั้งหมดด้วยเทคนิคอีไลซ่าและอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ผลการทดสอบพบว่าเปปไทด์ SHSLLHH สำหรับทูเมอร์สับเพรสเซอร์โปรตีนพีซิกซ์ทีน และเปปไทด์ NERALTL สำหรับโทโพโรไอโซเมอร์ทูแอลฟา โดยให้ผลความต่างของสัญญาณในเซลล์มะเร็งปากมดลูกมากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติมากกว่าความต่างของสัญญาณที่ได้การย้อมเซลล์ชนิดเดียวกันด้วยอนุภาคฟาจควบคุม 16 และ 21 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นไปได้ในการนำอนุภาคฟาจจับจำเพาะไปใช้ในการตรวจหารอยโรคมะเร็งปากมดลูกในเบื้องต้นกับตัวอย่างชิ้นเนื้อโดยใช้อนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีนทูเมอร์สับเพรสเซอร์โปรตีนพีซิกซ์ทีนเป็นต้นแบบเปรียบเทียบกับการใช้แอนติบอดีมาตรฐาน ซึ่งผลปรากฏว่าอนุภาคฟาจสามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้เมื่อละลายเซลล์ในสารละลายไททรอนเอ็กซ์ตั้งแต่ 30 นาทีขึ้นไปและผลการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยอนุภาคฟาจให้ผลสอดคล้องกับการย้อมชิ้นเนื้อด้วยแอนติบอดี และเมื่อใช้เปปไทด์สังเคราะห์สามารถให้สัญญาณตรวจแยกเซลล์มะเร็งได้โดยการย้อมเซลล์สดที่ไม่ผ่านกระบวนการเตรียมใดๆ โดยใช้เวลาการย้อมตลอดกระบวนการเพียง 5 นาที ซึ่งแสดงถึงโอกาสในการพัฒนาผลผลิตจากโครงการวิจัยไปใช้พัฒนาเทคนิคการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก

เลขหมู่
เลขทะเบียน 017953
วัน เดือน ปี 3๓.๓.๖1

Abstract

Antibody-based biomarker detection has been widely applied to diagnose and confirm cervical cancer lesions, especially when the lesions are in early stage. However, several limitations such as costly and complicated manufacturing processes and uncontrollable product yield restrain the molecule to be applied as a tracer probe for molecular detections. In addition, molecular size and immunogenicity problems also repress antibody to be used as a contrast agents or therapeutics drugs carrier in *in vivo* diagnosis and therapeutic applications. This project aims to develop the novel binding peptides for cervical cancer detection. Phage-displayed random peptide library was scanned on cervical cancer biomarkers, tumor suppressor protein p16INK4a and topoisomerase 2 alpha (TOP2A). Binding phages on the biomarker surface was eluted before phage DNA extraction for displayed peptide analysis. The peptide database search engine confirmed that all selected peptides are novel. Binding analysis of the candidate peptides against each biomarker were performed by enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence staining, and bioinformatics-based calculation. The results show that peptide SHSLLHH and NERALTL provides the best peptide-protein binding properties against p16INK4a and TOP2A, respectively. Finally, Specific phage binding phage against p16INK4a was used as a modal in the preliminary study of immunohistochemistry staining method in comparison to p16INK4a antibody staining. Immunohistochemistry staining results indicate the possibility of specific binding phage use in cervical cancer detection in tissue samples, when cells were permeabilized in triton-X 100 solution for 30 minutes at least. Moreover, synthetic peptide could stain the fresh cervical cancer cell and gave the acceptable signal within only 5 minutes of cell staining process. This indicates the possibility of the binding peptide to be used in cervical cancer screening application.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
บทนำ (Introduction)	1
มะเร็งปากมดลูกและอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer)	1
การตรวจหารอยโรคมะเร็งปากมดลูกจากโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarkers)	2
การพัฒนาโมเลกุลตรวจจับสำหรับการตรวจวินิจฉัยและการรักษามะเร็งในระดับโมเลกุล	6
เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ (Phage display technology)	4
ฟาจที่ใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Bacteriophage)	9
คลังของฟาจดิสเพลย์ (Phage display library)	10
การประยุกต์ใช้คลังของฟาจดิสเพลย์ (Application of phage display library)	12
การประยุกต์ใช้คลังของฟาจดิสเพลย์เพื่อคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker)	13
เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์กับโรคมะเร็งปากมดลูก	18
การดำเนินการ	19
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	19
วิธีการทดลอง	22
- การเตรียมคลังของฟาจดิสเพลย์	22
- การนับจำนวนอนุภาคฟาจในสารละลายด้วยเทคนิคการทำไทเทรต	22
- การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a และเอนไซม์ TOP2A	23
- การเลี้ยงแยกโคลนของอนุภาคฟาจ	25
- การสกัด DNA จากโคลนของอนุภาคฟาจ	26
- การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ของอนุภาคฟาจ	26
- การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการจับจำเพาะของอนุภาคฟาจที่คัดเลือกได้กับโปรตีน เป้าหมายด้วยเทคนิค ELISA	27
- การติดฉลากฟาจด้วยสารฟลูออเรสเซนต์	29
- การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์และการวิเคราะห์ภาพ	30
- การทดสอบความใหม่และความถูกต้องของลำดับเบสที่แยกโดยการสืบค้นเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเปปไทด์ที่ได้จากการคัดเลือกโดยใช้คลังของฟาจดิสเพลย์	30

สารบัญเรื่อง (Table of Contents II)

- การศึกษาการจำลองพฤติกรรมการจับจำเพาะของโปรตีนด้วยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ (Bioinformatics-based technique) 31
- การทดสอบความสามารถของอนุภาคฟาจจับจำเพาะการตรวจแยกเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์ (flow cytometer) 31
- การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเปิดผิวเซลล์เพื่อใช้ในงานตรวจวินิจฉัยนอกร่างกายมนุษย์ 32
- การศึกษาผลของการใช้ออนุภาคฟาจจับจำเพาะกระตุ้นสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สำหรับใช้เป็นโมเลกุลตรวจจับเซลล์มะเร็งปากมดลูก 33
- การทดสอบความสามารถในการแทรกซึมผ่านเซลล์ของอนุภาคฟาจจับจำเพาะเปรียบเทียบกับโมเลกุลเปปไทด์สังเคราะห์ 33
- การทดสอบการประยุกต์ใช้งานอนุภาคฟาจจับจำเพาะในเบื้องต้นโดยทดสอบกับการย้อมสไลด์ตัวอย่างชิ้นเนื้อ 34
- ผลการทดลอง 35
 - การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย 35
 - การทดสอบความสามารถของฟาจจับจำเพาะในการแยกเซลล์ปกติออกจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เลี้ยงในห้องทดลอง 42
 - การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำอนุภาคฟาจจับจำเพาะไปใช้ในงานตรวจรักษาระดับโมเลกุลโดยใช้ออนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a เป็นโมเลกุลต้นแบบ 48
- สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 60
- เอกสารอ้างอิง 65
- ภาคผนวก 1 ผลงานที่เกี่ยวข้องและผลงานที่อยู่ระหว่างการดำเนินการ 69
- ภาคผนวก 2 ประวัติของคณะผู้วิจัย 135

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

รูปที่ 1.1	ภาพไตกล้องจุลทรรศน์ของตัวอย่างเซลล์และชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกที่ย้อมด้วยเทคนิคพยาธิวิทยามาตรฐานเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ย้อมด้วยแอนติบอดีจับจำเพาะกับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา	4
รูปที่ 1.2	ชุดตรวจโปรตีนพร้อมภาพผลการย้อมตัวอย่างสไลด์ชิ้นเนื้อที่มีรอยโรคมะเร็งปากมดลูกระยะเริ่มต้นและระยะลุกลาม	5
รูปที่ 1.3	ภาพวาดแสดงขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody)	7
รูปที่ 1.4	ภาพวาดแสดงขนาดและองค์ประกอบที่สำคัญของอนุภาคฟาจดิสเพลย์	9
รูปที่ 1.5	ภาพแสดงวงจรการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอฟาจ	10
รูปที่ 1.6	ภาพวาดแสดงการตัดต่อดีเอ็นเอที่สนใจลงในดีเอ็นเอของอนุภาคฟาจสำหรับการสร้างคลังของฟาจ	11
รูปที่ 1.7	ภาพแสดงกระบวนการในการนำคลังของฟาจดิสเพลย์มาใช้หาโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา	14
รูปที่ 1.8	ภาพแสดงการนำสารละลายอนุภาคฟาจไปเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างชนิดต่างๆ	16
รูปที่ 1.9	ภาพแสดงการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียและอนุภาคฟาจ	17
รูปที่ 2.1	แผนภาพแสดงขั้นตอนการคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะ	24
รูปที่ 2.2	แผนภาพแสดง DNA และตำแหน่งที่ใช้ตัดต่อยีนของอนุภาคฟาจ	27
รูปที่ 3.1	ผลการคัดเลือกฟาจที่จับจำเพาะกับ P16INK4a	36
รูปที่ 3.2	แสดงลำดับเบสไปโตต์จำนวน 20 ฟาจโคลนที่ได้กระบวนการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a	37
รูปที่ 3.3	ผลการทำ biopanning เพื่อคัดเลือกฟาจที่จับจำเพาะกับ TOP2A	38
รูปที่ 3.4	แสดงลำดับเบสไปโตต์จำนวน 20 ฟาจโคลนที่ได้กระบวนการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อเอนไซม์ TOP2A	39
รูปที่ 3.5	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการศึกษาปฏิกิริยาจับจำเพาะด้วยเทคนิค ELISA	41
รูปที่ 3.6	ภาพแสดงผลการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ด้วยอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a	43
รูปที่ 3.7	กราฟแสดงค่าทางสถิติของความแตกต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากผลการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ด้วยอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a	44
รูปที่ 3.8	ภาพแสดงผลการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ด้วยอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน TOP2A	46

สารบัญภาพ (List of Illustrations II)

รูปที่ 3.9	กราฟแสดงค่าทางสถิติของความแตกต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากผลการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ด้วยอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน TOP2A	47
รูปที่ 3.10	ภาพโครงสร้างแสดงการทำนายการจับกันระหว่างเปปไทด์ 5 เส้นกับ P16INK4a โดยอาศัยโปรแกรม protein docking	48
รูปที่ 3.11	ภาพแสดงผลการคำนวณและจำลองแบบของเปปไทด์จับกับ P16INK4a ที่เลือก	50
รูปที่ 3.12	ภาพแสดงผลการทำนายรูปแบบการจับกับโปรตีน P16INK4a จากการคำนวณ	51
รูปที่ 3.13	ภาพแสดงผลการทำนายโครงสร้างการจับกันระหว่างเปปไทด์ 4 เส้นกับโปรตีน TOP2A	52
รูปที่ 3.14	ภาพแสดงผลการทำนายโครงสร้างการจับกันระหว่างเปปไทด์ 4 เส้นกับโปรตีน TOP2A ตรงตำแหน่งจับกับ DNA	53
รูปที่ 3.15	กราฟแสดงผลการทดสอบอนุภาคฟาจในการซึมผ่านเซลล์	55
รูปที่ 3.16	กราฟแสดงผลการศึกษาหาเวลาที่ใช้ในการเตรียมเปิดผิวเซลล์ด้วยสารละลาย	56
รูปที่ 3.17	กราฟแสดงของการใช้อนุภาคฟาจจับจำเพาะกระตุ้นสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์	57
รูปที่ 3.18	กราฟแสดงผลการทดสอบความสามารถในการแทรกซึมผ่านเซลล์ของอนุภาคฟาจจับจำเพาะเปรียบเทียบกับโมเลกุลเปปไทด์สังเคราะห์	58
รูปที่ 3.19	ตัวอย่างภาพการย้อมเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกในเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี โดยใช้อนุภาคฟาจ	59

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

ABTS	Azino-bis(3-ethylbenzothiazole sulfonic acid) diammonium salt
ACE	Atomic contact energy
BSA	Bovine serum albumin
CDK	Cyclin-dependent kinase
CD44	Cell surface glycoprotein encoded by the CD44 gene
cDNA	Complementary DNA
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylidole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyldinitrilo)tetraacetate acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HB	Hydrogen and disulfide bonds
HPV	Human papillomavirus
HRP	Horseradish peroxidase
HUF	Human uterine fibroblast
H&E stain	Hematoxylin and eosin stain
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria broth
MCM2	Mini Chromosome Maintenance protein 2
p16 ^{INK4a}	CDK4/6 inhibitor 2A
Pap test	Papanicolaou test
PEG	Polyethalene glycol (PEG)
pfu	Plaque-forming unit
RNA	Ribonucleic acid
rVdW	Softened repulsive van der Waals energy
aVdW	Softened attractive van der Waals energy
ss-DNA	Single-stranded DNA
TBST buffer	Tris-Buffered Saline buffer
TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris)
Tween20	Polysorbate 20
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D- galactopyranoside

บทนำ (Introduction)

1. มะเร็งปากมดลูกและอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer)

ปัจจุบันมะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer) นับเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขที่มีอุบัติการณ์ผู้ป่วยรายใหม่ทั่วโลกมากกว่า 500,000 รายต่อปี และมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 50% ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยมากกว่า 80 % ของผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกทั้งหมดมักพบอยู่ในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา (1-3) สำหรับอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกในประเทศไทยในปัจจุบันจากรายงานการสำรวจผู้ป่วยโรคมะเร็งทั่วประเทศ โดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติพบว่ามะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านม ซึ่งรายงานผู้ป่วยเพิ่มขึ้นในแต่ละปีมากกว่า 6,500 รายทั่วประเทศ (4, 5) อุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่พบมากในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนารวมถึงประเทศไทยเกิดจากปัญหาสำคัญ ได้แก่ การขาดแคลนระบบการตรวจคัดกรองโรค หรือมีระบบการตรวจคัดกรองแต่ไม่สามารถจัดการระบบได้อย่างมีประสิทธิภาพ การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหารอยโรคระยะเริ่มต้นก่อนเกิดมะเร็งปากมดลูกทำให้แพทย์สามารถวางแผนติดตามเฝ้าระวังหรือกำจัดรอยโรคได้ก่อนการพัฒนาเป็นมะเร็ง จึงช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดโรครวมถึงลดงบประมาณในการบริหารจัดการด้านสาธารณสุขได้เป็นอย่างมาก

เทคนิคการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ได้แก่ การตรวจหาเซลล์ที่ผิดปกติในตัวอย่างเซลล์จากปากมดลูกโดยใช้เทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา (Pap smear) หากพบความผิดปกติจึงทำการส่องกล้องหาตรวจเพื่อหาบริเวณรอยโรคและทำการเก็บชิ้นเนื้อเพื่อตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิคทางพยาธิวิทยา (Histopathological examination) ต่อไป การตรวจคัดกรองและการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติทางเซลล์วิทยาและการตรวจยืนยันความผิดปกติทางพยาธิวิทยาจำเป็นต้องใช้แพทย์หรือเจ้าหน้าที่ผู้เชี่ยวชาญในการอ่านและประเมินผล โดยการประเมินผลยังแตกต่างกับขั้นประสบการณ์และความเห็นของผู้ตรวจเป็นสำคัญ ทำให้การประเมินผลความผิดปกติของเซลล์และความผิดปกติทางพยาธิวิทยาไม่มีความแม่นยำ ผลการประเมินมีความไม่แน่นอน มีความแปรปรวนสูงขึ้นกับความเห็นของผู้ตรวจวินิจฉัย โดยเฉพาะการประเมินผลในรอยโรคที่มีขนาดเล็กหรือความผิดปกติระยะเริ่มต้น (6-8) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโดยใช้โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาเป็นโมเลกุลเป้าหมายในการบ่งชี้ภาวะความผิดปกติของเซลล์ ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโดยเทคนิคดังกล่าวเป็นการตรวจวินิจฉัยในระดับโมเลกุล สามารถตรวจวัดได้ ช่วยลดความแปรปรวนในการประเมินผล และสามารถตรวจพบความผิดปกติของเซลล์ได้ตั้งแต่เกิดความผิดปกติในระยะเริ่มต้นก่อนที่เซลล์จะมีการแสดงออกทางพยาธิวิทยาที่ผิดปกติให้เห็น จึงทำให้เทคนิคการตรวจในระดับโมเลกุลมีความแม่นยำสูงและมีความไวสูงในการตรวจหาเซลล์ที่มีความผิดปกติตั้งแต่ในระยะเริ่มต้น

จากข้อมูลการศึกษากระบวนการการเกิดมะเร็งปากมดลูกพบว่ามีมากกว่าร้อยละ 92 ของผู้ป่วยพบการติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา (Human papillomavirus; HPV) โดยสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่มักพบเป็นสาเหตุก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ได้แก่ HPV16, 18 (9-12) ผลผลิตโปรตีนก่อมะเร็งของเชื้อไวรัส E6 และ E7 ครอบคลุมกระบวนการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์มีวงจรการเจริญและการแบ่งตัวที่ผิดปกติรวมถึงมีการแสดงออกของโปรตีนควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติ ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนที่ผิดปกติเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นโมเดลบ่งชี้ทางชีววิทยาสำหรับการตรวจรักษามะเร็งปากมดลูกในระดับโมเลกุลได้ แม้การตรวจหาไวรัส HPV จะเป็นเทคนิคการตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุลที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายสำหรับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก แต่จากการศึกษาในจำนวนผู้ป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ HPV ทั้งหมด มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ตรวจพบรอยโรคระยะเริ่มต้นก่อนเกิดมะเร็งหรือรอยโรคของมะเร็งปากมดลูกด้วย Pap test หรือเทคนิคทางพยาธิวิทยา (13, 14) ดังนั้นการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ HPV เพียงอย่างเดียวจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นบ่งชี้หรือทำนายรอยโรคระยะต่างๆ ของมะเร็งปากมดลูก (15, 16) เนื่องจากเทคนิคการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส HPV เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แต่มีความจำเพาะต่อรอยโรคระยะต่างๆ ของมะเร็งปากมดลูกต่ำ เทคนิคดังกล่าวจึงนิยมใช้ร่วมกับการตรวจ Pap test เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจคัดกรอง โดยพบว่าการใช้เทคนิคทั้งสองร่วมกันสามารถลดความถี่ของการนัดตรวจซ้ำในกระบวนการตรวจคัดกรองได้เป็นอย่างน้อย 3 ปีต่อครั้งและใช้งบประมาณรวมของการตรวจคัดกรองน้อยกว่าการตรวจคัดกรองที่ใช้เทคนิค Pap smear เพียงอย่างเดียว (17, 18) ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยในระดับโมเลกุลที่ โดยดัดแปลงใช้โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาที่พบในเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงหรืออยู่ระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นโมเลกุลเป้าหมายเพื่อช่วยเพิ่มความจำเพาะและลดความแปรปรวนให้กับการตรวจวินิจฉัยรอยโรคมะเร็งปากมดลูกในระยะเริ่มต้น

2. การตรวจหารอยโรคมะเร็งปากมดลูกจากโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarkers)

โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker) ที่สามารถใช้บอกรอยโรคระยะต่างๆ ของมะเร็งปากมดลูกได้อย่างจำเพาะ ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่พบเฉพาะในเซลล์เยื่อบุปากมดลูกที่เป็นมะเร็งหรือกำลังมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง การตรวจหาสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ทำได้โดยใช้โมเลกุลตรวจจับ (Molecular probe) ติดด้วยสารนำสัญญาณ เช่นสารประกอบที่ทำให้เกิดสี หรือสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยโมเลกุลตรวจจับเหล่านี้จะสามารถจับกับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาในตัวอย่างตรวจได้อย่างจำเพาะ เมื่อลำโมเลกุลที่ไม่จับจำเพาะออกแล้วจึงวัดสัญญาณสีหรือแสงในตัวอย่างตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแบบธรรมดาหรือกล้องจุลทรรศน์วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ วิธีการตรวจหารอยโรคโดยอาศัยโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker) จึงตรวจหารอยโรคได้อย่างจำเพาะ มีความน่าเชื่อถือและลดความแปรปรวนของการแปลผลจากการตรวจวินิจฉัยต่างครั้งหรือต่างบุคคล (Inter-intra observer variations) ได้ สารชีวโมเลกุลที่พบใช้เป็นโมเลกุลบ่งชี้รอยโรคของมะเร็งปากมดลูกในปัจจุบัน ได้แก่ โปรตีนที่เซลล์หรือเชื้อไวรัส HPV ผลิตขึ้นเพื่อทำหน้าที่ต่างๆ เฉพาะในเซลล์มะเร็งหรือ

เซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์มะเร็ง โดยอาจมีเพิ่มขึ้นหรือหายไปจากเซลล์เนื้อเยื่อปกติ เนื่องจากเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกมักมีความผิดปกติในด้านการสร้างโปรตีนที่ช่วยในการเติบโตเพิ่มจำนวน (proliferation) และยับยั้งโปรตีนซึ่งมีหน้าที่ในการทำลายตัวเอง (apoptosis) ของเซลล์ผิดปกติหรือเซลล์ที่หมดอายุ รวมถึงอาจพบโปรตีนมะเร็ง (Oncoproteins) ที่กำหนดการสร้างโดยดีเอ็นเอของเชื้อ HPV เอง ทำให้โปรตีนเหล่านี้สามารถใช้เป็นโมเลกุลชี้วัดการทำงานของเซลล์ผิดปกติซึ่งพร้อมที่จะเจริญไปเป็นเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะ ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากพยายามศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ในเซลล์เพื่อหาโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาสำหรับตรวจแยกโรคระยะต่างๆ โดยสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ 4 กลุ่มได้แก่

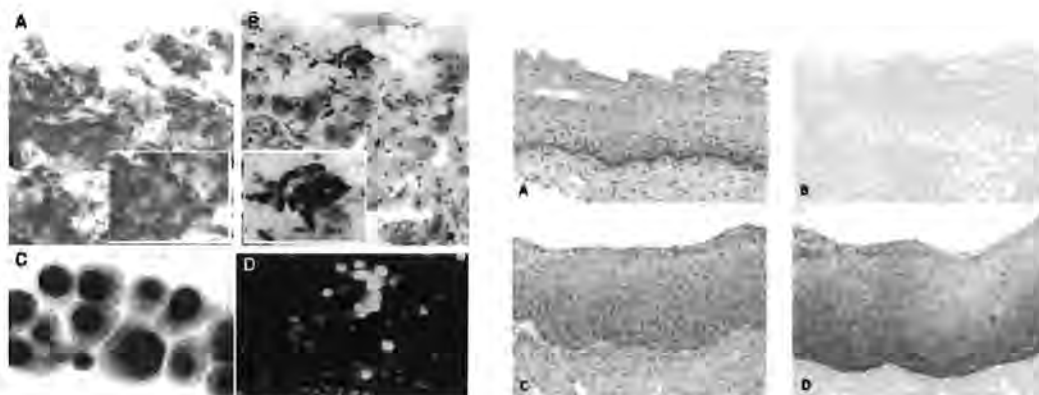
2.1) โมเลกุลโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) เช่น โปรตีน Ki-67 (19-21) และโปรตีนควบคุมการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Proliferating cell nuclear antigen) เช่น Topoisomerase II alpha (TOP2A) และ Mini Chromosome Maintenance protein 2 (MCM2) (22-24)

2.2) โมเลกุลโปรตีนควบคุมการเจริญของเนื้องอก (Tumor suppressor protein) โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาที่นิยมใช้แยกโรคระยะรอยโรคของมะเร็งปากมดลูกที่สำคัญ ได้แก่ P16INK4a (25-28), โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อก้อนเนื้องอกที่จะเจริญเป็นมะเร็ง เช่น CD44 (29, 30)

2.3) โปรตีนควบคุมการสร้างส่วนประกอบหรือโครงสร้างที่สำคัญของก้อนมะเร็ง เช่นโปรตีนส่งเสริมการเจริญของเส้นเลือดในก้อนมะเร็ง (Vascular endothelial growth factor: VEGF) (31)

2.4) โปรตีนของเชื้อไวรัส HPV ซึ่งเป็นโปรตีนก่อให้เกิดมะเร็งโดยไปกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของโปรตีนและยีนในเซลล์ปกติ โปรตีนที่นิยมนำมาใช้เป็นโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของรอยโรคมะเร็งปากมดลูกในกลุ่มนี้ได้แก่ โปรตีน E6 และโปรตีน E7 (32)

การศึกษาเพื่อค้นพบโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker) มีบทบาทสำคัญในการเลือกใช้โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาสำหรับตรวจวินิจฉัยแยกโรคระยะต่างๆ ของมะเร็งปากมดลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรอยโรคระยะเริ่มต้นก่อนเกิดมะเร็งซึ่งความผิดปกติของเซลล์หรือเนื้อเยื่อยังไม่ชัดเจน การใช้โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาตรวจโรคระยะต่างๆ ของมะเร็งปากมดลูก สามารถใช้ได้ทั้งในการตรวจหาเซลล์ผิดปกติใน Pap smear และการตรวจชิ้นเนื้อ โดยนำสารชีวโมเลกุลในกลุ่มแอนติบอดีติดด้วยสารนำสัญญาณตรวจจับ เช่นสารประกอบที่ทำให้เกิดสีหรือสารนำสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์เป็นโมเลกุลตรวจจับ (Molecular probe) ไปทำปฏิกิริยาจับจำเพาะกับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของเซลล์ใน Pap smear (Immunocytology) หรือในชิ้นเนื้อตัดจากผู้ป่วย (Immunohistology) เมื่อล้างแอนติบอดีที่ไม่จับจำเพาะออกจะสามารถเห็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาจับจำเพาะของโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 ซ้าย: แสดงภาพไตกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ใน Pap smear เปรียบเทียบระหว่างสไลด์ที่ย้อมด้วยเทคนิคทางเซลล์วิทยา (A) กับสไลด์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีจับจำเพาะกับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาซึ่งติดฉลากด้วยสารประกอบที่ทำให้เกิดสี (B และ C) และสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถตรวจหาเซลล์ที่ผิดเซลล์โดยใช้โมเลกุลแตกต่างกัน 2 ชนิดพร้อมกัน (D) จากรูปเป็นการใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สีเหลืองและแดง สำหรับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาแต่ละชนิด เซลล์ที่ผิดปกติจะพบโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาทั้ง 2 ชนิดซึ่งจะแสดงให้เห็นเป็นสีส้ม (33)

ขวา: แสดงภาพไตกล้องจุลทรรศน์ของชิ้นเนื้อที่ตัดจากผู้ป่วยเปรียบเทียบระหว่างชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยเทคนิคพยาธิวิทยา H&E (A และ C) กับชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยแอนติบอดีจับจำเพาะการโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาซึ่งติดฉลากด้วยสารประกอบที่ทำให้เกิดสี (B และ D) ของชิ้นเนื้อปกติ (บน) กับชิ้นเนื้อที่พบรอยโรคมะเร็งระยะ CIN3 (ล่าง) (34)

จากเทคนิคทั้งหมดของการตรวจหารอยโรคระยะเริ่มต้นก่อนเกิดมะเร็งปากมดลูกตามที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น จะเห็นได้ว่าโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มความจำเพาะรวมถึงช่วยลดความแปรปรวนในการแปลผลซึ่งขึ้นกับประสบการณ์ของบุคลากรผู้ปฏิบัติงานให้กับเทคนิคต่างๆ ตั้งแต่การตรวจคัดกรองด้วยเทคนิคทางเซลล์วิทยา (Pap test), การตรวจวินิจฉัยตัดชิ้นเนื้อด้วยเทคนิคทางพยาธิวิทยา (Histopathology) ไปจนถึงเทคนิคทางเลือกใหม่ซึ่งอาศัยการตรวจจับภาพมะเร็งด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังพัฒนาขึ้น ความจำเพาะและความไวของการตรวจจับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาเพื่อตรวจหารอยโรคมะเร็งปากมดลูกระยะต่างๆ จะขึ้นอยู่กับทางเลือกใช้โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาที่ศึกษาค้นพบ ซึ่งบางโมเลกุลอาจพบได้ในเซลล์ที่มีการเจริญแบ่งตัวตามปกติ (22) หรือความผิดปกติของเซลล์ในรอยโรคหนึ่งอาจพบโปรตีนบ่งชี้ทางชีววิทยาหลายชนิดทำงานร่วมกัน การจะเลือกใช้โมเลกุลเหล่านี้ในการบอกรอยโรคระยะต่างๆ ของมะเร็งปากมดลูกอย่างจำเพาะ จึงอาจจำเป็นต้องตรวจติดตามโปรตีนหลายๆ โมเลกุลพร้อมกันเป็นชุดโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker profile) เพื่อตรวจแยกโรคระยะต่างๆ ได้อย่างจำเพาะมากยิ่งขึ้น (35-37) จากจำนวนโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของรอยโรคมะเร็งปากมดลูกทั้งหมดที่มีการศึกษา พบว่าโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ตรวจแยกโรคระยะ

เริ่มต้นก่อนเกิดมะเร็งและมีการศึกษาพบว่าสามารถลดความแปรปรวนจากการแปรผลในแต่ละครั้งหรือแต่ละบุคคลได้ทั้งกับการตรวจด้วยทางเซลล์วิทยา (Pap test) และการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (histopathological examination) ได้แก่ โปรตีน P16INK4a (หรือการใช้โปรตีน P16INK4a ร่วมกับโปรตีน Ki67) และยังมีโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาอีกสองชนิดคือ Topoisomerase II alpha (TOP2A) และ Mini Chromosome Maintenance protein 2 (MCM2) ซึ่งเป็นโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาเป้าหมายของชุดน้ำยาสำหรับตรวจรอยโรคมะเร็งปากมดลูก ProEx C ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด (38, 39) โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาทั้งสามชนิดมีหลักฐานการศึกษาที่พิสูจน์ได้ค่อนข้างแน่ชัดแล้วว่าสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยมะเร็งเร็งปากมดลูกได้ทั้งในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เป็นเซลล์ใน Pap smear และในตัวอย่างชิ้นเนื้อ รูปที่ 1.2 แสดงภาพตัวอย่างของชุดน้ำยาสำหรับตรวจรอยโรคมะเร็งปากมดลูกใน Pap smear และในชิ้นเนื้อซึ่งตรวจหาโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา TOP2A และ MCM2 ได้พร้อมกัน



รูปที่ 1.2 ซ้าย: ชุดตรวจโปรตีน P16INK4a พร้อมภาพผลการย้อมตัวอย่างสไลด์ชิ้นเนื้อที่มีรอยโรคมะเร็งปากมดลูกระยะเริ่มต้นและระยะลุกลาม

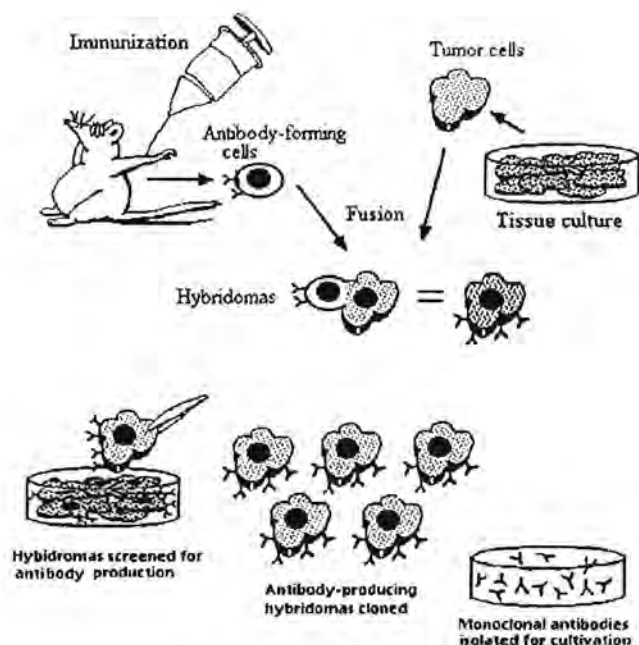
ขวา: ชุดตรวจโปรตีน ProExC (TOP2A และ MCM2) พร้อมภาพผลการย้อมตัวอย่างสไลด์ชิ้นเนื้อที่มีรอยโรคมะเร็งปากมดลูกระยะเริ่มต้นและระยะลุกลาม

โครงการวิจัยนี้ได้เลือกพัฒนาโมเลกุลตรวจจับขนาดเล็กเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจรักษาในระดับโมเลกุลซึ่งจำเพาะต่อโปรตีนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โปรตีน P16INK4a, และเอนไซม์ TOP2A ในชุดตรวจ ProExC ซึ่งเป็นโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในการตรวจหารอยโรคมะเร็งปากมดลูกและมีชุดตรวจที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน ซึ่งได้รับการพัฒนาให้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในงานย้อม immunohistochemistry ในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษร่วมด้วย

3. การพัฒนาโมเลกุลตรวจจับสำหรับการตรวจวินิจฉัยและการรักษามะเร็งในระดับโมเลกุล

การตรวจรักษาในระดับโมเลกุลเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายให้ใช้ในงานตรวจวินิจฉัยมะเร็งด้วยภาพและการรักษาโรคมะเร็งชนิดต่างๆ เนื่องจากให้ความถูกต้องน่าเชื่อถือและมีความจำเพาะต่อเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งสูง หลักการของการตรวจรักษามะเร็งในระดับโมเลกุลโดยทั่วไปมักอาศัยปฏิกิริยาจับจำเพาะระหว่างแอนติบอดีตรวจจับกับโปรตีนแอนติเจนซึ่งเป็นโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของเซลล์มะเร็ง (cancer or tumor markers) โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาเหล่านี้อาจมีเพิ่มขึ้นหรือหายไปจากเซลล์ปกติ เนื่องจากเซลล์ที่พัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งจะมีความผิดปกติในการสร้างโปรตีนที่ช่วยในการเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) โปรตีนซึ่งมีหน้าที่ในการทำลายตัวเอง (apoptosis) ของเซลล์ผิดปกติหรือเซลล์ที่หมดอายุ และโปรตีนที่ช่วยส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้อร้ายเป็นต้น โปรตีนเหล่านี้จึงสามารถใช้เป็นโมเลกุลเป้าหมายบ่งชี้การเกิดมะเร็งในระยะต่างๆ ได้อย่างจำเพาะ การดัดแปลงแอนติบอดีจับจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้การเกิดมะเร็งโดยติดฉลากแอนติบอดีด้วยสารที่ทำให้เกิดสีสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยรอยโรคมะเร็งด้วยภาพในระดับโมเลกุลหรืออาจนำไปสำหรับเทคนิคการรักษามะเร็งในระดับโมเลกุลโดยติดฉลากยาฆ่าเซลล์มะเร็งกับโมเลกุลแอนติบอดีแล้วฉีดเข้าร่างกายผู้ป่วย เพื่อใช้แอนติบอดีเป็นโมเลกุลขนส่งยาไปยังทำลายเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่อวัยวะต่างๆ ได้อย่างจำเพาะ (40-42) ดังนั้นเทคโนโลยีการพัฒนาโมเลกุลจับจำเพาะสำหรับงานตรวจรักษาในระดับโมเลกุลในปัจจุบันจำเป็นต้องคำนึงถึงการนำไปใช้ทั้งภายนอกและภายในร่างกายมนุษย์ โมเลกุลจับจำเพาะที่พัฒนาขึ้นใช้ในงานตรวจรักษาสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ แอนติบอดี โมเลกุลขนาดเล็กและเปปไทด์ขนาดเล็กสำหรับใช้ในงานตรวจวินิจฉัยและการรักษาในระดับโมเลกุล

แอนติบอดีเป็นโมเลกุลพื้นฐานที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในงานตรวจรักษาระดับโมเลกุล แอนติบอดีสำหรับใช้เป็นโมเลกุลตรวจจับที่จำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของมะเร็งชนิดต่างๆ มักนิยมใช้โมเลกุลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงที่เรียกว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีโดยทั่วไปจะเริ่มจากการฉีดโปรตีนแอนติเจนเป้าหมายบริสุทธิ์เพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลองก่อนฆ่าสัตว์ทดลอง นำเซลล์ม้ามหรือเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี (Antibody-forming cell) มาใช้หลอมรวมกับเซลล์มะเร็งเกิดเป็นเซลล์ลูกผสม (Hybridoma cell) ซึ่งสามารถเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีได้เพียงหนึ่งเซลล์มาเลี้ยงเพิ่มจำนวน ทำให้ได้แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากเซลล์ในโคลนเดียวกันจึงได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลแอนติเจนเป้าหมายสูง (43) ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีแสดงในรูปที่ 1.3



Monoclonal Antibody Production

Access Excellence @ the National Health Museum cited: <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/monoclonal.php>

รูปที่ 1.3: ภาพวาดแสดงขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody)

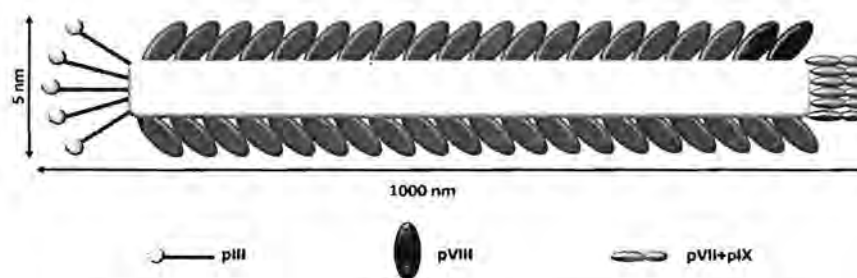
นอกจากกระบวนการผลิตโดยอาศัยการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีตามธรรมชาติในสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนเป้าหมายเพื่อผลิตแอนติบอดีใช้ในห้องทดลองแล้ว ยังมีการพัฒนาเทคนิคการผลิตโมเลกุลจับจำเพาะต่อแอนติเจนเป้าหมายในรูปแบบรีคอมบิเนนต์แอนติบอดีในเซลล์สายพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (cell line) โดยการผลิตรีคอมบิเนนต์แอนติบอดีเหล่านี้เกิดจากการตัดต่อดีเอ็นเอที่กำหนดสร้างเฉพาะส่วนของแอนติบอดีบริเวณจับจำเพาะกับแอนติเจนเป้าหมายกับเซลล์สายพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม วิธีดังกล่าวทำให้สามารถผลิตโมเลกุลตรวจจับได้จำนวนมากโดยการเลี้ยงเซลล์ในห้องทดลอง (44, 45) อย่างไรก็ตามขั้นตอนการผลิตโมเลกุลจับจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาไม่ว่าจะเป็นแอนติบอดีที่ผ่านการดัดแปลงในสัตว์ทดลองหรือรีคอมบิเนนต์แอนติบอดีมีกระบวนการที่ยุ่งยาก จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการผลิตและใช้งบประมาณในการผลิตสูง เพื่อแก้ไขข้อจำกัดของการผลิตโมเลกุลจับจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของเซลล์มะเร็งจึงได้มีการพัฒนาใช้โมเลกุลและเปปไทด์ขนาดเล็กสำหรับใช้ในงานตรวจรักษา โดยโมเลกุลขนาดเล็กและเปปไทด์ที่มีการประยุกต์ใช้อาจเป็นโมเลกุลหรือเปปไทด์ที่พบคู่ปฏิบัติการที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ เช่น โฟเลตสำหรับการตรวจหาโรคมะเร็งที่มีการแสดงออกของโฟเลตรีเซพเตอร์ที่ผิดปกติ หรือเปปไทด์ฮอร์โมนต่างๆ ซึ่งจำเพาะกับรีเซพเตอร์ที่

พบการแสดงออกผิดปกติในรอยโรคมะเร็ง เป็นต้น (46) อย่างไรก็ตามสำหรับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาอื่นๆ ซึ่งไม่พบโมเลกุลขนาดเล็กหรือเปปไทด์เป้าหมายที่จำเพาะ สามารถพัฒนาเปปไทด์ขนาดเล็กที่จับจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาเหล่านี้ผ่านกระบวนการคัดเลือกหาเปปไทด์จับจำเพาะขนาดเล็กโดยอาศัยเทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์

เนื่องจากเปปไทด์ตรวจจับเป็นโมเลกุลโปรตีนสังเคราะห์ขนาดเล็กซึ่งโดยทั่วไปจะมีความยาวประมาณ 6-20 ลำดับกรดอะมิโน ความสามารถในการจับจำเพาะบนโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาเป้าหมายของเซลล์มะเร็งจึงขึ้นอยู่กับลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์เป็นสำคัญ (ต่างจากการเลือกใช้โมเลกุลตรวจจับขนาดใหญ่ที่ความจำเพาะอาจขึ้นกับการพันงอของโปรตีนบริเวณจับจำเพาะร่วมด้วย) ดังนั้นการเลือกใช้เปปไทด์ตรวจจับที่มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมาะสมและมีความจำเพาะสูง จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการออกแบบพัฒนาโมเลกุลตรวจจับชนิดนี้ ขั้นตอนของการคัดเลือกลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของมะเร็งชนิดต่างๆ ทำได้โดยใช้เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ซึ่งสามารถกำหนดการสร้างเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันเป็นจำนวนมากในคราวเดียว เกิดเป็นคลังของฟาจสำหรับนำมาใช้เลือกจับกับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาเป้าหมายและทดสอบการจับจำเพาะก่อนนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนไปที่ได้ ไปผลิตเป็นเปปไทด์สังเคราะห์เพื่อใช้ในงานตรวจรักษาต่อไป

4. เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ (Phage display technology)

เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี 1985 โดย George Smith ซึ่งเป็นเทคนิคในการสร้างอนุภาคฟาจให้มีเปปไทด์หรือโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนแสดงอยู่ที่ผิว โดยเปปไทด์หรือโปรตีนที่แสดงอยู่ที่ผิวจะมีความสามารถในการจับกับโมเลกุลเป้าหมายตรงบริเวณที่สนใจได้อย่างจำเพาะจึงใช้เป็นอนุภาคตรวจจับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker) ได้ โครงสร้างของอนุภาคฟาจที่ใช้ในเทคโนโลยีจะมีลักษณะเหมือนกับอนุภาคไวรัสที่พบในธรรมชาติ ประกอบด้วยเปลือกโปรตีนหุ้มโมเลกุลของสารกำหนดข้อมูลทางพันธุกรรม (Genetic Information) ได้แก่ RNA หรือ DNA ฟาจที่ใช้ในเทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ส่วนมากอยู่ในกลุ่มฟาจเส้น (Filamentous phage) ประกอบด้วยเปลือกโปรตีนหุ้มสารพันธุกรรมเป็นวงแหวนดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Single strand DNA) ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนและสำหรับสร้างเปลือกโปรตีนของฟาจดิสเพลย์ เปลือกโปรตีนของฟาจมีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ pIII ประมาณ 3-5 โมเลกุลที่ปลายด้านหนึ่งของทำหน้าที่เกาะผิวเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเพื่อเพิ่มจำนวน และโปรตีน pVIII ประมาณ 2,700 โมเลกุล ล้อมรอบวงแหวนดีเอ็นเอสายเดี่ยวของฟาจทำหน้าที่รักษารูปร่างและช่วยในการนำดีเอ็นเอของฟาจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 1.4 การสร้างสายเปปไทด์หรือโปรตีนที่ต้องการให้แสดงบนผิวฟาจอาจรวมอยู่ที่โปรตีน pIII หรือ pVIII (Fusion protein) โดยมีความยาวได้ถึง 38 และ 6 โมเลกุลของกรดอะมิโน กรณีอยู่ที่ pIII และ pVIII ตามลำดับ โดยไม่ทำให้ความสามารถในการเกาะเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านหรือหน้าที่ในการรวมตัวของอนุภาคฟาจ (particle assembly) เปลี่ยนแปลงไป

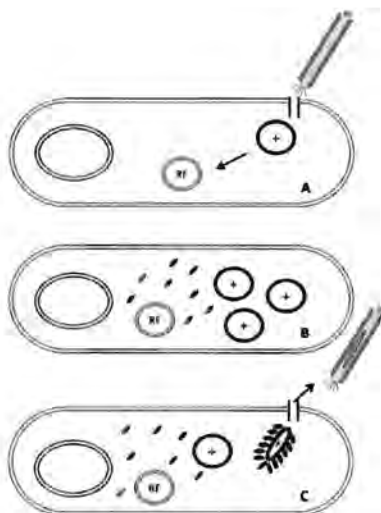


รูปที่ 1.4 แสดงขนาดและองค์ประกอบที่สำคัญของอนุภาคฟาจดิสเพลย์

อนุภาคฟาจไม่สามารถเติบโตและเพิ่มจำนวนได้เองเช่นเดียวกับอนุภาคไวรัส ฟาจจำเป็นต้องอาศัยเซลล์เจ้าบ้าน (host) โดยการปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านแล้วอาศัยเอ็นไซม์และวัตถุดิบที่จำเป็นของเซลล์เจ้าบ้านในการสร้างโปรตีนรวมถึงเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวเอง โปรตีนและสารพันธุกรรมของฟาจที่เพิ่มจำนวนขึ้นจะรวมกันเป็นอนุภาคใหม่แล้วออกจากเซลล์เจ้าบ้านเดิมเพื่อหาเซลล์เจ้าบ้านใหม่ในการเพิ่มจำนวนต่อไป การเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้านของฟาจเหล่านี้จะมีความจำเพาะซึ่งกำหนดโดยโปรตีน รีเซพเตอร์ (Protein receptor) ที่ผิวของฟาจ สำหรับฟาจที่นำมาใช้ในเทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์โดยทั่วไปจะเป็นฟาจที่ใช้เซลล์แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Bacteriophage) ดังนั้นจึงสามารถเพิ่มจำนวนฟาจได้ครั้งละมากๆ โดยการเลี้ยงเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์จำเพาะแล้วแต่ชนิดของฟาจที่ใช้

5. ฟาจที่ใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Bacteriophage)

เซลล์เจ้าบ้านของฟาจเส้น (Filamentous phage) ที่ใช้ทั่วไปในเทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ ได้แก่แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) ในกลุ่ม *E. coli* โดยการเพิ่มจำนวนของฟาจผ่านเซลล์ *E. coli* เริ่มจากการเกาะติดของโปรตีน pIII ที่ F pilus ที่ผิวเซลล์ *E. coli* จากนั้นฟาจจะปล่อยดีเอ็นเอสายเดี่ยวของตัวเองลงในเซลล์ *E. coli* ดีเอ็นเอสายเดี่ยวของฟาจจะถูกจำลองและสร้างเป็นดีเอ็นเอสายคู่เพื่อสร้างโปรตีน (Transcription-translation) ของฟาจและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของฟาจแล้วจึงรวมเป็นอนุภาคใหม่ถูกขับออกมาผ่านเมมเบรนของ *E. coli* ซึ่งอาศัยการทำงานร่วมกันของโปรตีน pVI, pI และ pXI ของฟาจ และโปรตีน thioredoxin ของ *E. coli* ในการสร้างช่อง (pVI channel) สำหรับขับอนุภาคฟาจออกจากเซลล์เจ้าบ้าน โดยที่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* จะไม่ถูกทำลายต่างจากการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่พบทั่วไปในธรรมชาติ (47-49) และเซลล์เจ้าบ้านจะยังสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ด้วยเวลาที่ช้ากว่าปกติประมาณ 50% อนุภาคฟาจที่ได้จากการเพิ่มจำนวน (47) อนุภาคฟาจซึ่งประกอบด้วยวงแหวนดีเอ็นเอสายเดี่ยวและเปลือกโปรตีนพร้อมกับสายเปปไทด์หรือโปรตีนที่ต้องการแสดงที่ผิวฟาจดิสเพลย์ที่ถูกปล่อยจากเซลล์เจ้าบ้านละลายอยู่ในมีเดียเหลวที่เลี้ยงแบคทีเรียอยู่ วงจรการเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจแสดงในรูปที่ 1.5



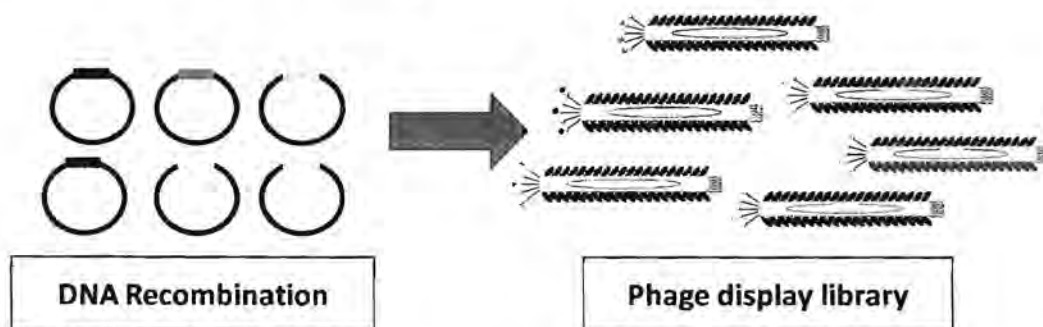
รูปที่ 1.5 ภาพแสดงวงจรการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอฟาจ อนุภาคฟาจเส้น (Filamentous phage) ปล่อยดีเอ็นเอสายเดี่ยวลงในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน ก่อนถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (Replication form; RF) (A) เพื่อเพิ่มจำนวนและสร้าง โปรตีนชนิดต่างๆ (B) สำหรับรวมตัวกันเป็นอนุภาคใหม่แล้วถูกปล่อยออกจากเซลล์เจ้าบ้าน ผ่านช่อง pVI สำหรับขับฟาจออกโดยไม่ทำลายเซลล์เจ้าบ้าน (C)

การให้ฟาจแสดงสายเปปไทด์ตามลำดับกรดอะมิโนที่ต้องการบนผิวทำได้โดยอาศัยงานด้านวิศวกรรมชีวภาพ (Bioengineering) (50) ในการตัดต่อสารพันธุกรรม (Genetic recombination) ของฟาจ ทำการตัดต่อดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับเบสที่สนใจเข้ากับดีเอ็นเอของฟาจจากนั้นจึงนำไปเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน เซลล์เจ้าบ้านจะใช้วัฏจักรที่จำเป็นในการถอดรหัสพันธุกรรมเพื่อสร้างโปรตีน (transcription-translation) ห่อหุ้มอนุภาคของฟาจ ซึ่งลำดับเบสในส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดต่อเข้าไปในดีเอ็นเอของฟาจจะถูกถอดรหัสเป็นสายเปปไทด์แสดงอยู่ที่ผิวของฟาจด้วย ด้วยกระบวนการดังกล่าวทำให้สามารถผลิตฟาจที่มีสายเปปไทด์ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนตามที่ต้องการอยู่ที่ผิวได้ จากประโยชน์ของความสามารถในการผลิตสายเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนตามต้องการได้จากการตัดต่อดีเอ็นเอที่รู้ลำดับเบสลงไปในดีเอ็นเอของฟาจทำให้สามารถผลิตฟาจดิสเพลย์ที่มีความหลากหลายได้โดยใช้ดีเอ็นเอที่มีลำดับแตกต่างกันตัดต่อลงในดีเอ็นเอของฟาจแล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้านในครั้งเดียวกันเพื่อผลิตสารละลายฟาจดิสเพลย์ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันจำนวนมากได้ถึงหนึ่งหมื่นล้านแบบ (10^{10}) ในสารละลายเดียวกันเรียกว่าคลังของฟาจ (Phage display library)

6. คลังของฟาจดิสเพลย์ (Phage display library)

คลังของฟาจดิสเพลย์ หมายถึงสารละลายที่มีฟาจดิสเพลย์จำนวนมากกว่าหนึ่งร้อยล้านตัวละลายอยู่ซึ่งแต่ละตัวจะแสดงเปปไทด์หรือโปรตีนสายสั้นๆ ที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันอยู่ที่ผิว เกิดจากการตัดต่อดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแตกต่างกันหลายๆ แบบลงในดีเอ็นเอของฟาจแล้วนำไปเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้านพร้อมกันในครั้ง

เดียวทำให้ได้ฟาจที่มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันจำนวนมากได้ถึงหนึ่งหมื่นล้านแบบ (10^{10}) ในสารละลายซึ่งสกัดจากเซลล์เจ้าบ้านในครั้งเดียว ดังแสดงในรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 ภาพวาดแสดงการตัดต่อดีเอ็นเอที่สนใจลงในดีเอ็นเอของอนุภาคฟาจสำหรับการสร้างคลังของฟาจ

5.1. คลังของฟาจแสดงเปปไทด์ชนิดที่มีลำดับกรดอะมิโนแบบสุ่ม (Phage display of random peptide library): คลังของฟาจซึ่งแสดงเปปไทด์ชนิดที่มีลำดับกรดอะมิโนแบบสุ่ม คือ คลังของฟาจที่เกิดจากการตัดต่อดีเอ็นเอที่กำหนดที่มีจำนวนเบสเท่ากัน แต่มีตำแหน่งของลำดับเบสสลับกับแบบสุ่มทำให้ได้สายเปปไทด์แสดงบนอนุภาคฟาจที่มีขนาดความยาวเท่ากันแต่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันแบบสุ่ม ความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนในคลังของฟาจชนิดนี้ สามารถนำมาใช้สำหรับศึกษารายละเอียดของลำดับกรดอะมิโนตรงบริเวณเข้าทำปฏิกิริยาของโมเลกุลโปรตีนและแอนติบอดี (Epitope mapping) และใช้หาลำดับกรดอะมิโนที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างจำเพาะ (Biomarker identification) โดยใช้ได้กับตัวอย่างตรวจทั่วไปไม่จำกัดชนิด

5.2. คลังของฟาจแสดงเปปไทด์หรือโปรตีนชนิดที่สร้างจาก cDNA (Phage display cDNA library): คลังของฟาจที่เกิดจากการตัดต่อชิ้นส่วนของดีเอ็นเอคู่สม (Complementary DNA; cDNA) ซึ่งสังเคราะห์จากเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ได้จากเซลล์ที่ต้องการศึกษา (การสร้างคลังของฟาจจากเอ็มอาร์เอ็นเอนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อต้องการจำลองคลังของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อทำงานในเซลล์ คลังของฟาจที่รู้จักกันดีในกลุ่มนี้ ได้แก่คลังของโปรตีนแอนติบอดี (Phage display antibody library) โมเลกุลแอนติบอดีตรงบริเวณที่มีส่วนจับจำเพาะกับโปรตีนแอนติเจนได้หลากหลาย (variable region) ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด บี ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น ดังนั้นการแยกเอาเฉพาะส่วนของเอ็มอาร์เอ็นเอที่กำหนดการถอดรหัสโปรตีนตรงบริเวณที่มีส่วนจับจำเพาะกับโปรตีนแอนติเจน (variable region) ลีดขาว มาแปลงเป็นซีดีเอ็นเอแล้วนำไปจากเซลล์เม็ด (ตัดต่อลงดีเอ็นเอของฟาจ จะทำให้ได้คลังของฟาจที่แสดงส่วนของโปรตีนแอนติบอดีที่สามารถจับกับแอนติเจนได้หลากหลายตามที่เซลล์เม็ดเลือดขาวนั้นผลิตขึ้น การนำฟาจที่แสดงส่วนของแอนติบอดีมาใช้แทนแอนติบอดีทั้ง

โมเลกุล จะทำให้สามารถสร้างโมเลกุลตรวจจับที่มีราคาถูกลง และยังมีคุณสมบัติที่จะใช้ในร่างกายสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) มากกว่าเนื่องจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดโมเลกุลออกจากร่างกายทำได้ช้ากว่า (51) การนำคลังของฟาจชนิดนี้มาใช้มักทำกับตัวอย่างตรวจที่ต้องการศึกษาการทำงานของโมเลกุลโปรตีนในเซลล์ซึ่งจำเพาะใช้ได้เพียงในระบบโปรตีนของเซลล์ที่นำมาใช้สกัดเอ็นอาร์เอ็นเอ

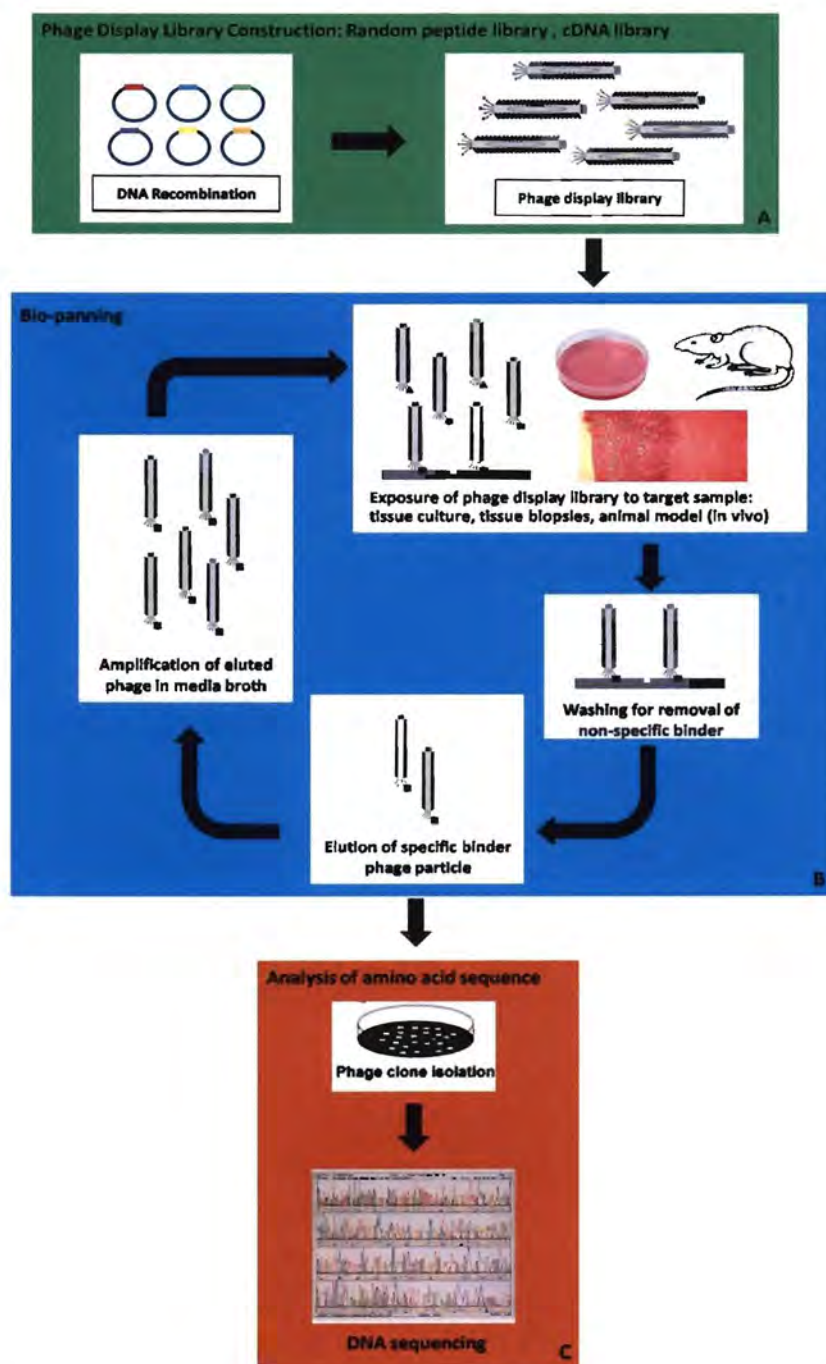
7. การประยุกต์ใช้คลังของฟาจดิสเพลย์ (Application of phage display library)

จากความรู้ในเรื่องการจัดรูปแบบโครงสร้างของโปรตีนเพื่อทำหน้าที่ต่างๆ ภายในเซลล์ (Functional protein) ซึ่งพบว่าหน่วยย่อยที่ทำให้โปรตีนเหล่านี้สามารถจัดรูปแบบโครงสร้าง (Structural formation) รวมถึงสามารถเกิดปฏิกิริยาจับกันได้อย่างจำเพาะระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction) จำเป็นต้องประกอบด้วยกรดอะมิโนอย่างน้อยที่สุด 3 ตัว (Tripeptide motif) แม้การที่สายเปปไทด์มีจำนวนกรดอะมิโนที่ยาวขึ้นและมีการพับงอเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้น จะช่วยได้พันธะที่แข็งแรงขึ้นหรือมีความจำเพาะมากขึ้นในการเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโปรตีน แต่หน่วยย่อยที่เล็กที่สุดซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ตัว นี้ ถือเป็นหน่วยพื้นฐานที่ทำให้โปรตีนสามารถทำงานหรือเกิดปฏิกิริยาจับกันได้ (52) ฟาจดิสเพลย์ที่มีเปปไทด์สายสั้นๆ บนผิวที่ปลายด้านหนึ่ง ซึ่งอาจมีลักษณะเป็นวงเปปไทด์ (Loop) แสดงหน่วยย่อยของโปรตีนที่ทำหน้าที่ได้ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนอย่างน้อย 3 ตัว เมื่อนำคลังของฟาจดิสเพลย์ที่มีลำดับกรดอะมิโน (Amino acid sequence) แตกต่างกันในสายโปรตีนไปทำปฏิกิริยาจับกับโปรตีนเป้าหมายในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา หน่วยย่อยโปรตีนบนฟาจบางตัวจะสามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะในขณะที่บางตัวไม่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้ ฟาจที่ไม่จับกับโปรตีนเป้าหมายจะถูกล้างทิ้งไปเหลือแต่ฟาจที่จับได้กับโปรตีนเป้าหมายซึ่งสามารถแยกออกมาตรวจสอบลำดับของกรดอะมิโนได้ ด้วยกระบวนการที่กล่าวมานี้จะทำให้รู้ถึงรายละเอียดของลำดับกรดอะมิโนตรงบริเวณที่โปรตีนเข้าทำปฏิกิริยากัน (Epitope) และเนื่องจากในคลังของฟาจดิสเพลย์ประกอบด้วยหน่วยของโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันมากมายหลายแบบ ฟาจที่ทำปฏิกิริยาจับกับโปรตีนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะอาจมีมากกว่า 1 แบบซึ่งสามารถร่างเป็นแผนที่ตรงบริเวณที่โปรตีนเข้าทำปฏิกิริยากัน (Mapping epitope) สายเปปไทด์ที่แสดงอยู่บนผิวฟาจสามารถเกิดปฏิกิริยาจับโมเลกุลเป้าหมายต่างๆ เช่น โมเลกุลแอนติบอดี, โปรตีนแอนติเจนชนิดต่างๆ หรือโมเลกุลตัวรับ (Receptor molecule) ได้อย่างจำเพาะ (53) จึงทำให้สามารถดัดแปลงคลังของฟาจดิสเพลย์ไปเป็นเครื่องมือสำหรับศึกษาบริเวณเกิดปฏิกิริยาจับกันของโปรตีน (Epitope) ที่พบในธรรมชาติได้อย่างกว้างขวางเกือบทุกปฏิกิริยา รวมถึงอาจช่วยให้ค้นพบโปรตีนเป้าหมายใหม่ๆ ที่ไม่เคยค้นพบมาก่อนอีกด้วย ดังจะพบได้ว่าการประยุกต์นำคลังของฟาจดิสเพลย์ไปใช้อาจทำเพื่อการศึกษาบริเวณเกิดปฏิกิริยาสำหรับคู่ปฏิกิริยาโปรตีนซึ่งเป็นที่รู้จักอยู่แล้ว (54) หรือใช้เพื่อหาโมเลกุลเป้าหมายใหม่ๆ ซึ่งสามารถบ่งชี้รอยโรคได้อย่างจำเพาะ (Specific Biomarker) มากกว่าโมเลกุลเป้าหมายเดิมที่มีอยู่

8. การประยุกต์ใช้คลังของฟาจดีสเพลย์เพื่อคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker)

การประยุกต์ใช้คลังของฟาจเพื่อหาโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker) ชนิดใหม่ๆ เป็นประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยและการรักษา ในขั้นของการตรวจวินิจฉัยคลังของฟาจดีสเพลย์จะถูกนำมาใช้เพื่อหาโมเลกุลตรวจจับ (Molecular probe) ที่จับกับโปรตีนเป้าหมายอย่างจำเพาะโดยติดตามสัญญาณ เช่น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ สารเคมีที่ทำให้เกิดสี หรือสารเคมีลูมิเนสเซนซ์ที่อนุภาคฟาจแล้ว ติดตามสัญญาณการจับกันของโมเลกุลด้วยภาพ (Molecular imaging) จากกล้องจุลทรรศน์ชนิดต่างๆ ทำให้สามารถตรวจวัดโปรตีนเป้าหมายในตัวอย่างตรวจได้อย่างจำเพาะ ส่วนในขั้นของการรักษาของฟาจดีสเพลย์มักจะถูกนำมาใช้เพื่อหาโมเลกุลซึ่งทำหน้าที่ขนส่งยา (Drug delivery) เพื่อให้ยาออกฤทธิ์จำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย (Targeting therapeutics) การใช้โมเลกุลขนส่งยาไปยังบริเวณเป้าหมายได้อย่างจำเพาะนี้ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาโดยสามารถควบคุมการออกฤทธิ์เฉพาะที่และลดผลข้างเคียงของยาต่ออวัยวะอื่นรวมถึงช่วยลดปริมาณยาที่จำเป็นต้องใช้เพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดซึมของยาไปสู่อวัยวะเป้าหมายอีกด้วย

กระบวนการในการนำคลังของฟาจดีสเพลย์มาใช้หาโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker) หรือโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างตรวจ และการคัดเลือกฟาจดีสเพลย์ที่สามารถนำมาใช้ในงานตรวจรักษาประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การเตรียมคลังของฟาจดีสเพลย์ (Phage display library construction) 2) การคัดเลือกโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาโดยคลังของฟาจดีสเพลย์ (Bio-panning) และ 3) การตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่สามารถจับกับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาได้อย่างจำเพาะดังแสดงตามแผนผังในรูปที่ 1.7



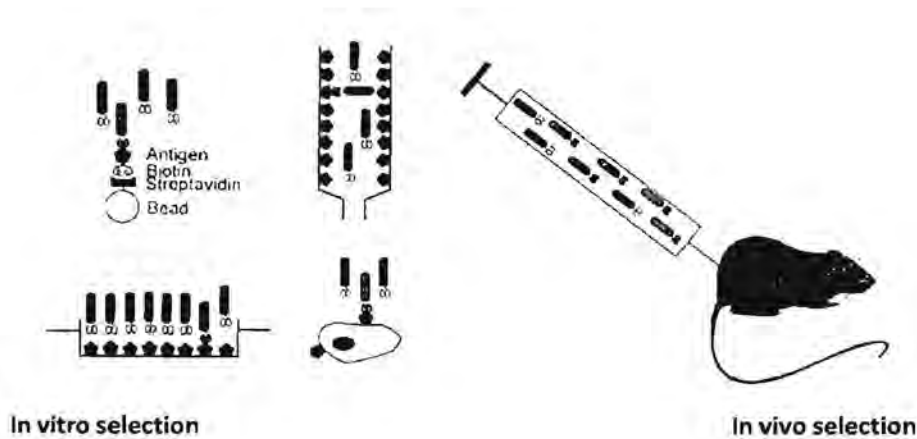
รูปที่ 1.7. ภาพแสดงกระบวนการในการนำคลังของฟาจดิสเพลย์มาใช้หาโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker) หรือโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างตรวจซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ 1) การเตรียมคลังของฟาจดิสเพลย์ (Phage display library construction) (A) 2) การคัดเลือก

โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาโดยคลังของฟาจดิสเพลย์ (Bio-panning) (B) และ 3) การตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่สามารถจับกับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาได้อย่างจำเพาะ (C)

7.1. การเตรียมและเพิ่มจำนวนคลังของฟาจ: การเตรียมคลังของฟาจดิสเพลย์โดยการตัดต่อดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่หลากหลายลงในดีเอ็นเอของฟาจ ดีเอ็นเอที่ใช้ตัดต่ออาจเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม หรือเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จาก mRNA ซึ่งสกัดจากเซลล์ขึ้นอยู่กักระบบของโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา โดยใช้เอนไซม์ Restriction endonuclease ตัดวงแหวนดีเอ็นเอของฟาจตรงตำแหน่งที่จำเพาะและนำดีเอ็นเอที่สนใจแทรกลงไปต่อดีเอ็นเอเข้ากันด้วยเอนไซม์ DNA ligase (50) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ตัดต่อขึ้นใส่เซลล์เจ้าบ้านของฟาจที่ใช้โดยเทคนิค electroporation แล้วเลี้ยงแบคทีเรียเจ้าบ้านในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวเพื่อแบคทีเรียเจ้าบ้านสร้างอนุภาคของฟาจที่มีสายโปรตีนที่ต้องการแสดงอยู่ออกมาดังแสดงในรูปที่ 1.7 A.

7.2. Bio-panning: กระบวนการในการนำคลังของฟาจดิสเพลย์มาใช้หาโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker) หรือโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างตรวจประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การนำอนุภาคฟาจในคลังไปเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมาย 2) ล้างอนุภาคฟาจที่ไม่จับจำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายออก 3) แยกอนุภาคฟาจที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายออกมาเพิ่มจำนวน 4) เพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจที่จำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างตรวจดังแสดงในรูปที่ 1.7 B.

- การนำอนุภาคฟาจในคลังไปเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมาย: การนำคลังของฟาจซึ่งประกอบด้วยเฟสที่ที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันหลายชนิดไปเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างที่ต้องการศึกษาซึ่งอาจทำได้ในห้องทดลอง (in vitro) หรืออาจนำคลังของฟาจไปเลือกจับกับอวัยวะที่อยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (in vivo) (55) ตัวอย่างส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษาหาโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาในห้องทดลอง เช่น การศึกษาโมเลกุลแอนติบอดีและเซลล์ในเลือด (56) การศึกษาหาโมเลกุลเป้าหมายในเนื้อเยื่อที่เก็บจากสิ่งมีชีวิตสารคัดหลั่ง รวมถึง (Tissue biopsies) สามารถทำได้โดยแยกเอาโมเลกุลหรือเซลล์ที่ต้องการศึกษาติดบนผิวของอุปกรณ์คัดกรองซึ่งอาจเป็นเม็ดเซฟาเดกซ์ (Sephadex bead matrix) คอลลิมนัดแคตไอออน, ผิวพลาสติกหรือติดบนกระจกสไลด์ก่อนเติมสารละลายคลังของฟาจท่วมบนผิวตัวอย่างตรวจแล้วปล่อยให้ฟาจเลือกทำปฏิกิริยาจับโมเลกุลเป้าหมาย สำหรับการนำฟาจดิสเพลย์ไปเลือกจับโมเลกุลเป้าหมายภายในอวัยวะของสิ่งมีชีวิตจะทำโดยการฉีดสารละลายคลังของฟาจเข้าสู่กระแสเลือดของสัตว์ทดลองแล้วจึงตัดเอาชิ้นเนื้อจากอวัยวะที่ต้องการศึกษามาคัดแยกอนุภาคฟาจซึ่งจับอยู่ที่อวัยวะดังกล่าวมาตรวจวิเคราะห์ (47) การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาเลือกจับกับสารละลายอนุภาคฟาจแสดงในรูปที่ 1.8

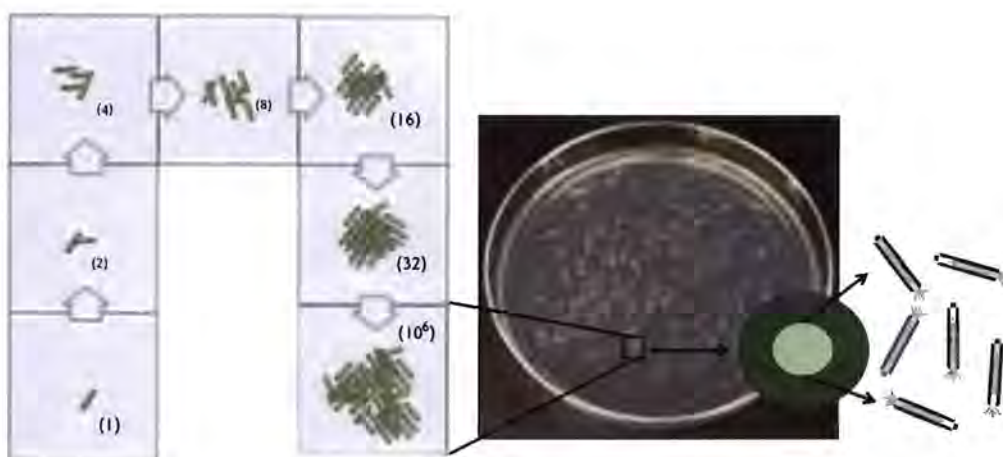


รูปที่ 1.8 แสดงการนำสารละลายอนุภาคฟาจไปเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ซึ่งทำได้ในห้องทดลอง (in vitro selection) โดยติดบนตัวค้ำจุน เช่น บนเม็ดเซฟาเตกซ์, คอลัมน์คัดแยกสารชีวพลาสติกโพลีเมอร์ รวมถึงเซลล์และเนื้อเยื่อบนกระจกสไลด์ และภาพแสดงการการนำ , สารละลายอนุภาคฟาจไปเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมายในสิ่งมีชีวิต (in vivo selection) ตามลำดับ (47)

- การแยกอนุภาคฟาจที่สามารถจับจำเพาะออกจากโมเลกุลเป้าหมาย: การแยกเอาอนุภาคฟาจดีสเพลย์ที่จับกับโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างจำเพาะ โดยสารละลายกรด เช่น กรดเกลือ (HCl) เจือจาง และสารละลายไกลซีน (Glycine buffer) หรืออาจใช้สารละลายโมเลกุลโปรตีนชนิดอื่นที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้จำเพาะกว่าไปแย่งจับกับอนุภาคฟาจเพื่อแยกเอาอนุภาคฟาจออกจากตัวอย่างตรวจ (47, 57)

- การเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจที่จำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย: การเพิ่มจำนวนฟาจจับจำเพาะที่แยกได้ทำโดยอาศัยเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านในการเพิ่มจำนวน ระหว่างการเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้านในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว อนุภาคฟาจที่เพิ่มจำนวนในเซลล์จะถูกขับออกจากเซลล์ ซึ่งสามารถปั่นตกตะกอนแล้วล้างเอาฟาจที่เพิ่มจำนวนนำกลับไปคัดเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมายในรอบถัดไป

กระบวนการสำหรับคัดเลือกโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาโดยคลังของฟาจดีสเพลย์ (Bio-panning) จะทำซ้ำประมาณ 3-5 รอบเพื่อให้ได้ฟาจดีสเพลย์ที่จำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา จากนั้นจึงนำอนุภาคฟาจที่เลือกได้ไปเลี้ยงในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน เพื่อให้ฟาจฉีดสารพันธุกรรมเข้าในเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านที่มีสารพันธุกรรมของฟาจอยู่ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนบนจานเพาะเชื้อ โดยเซลล์เจ้าบ้าน 1 เซลล์บนจานเพาะเชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็น 1 โคโลนี ดังนั้นในโคโลนีหนึ่งๆ บนจานเพาะเชื้อจะมีฟาจที่แสดงลำดับกรดอะมิโนแบบเดียวกันเพียง 1 แบบบนโคโลนีเรียกว่า "Plaque" ดังแสดงในรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.9 แสดงการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย 1 เซลล์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเมื่อเซลล์เจริญเป็น โคลินี จะมีกลุ่มอนุภาคฟาจ (Plaque) ซึ่ง 1 โคลินีจะมีฟาจที่แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ เหมือนกันอยู่ 1 แบบ (50)

7.3. การตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนของฟาจที่เลือกได้: การตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ บนผิวฟาจที่จับจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมาย สามารถทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอของฟาจบริเวณที่กำหนดการสร้างสายเปปไทด์จากกลุ่มอนุภาค (Plaque) ที่แยกได้บนโคลินีของเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน หรืออาจเขี่ยเอาโคลินีแบคทีเรียเจ้าบ้านมาเพิ่มจำนวนเพื่อสกัดเอาดีเอ็นเอของฟาจที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรีย แล้วตัดเฉพาะดีเอ็นเอส่วนที่กำหนดการสร้างสายเปปไทด์มาหาลำดับเบสและแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ที่แสดงบนผิวฟาจได้ดังแสดงในรูปที่ 1.7 C.

เมื่อได้ลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์บนอนุภาคฟาจที่สามารถจับจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย ในตัวอย่างที่ได้ ลำดับกรดอะมิโนนี้อาจนำไปใช้พร้อมทั้งอนุภาคฟาจหรือนำไปสังเคราะห์เอาเฉพาะสายเปปไทด์ไปใช้เป็นโมเลกุลตรวจจับ (Molecular probe) ในการตรวจรักษาโรค การประยุกต์นำฟาจทั้งอนุภาคมาใช้เป็นโมเลกุลตรวจจับแทนแอนติบอดี จะทำให้ได้โมเลกุลตรวจจับที่มีราคาประหยัดสามารถเพิ่มจำนวนได้ง่ายผ่านเซลล์เจ้าบ้านด้วยเทคนิคการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียทั่วไป ส่วนการนำเฉพาะลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์มาสังเคราะห์ใช้จะทำให้ได้โมเลกุลตรวจจับที่มีขนาดเล็ก เหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับนำไปใช้ในร่างกายสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) เนื่องจากแทรกซึมสู่มอเลกุลเป้าหมายภายในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ได้ง่าย สามารถหลีกเลี่ยงการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสิ่งมีชีวิต และมีความจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย โมเลกุลเปปไทด์เหล่านี้อาจนำมาติดอนุพันธ์ยาเพื่อใช้เป็นอนุภาคสำหรับขนส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ(58) หรือติดสารนำสัญญาณแสงเพื่อขนส่งสารนำสัญญาณไปบริเวณรอยโรคในขั้นตอนการตรวจวินิจฉัย ช่วยคัดเลือกบริเวณที่มีรอย

โรคเพื่อการกำจัดหรือตัดชิ้นเนื้อส่งตรวจโดยวิธีมาตรฐานได้อย่างจำเพาะทันทีขณะที่ทำการตรวจโดยไม่ต้องรอผลจากห้องปฏิบัติการ (59)

9. เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์กับโรคมะเร็งปากมดลูก

ความสำเร็จของในงานวิจัยที่ศึกษาการนำเทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์มาใช้พัฒนาการตรวจวินิจฉัยและรักษามะเร็งปากมดลูกที่มีอยู่เป็นการศึกษาเพื่อคัดเลือกฟาจดิสเพลย์จากคลังของฟาจที่มีอยู่ปัจจุบันใช้โมเลกุลเป้าหมายจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ โปรตีนมะเร็ง (Oncoprotein) สกัดบริสุทธิ์ของไวรัส HPV หรือการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะบนเนื้อเยื่อมะเร็งที่เลี้ยงขึ้นในห้องทดลอง (Tissue culture) โปรตีนมะเร็ง (Oncoprotein) สกัดบริสุทธิ์ที่ใช้ในคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะเป็นโปรตีนของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ก่อโรค เช่น HPV16 และ HPV18 ที่พบภายในเซลล์มะเร็ง โดยโปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนเป้าหมายที่มีใช้อยู่แล้วในการตรวจวินิจฉัยด้วยแอนติบอดี คลังของฟาจดิสเพลย์จะถูกนำมาใช้เพื่อหาโมเลกุลตรวจจับที่มีความจำเพาะมากขึ้นและผลของลำดับกรดอะมิโนที่คัดเลือกได้สามารถนำไปใช้สร้างเปปไทด์หรือส่วนของแอนติบอดีตรวจจับขนาดเล็กที่แทรกซึมเข้าไปจับโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์ได้ง่าย (60, 61) ถึงแม้ว่าโปรตีนของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ก่อโรคเหล่านี้จะจัดเป็นโมเลกุลบ่งชี้ทางที่สำคัญชีววิทยาของมะเร็งปากมดลูก แต่ในผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกที่พบในกลุ่มประชากรอาจมีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดหรือในบางรายไม่พบการติดเชื้อ HPV ร่วมด้วย ทำให้ผลของฟาจดิสเพลย์ที่ได้มีข้อจำกัดในการนำมาใช้จริง สำหรับการคัดเลือกฟาจโดยใช้เนื้อเยื่อมะเร็งที่เลี้ยงขึ้นในห้องทดลอง (Tissue culture technique) จากสายพันธุ์ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cell line) (62) ซึ่งจะทำได้ฟาจที่จำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายซึ่งอาจเป็นโปรตีนของเชื้อไวรัสหรือเป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นเองโดยเซลล์มะเร็งเจ้าบ้าน ทำให้ฟาจดิสเพลย์ที่ได้จากการคัดเลือกโดยใช้จากเนื้อเยื่อนี้มีจำนวนมาก จึงมีโอกาที่จะได้ฟาจดิสเพลย์ซึ่งมีความจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาต่ำ ดังนั้นแผนงานวิจัยนี้จึงมุ่งทำการศึกษาเพื่อศึกษาหาลำดับโปรตีนเปปไทด์บนฟาจดิสเพลย์ตรวจจับที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาของรอยโรคมะเร็งปากมดลูกที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ โปรตีน P16INK4a, และเอนไซม์ TOP2A (Topoisomerase II alpha)

การดำเนินการ

1. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.1. สารเคมี, สารชีวโมเลกุล และเซลล์

1.1.1. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเซลล์

- 1.1.1.1. Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
- 1.1.1.2. Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)
- 1.1.1.3. Sodium Chloride (NaCl)
- 1.1.1.4. 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris)
- 1.1.1.5. 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyldinitrilo)tetraacetice acid (EDTA)
- 1.1.1.6. Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)
- 1.1.1.7. Hydrogen chloride (HCl)
- 1.1.1.8. Sodium hydroxide (NaOH)
- 1.1.1.9. Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)
- 1.1.1.10. Sodium iodide (NaI)
- 1.1.1.11. Xylene (C_8H_{10})
- 1.1.1.12. Ethanol (C_2OH_6)
- 1.1.1.13. Boric acid (H_3BO_3)
- 1.1.1.14. Agarose powder
- 1.1.1.15. Dihydrogen dioxide (H_2O_2)
- 1.1.1.16. Polysorbate 20 (Tween 20)
- 1.1.1.17. 2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethanol (Triton X-100)
- 1.1.1.18. Ethidium bromide ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$)
- 1.1.1.19. Azino-bis(3-ethylbenzothiazole sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)
- 1.1.1.20. Fluorescine isothiocyanate (FITC)
- 1.1.1.21. 4',6-diamidino-2-phenylidole (DAPI)
- 1.1.1.22. 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)

- 1.1.1.23. Aluminum potassium sulfate ($KAl(SO_4)_2$)
- 1.1.1.24. Hematoxylin
- 1.1.1.25. Acetic acid ($C_2H_4O_2$)
- 1.1.1.26. Sodium iodate ($NaIO_3$)
- 1.1.1.27. Glycerol ($C_3H_8O_3$)
- 1.1.1.28. Tetracycline powder
- 1.1.1.29. Polyethalene glycol (PEG) 8,000
- 1.1.1.30. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)
- 1.1.1.31. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Xgal)
- 1.1.1.32. Bacto-Tryptone powder
- 1.1.1.33. Yeast extract
- 1.1.1.34. Agar powder
- 1.1.1.35. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- 1.1.1.36. Fibroblast Growth Media
- 1.1.1.37. Fibroblast Frowth Factors
- 1.1.1.38. Fetal Bovine Serum (FBS)
- 1.1.1.39. Bovine Serum Albumin (BSA) powder

1.1.1. สารชีวโมเลกุล

- 1.1.1.1. Human P16INK4a recombinant protein (lyophilized)
- 1.1.1.2. Human topoisomerase enzyme
- 1.1.1.3. Mouse Anti-human P16INK4a
- 1.1.1.4. Mouse anti-human topoisomerase enzyme
- 1.1.1.5. Horseradish Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-mouse IgG
- 1.1.1.6. Horseradish Peroxidase-Conjugated Mouse Anti-M13 phage
- 1.1.1.7. DyLight 550-Conjugated Rabbit Anti-mouse IgG

1.1.1.8. คลังของฟาจทิสเพลย์ชนิดแสดงเปปไทด์แบบสุ่มขนาด 7 ลำดับกรดอะมิโน

1.1.1.9. M13mp18 ss-DNA rulers

1.1.2. เซลล์

1.1.2.1. แบคทีเรียเจ้าบ้านของ M13 Phage Vector ได้แก่ เชื้อ *E.Coli* สายพันธุ์ ER2738

1.1.2.2. Human Uterine Fibroblast (HUF) primary cell line

1.1.2.3. CaSki cell line

1.1.3. เครื่องวิทยาศาสตร์ วัสดุ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

1.1.3.1. Plastic Petri-dishes

1.1.3.2. Cover glass, glass slides

1.1.3.3. Conical tube 15 ml, Conical tube 50 ml, and Microcentrifuge tube 1.5 ml

1.1.3.4. Microtiter plate; 96-wells plate

1.1.3.5. Pipettor, and Multichannel pipettor

1.1.3.6. Moist chamber

1.1.3.7. Bacterial Incubator, and CO₂ Incubator

1.1.3.8. Class II Biosafety cabinet

1.1.3.9. Light microscope, and Fluorescence microscope

1.1.3.10. Water bath

1.1.3.11. Ice bath

1.1.3.12. Shaker incubator

1.1.3.13. Vortex mixer

1.1.3.14. Centrifugation machine

1.1.3.15. Spectrophotometer

1.1.3.16. Microcentrifuge tube

1.1.3.17. Gel electrophoresis set and power supplies

1.1.3.18. Gel analysis system (Gel Doc)

1.1.3.19. Microplate reader

2. วิธีการทดลอง

2.1. การเตรียมคลังของฟาจดิสเพลย์

การเตรียมคลังของฟาจเพื่อคัดฟาจที่ไม่จำเพาะซึ่งอาจเป็นฟาจที่จับกับผิว Plastic Petri-dishes หรือโปรตีนต่างๆ ที่ละลายใน Blocking buffer ออกจากคลังของฟาจก่อน โดยเริ่มจากการเตรียมครึ่งพื้นผิวของ Plastic Petri-dishes ด้วย สารละลาย Blocking buffer (5% BSA ใน 0.1 M NaHCO₃ pH 8.6) 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืนที่ 4 °C จำนวน 3 Petri-dishes ล้างผิวของ Petri-dishes เพื่อกำจัด BSA ส่วนเกินออก ก่อนนำสารละลายคลังของฟาจซึ่งมีปริมาณอนุภาคฟาจเริ่มต้นประมาณ 10¹¹ โคลน เทใส่ให้ท่วมผิว Petri-dishes ปล่อยให้อนุภาคฟาจจับไม่จำเพาะเกาะบนผิว Petri-dishes 1 ชั่วโมง บนเครื่องแกว่งผสมสารที่อุณหภูมิห้อง ก่อนจะดูดสารละลายฟาจที่เหลือบนพื้นผิวเข้าจับกับผิว Petri-dishes อันใหม่อีก 1 ชั่วโมง ทำซ้ำจนครบทั้ง 3 อัน แล้วจึงเก็บสารละลายอนุภาคฟาจไปนับจำนวนโดยเทคนิคการทำไทเทรต และเก็บสารละลายคลังของฟาจดิสเพลย์ที่เตรียมแล้วไว้ที่ 4 °C เพื่อไว้นำไปใช้ในการคัดเลือกอนุภาคฟาจจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a และแอนไซม์ TOP2A ตามลำดับ

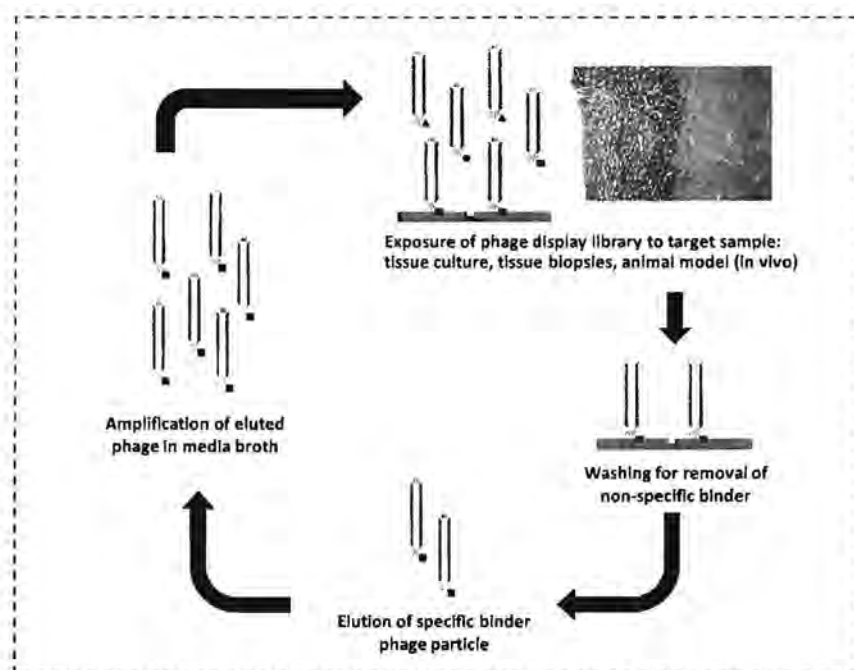
2.2. การนับจำนวนอนุภาคฟาจในสารละลายด้วยเทคนิคการทำไทเทรต

การประยุกต์ใช้ Phage display ในงานวิจัยโดยทั่วไปนิยมใช้ในรูปสารละลายแขวนลอย (Phage display suspension) เทคนิคพื้นฐานที่จำเป็นต้องใช้ประกอบด้วยวิธีการตรวจวัดความเข้มข้นหรือการนับจำนวนอนุภาคฟาจ ใน Phage display suspension ที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง ด้วยเทคนิค Phage titer analysis เนื่องจากอนุภาคฟาจ มีขนาดเล็ก (~900 nm) ไม่สามารถตรวจนับปริมาณได้โดยการใช้อัลตร้าจูลทรศน์ การตรวจวัดความเข้มข้นทำได้โดยการเจือจาง Phage display suspension และนำไปเลี้ยงในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน โดยอนุภาคฟาจ 1 อนุภาคจะใช้เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน 1 เซลล์ในการเจริญเติบโต ดังนั้นเมื่อเจือจาง Phage display suspension จนกระทั่งมีจำนวนพอเหมาะ (Phage titering) กับเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านบน แล้วนำเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านบนไปเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อและนับจำนวนแบคทีเรียที่มีอนุภาคฟาจ เจริญอยู่ โดยใช้)LB/IPTG/Xgel plate ซึ่งจะให้สีฟ้ากับโคโลนีที่มีอนุภาคฟาจเจริญอยู่การตรวจวัดความเข้มข้นของ (อนุภาคฟาจในเทคนิคนี้ จำเป็นต้องใช้ตรวจวัดทั้งก่อนและหลังการนำ Phage display suspension ไปเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมาย P16INK4a, และแอนไซม์ TOP2A โดยขั้นตอนตรวจวัดความเข้มข้นของฟาจเริ่มจากการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียแบคทีเรียเจ้าบ้านของ M13 Phage Vector ได้แก่ *E.coli* สายพันธุ์ ER2738 ใน LB มีเตียปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้ ที่ 37 °C ประมาณ 4-8 ชั่วโมง ใน shaker incubator จนกระทั่งได้เชื้อที่มีความขุ่นซึ่ง

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ ได้เท่ากับ 0.5 หลอมละลาย Top Agar ปราศจากเชื้อในหลอดเลี้ยงเชื้อปิดฝาเกลียวโดยใช้ไมโครเวฟ แล้วอุ่นไว้ที่ 45°C ใน Water bath เจือจาง Phage display suspension ใน LB มีเดีย โดย 10-fold 100-fold หรือ 10³-fold serial dilution ให้มีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของอนุภาคฟาจ ผสมเซลล์แบคทีเรียแบคทีเรียเจ้าบ้านจากข้อ 1 ปริมาตร 200 µl กับ 10 µl ของสารละลาย phage ในข้อ 4 ในหลอด microcentrifuge tube ปราศจากเชื้อ 1 หลอดต่อ 1 ความเข้มข้น ผสมสารละลายเซลล์แบคทีเรียแบคทีเรียเจ้าบ้านกับ phage display suspension ให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-5 นาที เทสารละลายผสมระหว่างอนุภาคฟาจ กับเซลล์แบคทีเรียแบคทีเรียเจ้าบ้านในข้อ 6 ทั้งหมดลงในหลอด Top Agar ที่อุ่นไว้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex แล้วเทลงบน pre-warm LB/IPTG/Xgel plate ในข้อ 3 เอียง plate ให้ Top Agar กระจายทั่วผิวหน้า LB/IPTG/Xgel plate ซึ่งอุ่นไว้ที่ 37°C อย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้งาน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที รอให้ Top Agar แข็งตัวคว่ำ plate ลงและตั้ง plate ไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 คืน นับ plaque แล้วคำนวณเป็นความเข้มข้นในหน่วย plaque forming units (pfu) per 10 µl โดยใช้จำนวนนับจาก plate ที่มีจำนวน plaque ประมาณ 200 pfu ต่อ plate

2.3. การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a และเอนไซม์ TOP2A

การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะโมเลกุลเป้าหมาย โปรตีน P16INK4a และ เอนไซม์ TOP2A โดยเทคนิค Biopanning เป็นขั้นตอนสำคัญ ซึ่งประกอบด้วยชุดกระบวนการ 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ 1) การเลือกจับระหว่างอนุภาคฟาจในคลังของฟาจดิสเพลย์กับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาเป้าหมาย โดยนำสารละลายคลังของฟาจซึ่งประกอบด้วยฟาจที่มีสายเปปไทด์แสดงอยู่ที่ผิวมากกว่าหนึ่งร้อยล้านแบบไปทำปฏิกิริยาจับกับโมเลกุลเป้าหมาย ขึ้นเนื้อที่ต้องการศึกษาใน (โมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา) 2) ล้างอนุภาคฟาจที่ไม่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้ออก 3) แยกอนุภาคฟาจจับจำเพาะออกจากโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างขึ้นเนื้อ 4) เพิ่มจำนวนฟาจจับจำเพาะในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน แล้วนำฟาจที่เพิ่มจำนวนได้ไปเลือกจับกับโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างขึ้นเนื้อรอบถัดไปดังแสดงเป็นแผนผังขั้นตอนในรูปที่ 2 การทำ Biopanning ตามขั้นตอนซ้ำ 3 รอบจะทำให้ได้อนุภาคฟาจที่มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 2.1. แสดงขั้นตอนการทำ Biopanning เริ่มจากการนำฟาจในคลังมาเลือกจับกับโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา เป้าหมาย ล้างฟาจที่ไม่จับจำเพาะออก แยกอนุภาคฟาจจากโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างชิ้นเนื้อแล้วจึงนำไปเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน การทำ Biopanning จะทำซ้ำ 3 รอบเพื่อให้ได้ฟาจที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย

การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a และ เอนไซม์ TOP2A เริ่มจากการเตรียมตั้งพื้นผิวของ Plastic Petri-dishes ด้วย สารละลายโปรตีนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โปรตีน P16INK4a และเอนไซม์ TOP2A เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 20 เฟทส ตามลำดับ บน Petri-dishes ชนิดละ 3 Petri-dishes เป็นเวลา 1 คืนที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นจึงนำคลังของฟาจที่เตรียมไว้เลือกจับกับโปรตีนบน Petri-dishes ปล่อยให้อนุภาคฟาจจับกับพื้นผิวโปรตีนเหลือประมาณ 2×10^{10} ไปใช้เลือกจับกับโปรตีน P16INK4a ที่ถูก coat บน plate เรียกว่าการทำ Biopanning ฟาจที่จับกับโปรตีน P16INK4a จะถูก elute, นับและเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกด้วยกระบวนการ Biopanning ซ้ำ 3 รอบ โดยควบคุมให้อนุภาคฟาจเริ่มต้นที่ใช้ในกระบวนการ Biopanning มีปริมาณเท่ากันทุกรอบ เพื่อให้สามารถติดตามการประสิทธิภาพของการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a ของกระบวนการ Biopanning ในแต่ละรอบ จึงได้ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วน

ของฟาจก่อนและหลังการคัดเลือกจับกับโปรตีน P16INK4a ด้วยกระบวนการ Biopanning ในแต่ละรอบดังแสดงในรูปที่ 2

2.4. การเลี้ยงแยกโคลนของอนุภาคฟาจ

หลังจากกระบวนการคัดเลือก Phage display จับจำเพาะโดยใช้ Phage display Library (Biopanning) ที่จำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาในชิ้นเนื้อซึ่งผลผลิตที่ได้จะอยู่ในรูปของสารละลายฟาจซึ่งประกอบด้วยอนุภาคฟาจที่แสดงเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะแบบต่างๆ ละลายอยู่ การจะวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเปปไทด์บนอนุภาคฟาจแต่ละแบบได้นั้น จะต้องทำการแยกอนุภาคฟาจแต่ละโคลนออกจากสารละลาย ที่ประกอบด้วยอนุภาคฟาจจับจำเพาะมากกว่า 1 แบบละลายผสมกันอยู่ การแยกอนุภาคฟาจแต่ละโคลนออกจากสารละลาย จะอาศัยคุณสมบัติของอนุภาคฟาจที่ต้องอาศัยเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านในการเจริญเพิ่มจำนวน 1 เซลล์ต่อ 1 อนุภาค เมื่อผสมสารละลายฟาจที่มีความเข้มข้นพอเหมาะ (เจือจางให้จำนวนเซลล์เจ้าบ้านมีเพียงพอกับอนุภาคฟาจอนุภาคฟาจจะเข้าสู่ไซโทรพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นจึงแยกเซลล์เจ้าบ้าน (ออกมาสักที่ละเซลล์โดยการเลี้ยงแยกโคโลนีนบนจานเพาะเชื้อ การตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนบนอนุภาคฟาจทำได้โดยสกัด DNA ของอนุภาคฟาจจากเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านแต่ละโคโลนินมาตรวจวิเคราะห์ (DNA sequencing) การสกัด DNA ของอนุภาคเริ่มจากการสกัดแยกอนุภาคฟาจออกจากเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านในแต่ละโคโลนินก่อน โดยเมื่อสกัดได้ DNA ของอนุภาคฟาจแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ Primer จับจำเพาะต่อไป ขั้นตอนการเลี้ยงแยกโคลนของอนุภาคฟาจเริ่มจากการเลี้ยงแบคทีเรียเจ้าบ้านของ M13 Phage Vector ได้แก่ *E.coli* สายพันธุ์ ER2738 ใน LB มีเดียปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้ ที่ 37 °C ประมาณ 4-8 ชั่วโมง ใน shaker incubator จนกระทั่งได้เชื้อที่มีความขุ่นซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ ได้เท่ากับ 0.5 เตรียมหลอมละลาย Top Agar ปราศจากเชื้อในหลอดเลี้ยงเชื้อปิดฝาเกลียว แล้วอุ่นไว้ที่ 45°C ใน Water bath จากนั้นเจือจาง Phage display suspension ที่ล้างแยกจากโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างที่ตรวจจากการเลือกจับรอบสุดท้ายใน LB มีเดียให้มีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของอนุภาคฟาจ ใน Phage display suspension ที่ล้างแยกออกจากตัวอย่างโดยทั่วไปมีค่าประมาณ 10⁻¹⁰ (ผสมแบคทีเรียเจ้าบ้านจากข้อ 1 ปริมาตร 200 µl กับ phage display suspension เจือจาง ในข้อ 4 ปริมาตร 10 µl ใน microcentrifuge tube ปราศจากเชื้อ 1 หลอดต่อ 1 ความเข้มข้น ผสมแบคทีเรียเจ้าบ้านกับ phage display suspension เจือจางให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-5 นาที เทสารละลายผสมระหว่างอนุภาคฟาจกับแบคทีเรียเจ้าบ้านทั้งหมดลงในหลอด Top Agar ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex แล้วเทลงบน pre-warm LB/IPTG/Xgel plate เอียง

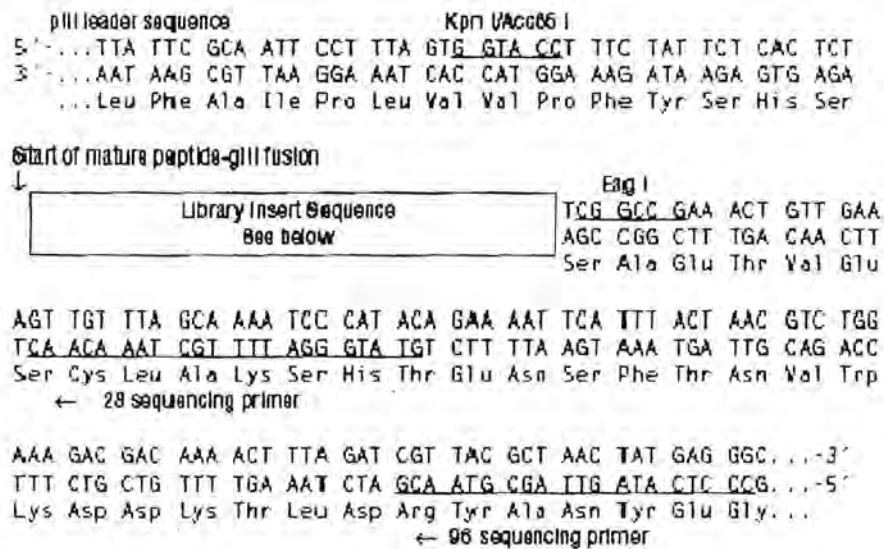
plate ให้ Top Agar กระจายทั่วผิวหน้า LB/IPTG/Xgel plate ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที รอให้ Top Agar แข็งตัวคว่ำ plate ลงและเลี้ยงเชื้อใน plate ที่ 37°C ประมาณ 1 คืน เก็บโคโลนีบน plate ไว้ที่ 4°C ได้ 1-3 วัน

2.5. การสกัด DNA จากโคลนของอนุภาคฟาจ

ทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนโคลนของฟาจที่แยกได้จากกระบวนการเลี้ยงแยกโคลนแต่ละโคลนโดยเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน; ER2738 ใน LB มีเดีย 10 มิลลิลิตร จาก 1 โคโลนีของเซลล์เจ้าบ้านที่ 37 °C ประมาณ 1 คืน เจือจางเชื้อเซลล์เจ้าบ้านจากข้อ 1 ใน LB มีเดียปราศจากเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:100 แล้วดูดเชื้อที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ culture tube อันใหม่ตามจำนวนโคลนของฟาจที่ต้องการจะนำไปศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส 1 โคลน ต่อ 1 tube จากนั้นใช้ไม้ปลายแหลมหรือปิเปตทิปปราศจากเชื้อเขี่ย (pick) plaque บนโคโลนีบน plate คัดแยกโคลน ลงในเซลล์เจ้าบ้านเจือจาง 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากข้อ 2 แล้วเลี้ยงเพิ่มจำนวนที่ 37°C เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายด้านบนประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ ถ้าต้องการจะเก็บรักษาในรูป Phage display suspension ในขั้นนี้สามารถทำได้โดยปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็วรอบและที่เวลาเท่าเดิม แล้วเก็บสารละลายด้านบนประมาณ 80% ของทั้งหมด สารละลายนี้สามารถเก็บรักษาที่ 4°C ได้ 2-3 สัปดาห์ หรือเก็บในกลีเซอรอลปราศจากเชื้อด้วยอัตราส่วนปริมาตร 1:1 ที่ -20°C เติมสารละลาย 20% w/v ของ PEG ใน 2.5 M NaCl 200 μ l ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าขึ้นลง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10-20 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm 4°C เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายด้านบนทิ้งเก็บเฉพาะตะกอน ละลายตะกอนใน Iodine buffer เขย่าผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 250 μ l ตั้งทิ้งไว้ 10-20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ไม่ควรตั้งทิ้งไว้นานเนื่องจากโปรตีนอื่นจะตกตะกอนปนเปื้อน) ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm 4°C เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายด้านบนทิ้งเก็บเฉพาะตะกอน ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอลแช่เย็นที่ -20°C 0.5 มิลลิลิตร ตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนใน 30 μ l TE buffer หรือในน้ำปราศจากไอออนเก็บไว้ที่ -20°C ตรวจปริมาณ DNA โดยเทคนิค gel electrophoresis ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ 5 μ l ควรให้ความเข้มของ band เท่ากับความเข้มของ band ดีเอ็นเอสายเดี่ยว M13mp18 DNA เมื่อสกัดผลผลิตจาก gel จะได้ DNA สายเดี่ยวสำหรับนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing)

2.6. การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ของอนุภาคฟาจ

DNA ที่สกัดได้จากอนุภาคฟาจซึ่งคือ DNA สายเดี่ยวนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาคัดยหลักการ dideoxy chain termination โดยใช้ Sequencing primer ซึ่งเริ่มจับที่ตำแหน่ง downstream (ทางด้าน 3') ของ DNA ฟาจต้นแบบตรงบริเวณที่กำหนดการแสดงสายโปรตีนเปปไทด์ที่แทรกลงไป ใน DNA ของอนุภาคฟาจ ดังรูปในแผนผังตามรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2. แสดง DNA ของอนุภาคฟาจจาก 5'-3' สายบน การวิเคราะห์ลำดับเบส ((DNA sequencing) สามารถเริ่มปฏิกิริยาได้โดยใช้ -28 หรือ -96 sequencing primer ดังแสดงในรูป ตำแหน่งแทรก DNA ของ Random peptide library อยู่ที่ตำแหน่งตัด (Restriction sites) KpnI/Acc65I และ EagI ตามลำดับ

ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่แสดงออกบนผิวอนุภาคฟาจจับจำเพาะวิเคราะห์ได้จากข้อมูลลำดับเบสของ DNA อนุภาคฟาจที่อยู่ระหว่าง restriction sites KpnI/Acc65I และ EagI ซึ่งลำดับเบสตรงบริเวณดังกล่าว ประกอบด้วยลำดับเบสรหัสพันธุกรรมของลำดับกรดอะมิโน Phe Tyr Ser His Ser ตามด้วยลำดับเบสรหัสพันธุกรรมของเปปไทด์จับจำเพาะจำนวน 7 ลำดับกรดอะมิโน

2.7. การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการจับจำเพาะของอนุภาคฟาจที่คัดเลือกได้กับโปรตีน เป้าหมายด้วยเทคนิค Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA)

หลังจากกระบวนการคัดเลือก Phage display จับจำเพาะโดยใช้ Phage display Library (Bio-panning) ที่จำเพาะต่อโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาเป้าหมายและลำดับเปปไทด์จับจำเพาะจากการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ดังที่กล่าวมาแล้วซึ่งอาจได้เปปไทด์จากกระบวนการคัดเลือกมากกว่าหนึ่งลำดับเปปไทด์ จึงสามารถทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาจับจำเพาะของอนุภาคฟาจกับโมเลกุลเป้าหมายของอนุภาคฟาจที่คัดเลือกได้ ด้วยเทคนิค Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA) เพื่อคัดเลือกเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติจับกับโมเลกุลเป้าหมายที่ดีที่สุด โดยหลังจากคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะจาก Phage display

library และเลี้ยงแยกอนุภาคฟาจออกจาก Phage display suspension เรียบร้อยแล้ว จากนั้นเลี้ยงเพิ่มจำนวน เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน ER2738 ใน LB มีเดีย 10 มิลลิลิตร จาก 1 โคโลนีของเซลล์เจ้าบ้านที่ 37 °C ประมาณ 1 คืน เจือจางเชื้อเซลล์เจ้าบ้านจากข้อ 1 ใน LB มีเดียปราศจากเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:100 แล้วดูดเชื้อที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองพลาสติก อันใหม่ตามจำนวนอนุภาคฟาจต้องการจะนำไปศึกษา คุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาจับจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมาย 1 โคโลนีที่เลือกต่อ 1 หลอดทดลองพลาสติก ใช้ไม้ปลายแหลมหรือปิเปตทิปปราศจากเชื้อเขี่ย (pick) plaque บนจานเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการนับจำนวนโคโลนีของฟาจที่เลี้ยงแยกได้ ลงในเซลล์เจ้าบ้านเจือจาง 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้วเลี้ยงเพิ่มจำนวนที่ 37°C ไม่เกิน 5 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายด้านบนประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ หลอดทดลองพลาสติกอันใหม่ เก็บรักษาในสารละลายฟาจที่ 4°C จนกว่าจะศึกษาคุณสมบัติการจับจำเพาะด้วยเทคนิค ELISA เตรียมเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน; ER2738 ใน LB มีเดีย 20 มิลลิลิตร จาก 1 โคโลนีของเซลล์เจ้าบ้าน นำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนที่ 37°C จนกระทั่งได้เชื้อที่มีความขุ่นซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ ได้เท่ากับ 0.01-0.05 เดิม สารละลายฟาจปริมาตร 5 µl ลงผสมกับเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านใน LB มีเดีย 20 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ด้วยเครื่อง shaker incubator ที่ 37°C เป็นเวลาไม่เกิน 5 ชั่วโมงแล้วแบ่งสารผสมใส่หลอดทดลองพลาสติก ปั่นตกตะกอนสารละลายที่ 12,000 g 4°C เป็นเวลา 10 นาที ดูด สารละลายฟาจด้านบนเก็บใส่หลอดทดลองพลาสติกอันใหม่เติมสารละลาย 20% w/v ของ PEG ใน 2.5 M NaCl ประมาณ 1/6 เท่าของปริมาตร สารละลายฟาจ ทิ้งให้ตกตะกอนที่ 4°C เป็นเวลา 1 คืนหรือ 2 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย 10 นาที นำไปปั่นตกตะกอนสารละลายที่ 12,000 g 4°C เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้งอาจปั่นตกตะกอนอีกครั้งเพื่อดูดสารละลายที่ยังเหลืออยู่ทิ้ง ละลายตะกอนของอนุภาคฟาจที่เหลืออยู่ ใน 1 มิลลิลิตร TBS แล้วปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ 14,000 g 4°C เป็นเวลา 15 นาที จึงดูดสารละลายฟาจด้านบนเก็บใส่ หลอดทดลองพลาสติกอันใหม่ ตกตะกอนอนุภาคฟาจอีกครั้งโดยเติมสารละลาย 20% w/v ของ PEG ใน 2.5 M NaCl ประมาณ 1/6 เท่าของ ปริมาตร Phage display suspension ทิ้งให้ตกตะกอนบนน้ำแข็ง bath 15-60 นาที แล้วจึงปั่นตกตะกอนสารละลายที่ 14,000 g 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้งอาจปั่นตกตะกอนอีกครั้งเพื่อดูดสารละลายที่ยังเหลืออยู่ทิ้ง ละลายตะกอนของอนุภาคฟาจจากข้อ 12 ใน 50 µl TBS แล้วนำไปตรวจวัดความเข้มข้นของ Phage display suspension โดย Phage titer analysis ดังที่ได้อธิบายใน Protocol II ซึ่งควรมีความเข้มข้นประมาณ 10¹⁴ pfu/มิลลิลิตร สารละลายฟาจนี้สามารถเก็บรักษาที่ 4°C ได้ประมาณ 2-3 สัปดาห์หรือเก็บรักษาในกลีเซอรอลปราศจากเชื้อด้วยอัตราส่วนปริมาตร 1:1 ที่ -20°C เมื่อเตรียมสารละลายฟาจแล้วจึงเตรียมหลุมปฏิกิริยาสำหรับการทำ ELISA โดยตรงโปรตีนเป้าหมายความเข้มข้น 100 µg/มิลลิลิตร ใน NaHCO₃,

pH 8.6 ปริมาตร 100-200 μl ทิ้งไว้ในกล่องกักความชื้น (moist chamber) ที่ 4°C เป็นเวลา 1 คืน ในหลุมปฏิกิริยา 1 แถวสำหรับอนุภาคที่ต้องการศึกษา 1 ชนิดลำดับเปปไทด์บนอนุภาคฟาจ โดยเหลือหลุมปฏิกิริยาเปล่าไว้ 1 หลุม คว่ำจานหลุมปฏิกิริยา (microtiter plate) และเขย่าสารละลายโปรตีนเป้าหมายทิ้ง แล้วคว่ำด้านหน้า microtiter plate ชับบนกระดาษทิชชูสะอาด แล้วเติม blocking buffer ลงแต่ละหลุมรวมทั้งหลุมปฏิกิริยาเปล่าที่ไม่ได้ตรึงโปรตีนเป้าหมายด้วย ทิ้งไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เตรียม microtiter plate เปล่าที่ไม่ได้ตรึงด้วยโปรตีนเป้าหมาย แต่ตรึงด้วย blocking buffer ทิ้งไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง คว่ำ microtiter plate ในข้อ 14 และ 15 เขย่า blocking buffer ออกแล้วล้างแต่ละหลุมปฏิกิริยาด้วย TBST buffer (ควรมี Tween 20 ที่มีเปอร์เซ็นต์เท่ากับที่ใช้ในการทำ Bio-panning) 6 ครั้ง โดยหลังจากการล้างแต่ละครั้งจะคว่ำด้านหน้า microtiter plate ชับบนกระดาษทิชชูสะอาด เจือจางสารละลายฟาจที่ต้องการศึกษาแต่ละแบบใน microtiter plate เปล่าที่ตรึงไว้ด้วย blocking buffer ใน 15 โดยเติม TBST ปริมาตร 150 μl ในแต่ละหลุม ดูดสารละลายฟาจ 50 μl ใส่ลงใน TBST buffer หลุมแรก ดูดผสมขึ้นลงแล้วดูดสารผสมในหลุมแรก 50 μl เจือจางใน TBST buffer หลุดถัดไป ทำซ้ำจนครบ 12 หลุม (fourfold serial dilution) ใช้ multichannel pipettor ดูด Phage display suspension เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ 100 μl ใส่ลงในหลุมปฏิกิริยาของ microtiter plate ที่เตรียมไว้ในข้อ 14 ซึ่งมีโปรตีนเป้าหมายตรึงอยู่ ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาบนเครื่องผสมสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมปฏิกิริยาด้วย TBST buffer 6 ครั้ง โดยหลังจากการล้างแต่ละครั้งจะคว่ำด้านหน้า microtiter plate ชับบนกระดาษทิชชูสะอาด จากนั้นเตรียมเจือจางแอนติบอดีจับจำเพาะต่อ M13 phage (anti-M13) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์ราดิชเพอร์ออกซิเดส (Horseradish Peroxidase; HRP) ตามความเข้มข้นที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำให้ใช้เติมลงในหลุมปฏิกิริยาแต่ละหลุมๆ ละ 200 μl ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาบนเครื่องผสมสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผสม 30% H_2O_2 36 μl กับ ABTS stock 21 มิลลิลิตร และใช้สารผสมดังกล่าวทันที โดยเติมลงในหลุมปฏิกิริยาแต่ละหลุมๆ ละ 200 μl แล้วทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาบนเครื่องผสมสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-60 นาที ตรวจจับสัญญาณ HRP ที่ 405-425 nm เปรียบเทียบกับหลุมเปล่าที่ไม่ได้ตรึงโปรตีนเป้าหมายเป็น negative control

2.8. การติดฉลากฟาจด้วยสารฟลูออเรสเซนต์

การติดฉลากเปปไทด์ของอนุภาคฟาจและอนุภาคฟาจตัวควบคุม (อนุภาคฟาจที่ไม่มีการแสดงออกของเปปไทด์) ด้วยสี fluorescein isothiocyanate (FITC) ตามที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ [15] โดยนำสารละลายอนุภาคฟาจประมาณ 10^{12} pfu ใน 0.1 มิลลิลิตร FITC (TRITC) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 0.3

M NaHCO₃ (pH 8.6) แล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมบัฟเฟอร์ PBS ลงไป 1 มิลลิลิตร สกัดอนุภาคฟาจที่ถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์แล้ว โดยการตกตะกอนด้วย polyethylene glycol และนับปริมาณด้วยวิธี phage titration assay ประสิทธิภาพของการติดฉลากสีฟลูออเรสเซนซ์ประมาณ 1,300-850 fluorochromes/phage particles

2.9. การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์และการวิเคราะห์ภาพ

Human Uterine Fibroblast (HUF) ในการทดลองถูกใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ปกติ และ Cervical cancer cell line (CaSki) ถูกใช้เป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการแสดงออกของ p16 มากกว่าปกติ ซึ่งตรวจยืนยันด้วยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ p16 ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Abcam®; ab54210) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บน cover slip ที่ปราศจากเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal calf serum (Gibco) 10% ที่อุณหภูมิ 37°C และมี CO₂ 5% เพื่อให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้จนกว่าจะพร้อมใช้งานได้ ทำการตรึงเซลล์บน cover slip ด้วย methanol และ permeabilized เซลล์ด้วย 0.25% Triton X-100 ใน PBS buffer และ blocked เซลล์ด้วย 1% BSA ใน PBS เป็นเวลา 30 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS ก่อน ย้อมเซลล์ด้วยอนุภาคฟาจที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนซ์ (~10¹⁰ pfu) นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร DAPI ลงไป ทิ้งไว้นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเทสารละลายบนเซลล์ที่ตรึงไว้ทิ้งไปและปิดเซลล์อย่างถาวรไว้บน microscope slide ด้วย glycerol ถ่ายภาพเซลล์ด้วยกล้อง confocal microscope (Nikon C1 model) โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ pinhole ใช้ขนาดใหญ่ที่สุด 6.5 และ 5.0 สำหรับสีเขียวและสีน้ำเงินตามลำดับ และภาพฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ 1.44 (63) ในแต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ภาพเซลล์ประมาณ 200 เซลล์ (ดูจากการติดสีที่นิวเคลียสของเซลล์) จากนั้นค่าความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์จะคำนวณเป็นค่า mean grayscale level (โดยใช้ 8-bit grayscale image; black (0) – white (255)) เปรียบเทียบความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ในเซลล์แต่ละกลุ่มโดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 98%

2.11. การทดสอบความใหม่และความถูกต้องของลำดับเปปไทด์ที่แยกโดยการสืบค้นเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเปปไทด์ที่ได้จากการคัดเลือกโดยใช้คลังของฟาจดิสเพลย์

เปปไทด์ที่คัดเลือกได้จากกระบวนการคัดเลือก นำไปทดสอบความจำเพาะและความใหม่ในฐานข้อมูลเปปไทด์ที่เคยมีรายงานมาก่อน ได้แก่ mimotope database and beyond (MimoDB) ซึ่งฐานข้อมูลดังกล่าวได้รวบรวมลำดับเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีนชนิดต่างๆ ที่เคยมีรายงานก่อนรวมถึงเปปไทด์ที่ได้จากการ

คัดเลือกจากกระบวนการคัดเลือกโดยใช้คลังของฟาจดิสเพลย์ด้วย นอกจากนี้ฐานข้อมูลดังกล่าวยังได้รวบรวมลำดับเปปไทด์ที่พบซ้ำๆ กันจากกระบวนการคัดเลือกกับโปรตีนเป้าหมายต่างชนิดกัน ซึ่งอาจเป็นเปปไทด์ที่ไม่จำเพาะซึ่ง elute ได้จากงานเลี้ยงเชื้อพลาสติกหรือโปรตีนที่ละลายอยู่ในบล็อกกิ้งบัฟเฟอร์ที่พบได้เหมือนกันในระบบการคัดเลือก เรียกว่า target-unrelated peptide (64, 65)

2.12. การศึกษาการจำลองพฤติกรรมการจับจำเพาะของโปรตีนด้วยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ (Bioinformatics-based technique)

ในการศึกษาการจำลองการจับกันระหว่างเปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการคัดเลือกกับโปรตีนที่สนใจ โดยอาศัยรูปแบบการทำงานของ protein docking ที่ใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ทำนายและสร้างรูปแบบการจับกันระหว่างโปรตีน เริ่มจากการค้นหาโครงสร้างของโปรตีนจากฐานข้อมูลโปรตีน (Protein Data Bank; PDB) เลือกโครงสร้างของโปรตีนที่ตรงกับโปรตีนที่ใช้ในกระบวนการ Planning นำโครงสร้างข้อโปรตีนที่ได้นำไปจำลองตำแหน่งการจับจำเพาะกับเปปไทด์ที่ถูกสร้างขึ้นจากโปรแกรม PyMol ที่ถูกบันทึกเป็นโครงสร้างที่ยังไม่มีการบิตงอในรูปแบบ PDB file นำข้อมูลทั้งสองได้แก่ โครงสร้างโปรตีนที่สนใจ(Receptor Molecule) และโครงสร้างเปปไทด์(Ligand Molecule) ไปหารูปแบบที่เป็นไปได้ของการจับกันของสองโมเลกุลในโปรแกรม PatchDock ซึ่งเป็นโปรแกรมแบบ web server (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) ผลลัพธ์ที่ได้จากโปรแกรม PatchDock จะรายงานรูปแบบของการจับกันที่เป็นไปได้ทั้งหมด เป็นค่า Transformations จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณโดยละเอียดขึ้นในโปรแกรม FireDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>) ซึ่งจะรายงานผลค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวกับการจับกันของสองโมเลกุล ในรอบแรกจะใช้ค่าระดับการ Refilement ระดับ Restricted ก่อนเพื่อให้โปรแกรมคำนวณค่าเบื้องต้นให้ก่อนและใช้เวลาในการคำนวณรวดเร็ว ในรอบที่สองจะคัดเลือกรูปแบบ Transformations ที่ได้จากรอบแรกมาเพียง 25 รูปแบบที่มีค่า Binding Score สูงที่สุด และตั้งค่า Refilement เป็นระดับ Full เพิ่มความแม่นยำและความละเอียดในการคำนวณมากยิ่งขึ้น รายงานผลของค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่ Binding Score, aVdW, rVdW, ACI, HB

2.13. การทดสอบความสามารถของอนุภาคฟาจจับจำเพาะการตรวจแยกเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์ (flow cytometer)

เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของขนาดของอนุภาคฟาจที่อาจมีผลต่อการแทรกซึมของอนุภาคฟาจตรวจจับเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์สังเคราะห์จึงทำการศึกษาความสามารถของอนุภาคฟาจติดฉลากสารเรืองแสง

ฟลูออเรสเซนซ์ในการซึมเข้าทำปฏิกิริยาในเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยทดสอบใช้อนุภาคฟาคติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ในการทำปฏิกิริยาตรวจจับโปรตีน p16INK4a ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์ (flow cytometer) โดยนำเซลล์มะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ CaSki ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) ให้เป็นเซลล์เดี่ยวก่อนนำไปปั่นล้างทำการตรึงและรักษาสภาพเซลล์ (cell fixation) ด้วยเมทานอลเข้มข้น 5 นาที ปั่นล้างด้วยบัฟเฟอร์จากนั้นแบ่งตัวอย่างเซลล์ออกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งทำการเปิดผิวเซลล์ (permeabilization) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ผสมทวิน 20 0.1% เป็นเวลา 60 นาที อีกส่วนนำละลายด้วยบัฟเฟอร์ไม่ผสมทวิน 20 ปั่นล้างแล้วจึงละลายเซลล์ในสายละลายโบวายซีรัมอัลบูมิน 1% เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาไม่จำเพาะ 30 นาที แล้วจึงแบ่งเซลล์ทั้ง 2 ส่วน ใส่หลอดทดลองพลาสติกส่วนละ 3 หลอด ปริมาณหลอดละ 500,000 เซลล์ต่อหลอด โดยประมาณนำเซลล์แต่ละหลอดไปปั่นตกตะกอนแล้วจึงละลายเซลล์ด้วยสารละลายชนิดต่างๆ ได้แก่

- สารละลายอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a ติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ไอโซไธโอไซยานเนต (Fluorescein isothiocyanate; FITC) ที่มีจำนวนอนุภาคสุทธิ 1×10^{10} อนุภาค
- สารละลายแอนติบอดีจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a อัตราส่วน 1:500
- สารละลายอนุภาคฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์จับจำเพาะติดฉลากสารเรืองแสงที่มีจำนวนอนุภาคสุทธิ 1×10^{10} อนุภาค

หลังจากปล่อยให้ทำปฏิกิริยาในสารละลายต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงปั่นล้างเซลล์ก่อนนำตัวอย่างเซลล์ที่ผสมสารละลายแอนติบอดีไปละลายในสารละลายแอนติบอดีตรวจติดตามติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ดายไลท์ 550 (Dylight 550) เป็นเวลา 60 นาที เซลล์ทุกตัวอย่างนำไปปั่นล้างแล้ววัดปริมาณการจับติดของโมเลกุลติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแต่ละเซลล์จากความเข้มของสารเรืองแสงที่วัดได้โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์ (flow cytometer) ชนิดวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์

2.14. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเปิดผิวเซลล์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยนอกร่างกายมนุษย์

การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเปิดผิวเซลล์ด้วยสารละลายทวิน 20 0.1% ที่สามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุภาคฟาจจับจำเพาะติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ในขณะที่ยังคงความจำเพาะในการตรวจจับ ทดลองโดยนำเซลล์มะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ CaSki ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) ให้เป็นเซลล์เดี่ยวก่อนนำไปปั่นล้างทำการตรึงและรักษาสภาพเซลล์ (cell fixation) ด้วยเมทา

นอลเข้มข้น 5 นาที ปั่นล้างด้วยบัฟเฟอร์จากนั้นแบ่งตัวอย่างเซลล์ออกเป็นห้าส่วน แต่ละส่วนทำการเปิดผิวเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ผสมทวิน 20 0.1% เป็นเวลา 0, 30, 60, 90, และ 120 นาที ตามลำดับแล้วจึงละลายเซลล์ในสายละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน 1% เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาไม่จำเพาะ 30 นาที แบ่งเซลล์แต่ละตัวอย่างใส่หลอดทดลองพลาสติกตัวอย่างละ 2 หลอด ปริมาณหลอดละ 500,000 เซลล์ต่อหลอด โดยประมาณ นำเซลล์แต่ละหลอดไปปั่นตกตะกอนแล้วจึงละลายเซลล์แต่ละหลอดด้วยสารละลายอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a และอนุภาคฟาจควบคุมติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีจำนวนอนุภาคสุทธิ 1×10^{10} อนุภาค หลังจากปล่อยให้ทำปฏิกิริยาในสารละลายต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงปั่นล้างเซลล์ก่อนนำตัวอย่างเซลล์ทุกตัวอย่างไปปั่นล้างแล้ววัดปริมาณการจับติดของโมเลกุลติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของแต่ละเซลล์จากความเข้มของสารเรืองแสงที่วัดได้โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิด flow cytometer และหาปริมาณเซลล์ชนิดวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์

2.15. การศึกษาผลของการใช้อนุภาคฟาจจับจำเพาะกระตุ้นสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สำหรับใช้เป็นโมเลกุลตรวจจับเซลล์มะเร็งปากมดลูก

การทดสอบผลของการใช้อนุภาคฟาจเพื่อการกระตุ้นสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ทำโดยการปรับจำนวนโมเลกุลสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ติดฉลากบนอนุภาคฟาจ โดยใช้สารละลายอนุภาคฟาจที่ปริมาณสุทธิตั้งแต่ 10^{13} - 10^5 ทำปฏิกิริยากับสารละลายฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน หลังจากตกตะกอนปั่นแยกเอาเฉพาะอนุภาคฟาจติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาแล้ว จึงทำการวัดปริมาณสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยเครื่องวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เทียบกับสารละลายฟลูออเรสเซนต์มาตรฐานที่รู้ความเข้มข้น แล้วจึงคำนวณเป็นปริมาณโมเลกุลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ต่ออนุภาคฟาจหนึ่งอนุภาค จากนั้นนำอนุภาคฟาจที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตัวอย่างต่างๆ จำนวน 10^{10} อนุภาค เท่าๆ กัน ไปทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ทำการเปิดผิวเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.16. การทดสอบความสามารถในการแทรกซึมผ่านเซลล์ของอนุภาคฟาจจับจำเพาะเปรียบเทียบกับโมเลกุลเปปไทด์สังเคราะห์

การใช้อนุภาคฟาจจับจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูกอาจมีข้อจำกัดในการนำอนุภาคฟาจจับจำเพาะไปใช้ในร่างกายสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านกระบวนการเปิดผิวเซลล์ก่อนได้ ดังนั้นการทดสอบนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการแทรกซึมผ่านเซลล์ของอนุภาคฟาจจับจำเพาะกับโมเลกุลเปปไทด์สังเคราะห์ ในการตรวจจับเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกสาย

พันธุ์ CaSki และ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวมดลูก (Human Uterine Fibroblast; HUF) ซึ่งเป็นเซลล์สดที่ไม่ผ่านกระบวนการตรึงด้วยเมทานอลหรือการเปิดผิวเซลล์ นำไปทำการปั่นล้างด้วยบัฟเฟอร์แล้วจึงแบ่งเซลล์แต่ละตัวอย่างใส่หลอดทดลองพลาสติกตัวอย่างละ 2 หลอด ปริมาณหลอดละ 500,000 เซลล์ต่อหลอด โดยประมาณ นำเซลล์แต่ละหลอดไปปั่นตกตะกอนแล้วจึงละลายเซลล์ด้วยสารละลายชนิดต่างๆ ได้แก่

- สารละลายเปปไทด์สังเคราะห์ควบคุมที่มีชนิดและปริมาณกรดอะมิโนเหมือนกับเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a แต่จัดเรียงลำดับกรดอะมิโนให้ไม่ตรงกับเปปไทด์จับจำเพาะ ซึ่งเปปไทด์สังเคราะห์ควบคุมนี้จะมีคุณสมบัติโมเลกุลและค่าประจุรวมเหมือนกับเปปไทด์จับจำเพาะทุกประการ จึงสามารถใช้เป็นเปปไทด์ตัวแปรควบคุมที่เกิดจากการเชื่อมผ่านเซลล์อย่างไม่จำเพาะของเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก และปฏิกิริยาไม่จับจำเพาะที่เกิดจากแรงจากประจุไฟฟ้ารวมของเปปไทด์ได้ โดยใช้สารละลายเปปไทด์เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์
- เปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์
- สารละลายอนุภาคฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์จับจำเพาะติดฉลากสารเรืองแสงที่มีจำนวนอนุภาคสุทธิ 1×10^{10} อนุภาค
- สารละลายอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a ติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีจำนวนอนุภาคสุทธิ 1×10^{10} อนุภาค
- สารละลายแอนติบอดีจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a ติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีจำนวนโมเลกุลสุทธิประมาณ 1×10^{10} โมเลกุล

หลังจากปล่อยให้ทำปฏิกิริยาในสารละลายต่างๆ เป็นเวลา 5 นาที เซลล์ทุกตัวอย่างนำไปปั่นล้างแล้ววัดปริมาณการจับติดของโมเลกุลติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแต่ละเซลล์จากความเข้มของสารเรืองแสงที่วัดได้โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์ (flow cytometer)

2.17. การทดสอบการประยุกต์ใช้งานอนุภาคฟาจจับจำเพาะในเบื้องต้นโดยทดสอบกับการย้อมสไลด์ตัวอย่างชิ้นเนื้อ

นำตัวอย่างสไลด์ชิ้นเนื้อที่ละลายพาราฟินออกแล้วตามเทคนิคการเตรียมสไลด์ย้อมชิ้นเนื้อทั่วไปลงไปต้มในบัฟเฟอร์คีนสภาพโปรตีน 20-25 นาที ในน้ำเดือด ล้างโดยเปิดน้ำประปาไหลผ่านสไลด์ประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงนำสไลด์ไปแช่ในบัฟเฟอร์สำหรับล้างชิ้นเนื้อแก้วล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ซับบัฟเฟอร์โดยรอบให้ด้วยกระดาษชำระ ระวังอย่าปล่อยให้ชิ้นเนื้อแห้ง หยดสารละลายอนุภาคฟาจเจือจางให้ท่วมชิ้นเนื้อ (ปริมาตร 200 ไมโครลิตร) เขย่าผสมข้างด้วยความเร็วรอบ 50-100 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

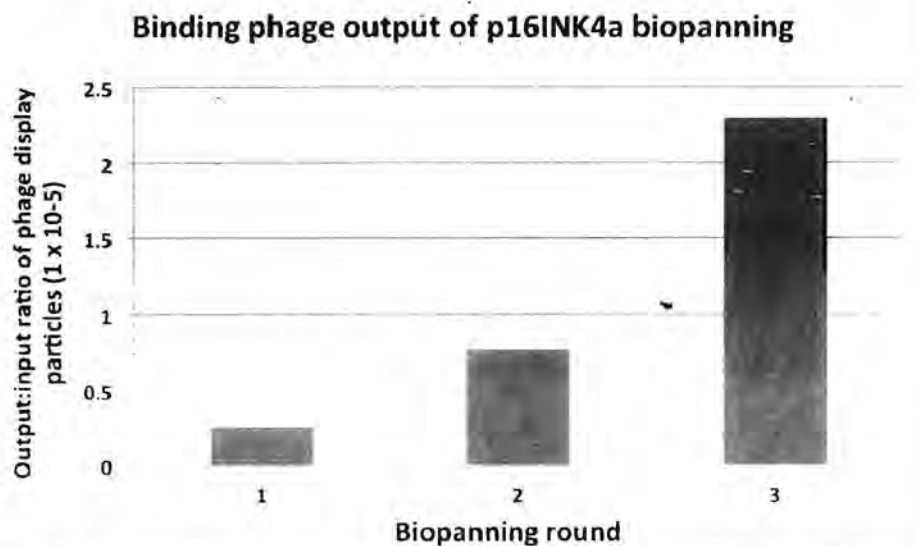
จากนั้นล้างสไลด์ในบัฟเฟอร์สำหรับล้างสไลด์ขึ้นเนื้อ แกว่งล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ซับบัฟเฟอร์โดยรอบ หยดสารละลายแอนติบอดีจับจำเพาะต่ออนุภาคฟาจติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์เรดิสเปอร์ออกซิเดสให้ท่วมชิ้นเนื้อ เขย่าผสมด้วยความเร็วรอบ 50-100 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างสไลด์ในบัฟเฟอร์แกว่งล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ซับบัฟเฟอร์ให้แห้ง หยดสารละลาย DAB ที่เจือจางในบัฟเฟอร์อัตราส่วน 1:50 ให้ท่วมสไลด์ เขย่าช้านาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แخذตัวอย่างใน counter stain นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดโดยให้ไหลผ่านประมาณ 5 นาที ปลอยสไลด์แห้ง หยด Mounting media ปิดกระจกสไลด์ตามขั้นตอนการเก็บรักษา ตัวอย่างสไลด์ นำไปตรวจหาปฏิกิริยาจับจำเพาะได้กล้องจุลทรรศน์ตามเทคนิคการย้อมตรวจชิ้นเนื้อตามปกติ

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย

1.1. การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a

การใช้ P16INK4a ที่เป็นโปรตีนสกัดบริสุทธิ์สำหรับทำการเตรียมคลังของฟาจ ขั้นตอนเริ่มจากการคัดฟาจที่ไม่จำเพาะซึ่งอาจเป็นฟาจที่จับกับงานเลี้ยงเซลล์พลาสติกหรือโปรตีนต่างๆ ที่ละลายใน Blocking buffer ออกจากคลังของฟาจก่อน โดยนำสารละลายคลังของฟาจซึ่งมีปริมาณอนุภาคฟาจเริ่มต้นประมาณ 10^{11} โคโลน ไปเลือกจับกับงานเลี้ยงเชื้อเปลาที่ coat ด้วย blocking buffer จากนั้นจึงนำคลังของฟาจที่เหลือประมาณ 2×10^{10} ไปใช้เลือกจับกับโปรตีน P16INK4a ที่ถูก coat บน plate เรียกว่าการทำ Biopanning ฟาจที่จับกับโปรตีน P16INK4a จะถูก elute, นับและเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกด้วยกระบวนการ Biopanning ซ้ำ 3 รอบ โดยควบคุมให้อนุภาคฟาจเริ่มต้นที่ใช้ในกระบวนการ Biopanning มีปริมาณเท่ากันทุกรอบ เพื่อให้สามารถติดตามการประสิทธิภาพของการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a ของกระบวนการ Biopanning ในแต่ละรอบ จึงได้ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนของฟาจก่อนและหลังการคัดเลือกจับกับโปรตีน P16INK4a ด้วยกระบวนการ Biopanning ในแต่ละรอบดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ผลการทำ biopanning เพื่อคัดเลือกฟาจที่จับจำเพาะกับ P16INK4a แสดงอัตราส่วนจำนวนฟาจเริ่มต้นและฟาจจับจำเพาะที่ elute ได้ในแต่ละรอบ ซึ่งแสดงให้เห็นความจำเพาะที่เพิ่มสูงขึ้นของการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a ในการคัดเลือกแต่ละรอบ

สารละลายฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a ที่ elute ได้ในแต่ละรอบนำไป infect เข้าเซลล์ *E. coli* และเลี้ยงให้ได้ isolated colony เกิดเป็นโคลนของฟาจ โดยแต่ละโคลนของฟาจจะประกอบด้วยฟาจแสดงเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันเพียง 1 ชนิด เพื่อแยกเอาโคลนของฟาจแต่ละโคลนไปเพิ่มจำนวนและสกัดเอา DNA ของฟาจแต่ละโคลนไปตรวจหาลำดับ DNA ด้วยเทคนิค DNA sequencing โดยเลือกโคลนของฟาจแบบสุ่มอย่างน้อย 20 โคลน ที่ elute ได้จากการทำ biopanning ในแต่ละรอบนำไปหาลำดับ DNA ของฟาจตรงตำแหน่งที่ควบคุมการแสดงออกของเปปไทด์ที่ผิวของฟาจที่ติดต่อแทรกอยู่ทั้งหมด 21 ลำดับเบส ซึ่งลำดับ DNA ของแต่ละโคลนที่ได้ สามารถนำไปแปลผลหาลำดับเปปไทด์ที่จับจำเพาะกับโปรตีน P16INK4a ยาว 7 amino acid หลังกระบวนการ Biopanning ทั้ง 3 รอบ สามารถแยกฟาจจับจำเพาะซึ่งแสดงเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกันจำนวน 5 ลำดับกรดอะมิโน ดังแสดงในรูปที่ 3.2

S H S L L H H	P16_1	S H S L L H H	P16_1	S H S L L H H
S H S L L H H		S H S L L H H		S H S L L H H
S I P S L N M		S H S L L H H		S H S L L H H
S Q T Q L P G		S H S L L H H		S H S L L H H
S Q P D R N E		S H S L L H H		S H S L L H H
S S L F Y K Y		S H S L L H H		S H S L L H H
S P P G S P H		S H S L L H H		S H S L L H H
Y P H L P E H		S H S L L H H		S H S L L H H
L S V L H D Q		S H S L L H H		S H S L L H H
L I R P S P D		S H S L L H H		S H S L L H H
D S S P L S L		S H S L L H H		S H S L L H H
A S A P L L G	P16_2	S L H Q P H L	P16_2	S L H Q P H L
Q T S P P H I		S H G N W W R		S L H Q P H L
G T P T P A I	P16_3	Y R A P W P P	P16_3	Y R A P W P P
N A P Y G L R	P16_4	Y A W D T Y R	P16_4	Y A W D T Y R
E H F Q P P L		Y A W D T Y R		Y R A P W P P
T N D T S P S		Y A W D T Y R		Y A W D T Y R
V I K S W Y Q	P16_5	F P P S V I R	P16_5	F P P S V I R
V E S T G I W		H A I Y P R H		F P P L V L R
V L H P S R N		I P T H I R P		

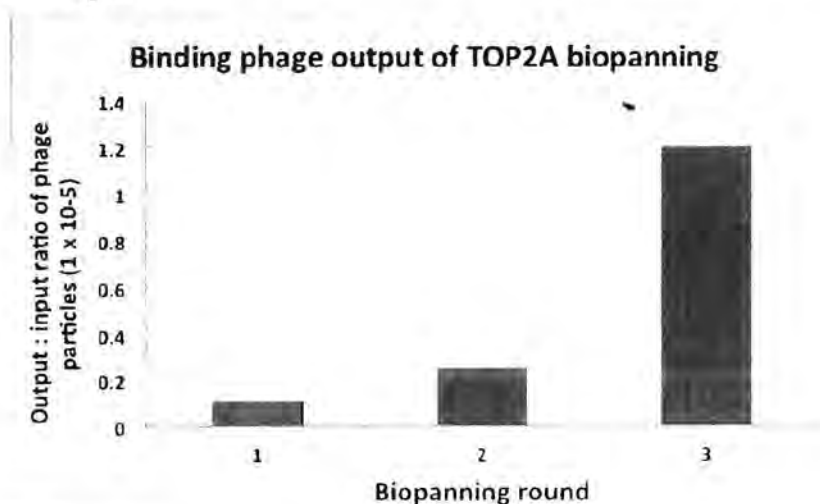
รูปที่ 3.2 แสดงลำดับเปปไทด์จำนวน 20 ฟาจโคลนที่ได้กระบวนการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a ในแต่ละรอบ ซึ่งพบว่าหลังเสร็จสิ้นกระบวนการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะทั้ง 3 รอบ สามารถแยกฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะที่มีลำดับกรดอะมิโน SHSLLHH (p16_1) ได้ นอกจากนี้ยัง

ได้เปปไทด์จับจำเพาะที่พบได้ซ้ำๆ กัน ในรอบที่ 2 และ 3 ของกระบวนการ Biopanning อีก ทั้งหมด 4 เส้น ได้แก่ SLHQPHL (p16_2), YRAPWPP (p16_3), YAWDTYR (p16_4) และ FPPSVIR (p16_5)

จากผลการทดลองพบว่าหลังจากเสร็จสิ้นการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a ด้วยกระบวนการคัดเลือกทั้ง 3 รอบแล้ว สามารถแยกโคลนของฟาจที่แสดงแสดงเปปไทด์ซ้ำกันได้ 5 เส้น ได้แก่ SHSLHH (p16_1), SLHQPHL (p16_2), YRAPWPP (p16_3), YAWDTYR (p16_4) และ FPPSVIR (p16_5) โดยพบปริมาณเพิ่มขึ้นในการคัดเลือกรอบที่ 2 และ 3 ดังแสดงในรูปที่ 2 ตามลำดับ

1.2. การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อเอนไซม์ TOP2A

การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน TOP2A เริ่มจากการคัดฟาจที่ไม่จำเพาะซึ่งอาจเป็นฟาจที่จับกับงานเลี้ยงเซลล์พลาสติกหรือโปรตีนต่างๆ ที่ละลายใน Blocking buffer ออกจากคลังของฟาจก่อน โดยนำสารละลายคลังของฟาจซึ่งมีปริมาณอนุภาคฟาจเริ่มต้นประมาณ 10^{11} โคลน ไปเลือกจับกับงานเลี้ยงเชื้อเปลาที่ coat ด้วย blocking buffer จากนั้นจึงนำคลังของฟาจที่เหลือประมาณ 2×10^{10} ไปใช้เลือกจับกับเอนไซม์ TOP2A สกัดบริสุทธิ์ที่ถูก coat บน plate ฟาจที่จับกับเอนไซม์ TOP2A จะถูก elute, นับและเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกด้วยกระบวนการ Biopanning ซ้ำ 3 รอบ โดยควบคุมให้อนุภาคฟาจเริ่มต้นที่ใช้ในกระบวนการ Biopanning มีปริมาณเท่ากันทุกรอบ เพื่อให้สามารถติดตามการประสิทธิภาพของการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อเอนไซม์ TOP2A ของกระบวนการ Biopanning ในแต่ละรอบ จึงได้ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนของฟาจก่อนและหลังการคัดเลือกจับกับเอนไซม์ TOP2A ด้วยกระบวนการ Biopanning ในแต่ละรอบดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ผลการทำ biopanning เพื่อคัดเลือกฟาจที่จับจำเพาะกับ TOP2A แสดงอัตราส่วนจำนวนฟาจเริ่มต้น และฟาจจับจำเพาะที่ elute ได้ในแต่ละรอบ ซึ่งแสดงให้เห็นความจำเพาะที่เพิ่มสูงขึ้นของการคัดเลือก ฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน TOP2A ในการคัดเลือกแต่ละรอบ

แยกโคลนของอนุฟาจในสารละลายฟาจจับจำเพาะต่อเอนไซม์ TOP2A ที่ elute ได้เพื่อสกัดเอา DNA ของฟาจแต่ละโคลนไปตรวจหาลำดับ DNA ด้วยเทคนิค DNA sequencing โดยเลือกโคลนของฟาจแบบสุ่มอย่างน้อย 20 โคลน ที่ elute ได้จากการทำ Biopanning ในแต่ละรอบ ลำดับ DNA ของฟาจตรงตำแหน่งที่ควบคุม การแสดงออกของเปปไทด์ที่ผิวของฟาจที่ติดต่อแทรกอยู่ของแต่ละโคลนที่ได้ นำไปแปลผลหาลำดับเปปไทด์ที่จับ จำเพาะกับเอนไซม์ TOP2A หลังกระบวนการ Biopanning ทั้ง 3 รอบ สามารถแยกฟาจจับจำเพาะซึ่งแสดงเปป ไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนจำนวน 4 ลำดับกรดอะมิโน ดังแสดงในรูปที่ 3.4

TOP_1	N E R A L T L Y T P E L N N T G A H L Q Q A S N I L Y K A S L A T H R A S Q S P R S G S S T P G K	TOP_1	N E R A L T L N E R A L T L N L I G L F T D T R R L D V G N D Q L V G S I M R I E N G S M A S S W Y S N V M S H	TOP_1	N E R A L T L N E R A L T L N E R A L T L W N A K Y T L I S V T R T T A A A T I T K F L S T K S P S P S T H W K Y H Y T G R L Y S L Q S V I N S L Q S V I
TOP_2	W S T T N V P S S I E D A R S G E M Y A E S I S A A I G S M S I D Q Y D T S R V F R Q A T R S Q P	TOP_2	W S T T N V P W S T T N V P L S N N N L R F T G Y I L D T W A S P L H D R S S V L T Y V T N S L T Q Y G A M H T Q I G P D K Q Y F G H K G Q N T G I S S K	TOP_3	L S N N N L R L S N N N L R Q G S L A R T TOP_4
TOP_4	H A M R A Q P L I A Q K G P L E L P R R P I S P W M L P G H A V Y R P D N P K A A R			TOP_4	H A M R A Q P H A M R A Q P H A M R A Q P W P Y D Q Q L E P P D N W K T P A R H I Y

รูปที่ 3.4 แสดงลำดับเปปไทด์จำนวน 20 ฟาจโคลนที่ได้กระบวนการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะต่อเอนไซม์ TOP2A ในแต่ละรอบ ซึ่งพบว่าหลังเสร็จสิ้นกระบวนการคัดเลือกฟาจจับจำเพาะทั้ง 3 รอบ สามารถแยกฟาจ

แสดงเปปไทด์จับจำเพาะที่มีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกันจำนวน 4 ลำดับกรดอะมิโน NERALTL (TOP_1), WSTTNVP (TOP_2), LSNNNLR (TOP_3) และ HAMRAQP (TOP_4)

จากข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนพบว่าเปปไทด์ NERALTL (TOP_1) เป็นเปปไทด์ที่พบแยกได้จากการรอบ การคัดแยกทั้ง 3 รอบ ขณะที่เปปไทด์ LSNNNLR (TOP_3) แยกได้ในรอบที่ 2 และ 3 นอกจากนี้ยังเลือกเปปไทด์ อีก 2 เส้นที่พบซ้ำระหว่างการคัดเลือกอนุภาคจับจำเพาะ ได้แก่ WSTTNVR (TOP_2) ซึ่งพบในการคัดเลือกรอบ ที่ 1 และ 2 และ HAMRAQP (TOP_4) ซึ่งพบในการคัดเลือกรอบที่ 1 และ 3 มาเพิ่มจำนวนเพื่อศึกษา เปรียบเทียบกับเปปไทด์อีก 2 เส้นด้วย

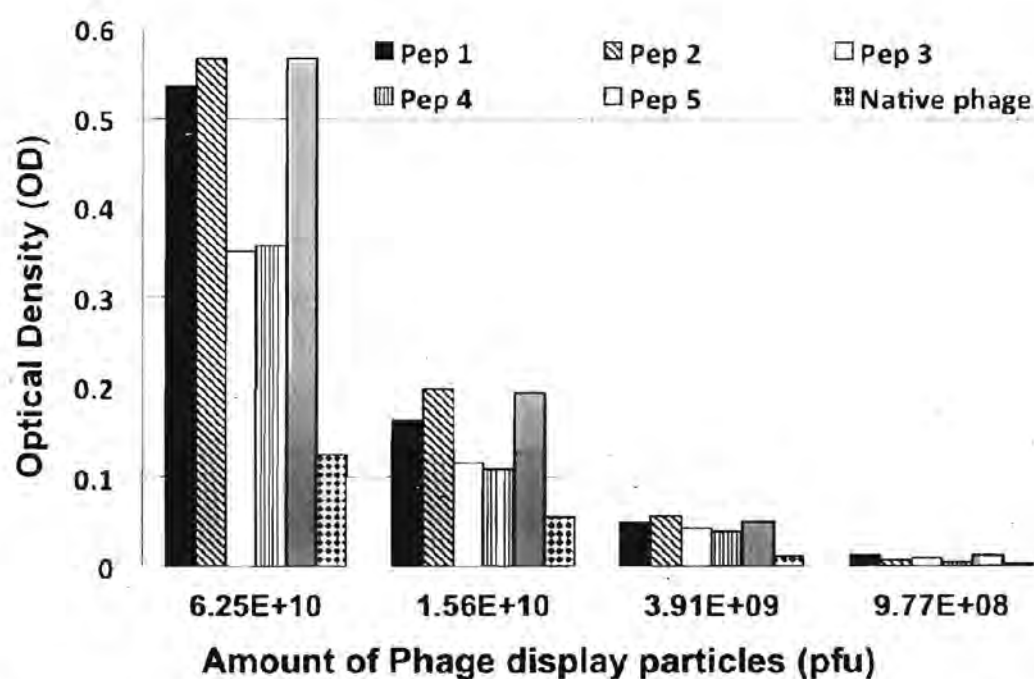
1.3. การทดสอบความใหม่และความถูกต้องของลำดับเปปไทด์ที่แยกโดยการสืบค้นเปรียบเทียบกับ ฐานข้อมูลเปปไทด์ที่ได้จากการคัดเลือกโดยใช้คลังของฟาจดิสเพลย์

นำเปปไทด์ที่คัดแยกได้ไปทดสอบความจำเพาะและความใหม่ในฐานข้อมูลเปปไทด์ที่เคยมีรายงานมา ก่อน ได้แก่ mimotope database and beyond (MimoDB) ซึ่งฐานข้อมูลดังกล่าวได้รวบรวมลำดับเปปไทด์จับ จำเพาะต่อโปรตีนชนิดต่างๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อนรวมถึงเปปไทด์ที่ได้จากการคัดเลือกจากกระบวนการคัดเลือกโดยใช้ คลังของฟาจดิสเพลย์ด้วย นอกจากนี้ฐานข้อมูลดังกล่าวยังได้รวบรวมลำดับเปปไทด์ที่พบซ้ำๆ กันจาก กระบวนการคัดเลือกกับโปรตีนเป้าหมายต่างชนิดกัน ซึ่งอาจเป็นเปปไทด์ที่ไม่จำเพาะซึ่ง elute ได้จากจานเลี้ยง เชื้อพลาสติกหรือโปรตีนที่ละลายอยู่ในบล็อกกิ้งบัฟเฟอร์ที่พบได้เหมือนกันในระบบการคัดเลือก เรียกว่า target-unrelated peptide ผลการเทียบหาลำดับเปปไทด์ที่เหมือนกันในฐานข้อมูลพบว่าเปปไทด์ทั้ง 5 เส้นที่คัดเลือก ได้จากกระบวนการคัดเลือกนี้ ไม่ตรงกับเปปไทด์ใดๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความใหม่ของ ลำดับเปปไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้และแสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของการคัดเปปไทด์ที่ไม่จับจำเพาะออกจาก ระบบคัดเลือกที่ใช้ในการทดลอง จากนั้นจึงนำเปปไทด์ที่ได้ไปศึกษาการจับจำเพาะของเปปไทด์บนโมเลกุลโปรตีน P16INK4a โดยการจำลองพฤติกรรมจับจำเพาะของโปรตีนด้วยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ (Bioinformatics-based technique)

1.4. การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของอนุภาคฟาจที่เลือกได้ในการจับกับกับโปรตีนเป้าหมาย ด้วยเทคนิค ELISA

จากผลการคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Biopanning ที่จับกับ โปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งลำดับเปปไทด์ที่เลือกได้มีมากกว่า 1 ลำดับเปปไทด์ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ

ความสามารถของอนุภาคฟาจที่เลือกได้ในการจับกับกับโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิดด้วยเทคนิค ELISA เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกใช้ลำดับเปปไทด์ที่ให้ความไวในการจับโปรตีนเป้าหมายได้ดีที่สุด อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a ที่น่าจะเป็นไปได้ซึ่งคัดเลือกได้จากกระบวนการ Biopanning จำนวน 5 ลำดับเปปไทด์ ได้แก่ SHSLHH (p16_1), SLHQPHL (p16_2), YRAPWPP (p16_3), YAWDTYR (p16_4) และ FPPSVIR (p16_5) ให้ผลสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเทคนิค ELISA ดังแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาจับจำเพาะระหว่างอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จำเพาะทั้ง 5 ลำดับเปปไทด์ ได้แก่ SHSLHH (p16_1), SLHQPHL (p16_2), YRAPWPP (p16_3), YAWDTYR (p16_4) และ FPPSVIR (p16_5) ที่คัดเลือกได้กับโปรตีน P16INK4a เปรียบเทียบกับอนุภาคฟาจควบคุมที่ไม่แสดงลำดับเปปไทด์ใดๆ (native phage) โดยเทคนิค ELISA แกน x แสดงความเข้มข้นของอนุภาคฟาจที่ใช้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะที่คัดเลือกได้ทั้งหมดสามารถให้สัญญาณ ELISA มากกว่าอนุภาคฟาจควบคุม

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะที่ได้จากกระบวนการคัดเลือกทั้ง 5 ลำดับเปปไทด์ มีความสามารถจับกับโปรตีน P16INK4a ได้ดีกว่าอนุภาคฟาจควบคุม โดยอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์

SHSLLHH (p16_1), SLHQPHL (p16_2), และ FPPSVIR (p16_5) ให้สัญญาณ ELISA ได้ดีที่สุดในเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ที่เหลือ

2. การทดสอบความสามารถของฟาจจับจำเพาะในการแยกเซลล์ปกติออกจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เลี้ยงในห้องทดลอง

อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะที่คัดเลือกได้จากกระบวนการ Biopanning ร่วมกับผลการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายของเปปไทด์ที่เลือกได้ด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งการศึกษาทั้งสองกระบวนการเป็นการศึกษาเปรียบเทียบการจับกันของอนุภาคฟาจกับโปรตีนเป้าหมายที่สกัดบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามการนำอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางคลินิก อนุภาคฟาจจับจำเพาะต้องมีความสามารถในการเลือกจับโปรตีนเป้าหมายที่จำเพาะซึ่งอยู่ภายในเซลล์ที่ผิดปกติได้ การทดลองนี้จึงได้เป็นการทดสอบความสามารถของอนุภาคฟาจจับจำเพาะในการตรวจคัดแยกเซลล์ที่ผิดปกติโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติโดยใช้เทคนิคการย้อมเซลล์ด้วยอนุภาคฟาจจับจำเพาะติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

2.1. การทดสอบความสามารถของฟาจจับจำเพาะในการแยกเซลล์ปกติออกจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการแสดงออกของโปรตีน P16INK4a มากผิดปกติ

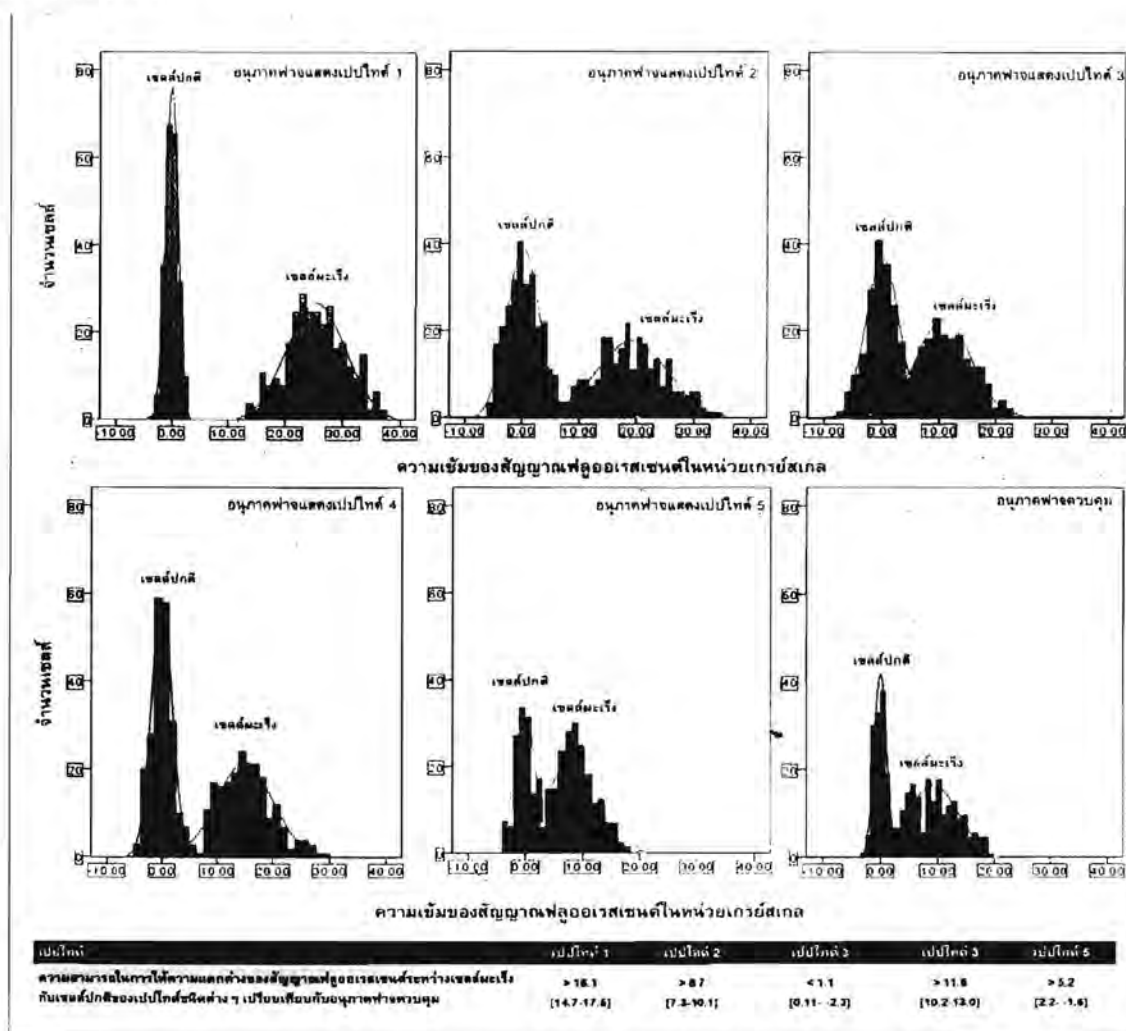
อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a ที่ได้จากการคัดเลือกติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (FITC) จากนั้นนำไปทำการทดสอบการจับจำเพาะของฟาจแสดงเปปไทด์ดังกล่าวในการเลือกจับกับเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง Caski ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน P16INK4a มากผิดปกติ เปรียบเทียบกับตัวแทนของเซลล์ที่แสดงระดับ P16INK4a ปกติ ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากฉีวมดลูก (Human uterine fibroblast; HUF) ผลการย้อมเซลล์พบว่าฟาจแสดงเปปไทด์ SHSLLHH (p16_1), SLHQPHL (p16_2), (p16_3), YAWDTYR (p16_4) และ (p16_5) สามารถเลือกจับกับเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก Caski ซึ่งพบการแสดงออกของโปรตีน P16INK4a สูงเปรียบเทียบกับเซลล์ HUF ซึ่งมีระดับ P16INK4a ปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ 7 ถึง 17 หน่วยเกลย์เกลเมื่อเทียบกับอนุภาคฟาจควบคุมซึ่งเป็นอนุภาคฟาจที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ ดังแสดงรูปที่ 3.6

	ภาพแสดงผลการย้อมเซลล์ด้วยเปปไทด์บนอนุภาคฟาจ ติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์		ภาพแสดงบริเวณเซลล์ร่วมกับนิวเคลียสของเซลล์แต่ละภาพ	
	เซลล์มะเร็ง	เซลล์ปกติ	เซลล์มะเร็ง	เซลล์ปกติ
อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ p16_1				
อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ p16_2				
อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ p16_3				
อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ p16_4				
อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ p16_5				
อนุภาคฟาจควบคุม				

รูปที่ 3.6. ซ้าย: ภาพแสดงผลการย้อมเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน P16INK4a มาก ผิดปกติเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ด้วยเปปไทด์บนอนุภาคฟาจติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ชนิดต่างๆ ได้แก่ เปปไทด์ p16_1, เปปไทด์ p16_2, เปปไทด์ p16_3, เปปไทด์ p16_4, เปปไทด์ p16_5, และอนุภาคฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ, โดยความแตกต่างของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้จากเซลล์มะเร็งที่ย้อมด้วยเปปไทด์

ชาว: ภาพแสดงบริเวณร่วมกันของเซลล์ที่มีอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ของแต่ละภาพ ซึ่งสามารถแสดงตำแหน่งเซลล์ปกติที่ย้อมด้วยเปปไทด์ตรวจจับโปรตีน p16INK4a ที่ย้อมติดสีฟลูออเรสเซนซ์น้อยกว่าเซลล์มะเร็งมาก

จากการวิเคราะห์ค่าความเข้มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากภาพด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และค่าเปรียบเทียบแสดงความแตกต่างทางสถิติของความเข้มในการติดสีระหว่างเซลล์มะเร็งชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน P16INK4a สูงผิดปกติกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติที่ย้อมอนุภาคฟางแสดงเปปไทด์แต่ละชนิด ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 3.7

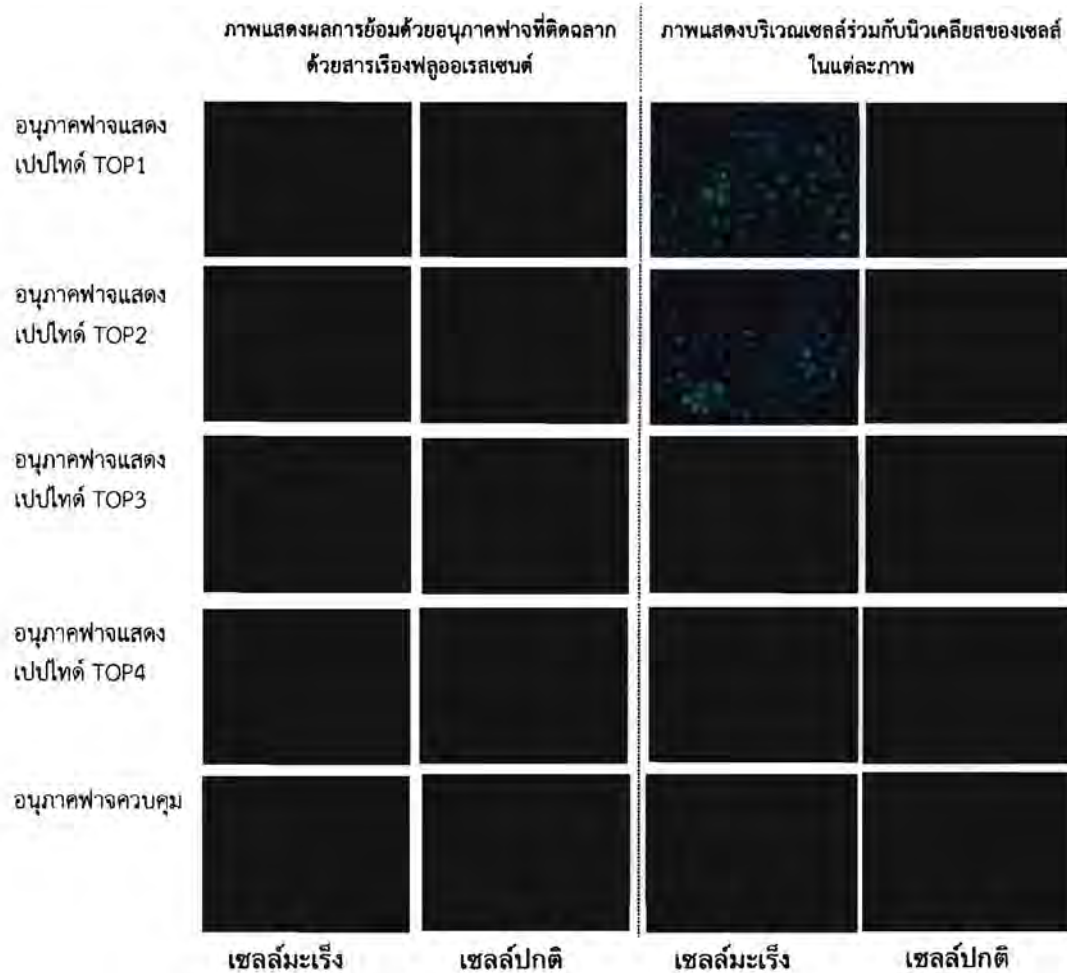


รูปที่ 3.7 กราฟแสดงค่าทางสถิติของความแตกต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งที่ย้อมด้วยอนุภาคฟางแสดงเปปไทด์ตรวจจับและอนุภาคควบคุม โดยอนุภาคฟางแสดง

เปปไทด์ p16_1, p16_2, และ p16_4 สามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณเพื่อใช้ในการตรวจแยกเซลล์มะเร็งได้มากกว่า 16.1, 8.7, และ 11.6 หน่วยเกรย์สเกล ขณะที่อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ 3 และ 5 ไม่สามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณความเข้มแสงบนเซลล์มะเร็งได้มากกว่าเซลล์ปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับความแตกต่างของสัญญาณที่วัดได้จากเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่ย้อมด้วยอนุภาคฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ

2.2. การทดสอบความสามารถของฟาจจับจำเพาะในการแยกเซลล์ปกติออกจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ TOP2A มากผิดปกติ

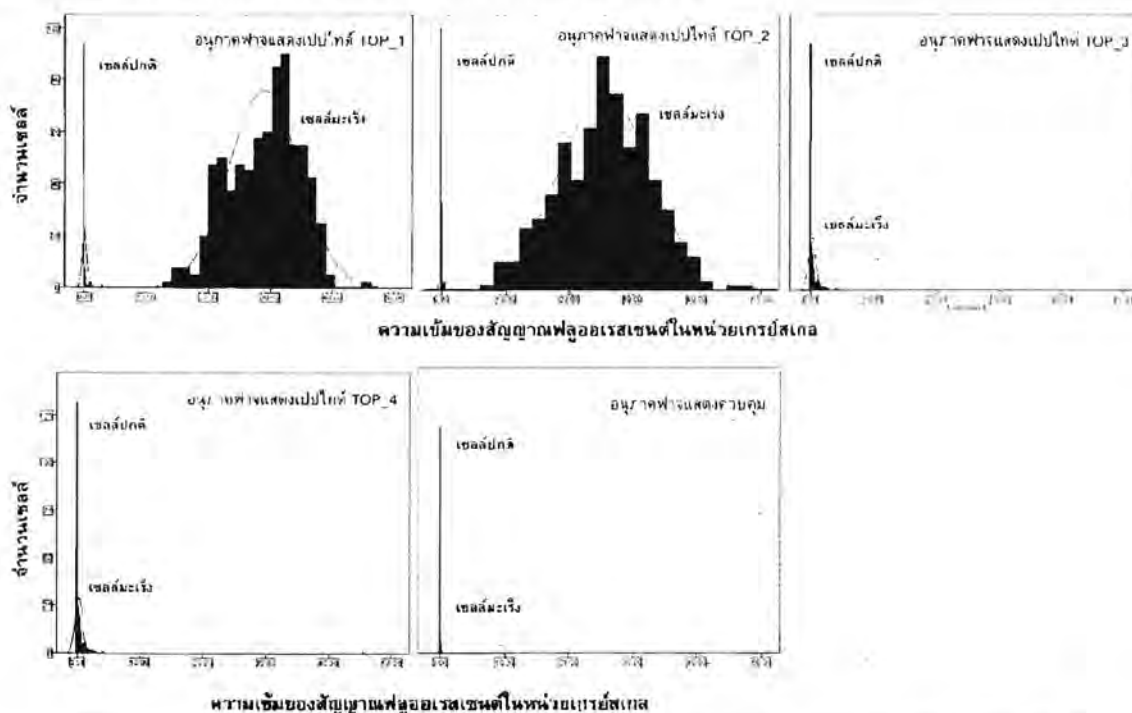
อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน TOP2A ที่ได้จากการคัดเลือกติดตามสารเรืองแสงฟลูออเรสซิน (FITC) จากนั้นนำไปทำการทดสอบการจับจำเพาะของฟาจแสดงเปปไทด์ดังกล่าวในการเลือกจับกับเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง Caski ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน TOP2A มากผิดปกติเปรียบเทียบกับตัวแทนของเซลล์ที่แสดงระดับ P16INK4a ปกติ ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวมดลูก (Human uterine fibroblast; HUF) ผลการย้อมเซลล์พบว่าฟาจแสดงเปปไทด์ NERALTL (TOP_1), และ W5TTNVP (TOP_2) สามารถเลือกจับกับเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก CaSki ซึ่งพบการแสดงออกของโปรตีน P16INK4a สูงเปรียบเทียบกับเซลล์ HUF ซึ่งมีระดับ TOP2A ปกติ อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ 8 ถึง 21 หน่วยเกรย์สเกลเมื่อเทียบกับอนุภาคฟาจควบคุมซึ่งเป็นอนุภาคฟาจที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ ดังแสดงรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8. ซ้าย: ภาพแสดงผลการย้อมเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน TOP2A มาก ผิดปกติเปรียบเทียบกับ การติดสีของเซลล์ปกติ ด้วยเปปไทด์บนอนุภาคฟางติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ชนิดต่างๆ ได้แก่ เปปไทด์ TOP_1, เปปไทด์ TOP_2, เปปไทด์ TOP_3, เปปไทด์ TOP_4 และอนุภาคฟางควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ, โดยความแตกต่างของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้จากเซลล์มะเร็งที่ย้อมด้วยเปปไทด์

ขวา: ภาพแสดงบริเวณร่วมกันของเซลล์ที่มีอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ของแต่ละภาพ ซึ่งสามารถแสดง ตำแหน่งเซลล์ปกติที่ย้อมด้วยเปปไทด์ตรวจจับโปรตีน TOP ที่ย้อมติดสีฟลูออเรสเซนต์น้อยกว่า เซลล์มะเร็งมากในเปปไทด์ TOP_1 และเปปไทด์ TOP_2

จากการวิเคราะห์ค่าความเข้มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากภาพด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และค่าเปรียบเทียบแสดงความแตกต่างทางสถิติของความเข้มในการติดสีระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติที่ย้อมอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์แต่ละชนิด ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 3.9



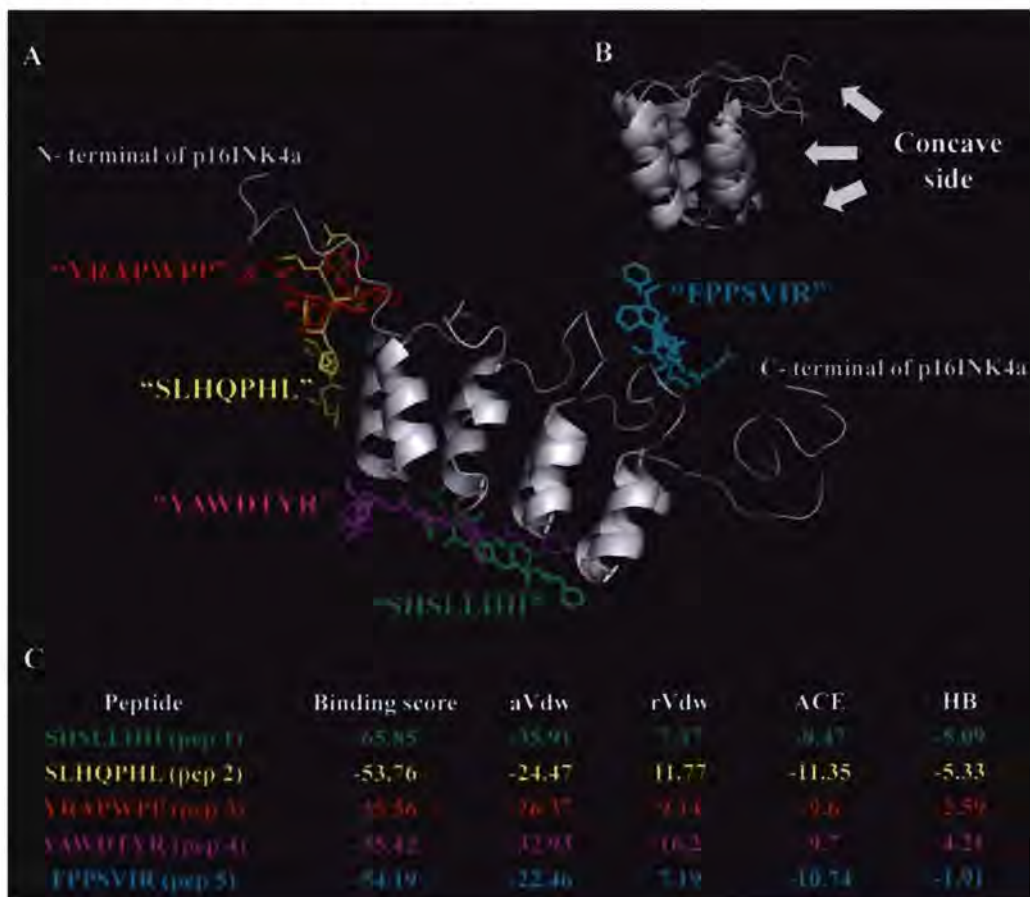
เซลล์ปกติ	เซลล์ปกติ TOP 1	เซลล์ปกติ TOP 2	เซลล์ปกติ TOP 3	เซลล์ปกติ TOP 4
สามารถในการให้ความแตกต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ปกติของเปปไทด์ชนิดต่างๆ เมื่อเทียบกับอนุภาคฟาจควบคุม	> 21.1 [16.6-23.6]	> 18.8 [16.4-21.3]	> 0.2 [2.4-2.7]	< 0.02 [-3.6-2.9]

รูปที่ 3.9 กราฟแสดงค่าทางสถิติของความแตกต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งที่ย้อมด้วยอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ตรวจจับและอนุภาคควบคุม โดยอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ TOP_1 และ TOP_2 สามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณเพื่อใช้ในการตรวจแยกเซลล์มะเร็งได้มากกว่า 21 และ 18 หน่วยเกรย์สเกล ขณะที่อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์ TOP_3 และ TOP_4 ไม่สามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณความเข้มแสงบนเซลล์มะเร็งได้มากกว่าเซลล์ปกติเมื่อเปรียบเทียบกับความแตกต่างของสัญญาณที่วัดได้จากเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่ย้อมด้วยอนุภาคฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ

3. การศึกษาการจับจำเพาะของเปปไทด์บนโมเลกุลโปรตีนเป้าหมายโดยการจำลองพฤติกรรมจับจำเพาะของโปรตีนด้วยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ (Bioinformatics-based technique)

3.1. การศึกษาการจับจำเพาะของเปปไทด์บนโมเลกุลโปรตีน p16INK4a

การศึกษาในส่วนนี้เป็นการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการทำนายการจับกันระหว่างเปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการคัดเลือกกับ โปรตีน P16INK4a โดยอาศัยรูปแบบการทำงานของ protein docking ที่ใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ทำนายและสร้างรูปแบบการจับกันระหว่างโปรตีน ทั้งนี้รูปแบบการจับกันระหว่างเปปไทด์แต่ละเส้นกับ P16INK4a สามารถอธิบายได้จากค่าพลังงานชนิดต่างๆ ที่ถูกกำหนดไว้ในโปรแกรมนั้นๆ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้โปรแกรมที่เป็น web server สำหรับให้บริการการทำ protein docking ได้แก่ PatchDock และ FireDock ซึ่งในกระบวนการทำนั้น รูปแบบและโครงสร้างที่เป็นไปได้ของโปรตีนที่สนใจจะถูกทำนายและคำนวณค่าพลังงานที่เกิดจากแรงกระทำระหว่างเปปไทด์กับโปรตีน เพื่อให้ได้รูปร่างและโครงสร้างใกล้เคียงความจริงที่มีโอกาสพบได้ในธรรมชาติมากที่สุด ผลของ Solution ที่ดีที่สุดที่ได้จากการทำ protein docking ระหว่างเปปไทด์แต่ละเส้นกับโปรตีน P16INK4a ทั้งโมเลกุลแสดงในรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 ภาพโครงสร้างแสดงการทำนายการจับกันระหว่างเปปไทด์ 5 เส้นกับ P16INK4a โดยอาศัยโปรแกรม protein docking (A) โครงสร้าง 3 มิติแสดงการจับกันของ P16INK4a กับเปปไทด์ทั้ง 5 โดยเป็นโครงสร้างที่ให้ค่า binding score ดีที่สุดของเปปไทด์แต่ละเส้นต่อโปรตีน P16INK4a (B) โครงสร้างแสดงส่วนโค้งงอของ P16INK4a ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ SHSLLHH, YAWDTYR และ FPPSVIR จับได้และเป็นตำแหน่งจับจำเพาะของโปรตีน P16INK4a สำหรับการเกิดปฏิกิริยาควบคุมการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ (C) ค่า binding score ที่เกิดจากการคำนวณค่าพลังงานต่างๆ เช่น atomic contact energy, softened Van der Waals interactions, estimation of binding free energy และ H-bonding ซึ่งเกิดการคำนวณจากการปรับค่าการหมุนต่างๆ ของเปปไทด์และ P16INK4a

จากผลการทำ protein docking พบว่า เปปไทด์แต่ละเส้นจับในบริเวณตำแหน่งที่ต่างกันบน P16INK4a ค่า binding score ที่คำนวณได้จากค่าพลังงานชนิดต่างๆ แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ SHSLLHH ซึ่งเป็นเปปไทด์จับจำเพาะที่ซ้ำมากที่สุดที่แยกได้จากกระบวนการคัดเลือกให้ค่า binding score ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์เส้นอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบผลที่น่าสนใจว่าค่า binding score ของเปปไทด์จำนวน 3 เส้น ได้แก่ SHSLLHH, YAWDTYR และ FPPSVIR จับโปรตีน P16INK4a ที่ตำแหน่งจับจำเพาะของโปรตีน CDK4/6 ซึ่งควบคุมการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ จึงได้ทำการศึกษาเทียบตำแหน่ง Binding site ของเปปไทด์ทั้งสามเส้นกับโปรตีน CDK4/6 โดยใช้เทคนิค Surface alignment ในการคำนวณและจำลองแบบบนโปรตีน CDK4/6 ขั้นตอนการคำนวณและจำลองแบบเริ่มจากการเปรียบเทียบโครงสร้างของ CDK4 และ CDK6 (structural alignment) เพื่อหาค่าตำแหน่งและตำแหน่งร่วมของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งทำปฏิกิริยาจับกับโปรตีน P16INK4a แล้วจึงทำการจัดเรียงลำดับเปปไทด์ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่จับจำเพาะบนผิวของ CDK4 และ CDK 6 ได้ผลดังแสดงในรูปที่



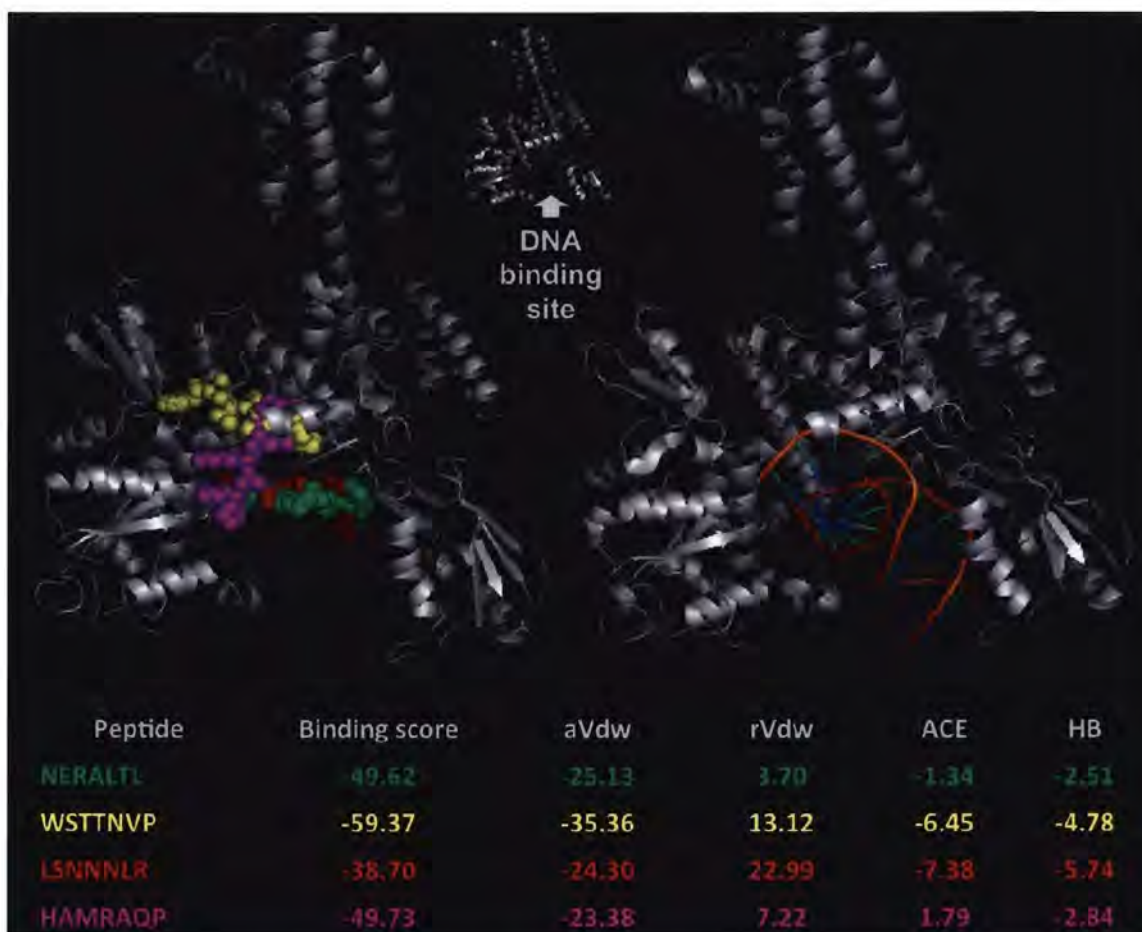
Molecule of analyze	P16_1 "SHSLHH"	P16_2 "SLHQPHL"	P16_4 "YAWDTYR"
CDK4	S28	Q101 / S150	D100 / -
CDK6	-	Q103 / S155	D102 / R168
P16 interactive residues	R87	G55 / E88	M54 / E27

รูปที่ 3.12 แสดงผลการทำนายรูปแบบการจับกับโปรตีน P16INK4a จากการคำนวณ ของเปปไทด์ p16_1, p16_2 และ p16_4 พร้อมตำแหน่งกรดอะมิโนบนของเปปไทด์ที่ตรงกับตำแหน่งกรดอะมิโนของ CDK4 และ CDK6 ที่เกิดพันธะจับกับกรดอะมิโนบนโปรตีน P16INK4a

3.6.2. การศึกษาการจับจำเพาะของเปปไทด์บนโมเลกุลโปรตีน TOP2A

การศึกษาในส่วนนี้เป็นการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการทำนายการจับกันระหว่างเปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการคัดเลือกกับ โปรตีน TOP2A โดยอาศัยรูปแบบการทำงานของ protein docking ที่ใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ทำนายและสร้างรูปแบบการจับกันระหว่างโปรตีน ทั้งนี้รูปแบบการจับกันระหว่างเปปไทด์แต่ละเส้นกับ TOP2A สามารถอธิบายได้จากค่าพลังงานชนิดต่างๆ ที่ถูกกำหนดไว้ในโปรแกรมนั้นๆ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้โปรแกรมที่เป็น web server สำหรับให้บริการการทำ protein docking ได้แก่ PatchDock และ FireDock ซึ่งในกระบวนการทำนั้น รูปแบบและโครงสร้างที่เป็นไปได้ของโปรตีนที่สนใจจะถูกทำนายและคำนวณค่าพลังงานที่เกิดจากแรงกระทำระหว่างเปปไทด์กับโปรตีน เพื่อให้ได้รูปร่างและโครงสร้างใกล้เคียงความจริงที่มีโอกาสพบได้ในธรรมชาติมากที่สุด ผลของ Solution ที่ดีที่สุดที่ได้จากการทำ protein docking ระหว่างเปปไทด์แต่ละเส้นกับโปรตีน TOP2A ทั้งโมเลกุลแสดงในรูปที่ 3.13

จากผลการจำลองและคำนวณค่าพลังงานพบว่าแบบจำลองที่ดีที่สุดของการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ TOP2A กับเปปไทด์ TOP_1 “NERALTL” ให้ที่มีค่า binding score ดีที่สุด เนื่องจากโมเลกุลคู่ปฏิกิริยาตามธรรมชาติของเอนไซม์ ได้แก่ DNA จึงไม่สามารถศึกษาแบบจำลองของการเกิดพันธะจับกันโดยการเทียบเคียงรูปแบบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนบนผิวของโมเลกุลคู่ปฏิกิริยา (Surface alignment) ได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาเพิ่มเติมในแบบจำลองที่แสดงเปปไทด์จับตรงตำแหน่งที่เกิดการจับกับ DNA ผลแสดงรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 ผลรูปแบบการจับกันของเปปไทด์ทั้ง 4 เส้น ที่คัดเลือกได้กับเอนไซม์เป้าหมาย TOP2A บริเวณตำแหน่งเกิดปฏิกิริยาจับกับ DNA (ซ้าย) และภาพโครงสร้าง 3 มิติแสดงโครงสร้าง TOP2A จับกับ DNA (ขวา) โดยอาศัยโปรแกรม protein docking (PatchDock, FireDock) พร้อมค่าพลังงานที่ได้จากการคำนวณผลลัพธ์ของค่าต่างๆ ได้แก่ atomic contact energy, softened Van der Waals

interactions, estimation of binding free energy และ H-bonding ซึ่งเกิดการคำนวณจากการปรับค่าการหมุนต่างๆ ของเปปไทด์ และ TOP2A

จากผลการคำนวณค่าพลังงานของการจับกันระหว่างเปปไทด์ที่คัดเลือกได้กับเอนไซม์ TOP2A ตรงตำแหน่งเกิดปฏิกิริยาจับกับ DNA จากแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติ พบว่าเปปไทด์ TOP_2 "WSTTNVR" ให้ค่าพลังงานดีที่สุด ตามด้วย TOP_4 "HAMRAQP" และ TOP_1 "NERALTL" ตามลำดับ

3.7. การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำอนุภาคฟาจจับจำเพาะไปใช้ในงานตรวจรักษาระดับโมเลกุล โดยใช้อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a เป็นโมเลกุลต้นแบบ

เนื่องจากการประยุกต์ใช้เปปไทด์จับจำเพาะที่ได้จากการคัดเลือกโดยใช้คลังของฟาจดิสเพลย์ที่มีรายงานโดยกลุ่มวิจัยต่างๆ ที่มีมาก่อน ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้เปปไทด์จับจำเพาะเพื่อตรวจจับโมเลกุลหรือเซลล์เป้าหมายภายในร่างกายสัตว์ทดลอง (*in vivo study*) ใน 2 รูปแบบ ได้แก่ 1. การนำอนุภาคแสดงเปปไทด์จับจำเพาะทั้งอนุภาคมาติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในการตรวจติดตามโมเลกุลเป้าหมาย และ 2. การนำเฉพาะข้อมูลลำดับเปปไทด์จับจำเพาะที่ได้จากการคัดเลือกโดยคลังของฟาจดิสเพลย์มาใช้สังเคราะห์เป็นเปปไทด์จับจำเพาะติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มาใช้ตรวจติดตาม โดยการใช้อนุภาคฟาจทั้งอนุภาคมาเป็นโมเลกุลตรวจติดตามมีข้อได้เปรียบที่พื้นที่ผิวของอนุภาคฟาจ 1 อนุภาค สามารถติดฉลากกับโมเลกุลสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้เป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับการใช้เปปไทด์สังเคราะห์ซึ่งสามารถสังเคราะห์ที่ติดฉลากกับโมเลกุลสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้เพียง 1 โมเลกุล ขณะที่เปปไทด์สังเคราะห์จะมาจากขนาดเล็กกว่าแทรกซึมสู่เซลล์เป้าหมายได้ดีกว่าและยังมีความปลอดภัยเหมาะกับการใช้งานในร่างกายสิ่งมีชีวิตมากกว่า การทดลองนี้จึงทำขึ้นเพื่อศึกษาทดสอบและเปรียบเทียบความเป็นไปได้ของการใช้อนุภาคฟาจกับเปปไทด์สังเคราะห์ที่จับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a ในการพัฒนาใช้ในงานตรวจรักษาในระดับโมเลกุล

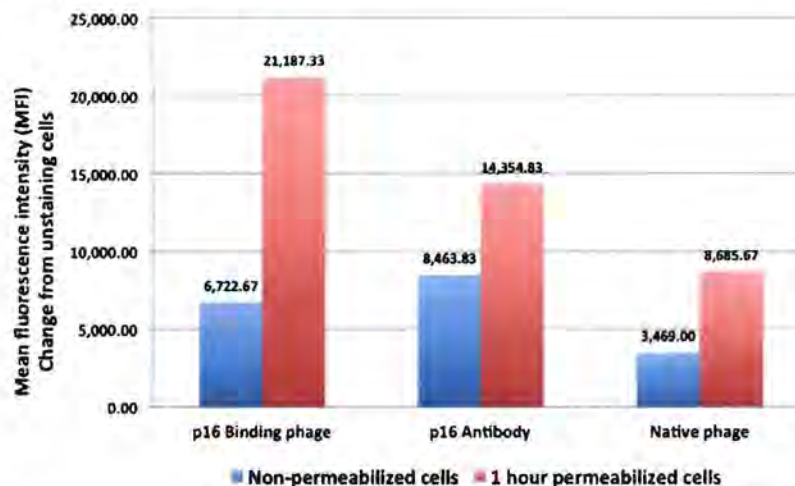
3.7.1. การทดสอบความสามารถของอนุภาคฟาจจับจำเพาะการตรวจแยกเซลล์มะเร็งปากมดลูก

โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์ (flow cytometer)

ความสามารถของอนุภาคฟาจติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในการซึมเข้าทำปฏิกิริยาในเซลล์มะเร็งปากมดลูก ผลการทดสอบในภาพที่ 3.15. แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ซึ่งผ่านกระบวนการเตรียมดังอธิบายในข้อ 2.12. ในสารละลายต่างๆ ได้แก่

- สารละลายอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a ติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ไอโซไทโอไซยาเนต (Fluorescein isothiocyanate; FITC) ที่มีจำนวนอนุภาคสุทธิ 1×10^{10} อนุภาค
- สารละลายแอนติบอดีจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a อัตราส่วน 1:500

- สารละลายอนุภาคฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์จับจำเพาะติดฉลากสารเรืองแสงที่มีจำนวนอนุภาคสุทธิ 1×10^{10} อนุภาค



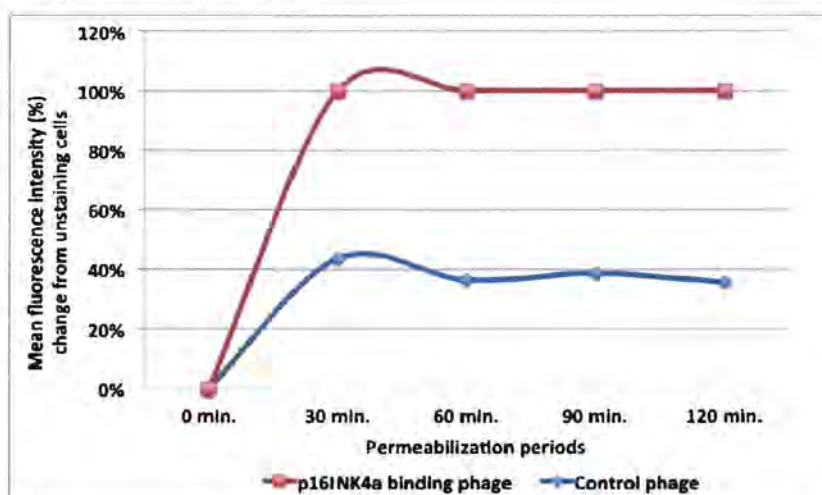
รูปที่ 3.15 ค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่ได้ผ่านการเปิดผิวเซลล์ (น้ำเงิน) และที่ผ่านการเปิดผิวเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แดง) ซึ่งย้อมด้วยอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a, แอนติบอดีต่อโปรตีน p16INK4a และอนุภาคฟาจที่ควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์จับจำเพาะติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าโมเลกุลตรวจจับติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์สามารถซึมผ่านและเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายในเซลล์ที่ผ่านการเปิดผิวเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการเปิดผิวเซลล์ โดยผลต่างของสัญญาณในเซลล์ที่ผ่านการเปิดผิวเซลล์ให้ผลของสัญญาณเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในกลุ่มตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ แอนติบอดี และอนุภาคฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์จับจำเพาะตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเปิดผิวเซลล์มีผลอย่างยิ่งกับการดัดแปลงใช้อนุภาคฟาจในการพัฒนางานตรวจวินิจฉัยในระดับโมเลกุล

3.7.2. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเปิดผิวเซลล์ด้วยสารละลาย 0.1% tween 20

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่ากระบวนการเปิดผิวเซลล์อาจมีผลอย่างยิ่งในการพัฒนาอนุภาคฟาจจับจำเพาะสำหรับใช้ในงานตรวจรักษาในระดับโมเลกุล จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงระยะเวลาที่เหมาะสมของการเปิดผิวเซลล์ด้วยสารละลายทวิน 20 0.1% ที่สามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดตัวอย่างเซลล์ที่ทำการเปิดผิวเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ผสมทวิน 20 0.1% เป็นเวลา 0, 30, 60, 90, และ 120 นาที ตามลำดับให้ค่าเฉลี่ยของความ

เข็มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาคฟาจจับจำเพาะ และอนุภาคฟาจควบคุมดังแสดงในรูปที่ 3.16



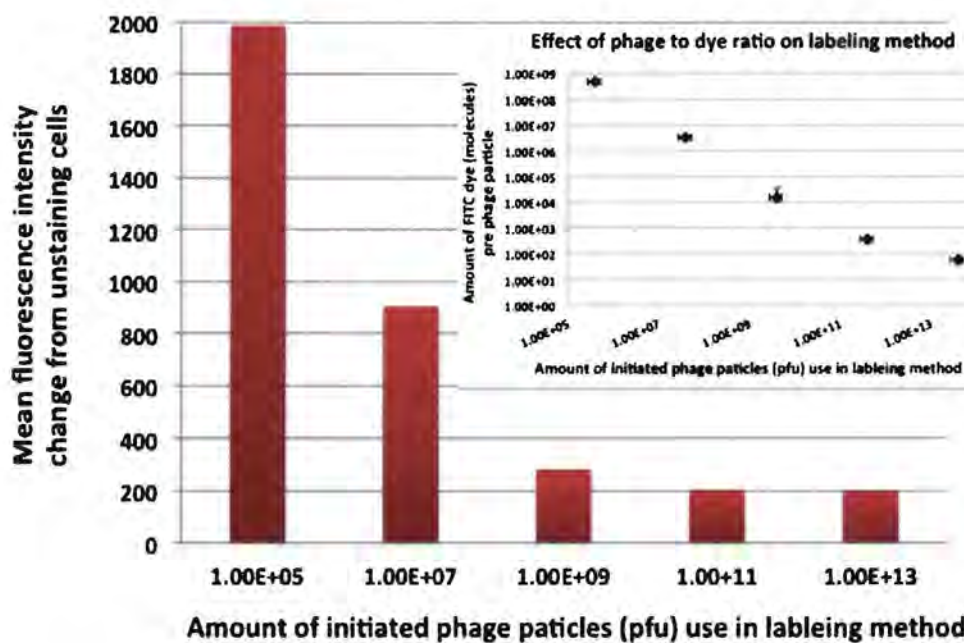
รูปที่ 3.16. ค่าเฉลี่ยของความเข็มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาคฟาจจับจำเพาะ (แดง (น้ำเงิน)) และอนุภาคฟาจควบคุม (ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซลล์ที่ผ่านกระบวนการเปิดผิวเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกสามารถทำปฏิกิริยากับอนุภาคฟาจจับจำเพาะให้สัญญาณดีกว่าอนุภาคฟาจควบคุมประมาณ 60% เมื่อคิดจากเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงจากเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการเปิดผิวเซลล์ โดยสัญญาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเซลล์ผ่านการเปิดผิวเซลล์ในเวลา 30 นาทีแรกและสัญญาณเริ่มคงที่แม้จะเพิ่มเวลาการเปิดผิวเซลล์ด้วยสารละลายทวิน 20 0.1% จนถึง 120 นาที ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเปิดผิวเซลล์ด้วยสารละลายทวิน 20 0.1% ตั้งแต่ 30 นาทีขึ้นไปจะช่วยให้อนุภาคฟาจสามารถเข้าทำปฏิกิริยาตรวจจับเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้

3.7.3. การศึกษาผลของการใช้อนุภาคฟาจจับจำเพาะกระตุ้นสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สำหรับใช้เป็นโมเลกุลตรวจจับเซลล์มะเร็งปากมดลูก

เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์สังเคราะห์แม้ว่าอนุภาคฟาจจะมีขนาดใหญ่กว่า แต่การใช้อนุภาคฟาจทั้งอนุภาคเป็นโมเลกุลตรวจจับเซลล์มะเร็ง อนุภาคฟาจจะมีพื้นที่ผิวที่ประกอบด้วยบล็อกโปรตีนสามารถทำปฏิกิริยาติดฉลากกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้เป็นจำนวนมาก ทำให้อนุภาคหนึ่งอนุภาคสามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้มากกว่าโมเลกุลเปปไทด์สังเคราะห์ที่สามารถทำปฏิกิริยาติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้เพียง 1 โมเลกุล จึงเป็นการช่วยเพิ่มความไวให้กับโมเลกุลตรวจจับได้อย่างมาก การทดลองนี้ได้ปรับจำนวน

โมเลกุลสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดฉลากบนอนุภาคฟาจ โดยใช้สารละลายอนุภาคฟาจที่ปริมาณแตกต่างกัน ในการสร้างให้อนุภาคฟาจมีจำนวนสารสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ผิวแตกต่างกัน หลังจากตกตะกอนปั่น แยกเอาเฉพาะอนุภาคฟาจติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาแล้ว จึงทำการวัดปริมาณสารเรืองแสง ฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่องวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เทียบกับสารละลายฟลูออเรสเซนซ์มาตรฐานที่รู้ความเข้มข้น แล้วจึงนำอนุภาคฟาจที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ตัวอย่างต่างๆ จำนวน 10^{10} อนุภาคเท่าๆ กัน ไป ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ทำการเปิดผิวเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้ผลของปริมาณโมเลกุลของสาร เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ต่ออนุภาคฟาจหนึ่งอนุภาคและผลการย้อมเซลล์ดังรูปที่ 3.17

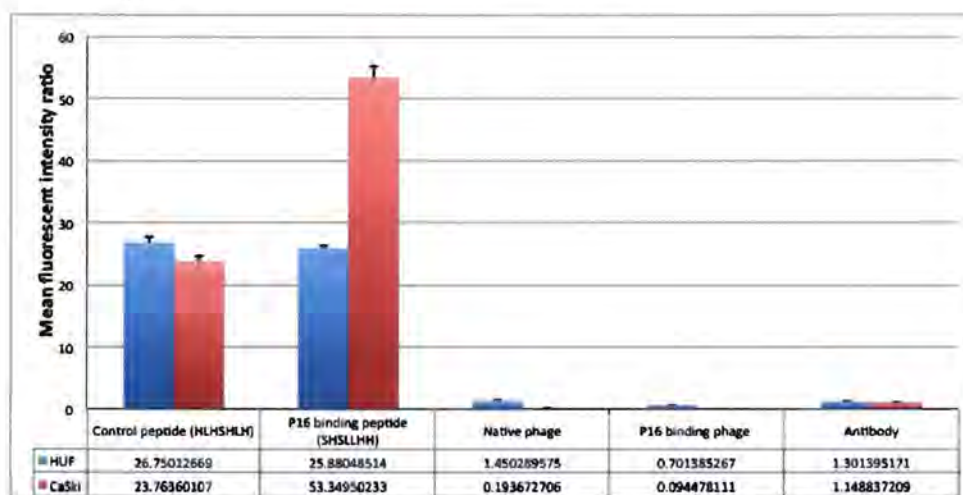


รูปที่ 3.17 กราฟแสดงผลของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เฉลี่ยที่วัดได้จากเซลล์ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาคฟาจที่ ปริมาตรสุทธิต่างๆ ตั้งแต่ 10^{13} - 10^5 อนุภาค ที่ใช้ในกระบวนการติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรส เซนซ์ กราฟภายในแสดงปริมาณโมเลกุลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ต่ออนุภาคฟาจหนึ่งอนุภาค เมื่อใช้อนุภาคฟาจที่ปริมาณฟาจสุทธิต่างๆ ในกระบวนการติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์

3.7.4. การทดสอบความสามารถในการแทรกซึมผ่านเซลล์ของอนุภาคฟาจจับจำเพาะเปรียบเทียบกับ โมเลกุลเปปไทด์สังเคราะห์

จากผลการทดสอบการใช้อนุภาคฟาจจับจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่าอนุภาคสามารถทำงานได้ดีเมื่อนำตัวอย่างเซลล์ไปแช่ในสารละลายที่ช่วยในการเปิดผิวเซลล์ ซึ่งอาจเป็น

ข้อจำกัดในการนำอนุภาคฟาจจับจำเพาะไปใช้ในร่างกายสิ่งมีชีวิต จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบการแทรกซึมผ่านเซลล์ของอนุภาคฟาจจับจำเพาะกับโมเลกุลเปปไทด์สังเคราะห์ ในการตรวจจับเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ CaSki และ เซลล์ไฟโบรบลาสตจากผิวมดลูก (Human Uterine Fibroblast; HUF) ที่ไม่ผ่านกระบวนการตรึงด้วยเมทานอลหรือการเปิดผิวเซลล์ นำไปปั่นตกตะกอนแล้วจึงละลายเซลล์ด้วยสารละลายชนิดต่างๆ ดังอธิบายในข้อ 2.14 ได้ค่าเฉลี่ยของความเข้มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ดังแสดงในรูปที่ 3.18

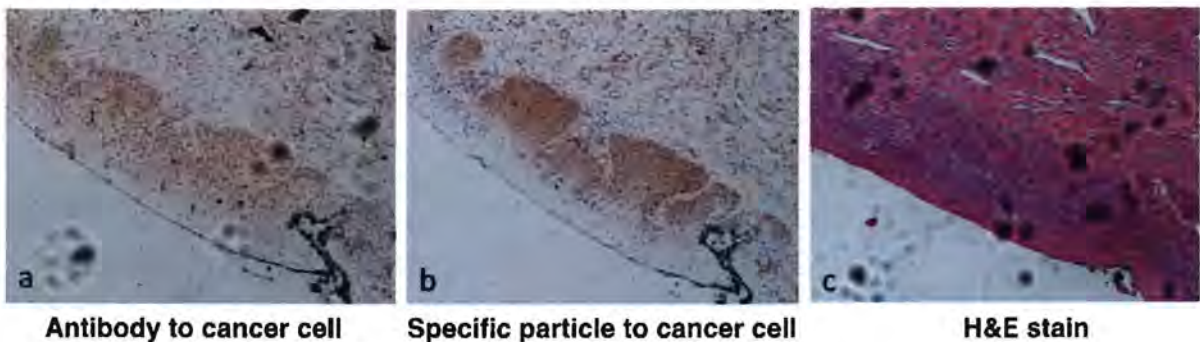


รูปที่ 3.18 กราฟแสดงผลของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เฉลี่ยที่วัดได้จากเซลล์ที่ทำปฏิกิริยากับอนุภาคฟาจที่ปริมาตรสุทธิต่างๆ ตั้งแต่ 10^{13} - 10^5 อนุภาค ที่ใช้ในกระบวนการติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ กราฟภายในแสดงปริมาณโมเลกุลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ต่ออนุภาคฟาจหนึ่งอนุภาค เมื่อใช้อนุภาคฟาจที่ปริมาณฟาจสุทธิต่างๆ ในกระบวนการติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์สังเคราะห์สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ที่ไม่ผ่านการเปิดผิวเซลล์ได้ดี ในขณะที่อนุภาคฟาจและแอนติบอดีไม่สามารถแทรกซึมเข้าสู่เซลล์สดได้ และเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a สามารถให้สัญญาณตรวจจับเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสตจากผิวมดลูกปกติ ขณะที่เปปไทด์ควบคุมไม่สามารถให้ให้สัญญาณที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิดได้ สรุปได้ว่าเปปไทด์สังเคราะห์สามารถซึมผ่านเซลล์ที่ไม่ผ่านการเปิดผิวเซลล์ได้ดีกว่าอนุภาคฟาจและเปปไทด์จับจำเพาะที่ได้สามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ CaSki มากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสตจากปากมดลูก HUF

3.7.5. การทดสอบการประยุกต์ใช้งานอนุภาคฟาจจับจำเพาะในเบื้องต้นโดยการทดสอบการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มีรอยโรคมะเร็งปากมดลูก

การทดสอบการใช้งานอนุภาคฟาจโดยใช้เทคนิคการตรวจจับเทียบเคียงกับเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรีด้วยแอนไซม์ที่ทำให้เกิดสีในเบื้องต้น ด้วย โดยใช้สไลด์ชิ้นเนื้อที่ได้รับการตรวจผลมาก่อนด้วยเทคนิคทางพยาธิวิทยามาตรฐานว่ามีรอยโรคมะเร็งปากมดลูกชนิด microinvasive มาเตรียมตามขั้นตอนการเตรียมสไลด์สำหรับงานตรวจอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรีตามปกติ โดยในขั้นการทำปฏิกิริยาการแอนติบอดีได้เปลี่ยนจากการใช้แอนติบอดีมาเป็นอนุภาคฟาจปริมาตรสุทธิ 2×10^{10} อนุภาคเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำชิ้นเนื้อไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่ออนุภาคฟาจติดฉลากแอนไซม์ฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงล้างออกและนำไปทำปฏิกิริยากับสับสเตรทของแอนไซม์ที่ให้สีน้ำตาล ผลการทดลองเปรียบเทียบกับการใช้แอนติบอดีมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 3.19



รูปที่ 3.19 ตัวอย่างภาพการย้อมเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกในเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี (a) ย้อมด้วยอนุภาคจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง (b) และการย้อมด้วยวิธีมาตรฐาน H&E (c) แสดงให้เห็นว่า การย้อมด้วยอนุภาคจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งให้ผลลักษณะการแบ่งชั้นของกลุ่มเซลล์ผิดปกติได้ชัดเจนเทียบกับการย้อมด้วยแอนติบอดี และการย้อมด้วยวิธีมาตรฐาน H&E

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกอนุภาคฟาจจับจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย

จากกระบวนการคัดเลือกอนุภาคแสดงเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิด เริ่มจากการเตรียมคลังของฟาจดิสเพลย์แสดงเปปไทด์แบบสุ่ม โดยนำไปคัดแยกอนุภาคที่ไม่จับจำเพาะออกก่อน จากนั้นคลังของฟาจที่เหลือนำไปใช้ในการคัดเลือกอนุภาคฟาจที่แสดงเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิด จำนวน 3 รอบ จำนวนฟาจที่จับบนโปรตีนซึ่งแยกได้ในแต่ละรอบ นำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อเพิ่มปริมาณอนุภาคฟาจที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายในคลังที่เหลืออยู่ก่อนจะนำไปใช้ในการคัดเลือกในรอบต่อไป โดยทำการควบคุมให้อนุภาคฟาจที่ใช้ในการคัดเลือกแต่ละรอบมีปริมาณเท่ากัน เมื่อทำการคำนวณอัตราส่วนระหว่างปริมาณฟาจหลังการคัดเลือกต่อปริมาณฟาจเริ่มต้นที่ใช้ในการคัดเลือกแต่ละรอบพบว่า ปริมาณฟาจจำเพาะที่คัดแยกได้มีอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของการคัดเลือก แสดงให้เห็นว่าสามารถแยกฟาจจับจำเพาะได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มรอบในการคัดเลือกฟาจบนโมเลกุลเป้าหมาย ซึ่งข้อสังเกตที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ซึ่งสามารถพบเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกันมากขึ้นในการคัดเลือกในแต่ละรอบตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณอนุภาคฟาจที่ได้ระหว่างกระบวนการ Biopanning ของโปรตีน P16INK4a และ TOP2A เมื่อใช้ปริมาณอนุภาคฟาจเริ่มต้นเท่ากัน ปริมาณอนุภาคฟาจที่คัดแยกได้ระหว่างกระบวนการ Biopanning ของโปรตีน TOP2A ให้ปริมาณฟาจที่คัดแยกได้น้อยกว่าประมาณ 1 เท่าตัว เกิดจากการใช้ขนาดจานเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ตรึงโปรตีนระหว่างการทำ Biopanning ที่ไม่เท่ากัน โดยขนาดจานเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในกระบวนการ Biopanning สำหรับ TOP2A เป็นจานกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 35 มิลลิเมตร ขณะที่เลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในกระบวนการ Biopanning สำหรับโปรตีน P16INK4a เป็นจานกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 60 มิลลิเมตร โดยการที่คณะผู้วิจัยจำเป็นต้องเลือกใช้จานเลี้ยงเซลล์สำหรับกระบวนการ Biopanning ของ TOP2A เล็กกว่าที่ใช้สำหรับโปรตีน P16INK4a เพราะ TOP2A เป็นผลผลิตเอนไซม์ที่มีราคาสูงกว่าโปรตีน P16INK4a มาก นอกจากนี้ปริมาณความเข้มข้นของผลผลิตเอนไซม์รวมถึงความสามารถในการกระตุ้นปฏิกิริยาเคมีที่ได้ในแต่รอบการผลิตไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งบริษัทผู้ผลิตจำหน่ายเอนไซม์ดังกล่าวเป็นความเข้มข้นในหน่วยความสามารถในการกระตุ้นปฏิกิริยาเคมี (Unit) ในระหว่างกระบวนการคัดเลือกอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะ ผู้วิจัยจึงต้องใช้ผลผลิตเอนไซม์ที่จากรอบการผลิตรอบเดียวกันทั้งหมดเพื่อควบคุมให้ตัวแปรต่างๆ ในกระบวนการคัดเลือกแต่ละมีความคงที่เหมือนกันมากที่สุด แม้ผู้วิจัยได้ทำการประมาณปริมาณโปรตีนที่ใช้ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เพียงพอต่อกระบวนการ Biopanning ทั้ง 3 รอบ และทำการสั่งซื้อเอนไซม์

ทั้งหมดพร้อมกันจากรอบการผลิตรอบเดียวกันในหน่วย ความสามารถในการกระตุ้นปฏิกิริยาเคมี (Unit) แต่เมื่อเริ่มกระบวนการผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์จริงในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าน้อยกว่าที่ประเมินไว้ ทำให้เอนไซม์ที่ส่งชื่อมามีปริมาณไม่เพียงพอในการทำ Biopanning บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 60 มิลลิเมตร ผู้วิจัยจึงแก้ปัญหาโดยการใช้จานเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดเล็กง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าแม้การเปลี่ยนขนาดจานเลี้ยงเซลล์สำหรับการทำ Biopanning จะทำให้ปริมาณ output phage ที่ได้ลดลง แต่กระบวนการ biopanning ยังให้ผล Output : input ratio เพิ่มขึ้นเมื่อรอบของการคัดเลือกเพิ่มขึ้นซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถของระบบการคัดเลือกในการเลือกจับอนุภาคฟาจที่มีความจำเพาะ และยังสามารถคัดแยกอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะต่อเอนไซม์ TOP2A ได้ในเมื่อผ่านกระบวนการคัดเลือกรอบที่ 3 เช่นเดียวกับผลที่ได้ในกระบวนการ Biopanning ของโปรตีน P16INK4a

2. การทดสอบความสามารถของฟาจจับจำเพาะในการแยกเซลล์ปกติออกจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เลี้ยงในห้องทดลอง

ผลการคัดเลือกเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน P16INK4a ได้เปปไทด์จับจำเพาะจำนวน 5 ลำดับกรดอะมิโน ได้แก่ SHSLLHH (p16_1), SLHQPHL (p16_2), YRAPWPP (p16_3), YAWDTYR (p16_4) และ FPPSMIR (p16_5) และ เอนไซม์ TOP2A ตามลำดับ จากลำดับเปปไทด์จับจำเพาะต่อ โปรตีน P16INK4a ที่แยกได้ แม้เปปไทด์ SHSLLHH จะเป็นลำดับเปปไทด์ที่พบซ้ำมากที่สุดในช่วงกระบวนการคัดเลือก แต่ลำดับเปปไทด์ซ้ำที่เหลือนี้ก็สามารถพบซ้ำในระหว่างคัดแยกในแต่ละรอบได้ เปปไทด์ที่เหลือเหล่านี้จึงมีคุณสมบัติในการจับจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายเช่นกันจึงได้ทำการคัดแยกเพิ่มจำนวนไว้เพื่อนำไปทดสอบเปรียบเทียบคุณสมบัติในด้านอื่นๆ ซึ่งผล ELISA, การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ และการคำนวณค่า Binding score โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ต่างให้ผลยืนยันสอดคล้องตรงกันถึงความสามารถในการจับกับโมเลกุล p16INK4a ของเปปไทด์ที่พบลำดับกรดอะมิโนซ้ำบ่อยที่สุดในระหว่างการคัดเลือก ได้แก่ เปปไทด์ "SHSLLHH" ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเปปไทด์ดังกล่าวในการประยุกต์ใช้ในงานตรวจรักษา

การย้อมเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยใช้อนุภาคฟาจจับจำเพาะที่คัดเลือกได้ติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ย้อมเซลล์ทั้งสอง โดยประสิทธิภาพของการย้อมเซลล์มะเร็งรายงานในรูปแบบความต่างค่าความต่างทางสถิติของสัญญาณที่ได้จากการย้อมเซลล์ทั้งสองด้วยอนุภาจติดฉลากสารเรืองแสง ตัวอย่างเดียวกันเทียบกับค่าความต่างที่ได้จากการย้อมเซลล์ทั้งสองด้วยอนุภาคฟาจควบคุม เนื่องจากการกระบวนการติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์บนอนุภาคฟาจควบคุมได้ยาก การใช้อนุภาคฟาจเข้มข้นมากถึง

10^{12} อนุภาคต่อมิลลิลิตรในการติดตามความคาดเคลื่อนในการดูดสารละลายฟาจเพียงเล็กน้อยในแต่ละครั้งอาจทำให้ผลการติดตามจะมีความแตกต่างกันมากในแต่ละครั้งที่ทำการติดตาม อย่างไรก็ตามการศึกษาประสิทธิภาพของการย้อมเซลล์มะเร็งในรูปแบบความค่าความต่างทางสถิติของสัญญาณที่ได้จากการย้อมเซลล์ทั้งสองด้วยอนุภาคฟาจติดตามสารเรืองแสงตัวอย่างเดียวกันเทียบกับค่าความต่างที่ได้จากการย้อมเซลล์ทั้งสองด้วยอนุภาคฟาจควบคุม ทำให้ในขั้นการติดตามสารเรืองฟลูออเรสเซนซ์บนอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์แต่ละชนิดที่ให้ประสิทธิภาพในการติดตามเมื่อคิดเป็นจำนวนโมเลกุลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ต่ออนุภาคฟาจแตกต่างกันไม่ส่งผลต่อการศึกษาประสิทธิภาพของการย้อมเซลล์มะเร็ง กล่าวคือแม้ว่าอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์แต่ละชนิดจะมีจำนวนสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ต่ออนุภาคไม่เท่ากันแต่ความแตกต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการย้อมเซลล์มะเร็งและเซลล์ไฟโบรบลาสติที่อนุภาคฟาจติดตามสารเรืองแสงตัวอย่างเดียวกันจะมีค่าเท่ากันจึงสามารถเปรียบเทียบกันได้

สำหรับเปปไทด์จับจำเพาะต่อเอนไซม์ TOP2A พบเปปไทด์ NERALTL (TOP_1) เป็นเปปไทด์ที่พบแยกได้จากการรอบการคัดแยกทั้ง 3 รอบ ขณะที่เปปไทด์ LSNNL (TOP_3) แยกได้ในรอบที่ 2 และ 3 นอกจากนี้ยังเลือกเปปไทด์อีก 2 เส้นที่พบซ้ำระหว่างการคัดเลือกอนุภาคจับจำเพาะ ได้แก่ WSTTNVR (TOP_2) ซึ่งพบในการคัดเลือกรอบที่ 1 และ 2 และ HAMRAQP (TOP_4) ซึ่งพบในการคัดเลือกรอบที่ 1 และ 3 มาเพิ่มจำนวนเพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับเปปไทด์อีก 2 เส้นด้วย จากข้อจำกัดเรื่องการสังเคราะห์ recombinant protein ทำให้การศึกษาในโครงการนี้ยังไม่ได้ทดสอบความสามารถของเปปไทด์จับจำเพาะกับเอนไซม์ TOP2A อย่างไรก็ตามผลการทดสอบด้วยเทคนิคการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ และการคำนวณค่าพลังงานที่เกิดจากการจับกันระหว่างเปปไทด์ที่ได้จากโครงการกับโปรตีนเป้าหมาย (Binding score) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ “NERALTL” ให้ความต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจแยกเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดีที่สุดและให้ค่าพลังงานที่เกิดจากการจับกันระหว่างเปปไทด์ที่ได้จากโครงการกับโปรตีนเป้าหมาย จากการคำนวณได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับเปปไทด์ตัวอื่นๆ ที่แยกได้ ซึ่งช่วยสนับสนุนผลของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการคัดเลือกอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะ

การศึกษารูปแบบการจับกันระหว่างโปรตีนเป้าหมายและเปปไทด์ที่ได้จากการคัดเลือกโดยอาศัยคลังของฟาจแสดงเปปไทด์สายสั้นๆ ด้วยการคำนวณและทำนายรูปแบบทางคอมพิวเตอร์ให้ใกล้เคียงกับการจับกันของโมเลกุลที่เกิดจริงตามธรรมชาติ ในปัจจุบันอยู่ระหว่างการศึกษาระยะเวลาในการพัฒนาอัลกอริทึมสำหรับการคำนวณอีกมาก อัลกอริทึมที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ซอร์สโค้ดเปิด (open source) สำหรับการคำนวณรูปแบบการจับกันของโปรตีนเป้าหมายกับลิแกนด์หรือเปปไทด์สายสั้นๆ เริ่มจากการจำลองโดยการคำนวณ

จากความเข้ากันได้ทางรูปร่างและการประมาณจากค่าพลังงานในการเกิดแรงของการดึงดูและเกิดพันธะจับกันระหว่างเปปไทด์กับโปรตีนเป้าหมาย อย่างไรก็ตามการจำลองรูปแบบการจับกันระหว่างเปปไทด์กับโปรตีนในรูปแบบเปปไทด์ที่ใช้ในการศึกษาจำลองรูปแบบการจับกันของโครงการวิจัยนี้ยังเป็นเปปไทด์เส้นตรงอยู่ การศึกษารูปแบบการจับกันของโมเลกุลให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติควรเริ่มจากการทำนายรูปแบบโครงสร้าง 3 มิติ ของเปปไทด์ก่อนจึงค่อยทำการจำลองรูปแบบการจับกันของเปปไทด์ที่มีรูปร่าง 3 มิติที่ได้ กับโปรตีนเป้าหมาย แต่จากข้อจำกัดของอัลกอริทึมที่มีอยู่ในปัจจุบัน ยังไม่มีอัลกอริทึมใดรองรับการทำนายรูปแบบโครงสร้าง 3 มิติของเปปไทด์สั้นขนาด 7 ลำดับกรดอะมิโน เปปไทด์สายสั้นที่ได้จากโครงการวิจัยนี้เมื่อนำไปใช้ในการจำลองแบบตามอัลกอริทึมที่มีอยู่ในปัจจุบันจึงถูกมองเป็นเสมือนลิแกนด์ซึ่งมีขนาดเล็กมากเกินกว่าที่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 3 มิติ จะมีผลต่อการจำลองรูปแบบการจับกันของโมเลกุลโดยกระบวนการคำนวณจากความเข้ากันได้ทางรูปร่างและการประมาณจากค่าพลังงานในการเกิดแรงของการดึงดูและเกิดพันธะจับกันระหว่างเปปไทด์กับโปรตีนเป้าหมาย ทำให้การคำนวณค่าพลังงานที่เกิดจากการจับกันระหว่างโมเลกุลขึ้นกับคุณสมบัติด้านประจุรวมและลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์เป็นหลัก และเมื่อประมาณขนาดของเปปไทด์ขนาด 7 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้ ซึ่งมีขนาดประมาณ 0.5-1.4 กิโลดาลตัน ขนาดที่โปรตีนเป้าหมาย p16INK4a และ TOP2A ซึ่งมีขนาด 16 กิโลดาลตัน และ 170 กิโลดาลตันตามลำดับซึ่งเปปไทด์มีขนาดเล็กกว่าโปรตีนเป้าหมายตั้งแต่ 32-120 เท่า ดังนั้นเพื่อให้ผลการจำลองรูปแบบการจับกับของเปปไทด์ที่ได้กับโปรตีนเป้าหมายมีความใกล้เคียงกับรูปแบบที่สามารถเกิดในธรรมชาติมากที่สุดสำหรับโปรตีนเป้าหมาย p16INK4a เนื่องจากมีโปรตีนคู่ปฏิริยาตามธรรมชาติ ได้แก่ โปรตีน CDK4/6 จึงได้นำเปปไทด์ที่ได้จากการทดลองมีจัดเรียงรูปแบบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ผิว CDK4/6 ตรงตำแหน่งเกิดปฏิริยาจับกับ p16INK4a ซึ่งได้แบบจำลองตามที่แสดงไว้ในผลการทดลอง อย่างไรก็ตามสำหรับเอนไซม์ TOP4A เมื่อพิจารณาจากโครงสร้าง 3 มิติ ของรูปแบบการจับกับเอนไซม์ TOP2A ของเปปไทด์ทั้ง 4 เส้นที่คัดเลือกได้ตรงตำแหน่งถูกดปฏิริยาจับกับ DNA ของเอนไซม์ พบว่าค่าพลังงานการจับกับเอนไซม์ของเปปไทด์ TOP2A_2 "WSTTNVR" ให้ค่าพลังงานดีที่สุด ขณะที่เปปไทด์ TOP2A_1 "NERALTL" ให้ค่าพลังงานลดลงจากค่าพลังงานที่คำนวณได้จากแบบโครงสร้างของเปปไทด์ TOP2A_1 ที่จับกันอย่างอิสระกับเอนไซม์ TOP2A แสดงให้เห็นว่าแม้ผลการคัดเลือกเปปไทด์จากการทดลองกับการคำนวณค่าพลังงานจากแรงต่างๆ ที่จับกับโปรตีนเป้าหมายเมื่อใช้โครงสร้างที่ปล่อยให้มีการจับอย่างอิสระ จะให้ผลสอดคล้องกันโดยแสดงว่าเปปไทด์ TOP2A_1 "NERALTL" สามารถจับกับเอนไซม์ TOP2A ได้ดีที่สุด ซึ่งหากต้องการดัดแปลงเปปไทด์ที่ติดฉลากเปปไทด์ด้วยยาหรือสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เพื่อนำไปใช้ในการขนส่งยาหรือสารนำสัญญาณสำหรับตรวจคัดกรองหรือวินิจฉัย เปปไทด์ TOP2A_1 "NERALTL" จะมีความเหมาะสมที่สุด แต่หากจะพิจารณานำเปปไทด์ไปใช้ในการ

ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ TOP2A โดยการแย่งจับกับ DNA ควรพิจารณานำเปปไทด์ TOP2A_2 "WSTTNVR" มาทดสอบ ซึ่งในกระบวนการศึกษาทดสอบการนำเปปไทด์ TOP2A_1 "NERALTL" มาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ TOP2A อาจทำได้แต่อาจจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ใช้เพื่อให้ปริมาณความเข้มข้นเพียงพอที่จะเหลือจับบริเวณที่จับกับ DNA ของเอนไซม์ เนื่องจากเปปไทด์ส่วนหนึ่งจะจับบริเวณอื่นๆ ของเอนไซม์ได้ดีกว่า

3. การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำอนุภาคฟาจจับจำเพาะไปใช้ในงานตรวจรักษาระดับโมเลกุลโดยใช้ อนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16INK4a เป็นโมเลกุลต้นแบบ

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำผลผลิตอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองหรือใช้ยืนยันผลตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ผิดปกติ แม้ว่าจุดเด่นที่สำคัญของการพัฒนาเปปไทด์สายสั้นๆ สำคัญการตรวจจับเซลล์มะเร็งมักเป็นการประยุกต์ใช้ในงานตรวจรักษาในร่างกายผู้ป่วย จากคุณสมบัติเรื่องขนาดและความปลอดภัยในการใช้งาน อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้อนุภาคฟาจทั้งอนุภาคในงานตรวจวินิจฉัยก็มีจุดเด่นหลายประการดังที่ได้อภิปรายและแสดงให้เห็นในการทดลองมาก่อนแล้ว เช่น การใช้อนุภาคช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการติดฉลากโมเลกุลตรวจจับหรือสารเรืองแสง, อนุภาคที่มีสารพันธุกรรมอยู่มีประโยชน์ในการติดตามศึกษา พัฒนาเปลี่ยนแปลง หรือเพิ่มจำนวนได้ในราคาต้นทุนประหยัด จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคฟาจสามารถใช้ในการตรวจแยกเซลล์ได้ดีหากผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม นอกจากนี้ผลการทดลองในส่วนของการเปรียบเทียบการใช้งานอนุภาคฟาจแสดงเปปไทด์จับจำเพาะทั้งอนุภาคกับการใช้เปปไทด์สังเคราะห์ติดฉลากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในการย้อมเซลล์สดที่ไม่ผ่านกระบวนการตรึงหรือเปิดผิวเซลล์ ยังพบว่าเปปไทด์สังเคราะห์สามารถให้สัญญาณตรวจจับเซลล์มะเร็งได้ต่างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญโดยใช้เวลาย้อมเซลล์ทั้งกระบวนการเพียง 5 นาที แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการดัดแปลงนำเปปไทด์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองในตัวอย่างจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นพบลำดับเปปไทด์จับจำเพาะต่อการตรวจหามะเร็งปากมดลูกจากโครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นในส่วนของการศึกษาหาลำดับเปปไทด์จับจำเพาะ ก็จะนำผลการศึกษาไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติที่เหมาะสมกับงานนั้นๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Jemal A., Bray F, Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69-90.
2. WHO. Epidemiological status of cervical cancer. Cervical cancer screening in developing countries : report of a WHO consultation. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2002. p. 3-4.
3. Sankaranarayanan R, Budukh AM, Rajkumar R. Effective screening programmes for cervical cancer in low- and middle-income developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*. 2001;79:954-62.
4. Srivatanakul P, Attasara P. Cancer in Thailand. Kluhuprema T, Srivatanakul P, Attasara P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y, editors. Bangkok: National cancer institute; 2000.
5. Attasara P, Buasom R. Hospital-based cancer registry 2009. Attasara P, Buasom R, editors. Bangkok: Information Technology Division National Cancer Institute; 2010.
6. Ceballos KM, Chapman W, Daya D, Julian JA, Lytwyn A, McLachlin CM, et al. Reproducibility of the histological diagnosis of cervical dysplasia among pathologists from 4 continents. *Int J Gynecol Pathol*. 2008 Jan;27(1):101-7.
7. Jeronimo J, Massad LS, Castle PE, Wacholder S, Schiffman M. Interobserver agreement in the evaluation of digitized cervical images. *Obstet Gynecol*. 2007 Oct;110(4):833-40.
8. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA*. 2001 Mar 21;285(11):1500-5.
9. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute*. [Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1995 Jun 7;87(11):796-802.
10. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Wentzensen N, Gravitt PE. Human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Jul;19(7):1675-81.
11. Bryan JT, Taddeo F, Skulsky D, Jansen KU, Frain BM, Qadadri B, et al. Detection of specific human papillomavirus types in paraffin-embedded sections of cervical carcinomas. *J Med Virol*. 2006 Jan;78(1):117-24.
12. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jan 13;88(1):63-73.
13. Oliveira LH, Rosa ML, Pereira CR, Vasconcelos GA, Silva RA, Barrese TZ, et al. Human papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006 Sep-Oct;48(5):279-85.
14. Lazcano-Ponce E, Lorincz AT, Salmeron J, Fernandez I, Cruz A, Hernandez P, et al. A pilot study of HPV DNA and cytology testing in 50,159 women in the routine Mexican Social Security Program. *Cancer Causes Control*. 2010 Jul 9;21(10):1693-700.
15. Zhang WY, Xue YZ, Chen M, Han L, Luo M. Prevalence of high-risk human papillomavirus infection in different cervical lesion among organized health-examination women in Shanghai, China. *Chin Med J (Engl)*. 2008 Aug 20;121(16):1578-82.
16. Dane C, Batmaz G, Dane B, Cetin A. Screening properties of human papillomavirus testing for predicting cervical intraepithelial neoplasia in atypical squamous cells of undetermined

- significance and low-grade squamous intraepithelial lesion smears: a prospective study. *Ann Diagn Pathol.* 2009 Apr;13(2):73-7.
17. Saraiya M, Berkowitz Z, Yabroff KR, Wideroff L, Kobrin S, Benard V. Cervical Cancer Screening With Both Human Papillomavirus and Papanicolaou Testing vs Papanicolaou Testing Alone: What Screening Intervals Are Physicians Recommending? *Arch Intern Med.* June 14, 2010;170(11):977-86.
 18. Mandelblatt JS, Lawrence WF, Womack SM, Jacobson D, Yi B, Hwang YT, et al. Benefits and costs of using HPV testing to screen for cervical cancer. *JAMA.* 2002 May 8;287(18):2372-81.
 19. Carreras R, Alameda F, Mancebo G, Garcia-Moreno P, Marinosa ML, Costa C, et al. A study of Ki-67, c-erbB2 and cyclin D-1 expression in CIN-I, CIN-III and squamous cell carcinoma of the cervix. *Histol Histopathol.* 2007 Jun;22(6):587-92.
 20. Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA, Kjellevoid KH, Fiane B, Lovslett K, et al. Ki67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol.* 2004;26(1-2):13-20.
 21. Carrilho C, Gouveia P, Cantel M, Alberto M, Buane L, David L. Characterization of human papillomavirus infection, P53 and Ki-67 expression in cervix cancer of Mozambican women. *Pathol Res Pract.* 2003;199(5):303-11.
 22. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Up-regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is closely associated with high-risk human papillomavirus (HPV) and progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but does not predict disease outcome in cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007 Feb;130(2):223-31.
 23. Goel MM, Mehrotra A, Singh U, Gupta HP, Misra JS. MIB-1 and PCNA immunostaining as a diagnostic adjunct to cervical Pap smear. *Diagn Cytopathol.* 2005 Jul;33(1):15-9.
 24. Tjalma W, Weyler J, Pollefliet C, Bogers J, Van Marck E, van Dam P, et al. The evaluation of proliferative activity in CIN III and microinvasive cervical cancer and its role in recurrence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 Feb;94(2):270-5.
 25. Tan G, Norlatiffah S, Sharifah N, Razmin G, Shiran M, Hatta A, et al. Immunohistochemical study of p16 INK4A and survivin expressions in cervical squamous neoplasm. (Original Article)(Report). *Indian Journal of Pathology and Microbiology.* 2010;53(1):1.
 26. Gupta R, Srinivasan R, Nijhawan R, Suri V, Uppal R. Protein p 16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010 Jan-Mar;53(1):7-11.
 27. Redman R, Rufforny I, Liu C, Wilkinson EJ, Massoll NA. The utility of p16(Ink4a) in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. *Arch Pathol Lab Med.* 2008 May;132(5):795-9.
 28. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quinto L, et al. p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol.* 2009 Jan;28(1):90-7.
 29. Dellas A, Schultheiss E, Almendral AC, Torhost J, Gudat F. Expression of CD44 and variant isoforms in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 1996 Aug;62(2):218-25.
 30. Kohlberger PD, Kieback DG, Bancher D, Stickeler E, Heinzl H, Gitsch G, et al. Immunohistochemical detection of CD44 splice variant expression in premalignant lesions of the cervix and benign cervical epithelium. *Gynecol Oncol.* 1997 Aug;66(2):227-32.
 31. Hammes LS, Tekmal RR, Naud P, Edelweiss MI, Kirma N, Valente PT, et al. Up-regulation of VEGF, c-fms and COX-2 expression correlates with severity of cervical cancer precursor (CIN) lesions and invasive disease. *Gynecol Oncol.* 2008 Sep;110(3):445-51.
 32. Yim E-K, Park J-S. Biomarkers in cervical cancer. *Biomarker Insights.* 2007;1:215-25.
 33. Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, et al. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 8;95(25):14932-7.

34. Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A, et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*. 2005 Apr;37(2):112-24.
35. Wang JL, Andersson S, Li X, Hellstrom AC, Auer G, Angstrom T, et al. p16INK4a and laminin-5gamma2 chain expression during the progression of cervical neoplasia. *Acta Oncol*. 2006;45(6):676-84.
36. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Mitsuya T. Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature. *Gynecol Oncol*. 2008 Mar;108(3):598-602.
37. Kong CS, Beck AH, Longacre TA. A panel of 3 markers including p16, ProExC, or HPV ISH is optimal for distinguishing between primary endometrial and endocervical adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2010 Jul;34(7):915-26.
38. Kelly D, Kincaid E, Fansler Z, Rosenthal DL, DP. C. Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions from cytologic samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx C). *Cancer*. 2006 Dec 25;108(6):494-500.
39. Tambouret RH, Misdraji J, Wilbur DC. Longitudinal clinical evaluation of a novel antibody cocktail for detection of high-grade squamous intraepithelial lesions on cervical cytology specimens. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Jun;132(6):918-25.
40. Dancey G, Begent R, Meyer T. Imaging in targeted delivery of therapy to cancer. *Targeted Oncology*. 2009;4(3):201-17.
41. Manning HC, Merchant NB, Foutch AC, Virostko JM, Wyatt SK, Shah C, et al. Molecular Imaging of Therapeutic Response to Epidermal Growth Factor Receptor Blockade in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008 November 15, 2008;14(22):7413-22.
42. Sharkey RM, Goldenberg DM. Novel radioimmunopharmaceuticals for cancer imaging and therapy. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008;9(12):1302-16.
43. Susan S. Committee on methods of producing monoclonal antibodies Iflar, National research council. Monoclonal antibody production. . Vaupel NG, editor. Washington, DC: National academy press; 1999.
44. Birch JR, Racher AJ. Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006 Aug 7;58(5-6):671-85.
45. Gödia F, Fussenegger M, Zeng W, Puchacz E, Heineken K, Raymond I, et al. Generation of Recombinant Antibody Manufacturing Cell Lines Using Cell-Cell Fusion. *Animal Cell Technology Meets Genomics: Springer Netherlands*; 2005. p. 483-8.
46. Khemthongcharoen N, Jolivot R, Rattanavarin S, Piyawattanametha W. Advances in imaging probes and optical microendoscopic imaging techniques for early in vivo cancer assessment. *Advanced Drug Delivery Reviews*. (0).
47. Azzazy HM, Highsmith WE, Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*. 2002 Sep;35(6):425-45.
48. Marciano DK, Russel M, Simon SM. Assembling filamentous phage occlude pIV channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9359-64.
49. Russel M, Linderoth NA, Sali A. Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. *Gene*. 1997 Jun 11;192(1):23-32.
50. Mullis KB. Recombinant DNA technology and molecular cloning. In: Allison LA, editor. *Fundamental Molecular Biology*. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2007. p. 180-231.
51. Arap MA. Phage display technology - Application and innovations. *Genetics and Molecular Biology*. 2005;28(1):1-9.
52. Vendruscolo M, Paci E, Dobson CM, Karplus M. Three key residues form a critical contact network in a protein folding transition state. *Nature*. 2001 Feb 1;409(6820):641-5.

53. Bremnes T, Lauvrak V, Lindqvist B, Bakke O. Selection of phage displayed peptides from a random 10-mer library recognising a peptide target. *Immunotechnology*. 1998 Jun;4(1):21-8.
54. Stephen CW, Helminen P, Lane DP. Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol*. 1995 Apr 21;248(1):58-78.
55. Whitney M, Crisp JL, Olson ES, Aguilera TA, Gross LA, Ellies LG, et al. Parallel in vivo and in vitro selection using phage display identifies protease-dependent tumor-targeting peptides. *J Biol Chem*. 2010 Jul 16;285(29):22532-41.
56. Santamaria H, Manoutcharian K, Rocha L, Gonzalez E, Acero G, Govezensky T, et al. Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from human papillomavirus-infected patients using phage display libraries. *Clin Immunol*. 2001 Dec;101(3):296-302.
57. Szardenings M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res*. 2003;23(4):307-49.
58. Du B, Han H, Wang Z, Kuang L, Wang L, Yu L, et al. targeted drug delivery to hepatocarcinoma in vivo by phage-displayed specific binding peptide. *Mol Cancer Res*. 2010 Feb;8(2):135-44.
59. Xie HL, Wang Z, Cui SJ, Zhang CF, Cui YD. The epitope of the VP1 protein of porcine parvovirus. *Virol J*. 2010 Jul 16;7(1):161.
60. Dona MG, Giorgi C, Accardi L. Characterization of antibodies in single-chain format against the E7 oncoprotein of the human papillomavirus type 16 and their improvement by mutagenesis. *BMC Cancer*. 2007;7:25.
61. Fujii T, Austin D, Guo D, Srimatkandada S, Wang T, Kubushiro K, et al. Peptides inhibitory for the transcriptional regulatory function of human papillomavirus E2. *Clin Cancer Res*. 2003 Nov 1;9(14):5423-8.
62. Robinson P., Stuber D., Deryckere F., Tedbury P., Lagrange M., G. O. Identification using phage display of peptides promoting targeting and internalization into HPV-transformed cell lines. *J Mol Recognit*. 2005 Mar-Apr;18(2):175-82.
63. M. D. Abramoff, P. J. Magalhaes, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 2004;11(7):36-42.
64. Ru B, Huang J, Dai P, Li S, Xia Z, Ding H, et al. MimoDB: A new repository for mimotope data derived from phage display technology. *Molecules*. 2010;15(11):8279-88.
65. Huang J, Ru B, Zhu P, Nie F, Yang J, Wang X, et al. MimoDB 2.0: a mimotope database and beyond. *Nucleic Acids Research*.40(D1):D271-D7.

ภาคผนวก 1

ผลงานที่เกี่ยวข้องและผลงานที่อยู่ระหว่างการ

ดำเนินการ



8th Asian Congress for Microcirculation

"Microvascular Biology and Bioengineering towards Regenerative Medicine"

26-28 October 2011, Bangkok, Thailand



8th Asian Congress for Microcirculation

Editors

S.C. Bunnag, P. Futrakul and S. Patumraj

MEDIMOND
INTERNATIONAL PROCEEDINGS

Acridine orange staining for cell analysis

**Khemthongcharoen N.^{*}, Ruangpracha A.^{*}, Sarapukdee P.^{*},
Wongsawatsuriyha P.^{*}, Beadyananda F.^{*}, Piyawattanametha W.^{**}**

** National Electronics and Computer Technology Center, Pathumthani, Thailand.*

*** Advanced Imaging Research Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

Summary

This work demonstrated the potential use of an acridine orange (AO) dye for nuclear to cytoplasmic (N/C) ratio analysis. The interaction of the AO dye to DNA and RNA emitted the green fluorescence in the cell nucleuses and red fluorescence around the cytoplasmic area by using a 488 nm excitation light source. Average of green to red fluorescence ratio of the HUF and Caski cells could represent an approximate N/C ratio which is calculated by semi-automated cells analysis software. Results from this study demonstrated the possibility of using the low cost AO dye to indirectly measure the N/C ratio in cell for abnormal cell diagnosis and classification.

Introduction

Acridine orange (AO) is a well known inexpensive fluorescence dye using in both laboratory investigation and research applications. Due to high sensitivity of the AO dye, it has been widely used for rapid screening of biological samples having very low contamination in microorganisms such as bacterial cells in cerebrospinal fluid (1), and malaria in the proteinaceous blood smear (2). Furthermore, the AO dye has been mostly used as a low cost fluorescence dye for cell viability observation (3), cell cycle determination (4), and cell physiology study (5). Neutral form of the AO monomers are slightly cationic and lipid membrane permeable (6). Fluorescence profiles of the AO dye could be differently generated depending on its chemical structure and the type of cellular molecule interaction (7). As a monomeric form, the AO dye has the maximum spectral absorption at 492 nm and emitting the green fluorescence light at around 530 nm while the maximum spectral emission of its dimeric or oligomeric were red-shifted to around 655 nm with an absorbance spectral maxima at 465 nm. Molecular interactions of AO dye to DNA and RNA relying on intercalation and electrostatic attraction can also generate the green and red fluorescence emission, respectively. The ratio of green to red fluorescence of the AO dye has been widely

used to indicate the acidic compartments and organelles located in the cells. Unlike those previous works, we proposed to apply green to red fluorescence ratio for rapid and reproducible analysis of the Nuclear-Cytoplasmic (N/C) ratio which is one of the key parameters for abnormal cell diagnosis and classification.

Materials and Methods

Human uterine fibroblast (HUF) and human cervix carcinoma cell lines (Caski) were grown on sterile cover glasses immersing in the fibroblast growth medium (PromoCell) and Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL) with the suitable supplements, respectively. Media were appropriately replaced in order to maintain the cell viability before usage. For fluorescence staining, the cover glasses overlaid with either HUF or Caski cells were quickly rinsed for a few times with a phosphate buffer saline (PBS) solution with pH 7.2. Cells were fixed for 3 minutes in 10% formaldehyde before immersing in 60 $\mu\text{g/ml}$ of the AO dye (Sigma-Aldrich) in PBS pH 7.2 for 3 minutes. The cover glasses were thoroughly rinsed for several times, and then the cell surfaces were permanently mounted on the microscope slide with a drop of glycerol. Cell images were captured under a confocal microscope (Nikon C1 model) with a 488 nm excitation light source. Both Green and red fluorescence channels were used to read out the fluorescence signals. Green and red merging images were used for the averaging calculation of green to red fluorescence ratio. All cells appearing in the images were also calculated for their N/C ratio by semi-automated cells analysis software.

Results

Cellular compartments performing by AO dye staining

Figure 1 illustrates the green, red and two color merging images at the nuclear compartment focusing plane of 1st (1a-c) and 7th (1d-f) day of the HUF cell growth with the AO dye staining. Areas of the cell performing by red fluorescence (1b and 1e) are slightly extended comparing to the green fluorescence (1a and 1d) images. The nucleolar contents of HUF growing at 7th day become denser than the 1st day cell growing. All of green, red and two color merging images in each day of cell proliferation demonstrate the same nucleolar changing pattern.

Average of green to red fluorescence ratio for N/C ratio analysis

Two different cell lines including HUF and Caski represented the eukaryotic cell with less and high N/C ratio characterization, respectively. Nuclear-Cytoplasmic ratio of each cells in the images were cropped and calculated by a semi-automated software, ImageJ 1.44 as demonstrated in figure 2a and b. Average N/C ratio of HUF cells and average of green to red fluorescence ratio from each images, $n=3$, were calculated displaying in the bar-line combination chart as shown in figure 2c. The correlated values between green to red ratio and N/C ratio of the images indicate the possibility to apply the green to red fluorescence ratio parameter as a rapid and reproducible technique for an indirect measurement of the N/C ratio analysis.

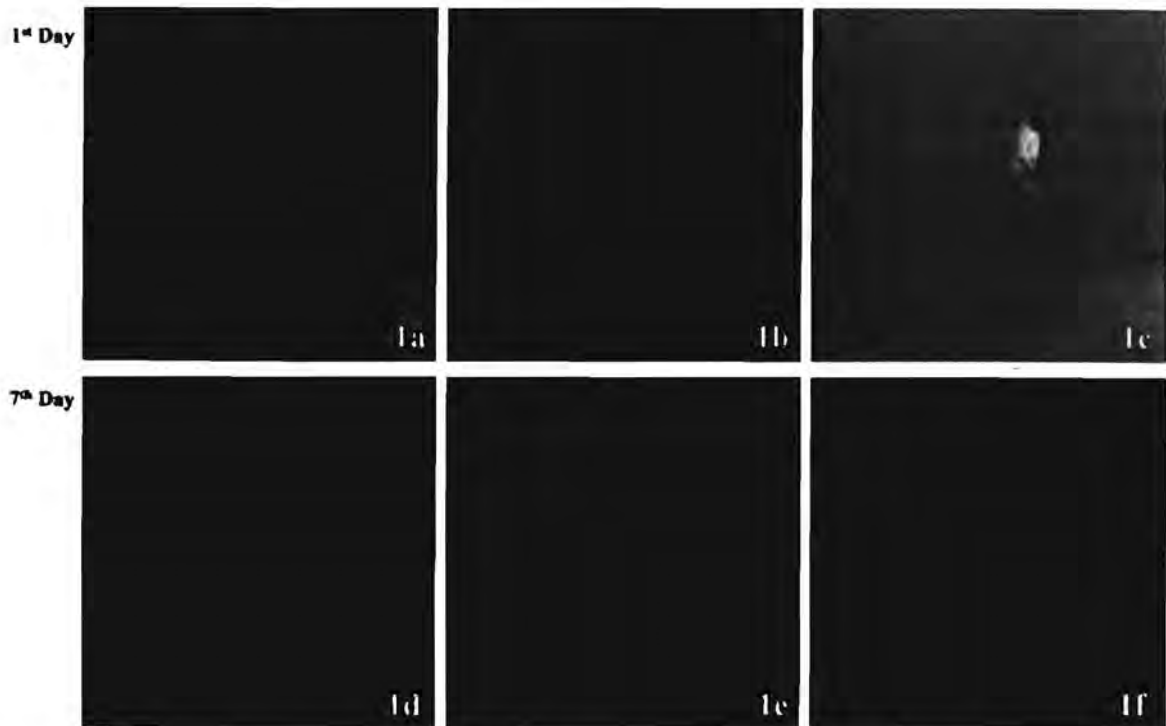


Figure 1: Fluorescence images at the cell nucleus focusing imaging plane (400x) of HUF cell staining with the AO dye at 1st (1a-c) and 7th (1d-f) day growing. Green (1a and 1d), red (1b and 1e), and color merge fluorescence images (1c and 1f) were acquired with 488 nm excitation laser light source.

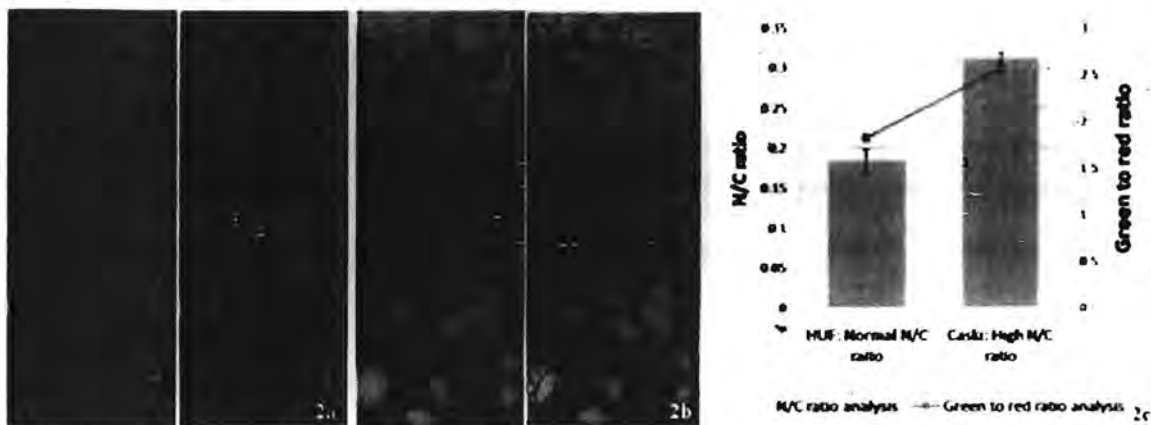


Figure 2: Fluorescence images of HUF (2a) and Caski (2b) cells show the green fluorescence is mostly located in the cell nuclei while the red fluorescence is located around the cytoplasmic area. All cells in the images were cropped and calculated for the N/C ratio of the cells. Both averaging number of the N/C ratio and green to red fluorescence ratio from each image, $n=3$, were displayed in the bar-line combination (2c).

Conclusions

This study demonstrated the application of the AO dye staining for cell analysis. Cell compartments could be visualized by using an inexpensive AO dye staining. Moreover, agreement between the ratios of green to red fluorescence with the N/C

ratio of the cells indicates the possibility to use the AO dye as a rapid and reproducible method for an indirect measurement of N/C ratio which is one of important parameters for abnormal cell diagnosis and classification.

Acknowledgement

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission.

References

1. Fazii P, Ciancaglini E, Riario Sforza G. Differential fluorescent staining method for detection of bacteria in blood cultures, cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 21, 373-378, 2002.
2. Nandwani S, Mathur M, Rawat S. Evaluation of the direct acridine orange staining method and Q.B.C. and test for diagnosis of malaria in Delhi, India. *J Commun Dis.*, 35, 279-282, 2003.
3. Mascotti K, McCullough J, Burger SR. HPC viability measurement: Trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion.*, 40, 693-696, 2000.
4. Gonzalez K, McVey S, Cunnick J, Udovichenko IP, Takemoto DJ. Acridine orange differential staining of total DNA and RNA in normal sand galactosemic lens epithelial cells in culture using flow cytometry. *Curr Eye Res.*, 14, 269-273, 1995.
5. Melnik VI, Bikbulatova LS, Gulyaeva NV, Bazyan AS. Synaptic vesicle acidification and exocytosis studied with acridine orange fluorescence in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res.*, 26, 549-554, 2001.
6. Han J, Burgess K. Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chem Rev.*, 110, 2709-2728, 2010.
7. Rigler R. Fluorescence and single molecule analysis in cell biology. *Biochem Biophys Res Commun.*, 396, 170-175, 2010.

Phage Display Specific p16INK4a Binding Peptide for *Ex Vivo* Cancer Cells Imaging

Numfon Khemthongcharoen¹, Athisake Ruangpracha¹, and Wibool Piyawattanametha^{1,2}

¹ Photonics Technology Laboratory (PTL), National Electronics and Computer Technology Center, Pathumthani, Thailand

² Advanced Imaging Research Center (AIRC), Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Abstract—This work demonstrates the application of phage display technology for molecular diagnosis utility. We propose a novel phage-displayed peptide which specifically bind to p16INK4a, a cervical cancer biomarker. Whole phage particles were developed as a molecular tracer for *ex vivo* cells imaging technique. Increase in specific phages binding to p16INK4a overexpressed cells is improved when the cells were initially permeabilized in order to make phage penetrable pores on the target cell membranes. We also proved that fluorescence signal could be obviously enhanced due to tremendous interaction sites for fluorescence dye labeling available on capsid proteins around phage particles. Evaluation of p16INK4a binding phages to discriminate between p16INK4a overexpressed cervical cancer cells versus normal fibroblast cells demonstrated higher fluorescence intensity of 2.5 fold over native phages.

Index Terms—Phage display, p16^{INK4a}, cervical cancer, cell imaging and peptide

INTRODUCTION

Phage display technology is a versatile biological tool for protein binding study, bio-nanotechnology applications and biomarker scanning [1, 2]. Phage display peptide library is a common tool used for specific peptide screening on target protein to identify peptide sequence that can bind to specifically to target protein [3,4]. Specific peptide sequence obtained from phage display screening have been widely developed for using in both molecular diagnosis and therapeutics utilities [5, 6]. Specific peptide tracers obtained from phage display screening have been accepted as specific, tiny, low immunogenic, tissue penetrable and safety molecular tracer probes for *in vivo* use. However, several previous studies claimed that whole phage particle provides many advantages for molecular diagnosis and therapeutics applications [7,8]. Phage particles consisted of capsid proteins coated genetic materials (Fig. 1) are endlessly reproducible via a standard and inexpensive bacterial cell culture. Capsid proteins around phage particle also provide vast interaction sites for fluorescence molecule labeling for signal enhancing for *ex vivo* imaging purpose [9]. In this study, we present the application of phage display technology for specific phage-displayed binding peptide identification. One of the most well known cervical cancer biomarker, p16INK4a (p16), was used as a target protein for specific binding phage development. Fluorescence-labeled specific p16 binding phages were studied for their performance in cell penetrability, fluorescence dye

capturing, specific binding to p16-overexpressed cancer cells in comparison to conventional p16 antibody staining, and their normal-cancer cell discriminated power in comparison to native phage particles (phages without peptide display).

MATERIALS AND METHODS

A. Specific phage-displayed p16 binding peptide screening (Biopanning assay)

Phage display of heptamer random peptide library (New England Biolabs[®] Inc.) was pre-adsorbed on bovine serum albumins (BSA) coated plastic plates to eliminate nonspecific binding phages before three rounds screening on p16 protein coated surfaces. Unbound phages were wash out, and then p16 bound phages were eluted by 0.2 M glycine-HCl (10 mM HCl buffered to pH 2.2 with glycine). Amount of the input phages and eluted phages (output phages) were counted by phage titration assay. Ratio of input to output phages were calculated to indicate the specific selection of p16 binding phage acquired from each phage screening round. Individual phage colonies were picked to perform DNA sequencing. The most repetitive binding peptide display was assigned as a specific phage-displayed p16 binding peptide tracer. Then, the specific p16 binding phages were labeled with a fluorescence dye, Fluorescein Isothiocyanate (FITC), on their surfaces for using in further cell staining experiments as described in Fig. 1.

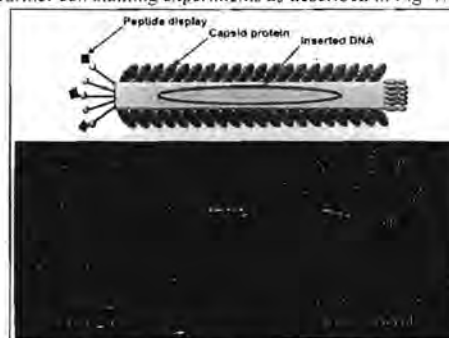


Fig. 1 Schematic demonstrates structure of phage-displayed peptide particle consisting of capsid proteins coated genetic materials (DNA). Genetic engineering method allows phages to display specific binding peptide on its surface. Fluorescence labeling on capsid proteins of phage-displayed specific binding peptides enables phage particles to be used as molecular tracers for cancer cells detection via optical imaging.

B. Cells staining efficiency of p16 binding phage versus p16 specific antibody

Staining efficiency of p16 binding phages on p16 overexpressed cancer cells, CaSki, was compared to that of p16 specific antibody by flow cytometry method. CaSki cells suspension was fixed for 5 minutes by methanol, spun down for cell sediment collection. Cells were resuspended in PBS buffer before dividing into two parts for non-permeabilized and permeabilized cell preparation. For permeabilized cells sample, cell suspension was incubated with 0.1% tween 20 for 1 hour before spun down to collect cell sediment, resuspended and incubated in BSA blocking buffer for 30 minutes. Non-permeabilized cells sample was prepared by 30 minutes cell incubation with BSA blocking buffer. Each of BSA blocking cell suspension (permeabilized and non-permeabilized cells) were divided into two parts for interacting with 10^{11} FITC-labeled binding phage, FITC-labeled native phage and 1:500 mouse anti-human p16 antibody (Abcam®, ab54210) for 1 hour. Cells suspensions were centrifuged to collect CaSki cells sediment and resuspended in PBS buffer. Antibody staining cells suspension then was incubated with DyLight®550-labeled goat polyclonal secondary antibody to mouse IgG for 1 hour. Cells suspensions were centrifuged to collect the cells sediment and resuspended in PBS buffer for flow cytometry analysis using FITC and PE-A filter sets of BD LSR II instrument. BD Biosciences, USA, for FITC and DyLight®550 signal measurement, respectively.

C. Evaluation of phage-displayed peptide "SHSLHH" binding to p16 overexpressed cells by flow cytometer

Specific absorption ability of fluorescence-labeled p16 binding phages into CaSki cell was evaluated by flow cytometry analysis. CaSki cells suspension was fixed for permeabilized and non-permeabilized cells preparation as previously described in B. Both permeabilized and non-permeabilized cells were incubated with BSA blocking buffer for 30 minutes to block nonspecific probe interactions. Each of BSA blocking cell suspension (permeabilized and non-permeabilized cells) were divided into two parts for interacting with 10^{10} FITC-labeled phage-displayed p16 binding peptide and FITC-labeled native phages. The mixtures were centrifuged to collect CaSki cells sediment. Cells were resuspended in PBS buffer for flow cytometry analysis.

D. Cell penetrability of phage particles for cell imaging analysis

Since p16 is known as an intracellular protein, potential application of whole phage particle to be used as a molecular tracer for *ex vivo* cell imaging was evaluated by cell penetrability study. CaSki cell suspension was fixed and permeabilized at 30, 60, 90, and 120 minutes. Various periods of permeabilized and non-permeabilized cells were incubated for 1 hour with 10^{10} pfu FITC-labeled p16 binding phages and native phages, respectively. Mean fluorescence intensities (MFI) of CaSki cells stained by p16 binding phages and native phages at different permeabilization periods changing

from MFI of non-permeabilized stained cells were plotted in line graph as shown in Fig. 5.

E. Performance of whole phage particle use on fluorescence signal enhancement ability

In contrast to specific peptide tracer or an antibody molecule, phage display particles provide tremendous chemical interaction sites for fluorescence molecules labeling on their capsid protein coating surface. In case of whole phage particles use as a molecular tracer, increasing of the fluorescence molecules labeling on phage particles should enhance fluorescence signal for cells staining. To prove this hypothesis, difference amount of phage particles use in fluorescence labeling method were varied from 10^1 - 10^3 pfu. Difference amount of phage particles were suspended in 250 µg/ml FITC dye and labeled phages were purified by polyethylene glycol (PEG) precipitation. Fluorescence intensities of FITC-labeled phage suspensions were measured by fluorescence spectrometer to quantify the labeling efficiency as amount of FITC molecules labeling per phage particle. Same amount of phage particles with different FITC-labeling molecules per phage were incubated with CaSki cells for flow cytometry analysis as described previously in C.

F. Evaluation of specific p16 binding phages on cancer cell discrimination by *ex vivo* cell imaging analysis

Finally, specific p16 binding phages were evaluated for their ability to discriminate p16 overexpressed cervical cancer cells from normal fibroblast cells by cells imaging analysis. Human Uterine Fibroblast, HUF, and Cervical cancer cell line, CaSki, represent as normal fibroblast cell and p16 overexpressed cancer cell, respectively. Cells were grown on sterile cover slips immersing in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum under 37°C and sustained in 5% CO₂ cell culturing condition. Cells on coverslips were fixed for 5 minutes by methanol, permeabilized for 10 minutes by 0.25% Triton X-100 and blocked for 30 minutes by 1% BSA in PBS buffer. Cells were incubated with 10^1 pfu fluorescent-labeled p16 binding phages and native phages for 1 hour. Nonspecific binding phages were thoroughly rinsed out, before immersing in 1 µg/ml a nuclear staining dye, DAPI, for 30 seconds at room temperature. Fixed cells were thoroughly rinsed, and then the cell surfaces were permanently mounted on the microscope slide with glycerol. Cell images were taken by confocal fluorescence microscope (Nikon C1 model) using 408, and 488 laser sources to perform DAPI, FITC-labeled phages with blue and green emission filters in the same cells simultaneously. Cell images analysis were processed using the ImageJ 1.44 program [10]. Cell images were arbitrarily cropped so that each sample had approximately 200 cells (based on the observed nuclear staining). Then, fluorescence signal intensities were calculated as the mean grayscale level (using 8-bit grayscale image, black (0) – white (255)). Relative fluorescence intensities between HUF and CaSki cells among the phage staining groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA).

statistical calculation with 98% confidence intervals to compare their ability in cancer cell discrimination

RESULTS AND DISCUSSIONS

A. Specific phage-displayed p16 binding peptide screening (Biopanning assay)

Input to output ratio of phage particles obtained from each round of phage display library screening on p16 coated surface is shown in Fig. 2. Increasing of input to output ratios of phage particles from each round of phage screening on p16 coated plate indicate specific selection of the biopanning assay which can be increased by adding phage screening round on p16 surface. Individual phage colonies were picked to perform DNA sequencing in which peptide "SHSLLHH" was found as the most repetitive p16 binding peptide expressed on phage particles. Phage-displayed peptide "SHSLLHH" would be assigned as a p16 specific binding phage and labeled with fluorescence dye, FITC, for using in the further specific phage evaluation experiments.

B. Cells staining efficiency of p16 binding phage versus p16 specific antibody

Figure 3 illustrates mean fluorescence intensities (MFI) of CaSki cells stained by p16 binding phages, specific antibody and native phages changing from the baseline MFI of unstained CaSki cells. MFI of CaSki cells stained by both p16 binding phages and p16 antibody are increased when the cells are prior permeabilized for 1 hour by 0.1% tween 20. In non-permeabilized cells, p16 antibody staining exhibits the highest fluorescence signal in comparison to p16 binding phages staining. However, MFI of p16 binding phages staining on 1 hour permeabilized cells is accelerated and presents the highest fluorescence signal. Small increase of MFI in non-permeabilized cells stained by native phages due to nonspecific absorption indicates the interacted selectivity of p16 binding phages to p16 overexpressed cancer cells. This result can be concluded that cells staining efficiency of p16 binding phages is lower than p16 antibody, but it can be greatly improved by cells permeabilization procedure available in basic *in vivo* cells staining experiments.

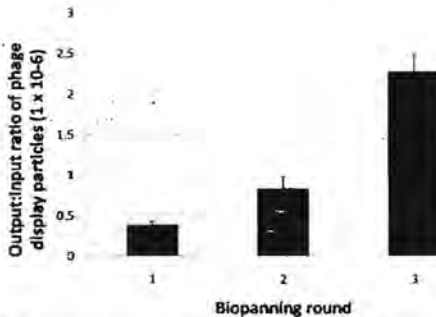


Fig. 2 Input to output ratios of phage particles from each p16INK4a scanning round indicate the specific selection of biopanning process to identify the p16 binding peptide displayed on phage surface

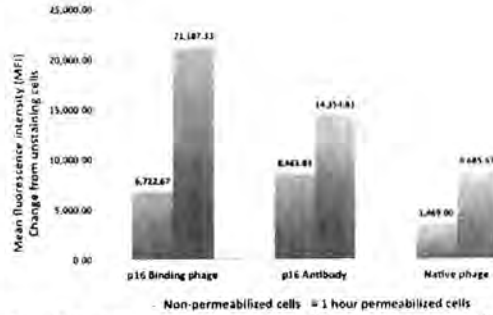


Fig. 3 Flow cytometry results show mean fluorescence intensities (MFI) of non-permeabilized (blue) and 1 hour permeabilized (red) cells stained by p16 binding phages, p16 antibody, and native phages, respectively. p16 antibody provides the highest signal for non-permeabilized cells staining. However, staining efficiency of p16 binding phages can be greatly improved by 0.1% tween 20 cells permeabilization. Small increase of fluorescence signal in permeabilized cells stained by native phages due to nonspecific absorption indicates the specific binding selection of p16 binding phages to the p16 overexpressed cancer cells.

C. Evaluation of phage-displayed peptide "SHSLLHH" binding to p16 overexpressed cells by flow cytometer

Because the limitation of flow cytometry technique in which the amount of cells suspended in buffer is only in an estimation number and non-specific binding tracer molecule couldn't be rinsed out very well from the cell suspending in the buffer, so the relative MFI of permeabilized stained cells changing from non-permeabilized cells are used to compare in this study. MFI from flow cytometry analysis in Fig. 4 show different MFI change of permeabilized CaSki cells from non-permeabilized cells (red) stained by phage p16 binding phage (blue) and native phage (green). Phage-displayed peptide "SHSLLHH" stained on permeabilized CaSki cells (blue) provides significant higher MFI change than that of native phages (green).

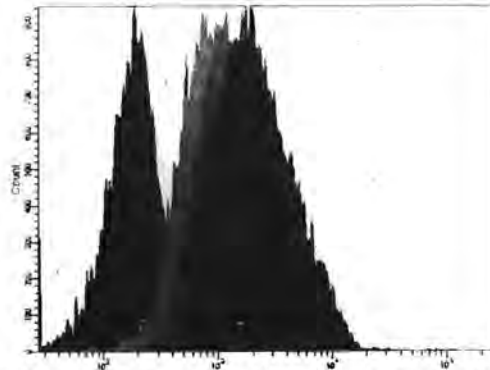


Fig. 4 Flow cytometry results show difference MFI of 1 hour permeabilized p16INK4a overexpressed cancer cells stained by phage-displayed p16INK4a binding peptide (blue), and control phages (green) compared to average MFI of non-permeabilized cells stained by phage-displayed p16INK4a binding peptide and control phages (red), and original MFI of unstained cells (gray), respectively.

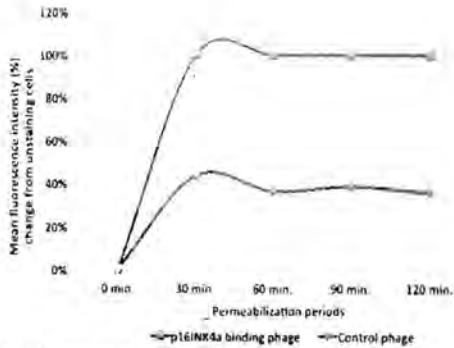


Fig 5 Percentages of MFI change in p16INK4a overexpressed staining cells at different permeabilization periods. Cells stained by phage-displayed p16INK4a (red) can be improved when the cells were permeabilized for at least 30 minutes. Control phage (blue) can be non-specifically absorbed into the cells during permeabilization, but signal changes are around 60% lower than the saturated signal of the cells staining by p16INK4a binding phages.

D. Cell penetrability of phage particles for cell imaging analysis

Cells penetrability of phage particles to CaSki cells with different permeabilization periods was shown in Fig 5. Line graph indicates that relative MFI change of CaSki cells stained by p16 binding phage particles that is accelerated increase after at least 30 minutes permeabilization in 0.1% tween 20. Relative MFI change of the cells stained by p16 binding phages are about 50% higher than the cells stained by native phages. This result indicated the potential of p16 binding phage as a molecular tracer for *ex vivo* p16 overexpressed cells detection. Cells under test need to be permeabilized for at least 30 minutes to allow specific absorption of phage particles into the target cancer cells.

E. Performance of whole phage particle use on fluorescence signal enhancement ability

Different amount of phage particles were incubated with FITC solution in phage labeling method to generate the variation of fluorescence molecules labeling on a phage particle. An inset in Fig. 5 shows quantified FITC molecules labeled on phage particles at different initiated phage using in labeling process. Then, the same amount of FITC labeled phage particles were stained on CaSki cells for flow cytometry analysis. Reducing the amount of phage particles from 10^{13} - 10^7 suspending in 250 μ g/ml FITC dye during labeling method can improve detection sensitivity when the same amount of phage particles were used for cell staining due to increment of the attached FITC molecules per one phage particle (Fig. 5). This result confirms that whole phage particles can enhance the fluorescence signal from enormous interaction sites for fluorescence dye labeling on their protein coated surface, and hence phage particles can increase the detection sensitivity in cells imaging analysis technique.

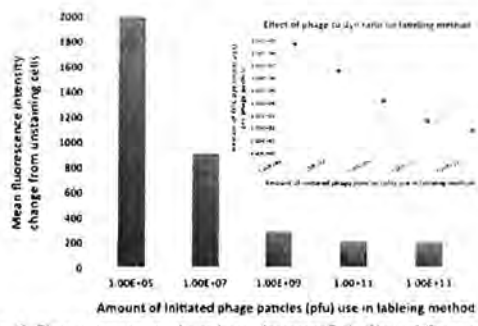


Fig 5 Flow cytometry results indicate the quantified effect of fluorescence molecules labeling per phage to evaluate staining signal enhancement. Reducing of the amounts of phage particles used in fluorescence labeling method enables more fluorescence dye attachment per phage particle (an inset) and more fluorescence signal detectable by flow cytometer.

F. Evaluation of specific p16 binding phages on cancer cell discrimination by *ex vivo* cell imaging analysis

Application of p16 binding phage particles to discriminate p16 overexpressed cancer cells from the normal cells base on *ex vivo* cells imaging analysis were evaluated. Confocal imaging analysis in Fig. 6 demonstrates significant changes in fluorescence signal between CaSki and HUF cells. Statistical analysis shows relative difference of fluorescence intensity in CaSki and HUF cells stained by p16 binding phage is significantly higher than those stained by native phage particles, 16.1 grayscale unit (98% confidence intervals, [14.6-17.5]).

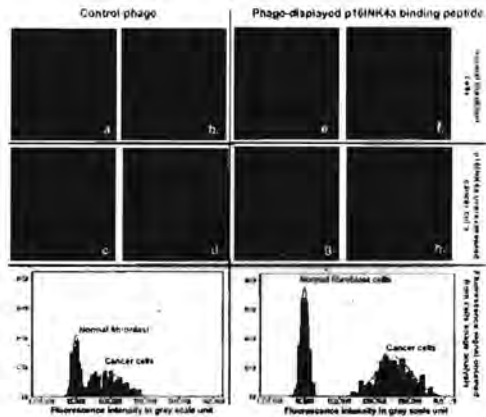


Fig 6 Confocal imaging analysis demonstrates changes in fluorescence intensity obtained from the cells stained by phage-displayed p16INK4a binding peptide (e, f, g, and h). Signal intensity is around 16 times higher than the cells stained by control phage (a, b, c, and d). The differentiation in fluorescence signal is used for p16INK4a overexpressed cervical cancer cells (c, d, g and h) and normal fibroblast cells (a, b, e, and f) discrimination.

CONCLUSIONS

This work presents an example of utilizing phage display particles as a specific tracer molecule. We propose a novel p16INK4a binding peptide for cervical and other HPV related cancers detection. Using the whole phage particle as an *in vivo* cancer imaging probe was achieved via intracellular protein detection. This genetic carried particle potentially provides many advantages over traditional molecular tracers such as particle reproducibility, various environments endurable, and image signal enhanced ability from vast surface areas available for fluorescence dye labeling.

ACKNOWLEDGMENT

This study is supported in part by grants from Government Research Budget (2012), Ratchadapiseksompotch Fund from the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University grant number RA13/54(1), Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (HR1162 and HR 11661), and Research Fund from NSTDA, Thailand (Project code P-11-01110).

REFERENCES

- [1] O. S. Seker, and H. V. Demir, "Material binding peptides for nanotechnology," in *Molecules*, vol. 16, 2011, pp. 1426-1251.
- [2] K. C. Brown, "Peptidic tumor targeting agents: The road from phage peptide selection to clinical application," in *Current Pharmaceutical Design*, vol. 16, 2010, pp. 1040-1054.
- [3] I. Accardi, M. G. Dona, P. D. Bontà, and C. Giorgi, "Intracellular anti-E7 human antibodies in single-chain format inhibit proliferation of HPV16-positive cervical carcinoma cells," in *International Journal of Cancer*, Vol. 116, 2005, pp. 564-70.
- [4] S. J. Liang, L. K. Pao, C. C. An, Y. C. Yao, C. P. Sheng, C. C. Chia, et al., "A Novel peptide specifically binding to interleukin-6 receptor (gp80) inhibits angiogenesis and tumor Growth," in *Cancer Research*, Vol. 65, 2005, pp. 4827-35.
- [5] T. Y. Lee, C. T. Lin, S. Y. Kuo, D. K. Chang, and H. C. Wu, "Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery," in *Cancer Research*, Vol. 67, 2007, pp. 10958-65.
- [6] P. Molek, B. Strukelj, and T. Bratkovic, "Peptide Phage Display as a Tool for Drug Discovery: Targeting Membrane Receptors," in *Molecules*, Vol. 16, 2011, pp. 857-87.
- [7] S. L. Deutscher, "Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer," in *Chemical Reviews*, Vol. 110, 2010, pp. 3196-211.
- [8] J. R. Newton, K. A. Kelly, U. Mahmood, R. Weissleder, and S. L. Deutscher, "In vivo selection of phage for the optical imaging of PC-3 human prostate carcinoma in mice," in *Neoplasia*, Vol. 8, 2006, pp. 772-80.
- [9] K. A. Kelly, P. Waterman, and R. Weissleder, "In vivo imaging of molecularly targeted phage," in *Neoplasia*, Vol. 8, 2006, pp. 1011-18.
- [10] M. D. Abramoff, P. J. Magalhaes, and S. J. Ram, "Image Processing with ImageJ," in *Biophotonics International*, Vol. 11, 2004, pp. 36-42.



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- การประดิษฐ์
 การออกแบบผลิตภัณฑ์
 อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้
ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535
และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ	12 ก.ค. 55	เลขที่คำขอ	1201003486
วันยื่นคำขอ			
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ			
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์			
ประเภทผลิตภัณฑ์			
วันประกาศโฆษณา		เลขที่ประกาศโฆษณา	
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร		เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่			

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
"เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} และกรรมวิธีการใช้เปปไทด์ดังกล่าว"

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 111 อุทยาน วิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120	3.1 สัญชาติ ไทย
	3.2 โทรศัพท์ 02-564-7000 ต่อ 1314 - 1350
	3.3 โทรสาร 02 564 7003
	3.4 อีเมล tlx@tmc.nstda.or.th

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
 ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ผู้รับโอน ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี) ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์) น.ส.อรุณศรี ศรีธนะฉิทธิพล และ/หรือ นายชาญชัย นีรพัฒน์กุล และ/หรือ นางทิพวรรณ รัตนกิจ อยู่ที่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 111อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120	5.1 ตัวแทนเลขที่ 1463,1731, 2260
	5.2 โทรศัพท์ 02 5647000
	5.3 โทรสาร 025647003
	5.4 อีเมล ipm@tmc.nstda.or.th

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)
อยู่ที่หน้า 3

7. คำขอรับ สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอ ให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ _____ วันยื่น _____ เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
 คำขอเดิมมีการประดิษฐ์นหลายอย่าง ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ของเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่อาจบรรยายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับชื่อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

8. การยื่นคำขออนุญาตราชอาณาจักร				
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการ ประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				
8.4 <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย <input type="checkbox"/> ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ <input type="checkbox"/> ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้				
9. การแสดงการประดิษฐ์ หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด				
10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ				
10.1 เลขทะเบียน		10.2 วันที่ฝากเก็บ		สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ
11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำ เป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา <input type="checkbox"/> อังกฤษ <input type="checkbox"/> ฝรั่งเศส <input type="checkbox"/> เยอรมัน <input type="checkbox"/> ญี่ปุ่น <input type="checkbox"/> อื่น ๆ				
12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียนและประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ. <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในประกาศโฆษณา				
13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย			14. เอกสารประกอบคำขอ	
ก. แบบพิมพ์คำขอ	3	หน้า	<input type="checkbox"/> เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนารูปแบบผลิตภัณฑ์	18	หน้า	<input type="checkbox"/> หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบ ผลิตภัณฑ์	
ค. ข้อถ้อยสิทธิ	2	หน้า	<input type="checkbox"/> หนังสือมอบอำนาจ	
ง. รูปเขียน	9	รูป	9	หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์				
<input type="checkbox"/> รูปเขียน	-	รูป	-	หน้า
<input type="checkbox"/> ภาพถ่าย	-	รูป	-	หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์	1	หน้า	<input type="checkbox"/> เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ	
<input type="checkbox"/> เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่น คำขอในประเทศไทย				
<input type="checkbox"/> เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ				
<input type="checkbox"/> เอกสารอื่น ๆ เอกสารประกอบกรยื่นคำขอรับสิทธิบัตร				
15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า <input checked="" type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน <input type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก				
16. ลายมือชื่อ (<input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร; <input checked="" type="checkbox"/> ตัวแทน)				
			 (น.ส. อรุณศรี ศรีธนะอิทธิพล) ตัวแทนผู้รับมอบอำนาจ	

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่
เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

6. ชื่อผู้ประดิษฐ์

1. น.ส.น้ำฝน เข็มทองเจริญ
2. นายวิบูลย์ ปิยวัฒน์เมธา
3. นายอติเศกเรืองประชา
4. นายสันติ รัตนวารินทร์
5. นายคังคาร จารุจารีต

อยู่ที่ ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ 112 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

6. นางสุทธิลักษณ์ ปทุมราช อยู่ที่ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. นายสมชัย นิรุตติศาสตร์ อยู่ที่ ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. นายพงษ์ศักดิ์ สาระภักดิ์ อยู่ที่ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. นายโรมิโอ ใจริโว

อยู่ที่ ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ 112 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} และกรรมวิธีการใช้เปปไทด์ดังกล่าว

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

- 5 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} และกรรมวิธีการใช้เปปไทด์ดังกล่าว

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โปรตีน p16^{INK4a} เป็นโปรตีนที่สำคัญซึ่งทำหน้าที่ควบคุมวงจรการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle)

[1, 2] เซลล์มะเร็งที่มีการเจริญและแบ่งตัวผิดปกติจากการติดเชื้อไวรัสเปปิโลมา (papillomavirus)

- 10 มักจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดมะเร็งของเซลล์ชั้นเยื่อบุผิวชนิดต่างๆ เช่น มะเร็งปากมดลูกและมะเร็งของหู คอ จมูก [3-6] ซึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งดังกล่าวจะมีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} มากผิดปกติ เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติโดยทั่วไปซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} ระดับต่ำกว่ามาก

ที่ผ่านมาเทคนิคมาตรฐานในการตรวจหาเซลล์มะเร็งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเปปิโลมาจะอาศัยการเก็บตัวอย่างเซลล์หรือตัดชิ้นเนื้อตรวจทางพยาธิวิทยา ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยประสบการณ์ความเชี่ยวชาญของผู้ตรวจเป็นสำคัญ ดังนั้น

- 15 การตรวจหาเซลล์มะเร็งจึงขาดความถูกต้องแม่นยำและมีความแปรปรวนในแต่ละครั้งหรือในแต่ละบุคคลสูง นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังมีความไวต่ำ ไม่สามารถใช้ตรวจหาเซลล์ก่อนมะเร็งที่มีความผิดปกติในระยะเริ่มต้น (precancerous cells) ซึ่งยังไม่มีการแสดงออกของความผิดปกติทางพยาธิวิทยาให้สังเกตเห็นได้

ต่อมาได้มีการพัฒนาใช้โปรตีน p16^{INK4a} เป็นโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยา (Biomarker)

ของเซลล์มะเร็งชนิดดังกล่าวเพื่อช่วยให้การตรวจหาเซลล์มะเร็งมีความแม่นยำน่าเชื่อถือ

- 20 และสามารถตรวจพบเซลล์ที่มีความผิดปกติในระยะเริ่มต้นได้ แม้ว่าความผิดปกติทางพยาธิวิทยายังไม่แสดงออกให้เห็น [7, 8] การตรวจหาเซลล์มะเร็งโดยใช้โปรตีน p16^{INK4a}

เป็นโมเลกุลบ่งชี้ทางชีววิทยาอาจสามารถทำได้โดยการตรวจหาโมเลกุลแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน p16^{INK4a}

[9], การตรวจเมทิลเลชัน (methylation) ของยีนควบคุมการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} [10] หรือการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อโดยตรงโดยอาศัยแอนติบอดีจับจำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าว

- 25 แม้ว่าเทคนิคการตรวจแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอและการตรวจเมทิลเลชันของโปรตีน p16^{INK4a} จะเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ มีความไวสูง และสามารถตรวจหาเซลล์มะเร็งตั้งแต่ระยะเริ่มต้นได้

แต่สองเทคนิคนี้เป็นการตรวจความผิดปกติในการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนในระดับยีนเท่านั้น

จะไม่สามารถตรวจวัดปริมาณโปรตีน p16^{INK4a}

ที่เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของเซลล์ที่แท้จริงได้ นอกจากนี้

- 30 เทคนิคทั้งสองนี้ยังมีขั้นตอนการตรวจที่ยุ่งยากและต้องใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการอบรมและมีความรู้เฉพาะทางเป็นอย่างดี จึงมักนิยมใช้กับการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่เหมาะสมกับการใช้ตรวจหาปริมาณโปรตีน p16^{INK4a}

ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่เป็นตัวอย่างส่งตรวจสำหรับการบริการ ที่ต้องการความรวดเร็ว และความสะดวกในการใช้งาน ดังนั้น ในปัจจุบันการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a}

ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อสำหรับการบริการจึงนิยมใช้แอนติบอดีจับจำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a} สำหรับตรวจหาโปรตีน

- เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน "GLY-ARG-GLY-ASP-ASN-PRO" (เอกสารสิทธิบัตร SG159663, PCT/EP2008/007537),
เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน "HIS-SER-LEU-GLY-LYS-TRP-LEU-GLY-HIS-PRO-ASP-LYS-PHE" (เอกสารสิทธิบัตร
SG159672, US 2010/0204134 และ PCT/EP2008/007441), เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน Arg-Phe-Met-Trp-Met-Arg
(เอกสารสิทธิบัตร SG159669, PCT/EP2008/007601), การใช้เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน Asn-Ile-Pro-Pro-Leu, Ile-Pro-
5 Pro-Leu, Ile-Pro-Pro, Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro, Val-Pro-Pro-Phe, Val-Pro-Pro, Phe-Pro-Pro-Gln, หรือ Leu-Pro-Pro-
Thr สำหรับการยับยั้งโรคการเจริญแก่ตัวของเซลล์ที่ผิดปกติ (เอกสารสิทธิบัตร EP2371375),
การใช้เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันที่จำเพาะสำหรับการรักษาโรคมะเร็ง (เอกสารสิทธิบัตร WO/2012/002762),
เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะสำหรับมะเร็งเต้านม (เอกสารสิทธิบัตร WO2012007137),
เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะต่อการยับยั้งเชื้อไวรัส HIV (เอกสารสิทธิบัตร WO/2011/127624)
10 และยังมีเปปไทด์สำหรับใช้จำเพาะกับการรักษาโรคต่างๆ
อีกเป็นจำนวนมากทั้งที่อยู่ระหว่างการยื่นขอคุ้มครองสิทธิและได้รับการคุ้มครองสิทธิแล้ว นอกจากนี้
ยังมีการออกแบบเปปไทด์เพื่อวัตถุประสงค์สำหรับการตรวจหาหรือตรวจติดตาม (monitoring)
เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ผิดปกติไป อาทิ เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน "Ser-Asn-Phe-Tyr-Met-Pro-Leu" หรือ "Gly-Gly-Gly-
Ser-Lys" สำหรับการตรวจหามะเร็งที่ลำไส้ (เอกสารสิทธิบัตร US 20100310459) ในร่างกายผู้ป่วย และ
15 เปปไทด์ที่มีลำดับกรด อะมิโน Gln-Leu-Met-Ser-Ala-Asp-Ser, Leu-Pro-Leu-His-Ser-Leu-Ser, Ala-Ser-Tyr-Asn-Tyr-
Asp-Ala, Ala-Gln-Leu-Ser-Thr-Leu-Ala, และ Thr-Gly-Pro-Thr-Ile-Gln-His สำหรับการตรวจหาหรือรักษาโรคภูมิคุ้มกัน
(เอกสารสิทธิบัตร US 20100061929) ในร่างกายสิ่งมีชีวิต เป็นต้น

จากรายงานดังกล่าวข้างต้น

- การใช้เปปไทด์เป็นตัวตรวจจับจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ทั้งในแง่การตรวจติดตามโปรตีน โมเลกุล
20 หรืออวัยวะเป้าหมาย และการรักษาโรคต่างๆ อย่างไรก็ตาม
ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการพัฒนาเปปไทด์ที่มีความสามารถในการจับจำเพาะกับโปรตีน p16^{INK4a}
โดยเฉพาะในแง่มุมของการใช้เปปไทด์เพื่อตรวจติดตามหาโปรตีนชนิดนี้ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อส่งตรวจ
ซึ่งจะช่วยลดข้อจำกัดต่างๆ ของการใช้แอนติบอดีจับจำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a} ได้ ดังนั้น
ในการประดิษฐ์นี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}
25 และกรรมวิธีใช้เปปไทด์ดังกล่าว
เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจหาตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a}

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}
และพัฒนารกรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a}
30 ด้วยเปปไทด์ที่ ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามดังกล่าว โดยเปปไทด์ตามการประดิษฐ์นี้มีลำดับกรดอะมิโนที่เลือกได้จาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 คือ SHSLHH (ser-his-ser-leu-leu-his-his), ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 คือ SLHQPHL (ser-leu-his-gln-
pro-his-leu) หรือ ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 คือ YAWDTYR (tyr-ala-trp-asp-thr-tyr-arg) อย่างใดอย่างหนึ่ง
เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ตามการประดิษฐ์นี้
ได้พัฒนาขึ้นให้มีความจำเพาะสูงกับการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} โดยมีขนาดโมเลกุลเล็กเพียง 7 กรดอะมิโน
35 จึงมีความสามารถในการแทรกซึมเข้าจับโปรตีน p16^{INK4a} ภายในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อได้ดี
รวมทั้งไม่จับกับโปรตีนอื่นที่จำเป็นต้องใช้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เช่น
โปรตีนไบวาซิมัลล์ลูมินในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ดูดช่องว่างในการย้อมเซลล์หรือชิ้นเนื้อบนกระจกสไลด์

จึงช่วยให้สามารถลดสัญญาณรบกวนหรือผลบวกวงอันเกิดจากการจับไม่จำเพาะดังกล่าวได้

อีกทั้งขั้นตอนการติดตามสัญญาณการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}

ก็ง่ายโดยสามารถตรวจวัดสัญญาณตามเหมาะสมกับชนิดของโมเลกุลติดตามที่ติดฉลากบนสายเปปไทด์

จึงให้ผลการประยุกต์ใช้ในการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a}

- 5 ด้วยกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยให้ผลการตรวจที่มีความไวสูง ให้สัญญาณที่ชัดเจน และไม่มีสัญญาณรบกวนและผลบวกวงซึ่งดีกว่าการใช้แอนติบอดีเชิงการค้ามาก อีกทั้งยังสามารถผลิตเพิ่มจำนวนเปปไทด์ได้ครั้งละมากๆ ด้วยการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก

โดยสามารถตัดต่อพันธุกรรมกับสารพันธุกรรมของอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจและใช้งานเปปไทด์ในรูปของเปปไทด์ที่ติดฉลาก

ด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยโมเลกุลติดตามในกลุ่มสารเคมีหรือโมเลกุลชีวเคมีได้

- 10 โดยเปปไทด์ที่อยู่บนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจดังกล่าวสามารถผลิตเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัดด้วยระบบการเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตแอนติบอดีมาก และขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตรวจก็ไม่ยุ่งยาก จึงมีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์และกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้กับงานบริการตรวจส่งตรวจในห้องปฏิบัติการที่ต้องการความถูกต้อง ความไวสูง ชัดเจน โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ และมีต้นทุนต่ำ

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

- 15 รูปที่ 1 ตารางแสดงสัญลักษณ์ปัญหาชนะในภาษาอังกฤษแทนความหมายของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ทั้ง 20 ชนิด

รูปที่ 2 บน: ภาพแบบจำลองแสดงตำแหน่งเกิดปฏิกิริยา (reactive protein binding sites) บนโปรตีน p16^{INK4a} จากปลายเอ็น (N-terminal) ด้านซ้ายถึงปลายซี (C-terminal) ทางด้านขวา

ล่าง: ภาพแบบจำลองตำแหน่งจับจำเพาะของเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 (1), เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 (2) และ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 (3) บนผิวโปรตีน p16^{INK4a}

- 20 โดยเปปไทด์ทั้งสามสามารถเกาะบริเวณตำแหน่งเกิดปฏิกิริยา (reactive protein binding sites) หรือตำแหน่งใกล้เคียงตำแหน่งเกิดปฏิกิริยาของโปรตีน p16^{INK4a}

ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่งกรดอะมิโนตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโปรตีน p16^{INK4a} ในช่วง A73-T93 ตรงกับตำแหน่งเกิดปฏิกิริยา D74, A76, T77, D84, E88, F90 และ D92

- 25 สำหรับเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1; ช่วง P40-S56 ตรงกับตำแหน่งเกิดปฏิกิริยา N42, Y44, V51, M52, M54 และ C55 สำหรับเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 และในช่วง A21-V28 ตรงกับตำแหน่งเกิดปฏิกิริยา R22, E26 และ E27 สำหรับเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3

รูปที่ 3 ซ้าย: แสดงผลการย้อมเซลล์มะเร็งชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} มากผิดปกติเปรียบเทียบกับผลการย้อมเซลล์ปกติ ด้วยเปปไทด์ชนิดต่างๆ

ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจ (bacteriophage particle)

- 30 ที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์โดยเปปไทด์ดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโนดังนี้

เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 (g1 และ g2), เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 (x1 และ x2),

เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 (c1 และ c2), อนุภาคแบคทีเรียโอฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ

ซึ่งเคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (g1 และ g2),

และอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจควบคุมที่แสดงเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนอื่นซึ่งไม่ตรงกับเปปไทด์ตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ทั้ง 3 เส้น (ได้จากคลังเปปไทด์เดียวกันกับเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1-3)

- 35 ซึ่งเคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (g1 และ g2)

โดยความแตกต่างของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้จากเซลล์มะเร็งที่ย้อมด้วยเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1, เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2, เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3, อนุภาคแบค

เทอร์อิโอฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์ใด ๆ

และที่แสดงเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างจากเปปไทด์ตรวจจับทั้งสามซึ่งเคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (จ1) มากกว่าความเข้มข้นสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้จากเซลล์ปกติ 25.6, 18.2, 14.9, 9.5, และ 3.2 หน่วยเกรย์สเกล ตามลำดับ

5 ขวา: แสดงบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ที่มีอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ของแต่ละภาพ

ซึ่งสามารถแสดงตำแหน่งเซลล์ปกติที่ย้อมด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ตามการประติษฐานนี้ ซึ่งผลพบว่าไม่เกิดการติดสีสำหรับเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 (ก3 และ ก4), และ 3 (ค3 และ ค4), ขณะที่เปปไทด์ลำดับ กรดอะมิโนที่ 2 (ข3 และ ข4)

10 ย้อมติดเซลล์ปกติได้บ้างแต่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์น้อยกว่าสัญญาณที่ได้จากเซลล์มะเร็งมากอย่างมีนัยสำคัญ

และความแตกต่างระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ย้อมติดเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งจากการใช้อนุภาคแบคเทอร์อิโอฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์ใด ๆ ที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (ง1 และ ง2)

15 และอนุภาคแบคเทอร์อิโอฟาจควบคุมที่แสดงเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างจากเปปไทด์ตรวจจับทั้งสาม (จ1 และ จ2) ยังลดน้อยลงและไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเป็นลำดับ

รูปที่ 4

กราฟแสดงค่าทางสถิติของความแตกต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้ระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งที่ย้อมด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามตามการประติษฐานนี้และอนุภาคควบคุมต่างๆ

โดยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามทั้ง 3 เส้น (ก-ค)

20 สามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณเพื่อใช้ในการตรวจแยกเซลล์มะเร็งได้มากกว่า 16.1, 8.7 และ 11.6 หน่วยเกรย์สเกล

เมื่อเปรียบเทียบกับความแตกต่างของสัญญาณที่วัดได้จากเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่ย้อมด้วยอนุภาคแบคเทอร์อิโอฟาจควบคุมที่ไม่แสดงเปปไทด์ใด ๆ ซึ่งเคลือบผิวอนุภาคด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ (ง)

25 ขณะที่แบคเทอร์อิโอฟาจควบคุมที่แสดงเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนอื่นที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากเปปไทด์ตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ซึ่งเคลือบผิวอนุภาคด้วยสารฟลูออเรสเซนต์

ไม่สามารถใช้ตรวจแยกเซลล์มะเร็งออกจากเซลล์ปกติได้

โดยให้ความแตกต่างของสัญญาณน้อยกว่าความแตกต่างของสัญญาณจากเซลล์ที่ย้อมด้วยอนุภาคแบคเทอร์อิโอฟาจควบคุม (จ) ถึง 6.3 หน่วยเกรย์สเกล

รูปที่ 5

30 ภาพเปรียบเทียบระหว่างผลของการย้อมเซลล์มะเร็ง (บน) และเซลล์ปกติ (ล่าง)

ด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามตามการประติษฐานนี้เพื่อตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ซึ่งคือ

เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 (ซ้าย) กับการใช้โมเลกุลแอนติบอดีจับจำเพาะ (กลาง)

โดยพบความเข้มของสัญญาณเพิ่มขึ้นแปรผันตรงกันทั้งในเซลล์ที่ย้อมด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามตามการประติษฐานนี้และแอนติบอดีจับจำเพาะทางการค้างแสดงตามลูกครีซซึ่งย้อมติดเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติให้ความแตกต่างของสัญญาณได้อย่างมาก

35 เปรียบเทียบจากภาพนิวเคลียสของเซลล์ที่แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งต่างๆ ที่มีเซลล์อยู่จริงในแต่ละภาพ (ขวา)

ผลภาพแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามสามารถให้สัญญาณความเข้มฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจแยกเซลล์มะเร็ง (ขวาบน) มากกว่าเซลล์ปกติ (ขวาล่าง) ถึง 25.6 หน่วยเกรย์สเกล

ขณะที่การใช้โมเลกุลแอนติบอดีให้ความแตกต่างของสัญญาณในการตรวจแยกเซลล์มะเร็ง (กลางบน)

จากเซลล์ปกติ (กลางล่าง) เพียง 1.8 หน่วย เกรย์สเกล

ซึ่งเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามตามกาประดิษฐ์นี้สามารถให้ความต่างของสัญญาณมากกว่าการใช้แอนติบอดีถึง 14 เท่า

นอกจากนี้ตะกอนสัญญาณที่เกิดการจับอย่างไม่จำเพาะในสัญลักษณ์วงกลมยังพบได้กับตัวอย่างเซลล์ที่ย้อมด้วยโมเลกุลแอนติบอดีขณะที่ตะกอนเหล่านี้ไม่พบในเซลล์ที่ย้อมด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ในภาพถ่ายที่บริเวณเดียวกัน

5

รูปที่ 6 ภาพแสดงตัวอย่างการนำเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}

ตามการประดิษฐ์นี้ไปใช้ในการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งระยะต่างๆ

โดยใช้โมเลกุลติดตามเป็นอนุภาค

10

แบคทีเรียโอฟาที่เคลือบผิวด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสซินไอโซไซยาเนต (Fluorescein isothiocyanate; FITC) ซึ่งปฏิกิริยาการจับกันระหว่างเปปไทด์กับโปรตีน p16^{INK4a}

ในตัวอย่างชิ้นเนื้อสามารถตรวจติดตามได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์วัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่สามารถกระตุ้นการเรืองแสงและตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสซินไอโซไซยาเนตที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม (ประมาณ 490 และ 521 นาโนเมตร ตามลำดับ)

15

จากภาพจะพบตำแหน่งที่มีการย้อมติดสีฟลูออเรสเซนซ์สูงซึ่งคือตำแหน่งเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน

p16^{INK4a} มาก ที่บริเวณชั้นเยื่อเมือกในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มีรอยโรคก่อนมะเร็ง (precancer lesion) (บนขวา)

สูงกว่าที่บริเวณเดียวกันในตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติ (บนซ้าย)

และในโครงสร้างของชั้นที่ย้อมติดสีฟลูออเรสเซนซ์ดังกล่าวพบความหนาแน่นของเซลล์ผิดปกติเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากกว่าพื้นที่ 2 ใน 3 ของชั้นเซลล์เยื่อเมือก ขณะที่ตำแหน่งที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a}

20

ในรอยโรคมะเร็งระยะลุกลาม (invasive cancer lesion) จะพบมากในเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านใน (ล่างซ้าย)

เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มแสงที่บริเวณเดียวกันในตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติที่ไม่มีรอยโรคซึ่งจะไม่พบการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a}

จึงได้ภาพที่มีลักษณะเนื้อเยื่อที่เป็นพื้นสม่ำเสมอและย้อมแล้วไม่พบแถบหรือจุดสว่างของแสงฟลูออเรสเซนซ์ (ล่างขวา)

รูปที่ 7

25

ภาพแสดงตัวอย่างที่ได้จากการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาที่เคลือบผิวด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์เรดิส

เปอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase; HRP) ร่วมกับการใช้ซับสเตรทของเอนไซม์ฮอร์เรดิสเปอร์ออกซิเดส

3,3'-ไดอะมีโนเบนซิดีนเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีบนตัวอย่างชิ้นเนื้อ (ขวา) เพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}

30

ตามการประดิษฐ์นี้ ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีใช้ทั่วไปในงนพยาธิวิทยาคลินิกประจำวัน

เปรียบเทียบกับภาพชิ้นเนื้อจากตัวอย่างเดียวกันที่ตรวจด้วยเทคนิคมาตรฐานโดยการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (Hematoxylin and Eosin; H&E) (ซ้าย)

โดยเทคนิคการย้อมมาตรฐานแสดงแถบของกลุ่มเซลล์ผิดปกติซึ่งเป็นสีม่วงเข้มในพื้นที่สัมผัสของเซลล์ปกติอื่น

ขณะที่ชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามตามการประดิษฐ์นี้ซึ่งใช้โมเลกุลติดตามเป็นอนุภาคแบคทีเรียโอฟาที่เคลือบผิวด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์เรดิสเปอร์ออกซิเดส

35

จะแสดงให้เห็นว่าบริเวณเซลล์ที่ผิดปกติเป็นแถบเซลล์สีน้ำตาลในพื้นที่สัมผัสของเซลล์ปกติอื่นๆ

ดังแสดงตัวอย่างแถบเซลล์ชั้นเยื่อเมือกตามหัวลูกศร ภาพถ่ายทั้ง 4 ภาพ

ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเดียวกันที่กำลังขยาย 40 เท่า (บน) และ 100 เท่า (ล่าง)

รูปที่ 8

ตารางสรุปรายละเอียดของอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในวิธีการกินสภาพโปรตีนโดยอาศัยความร้อน

รูปที่ 9

- ภาพเปรียบเทียบผลการยับยั้งเนื้องอกมะเร็งด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจซึ่งเชื่อมต่อกับแอนไซม์ฮอว์เรติสเปอร์ออกซิเดส ร่วมกับการใช้ซีสเตรทของแอนไซม์ฮอว์เรติสเปอร์ออกซิเดส 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีน
- 5 เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีบนตัวอย่างชิ้นเนื้อ (ขวา) ในกระบวนการตรวจติดตาม เพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ตามการประดิษฐ์นี้ โดยใช้เทคนิคการคืนสภาพโปรตีนในตัวอย่าง โดยใช้ย៉างนำชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 95-99 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที (บน)
- เปรียบเทียบกับการยับยั้งตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ทำการคืนสภาพโปรตีนในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ไมโครเวฟ (ล่าง) ที่กำลังขยาย 40 เท่า
- 10 จากภาพแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าตัวอย่างที่ทำการคืนสภาพโปรตีนด้วยไมโครเวฟ สามารถแสดงสีน้ำตาลบริเวณแถบของกลุ่มเซลล์ที่ผิดปกติ (ลูกศรชี้) ได้เข้มกว่าบริเวณเดียวกันของตัวอย่างที่ใช้เทคนิคการคืนสภาพโปรตีนด้วยย៉างนำชนิดควบคุมอุณหภูมิ

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

- การประดิษฐ์นี้กล่าวถึงการประดิษฐ์โมเลกุลตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}
- 15 ที่เป็นเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามซึ่งมีความจำเพาะในการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} สำหรับใช้ในการตรวจหาเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} ทั้งในระดับต่ำในเซลล์ปกติและในระดับที่มากผิดปกติในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่มีรอยโรคมะเร็ง โดยอาศัยคุณสมบัติการจับจำเพาะของเปปไทด์ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งใน 3 รูปแบบ
- 20 ที่เปิดเผยในการประดิษฐ์นี้ ได้แก่ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 คือ SHSLH (ser-his-ser-leu-leu-his-his), เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 คือ SLHQPHL (ser-leu-his-gln-pro-his-leu) หรือ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 คือ YAWDTYR (tyr-ala-trp-asp-thr-tyr-arg)
- โดยจะทำการดัดแปลงติดฉลากเปปไทด์ดังกล่าวด้วยโมเลกุลติดตามที่อาจเป็นสารเคมี โมเลกุลชีวเคมี หรืออนุภาคตรวจติดตาม ที่สามารถใช้เป็นตัวตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมเลกุลโปรตีน p16^{INK4a} กับเปปไทด์จับจำเพาะดังกล่าวได้ ทั้งนี้
- 25 หลักการทำงานของเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามจะอาศัยความสามารถในการจับกับโปรตีน p16^{INK4a} ที่ตำแหน่งจำเพาะต่างๆ เมื่อนำเปปไทด์ตรวจติดตามโปรตีน p16^{INK4a} ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลหรือสารเคมีที่ตรวจติดตามสัญญาณได้ ไปใช้ตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อซึ่งผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมแล้ว
- 30 เปปไทด์ตรวจจับดังกล่าวจะถูกตรึงอยู่บนเซลล์หรือตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} สูงผิดปกติได้มากกว่าตัวอย่างเซลล์ปกติที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} ไม่สูง ดังนั้น ปริมาณของโปรตีน p16^{INK4a} ที่แตกต่างกันในตัวอย่างที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่ผิดปกติและตัวอย่างปกติ จึงสามารถตรวจพบได้โดยการตรวจติดตามจากโมเลกุลติดตามที่ติดฉลากบนสายเปปไทด์ด้วยกระบวนการตรวจติดตามที่เหมาะสมกับโมเลกุลติดตามที่เลือกใช้

- เนื่องจากผลิตภัณฑ์เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามและกรรมวิธีการตามการประดิษฐ์นี้ได้ถูกประดิษฐ์ขึ้นให้มีคุณสมบัติที่ดีเหนือกว่าการใช้แอนติบอดีจับจำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a} ทางการค้า ซึ่งใช้กันโดยทั่วไปในปัจจุบันหลายประการ
- 35 ดังนั้น จึงถือว่าผลิตภัณฑ์และกรรมวิธีการตามการประดิษฐ์นี้เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพในการตรวจติดตามเซลล์ที่มีการแสดงออก

ของโปรตีน p16^{INK4a} โดยมีข้อดีทั้งในแง่ ความไวสูง มีความเสถียร ให้สัญญาณที่ชัดเจน ไม่มีสัญญาณรบกวนและผลบวกลวง อีกทั้ง ยังสามารถผลิตเพิ่มจำนวนเปปไทด์ได้ครั้งละมากๆ ด้วยการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจไม่ยุ่งยาก และต้นทุนต่ำกว่าการผลิตแอนติบอดีมาก จึงมีความเหมาะสมและมีศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้กับงานบริการตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิกประจำวันที่ต้องการความถูกต้อง ชัดเจน ใช้งานง่ายโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ และมีต้นทุนต่ำ

ลำดับต่อไปจะขอกล่าวถึงรายละเอียดต่างๆ ของการพัฒนาผลิตภัณฑ์และกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้ ได้แก่ การคัดเลือกเปปไทด์ขนาดสั้นที่จับจำเพาะกับโปรตีน p16^{INK4a} การสร้างโมเลกุลของเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} กรรมวิธีการนำเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามตามลักษณะการประดิษฐ์นี้ไปใช้ในการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อ และตัวอย่างการทดลองใช้ผลิตภัณฑ์และกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้เพื่อตรวจตัวอย่างจริง

1. การคัดเลือกเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a}

เปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a} ตามการประดิษฐ์นี้ มีส่วนของลำดับกรดอะมิโนสำหรับตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ที่เลือกได้จากลำดับกรดอะมิโนรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งใน 3 ลำดับกรดอะมิโน (กรดอะมิโนแต่ละชนิดแทนด้วยสัญลักษณ์พหุอักษรภาษาอังกฤษดังอธิบายในรูปที่ 1) ดังนี้

- 15 ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 คือ SHSLH (ser-his-ser-leu-leu-his-his)
ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 คือ SLHQPHL (ser-leu-his-gln-pro-his-leu)
ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 คือ YAWDTYR (tyr-ala-trp-asp-thr-tyr-arg)

ทั้งนี้

เปปไทด์ทั้งสามลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวได้มาจากกระบวนการคัดเลือกเปปไทด์จากคลังของเปปไทด์บนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจ (bacteriophage display peptide library)

ซึ่งคลังของเปปไทด์บนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจดังกล่าวสร้างขึ้นจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีรหัสสำหรับกำหนดการสร้างเปปไทด์ขนาด 7 ลำดับกรดอะมิโน ซึ่งมีลักษณะไม่เหมือนกับธรรมชาติ และทำให้มีลำดับเบสเรียงสลับกันแบบสุ่มทุกแบบความเป็นไปได้และตัดต่อดีเอ็นเอดังกล่าวเข้ากับยีนควบคุมการสร้างโปรตีนที่ผิวแบคทีเรียโอฟาจ เมื่อทำให้เกิดการแสดงออกของคลังดีเอ็นเอดังกล่าว จะปรากฏเปปไทด์ขนาดความยาว 7

25 ลำดับกรดอะมิโน ที่มีลำดับกรดอะมิโนเรียงสลับกันแบบสุ่มครบทุกแบบความเป็นไปได้จากจำนวนชนิดของกรดอะมิโนทั้งหมด 20 ชนิด บนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจ ดังนั้นคลังของเปปไทด์ (peptide library) ที่ได้จะมีเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันทั้งหมด 1.28×10^9 แบบ

จากนั้นคัดเลือกเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a} แบบที่ดีที่สุดจากจำนวนเปปไทด์ทั้งหมด 1.28×10^9

30 แบบดังกล่าวจากคลังเปปไทด์บนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจ

โดยใช้หลักการคัดเลือกเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการตรวจหาเซลล์ที่มีการแสดงออกโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อบนกระจกสไลด์

นอกจากการคัดเลือกเปปไทด์จะมุ่งเน้นที่การคัดเลือกเปปไทด์ที่สามารถจับจำเพาะกับโปรตีน p16^{INK4a} ได้ดีแล้ว ยังทำการคัดเลือกเปปไทด์ที่อาจจับไม่จำเพาะกับกระจก พลาสติกหรือโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในบัฟเฟอร์ต่างๆ

35 ที่จะใช้ในขั้นตอนการตรวจติดตามออกอีกด้วย

ซึ่งการเพิ่มลักษณะการคัดเลือกดังกล่าวจะช่วยให้สามารถลดผลบวกลวงที่อาจเกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะของเปปไทด์ตรวจจับได้

ซึ่งลักษณะการจับไม่จำเพาะดังกล่าวมักจะเกิดเป็นสัญญาณรบกวนซึ่งจะเป็นปัญหาเช่นเดียวกับกรณีของการใช้แอนติบอดีจับจำเพาะในการตรวจทั่วไป ดังนั้น เปปไทด์ที่คัดเลือกได้นั้นนอกจากจะมีความจำเพาะในการใช้ตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} แล้ว ยังเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในสิ่งส่งตรวจจำพวกเซลล์หรือชิ้นเนื้อบนแผ่นสไลด์

5

เนื่องจากมีความไวสูงจากการที่มีคุณสมบัติการให้ค่าอัตราส่วนสัญญาณตรวจวัดต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio) สูงนั่นเอง

จากผลการคัดเลือกจากคลังเปปไทด์จะพบว่าไม่ใช่ทุกลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์คลังเปปไทด์นี้จะให้ผลดีตามต้องการ

ดังนั้น

ในการประดิษฐ์นี้จึงได้คัดเลือกเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนทั้งสามลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวข้างต้นมาใช้สร้างเป็นโมเลกุล

10

ติดตาม เนื่องจากเปปไทด์ทั้งสามนี้สามารถเกาะกับบริเวณตำแหน่งเกิดปฏิกิริยา (reactive protein binding sites) หรือตำแหน่งใกล้เคียงตำแหน่งเกิดปฏิกิริยาของโปรตีน p16^{INK4a} ได้ดี โดยระดับพลังงานรวม (Binding score)

การจับกับโปรตีน p16^{INK4a} ของเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1, เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 และ

เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 ที่ได้จากการคำนวณมีค่าเท่ากับ -65.85, -53.76 และ -55.42 ตามลำดับ

(ค่าระดับพลังงานรวมที่มีค่าติดลบสูงหมายถึงการจับระหว่างโมเลกุลมีความจำเพาะสูง และมีความเสถียรสูง)

15

ซึ่งตำแหน่งการเกาะดังกล่าวประกอบด้วยตำแหน่งกรดอะมิโนบนโปรตีน p16^{INK4a} ในช่วง A73-T93

ตรงกับตำแหน่งเกิดปฏิกิริยา D74, A76, T77, D84, E88, F90 และ D92 สำหรับเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1, ช่วง P40-

S56 ตรงกับตำแหน่งเกิดปฏิกิริยา N42, Y44, V51, M52, M54 และ C55 สำหรับเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2, และในช่วง

A21-V28 ตรงกับตำแหน่งเกิดปฏิกิริยา R22, E26 และ E27 สำหรับ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3

ดังภาพจำลองแสดงผลการจับจำเพาะในระดับโมเลกุลตามรูปที่ 2 ในขณะที่เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ

20

ที่มาจากคลังเปปไทด์เดียวกันจะไม่สามารถเลือกจับกับโปรตีน p16^{INK4a} ได้

และจากการคัดเลือกเปปไทด์ทั้งสามลำดับกรดอะมิโนที่แสดงออกบนผิวแบคทีเรียโอฟาจที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นใน

น่งการทำงานกับตัวอย่างจริง

ซึ่งทดสอบโดยการติดฉลากเปปไทด์ทั้งสามดังกล่าวด้วยโมเลกุลติดตาม(ต้นแบบ)ชนิดอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิว

อนุภาคด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ และทดสอบการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} พบว่า

25

เปปไทด์ทั้งสามลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวสามารถตรวจจับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} ได้จริง

โดยให้ผลของสัญญาณที่ชัดเจน และยังสามารถใช้ในการแยงแยกเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a}

มากผิดปกติออกจากเซลล์ปกติได้

โดยเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถติดสัญญาณการตรวจจับได้เนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} เหมือนกัน

แต่มีความแตกต่างกันในระดับความเข้มของสัญญาณอันเป็นผลมาจากระดับการแสดงออกโปรตีนชนิดนี้ที่ต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญ ดังตัวอย่างในรูปที่ 3 และ 4

30

ซึ่งแสดงภาพเซลล์และผลการคำนวณเปรียบเทียบทางสถิติของปริมาณความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์

เมื่อใช้เปปไทด์แต่ละลำดับกรดอะมิโนที่ติดฉลากด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรส

เซนต์ในการตรวจแยกเซลล์มะเร็งชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} มากผิดปกติออกจากเซลล์ปกติ

ผลแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเซลล์มะเร็งชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} ที่ย้อมด้วยเปปไทด์ลำดับกรด อะมิโนที่

1 เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 และเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3

35

ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามสามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์เฉลี่ยมากกว่าเซลล์ปกติที่ย้อมด้วยเปปไทด์ชนิดเดียวกัน

ถึง 25.6, 18.2 และ 14.9 หน่วยเกรย์สเกล ตามลำดับ

ขณะที่เซลล์มะเร็งที่ย้อมด้วยตัวควบคุมที่เป็นอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ

บนผิวเซลล์ซึ่งเคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และที่ย้อมด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่แสดง

เปปไทด์ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ

(ได้จากคลังเปปไทด์เดียวกันกับเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนทั้งสามรูปแบบตามการประดิษฐ์นี้) แต่ไม่มีความสามารถในการตรวจติดตามโปรตีน p16^{INK4a} ซึ่งเคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ จะให้สัญญาณความเข้มฟลูออเรสเซนต์เฉลี่ยมากกว่าเซลล์ปกติเพียง 9.5 และ 3.2 หน่วยเกรย์สเกล ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3

- 5 จากตัวอย่างดังกล่าวยืนยันได้ว่าเปปไทด์ตรวจติดตามทั้งสามลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจแยกเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a}
- นอกจากเซลล์ปกติได้ดีกว่าตัวควบคุมที่เป็นอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ ซึ่งเคลือบผิวด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.02$) โดยเปปไทด์ทั้งสามรูปแบบนี้สามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณในการตรวจแยกเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ ตั้งแต่ 5-10 16 หน่วย เกรย์สเกล ขณะที่กรณีใช้เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ
- 10 จากได้จากคลังเปปไทด์เดียวกันเป็นเปปไทด์ตรวจติดตามก็ไม่สามารถใช้ตรวจแยกเซลล์มะเร็งออกจากเซลล์ปกติได้ โดยตัวอย่างการให้สัญญาณที่ได้จากเปปไทด์ดังกล่าวให้ค่าความแตกต่างของความเข้มของสัญญาณระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติน้อยกว่าความแตกต่างของสัญญาณจากเซลล์ที่ย้อมด้วยอนุภาค แบคทีเรียโอฟาจที่ไม่แสดงเปปไทด์ใดๆ ซึ่งเคลือบผิวด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ถึง 6.3 เท่า ($p < 0.02$) ดังแสดงเป็นค่าทางสถิติดังรูปที่ 4
- 15 จากคุณสมบัติของเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก ทำให้เปปไทด์ทั้งสามลำดับกรดอะมิโนที่คัดเลือกได้ตามการประดิษฐ์นี้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์ที่มีการแสดงออกโปรตีน p16^{INK4a} ทั้งในระดับต่ำ ปกติ หรือสูงมากกว่าการใช้ไมเลกุลแอนติบอดีตรวจจับที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน และจะเป็นประโยชน์มากในกรณีที่ใช้ตรวจหาเซลล์ชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a}
- 20 สูงผิดปกติซึ่งมักเป็นเซลล์ที่เกิดความผิดปกติ เช่น เซลล์มะเร็ง เป็นต้น เนื่องจากโปรตีน p16^{INK4a} เป็นโปรตีนควบคุมการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ที่พบแสดงออกมากภายในนิวเคลียสหรือไซโทพลาสซึมของเซลล์มะเร็ง [11-13] ดังนั้น การตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ที่แสดงออกจากเซลล์มะเร็งด้วยไมเลกุลเปปไทด์ตรวจจับซึ่งมีความจำเพาะสูงและมีขนาดเล็กกว่าไมเลกุลแอนติบอดีประมาณ 150 เท่า ทำให้เปปไทด์สามารถซึมผ่านผิวเซลล์เข้าจับกับโปรตีน p16^{INK4a} ได้ดีกว่าไมเลกุลแอนติบอดี
- 25 นอกจากนี้การใช้เปปไทด์ตามการประดิษฐ์นี้ยังช่วยลดสัญญาณรบกวนจากการจับไม่จำเพาะของไมเลกุลตรวจติดตามได้ดีกว่าการใช้แอนติบอดี ซึ่งเป็นผลจากการใช้คลังของเปปไทด์เพื่อคัดเลือกเปปไทด์ที่ไม่จับจำเพาะที่อาจทำให้เกิดสัญญาณรบกวนต่างๆ ในการตรวจติดตามออก ดังนั้นเปปไทด์ตรวจติดตามนี้จึงมีความจำเพาะสูงและให้อัตราส่วนสัญญาณใช้งานต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio) สูงกว่าแอนติบอดีตรวจติดตามมาก ดังแสดงในรูปที่ 5
- 30 ซึ่งแสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่ย้อมด้วยแอนติบอดีจับจำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a} และ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 ที่ติดฉลากด้วยไมเลกุลติดตามชนิดอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ตามลำดับจากปัจจัยเรื่องขนาดและความจำเพาะของเปปไทด์ตรวจจับรวมถึงอัตราสัญญาณใช้งานต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio) จึงทำให้การใช้เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยไมเลกุลเพื่อตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}
- 35 ในการตรวจหาเซลล์ชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} ผิดปกติ โดยเฉพาะกลุ่มของเซลล์มะเร็ง มีความจำเพาะและความไวสูงกว่าการใช้แอนติบอดีแบบดั้งเดิมอย่างน้อยถึง 8 เท่า ซึ่งถือว่าผลดังกล่าวค่อนข้างดีมาก เนื่องจากที่ผ่านมายังไม่เคยมีรายงานการพัฒนาไมเลกุลอื่นใดเพื่อมาทดแทนแอนติบอดีโดยที่ไมเลกุลนั้นให้ประสิทธิภาพการใช้งานในการตรวจติดตามโปรตีน p16^{INK4a} ที่ดีเทียบเท่าหรือดีกว่าแอนติบอดีมาก่อน

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 3 และ 4

จะพบว่าทางเลือกใช้เปปไทด์ขนาดสั้นที่ลำดับกรดอะมิโนเป็นเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 คือ SHSLLHH (ser-his-ser-leu-leu-his-his)

5 สามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณในการตรวจแยกเซลล์ปกติออกจากเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นตัวอย่างของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 หรือ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 โดยพบว่าเมื่อใช้การติดตามปฏิกิริยาจับจำเพาะด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1

สามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณในการตรวจแยกเซลล์มะเร็งจากเซลล์ปกติได้มากกว่าเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 และ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 ถึงประมาณ 1.5 และ 2 เท่า ตามลำดับ

10 ในขณะที่เปปไทด์ทั้งหมดสามารถให้ความแตกต่างของสัญญาณในการตรวจแย่งแยกเซลล์ปกติออกจากเซลล์มะเร็งได้มากกว่าการใช้แอนติบอดีด้วยเทคนิคแบบดั้งเดิมได้ตั้งแต่ 8-14 เท่าตัว

ซึ่งนอกจากจะเป็นผลมาจากขนาดของเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่าแอนติบอดีถึง 150 เท่า

ทำให้สามารถซึมผ่านผิวเซลล์หรือเนื้อเยื่อเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีน p16^{INK4a} ได้ดี

และยังเกิดจากความสามารถของเปปไทด์ตรวจจับที่มีความจำเพาะสูง ไม่จับกับโปรตีนที่ไม่จำเพาะอื่นๆ

15 ในตัวอย่างตรวจซึ่งเป็นการลดสัญญาณรบกวนและเพิ่มอัตราสัญญาณใช้งานต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio) ซึ่งเป็นการเพิ่มความไวให้กับเทคนิคการตรวจ

2. การสร้างเปปไทด์ที่ติดฉลากโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ตามลักษณะการประดิษฐ์นี้

2.1 การสร้างสายเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนตามลักษณะการประดิษฐ์นี้

20 การสร้างสายเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนตามลักษณะการประดิษฐ์นี้ คือ การสร้างสายเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งในสามรูปแบบ ดังนี้ ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 คือ SHSLLHH (ser-his-ser-leu-leu-his-his), ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 คือ SLHQPHL (ser-leu-his-gln-pro-his-leu) และ ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 คือ YAWDTYR (tyr-ala-trp-

asp-thr-tyr-arg) ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น

การสังเคราะห์สายเปปไทด์ด้วยเครื่องสังเคราะห์สายเปปไทด์อัตโนมัติเพื่อให้ได้สายเปปไทด์เดี่ยวๆ

เพื่อใช้ในลักษณะของสายเปปไทด์อิสระ

25 หรือการสร้างสายเปปไทด์โดยอาศัยกระบวนการแสดงออกของสายเปปไทด์เสมือนธรรมชาติด้วยการแสดงออกเปปไทด์บนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจ (bacteriophage display) ซึ่งจะทำให้สามารถสร้างสายเปปไทด์ได้ง่าย รวดเร็ว

และมีต้นทุนการผลิตต่ำ เนื่องจากสามารถผลิตเพิ่มจำนวนได้ด้วยระบบการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน

อีกทั้งอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่มีการแสดงออกสายเปปไทด์อยู่บนผิวอนุภาคดังกล่าวยังสามารถดัดแปลงมาเป็นโมเลกุลติดตามเพื่อช่วยขยายสัญญาณได้ดีอีกด้วย ซึ่งจะกล่าวถึงในลำดับต่อไป

30

2.2 การติดฉลากสายเปปไทด์ด้วยโมเลกุลติดตาม

เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ตามลักษณะการประดิษฐ์นี้

ทำได้โดยการนำเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนที่ 1-3 รูปแบบใดรูปแบบหนึ่งตามข้อ 2.1 ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งสายเปปไทด์เดี่ยวๆ ที่ได้จากเครื่องสังเคราะห์หรือเปปไทด์ที่มีการแสดงออกอยู่บนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจดังกล่าวข้างต้น

มาติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อเพิ่มความสามารถในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาการจับระหว่างเปปไทด์กับโปรตีน

35 p16^{INK4a}

โดยสำหรับในกรณีที่ใช้เปปไทด์ที่มีการแสดงออกอยู่บนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจจะทำการดัดแปลงให้อนุภาคแบคทีเรียโอฟาจดังกล่าวเป็นโมเลกุลติดตามได้โดยการเคลือบสารที่มีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลติดตามไปที่ผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจ

ดังนั้น กล่าวโดยสรุปแล้วการประดิษฐ์นี้สามารถเลือกโมเลกุลติดตามชนิดใดชนิดหนึ่ง ได้แก่

โมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นสารเคมี โมเลกุลชีวเคมี หรืออนุภาคตรวจติดตาม

มาติดฉลากที่สายเปปไทด์เพื่อให้เป็นโมเลกุลตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ตามลักษณะการประดิษฐ์นี้ได้ โดยที่ (1)

โมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นสารเคมีเลือกได้จากสารเคมีที่มีคุณสมบัติเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

- 5 สารประกอบเชิงซ้อนและไอออนเชิงซ้อนที่มีสี หรือสารประกอบที่อาศัยปฏิกิริยาเคมีทำให้เกิดสีหรือเกิดสัญญาณแสงได้
อย่างใดอย่างหนึ่ง (2) โมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นโมเลกุลชีวเคมีเลือกได้จากโปรตีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เอนไซม์ (เช่น
เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งใช้ร่วมกับสับสเตรท) โปรตีนที่มีคู่ปฏิกิริยาสำหรับตรวจติดตาม (เช่น อะวิติน หรือ ไปโอติน)
อย่างใดอย่างหนึ่ง และ (3) โมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นอนุภาคตรวจติดตาม

เลือกได้จากอนุภาคแบคทีเรียโอฟาหรืออนุภาคโลหะที่ถูกเคลือบผิวด้วยโมเลกุลติดตามในกลุ่มสารเคมีหรือโมเลกุลชีวเคมี
หรืออนุภาคขนาดนาโนที่ผลิตขึ้นโดยอาศัยสารประกอบเคมี อย่างใดอย่างหนึ่ง

ซึ่งอนุภาคตรวจติดตามดังกล่าวนี้จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของโมเลกุลติดตามซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการช่วยขยายสัญญาณการตรวจ
10 จวัด เพื่อใช้ในระบบการตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยาจับกันของเปปไทด์ตรวจจับกับโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างตรวจ ทั้งนี้
เนื่องจากโมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นอนุภาคตรวจติดตามให้ผลการขยายสัญญาณที่ดีตามเหตุผลที่กล่าวไปแล้ว

และยังพบว่ากรณีที่ใช้อนุภาคแบคทีเรียโอฟาที่ถูกเคลือบผิวด้วยโมเลกุลติดตามในกลุ่มสารเคมีหรือโมเลกุลชีวเคมีนั้นจะให้
15 ผลที่ดีและมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการประดิษฐ์นี้

เนื่องจากสามารถสร้างอนุภาคแบคทีเรียโอฟาโดยการดัดแปลงเป็นโมเลกุลติดตามเพื่อติดฉลากเปปไทด์ตรวจจับโปรตีน
p16^{INK4a} ตามลักษณะการประดิษฐ์นี้ได้ง่าย

ด้วยการติดต่อสายดีเอ็นเอสังเคราะห์เปปไทด์ลงในอนุภาคแบคทีเรียโอฟาที่สร้างขึ้น

ซึ่งจะทำให้สามารถเพิ่มจำนวนเปปไทด์ที่อยู่บนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาได้ครั้งหนึ่งเป็นจำนวนมากอย่างไม่จำกัดในระบบ
20 บการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปซึ่งมีต้นทุนการผลิตต่ำ

ทำให้สามารถผลิตเปปไทด์พร้อมกับติดฉลากอนุภาคตรวจติดตามซึ่งคืออนุภาคแบคทีเรียโอฟาได้พร้อมกันในการเพิ่มจำนวน
ในครั้งเดียว นอกจากนี้โปรตีนที่ล้อมรอบอนุภาคแบคทีเรียโอฟา (capsid protein)

ยังเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวที่จะนำมาโมเลกุลติดตามในกลุ่มโมเลกุลชีวเคมีที่จำเพาะกับโปรตีนดังกล่าวมาทำปฏิกิริยาเคลือบผิวแบบ
จำเพาะอีกด้วย

- 25 ซึ่งทำให้เปปไทด์หนึ่งเส้นบนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาหนึ่งอนุภาคสามารถติดฉลากกับโมเลกุลติดตามได้เป็นจำนวนมากดัง
เช่นที่สามารถทำได้กับการใช้อนุภาคโลหะเคลือบโมเลกุลติดตาม ซึ่งเป็นการขยายสัญญาณการตรวจวัดอีกทางหนึ่ง

ทั้งนี้ วิธีการติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามแต่ละชนิดบนสายเปปไทด์

จะแปรผันไปตามกลุ่มอะตอมหรือโมเลกุลที่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยายึดติดกับโปรตีนเปปไทด์ซึ่งแตกต่างกันไปตามแต่
ชนิดของโมเลกุลติดตามแต่ละชนิดที่เลือกใช้ อย่างเช่นกรณีตัวอย่างที่ได้กล่าวถึง

- 30 ตัวอย่างลักษณะของเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ตามการประดิษฐ์นี้
ในที่นี้ขอยกตัวอย่างลักษณะของเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}
ตามการประดิษฐ์นี้ ดังนี้

ตัวอย่างการติดฉลากสายเปปไทด์อิสระที่ได้จากเครื่องสังเคราะห์

ทำได้โดยการติดฉลากสายเปปไทด์ด้วยโมเลกุลติดตามโดยตรง โดยโมเลกุลติดตามจะเป็นโมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นสารเคมี
35 โมเลกุลชีวเคมี หรืออนุภาคตรวจติดตาม อย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น

กรณีใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซินไอโซไซยาเนต (Fluorescein isothiocyanate; FITC)

จะทำการติดฉลากได้โดยอาศัยลักษณะของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซินไอโซไซยาเนตที่มีหมู่เอ็นเอชเอส (N-
hydroxysuccinimide; NHS) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยายึดติดกับหมู่เอมีนของสายเปปไทด์ เป็นต้น

ส่วนกรณีที่ทำการศึกษาวิเคราะห์เปปไทด์โดยการแสดงออกอยู่บนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจ

อนุภาคแบคทีเรียโอฟาจดังกล่าวจะถูกตัดแปลงเป็นโมเลกุลติดตามได้โดยการเคลือบผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจด้วยโมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นสารเคมีหรือโมเลกุลชีวเคมี เช่น ตัวอย่างการตรวจเซลล์มะเร็งที่แสดงออกโปรตีน p16^{INK4a} โดยใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อบนกระจกสไลด์

5 ซึ่งในที่นี้ใช้เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ไอโซไซยาเนตทำหน้าที่เป็นโมเลกุลติดตามการตรวจจับโปรตีนเป้าหมาย

เมื่อนำเปปไทด์ที่ติดฉลากไปใช้ตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ปฏิกิริยาการจับจำเพาะระหว่างเปปไทด์ตรวจจับกับโปรตีน p16^{INK4a}

10 บนตัวอย่างชิ้นเนื้อสามารถตรวจวัดได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์วัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถกระตุ้นการเรืองแสงและตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ไอโซไซยาเนตที่ความยาวคลื่นประมาณ 490 และ 521 นาโนเมตรตามลำดับ ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 6

นอกจากการตรวจติดตามการจับกันระหว่างเปปไทด์ตรวจจับกับโปรตีน p16^{INK4a}

โดยอาศัยการติดฉลากเปปไทด์ด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์แล้ว

การปรับปรุงกระบวนการในการตรวจติดตามปฏิกิริยาการจับกันระหว่างกลุ่มสาร

15 ชีวโมเลกุลจำพวกโปรตีนกับเปปไทด์ตรวจจับเพื่อให้มีความเหมาะสมกับการใช้งานบริการการตรวจทางพยาธิวิทยาประจำวัน จะช่วยให้สามารถนำเปปไทด์ตรวจติดตามไปใช้งานในโรงพยาบาลได้อย่างแพร่หลายมากขึ้น อาทิ การใช้

เปปไทด์ที่แสดงออกบนอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจมาดัดแปลงให้เป็นเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามชนิดอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยสารชีวโมเลกุลที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์เรดิสเปอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase; HRP) ตัวอย่างการเลือกใช้สารโมเลกุลชีวเคมีสำหรับกรณีนี้ เช่น

20 ใช้โมเลกุลชีวเคมีเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจเมื่อทำปฏิกิริยาจับคู่กันระหว่างโมเลกุลแอนติบอดีซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์เรดิสเปอร์ออกซิเดสกับกลุ่มโปรตีนบนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจก็จะเกิดการเคลือบโมเลกุลแอนติบอดีซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์เรดิสเปอร์ออกซิเดสดังกล่าวอยู่บนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจจำนวนมาก จากนั้นตรวจวัดสัญญาณโดยใช้ ซับสเตรทของเอนไซม์ดังกล่าว เช่น 3,3'-ไดอะมีโนเบนซิดีน (3,3'-Diaminobenzidine; DAB) จะทำให้เกิดสีขึ้นในตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ขึ้น

25 ซึ่งสามารถตรวจติดตามปฏิกิริยาได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์สำหรับงานพยาธิวิทยาที่ใช้ทั่วไป

ทำให้การประยุกต์นำเปปไทด์ตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}

ไปใช้ในงานตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาสามารถถ่ายทอดสู่การใช้งานจริงได้ทันทีโดยไม่ต้องเพิ่มเติมอุปกรณ์การตรวจสัญญาณพิเศษอื่นๆ ดังตัวอย่างในรูปที่ 7

ซึ่งจากรูปได้แสดงการตรวจชิ้นเนื้อมะเร็งด้วยการย้อมสีฮีมาทอกซึลีนและอีโอซิน (Hematoxylin and Eosin; H&E)

30 ซึ่งเป็นเทคนิคการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อในงานตรวจทางพยาธิวิทยามาตรฐาน เปรียบเทียบกับการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่าง

โดยการติดฉลากเปปไทด์ด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์เรดิสเปอร์ออกซิเดส เพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างชิ้นเนื้อ จากนั้นจึงใส่ซับสเตรทของเอนไซม์ 3,3'-ไดอะมีโนเบนซิดีน

35 ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจพบแถบสีน้ำตาลของเซลล์ที่ผิดปกติในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในงานตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาทั่วไป นอกจากนี้ สาร

โมเลกุลชีวเคมีดังกล่าวอาจเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาแล้วทำให้เกิดสี โปรตีนที่มีคู่อปฏิกิริยาสำหรับการตรวจติดตาม เช่น โปรตีนอะวีนินและไบโอติน หรือโปรตีนในกลุ่มแอนติบอดีสำหรับการติดตาม เป็นต้น

โมเลกุลติดตามที่ใช้ติดตามเปปไทด์ตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}

จะสามารถเลือกได้จากสารเคมีหรือโมเลกุลชีวเคมีหลายประเภทดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

และยังสามารถเลือกใช้สารในกลุ่มเรดิโอไอโซโทปหรือสารเรืองแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์เพิ่มเติมได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม

สารเรดิโอไอโซโทปเป็นสารที่อันตราย ไม่เสถียร ดูแลรักษายาก

5 จึงไม่เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ในการบริการตรวจประจำวัน

ส่วนสารเรืองแสงเคมีลูมิเนสเซนซ์แม้จะเป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้งาน แต่สัญญาณที่เกิดขึ้นจะไม่คงทน

อีกทั้งกระบวนการตรวจติดตามต้องอาศัยปฏิกิริยาเคมีมีกระบวนการยุ่งยาก

การใช้สารเคมีในกลุ่มสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ติดตามเปปไทด์โดยตรงหรือเคลือบบนพื้นผิวอนุภาคตรวจติดตามเพื่อช

10 วยขยายสัญญาณในการตรวจติดตามโปรตีน p16^{INK4a}

จึงเป็นตัวอย่างที่ดีตัวอย่างหนึ่งที่สามารถประยุกต์ใช้ได้กับการตรวจทั้งในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อ ดังแสดงในรูปที่ 3-6

สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นสารที่ให้ความไวในการตรวจติดตามสูง

อีกทั้งการติดตามบนเปปไทด์โดยตรงยังทำได้ง่ายผ่านหมู่ทำปฏิกิริยาเอ็นเอชเอส บนสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์กับหมู่

เอมีนของเปปไทด์ ทำให้การตรวจติดตามสะดวกขึ้น นอกจากนี้ การใช้เปปไทด์ตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} ที่ใช้อนุภาค

15 แบนคเทอร์โอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นโมเลกุลติดตามดังตัวอย่างข้างต้นยังสามารถช่วย

เพิ่มความไวให้กับเทคนิคการใช้เปปไทด์ตรวจจับได้อีกหลายเท่าตัวจากการเพิ่มจำนวนพื้นที่ผิวสำหรับใช้ติดตามโมเลกุล

ติดตามที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการทำให้อนุภาคแบนคเทอร์โอฟาจแสดงเปปไทด์บนผิวอนุภาคทำได้โดยการติดต่อลำดับดีเอ็นเอ (DNA)

ที่สามารถถอดรหัสเป็นสายเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 หรือ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 หรือ เปปไทด์ลำดับกรด

อะมิโนที่ 3

20 ลงในดีเอ็นเอของอนุภาคแบนคเทอร์โอฟาจซึ่งใช้เซลล์แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้านตรงตำแหน่งที่ควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้ม

ที่ผิวอนุภาคแบนคเทอร์โอฟาจ ทำให้เกิดการสร้างสายเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 หรือ

เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 รูปแบบใดรูปแบบหนึ่งบนผิวอนุภาคแบนคเทอร์โอฟาจ ซึ่งช่วยขยายสัญญาณตรวจวัดได้

เนื่องจากแบนคเทอร์โอฟาจดังกล่าว 1

อนุภาคสามารถติดตามหรือเคลือบด้วยโมเลกุลติดตามชนิดสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้หลายร้อยโมเลกุลต่อหนึ่งอนุภา

ก

25 นอกจากนี้การใช้อนุภาคแบนคเทอร์โอฟาจชนิดที่ใช้เซลล์แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ผ่านกระบวนการติดต่อดีเอ็นเอให้สาม

ารแสดงเปปไทด์ตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} บนผิวอนุภาค ยังทำให้การผลิตเพิ่มจำนวนอนุภาคตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}

ดังกล่าว

สามารถทำได้ครั้งหนึ่งเป็นจำนวนมากด้วยระบบการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียมาตรฐานซึ่งมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตโปรตีน

นแอนติบอดีมากกว่าสิบเท่าตัว

30 แม้ว่า การใช้สารเคมีเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ติดตามเปปไทด์โดยตรงหรือใช้สารเคมีเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ติดตาม

ลากบนผิวอนุภาคที่มีเปปไทด์บนพื้นผิวเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} จะให้ความไวในการตรวจสูง

กระบวนการย่อมไม่ซับซ้อน

แต่การตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จำเป็นต้องใช้กล้องวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ซึ่งมีราคาแพงและไม่ค่อยใช้ทั่วไปในห้อง

ปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก

35 ดังนั้นถ้าจะให้ดีแล้วควรเลือกใช้โมเลกุลชีวเคมีที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีซึ่งสามารถตรวจ

วัดได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาที่มีใช้อยู่ทั่วไป ตัวอย่างเช่น ติดตาม

เปปไทด์ด้วยอนุภาคแบนคเทอร์โอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวอนุภาคแบนคเทอร์โอ

ฟาจซึ่งเชื่อมต่อกับแอนติบอดีฮอร์เรติสเปอร์ออกซิเดส

เพื่อใช้ในตัวอย่างตรวจผ่านปฏิกิริยาเคมีร่วมกับซัสเตรทที่ทำให้เกิดสี

ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ต้องการตรวจบนกระจกสไลด์นี้ มีหลักการคือ
ทำการเตรียมเซลล์หรือชิ้นเนื้อบนกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วยสารที่มีประจุบวก
โดยสารที่มีประจุบวกที่ใช้เคลือบบนกระจกสไลด์ดังกล่าว เลือกได้จากโพลีไลซีน หรือโพเอมีน
แต่สำหรับกรณีของการเตรียมชิ้นเนื้อบนกระจกสไลด์จะต้องทำการเตรียมตัวอย่างในอ่างน้ำเปล่าที่ไม่ผสมสารช่วยในการยึด
เกาะ ซึ่งขออธิบายตัวอย่างการเตรียมตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อ ดังนี้

5 การเตรียมตัวอย่างตรวจที่เป็นเซลล์โดยการตรึงเซลล์บนสไลด์ เช่น ตัวอย่างเซลล์จากแปปสเมียร์ (pap smear)
เพื่อตรวจเซลล์ปากมดลูกที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} สูง ซึ่งเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งปากมดลูก
โดยเก็บและเตรียมตัวอย่างแบบดั้งเดิมซึ่งใช้อุปกรณ์สำหรับขูดตัวอย่างเซลล์ (scraper) หรือการเตรียมตัวอย่างแบบใหม่
(liquid-based cervical cytology) เซลล์ที่เก็บได้จะถูกนำไปเตรียมเป็นสเมียร์เซลล์ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์บนกระจกสไลด์
10 จากนั้นทำการรักษาสภาพด้วยน้ำยารักษาสภาพเซลล์หรือแช่สไลด์ใน 95% เอทานอล 15 นาที ถึง 24
ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์มาผึ่งให้แห้ง ก่อนการกินสภาพโปรตีน p16^{INK4a}
และการย้อมด้วยเปปไทด์เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการตรวจจับในขั้นต่อไป

สำหรับการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการรักษาสภาพโดยการเอาน้ำออกและเก็บรักษาในบล็อกพาราฟิ
นบนกระจกสไลด์

15 เริ่มจากนำบล็อกพาราฟินไปตัดเป็นแผ่นด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อโดยปรับความหนาของการตัดชิ้นเนื้อให้อยู่ที่ประมาณ 3
ไมครอน ใช้น้ำแข็งถูบล็อกพาราฟินให้เย็นเพื่อช่วยให้บล็อกแข็งทำให้ตัดชิ้นเนื้อได้ง่ายขึ้น

บล็อกชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วจะได้เป็นแถบพาราฟิน

ใช้ปากคีบจับแถบพาราฟินไปลอยในอ่างน้ำเปล่าที่ไม่ผสมสารช่วยในการยึดเกาะ (สารยึดเกาะที่นิยมใช้ เช่น เจลาติน)
ที่อุณหภูมิประมาณ 43 องศาเซลเซียส ระวังอย่าให้แถบพาราฟินพลิกด้าน

20 ใช้ปากคีบเขี่ยแยกแถบพาราฟินที่มีสภาพตัวอย่างเนื้อสมบูรณ์เพื่อซ่อนวางบนกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วยสารที่ช่วยให้ชิ้นเนื้อ
ยึดเกาะบนสไลด์ เช่น 3-อะมิโน โพรพิล ไตรเอโทซิลาน (3-aminopropyltriethoxysilane) หรือ อัลบูมิน (Albumin)
ตากสไลด์ให้แห้งสนิทในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนจึงนำสไลด์ออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
ก่อนกระบวนการกินสภาพโปรตีนและกระบวนการย้อมด้วยเปปไทด์ตรวจติดตาม ต้องนำสไลด์ชิ้นเนื้อไปล้างแว็กซ์
ล้างพาราฟินและทำการกินน้ำให้กับชิ้นเนื้อโดยนำสไลด์ชิ้นเนื้อไปจุ่มในโทไซลีน (xylene) เข้มข้น 2 โด โดละ 3 นาที
25 ตามด้วย 1:1 โไซลีน:เอทานอล (xylene:ethanol) 3 นาที แล้วจึงคืนน้ำในกับชิ้นเนื้อโดยจุ่มในเอทานอลเข้มข้น 2 ครั้ง
ครั้งละ 3 นาที ตามด้วย เอทานอล 90% และ 70% อย่างละ 3 นาที ตามลำดับ

3.2 การกินสภาพโปรตีน (antigen retrieval)

ของตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ต้องการตรวจด้วยแอนติบอดีหรือความร้อน

30 เนื่องจากตัวอย่างชิ้นเนื้อหรือตัวอย่างเซลล์ที่ผ่านกระบวนการรักษาสภาพโดยการแช่ในฟอร์มาลินหรือน้ำยารักษา
สภาพอื่นๆ มาเป็นเวลานาน จะทำให้โปรตีนเป้าหมายหรือโปรตีนแอนติเจนในตัวอย่างตรวจเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ
และเกิดการบดบังโปรตีนเป้าหมายทำให้ไม่สามารถจับกับเปปไทด์ตรวจติดตามได้

การบดบังการเกิดปฏิกิริยานี้อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเกิดพันธะเชื่อมโยง (cross-link)

ระหว่างตำแหน่งจับจำเพาะของเปปไทด์ หรืออาจเกิดพันธะเชื่อมโยงกับเปปไทด์อื่นๆ บริเวณใกล้เคียงในตัวอย่างตรวจ
การเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงประจุไฟฟ้าสถิต (electrostatic charge)

35 และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนที่ตำแหน่งจับจำเพาะแบบชั่วคราว ดังนั้น

ก่อนกระบวนการย้อมเซลล์หรือชิ้นเนื้อด้วยเปปไทด์ตรวจติดตามเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการตรวจจับ

จึงต้องทำการกินสภาพโปรตีนในตัวอย่างก่อน ตัวอย่างเทคนิคที่สามารถใช้ในการกินสภาพโปรตีนแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่
ได้แก่ เทคนิคที่อาศัยความร้อนในการกินสภาพโปรตีนและเทคนิคที่อาศัยแอนติบอดีในการกินสภาพโปรตีน

3.2.1 เทคนิคที่อาศัยความร้อนในการกินสภาพโปรตีน

อุปกรณ์และสารเคมีที่สำคัญในการคืนสภาพโปรตีนโดยอาศัยความร้อน ประกอบด้วย อุปกรณ์ให้ความร้อน เช่น อ่างน้ำชนิดควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่สามารถปรับอุณหภูมิได้ถึง 95-99 องศาเซลเซียส, ไมโครเวฟ, หม้อความดัน, หม้อนึ่งผัก หรือหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออโตเครป (autoclave) และบัฟเฟอร์สำหรับคืนสภาพโปรตีน เช่น ซิเตรทบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) หรือบัฟเฟอร์ปรับกรด-ด่าง (TBS buffer) เป็นต้น

- 5 การคืนสภาพโปรตีนทำได้โดยนำสไลด์เซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการล้างพาราฟินและคืนน้ำให้กับตัวอย่างเรียบร้อยแล้วไปแช่ในบัฟเฟอร์สำหรับคืนสภาพและให้ความร้อนที่เวลาต่าง ๆ กันตามแต่ชนิดของอุปกรณ์ให้ความร้อน ดังแสดงในรูปที่ 8 และจากรูปที่ 9 จะพบว่าเมื่อเปรียบเทียบผลการคืนสภาพโปรตีนของตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อ โดยการต้มตัวอย่างให้เดือดอย่างต่อเนื่องในไมโครเวฟจะให้ผลดีกว่าการต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยการต้มตัวอย่างให้เดือดอย่างต่อเนื่องในไมโครเวฟ จะใช้เวลา 20 - 25 นาที
- 10 ในบัฟเฟอร์คืนสภาพที่มีค่าพีเอชเป็นต่างในช่วง 8 - 10 และจะให้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์คืนสภาพเท่ากับ 9

3.2.2 เทคนิคที่อาศัยเอนไซม์ในการคืนสภาพโปรตีน

เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการคืนสภาพโปรตีนอาจใช้เป็น โปรตีนเนส (Proteinase K), ทริปซิน (Trypsin), เปปซิน (Pepsin), โปรเนส (Pronase) หรือ โปรตีนเนส (proteinase) โดยนำเอนไซม์ต่างๆ

ไปทำปฏิกิริยากับตัวอย่างเนื้อหรือเซลล์บนสไลด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-20 นาที

- 15 ก่อนนำไปล้างและเข้าสู่กระบวนการย้อมด้วย เปปไทด์ตามการประดิษฐ์นี้ สำหรับตัวอย่างในรูปที่ 6 และ 7 แสดงภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยเปปไทด์จับจำเพาะซึ่งผ่านกระบวนการคืนสภาพโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ทริปซินและอาศัยความร้อนจากไมโครเวฟร่วมกับทริสบัฟเฟอร์ปรับกรด-ด่าง (Tris buffer; pH 9) ตามลำดับ

3.3 การนำตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ผ่านการคืนสภาพโปรตีนแล้ว

ไปทำปฏิกิริยากับเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามตามลักษณะการประดิษฐ์นี้

- 20 ตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการเตรียมอย่างเหมาะสมแล้วจากข้อ 3.1 และ 3.2 จะถูกนำไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาการจับกันอย่างไม่จำเพาะของโปรตีนโดยใช้บัฟเฟอร์ผสมโบวายซีรั่มอัลบูมิน (blocking buffer) หรืออาจใช้ซีรั่มของสัตว์อื่นๆ เช่น ม้า, วัว, แกะ, หมู, ลิง หรือ กระต่าย 10% ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยเทบัฟเฟอร์ดังกล่าวลงบนตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อในกล่องเก็บความชื้น (humidify chamber) จากนั้นบ่มเซลล์หรือชิ้นเนื้อดังกล่าวในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 30 - 120 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 25 สารละลายเหล่านี้จะช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาจับกันที่ไม่จำเพาะของ เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามตามการประดิษฐ์นี้กับโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างตรวจได้ จากนั้นซับบัฟเฟอร์ออก (โดยไม่ต้องล้าง) ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามตามการประดิษฐ์นี้ สำหรับตรวจติดตามประมาณ 10¹² โมเลกุล ซึ่งคิดเป็นค่าความเข้มข้นของเปปไทด์ในช่วงความเข้มข้น 25 - 100 ไมโครโมลาร์ หรือ คิดเป็นน้ำหนักของเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1, เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 และ
- 30 เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 ประมาณ 1.378, 1.380 และ 1.618 นาโนกรัม ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างเปปไทด์ส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ปรับกรด-ด่างผสมสารลดแรงตึงผิวที่มีค่าพีเอชในช่วง 7.3-7.5 ที่ผสมด้วยสารลดแรงตึงผิวไตรตันเอกซ์ 100 (triton-x 100) 0.025% หรือการใช้บัฟเฟอร์ดังกล่าวที่ไม่ผสมด้วยสารลดแรงตึงผิว หรือสารละลายบัฟเฟอร์อื่นที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ก่อนนำไปตรวจติดตามด้วยเทคนิคต่างๆ ตามแต่ชนิดโมเลกุลหรือสารเคมีที่ใช้ติดฉลากเปปไทด์

- 35 3.4 การตรวจติดตามปฏิกิริยาจับจำเพาะระหว่างตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อกับเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม

ขั้นตอนการตรวจติดตามปฏิกิริยาจับจำเพาะระหว่างตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อกับเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามที่ได้จากข้อ 3.3 ทำได้โดยการตรวจติดตามด้วยเทคนิคต่าง ๆ ตามแต่นิยามโมเลกุลหรือสารเคมีที่ใช้ติดฉลากเปปไทด์

- ตัวอย่างเช่น เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เรืองแสงฟลูออเรสซินไอโซไซโรไอโซยานาต (Fluorescein isothiocyanate; FITC) สามารถตรวจติดตามการจับกับของเปปไทด์กับโปรตีน p16^{INK4a}
- 5 ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์วัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถกระตุ้นการเรืองแสงและตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสซิน ไอโซไซโรไอโซยานาตที่ความยาวคลื่นที่ประมาณ 490 และ 521 นาโนเมตรตามลำดับ ซึ่งจะให้ภาพสัญญาณดังแสดงในรูปที่ 6
- หรือกรณีที่ใช้เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์เรดิสเปอร์ออกซิเดส เพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a}
- 10 จากนั้นในขั้นตอนการติดตามปฏิกิริยาการจับจำเพาะ จะทำการใส่สาร 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีน ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งจะช่วยให้สามารถตรวจวัดโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างชิ้นเนื้อได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยาทั่วไปได้ ดังแสดงในรูปที่ 7 เป็นต้น

ตัวอย่างการใช้กรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้ในการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อ

- เมื่อทดลองใช้กรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้ในการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อ
- 15 พบว่ากรณีของการเตรียมตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อสำหรับการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ด้วยเปปไทด์ตรวจติดตามสามารถใช้ได้ผลดีและสะดวกเหมาะสมกับการใช้ในงานบริการตรวจประจำวัน อย่างไรก็ตาม เทคนิคการคืนสภาพโปรตีนเป็นขั้นตอนที่มีผลอย่างมากต่อปฏิกิริยาการตรวจติดตามด้วยเปปไทด์ตามการประดิษฐ์นี้กับโปรตีน p16^{INK4a}
- 20 เทคนิคที่อาศัยเอนไซม์ในการคืนสภาพโปรตีนแม้ว่าจะจะเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ได้กับทั้งตัวอย่างเซลล์และตัวอย่างชิ้นเนื้อทั่วไป

แต่การใช้เอนไซม์คืนสภาพโปรตีนมีขั้นตอนการเตรียมยุ่งยากและทำให้การตรวจวินิจฉัยจำเป็นต้องใช้งบประมาณเพิ่มเติมสำหรับเอนไซม์และสารเคมีอื่นๆ ในการตรวจแต่ละตัวอย่าง อีกทั้งเทคนิคดังกล่าวยังใช้ไม่ได้ผลดีนักกับโปรตีนส่วนใหญ่

- 25 การใช้วิธีที่อาศัยความร้อนจึงเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมกับการนำไปใช้ในการตรวจในห้องปฏิบัติการคลินิกกับตัวอย่างจำนวนมาก

ซึ่งจากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการคืนสภาพโปรตีนในบัฟเฟอร์ต้มเดือดโดยใช้ไมโครเวฟสามารถใช้คืนสภาพโปรตีน p16^{INK4a}

- 30 และทำปฏิกิริยากับเปปไทด์จับจำเพาะได้ดีกว่าและใช้เวลาสั้นกว่าการคืนสภาพโปรตีนในน้ำร้อนโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ดังแสดงในรูปที่ 9 จากรูปได้แสดงบริเวณเซลล์ผิดปกติที่มีการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a} มากผิดปกติเป็นสีน้ำตาลเข้มในตัวอย่างที่ผ่านการคืนสภาพโปรตีนในบัฟเฟอร์ที่จุดเดือดด้วยไมโครเวฟ
- จากปฏิกิริยาตรวจติดตามโดยใช้อนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์เรดิสเปอร์ออกซิเดสเป็นโมเลกุลติดตาม

- 35 ร่วมกับซับสเตรทของเอนไซม์ดังกล่าว คือ 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีน ซึ่งสามารถให้ความชัดเจนของแถบสีบริเวณเซลล์ผิดปกติที่เกิดจากปฏิกิริยาจับจำเพาะชัดเจนกว่าตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการคืนสภาพโปรตีนโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

จากรายละเอียดการประดิษฐ์และตัวอย่างทั้งหมดดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามเพื่อการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} สามารถใช้ในการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อได้จริง และจะให้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ตามกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้

ซึ่งต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมเซลล์หรือชิ้นเนื้อให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมก่อนการทำปฏิกิริยาตรวจจับโปรตีน โดยผลิตภัณฑ์และกรรมวิธีตามรายละเอียดการประดิษฐ์นี้จะช่วยให้สามารถช่วยแบ่งแยกข้อแตกต่างของเซลล์ที่ผิดปกติออกจากเซลล์ปกติได้ดีกว่าการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a}

มากกว่าการติดตามสัญญาณที่มีระดับความเข้มของสัญญาณที่แตกต่างกัน

5 ซึ่งสัญญาณดังกล่าวเป็นผลมาจากการตรวจจับการแสดงออกของโปรตีน p16^{INK4a}

ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ การเกิดปฏิกิริยาจับจำเพาะระหว่างเปปไทด์กับโปรตีน

p16^{INK4a} ตามลักษณะการประดิษฐ์นี้ จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของลำดับกรดอะมิโนแต่ละตัวเป็นสำคัญ

ซึ่งแตกต่างจากการใช้แอนติบอดีเป็นโมเลกุลตรวจจับซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าเปปไทด์ประมาณ 150 เท่า

และจำเป็นต้องอาศัยรูปร่างโครงสร้างโมเลกุลของส่วนจับจำเพาะของแอนติบอดีในการเกิดปฏิกิริยาจับกับโปรตีน p16^{INK4a}

10 จากข้อแตกต่างนี้ ทำให้การผลิตเปปไทด์ตรวจติดตามโดยใช้เครื่องสังเคราะห์เปปไทด์

สามารถทำได้โดยยังรักษาประสิทธิภาพการทำงานของเปปไทด์ได้อย่างสมบูรณ์

ขณะการผลิตแอนติบอดียังจำเป็นต้องทำในสิ่งมีชีวิตหรือต้องสกัดจากเซลล์สัตว์ที่เลี้ยงขึ้นในห้องทดลองปราศจากเชื้อ

จากกระบวนการผลิตที่แตกต่างกันนี้ ทำให้การผลิตเปปไทด์ตรวจติดตามที่มีความบริสุทธิ์สูงสามารถทำได้ครั้งละมาก ๆ

อีกทั้งยังมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าแอนติบอดีหลายเท่าตัว นอกจากนี้ เปปไทด์ตรวจติดตามโปรตีน p16^{INK4a}

15 ยังมีความเสถียรสูงสามารถนำไปประยุกต์ใช้และดัดแปลงเพื่อพัฒนา รวมถึงเพิ่มความไวและความจำเพาะให้งานตรวจติดตามได้หลากหลาย

การนำเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะทั้งสามรูปแบบตามการประดิษฐ์นี้ไปดัดแปลงใช้ในรูปของโมเลกุลติดตามที่เป็นอนุภาค

แบบแคเทอรีโอฟาจโดยการต่อติดดีเอ็นเอที่มีรหัสเบสตรงกับกำหนดสร้างเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 หรือ

เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 หรือ เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3 รูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง

20 ลงโนติเอ็นเอตรงตำแหน่งที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ผิวของแคเทอรีโอฟาจให้สามารถแสดงเปปไทด์ตรวจติดตามทั้งสามรูปแบบนี้ที่ผิวอนุภาคสามารถทำได้ และทำให้สามารถผลิตเพิ่มจำนวนแคเทอรีโอฟาจที่สามารถตรวจจับโปรตีน

p16^{INK4a} ได้ครั้งละจำนวนมาก ๆ โดยระบบการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ

อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความไวให้กับระบบการตรวจติดตามจากการที่มีเปปไทด์ที่ติดฉลากจำนวนมากที่เพิ่มขึ้นบนอนุภาค

แคเทอรีโอฟาจอีกด้วย ดังนั้น กล่าวโดยสรุปแล้วผลิตภัณฑ์และกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้มีข้อดี ทั้งในแง่ความไวสูง

25 มีความเสถียร ให้สัญญาณที่ชัดเจน ไม่มีสัญญาณรบกวนและผลบวกปลอม ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างง่าย อีกทั้ง

ยังสามารถผลิตเพิ่มจำนวนเปปไทด์ได้ครั้งละมาก ๆ ด้วยการผลิตที่ไม่ยุ่งยากและต้นทุนต่ำกว่าการผลิตแอนติบอดีมาก

จึงมีความเหมาะสมและมีศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้กับงานบริการตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิกประจำวันที่ต้องการความถูกต้อง

ชัดเจน โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ และมีต้นทุนต่ำ

การประดิษฐ์นี้จึงมีศักยภาพสูงในการถ่ายทอดสู่การผลิตเชิงอุตสาหกรรมเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการตรวจติดตามการแสดง

30 ออกของโปรตีน p16^{INK4a} ในเซลล์หรือชิ้นเนื้อ ตัวอย่างเช่น การตรวจเพื่อแบ่งแยกเซลล์มะเร็งออกจากเซลล์ปกติ

หรือการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจติดตามโปรตีน p16^{INK4a} ที่เกี่ยวข้องต่อไป เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Romagosa C., et al., p16^{INK4a} overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*, 2011, 30(18): p. 2087-2097.
- 35 2. Bahnassy A.A., et al., The role of cyclins and cyclins inhibitors in the multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2006, 18(4): p. 292-302.
3. Huang L.W. and Lee C.C., p16^{INK4a} overexpression predicts lymph node metastasis in cervical carcinomas. *J Clin Pathol*, 2012, 65: p. 117-121.

4. Benevolo M., et al., Immunohistochemical expression of p16^{INK4a} is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol*, 2006. 19(3): p. 384-391.
5. Ma C. and Lewis J., Small Biopsy Specimens Reliably Indicate p16 Expression Status of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol*: p. 1-8.
- 5 6. Thomas J. and Primeaux T., Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Annals of Diagnostic Pathology*, 2012. 16(2):p. 91-99
7. Queiroz C., et al., P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract*, 2006. 202(2): p. 77-83.
- 10 8. Redman R., et al., The utility of p16(Ink4a) in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. *Arch Pathol Lab Med*, 2008. 132(5): p. 795-9.
9. von Keyserling H., et al., p16^{INK4a} and p14ARF mRNA expression in Pap smears is age-related. *Mod Pathol*. 2012. 25(3): p. 465-470.
10. Zhou J., et al., A 115-bp MethyLight assay for detection of p16 (CDKN2A) methylation as a diagnostic biomarker in human tissues. *BMC Med Genet*. 2011. 12(1): p. 67.
- 15 11. Wang J.L., et al., p16^{INK4a} and p14ARF expression pattern by immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Mod Pathol*, 2004. 18(5): p. 629-637.
12. Haller F., et al., Expression of p16^{INK4a} in gastrointestinal stromal tumours (GISTs): two different forms exist that independently correlate with poor prognosis. *Histopathology*, 2010. 56(3): p. 305-318.
- 20 13. Buajeeb W., et al., Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*, 2009. 38(1): p. 104-108.
14. Ordi J., et al., p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol*, 2009. 28(1): p. 90-7.
- 25 15. Dray M., et al., p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*, 2005. 37(2): p. 112-24.

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ดั่งที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถือสิทธิ

1. เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามซึ่งมีความจำเพาะกับการตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} โดยที่เปปไทด์ดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโนที่เลือกได้จากลำดับกรดอะมิโนที่ 1 คือ SHSLHH (ser-his-ser-leu-leu-his-his)
5 ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 คือ SLHQPHL (ser-leu-his-gln-pro-his-leu) หรือลำดับกรดอะมิโนที่ 3 คือ YAWDTYR (tyr-ala-trp-asp-thr-tyr-arg) อย่างใดอย่างหนึ่ง
2. เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม ตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่งเปปไทด์ที่ดีที่สุด คือ เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็นลำดับกรดอะมิโนที่ 1 คือ SHSLHH (ser-his-ser-leu-leu-his-his)
3. เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม ตามข้อถือสิทธิ 1
10 ที่ซึ่งโมเลกุลติดตามเลือกได้จากโมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นสารเคมี โมเลกุลชีวเคมี หรืออนุภาคตรวจติดตาม อย่างใดอย่างหนึ่ง
4. เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม ตามข้อถือสิทธิ 3 ที่ซึ่งโมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นสารเคมีเลือกได้จากสารเคมีที่มีคุณสมบัติเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ สารประกอบเชิงซ้อนและไอออนเชิงซ้อนที่มีสี
15 หรือสารประกอบที่อาศัยปฏิกิริยาเคมีทำให้เกิดสีหรือเกิดสัญญาณแสงได้ อย่างใดอย่างหนึ่ง
5. เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม ตามข้อถือสิทธิ 3 ที่ซึ่งโมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นโมเลกุลชีวเคมีเลือกได้จากโปรตีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เอนไซม์ หรือโปรตีนที่มีคู่ปฏิกิริยาสำหรับตรวจติดตาม อย่างใดอย่างหนึ่ง
6. เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม ตามข้อถือสิทธิ 3
20 ที่ซึ่งโมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นอนุภาคตรวจติดตาม เลือกได้จากอนุภาคแบคทีเรียโอฟาจหรืออนุภาคโลหะที่ถูกเคลือบผิวด้วยโมเลกุลติดตามในกลุ่มสารเคมีหรือโมเลกุลชีวเคมี หรืออนุภาคนาโนที่ผลิตขึ้นโดยอาศัยสารประกอบเคมี อย่างใดอย่างหนึ่ง
7. เปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม ตามข้อถือสิทธิ 3 หรือ 6
25 ที่ซึ่งโมเลกุลติดตามในกลุ่มที่เป็นอนุภาคตรวจติดตามที่เหมาะสมที่สุด คืออนุภาคแบคทีเรียโอฟาจที่ถูกเคลือบผิวด้วยโมเลกุลติดตามในกลุ่มสารเคมีหรือโมเลกุลชีวเคมี
8. กรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ในตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อ
ด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม ตามข้อถือสิทธิ 1 - 7 ข้อใดข้อหนึ่ง
ที่ซึ่งกรรมวิธีดังกล่าวประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้
(1) การเตรียมตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ต้องการตรวจบนกระจกสไลด์
30 (2) การคืนสภาพโปรตีนของตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ต้องการตรวจจากข้อ (1) ด้วยเอนไซม์หรือความร้อน
(3) การนำตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ผ่านการคืนสภาพโปรตีนแล้ว จากข้อ (2) ไปหาปฏิกิริยากับเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม ตามข้อถือสิทธิ 1 - 7 ข้อใดข้อหนึ่ง
(4)
35 การตรวจติดตามปฏิกิริยาจับจำเพาะระหว่างตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อกับเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม ที่ได้จากข้อ (3)

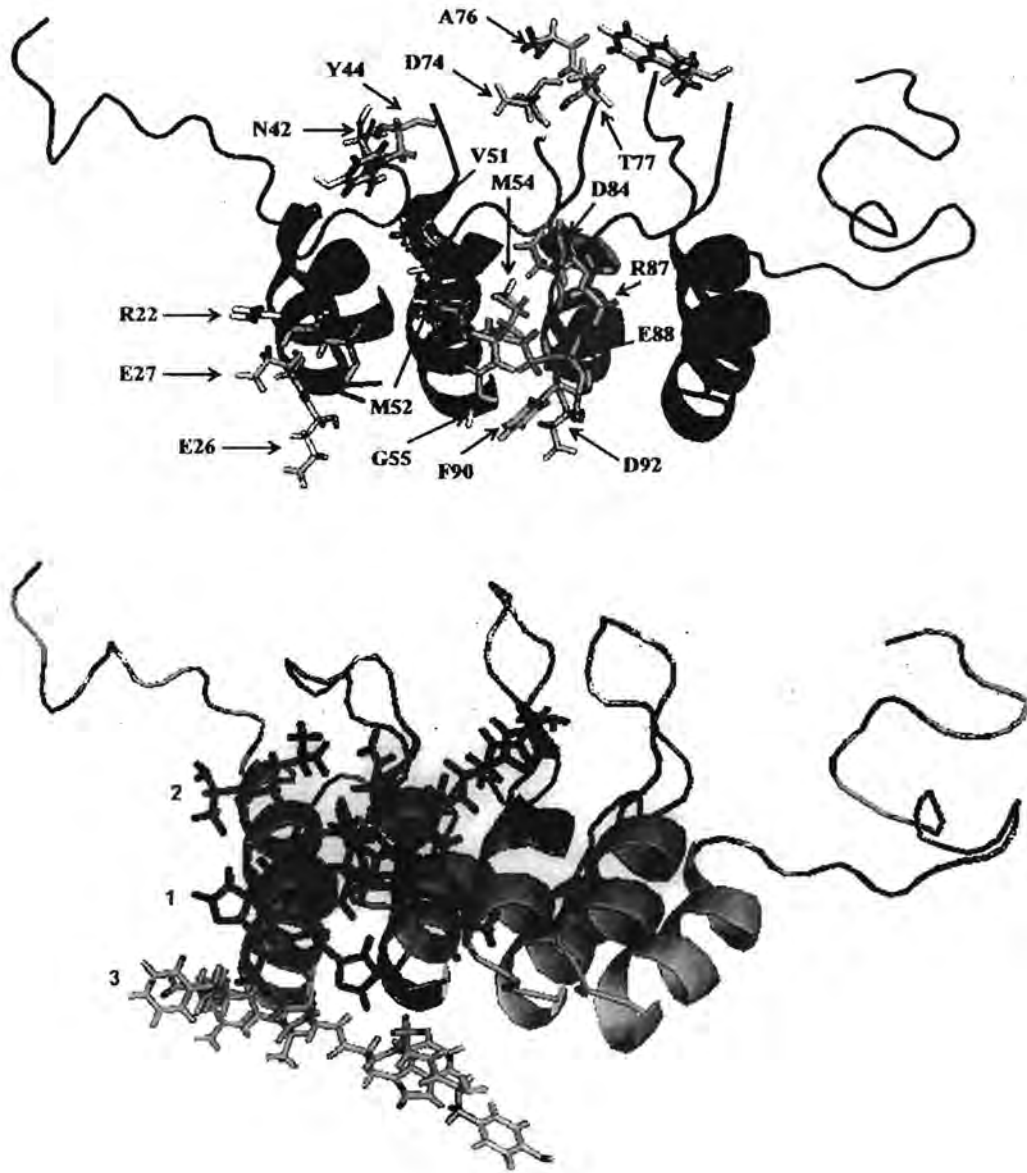
- 9 กรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ตามข้อถือสิทธิ 8
ที่ซึ่งตัวอย่างเซลล์ได้มาจากเซลล์เยื่อบุผิวที่ต้องการตรวจโดยตรง
หรือเซลล์ที่แยกได้จากตัวอย่างสวาคัดหลัง เยื่อเมือก หรือเสมหะของผู้ป่วย อย่างใดอย่างหนึ่ง
- 10 กรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ตามข้อถือสิทธิ 8
5 ที่ซึ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อได้มาจากชิ้นเนื้อของอวัยวะที่ต้องการตรวจซึ่งผ่านกระบวนการเก็บรักษาโดยการเอาหน้า
ออกและเก็บรักษาในบล็อกพาราฟิน
- 11 กรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ตามข้อถือสิทธิ 8
ที่ซึ่งการเตรียมตัวอย่างเซลล์ที่ต้องการตรวจบนกระจกสไลด์
ทำได้โดยการตรึงเซลล์บนกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วยสารที่มีประจุบวก
10 จากนั้นนำไปเก็บรักษาสภาพด้วยการแช่ในน้ำยารักษาสภาพ
- 12 กรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ตามข้อถือสิทธิ 8
ที่ซึ่งการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ต้องการตรวจบนกระจกสไลด์
ทำได้โดยการเตรียมชิ้นเนื้อบนกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วยสารที่มีประจุบวกในอ่างน้ำเปล่าที่ไม่ผสมสารช่วยใ
นการยัดเกาะ
- 15 13 กรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ตามข้อถือสิทธิ 11 หรือ 12
ที่ซึ่งสารที่มีประจุบวกที่ใช้เคลือบบนกระจกสไลด์ เลือกได้จากโพลีไลซีน หรือโพเอมีน อย่างใดอย่างหนึ่ง
- 14 กรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ตามข้อถือสิทธิ 8
ที่ซึ่งการคืนสภาพโปรตีนของตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อด้วยความร้อน
ทำได้โดยการต้มตัวอย่างให้เดือดอย่างต่อเนื่องในไมโครเวฟเป็นเวลา 20 - 25 นาที
20 ในบัฟเฟอร์คืนสภาพที่มีค่าพีเอชเป็นต่างในช่วง 8 - 10
- 15 15 กรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ตามข้อถือสิทธิ 14 ที่ซึ่งค่าพีเอชของบัฟเฟอร์คืนสภาพที่ดีที่สุด คือ 9
- 16 กรรมวิธีการตรวจหาโปรตีน p16^{INK4a} ตามข้อถือสิทธิ 8
ที่ซึ่งขั้นตอนการนำตัวอย่างเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ผ่านการคืนสภาพโปรตีนแล้ว
ไปทำปฏิกิริยากับเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตาม
25 ทำได้โดยการยับยั้งบริเวณช่องว่างที่อาจทำให้เกิดเกาะติดอย่างไม่จำเพาะด้วยบัฟเฟอร์ผสมโปรตีนโบวายซี
รัมอัลบูมิน ด้วยระยะเวลา 30 - 120 นาที
ก่อนนำตัวอย่างไปทำปฏิกิริยากับเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลติดตามในช่วงความเข้มข้น 25 - 100
ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างสารส่วนเกินออกด้วยบัฟเฟอร์ที่มีค่า พีเอชในช่วง 7.3-7.5
ที่ผสมด้วยสารลดแรงดึงผิวไตรตันเอกซ์ 100 0.025%
30 หรือการใช้บัฟเฟอร์ดังกล่าวที่ไม่ผสมด้วยสารลดแรงดึงผิว

บทสรุปการประดิษฐ์

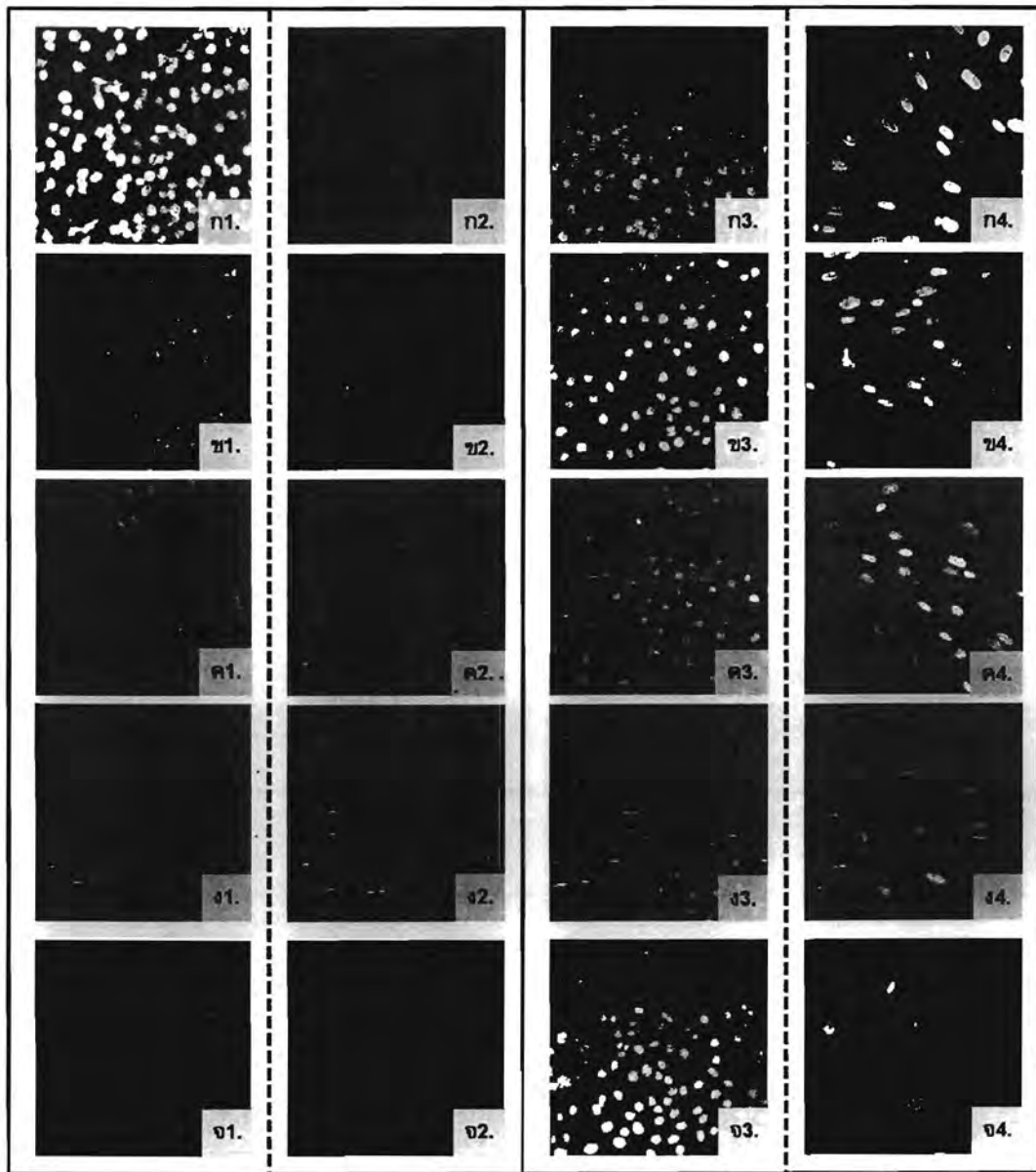
- การประดิษฐ์นี้กล่าวถึงประดิษฐ์โมเลกุลตรวจจับโปรตีน p16^{INK4a} และกรรมวิธีการใช้โมเลกุลตรวจจับดังกล่าวในตัวอย่างเซลล์หรือตัวอย่างชิ้นเนื้อ โดยการดัดแปลงติดตามเปปไทด์จับจำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a} ด้วยสารเคมี โมเลกุลชีวเคมี
- 5 หรืออนุภาคติดตามบนสายเปปไทด์ ที่ซึ่งเปปไทด์ดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโนอย่างใดอย่างหนึ่ง ใน 3 ลำดับกรดอะมิโน (เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 1, เปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 2 และเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 3) ดังที่ได้อธิบายไว้ในการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์ โดยคุณสมบัติที่สำคัญของ
- เปปไทด์ตรวจติดตามโปรตีน p16^{INK4a} ทั้ง 3 ลำดับกรดอะมิโนดังกล่าว เป็นเปปไทด์เส้นตรงขนาดเล็ก 7 ลำดับกรดอะมิโน ทำให้เปปไทด์ตรวจติดตามตามการประดิษฐ์นี้
- 10 มีความสามารถในการแทรกซึมผ่านเซลล์หรือเนื้อเยื่อตัวอย่างตรวจเข้าจับกับโปรตีน p16^{INK4a} ที่อยู่ในเซลล์ได้ดี จึงให้สัญญาณการตรวจที่ชัดเจน โดยให้สัญญาณดีกว่าการใช้แอนติบอดีถึง 8-14 เท่าตัว นอกจากนี้ ยังเป็นผลอันเนื่องมาจากเปปไทด์ตามการประดิษฐ์นี้มีความจำเพาะและมีความเสถียรสูง
- ในขณะที่แอนติบอดีจับจำเพาะต่อโปรตีน p16^{INK4a} ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน เป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าเปปไทด์ตรวจจับตามการประดิษฐ์นี้ถึง 150 เท่าโดยประมาณ อีกทั้ง
- 15 แอนติบอดีต้องอาศัยอิทธิพลของรูปแบบโครงสร้างที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งจับจำเพาะในขณะที่เปปไทด์ไม่จำเป็นต้องมีคุณสมบัติดังกล่าว
- การเก็บรักษาเปปไทด์ตรวจจับและการนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่างๆ จึงทำได้ง่ายมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในงานตรวจทางพยาธิวิทยาประจำวัน
- การสังเคราะห์เปปไทด์ตรวจติดตามที่มีความบริสุทธิ์สูงสามารถผลิตได้คราวละมากๆ
- 20 ได้ด้วยเครื่องสังเคราะห์เปปไทด์ตามเทคนิคการสังเคราะห์เปปไทด์พื้นฐานที่มีอยู่ในปัจจุบันหรืออาศัยกระบวนการเสมือนธรรมชาติในการผลิตเปปไทด์พร้อมอนุภาคติดตามโดยการกำหนดให้เปปไทด์แสดงออกบนผิวอนุภาค แบคทีเรียโอฟาจ
- ทำให้การผลิตเปปไทด์ตรวจติดตามมีต้นทุนต่ำและมีศักยภาพสูงในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ลำดับที่	สัญลักษณ์พยัญชนะภาษาอังกฤษที่ใช้แทนกรดอะมิโนชนิดต่างๆ (พร้อมชื่อย่อ)	กรดอะมิโนที่ใช้แทน
1	G (gly)	ไกลซีน
2	A (ala)	อะลานีน
3	R (arg)	อาร์จินีน
4	N (asn)	แอสพาราจีน
5	D (asp)	กรดแอสพาทิก
6	C (sys)	ซิสเตอีน
7	Q (gln)	กลูตามีน
8	E (glu)	กรดกลูตามิก
9	H (his)	ฮิสติดีน
10	I (ile)	ไอโซลิวซีน
11	L (leu)	ลิวซีน
12	K (lys)	ไลซีน
13	M (met)	เมทไธโอนีน
14	F (phe)	ฟีนิลอะลานีน
15	P (pro)	โพรลีน
16	S (ser)	เซอรีน
17	T (thr)	ทรีโอนีน
18	W (trp)	ทริปโตเฟน
19	Y (tyr)	ไทโรซีน
20	V (val)	วาลีน

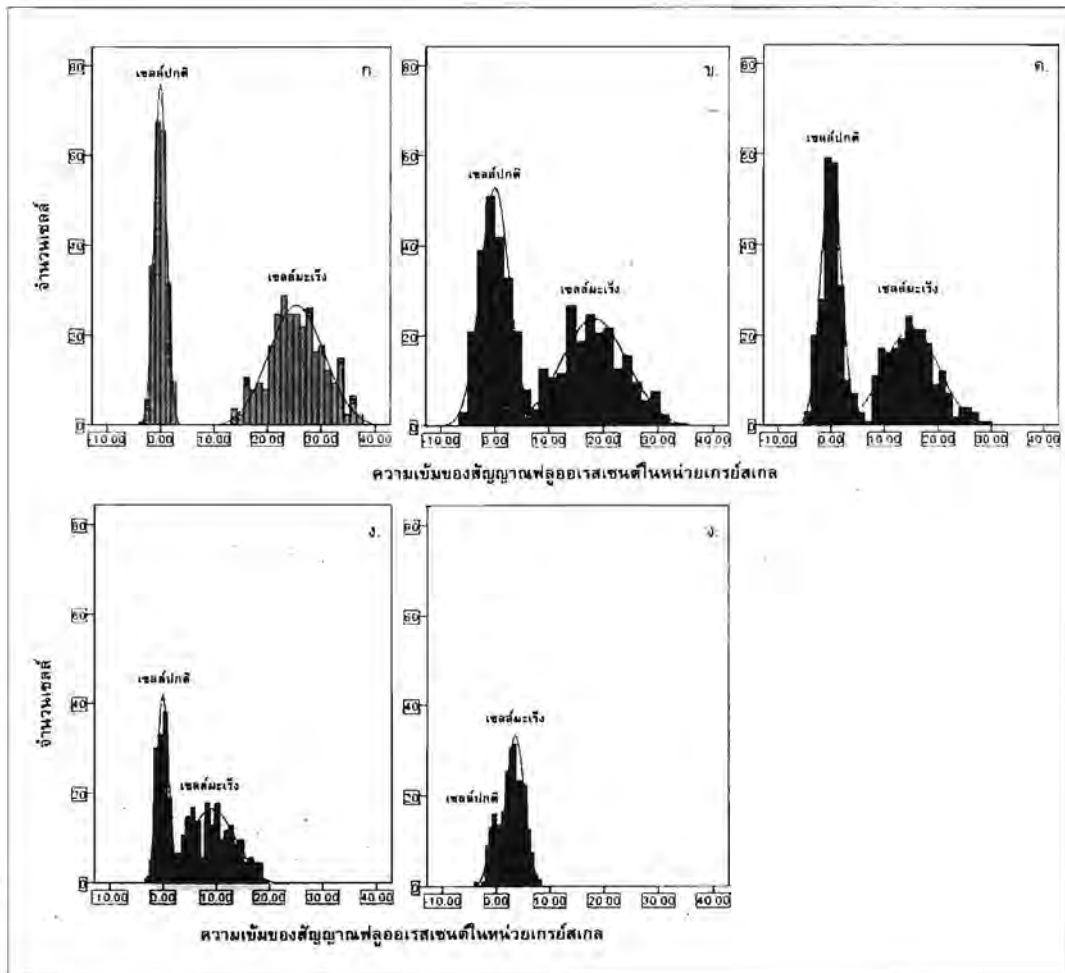
รูปที่ 1



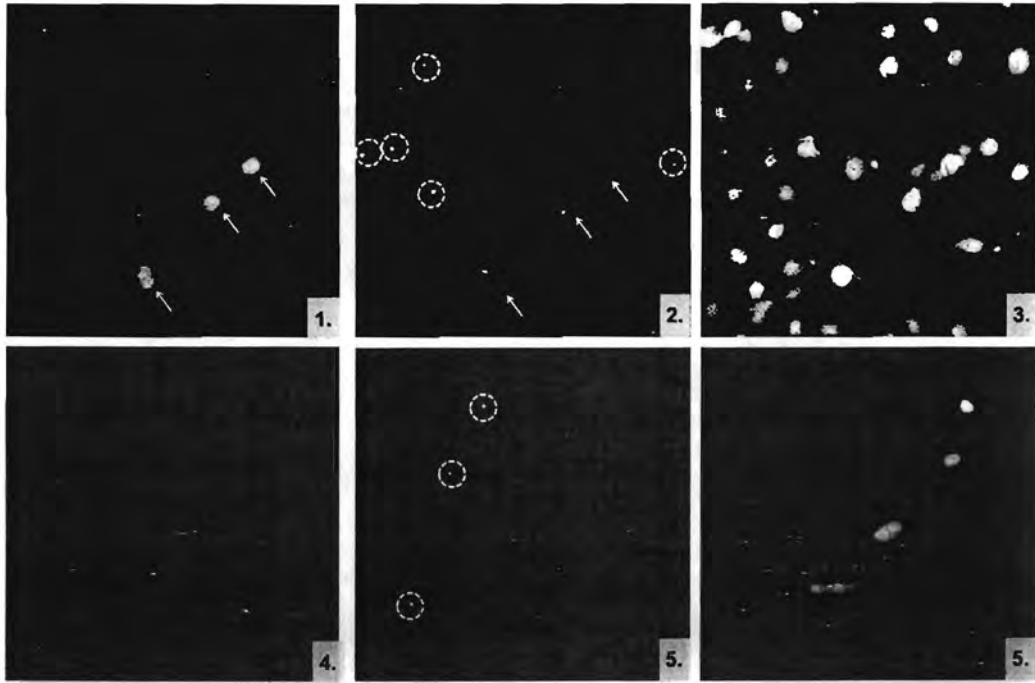
รูปที่ 2



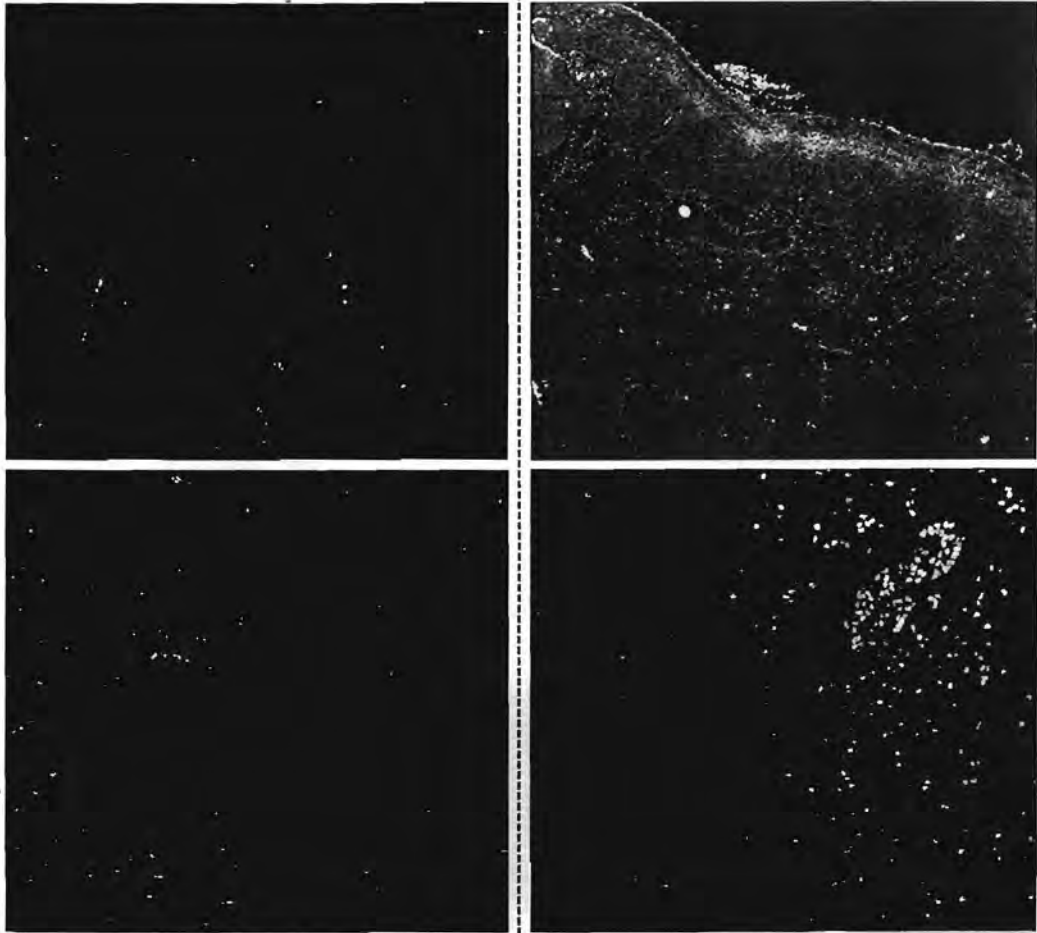
รูปที่ 3



รูปที่ 4

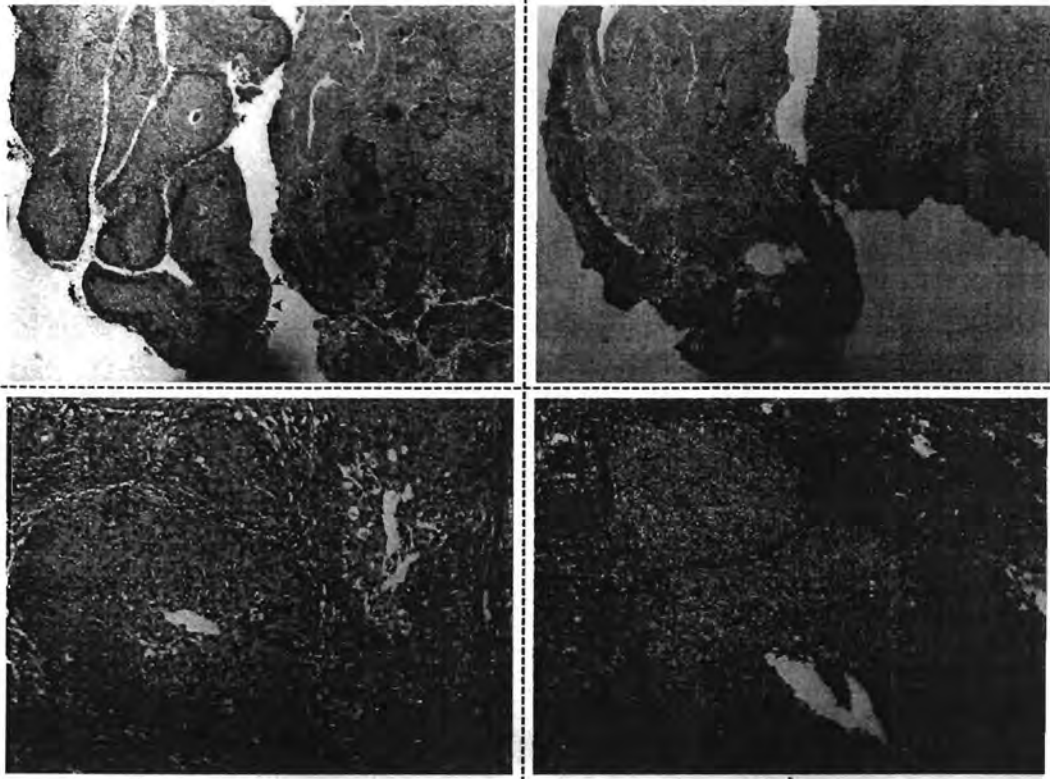


รูปที่ 5



รูปที่ 6

หน้า 7 ของจำนวน 9 หน้า

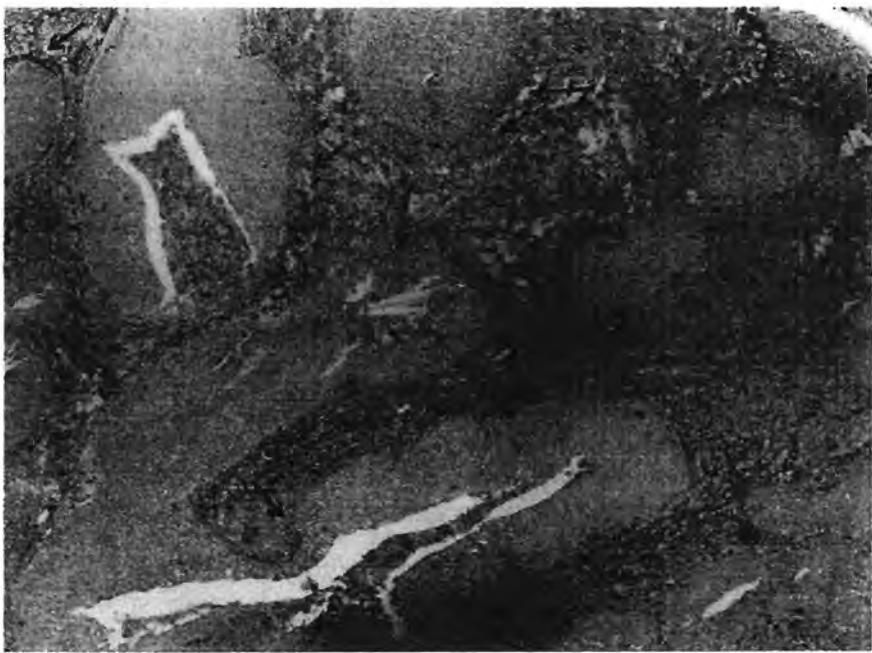


รูปที่ 7

อุปกรณ์ให้ความร้อน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	หมายเหตุ
อ่างน้ำชนิดควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	95-99 องศา	40	อุ่นบัฟเฟอร์ที่ 95-100 องศาเซลเซียส ในภาชนะทนความร้อน ก่อนใส่สไลด์ตัวอย่าง นำภาชนะบรรจุบัฟเฟอร์และสไลด์จากอ่าง ทิ้งให้เย็นประมาณ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องก่อนนำสไลด์ไปล้างน้ำเปล่า
ไมโครเวฟ	100 องศา (เดือด)	20	นำสไลด์แช่ในบัฟเฟอร์คืนสภาพที่มีค่าพีเอชเป็นด่างในช่วง 8 - 10 ที่ต้มเดือดอยู่ก่อนแล้ว ต้มสไลด์ในบัฟเฟอร์ให้เดือดต่อเนื่องอีก เป็นเวลา 20 - 25 นาที โดยอาจหยุดเวลาและเติมบัฟเฟอร์เป็นระยะๆทุก 5 นาที
หม้อความดัน	มากกว่า 100 องศา	3	ต้มบัฟเฟอร์ให้เดือดบนเตาไฟฟ้า แล้วจึงใส่สไลด์และปิดหม้อความดัน เริ่มจับเวลาเมื่อความดันในหม้อถึงจุดสูงสุด เมื่อครบ 3 นาที ยกลงจากเตาแล้วคลายความดันก่อนเปิดหม้อนำสไลด์ไปล้าง
หม้อนึ่งผัก	95-100 องศา	20	ต้มบัฟเฟอร์ให้เดือดก่อนนำไปในหม้อนึ่งที่มีสไลด์แล้วปิดฝา
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อออโตคลേป (autoclave)	มากกว่า 100 องศา	10	อุ่นบัฟเฟอร์ที่ 80 องศา ก่อนนำสไลด์ลงแช่และวางในออโตคลேป นึ่งที่อุณหภูมิ 120 องศา 10 นาที ความ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

รูปที่ 8

หน้า 9 ของจำนวน 9 หน้า



รูปที่ 9

ภาคผนวก 2
ประวัติของคณะผู้วิจัย

7.2. หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2.1. ผลของเหงือกปลาหมอดอกขาวต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ และต่อการ เติบโตของ เซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ปลูกบนผิวหนังของหนูชนิดไมส์

7.3. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว ชื่อผลงาน ปีที่ตีพิมพ์ การตีพิมพ์เผยแพร่ และ แหล่งทุน

ชื่อโครงการวิจัย	คณะผู้วิจัย	แหล่งทุน	ปีที่เริ่ม	ปีที่เสร็จ	ดัชนีวัดความสำเร็จ
7.3.1. การพัฒนาเคอคูมินแพทช์เพื่อใช้ในการยับยั้งการเติบโตของ เซลล์มะเร็งระดับที่ ปลูกบนผิวหนังของหนูชนิดไมส์	รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช อ. ไชรดา กนกพานนท์	ทุน วช 2550	ต.ค. 49	ก.ย. 50	- นำเสนอการประชุมระดับชาติ 1 ครั้ง NCBME - รายงานฉบับสมบูรณ์ - กำลังเสนอตีพิมพ์
7.3.2. Curcumin is effective as the anti-inflammatory, anti-infection in Helicobacter pylori infected rats, and anti-cancer in Hepatoma- cell implanted BALB/c-nude mice model	รศ. พญ. ดวงพร ทองงาม ผศ.พญ. นฤมล วิเศษโสภาส ผศ.พญ. ดร.อรอนงค์ ฤกษ์พัฒน์ รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช	ทุน เพิ่มขีด ความสามารถ ด้านการ วิจัยของ อาจารย์รุ่น กลางสกว	ก.ค. 49	เม.ย. 51	- ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 5 เรื่อง (publication number 41-45) - นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 3 ครั้ง

<p>7.3.3. ผลของเงินต้นต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่กระตุกในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทั้งสองข้าง</p>	<p>รศ.นพ. ประสงค์ ศิริวิริยะกุล รศ. ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช นส. อัจฉรียา ชนาวิรัตน์</p>	<p>ทุน วช 2550-51 และ ทุนรัชดาภิเษก สมโภช คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาฯ</p>	<p>ต.ค. 49</p>	<p>ก.ย. 51</p>	<p>- ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 3 เรื่อง (publication number 47, 52,56) - นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 3 ครั้ง - นำเสนอการประชุมระดับชาติ 2 ครั้ง</p>
<p>7.3.4. Studies on the effects of Ya-hom and herbal medicine on regional cerebral blood flow - การศึกษาผลของยาหอมและสารสกัดสมุนไพรต่ออัตราการไหลเวียนเลือดในสมอง</p>	<p>ผศ. ดร.อัมพร จาริยะพงศ์สกุล รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช</p>	<p>ทุนสภาวิจัย ฯ</p>	<p>ต.ค. 47</p>	<p>ก.ย. 49</p>	<p>- ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 1 เรื่อง (publication number 48) - นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 2 ครั้ง (ภาคผนวก)</p>

7.4. งานวิจัยที่กำลังทำ ชื่อผลงาน ปีที่ตีพิมพ์ การตีพิมพ์เผยแพร่ และ แหล่งทุน

ชื่อโครงการวิจัย	คณะผู้วิจัย	แหล่งทุน	ปีที่เริ่ม	ปีที่เสร็จ	ดัชนีวัดความสำเร็จ
7.4.1. Implantation of Human Papillomavirus Infected Cervical Cancer Cells into Animal Model.	รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช รศ.นพ. สมชัย นිරุตติศาสน์ ผศ.นพ.ดร. ปกรัฐ หังสสุต นาย มณฑล เลิศวรปรีชา	ทุนรัชดาภิเษก สมโภช คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาฯ	ก.ค. 49	เม.ย. 52	- ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 3 เรื่อง - นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 2 ครั้ง
7.4.2. In vivo study of neovascularization in biodegradable collagen scaffolds implanted mice	รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช Dr.Hideyuki Niimi อ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ	ทุนรัชดาภิเษก สมโภช คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาฯ	กย. 50	ธค.51	- นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 1 ครั้ง - รายงานฉบับสมบูรณ์ - กำลังเสนอตีพิมพ์
7.4.3.ผลของเงินสตี้นและการออกกำลังกายต่อการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียมในหนูแก่เพศผู้	รศ. นพ. ประสงค์ ศิริวิริยะกุล รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช (สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 33 (%))	ทุน วช 2550-51	ตค.49	ธค.51	- กำลังดำเนินการจัดทำรายงานสมบูรณ์ และตีพิมพ์
โครงการวิจัยใหม่ 7.4.4. ผลของเหงือกปลาหมอ ตอกขาวต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ และต่อการ เติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ปลูกบนผิวหนังของหนูชนิดโมดส์	รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ดร. สัญญา หกพุดชา(สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 35 (%))	ทุน วช 2552-53	ตค.51	กย.53	- กำลังดำเนินการ
7.4.5. Age alters cerebrovascular inflammation and effects of estrogen	รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช Dr. H. Niimi Dr. Seki Jendo นส. ชีพสมน วิบูลย์วรกุล (สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 15 (%))	ทุนจุฬาฯ ดุษฎีภิกษุ พรพรรณ	มค.52	มีค.54	- กำลังดำเนินการ

LISTS OF PUBLICATIONS

1. Ritter AB, Patumraj S, Duran WN. Interstitial diffusion of macromolecules. Proc. 7th Annual Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Science 2: 117.
2. Patumraj S, Ritter A.B., and Duran W.N. A Study of Coronary Macromolecular Transport. In Diabetic Rats. *Progress In Microcirculation Research 1993*, Chapter 13: 403-406.
3. Patumraj S. ศรีรวิทยาและสมุนไพรไทย *Chula Med J.* 1995;39(4) : 237-241.
4. Patumraj S. Roles of Garlic In Medicine *Chula Med J.* 1995;39(4) : 243-248.
5. Udayachalerm W, Jariyapongsakul A, Suwangool P, Patumraj S. Effects of ACE Inhibitor on Diabetic Cardiovascular Complications : Cardiac and vascular hypertrophy. *Chula Med J.* 1995; April 39(4) : 249-250.
6. Patumraj S, Jetapai U, and Udayachalerm W. Prevention of Diabetic Cardiovascular Complications by Garlic Extract. *Microcirculatory Approach To Asian Traditional Medicine : Strategy for the Scientific Evaluation 1996*, Chapter 12 : 107-116.
7. Patumraj S., Tewit S., Kasantikul V., and Udayachalerm W. Effects of Garlic Extract on Plasma Insulin, Lipid Profiles and Coronary Vascular Changes In SZ-rat. *Proc. The Sixth World Congress for Microcirculation.* Monduzzi Editores S.p.A. 1996 : 989-994.
8. Jariyapongskul A, Niimi H, and Patumraj S. Cerebral Microvascular Response to Hemorrhagic Hypotension in Spontaneously Diabetic Rats : an intravital fluorescence microscopic analysis. *Proc. The Sixth World Congress for Microcirculation.* Monduzzi Editores S.p.A. 1996 : 977-982.
9. Jariyapongskul , Niimi H, Kasantiikul V, Maneesri S, Patumraj S. Morphological changes of cerebral microvasculature in streptozotocin-induced diabetic rats : In vivo fluorescence and electron microscopic studies. In : Bunnag S.C., Srikiatkachorn A., Patumraj S. (eds). *Proc. The Third Asian Congress for Microcirculation.* Monduzzi Editores S.p.A-Bologna (Italy). 1997: 239-245.
10. Amatyakul S, Patumraj S., Niimi H. The effect of topical adrenomedullin application on striated muscle microcirculation : a pilot study. In : Bunnag S.C., Srikiatkachorn A., Patumraj S. (eds). *Proc. The Third Asian Congress for Microcirculation.* Monduzzi Editores S.p.A-Bologna (Italy). 1997:229-231.
11. Kasantikul V, Jariyapongskul A, Patumraj S. Computer-assisted image analysis of microvasculature in benign and malignant gliomas. In : Bunnag S.C., Srikiatkachorn A., Patumraj S. (eds). *Proc. The Third Asian Congress for Microcirculation.* Monduzzi Editores S.p.A. Bologna (Italy), 1997: 61-66.
12. Patumraj S., Tewit S., Kasantikul V., Sempukdeekul P. The Study of Garlic Extract on Diabetic Coronary Vascular Complications. *Microcirculation Annual 1997*; 13: 31-34.
13. Patumraj S. Microcirculation : Endothelial Cell As A Transport Barrier *Endothelium.* 1997 : 269-284.
14. Kasantikul V., Maneesri S., Latikavibul W., Patumraj S. Ultrastructural Alterations of Blood Vessel in Hypertension and Diabetic Patients. *Endothelium.* 1997 : 269-284.

15. Anuntasethakul T, Srikiatkachorn , Maneesri S, **Patumraj S**, Kasantikul V. Ultrastructural changes in endothelial cells of cerebral microvessels after exposure to nitric oxide donor. *Neuropathology* 1999, 19: 259-266.
16. Somboonwong J, Thanamitramanee S, Jariyapongskul A, **Patumraj S**. Therapeutic effects of *Aloe vera* on Cutaneous Microcirculation and Wound Healing in Second Degree Burn Model in Rats. *J Med Assoc Thai* 2000;83:417-425.
17. **Patumraj S**, Tewit S, Amatyakul S, Maneesri S, Jariyapongskul A, Kasantikul V, Shepro D. Comparative Effects of Garlic and Aspirin on Diabetic Cardiovascular Complication. *Drug Delivery* 2000; 7:1-6.
18. Futrakul N, Panichakul T, Chaisuriya P, Sirisinha S, Futrakul P, **Patumraj S**. Endothelial Cell Cytotoxicity Induced by Nephrotic Serum. The Second Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania. Editors. Sirisinha S., Chaiyaraj S., Tapchaisri, P. Jan. 2000. Monduzzi Edi. S.p.A.
19. Futrakul N, Panichakul T, Chaisuriya P, Sirisinha S, **Patumraj S**, Futrakul P. Endothelial cell cytotoxicity and renal hypoperfusion in idiopathic nephrotic syndrome. *Nephron* 2000;86: 241-2.
20. Futrakul N, Bulthep P, **Patumraj S**, Futrakul P. Glomerular endothelial dysfunction and altered cytokines in severe nephrosis. *Nephron*. 2000;86:199.
21. Wattanachon U., Covavisaruch N., **Patumraj S**. A measuring tool for vascular wall thickness : an image analysis approach. *Proc. The 4th National Computer Science and Engineering*. Nov. 16-17,2000.
22. Amatyakul S., **Patumraj S.**, Niimi H. Effects of adrenomedullin on the cardiac performance and coronary flow in an isolated perfused rat heart model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 23 (2000):269-275.
23. Srikiatkachorn A, Anuntasethakul T., Maneesri S., Phansuwan-Pujito P., **Patumraj S**, and Kasantikul V. Hyposerotonin-induced nitric oxide supersensitivity in the cerebral microcirculation. *Headache* 2000 Apr; 40(4) 267-275.
24. Udayachalerm W., Vechakarn O., **Patumraj S**. Effects of ACE-I on Diabetic Cardiovascular complications : Anti-Hypertensive and Non-Anthihypertensive Doses. *J Med Assoc Thai* 2001;84 (Suppl 1): S306-S313.
25. Chakraphan D.,Thipakorn B., and **Patumraj S**. Changes of mesenteric microcirculation in chronic diabetic rats: A pilot study using invital fluorescence microscopy. *Proc. 7th World Congress for Microcirculation*. Aug. 19-22, 2001.
26. Srikiatkachorn A, Anuntasethakul T., Phansuwan-Pujito P., **Patumraj S.**, and Kasantikul V. Effect of serotonin depletion on nitric oxide induced cerebrovascular nociceptive response. *Neuroreport* 2001 Apr, 12(50) 967-971.

27. Jariyapongskul A, **Patumraj S**, Yamaguchi S, Niimi H. The effect of long-term supplementation of vitamin C on leukocyte adhesion to the cerebral endothelium in STZ- induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (2002) 27(1): 67-76.
28. Futrakul N, Tosukhowong P, Valyapongichit Y, Tipprukmas N, Futrakul P, **Patumraj S**. Oxidative stress and hemodynamic maladjustment in chronic renal disease : A therapeutic implication. *Ren Fail* 2002 Jul ; 24(4) : 433-45
29. Futrakul N, Boongen M, Tosukhowong P, **Patumraj S**, Futrakul P. Treatment with vasodilators and crude extract of *Ganoderma lucidum* suppresses proteinuria in nephrosis with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 2002 ; 92(3) : 719-20
30. Futrakul N, Tohsukhowong P, **Patumraj S**, Siriviriyakul P, Tipprukmas N, Futrakul P. Treatments of hemodynamic maladjustment and oxidative stress prevent renal disease progression in chronically severe glomerulonephritides. *Ren Fail*. 2003 Sup;25(5):839-44
31. Khemapech S., Monsiri K, **Patumraj S**, and Siriviriyakul P. Genistein replacement therapy for vasodilation disorder in bilateral ovariectomized rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 271-278.
32. Futrakul N, Boongen M, **Patumraj S**, Siriviriyakul P, Tosukhowong P, Futrakul P. Treatment of glomerular endothelial dysfunction steroid-resistant nephrosis with *Ganoderma lucidum*, vitamins C, E, and vasodilators. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003, 29: 205-210.
33. Sridulyakul P, Chakraphan D, Bhattarakosol P, **Patumraj S**. Endothelial nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary circulation of streptozotocin induced diabetic rats . comparison using image analysis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 423-428.
34. Futrakul N, Siriviriyakul P, Panichakul T, Butthep P, **Patumraj S**, Tosukhowong P, Futrakul P. Glomerular endothelial cytotoxicity and dysfunction in nephrosis with focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 469-477
35. Futrakul P, Siriviriyakul P, Kulaputana O, **Patumraj S**, Bunnag S.C., Futrakul N. A hemodynamically mediated mechanism of renal disease progression in severe glomerulonephritides or nephrosis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 183-188.
36. Duansak D, Somboonwong J., and **Patumraj S**. Effects of *Alae vera* on leukocyte adhesion and TNF- α and IL-6 levels in burn wounded rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 239-246.
37. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotpaibulpan S., and **Patumraj S**. The effect of long-term supplementation of vitamin C on pulpal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003, 29: 313-320.

38. Jariyapongskul A, **Patumraj S**, Niimi H. Cerebral endothelial dysfunction in diabetes: intravital microscopical analysis using streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, IOS Press. 2003; 29: 331-335.
39. Molsiri K, **Patumraj S**, Siriviriyakul P. Preventive mechanism of genistein on coronary endothelial dysfunction in ovariectomized rats : An isolated arrested heart model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.31 (2), 2004
40. Chakraphan D, Sridulyakul P, Thipakorn B, Bunnag S.C, Huxley VA. **Patumraj S** : Attenuation of Endothelial Dysfunction by Exercise Training in STZ-Induced Diabetic Rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.32, 2005 :217-226
41. **Patumraj S**, Yoysungnoen P, Kachonrattanakul P., and Wirachwong P. Tumor Neocapillary Density in hepatocellular carcinoma cells Implanted Nude Mice Model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.33, 2005 :137-144
42. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, and **Patumraj S**. Antiangiogenic activity of curcumin in Hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.33, 2005 :127-136
43. Eamlarnam K, **Patumraj S**, Visedopas N, and Thong-Ngam D. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. *World J Gastroenterology* ISSN1007-9327 vol 12, 2006 :2035-2040
44. Prabjone R, Thong-Ngam D, Wisedopas N, Chatsuwon T, and **Patumraj S**. Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* on leukocyte-endothelium interaction in the gastric microcirculation of *Helicobacter pylori*-infected rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.33, 2006 :9-56
45. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, and **Patumraj S**. Effects of curcumin on tumor antiangiogenesis and biomarkers : COX-2 and VEGF *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 :109-116.
46. Niimi H, **Patumraj S**, and J.-Y.Han. Asian traditional medicine (ATM) : Recent progress based on scientific evidences. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 85 - 88.
47. Siriviriyakul P, Khemapech S., Molsiri K, and **Patumraj S**. The vascular effect of genistein : What is its mechanism, nitric oxide or PGL₂ ? *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 97 - 101.
48. Jariyapongskul A . **Patumraj S** and Niimi H. Effects of Yohim on the regional cerebral blood flow in rat using fluorescence videomicroscopy. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 139 - 144.
49. Futrakul N, Butthep P, **Patumraj S** , Siriviriyakul P and Futrakul F. Microvascular disease and endothelial dysfunction in chronic kidney disease : Therapeutic implication. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol 34, number 1,2, 2006 : 265 - 271.

50. Jariyapongskul A , Rungjaroen T, Kasetsuwan N, **Patumraj S** and Niimi H. Chronic changes of the iris microvasculature of streptozotocin – induced diabetic rats using fluorescence videomicroscopy. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 283 - 293.
51. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotpaibulpan S, and **Patumraj S**. Role of exercise training on pupal blood flow in diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 295 - 301.
52. Chanawirat A, Khemapech S, **Patumraj S** and Siriviriyakul P. Genistin replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 309 - 314.
53. Sridulyakul P, Chakraphan D and **Patumraj S**. Vitamin C supplementation could reverse diabetes-induced endothelial cell dysfunction in mesenteric microcirculation in STZ-rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 315 - 321.
54. Jariyapongskul A , Rungjaroen T , Kasetsuwan N , Patumraj S, Seki J , Niimi H. Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats. *Microvasc Res*. 2007 Mar 23;174:677-47.
55. **Patumraj S**, Wongeakin N, Jariyapongskul A, Futrakul N, Bunnag S.(2006). Combined effects of curcumin and vitamin C to protect endothelial dysfunction in the iris tissue of STZ-induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 35:481-89.
56. Thaveeratitham P., Plengpanich W., Naen-Udom W , **Patumraj S**., Khovichunkit, W. Effects of human apolipoprotein A-I on endotoxin-induced leukocyte adhesion on endothelial cells *in vivo* and on the growth of *Escherichia coli* *in vitro* *J. Endotoxin. Research*. Volume 13, Number 1 / 2007: 54-58.
57. Thaveeratitham P., W. Khovichunkit, S. **Patumraj**. High-density lipoproteins (HDL) inhibit endotoxin- Effect of the acute-phase HDL *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, Volume 36, Number 1 / 2007: 1 - 12.
58. Chakraphan D., Sridulyakul P., Thipakorn B., Bunnag S., Virginia H., **Patumraj S**. Leukocyte-endothelial cell interaction is attenuated by low-intensity exercise training and vitamin C supplementation in diabetic rats. *Asian Biomed Journal*. 2007:1: 67-75.
59. **Patumraj S**, Yoysungneon P. *Review Article*. Curcumin as a therapeutic agent against cancer. *Asian Biomed Journal* Vol. 1 No. 3 October 2007;239-252.
60. Kasiyaphat A, Siriviriyakul P, and **Patumraj S**. *Technical report*. A novel femur window chamber for *in vivo* studies of bone microcirculation. *Asian Biomed Journal* Vol. 1 No. 3 October 2007;301-305.
61. Duansak N, Yoysungneon P, Somchaichana J, Bhattarakosol P, Wirachwong P, Patumraj S. Correlation between hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor expression under tumor neovascularization in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Asian Biomedicine*. 2007. Vol. 1 No. 4 December;399-406.

62. Kasiyaphat A., Siriviriyakul P, and **Patumraj S.** Preventive effects of genistein on leukocyte adhesion in femur venules and on bone-loss induced in ovariectomized female rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 38;4. 2008:235-243.
63. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Changtam C, Suksamrarn A, Patumraj S. Suppression of tumor neocapillarization induced by HepG2 cells in nude mice supplemented with curcumin or tetrahydrocurcumin; an *in vivo* comparative study. *Asian Biomedicine* Vol. 2 No. 1 February 2008;77-82.
64. Jariyapongskul A, **Patumraj S**, Suksamrarn, A. Long-term effect of tetrahydrocurcumin supplementation on cerebral blood flow and endothelial cells in streptozotocin- induced diabetic rats. *Asian Biomedicine*. 2008, vol. 2, no.2,151-155.
65. Sridulyakul P, Wongeak-in N, **Patumraj S.** Increased nitric oxide level in diabetic rats from vitamin C supplementation: an *in vivo* detection using diaminofluorescein. *Asian Biomedicine* Vol. 2 No. 5 October 2008;371-379.
66. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Changtam C, Suksamrarn A, and **Patumraj S.** Anti-cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol*. 2008;14(13):2003-9.
67. Iertworapreecha M, Patumraj S, Niruthisard S, Hansasuta P, and Bhattarakosol P. Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. *Indian J Exp Biol*. 2009;47:327-332.
68. Wongeakin N, Sridulyakul P, Jariyapongskul A, Suksamrarn A, and **Patumraj S.** Effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on diabetes induced endothelial dysfunction. *African Journal of Biochemistry Research* 2009, Vol.3 (5):259-265.
69. Viboolvorakul S, Niimi H, Wongeak- in N, Eksakulkla S, **Patumraj S.** Increased Capillary Vascularity in the Femur of Aged Rats by Exercise Training. *Microvascular Research*., 2009 (78): 459-463.
70. Eksakulkla S, Suksom D, Siriviriyakul P, and **Patumraj S.** Increased NO bioavailability in aging male rats by genistein and exercise training: using 4, 5-diaminofluorescein diacetate *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย 1

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว ภาวพันธ์ ภัทรโกศล
(ภาษาอังกฤษ) Parvapan Bhattarakosol
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1009 03215 20 2
3. ตำแหน่งปัจจุบัน (วิชาการ) รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330
โทรศัพท์ 0-2252-8181 ต่อ 3628 โทรสาร 0-2252-5952
Email: parvapan@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
ปริญญาตรี	เทคนิคการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2524
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	2527
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	2533

ผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง ๓ ปี (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

1. Chantaraarphonkun S, Bhattarakosol P. Intra and Intergenotypic Variations among Human Cytomegalovirus (HCMV) gB Genotypes in Clinical Samples. *Intervirology* 2007; 50:78-84.
2. Thammabovorn T, Mungmee V, Thammachotruja L, Kowitdamrong E, Bhattarakosol P. Prevalence of viral infections in clinical specimens at Virology Laboratory Unit during the year 1998 to 2004. *Chula Med J* 2007; 51: 229-39.
3. Bhattarakosol P, chantaraarphonkun S. Prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) gB genotypes in Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 835-40.
4. Duansak N, Yoysungnoen P, Somchaichana J, Bhattarakosol P, Wirachwong P, Patumraj S. Correlation between hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor expression under tumor neovascularization in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Asian Biomedicine* 2007; 1(4): 399-406.
5. Sangdara A, Bhattarakosol P. Acyclovir susceptibility of herpes simplex virus isolates at King Chulalongkorn Hospital, Bangkok. *J Med Assoc Thai* 2008 91(6):908-12.
6. Lertworapreecha M, Thammachotruja L, Bhattarakosol P. Prevalence and distribution of HPV type in Thai women. *Chula Med J* 2008; 52:161-7.
7. Theamboonlers A, Bhattarakosol P, Chongsrisawat V, Sungkapalee T, Wuthirattanakit N, Poovorawan Y. Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during 2004-2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and a rare G3P[19] strain. *Virus Genes* 2008, 36:289-98.

8. Lertworapreecha M, Patumraj S, Niruthisard S, Hansasuta P, and Bhattarakosol P. Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. *Indian J Exp Biol* 2009; 47:327-32

โครงการวิจัยที่กำลังดำเนินการ

ลำดับที่	ผู้วิจัยหลัก	หัวข้อเรื่อง	แหล่งทุน	ปีที่ได้	ปีที่คาดว่าจะเสร็จ
1	รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล	การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด ทุน	งบประมาณแผ่นดิน	2550-2552	2553
2	รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล	การเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการเพื่อรับมือโรคมือเท้าและปาก	ทุนสสส.	2551	2552

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย 2

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) สมชัย นีรุธิศาสน์
(ภาษาอังกฤษ) Somchai Niruthisard, M.D.
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1013 00012 04 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน (วิชาการ) รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330
โทรศัพท์ +66-2-256-4718
E-mail Address: ndsomchai@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา

1972-1979	M.D. Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
1979-1982	Residency training in Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Professional membership:

Thai Medical Council
The Royal Thai College of Obstetricians and Gynecologists
Thai Gynecologic Cancer Society
Thai Society of Colposcopy and Cervical Pathology
The Medical Association of Thailand

Peer-reviewed publications:

1. Lertworapreecha M, Patumraj S, Niruthisard S, Hansasuta P, Bhattarakosol P. Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. *Indian J Exp Biol.* 2009 May;47(5):327-32.
2. Tantbiroj P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, Niruthisard S. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in borderline ovarian tumors: an immunohistochemical study. *J Med Assoc Thai.* 2009 Mar;92(3):308-14.
3. Tantbiroj P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, Niruthisard S. Comparison between adenocarcinoma in both endocervical and endometrial specimens from fractional curettage and pathologic findings in subsequent hysterectomy specimens. *J Med Assoc Thai.* 2008 Sep;91(9):1313-7.
4. Tantbiroj P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, Niruthisard S. Detection of PTFN immunoreactivity in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *J Med Assoc Thai.* 2008 Aug;91(8):1161-5.
5. Sirayapiwat P, Suwajanakorn S, Triratanachat S, Niruthisard S. The effects of GnRH antagonist on the endometrium of normally menstruating women. *J Assist Reprod Genet.* 2007 Dec;24(12):579-86.

6. Manchana T, Sirisabya N, Triratanachai S, **Niruthisard S**, Tannirandorn Y. Pyomyoma in a perimenopausal woman with intrauterine device. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;63(3):170-2.
7. Triratanachai S, **Niruthisard S**, Trivijitsilp P, Tresukosol D, Jarurak N. Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and early-staged uterine cervical squamous cell carcinoma: clinical significance. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Mar-Apr;16(2):575-80.
8. Kitkumthorn N, Yanatatsanajit P, Kiatpongson S, Phokaew C, Triratanachai S, Trivijitsilp P, Termrungruanglert W, Tresukosol D, **Niruthisard S**, Mutirangura A. Cytlin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. *BMC Cancer.* 2006 Mar 8;6:55.
9. Kiatpongson S, **Niruthisard S**, Mutirangura A, Trivijitsilp P, Vasuratna A, Chaithongwongwatthana S, Lertkachonsuk R. Role of human papillomavirus DNA testing in management of women with atypical squamous cells of undetermined significance. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Jan-Feb;16(1):262-5.
10. Bhattarakosol P, Lertworapreecha M, Kitkumthorn N, Triratanachai S, **Niruthisard S**. Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women. *J Med Assoc Thai.* 2002 Jun;85 Suppl 1:S360-5.
11. Pornthanakasem W, Shotetersuk K, Termrungruanglert W, Voravud N, **Niruthisard S**, Mutirangura A. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC Cancer.* 2001;1:2.
12. Limpaboon T, Pooart J, Bhattarakosol P, **Niruthisard S**, Chantratita W, Lulitanond V. p53 status and human papillomavirus infection in Thai women with cervical carcinoma. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2000 Mar;31(1):66-71.
13. Lertworapreecha M, Bhattarakosol P, **Niruthisard S**. Detection and typing of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia grade III in Thai women. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1998 Sep;29(3):507-11.
14. Reinprayoon D, Taneepanichskul S, **Niruthisard S**, Suwajanakon S. Uterine histopathologic changes after Cu-Fix intrauterine device insertion. *Contraception.* 1999 Jan;59(1):63-5.
15. Charuruks N, Voravud N, Termrungruanglert W, Lertsanguansinchai P, Tresukosol D, **Niruthisard S**, Sirisabya N. 13-cis-retinoic acid and interferon-alpha 2a therapy in locally advanced squamous cell carcinoma of the cervix: p53 alteration, proliferating cell nuclear antigen expression and angiogenesis response. *J Obstet Gynaecol Res.* 1998 Oct;24(5):333-41.
16. Mutirangura A, Sriuranpong V, Termrungruanglert W, Tresukosol D, Lertsanguansinchai P, Voravud N, **Niruthisard S**. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, pre-malignant and benign cervical lesions. *Br J Cancer.* 1998 Oct;78(7):933-9.
17. Van Damme L, **Niruthisard S**, Atisook R, Buer K, Dally I, Laga M, Lange JM, Karam M, Perriens JI. Safety evaluation of nonoxynol-9 gel in women at low risk of HIV infection. *AIDS.* 1998 Mar 5;12(4):433-7.

18. Bhattarakosol P, Poonnaniti A, **Niruthisard S**. Detection and typing of human papillomavirus in cervical cancer in the Thai. *J Med Assoc Thai*. 1996 Dec;79 Suppl 1:556-64.
19. Hemachudha T, Niruthisard S, Sirivichayakul S, Chomchey P, Wilde H. HTLV-1 has reached Thailand via a heterosexual route. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992 Jul-Aug;86(4):434.
20. **Niruthisard S**, Roddy RE, Chutivongse S. Use of nonoxynol-9 and reduction in rate of gonococcal and chlamydial cervical infections. *Lancet*. 1992 Jun 6;339(8806):1371-5.
21. **Niruthisard S**, Trisukosol D. Male sexual behavior as risk factor in cervical cancer. *J Med Assoc Thai*. 1991 Nov;74(11):507-12.
22. **Niruthisard S**, Roddy RE, Chutivongse S. The effects of frequent nonoxynol-9 use on the vaginal and cervical mucosa. *Sex Transm Dis*. 1991 Jul-Sep;18(3):176-9.

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย 3

- | | |
|--------------------|--|
| 1. ชื่อ (ภาษาไทย) | น้ำฝน เข้มทองเจริญ |
| ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) | Numfon Khemthongcharoen |
| 2. วันเดือนปีเกิด | 24 เมษายน 2527 |
| 3. สถานที่เกิด | กรุงเทพมหานคร |
| 4. สถานภาพการสมรส | โสด |
| 5. ตำแหน่งปัจจุบัน | ผู้ช่วยนักวิจัย |
| 6. ที่อยู่หน่วยงาน | ศูนย์วิจัยอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ |
| 7. เบอร์โทรศัพท์ | 081-402 1155 |
| 8. ประวัติการศึกษา | |
| | 2549-2552 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล |
| | 2545-2558 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล |
9. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, หนังสือ สิทธิบัตร (ในประเทศและต่างประเทศ)

Publications:

- N. Khemthongcharoen, R. Jolivot, S. Rattanavarin, and W. Piyawattanametha, "Advances in imaging probes and optical microendoscopic imaging techniques for early *in vivo* cancer assessment," *Advanced Drug Delivery Reviews*, In press

Proceedings/Conferences:

- N. Khemthongcharoen, A. Ruangphacha, and W. Piyawattanametha, "Phage Display Specific p16INK4a Binding Peptide for *Ex Vivo* Cancer Cells Imaging," The 6th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NanoMed 2012), Bangkok, Thailand, November 4-7, 2012.
- N. Khemthongcharoen, A. Ruangphacha, P. Sarapukdee, P. Wongsawatsuriyha, F. Beadyananda, and W. Piyawattanametha. Acridine orange staining for cell analysis. 8th Asian Congress for Microcirculation, Bangkok, Thailand. October 26-28, 2011
- N. Khemthongcharoen, A. Sappat, K. Jaruwongrunsee, A. Tuantranont, W. Wonglumsom and C. Promptmas. Development of Piezoresistive Microcantilever as a DNA Sensor for Cholera Toxin Gene Detection. 8th Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS 2009), Daegu, South Korea. November 11-14, 2009.
- N. Khemthongcharoen, A. Sappat, K. Jaruwongrunsee, A. Tuantranont, W. Wonglumsom, C. Promptmas. Preparation of Piezoresistive Microcantilever for Biosensor Application. Annual Conference on the National Research, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand, 2009.
- P. Sarapukdee, S. Rattanavarin, U. Jarujareat, N. Khemthongcharoen, R. Jolivot, B. W. Jung, D. López, M. J. Mandella, and W. Piyawattanametha. "Handheld Multispectral Dual-Axis Confocal Microscope for Cervical Cancer Screening," The international society for optics and photonics, Photonics West 2013, San Francisco, California, USA, February 5-7, 2013

- A. Ruangphacha, N. Khemthongcharoen, W. Piyawattanametha, "Homology modeling characterization of Cdk4-roscovitine complexes," 11th International Conference on Bioinformatics (InCoB 2012), Bangkok, Thailand, October 3-5, 2012.
- S. Rattanavarin, P. Sarapukdee, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, M. J. Mandella, and W. Piyawattanametha, "Handheld Cervical Confocal Microscope Based on a MEMS Scanner," Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies (APCOT 2012), Nanjing, China, July 8-11, 2012.
- P. Sarapukdee, S. Rattanavarin, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, M. J. Mandella, and W. Piyawattanametha, "MEMS Based Handheld Dual-Axis Confocal Microscope for Cervix Cancer Screening," International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology (LCTI-CON 2012), Hua Hin, Thailand, May 16-18, 2012.
- P. Wongsawatwuriyha, N. Khemthongcharoen, and W. Piyawattanametha, Video Mosaicing for Real-time Field of View Enhancement. IEEE Robotics and Biomimetics (ROBIO 2011), Phuket Island, Thailand, December 7-11, 2011.
- A. Tuantranont, A. Sappat, T. Lomas, A. Wisitsaraat, U. Sungkanak, N. Khemthongcharoen, and C. Promptmas, "Microcantilever Sensors for Point-of-Care Detection," Proceeding of the sensor symposium on sensors, micromachines and applied systems, 25th, 739-742, Japan, 2008.

Patents:

- Numfon Khemthongcharoen, Athisake Ruangphacha, Wibool Piyawattanametha, Santi Rattanavarin, Pongsak Sarapukdee, Ungkarn Jarujareet, Suthiluk Patumaraj, Somchai Nirutisart, Romuald Jolivot. 2012. Specific peptide tracers and their using method for p16INK4a detection, Application number 1201003486 (Thailand).
- Numfon Khemthongcharoen, Chamras Promptmas, Adisorn Tuantranont, and Assawapong Sappat. 2011. Preparation of microcantilever-based DNA sensor system for cholera toxin gene detection, Application number 1101000803 (Thailand).

Research scholarships:

- The Graduate Scholarship of the Faculty of Medical Technology, Mahidol University 2006-2007
- Scholarship for Master's Degree Student Support, Biosensor Research Project BT-B-01-NG-14 5001, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand, 2007-2008.

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย 4

1. ชื่อ (ภาษาไทย) พงษ์ศักดิ์ สาระภักดิ์
(ภาษาอังกฤษ) Pongsak Sarapukdee
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 1 4514 00004 23 8
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยนักวิจัย
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC)
ห้อง 321 112 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120
Advance Imaging Research (AIR) Center
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 104 ถนนราชดำริ แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์: +66 (0)2-564-6900 Ext 2332, +66 (0)2-256-4547
โทรสาร: +66 (0)2-564-6756
E-mail: sarapukdee@gmail.com
5. ประวัติการศึกษา
ระดับปริญญาตรี วิศวกรรม (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ระดับปริญญาโท วิศวกรรม (วิศวกรรมชีวเวช) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ
Biosensors, Electronics, MEMS-BASED, LabViews Programming
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
งานวิจัยในระดับปริญญาโท: การประดิษฐ์เครื่องมือตรวจวัดด้วยหลักการการดูดกลืนแสงชนิดไม่รุกล้ำร่างกาย
สำหรับตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงระดับไนตริกออกไซด์หลังจากกระตุ้นด้วยการรัดแขน
8. Publications:
 - P. Sarapukdee, S. Patumraj, M. Sriyudthsak, "Non-invasive nitric oxide optical sensor", The 2nd Symposium on Thai Biomedical Engineering, Bangkok, October 5-6, 2010. (2nd Paper Award)
 - P. Sarapukdee, S. Patumraj, M. Sriyudthsak, "Non-invasive nitric oxide optical sensor", 13th TSM annual Meeting of Thai Society of Microcirculation, Bangkok, Thailand, December 3, 2010. (2nd Poster Award)
 - P. Sarapukdee, S. Patumraj, M. Sriyudthsak, "A development of an non-invasive optical sensor for determining nitric oxide changes after arm-cuff occlusion", 8th Asian Congress for Microcirculation, Bangkok, Thailand, October 26-28, 2011 (1st Poster Award)

- N. Khemthongcharoen, A. Ruangphacha, P. Sarapukdee, P. Wongsawatsuriya, F. Beadyananda, and W. Piyawattanametha, "Acridine orange staining for cell analysis", 8th Asian Congress for Microcirculation, Bangkok, Thailand, October 26-28, 2011.
- Pongsak Sarapukdee, Santi Rattanavarin, Ungkarn Jarujareet, Numfon Khemthongcharoen, Athisake Ruangphacha, Michael J. Mandella, and Wibool Piyawattanametha, "MEMS-Based Handheld Dual-Axis Confocal Microscope for Cervix Cancer Screening", 9th International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology (ECTI-CON 2012), Hua Hin, Thailand, May 16-18, 2012.
- S. Rattanavarin, P. Sarapukdee, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, and Wibool Piyawattanametha, "Handheld cervical confocal microscope based on a mems scanner", The Sixth Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies, Nanjing, China, July 8-11, 2012.
- S. Rattanavarin, Pongsak Sarapukdee, Ungkarn Jarujareet, Numfon Khemthongcharoen, Athisake Ruangpracha, Romuald Jolivot, Il Woong Jung, Daniel López, "Handheld Multispectral Confocal Microscope for Cervical Cancer Diagnosis", Optical MEMS & Nanophotonics Conference 2012, Banff, Alberta, Canada, August 6-9, 2012.

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย 5

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)
(ภาษาอังกฤษ) สันติ รัตนวารินทร์
Santi Rattanavarin
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 2009 00231 15 0
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยนักวิจัย
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC)
ห้อง 321 112 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Advance Imaging Research (AIR) Center
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 104 ถนนราชดำริ แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน
กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์: +66 (0)2-564-6900 Ext 2332, +66 (0)2 256-4547

โทรสาร: +66 (0)2-564-6756

E-mail: santikurt@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

2008; Master of Engineering (Production Engineering)
Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok,
Thailand

2004; Bachelor of Science in Technical Education (Mechanical Engineering)
Faculty of Technical Education, King Mongkut's University of Technology North Bangkok,
Bangkok, Thailand

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ

- Pneumatic and Hydraulic System
- Mechanical Design

7. Publications:

Rattanavarin, S. ; Sarapukdee, P. ; Khemthongcharoen, N. ; Jarujareet, U. ; Jolivot, R. ; Jung, I.W. ; Lopez, D. ; Mandella, M.J. ; Piyawattanametha, W. "MEMS based multispectral confocal probe", Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSensors)

XXVII), 2013 Transducers & Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on Digital Object Identifier: 10.1109/Transducers.2013.6627233 Publication Year: 2013 , Page(s): 2173 – 2176

Pongsak Sarapukdee , **Santi Rattanavarin** ; Ungkarn Jarujareet ; Numfon Khemthongcharoen , Romuald Jolivot, et al. " *Handheld multispectral dual-axis confocal microscope for cervical cancer screening* ", Proc. SPIE 8575, Endoscopic Microscopy VIII, 85750V (March 13, 2013); doi:10.1117/12.2004224; <http://dx.doi.org/10.1117/12.2004224>

Tantipiriyakij, P. ; Sankatumvong, P. ; Sarapukdee, P. ; **Rattanavarin, S.** ; Jarujareet, U. ; Khemthongcharoen, N. ; Ruangphacha, A. ; Il Woong Jung ; Piyawattanametha, W. " *Characteristics of MEMS scanners with different driving bias* ", Electron Devices and Solid State Circuit (EDSSC). Bangkok, Thailand, December 3-5, 2012

Rattanavarin, S. ; Sarapukdee, P. ; Jarujareet, U. ; Khemthongcharoen, N. ; Ruangpracha, A. ; Jolivot, R. ; Il Woong Jung ; Lopez, D. ; Mandella, M.J. ; Piyawattanametha, W. " *Handheld multispectral confocal microscope for cervical cancer diagnosis* ", Optical MEMS and Nanophotonics (OMN), 2012 International Conference on Digital Object Identifier: 10.1109/OMEMS.2012.6318792 Publication Year: 2012 , Page(s): 41 - 42

Il Woong Jung , **Rattanavarin, S.** ; Sarapukdee, P. ; Mandella, M.J. ; Piyawattanametha, W. ; Lopez, D. " *2-D MEMS scanner for handheld multispectral confocal microscopes* ", Optical MEMS and Nanophotonics (OMN), 2012 International Conference on Digital Object Identifier: 10.1109/OMEMS.2012.6318891 Publication Year: 2012 , Page(s): 238 – 239

S. Rattanavarin, P. Sarapukdee, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, and Wibool Piyawattanametha, " *Handheld cervical confocal microscope based on a mems scanner* ", The Sixth Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies, Nanjing, China, July 8-11, 2012.

Pongsak Sarapukdee, **Santi Rattanavarin**, Ungkarn Jarujareet, Numfon Khemthongcharoen, Athisak Ruangphacha, Michael J. Mandella, and Wibool Piyawattanametha, " *MEMS-Based Handheld Dual Axis Confocal Microscope for Cervix Cancer Screening* ", 9th International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology (ECTI-CON 2012). Hua Hin, Thailand, May 16-18, 2012.

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย 6

- | | |
|--------------------|--|
| 1. ชื่อ (ภาษาไทย) | อังคาร จารุจารีต |
| ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) | Ungkarn Jarujareet |
| 2. วันเดือนปีเกิด | 28 พฤษภาคม 2528 |
| 3. สถานที่เกิด | จังหวัดนราธิวาส |
| 4. สถานภาพการสมรส | โสด |
| 5. ตำแหน่งปัจจุบัน | ผู้ช่วยนักวิจัย |
| 6. ที่อยู่หน่วยงาน | ศูนย์วิจัยอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ |
| 7. เบอร์โทรศัพท์ | 086-7336552 |
| 8. ประวัติการศึกษา | |
| | 2548-2551 วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิศวกรรมคอมพิวเตอร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| | 2544-2547 วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา วิศวกรรมคอมพิวเตอร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ |
9. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities -
10. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ -
11. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, หนังสือ สิทธิบัตร (ในประเทศและต่างประเทศ)
- 1) บทความเรื่อง "A Fast Algorithm for Iris Localization" นำเสนอในงานประชุมวิชาการ The 12th National Computer Science and Engineering Conference 2008 จัดที่โรงแรมลองบีชการ์เดน โฮเทล แอนด์ สปา พัทยา ระหว่างวันที่ 20 - 21 พฤศจิกายน พ.ศ. 2551 บทความนี้ตีพิมพ์ไว้ใน Proceedings of 12th National Computer Science and Engineering Conference 2008 หน้า 406-413
 - 2) บทความเรื่อง "An Iris-Blob Map – A Novel Feature for Iris Pattern Identification" นำเสนอในงานประชุมวิชาการ The 6th International Joint Conference on Computer Science and Software Engineering 2009 จัดที่โรงแรมลาгуนา บ่อ ภูเก็ต ระหว่างวันที่ 30 พฤศจิกายน – 3 ธันวาคม พ.ศ. 2552 บทความนี้ตีพิมพ์ไว้ใน Proceedings of 6th International Joint Conference on Computer Science and Software Engineering 2009 หน้า 257-262
 - 3) บทความเรื่อง "An Improvement of Iris-Blob Map Approach for Iris Identification" นำเสนอในงานประชุมวิชาการ ECTI-CON 2010 จัดที่โรงแรมเอ็มเพรช เชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 19 – 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2553 บทความนี้ตีพิมพ์ไว้ใน The 2010 ECTI International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunication and Information Technology หน้า 846-850
12. ทุนวิจัยที่เคยได้รับ -
13. ทุนวิจัยในปัจจุบัน -

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย 3

- | | |
|---|--|
| 1. ชื่อ (ภาษาไทย) | น้ำฝน เข้มทองเจริญ |
| ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) | Numfon Khemthongcharoen |
| 2. วันเดือนปีเกิด | 24 เมษายน 2527 |
| 3. สถานที่เกิด | กรุงเทพมหานคร |
| 4. สถานภาพการสมรส | โสด |
| 5. ตำแหน่งปัจจุบัน | ผู้ช่วยนักวิจัย |
| 6. ที่อยู่หน่วยงาน | ศูนย์วิจัยอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ |
| 7. เบอร์โทรศัพท์ | 081-402-1155 |
| 8. ประวัติการศึกษา | |
| | 2549-2552 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล |
| | 2545-2558 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 9. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, หนังสือ สิทธิบัตร (ในประเทศและต่างประเทศ) | |

Publications:

- N. Khemthongcharoen, R. Jolivot, S. Rattanavarin, and W. Piyawattanametha, "Advances in imaging probes and optical microscopical imaging techniques for early *in vivo* cancer assessment," *Advanced Drug Delivery Reviews*, In press

Proceedings/Conferences:

- N. Khemthongcharoen, A. Ruangphacha, and W. Piyawattanametha, "Phage Display Specific p16INK4a Binding Peptide for *Ex Vivo* Cancer Cells Imaging," The 6th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NanoMed 2012), Bangkok, Thailand, November 4-7, 2012.
- N. Khemthongcharoen, A. Ruangphacha, P. Sarapukdee, P. Wongsawatsuriya, F. Beadyananda, and W. Piyawattanametha. Acridine orange staining for cell analysis. 8th Asian Congress for Microcirculation, Bangkok, Thailand. October 26-28, 2011.
- N. Khemthongcharoen, A. Sappat, K. Jaruwongrunsee, A. Tuantranont, W. Wonglumsom and C. Promptma. Development of Piezoresistive Microcantilever as a DNA Sensor for *Cholera* Toxin Gene Detection. 8th Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS 2009), Daegu, South Korea. November 11-14, 2009.
- N. Khemthongcharoen, A. Sappat, K. Jaruwongrunsee, A. Tuantranont, W. Wonglumsom, C. Promptma., Preparation of Piezoresistive Microcantilever for Biosensor Application. Annual Conference on the National Research, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand, 2009.
- R. Sarapukdee, S. Rattanavarin, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, R. Jolivot, H. Jung, D. López, M. J. Mandella, and W. Piyawattanametha, "Handheld Multispectral Dual-Axis Confocal Microscope for Cervical Cancer Screening," The international society for optics and photonics, Photonics West 2013, San Francisco, California, USA. February 5-7, 2013.

- A. Ruangphacha, N. Khemthongcharoen, W. Piyawattanametha, "Homology modeling characterization of CDK4 roscovitine complexes," 11th International Conference on Bioinformatics (InCoB 2012), Bangkok, Thailand, October 3-5, 2012
- S. Rattanavarin, P. Sarapukdee, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, M. J. Mandella, and W. Piyawattanametha, "Handheld Cervical Confocal Microscope Based on a MEMS Scanner," Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies (APCOT 2012), Nanjing, China, July8-11, 2012
- P. Sarapukdee, S. Rattanavarin, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, M. J. Mandella, and W. Piyawattanametha, "MEMS-Based Handheld Dual-Axis Confocal Microscope for Cervix Cancer Screening," International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology (ECTI-CON 2012), Hua Hin, Thailand, May16-18, 2012.
- P. Wongsawatsuriya, N. Khemthongcharoen, and W. Piyawattanametha. Video Mosaicing for Real time Field of View Enhancement. IEEE Robotics and Biomimetics (ROBIO 2011). Phuket Island, Thailand, December 7-11, 2011.
- A. Tuantranont, A. Sappat, T. Lomas, A. Wisitsaraat, U. Sungkanak, N. Khemthongcharoen, and C. Promptmas. "Microcantilever Sensors for Point-of-Care Detection" Proceeding of the sensor symposium on sensors, micromachines and applied systems; 25th, 739-742, Japan, 2008.

Patents:

- Numfon Khemthongcharoen, Athisake Ruangphacha, Wibool Piyawattanametha, Santi Rattanavarin, Pongsak Sarapukdee, Ungkarn Jarujareet, Suthiluk Patumaraj, Somchai Nirutisart, Romuald Julivot. 2012. Specific peptide tracers and their using method for p16INK4a detection, Application number 1201003486 (Thailand).
- Numfon Khemthongcharoen, Chamras Promptmas, Adisorn Tuantranont, and Assawapong Sappat. 2011. Preparation of microcantilever-based DNA sensor system for cholera toxin gene detection, Application number 1101000803 (Thailand).

Research scholarships:

- The Graduate Scholarship of the Faculty of Medical Technology, Mahidol University 2006-2007.
- Scholarship for Master's Degree Student Support, Biosensor Research Project BT B-01-M-14-5000, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand, 2007-2008.

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย 4

1. ชื่อ (ภาษาไทย) พงษ์ศักดิ์ สาระภักดิ์
(ภาษาอังกฤษ) Pongsak Sarapukdee
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 1 4514 00004 23 8
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยนักวิจัย
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC)
ห้อง 321 112 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120
Advance Imaging Research (AIR) Center
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 104 ถนนราชดำริ แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์: +66 (0)2-564-6900 Ext 2332, +66 (0)2-256-4547
โทรสาร: +66 (0)2-564-6756
E-mail: sarapukdee@gmail.com
5. ประวัติการศึกษา
ระดับปริญญาตรี วิศวกรรม (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ระดับปริญญาโท วิศวกรรมชีวเวช บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ
Biosensors, Electronics, MEMS-BASED, LabViews Programming
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
งานวิจัยในระดับปริญญาโท: การประดิษฐ์เครื่องมือตรวจวัดด้วยหลักการการดูดกลืนแสงชนิดไม่รุกล้ำร่างกาย
สำหรับตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงระดับไนตริกออกไซด์หลังจากกระตุ้นด้วยการรัดแขน
8. Publications:
 - P. Sarapukdee, S. Patumraj, M. Sriyudthsak, "Non-invasive nitric oxide optical sensor", The 2nd Symposium on Thai Biomedical Engineering, Bangkok, October 5-6, 2010. (2nd Paper Award)
 - P. Sarapukdee, S. Patumraj, M. Sriyudthsak, "Non-invasive nitric oxide optical sensor", 13th TSM annual Meeting of Thai Society of Microcirculation, Bangkok, Thailand, December 3, 2010. (2nd Poster Award)
 - P. Sarapukdee, S. Patumraj, M. Sriyudthsak, "A development of an non-invasive optical sensor for determining nitric oxide changes after arm-cuff occlusion", 8 th Asian Congress for Microcirculation, Bangkok, Thailand, October 26-28, 2011. (1st Poster Award)

- N. Khemthongcharoen, A. Ruangphacha, P. Sarapukdee, P. Wongsawatsuriya, F. Beadyananda, and W. Piyawattanametha, "Acridine orange staining for cell analysis", 8 th Asian Congress for Microcirculation, Bangkok, Thailand, October 26-28, 2011
- Pongsak Sarapukdee, Santi Rattanavarin, Ungkarn Jarujareet, Numfon Khemthongcharoen, Athisak Ruangphacha¹, Michael J. Mandella, and Wibool Piyawattanametha, "MEMS-Based Handheld Dual-Axis Confocal Microscope for Cervix Cancer Screening", 9th International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology (ECTI-CON 2012), Hua Hin, Thailand, May 16-18, 2012.
- S. Rattanavarin, P. Sarapukdee, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, and Wibool Piyawattanametha, "Handheld cervical confocal microscope based on a mems scanner", The Sixth Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies, Nanjing, China, July 8-11, 2012.
- S. Rattanavarin, Pongsak Sarapukdee, Ungkorn Jarujareet, Numfon Khemthongcharoen, Athisak Ruangpracha, Romuald Jolivot, Il Woong Jung, Daniel López, "Handheld Multispectral Confocal Microscope for Cervical Cancer Diagnosis", Optical MEMS & Nanophotonics Conference 2012, Banff, Alberta, Canada, August 6-9, 2012

XXVII), 2013 Transducers & Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on Digital Object Identifier: 10.1109/Transducers.2013.6627233 Publication Year: 2013 , Page(s): 2173 – 2176

- Pongsak Sarapukdee ; **Santi Rattanavarin** ; Ungkarn Jarujareet ; Numfon Khemthongcharoen ; Romuald Jolivot, et al. " *Handheld multispectral dual-axis confocal microscope for cervical cancer screening* ", Proc. SPIE 8575, Endoscopic Microscopy VIII, 85750V (March 13, 2013); doi:10.1117/12.2004224, <http://dx.doi.org/10.1117/12.2004224>
- Tantipiriyakij, P. ; Sankatumvong, P. ; Sarapukdee, P. ; **Rattanavarin, S.** ; Jarujareet, U. ; Khemthongcharoen, N. ; Ruangphacha, A. ; Il Woong Jung ; Piyawattanametha, W. " *Characteristics of MEMS scanners with different driving bias* ", Electron Devices and Solid State Circuit (EDSSC), Bangkok, Thailand, December 3-5, 2012
- Rattanavarin, S.** ; Sarapukdee, P. ; Jarujareet, U. ; Khemthongcharoen, N. ; Ruangpracha, A. ; Jolivot, R. ; Il Woong Jung ; Lopez, D. ; Mandella, M.J. ; Piyawattanametha, W. " *Handheld multispectral confocal microscope for cervical cancer diagnosis* ", Optical MEMS and Nanophotonics (OMN), 2012 International Conference on Digital Object Identifier: 10.1109/OMEMS.2012.6318792 Publication Year: 2012 , Page(s): 41 - 42
- Il Woong Jung ; **Rattanavarin, S.** ; Sarapukdee, P. ; Mandella, M.J. ; Piyawattanametha, W. ; Lopez, D. " *2-D MEMS scanner for handheld multispectral confocal microscopes* ", Optical MEMS and Nanophotonics (OMN), 2012 International Conference on Digital Object Identifier: 10.1109/OMEMS.2012.6318891 Publication Year: 2012 , Page(s): 238 – 239
- S. **Rattanavarin**, P. Sarapukdee, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, and Wibool Piyawattanametha, " *Handheld cervical confocal microscope based on a mems scanner* ", The Sixth Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies, Nanjing, China, July 8-11, 2012.
- Pongsak Sarapukdee, **Santi Rattanavarin**, Ungkarn Jarujareet, Numfon Khemthongcharoen, Athisak Ruangphacha, Michael J. Mandella, and Wibool Piyawattanametha, " *MEMS-Based Handheld Dual-Axis Confocal Microscope for Cervix Cancer Screening* ", 9th International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology (ECTI-CON 2012), Hua Hin, Thailand, May 16-18, 2012.

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย 6

- | | |
|--------------------|--|
| 1. ชื่อ (ภาษาไทย) | อังคาร จารุจาริต |
| ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) | Ungkarin Jarujareet |
| 2. วันเดือนปีเกิด | 28 พฤษภาคม 2528 |
| 3. สถานที่เกิด | จังหวัดนครราชสีมา |
| 4. สถานภาพการสมรส | โสด |
| 5. ตำแหน่งปัจจุบัน | ผู้ช่วยนักวิจัย |
| 6. ที่อยู่หน่วยงาน | ศูนย์วิจัยอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ |
| 7. เบอร์โทรศัพท์ | 086-7336552 |
| 8. ประวัติการศึกษา | |
| | 2548-2551 วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิศวกรรมคอมพิวเตอร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| | 2544-2547 วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา วิศวกรรมคอมพิวเตอร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ |
9. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities -
10. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ -
11. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, หนังสือ สิทธิบัตร (ในประเทศและต่างประเทศ)
- 1) บทความเรื่อง "A Fast Algorithm for Iris Localization" นำเสนอในงานประชุมวิชาการ The 12th National Computer Science and Engineering Conference 2008 จัดที่โรงแรมล่องบิชการ์เด็น โฮเตล แอนต์ สปา พัทยา ระหว่างวันที่ 20 - 21 พฤศจิกายน พ.ศ. 2551 บทความนี้ตีพิมพ์ไว้ใน Proceedings of 12th National Computer Science and Engineering Conference 2008 หน้า 406-413
 - 2) บทความเรื่อง "An Iris-Blob Map – A Novel Feature for Iris Pattern Identification" นำเสนอในงานประชุมวิชาการ The 6th International Joint Conference on Computer Science and Software Engineering 2009 จัดที่โรงแรมลาгуนา บีช ภูเก็ต ระหว่างวันที่ 30 พฤศจิกายน – 3 ธันวาคม พ.ศ. 2552 บทความนี้ตีพิมพ์ไว้ใน Proceedings of 6th International Joint Conference on Computer Science and Software Engineering 2009 หน้า 257-262
 - 3) บทความเรื่อง "An Improvement of Iris-Blob Map Approach for Iris Identification" นำเสนอในงานประชุมวิชาการ ECTI-CON 2010 จัดที่โรงแรมเอ็มเพรส เชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 19 – 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2553 บทความนี้ตีพิมพ์ไว้ใน The 2010 ECTI International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunication and Information Technology หน้า 846-850
12. ทุนวิจัยที่เคยได้รับ -
13. ทุนวิจัยในปัจจุบัน -