การผลิตและลักษณะสมบัติของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ต่อ Notch1 และ Notch2 โดยใช้เซลล์ไลน์ HEK-293T

น.ส.วรวรรณ บุญรัศมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ANTIBODY scFv-Fc AGAINST NOTCH1 AND NOTCH2 USING HEK-293T CELL LINE

Miss Worawan Bunrasmee

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology and Microbial Technology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ต่อ Notch1 และ Notch2 โดยใช้เซลล์ไลน์ HEK-293T
โดย	น.ส.วรวรรณ บุญรัศมี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.จอมขวัญ มีรักษ์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วรวรรณ บุญรัศมี : การผลิตและลักษณะสมบัติของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ต่อ Notch1 และ Notch2 โดยใช้เซลล์ไลน์ HEK-293T . (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ANTIBODY scFv-Fc AGAINST NOTCH1 AND NOTCH2 USING HEK-293T CELL LINE) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

วิถีสัญญาณ Notch ประกอบด้วย รีเซบเตอร์ 4 ชนิด (Notch 1-4) และลิแกนด์ 5 ชนิด (Delta-1, 3, 4 และ Jagged 1, 2) การเกิดอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์และรีเซบเตอร์ จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณ NRR ทำให้เกิดการเผยตำแหน่งที่มีการตัดโดยเอนไซม์ซึ่งนำไปสู่การตัดโดยแกมมาซีครีเทส ดังนั้น NRR จึงเป็นตำแหน่งสำคัญเพื่อรักษาเสถียรภาพของ NRR ไว้เพื่อป้องกันการตัดของ Notch รีเซบเตอร์ วิถีสัญญาณ Notch ทำหน้าที่ควบคุมการเพิ่มจำนวน การเปลี่ยนสภาพ ตลอดจนถึงการตายของเซลล์หลายประเภท ความผิดปกติของสัญญาณ Notch ส่งผลให้เกิดการพัฒนาเป็นมะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้ มีการใช้ยากดการทำงานของเอนไซม์แกมมาซีครีเทส (GSI) เพื่อการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch แต่มีรายงานว่า GSI ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ เนื่องจากมีซับสเตรทหลายชนิด รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในรูป scFv-Fc ซึ่งเป็นโปรตีนลูกผสมประกอบด้วย scFv และ Fc ของอิมมูโนโกลบูลินจีของมนุษย์ ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางการรักษาบำบัดเนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีกว่ามอโนคลอนอลแอนติบอดีทั้งโมเลกุลหลายด้าน ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc ต่อบริเวณ NRR ของ Notch1 และ Notch2 โดยใช้เซลล์ไลน์ HEK-293T และศึกษาลักษณะสมบัติของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc โดยทดสอบการจับกับ Notch1 และ Notch2 และผลกระทบต่อวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat จากผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ต่อ Notch1 และ 2 ได้ในเซลล์ไลน์ HEK-293T เมื่อทำการทรานส์เฟคชันพลาสมิดที่มีชิ้นยีนของ scFv-Fc เข้าสู่เซลล์ โดยนำโปรตีนที่ได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไปแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ พบว่าบน SDS-PAGE ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียว เมื่อผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยสองขั้นตอนโดยใช้คอลัมน์ต่อ His-tag และ คอลัมน์โปรตีน A นำแอนติบอดีที่ได้ไปทดสอบรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อบริเวณ NRR โดย anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc บ่มกับเซลล์ไลน์ Jurkat พบว่าที่ปริมาณ 1 และ 10 ไมโครกรัม ตามลำดับ สามารถจับอย่างจำเพาะเมื่อวิเคราะห์ด้วย flow cytometry เพื่อศึกษาผลต่อการตัดของ Notch และการแสดงออกของยีนเป้าหมายของ Notch ได้แก่ *HES1* และ *HEY1* โดยใช้ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1 และ 10 ไมโครกรัม พบว่า รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc มีผลยับยั้งการตัด Notch1 ได้ และมีผลทำให้มีการลดลงของการแสดงออกของยีนทั้ง *HES1* และ *HEY1* ดังนั้นผลที่ได้บ่งชี้ว่า รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc มีประสิทธิภาพในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch เทียบเท่ากับการใช้ GSI การยับยั้งอย่างจำเพาะต่อวิถีสัญญาณ Notch โดยรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นอาจนำไปสู่การบำบัดรักษาโรคมะเร็งในอนาคตได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2561	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....

5872047523 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY
KEYWORD: Notch signaling, Recombinant antibody scFv-Fc, HEK-293T cell line

Worawan Bunrasmee : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ANTIBODY scFv-Fc AGAINST NOTCH1 AND NOTCH2 USING HEK-293T CELL LINE . Advisor: Assoc. Prof. Tanapat Palaga, Ph.D.

Notch signaling pathway comprises of four different Notch receptors (Notch-1-4) and five ligands (Delta-1, -3, -4 and Jagged1, 2). Receptor-ligand interaction on the cell surface results in a conformational change in the negative regulatory region (NRR) domain, which exposes a proteolytic cleavage site on the Notch receptor to γ -secretase. Therefore, NRR is a target for antibody blocking that confer stability of NRR and block the cleavage of Notch receptor. Notch signaling regulates proliferation, differentiation, and apoptosis of various cell types. Aberrant increases or deficiencies in Notch signaling lead to cancer development of various origins. Small molecule γ -secretase inhibitor (GSI) is generally used for inhibiting Notch signaling but it has undesirable side effects because γ -secretase has multiple substrates. scFv-Fc is a fusion protein of the single-chain variable fragments (scFv) and human immunoglobulin G (IgG) Fc domain. scFv-Fc has potential in clinical application over the whole monoclonal antibody for target therapy. The purpose of this research is to produce the recombinant antibody scFv-Fc against NRR of Notch1 and 2 in HEK-293T cell line and characterize the recombinant antibody in human leukemia cell line Jurkat. The results showed that recombinant anti-Notch1 and 2 scFv-Fc were successfully expressed in HEK-293T cell line when scFv-Fc gene harboring plasmid was transfected into the cells. Proteins from culture supernatant was purified by affinity chromatography column. The purified protein showed a single band protein, on SDS-PAGE after purification by two-step affinity chromatography method of His-tag and protein A affinity column. To test whether the recombinant antibody scFv-Fc recognizes the NRR, anti-Notch1 scFv-Fc and anti-Notch2 scFv-Fc were incubate to Jurkat cell line at 1, 10 µg, respectively. The results by flow cytometry showed specific binding of antibody. The effect on cleaved Notch and experession of the Notch target gene, *HES1, HEY1* were examined. Anti-Notch1 scFv-Fc and anti-Notch2 scFv-Fc were used at 1, 10 µg, respectively. The results showed that the recombinant antibody decreased the level of cleaved Notch1 and reduced the expression of *HES1* and *HEY1*. Therefore, the recombinant antibody anti-Notch1 scFv-Fc and anti-Notch2 scFv-Fc specifically inhibited Notch signaling at equivalent level as to that of GSI. Specific inhibition of Notch signaling by the recombinant antibodies may present a novel therapeutic approach in treatment of cancer in the future.

Field of Study:	Microbiology and Microbial Technology	Student's Signature ....
Academic Year:	2018	Advisor's Signature ....

Chulalongkorn University

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาของรองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี ที่กรุณาเป็นประธาน ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา และอาจารย์ ดร.จอมขวัญ มีรักษ์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และปรับปรุงวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆที่เป็นประโยชน์อย่างมาก และขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ บุคลากรทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการใช้สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ ตลอดระยะเวลาทำงานวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 2015 ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่เป็นกำลังใจสำคัญ และคอยสนับสนุนในด้านต่างๆ จนทำงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

วรวรรณ บุญรัศมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

.... ค
บทคัดย่อภาษาไทย... ค
.... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ... ง
กิตติกรรมประกาศ.. จ
สารบัญ.. ฉ
สารบัญตาราง... ญ
สารบัญภาพ.. ฎ
คำย่อ.. ฐ
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 ปริทรรศน์วรรณกรรม 3
2.1 วิถีสัญญาณ Notch.. 3
2.1.1 Notch รีเซบเตอร์และลิแกนด์... 3
2.1.1.1 Negative regulatory region (NRR)... 6
2.1.2 วิถีสัญญาณ Notch กับมะเร็ง.. 8
2.1.3 วิถีสัญญาณ Notch และ สารยับยั้งแกมมาซีครีเตส (GSI)... 9
2.1.4 การใช้แอนตีบอดีในการกดวิถีสัญญาณ Notch.. 11
2.2 รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc.. 13
2.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี... 15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง 17
3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ 17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ 17
3.1.1.1 เซลล์ไลน์ HEK-293T 17
3.1.1.2 เซลล์ไลน์ Jurkat 17
3.1.2 การเก็บรักษาเซลล์ 18
3.1.3 การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยง 18
3.2 การเตรียมพลาสมิด 18
3.3 การทรานส์เฟคชัน 19
3.4 การคัดเลือกเซลล์ไลน์ที่มีการทรานส์เฟคชันโดยพลาสมิด 20
3.5 การวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน 20
3.5.1 การสกัดโปรตีน 20
3.5.2 การวัดปริมาณโปรตีน 20
3.5.3 การแยกโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 21
3.5.4 วัดระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot 21
3.5.5 การตรวจสัญญาณโดยวิธี chemiluminescence 22
3.6 การแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFV-Fc และ anti-Notch2 scFV-Fc 23
3.6.1 การเตรียมตัวอย่าง 23
3.6.2 การแยกบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ His-Tag 24
3.6.3 การแยกบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์โปรตีน 24
3.7 การทำให้โปรตีนเข้มข้น 25
3.8 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีน 25
3.9 การวิเคราะห์ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในเซลล์ไลน์ Jurkat 26
3.9.1 การตรวจสอบการจับ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ของแอนติบอดีโดยวิธี Flow cytometry 26

3.9.2 การตรวจสอบผลของแอนติบอดีต่อการตัดของ Notch1 โดยวิธี Western blot 26

3.9.3 การวิเคราะห์ผลของแอนติบอดีต่อแสดงออกของยีน *HES1* และ *HEY1* โดยวิธี quantitative RT-PCR (qPCR) 27

3.9.3.1 การสกัด total RNA 27

3.9.3.2 การทำ Reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) 28

3.9.3.3 การตรวจหาการแสดงออกของยีน HES1 และ HEY1 ด้วยวิธี qPCR 28

3.8.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ 29

บทที่ 4 ผลการทดลอง 31

4.1 การยืนยันพลาสมิดประมวลรหัสรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี และ การสร้าง Empty vector 31

4.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในเซลล์ไลน์ HEK-293T 34

4.3 การแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc 35

4.3.1 การแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และanti-Notch2 scFv-Fc โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF ที่จำเพาะต่อ His-tag 36

4.3.2 ผลการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์โปรตีน A 42

4.3.3 การเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ 44

4.4 การทดสอบการจับกับ Notch1 และ Notch2 ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในเซลล์ไลน์ Jurkat 49

4.5 ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ต่อ วิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ไลน์ Jurkat 54

4.6 ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch *HES1* และ *HEY1* ในเซลล์ไลน์ Jurkat 56

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 59

บรรณานุกรม........ 66

ภาคผนวก........ 73

ประวัติผู้เขียน........ 84

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างแอนติบอดีต่อรีเซบเตอร์ของ Notch 12

ตารางที่ 2 แอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองโดยวิธี Western blot 23

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer 29

ตารางที่ 4 ความบริสุทธิ์และผลผลิตของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ที่ได้จาก 48

ตารางที่ 5 ความบริสุทธิ์และผลผลิตของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc ที่ได้จาก 48

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 โครงสร้างโปรตีนของ Notch รีเซปเตอร์และลิแกนด์ 3

ภาพที่ 2 วิถีสัญญาณ Notch 5

ภาพที่ 3 องค์ประกอบของ Negative regulatory region (NRR) 7

ภาพที่ 4 เปรียบเทียบโครงสร้างของแอนติบอดีและรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี 15

ภาพที่ 5 แสดงแผนที่พลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 32

ภาพที่ 6 แสดงขนาดของพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5, anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 และ Empty vector 33

ภาพที่ 7 ผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนส์ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในเซลล์ไลน์ HEK-293T 35

ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc จากน้ำเลี้ยงเซลล์ HEK-293T โดยใช้ Empty vector เป็นชุดควบคุมลบในการทดลอง 36

ภาพที่ 9 ผลการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF ที่จำเพาะต่อ His-tag 39

ภาพที่ 10 ผลการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF ที่จำเพาะต่อ His-tag 40

ภาพที่ 11 ผลการแยกบริสุทธิ์ของ Empty vector โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF ที่จำเพาะต่อ His-tag 42

ภาพที่ 12 ผลการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์โปรตีน A 44

ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ 47

ภาพที่ 14 ผลการทดสอบการจับรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ต่อ Notch1 ในเซลล์ไลน์ Jurkat 52

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 15 ผลการทดสอบการจับรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc ต่อ Notch2 ในเซลล์ไลน์ Jurkat 54

ภาพที่ 16 ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ต่อการตัด Notch1 ในเซลล์ไลน์ Jurkat 55

ภาพที่ 17 ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อระดับ mRNA ของยีน HES1 และ HEY1 ในเซลล์ไลน์ jurkat โดยวิธี qPCR 58

ภาพที่ 18 แบบจำลองการทำงานของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อวิถีสัญญาณ Notch 64

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำย่อ

Abs	Absorbance
ADAMs	A disintegrin and metalloprotease
APS	Ammonium persulfate
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
CSL	CBF1/RBPJ**κ** in vertebrates/Suppressor of Hairless in *Drosophila*, Lag-1 in *C.elegans*
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphates
FBS	Fetal bovine serum
GSI	*Gamma-secretase* inhibitor
HD	Heterodimerization domain
HES	Hairy and enhancer of spilt
HEY	Hairy and enhancer of spilt related with YRPW Motif
HRP	Horseradish peroxidase
M	Molar

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

MW	Molecular weight marker
NECD	Notch extracellular domain
NICD	Notch intracellular domain
NRR	Negative regulatory region
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline-Tween
pH	Potential of Hydrogen ion
PVDF	Polyvinylidene fluoride membrane
qPCR	*quantitative polymerase chain reaction*
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institube medium
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	Tetramethyllethylenediamine
TMB	3,3’,5,5’-Tetramethylbezidine
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume
%	Percentage
:	Ratio

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

Notch receptors เป็นกลุ่มโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane protein) พบได้บริเวณผิวของเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็ง เซลล์ต้นกำเนิด เป็นต้น วิถีสัญญาณ Notch จะทำหน้าที่ควบคุมกลไกการพัฒนาของเซลล์ เช่น การเพิ่มจำนวน การแบ่งตัว รวมทั้งการตายของเซลล์ โดยการทำงานจะขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ วิถีสัญญาณ Notch เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง รีเซบเตอร์และลิแกนด์ บนผิวเซลล์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจะประกอบด้วย รีเซบเตอร์ 4 ชนิดคือ Notch 1-4 และลิแกนด์ 5 ชนิดคือ Delta-1, -3, -4 Jagged1, 2 ซึ่งการส่งสัญญาณผ่านรีเซบเตอร์และลิแกนด์แต่ละคู่มีบทบาทหน้าที่ต่างกัน หากสัญญาณ Notch เพิ่มขึ้นหรือมีความผิดปกติจะส่งผลต่อการพัฒนาของเซลล์ รวมทั้งมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็ง ดังนั้น วิถีสัญญาณ Notch จึงเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการรักษาที่เฉพาะเจาะจงและมีศักยภาพในการรักษาโรคมะเร็งและโรคอื่น ๆ

สารยับยั้งแกมมาซีครีเตส หรือ GSI ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease) แต่ต่อมาพบว่า มีข้อจำกัดในการนำมาใช้ในการรักษาโรค เช่น โรคมะเร็ง เนื่องจากยามีความจำเพาะต่ำ ไม่สามารถยับยั้ง Notch แต่ละชนิดได้อย่างจำเพาะ เนื่องจากแกมมาซีครีเทสมีหลายซับเสรท ทำให้เมื่อใช้สารยับยั้งแกมมาซีเทรส จะมีการยับยั้งทั้ง 4 ชนิดของรีเซบเตอร์พร้อม ๆ กันและส่งผลกระทบต่อการยับยั้งการตัดของซับเสรทอื่น ๆ ด้วย นำไปสู่ผลข้างเคียงในการรักษา เช่น เกิดความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ต่อมาจึงมีการศึกษาพัฒนาวิธียับยั้งวิถีสัญญาณ Notch โดยใช้แอนติบอดี เนื่องจากมีความจำเพาะสูงและไม่ส่งผลข้างเคียง โดยแอนติบอดีในรูป scFv-Fc จะเป็นที่นิยมในการนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษา เนื่องจากมีคุณสมบัติในการรักษาโรคได้ดี โดยพบว่าแอนติบอดีในรูป scFv-Fc มีขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมและสามารถอยู่ในซีรั่มได้นานโดยไม่ถูกกำจัดได้ทางไต ซึ่งส่งผลให้

สามารถเข้าถึงเป้าหมายหรือเนื้องอกได้ดียิ่งขึ้น เมื่อเทียบกับการนำแอนติบอดีในรูปแบบอื่นมาใช้ในการรักษา

Negative regulatory region (NRR) เป็นบริเวณหนึ่งบนรีเซบเตอร์ของ Notch ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญในการเกิดวิถีสัญญาณ Notch โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (TALL) มักมีการเกิด mutation บริเวณ NRR ซึ่งทำให้มีการตัด Notch รีเซบเตอร์ ที่ไม่อยู่ภายใต้การควบคุมปกติ จึงส่งผลเกิดความผิดปกติของสัญญาณ Notch และนำไปสู่การเกิดโรค ดังนั้น บริเวณ NRR จึงเป็นที่น่าสนใจในการเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษา

โดยในงานวิจัยนี้ได้สนใจการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ต่อ Notch1 และ Notch 2 โดยใช้เซลล์ไลน์ HEK-293T และนำแอนติบอดีที่ได้มาใช้ในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็ง

วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ต่อ Notch1 และ Notch2 โดยใช้เซลล์ไลน์ HEK-293T และศึกษาการทำงานของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อการจับบริเวณ NRR ในเซลล์ไลน์ Jurkat และการกดวิถีสัญญาณ Notch

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

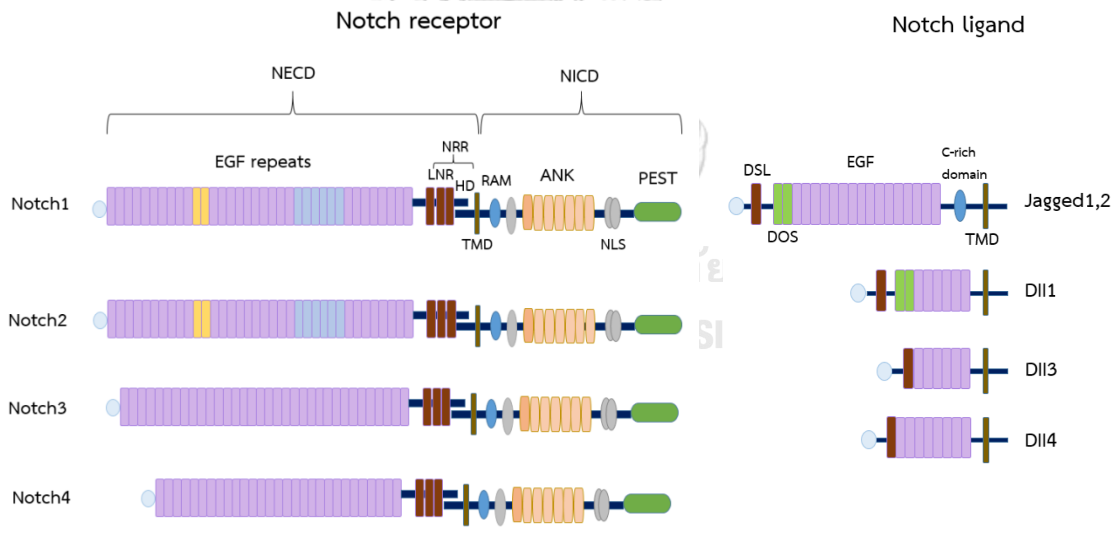
ได้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ต่อ Notch1 และ Notch2 ที่ผลิตโดยเซลล์ไลน์ HEK-293T ที่สามารถจับกับ Notch1 และ Notch2 ได้ และสามารถยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งได้

บทที่ 2
ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 วิถีสัญญาณ Notch

2.1.1 Notch รีเซบเตอร์และลิแกนด์

วิถีสัญญาณ Notch เกิดจากอันตรกิริยาระหว่าง Notch รีเซบเตอร์และลิแกนด์ ที่อยู่บนผิวเซลล์ ทำให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์ นำไปสู่กลไกพื้นฐานในการควบคุมกิจกรรมของเซลล์ในบริบทต่าง ๆ เช่น การเพิ่มจำนวน (proliferation) การเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ตลอดจนถึงการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) (1) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม มีรีเซบเตอร์ 4 ชนิด ได้แก่ (Notch1, Notch2, Notch3 และ Notch4) และมี ลิแกนด์ 5 ชนิด ได้แก่ (Delta-like (Dll) 1, Dll3, Dll4, Jagged1 และ Jagged2) (2) (แสดงในภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างโปรตีนของ Notch รีเซบเตอร์และลิแกนด์

NECD: Notch extracellular domain — Ank: Ankyrin

NICD: Notch intracellular domain — PEST: Proline-glutamate serine-threonine-rich

EGF: Epidermal growth factor — RAM: RBP-j-asspciated molecule

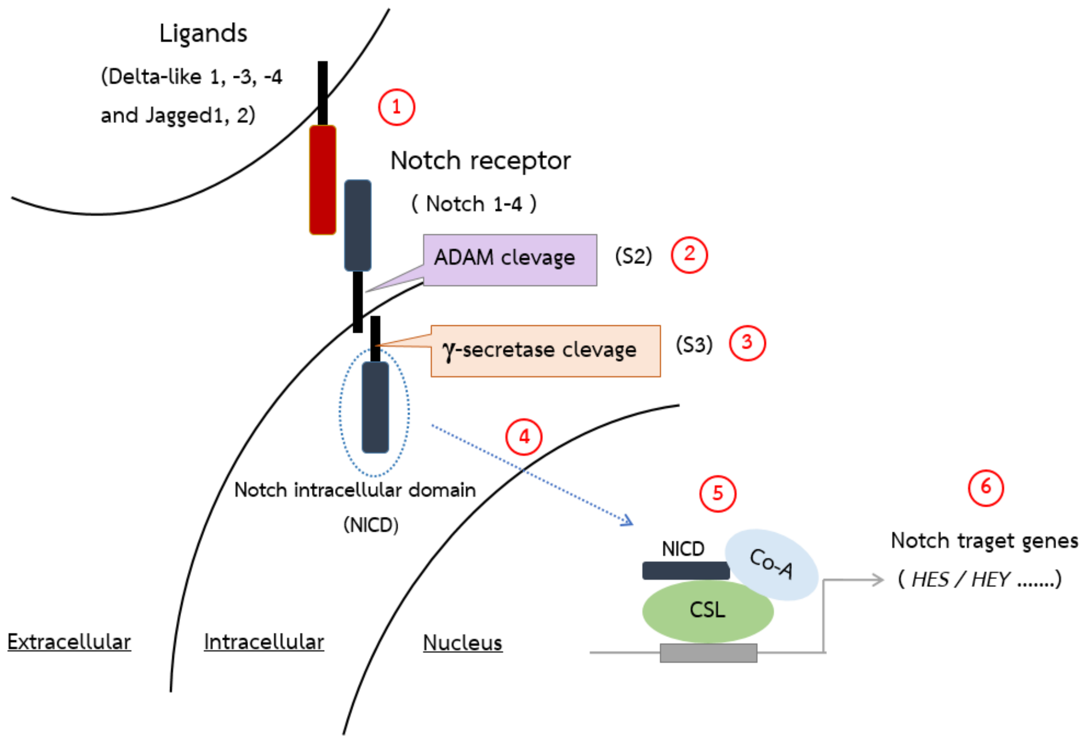
ลิแกนด์ของ Notch มีการแสดงออกบนผิวเซลล์ ในส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ประกอบไปด้วย Epidermal growth factor (EGF)-like repeats บริเวณ DSL (Delta/Serrate/Lag) และบริเวณ Cysteine-rich region ซึ่งพบในเฉพาะใน Jagged 1 และ Jagged 2 เท่านั้น (3)

Notch รีเซบเตอร์ เป็น transmembrane glycoproteins ชนิดที่1 ประกอบด้วย บริเวณที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Notch extracellular domain; NECD) ที่ประกอบไปด้วย บริเวณภายนอกเซลล์ที่มี Epidermal growth factor (EGF)-like repeats และ บริเวณ Negative regulatory region (NRR) โดย Notch1 และ Notch2 มี EGF-like repeats จำนวน 36 ซ้ำ ส่วน Notch3 มี EGF-like repeats จำนวน 34 ซ้ำและ Notch4 มี EGF-like repeats จำนวน 29 ซ้ำ ซึ่งบริเวณนี้มีความสำคัญในการทำอันตรกิริยาแบบจำเพาะกับลิแกนด์ (4) และในส่วนบริเวณที่อยู่ภายในเซลล์ ที่ประกอบด้วย Notch intracellular domain; NICD) ที่มีบริเวณ Membrane-proximal RBP-j-asspciated molecule (RAM) domain Ankyrin (Ank)-like repeats จำนวน 7 ซ้ำ Nuclear localization sequences (NLS) 2 ตำแหน่ง transactivation domain (TAD) และ Proline-glutamate serine-threonine-rich (PEST domain) โดยตำแหน่งของ TAD จะพบได้ใน Notch1 และ Notch2 เท่านั้น ซึ่งทุกตำแหน่งล้วนแล้วแต่เป็นบริเวณสำคัญในการส่งสัญญาณวิถีสัญญาณ Notch (5) (แสดงดังภาพที่ 1)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

อันตรกิริยาระหว่างรีเซบเตอร์และลิแกนด์ เกิดขึ้นระหว่างเซลล์สองเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกัน(6) การเกิดอันตรกิริยาระหว่าง Notch รีเซบเตอร์และลิแกนด์ เหนี่ยวนำการตัดบริเวณรีเซบเตอร์ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณ ADAM clevage และ บริเวณ γ-secretase cleavage (7) ส่งผลให้ NICD เป็นอิสระจากเยื่อหุ้มเซลล์ และเคลื่อนที่เข้าสู่ในนิวเคลียสได้ จากนั้น บริเวณตำแหน่ง RBP-Jkappa-associated module(RAM domain) ankyrin Ankyrin (ANK) ของ

NICD ไปทำอันตรกิริยากับ CSL/RBP-Jκ ซึ่งเป็น DNA binding transcription factor (8, 9) โดยมี NLS ทำหน้าที่กำหนดให้ Notch เข้าสู่เซลล์ และชักนำ transcription coactivator (CoA) รวมเป็น สารประกอบเชิงซ้อนNotch/ CSL /CoA ผ่าน TAD (10) นำไปสู่การกระตุ้นยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch เช่น ยีนในกลุ่มของ *Hairy and enhancer of spilt (HES) Hairy and enhancer of spilt related with YRPW Motif (HEY)* (11) โดยมี PEST domain ทำหน้าที่ความคุมความเสถียรของโปรตีนวิถีสัญญาณ Notch จะมีการควบคุมไม่ให้ทำงานตลอดเวลา โดยที่ Notch จะถูกย่อยสลายด้วย proteasome (12) (แสดงดังภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วิถีสัญญาณ Notch

(1) การจับกันระหว่าง Notch รีเซบเตอร์และลิแกนด์ เกิดการตัดบริเวณ Notch รีเซบเตอร์ 2 รอบ ได้แก่ (2) การตัดโดย ADAM clevage และ (3) การตัดโดย γ-secretase cleavage (4) NICD เคลื่อนเข้าไปสู่นิวเคลียส (5) ประกอบเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Notch/ CSL /CoA และ (6) เหนี่ยวนำให้มีการเกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย เช่น ยีนในกลุ่มของของ HES และ HEY

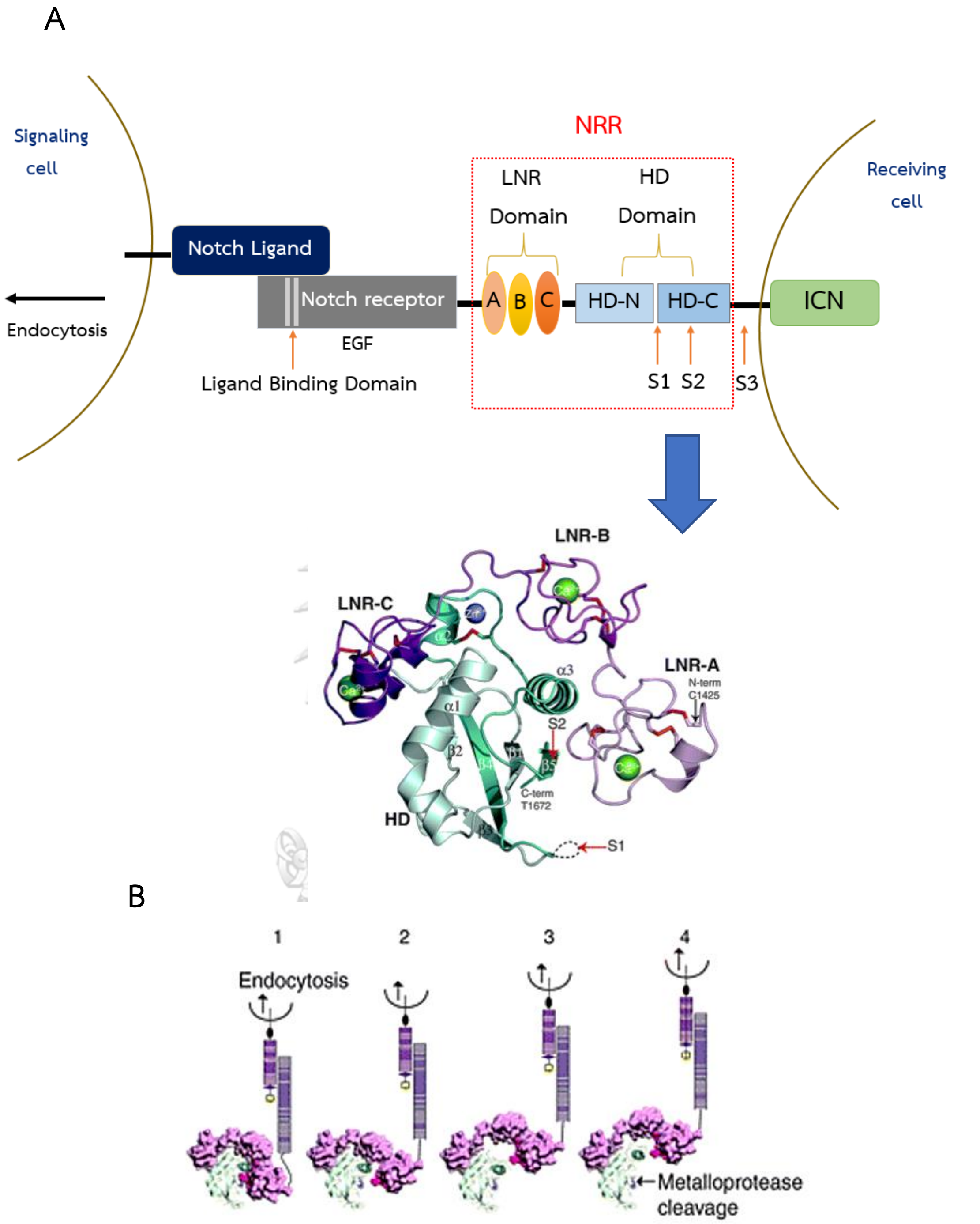
2.1.1.1 Negative regulatory region (NRR)

NRR เป็นบริเวณหนึ่งบน Notch รีเซบเตอร์ ซึ่งอยู่บริเวณ C-terminal ของ EGF-like repeats ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญในการเกิดวิถีสัญญาณ Notch (6) โดยบริเวณของ NRR ประกอบด้วย 2 โดเมนหลัก ได้แก่ LIN-12-Notch repeats (LNR) 3 ตำแหน่ง และ hetero dimerization (HD) 2 ตำแหน่ง (13) โดยมีตำแหน่งของ metalloprotease (ADAMs) cleavage (S2) อยู่บริเวณ C-terminal ของ HD domain ซึ่งเป็นตำแหน่งหนึ่งที่สำคัญในการเริ่มต้นการเกิดวิถีสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (14) (แสดงดังภาพที่ 3A)

ในภาวะปกติของรีเซบเตอร์ ในกรณีที่ไม่มีลิแกนด์เข้ามาจับ บริเวณ NRR จะมีการม้วนพับตัวเองเพื่อป้องกันการตัดโดย ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) จึงไม่สามารถเกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ แต่ถ้าหากมีลิแกนด์เข้ามาจับกับรีเซบเตอร์ ทำให้มีแรงดึงโดยการ endocytosis เข้าสู่ภายในเซลล์ของฝั่งลิแกนด์ ทำให้บริเวณ NRR เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เผยตำแหน่งในการตัดโดย ADAM (S2) ทำให้เกิดการตัด Notch รีเซบเตอร์ และการตัดด้วย γ -secretase นำไปสู่การเกิดวิถีสัญญาณ Notch ได้ (15) (แสดงดังภาพที่ 3B)

จากการศึกษาในเซลล์มะเร็ง พบว่าบริเวณ NRR มักจะเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) นำไปสู่การกระตุ้นการเกิดสัญญาณ Notch อย่างต่อเนื่องโดยไม่อาศัยลิแกนด์ และนำไปสู่การเกิดโรค เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T- cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) (16) ดังนั้น บริเวณ NRR เป็นเป้าหมายสำคัญในการกดสัญญาณ Nocth โดยใช้หลักการการรักษาเสถียรภาพของบริเวณ NRR ไว้ เพื่อป้องการตัดโดย ADAM

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 3 องค์ประกอบของ Negative regulatory region (NRR ดัดแปลงมาจาก) (13)

A) แสดงตำแหน่งและโครงสร้าง NRR บน Notch รีเซบเตอร์ B) แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ NRR เมื่อลิแกนด์เข้ามาจับ

2.1.2 วิถีสัญญาณ Notch กับมะเร็ง

วิถีสัญญาณ Notch ที่ผิดปกตินำไปสู่การเกิดโรคในมนุษย์หลายชนิด เนื่องจากสัญญาณ Notch มีความเชื่อมโยงกับความหลากหลายของกระบวนการทางชีวภาพ เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเปลี่ยนสภาพ ตลอดจนการตายของเซลล์ (1) โดยพบว่า การเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่ผิดปกติของสัญญาณ Notch จะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค เช่น โรคมะเร็ง (12)

Notch เป็นที่รู้จักกันในฐานะเป็นยีนที่ทำหน้าที่เป็นทั้ง oncogene และ tumor suppressor gene ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดย Notch ที่ทำหน้าที่เป็น oncogene พบว่ามีการแสดงของ Notch เพิ่มสูงขึ้นในมะเร็งต่าง ๆ ได้แก่ มะเร็งเต้านม (17) มะเร็งกระเพาะอาหาร (18) มะเร็งตับอ่อน (19) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (20) และพบว่าการแสดงออกของ Notch ลดลง ในมะเร็งผิวหนัง (21) มะเร็งตับบางชนิด (22) มะเร็งต่อมลูกหมาก (23) และ มะเร็งเต้านมบางชนิด (24) โดยในกรณีนี้ Notch ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor gene

นอกจากนี้ การกลายพันธุ์ของรีเซบเตอร์และลิแกนด์ของ Notch เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดวิถีสัญญาณ Notch ที่ผิดปกติไปและนำไปสู่การเกิดโรค (25)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ในปี ค.ศ. 2002 Talora และคณะ รายงานว่า ในระยะสุดท้ายของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูกพบการแสดงออกของ Notch1 ลดลง แต่การแสดงออกของ Notch2 ยังคงสูงขึ้น และเมื่อมีศึกษาการกระตุ้นการแสดงออกของ Notch1 โดยใช้อะดีโนไวรัสในการศึกษา พบว่าการแสดงออกของ HPV-E6 และ E7 ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิถีสัญญาณ Notch มีบทบาทที่สำคัญในการทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ในมะเร็งปากมดลูกระยะสุดท้าย (26)

ในปี ค.ศ. 2004 Parr และคณะ ได้ศึกษาวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งเต้านมและรายงานว่าการแสดงออกของ Notch1 ที่เพิ่มขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งแสดงให้เห็นถึง NOTCH1 เป็นยีนที่ทำหน้าที่เป็น oncogene ในขณะที่

Notch2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่มีอัตราการรอดสูง ซึ่งแสดงให้เห็นถึง Notch2 ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor (24)

ในปี ค.ศ. 2010 Donnem และคณะ ได้ศึกษาวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด non-small cell carcinoma (NSCC) และรายงานว่า การแสดงออกร่วมกันของ Notch1 และ VEGF-A มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง (27)

ในปี ค.ศ. 2004 Weng และคณะ รายงานว่า 50% ของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (T-cell acute lymphoblastic leukemia; T-ALL) เกิดจาก NOTCH1 มีการกลายพันธุ์ บริเวณ HD Domain ของ NRR ทำให้มีการเผยตำแหน่ง metalloprotease cleavage (S2) และเกิดสัญญาณเข้าสู่เซลล์ ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นด้วยลิแกนด์อิสระ ก่อให้เกิดการส่งสัญญาณของ Notch1 เพิ่มมากขึ้น (16) นอกจากนี้พบว่าโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว เกิดจากการสูญเสีย PEST domain ซึ่งทำหน้าที่ความคุมความเสถียรภาพของโปรตีนวิถีสัญญาณ Notch ด้วยการย่อยสลาย NICD โดยอาศัย proteasome เมื่อมีการสูญเสียส่วนนี้ไปจะทำให้มีการเปิดใช้งานของวิถีสัญญาณ Notch อย่างต่อเนื่อง ก่อให้เกิดการส่งสัญญาณของ Notch1 เพิ่มมากขึ้น (28)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นอกจากนี้ การเกิดการกลายพันธุ์บน Notch รีเซบเตอร์ ยังมีความเกี่ยวข้องกับโรคอื่น ๆ ด้วย เช่น โรคลิ้นหัวใจเอออร์ติก (aortic valve disease) เกิดจากการกลายพันธุ์ของ NOTCH1 (29) Alagille Syndrome (AS) เกิดจากการกลายพันธุ์ของ NOTCH2 (30) เป็นต้น

ดังนั้น วิถีสัญญาณ Notch จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการบำบัดรักษาที่เฉพาะเจาะจงในการรักษาโรคมะเร็งและโรคชนิดอื่น ๆ

2.1.3 วิถีสัญญาณ Notch และ สารยับยั้งแกมมาซีครีเตส (GSI)

สารยับยั้งแกมมาซีครีเตส (GSI) เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก โดยในระยะเริ่มแรก GSI

มีการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (31) เนื่องจากพบว่า เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์แกมมาซีครีเทส ทำให้มีการตัดโปรตีน amyloid precursor protein (APP) ในเซลล์ประสาท ที่ผิดตำแหน่งไปส่งผลให้เกิดการสะสมของ amyloid-β peptide เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อสมองและเกิดเซลล์ประสาทตาย ซึ่งส่งผลต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาพัฒนา GSI เพื่อใช้ในการยับยั้ง เอนไซม์แกมมาซีครีเทส (32) และยังมีการศึกษาพบว่ายาบางชนิดในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ได้เช่นเดียวกัน (33) โดยมีรายงานการศึกษาผลของ GSI ดังกล่าวในเซลล์มะเร็งมากมายในเวลาต่อมา

ในปี ค.ศ. 2004 Weng และคณะ รายงานว่า GSI สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-ALL โดยทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะพัก (G0-G1) (34)

ในปี ค.ศ. 2004 Hallahan และคณะ รายงานว่า DAPT (N-[N-(3,5-difluoro phenacetyl)-L--alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester ซึ่งเป็น GSI ชนิดหนึ่ง สามารถลดการเจริญของ medulloblastoma ในหนูทดลองได้ (35)

ในปี ค.ศ. 2006 O'Neil และคณะ รายงานว่า DAPT สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-ALL ได้ (36)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในการศึกษา GSI กับวิถีสัญญาณ Notch พบว่า GSI มีบทบาทในการยับยั้งรีเซบเตอร์ของ Notch ทั้ง 4 ชนิด พร้อม ๆ กัน รวมทั้งซับสเตรทอื่น ๆ นอกเหนือไปจาก Notch ทำให้ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่าง ๆ ภายในร่างกาย และผลข้างเคียงต่อมมนุษย์ได้ เช่น มีความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหารเป็นพิษ (37) ดังนั้น GSI จึงไม่เหมาะในการนำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรค อย่างเช่น โรคมะเร็ง เนื่องจากไม่มีความจำเพาะและมีผลข้างเคียงต่อมนุษย์

ต่อมาพบว่า GSI มีข้อจำกัดในการนำไปบำบัดรักษาโรค เนื่องจาก GSI ยับยั้งการตัดของ γ -secretase ของหลายซับสเตรต ซึ่งปัจจุบันพบว่า มีมากกว่า 60 โปรตีนที่แตกต่างกันที่เป็นเป้าหมายในการตัดด้วยแกมมาซีครีเตส ทำให้ GSI มีผลข้างเคียงที่รุนแรง (38)

2.1.4 การใช้แอนตีบอดีในการกดวิถีสัญญาณ Notch

ในปัจจุบัน แอนติบอดี ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากแอนตีบอดีมีความจำเพาะสูงและมีผลข้างเคียงต่อมนุษย์ต่ำ (39) ดังนั้น จึงมีผู้วิจัยจำนวนมากมีการพัฒนาสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อ Notch เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดรักษาโรค

ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการพัฒนาสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Notch รีเซบเตอร์และลิแกนด์ โดยงานวิจัยที่ผ่านมามีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Notch รีเซบเตอร์ด้วยกันสองตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณจับกับลิแกนด์ (ligand-binding domain) และ บริเวณของ NRR ดังแสดงในตารางที่ 1

ในปี ค.ศ. 2010 Aste-Amézaga และคณะ ได้สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อ ligand binding domain ของ Notch1 และรายงานว่า แอนติบอดีดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในหลอดทดลองได้ (*in vitro*) (40)

ในปี ค.ศ. 2010 Wu และคณะ ได้สร้างแอนติบอดีต่อบริเวณ NRR ของ Notch1 และ Notch2 และรายงานว่า แอนติบอดีมีความจำเพาะสูงต่อ Notch1 และ Notch2 ตามลำดับ และพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch1 ได้ในเซลล์มะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ของ Notch1 (41)

ในปี ค.ศ. 2012 Falk และคณะ ได้สร้างแอนติบอดีต่อบริเวณ NRR ของ Notch1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

และ Notch2 และรายงานว่า แอนติบอดีความจำเพาะสูงต่อ Notch1 และ Notch2 ตามลำดับ โดยยับยั้งบริเวณ NRR ทำหน้าที่ปิดกั้นโครงสร้าง NRR เพื่อป้องกันการเข้าถึงของ ADAM metalloprotease ส่งผลให้เกิดการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ได้ในเซลล์ต้นกำเนิดประสาท (neural stem cells) (42)

ในปี ค.ศ. 2013 Qiu, Peng และคณะ ได้สร้างแอนติบอดีต่อบริเวณ NRR ของ Notch1 และรายงานว่า แอนติบอดีมีความสามารถ ในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch1 ได้ในเซลล์มะเร็งเต้านม (43)

ในปี ค.ศ. 2014 Agnusdei และคณะ ได้สร้างแอนติบอดีต่อบริเวณ NRR ของ Notch1 และรายงานว่า แอนติบอดีมีความสามารถ ในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch1 ได้ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (T-ALL) จากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแบบเดิม (44)

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างแอนติบอดีต่อรีเซบเตอร์ของ Notch

อิพิโทปเป้าหมาย	แอนติบอดี	ผลต่อเซลล์ทดสอบ	ที่มา
Notch 1 NRR	WC75,WC629 Anti-NRR1 N1_E6 OMP-52 M51 Hu-hN1	Inhibitory Inhibitory Inhibitory Inhibitory Inhibitory	(45) (41) (42) (44) (43)
Notch 2 NRR	Anti-NRR2 N2_B6, N2_B9	Inhibitory Inhibitory	(41) (42)
Notch 3 NRR	A4, A8 A13	Inhibitory Activating	(44) (44)
Notch1 ligand -binding	WC613, WC133	Inhibitory	(40)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

domain	N1_9_b5	Inhibitory	(42)

2.2 รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc

ที่ผ่านมามีการพัฒนาและสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีหลากหลายชนิดเพื่อศึกษา วิจัย และประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ และมีคุณสมบัติที่เหมาะสม รวมทั้งเกิดผลข้างเคียงในมนุษย์น้อยที่สุด เพื่อนำไปพัฒนาใช้ในการบำบัดรักษาโรค

ในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่สนใจในการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด Single-chain Fv-Fc fusion proteins (scFv-Fc) เนื่องจาก มีขนาดโมเลกุลเล็กประมาณ 105 kDa เมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนตีบอดีทั้งโมเลกุล (Whole monoclonal antibodies; mAb) ที่มีขนาดโมเลกุล 150 kDa ทำให้มีสมบัติในการเข้าไปยังเนื้อเยื่อหรือก้อนมะเร็งทำได้ดียิ่งขึ้น (46) นอกจากนี้พบว่า มีครึ่งชีวิตในซีรั่มได้นานยิ่งขึ้น โดยการถูกกำจัดออกโดยทางไต (47) จากการเชื่อมตัว scFv กับ Fc region เมื่อเทียบกับ แอนติบอดีชนิด scFv ที่มีขนาดโมเลกุลเพียง 25 kDa ซึ่งจัดว่ามีขนาดโมเลกุลเล็กมากทำให้สามารถถูกกำจัดทางไตได้รวดเร็ว (48) และนอกจากนี้ข้อดีของการเชื่อมกับ Fc region คือ สามารถใช้ในการตรวจจับและทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพได้ เช่น โปรตีน A หรือ โปรตีน G (49) ชี้ให้เห็นว่าแอนติบอดี scFv-Fc มีศักยภาพและมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกมากกว่าแอนติบอดีชนิด mAb และ scFv (โครงสร้างของแอนติบอดีแต่ละชนิดแสดงดังภาพที่ 4)

ในปี ค.ศ. 2010 Donnem และคณะ ได้สร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc ที่มีการผลิตในเซลล์ไลน์รังไข่ของหนูแฮมสเตอร์ (Chinese hamster ovary; CHO) ต่อ B-cell activating factor (BAFF) ของ tumor necrosis factor family ได้รายงานว่า แอนติบอดี anti-BAFF มี

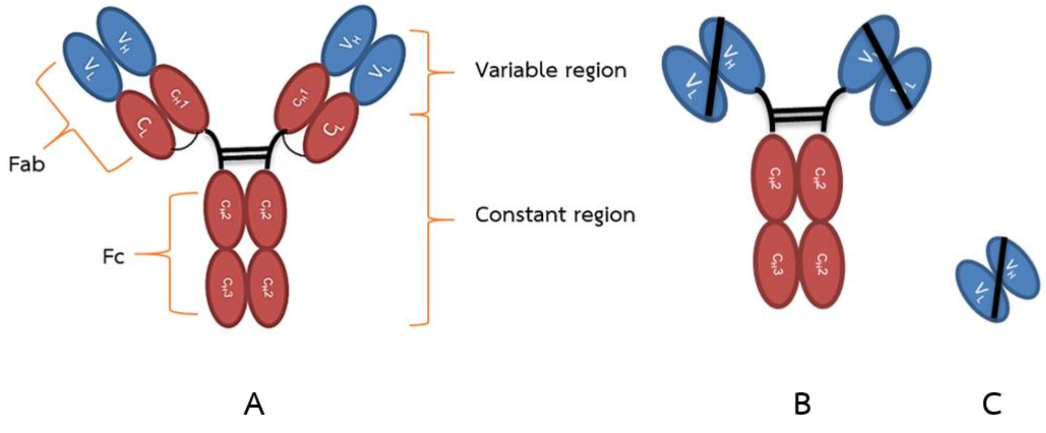
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ความจำเพาะต่อแอนติเจนสูงและชี้ให้เห็นว่าสามารถประยุกต์ใช้ในการบำบัดรักษาในผู้ป่วยโรคภูมิต้านตนเองได้ (27)

ในปี ค.ศ. 2011 Girgis และคณะ ได้สร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc ต่อ carcinoembryonic antigen (CEA) ที่มีการแสดงออกในมะเร็งตับอ่อน (pancreas cancers) โดยศึกษาในหนูที่มีการแสดงออก CEA ได้รายงานว่า รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-CEA scFv-Fc (H310A) มีความจำเพาะต่อแอนติเจนเป้าหมายของเนื้องอก ที่วิเคราะห์ได้จากภาพ MicroPET/CT (50)

ในปี ค.ศ. 2012 Falk และคณะ ได้สร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc ต่อบริเวณ NRR ของ Notch1 และ Notch2 โดยศึกษาในเซลล์ต้นกำเนิดประสาท (neural stem cells) และรายงานว่า anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งและมีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อ Notch รีเซบเตอร์แต่ละชนิด โดยไม่มีผลในการจับระหว่างชนิดของ Notch รีเซบเตอร์ ทั้งในเซลล์ต้นกำเนิดจากมนุษย์และหนูเม้าส์ ชี้ให้เห็นว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิถีสัญญาณ Notch แต่ละชนิด (42)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบโครงสร้างของแอนติบอดีและรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี

A) Whole monoclonal antibodies (mAb) B) Single-chain Fv-Fc fusion proteins (scFv-Fc)

C) Single-chain Fv proteins (scFv)

2.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี

รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาทางคลินิกเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันมีการผลิตรีคอมบีแนนท์แอนติบอดีในโฮสต์ที่หลากหลาย เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ พืช เซลล์แมลง รวมถึง เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (51)

พบว่าในปัจจุบันแอนติบอดีที่ใช้ในการรักษาเกือบทั้งหมดมีการผลิตในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เนื่องจาก มีการม้วนพับของโปรตีน (protein folding) และ มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหลังจากการแปลรหัส (post-translational modification) เสมือนในมนุษย์ นอกจากนี้ยังมีการผลิตโปรตีนได้สูงกว่าเซลล์โปรคารีโอท (52) และยังพบว่า คุณภาพและประสิทธิภาพของโปรตีนที่ผลิตได้จะดีกว่า เมื่อเทียบการผลิตในโฮสต์อื่น ๆ เช่น แบคทีเรีย พืช ยีสต์ เป็นต้น ดังนั้น จึงได้รับความนิยมสูงในการนำมาผลิตแอนติบอดี แม้ว่าการใช้เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมาผลิตจะมีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงและมีความยุ่งยากในการจัดการก็ตาม (53) โดยเซลล์ไลน์ที่ได้รับความนิยมและมี

ความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีมีหลายชนิด เช่น เซลล์รังไข่ของหนูแฮมสเตอร์ (Chinese hamster ovary; CHO), เซลล์ไตตัวอ่อนของมนุษย์ (Human embryonic kidney cells ; HEK293), เซลล์มัยอิโลมาของหนู NS0, และ เซลล์ไตตัวอ่อนของหนูแฮมสเตอร์ (baby hamster kidney; BHK) เป็นต้น (54)

เซลล์ไตตัวอ่อนของมนุษย์ 293T (HEK-293T) เป็นเซลล์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาผลิตแอนติบอดีเนื่องจากมีคุณสมบัติ คือ มีการเจริญเติบโตที่ดี มีความสามารถในการทรานส์เฟคชันสูง มีความเสถียรในการแสดงออก สามารถผลิตโปรตีนออกมานอกเซลล์ได้ และสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้สูง (55) ด้วยคุณสมบัติทั้งหมดนี้ทำให้เซลล์ไลน์ HEK-293T เป็นที่ยอมรับและถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในปัจจุบัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

3.1.1.1 เซลล์ไลน์ HEK-293T

เพาะเลี้ยง HEK-293T (Human embryonic kidney cell) (เซลล์ไตจากตัวอ่อนมนุษย์) (ATCC® CRL-3216™) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) (Hyclone, USA) ที่เติมเซรั่มลูกวัว (Fetal bovine serum; FBS) (Gibco, USA) 10 % (V/V) และยาปฏิชีวนะ penicillin 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Hyclone, USA) เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Thermoelectron corporation, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์และความชื้นสัมพัทธ์ 95%

3.1.1.2 เซลล์ไลน์ Jurkat

เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ Jurkat (เซลล์ไลน์มะเร็งชนิดทีลิมโฟซัยท์) (ATCC® CRL-2900) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Hyclone, USA) ที่เติม FBS (Gibco, USA) 10 % (V/V) ยาปฏิชีวนะ (penicillin 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Hyclone, USA) และ 50 µM ของ β-mercaptoethanol นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นสัมพัทธ์ 95%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.1.2 การเก็บรักษาเซลล์

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM หรือ RPMI-1640) 1 มิลลิลิตร ที่เติม 10% DMSO (v/v) (Sigma-Aldrich, USA) ใส่ลงในเซลล์ที่ปริมาณเซลล์ 1.5x10^6 เซลล์ โดยเก็บเซลล์ลงในหลอด cryogenic vial (Corning Inc., USA) และนำเซลล์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.1.3 การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยง

นำเซลล์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ตามที่ระบุใน 3.1.2 มาทำละลายอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์โดยนำเซลล์ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM, RPMI-1640) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์เหนือตะกอนเซลล์ออก ดีดหลอดให้เซลล์กระจายตัวและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM, RPMI-1640) จากนั้นย้ายลงฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ (ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร) (Nunc, USA) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เพื่อนำเซลล์ไปทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

3.2 การเตรียมพลาสมิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

นำพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 (Addgene, USA) และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 (Addgene, USA) ที่มีส่วน scFv-Fc ต่อ Notch1 และ 2 ตามลำดับ ไปทำการทรานส์ฟอร์มเมชั่นเข้าสู่ *E. coli* DH5α จากนั้นนำ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดมากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาแอมพิซิลลิน (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มเป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส เลือกโคโลนีเดี่ยว มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มีแอมพิซิลลิน (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มแบบเขย่าเป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (New Brunswick Scientific, Cannada) เก็บเซลล์ที่ได้จากการปั่นตกมาสกัดพลาสมิดด้วย

ชุดสกัด พลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตรวจสอบขนาดของพลาสมิด โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI (Thermo scientific, USA) ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของพลาสมิด วัดโดย NanoDrop™ 2000/2000c Spectro- photometer (Thermo scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร

Empty vector ที่ใช้เป็นชุดควบคุมลบในงานวิจัยนี้ ได้จากการตัดพลาสมิดของ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะร่วมกัน ได้แก่ *Bam*H1 และ *Bgl*II (Thermo scientific, USA) เพื่อตัดชิ้นส่วนของ insert ในการแสดงออกของ scFv-Fc ออก และเชื่อมชิ้นส่วนให้ติดกันด้วยการไลเกท

3.3 การทรานส์เฟคชัน

นำเซลล์ HEK-293T จำนวน $5x10^4$ เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในถาดหลุมชนิด 24 หลุม (Corning Inc., USA) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง เติมสารที่ประกอบไปด้วยพลาสมิด (anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5) 1 ไมโครกรัม ร่วมกับ FuGene6™ (Promega, USA) ซึ่งเป็น transfection reagent 3 ไมโครลิตร ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ลงไปในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี Opti-MEM (Gibco, USA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำสารผสมหยดลงไปทั่ว ๆ หลุมแต่ละหลุมที่มีเซลล์ HEK-293T จำนวน $5x10^4$ เซลล์ นำถาดหลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยให้หลุมของเซลล์ที่มี transfection reagent เพียงอย่างเดียวและใช้ Empty vector เป็นตัวควบคุมในการทดลองนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4 การคัดเลือกเซลล์ไลน์ที่มีการทรานส์เฟคชันโดยพลาสมิด

Geneticin (G418) (Gibco, USA) เป็นยาที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเซลล์ไลน์ หลังจากการการทรานส์เฟคชัน 48 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย G418 (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ มีการเปลี่ยนอาหารที่มี G418 ทุก ๆ 3-4 วัน จนกระทั่งได้เซลล์ที่อยู่รอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาคัดเลือก

3.5 การวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน

3.5.1 การสกัดโปรตีน

หลังจากที่เซลล์ถูกคัดเลือกด้วยยา Geneticin แล้ว เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์โดยล้าง PBS ที่เย็น จากนั้นเติม RIPA buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม (ที่มีเซลล์จำนวน $5x10^4$ เซลล์) ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงให้ซากเซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนใสซึ่งเป็นโปรตีน ไปทำการทดลองต่อไป

3.5.2 การวัดปริมาณโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ BCA protein assay kit (PIERCE, USA) โดยเจือจางโปรตีนที่ต้องการวัดด้วยน้ำที่ปลอดประจุและผ่านการฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1:10 ลงในถาดหลุมชนิด 96 หลุม (Corning Inc., USA) ซึ่งจะใช้ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063 และ 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นนำสารละลายที่ประกอบด้วยสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 50:1 ผสมให้เข้ากัน เติมลงในแต่ละหลุมปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและ

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) (Anthos 2010, UK)

3.5.3 การแยกโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมเจล SDS-PAGE 8% (ภาคผนวก ก) และเตรียมตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนที่ได้จากเซลล์ 30 ไมโครกรัม และส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ 40 ไมโครลิตร ผสมร่วมกับ สีย้อม (2x loading dye) และน้ำกลั่น (Double – distilled water) จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และโหลดตัวอย่างทั้งหมดลงในแต่ละหลุมของเจล โดยใช้ Color Plus Prestained Protein Ladder (New England BioLab, USA) เป็น protein marker โปรตีนตัวอย่างจะถูกแยกโดยผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยนำเจลย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue (GE Healthcare, UK) ที่มี Destaining buffer (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วน 1:9 จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าจนกว่าจะเห็นแบนโปรตีนสีน้ำเงิน จากนั้นใช้ Destaining buffer ล้างสีบนเจลออกจนกระทั่งเจลเป็นสีขาวใส วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีน และขนาดโมเลกุลของโปรตีนได้จากแถบที่ปรากฏ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.5.4 วัดระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot

เมื่อแยกโปรตีนครบเวลาที่กำหนด นำเจล SDS-PAGE แช่ใน transfer buffer (ภาคผนวก ก) ประมาณ 5 นาที ตัดกระดาษกรอง 6 แผ่น นำไปแช่ใน transfer buffer และ ตัด Polyvinylidene fluoride (PVDF) (GE Healthcare, UK) ไปแช่ในเมทานอล 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปแช่ใน transfer buffer สำหรับการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมม

เบรนนั้น นำกระดาษกรอง 3 แผ่นวางก่อน ตามด้วย PVDF เมมเบรน ตามด้วยเจล และกระดาษกรองอีก 3 แผ่น จากนั้นไล่ฟองอากาศออกและเติม transfer buffer ลงบนกระดาษกรองเล็กน้อย โดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 mA สำหรับ 1 เจล เป็นเวลา 90 นาที

3.5.5 การตรวจสัญญาณโดยวิธี chemiluminescence

หลังจากที่ย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรนแล้วนำเมมเบรนแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ก) เพื่อปิดที่ว่างบนเมมเบรน เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง บนเครื่องเขย่า เมื่อครบเวลา เท blocking solution ทิ้งและเติมแอนติบอดีปฐมภูมิ (แอนติบอดีที่ใช้แสดงดังตารางที่ 1) นำเมมเบรนมาวางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นวันต่อมาเทแอนติบอดีทิ้งและล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย PBST (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และ 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง ก่อนที่จะเติมแอนติบอดีทุติยภูมิ ซึ่งติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (HRP) (แอนติบอดีที่ใช้แสดงดังตารางที่ 2) และนำเมมเบรนมาวางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย PBST เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้งและ 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง เมื่อครบเวลานำไปตรวจวัดสัญญาณโดยวิธี chemiluminescence ซึ่งเป็นการติดตามผลโดยการเรืองแสงและการติดตามผลด้วยการประกบกับฟิล์มเอกซเรย์ (Amersham Biosciences, UK) ตามลำดับ โดยสารตั้งต้นที่ใช้ในการติดตามผลจะประกอบด้วยสารละลาย A และสารละลาย B (ภาคผนวก ก) เทสารผสมลงบนเมมเบรน บ่มเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นวางเมมเบรนลงบนแผ่นพลาสติกและวางบน Hypercassette (Amersham Biosciences, UK) นำแผ่นฟิล์มเอกซเรย์วางประกบบนเมมเบรน โดยขั้นตอนนี้ต้องทำในที่มืด ซึ่งเวลาที่ใช้ในการประกบฟิล์มนั้นจะขึ้นอยู่กับแต่ละโปรตีนที่ต้องการจะศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 แอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองโดยวิธี Western blot

แอนติบอดี	อัตราส่วนเจือจางที่ใช้	ผู้ผลิต
His-Tag	1:4000	Cell Signaling Technology, USA
β-actin	1:10000	Chemicon International, USA
Cleaved Notch1 (Val1744)	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Rabbit Ig (HRP)	1:4000	Cell Signaling Technology, USA
Mouse Ig (HRP)	1:4000	GE Healthcare, USA

3.6 การแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFV-Fc และ anti-Notch2 scFV-Fc

3.6.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำเซลล์ที่ถูกการทรานส์เฟคชัน ที่มีการแสดงออกอย่างเสถียร มาเลี้ยงในฟลาสก์ (ขนาด75 ตารางเซนติเมตร) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งประกอบไปด้วยยา G418 (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นระยะเวลา 5-7 วัน เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ ไปปั่นตกเอาตะกอนเซลล์ออกที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสและปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย binding buffer (pH 7.4) (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปกรองผ่าน filter ที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Pall Corporation, USA) เพื่อนำไปแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ต่อไป

3.6.2 การแยกบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ His-Tag

แยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ HisTrap™ FF (GE Healthcare, UK) ขนาด 1 มิลลิลิตร (อัตรา 1 มิลลิลิตร/นาที) ด้วยเครื่อง AKTA START (GE Healthcare, UK) ล้างคอลัมน์ด้วย 20% เอทานอลออกด้วยน้ำที่ผ่านการกรอง ปรับ pH คอลัมน์ให้เหมาะสมด้วย binding buffer (pH 7.4) (ภาคผนวก ก) จากนั้นโหลดตัวอย่างที่เตรียมไว้ผ่านคอลัมน์ โดยขณะเดียวกันเก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา เป็น flow-through หลังจากนั้นโหลด binding buffer (pH 7.4) เพื่อที่จะชะล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการออกจากคอลัมน์ ขณะเดียวกันเก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา เป็น Wash หลังจากนั้นโหลด Elution buffer (pH 7.4) (ภาคผนวก) เพื่อชะเอาโปรตีนที่ต้องการออกมาคือ anti-Notch1 และ 2 เก็บเป็น fraction ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ fraction โดยในแต่ละ fraction จะมีความเข้มข้นสุดท้ายของ imidazole ใน Elution buffer เท่ากันทุก fraction (Isocratic elution) เมื่อใช้งานเสร็จ คอลัมน์จะถูกเก็บด้วย 20% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่ได้แต่ละ fraction มารวมกันจากนั้นนำไป Dialysis ด้วย สารละลาย PBS 3 ครั้ง จึงได้ตัวอย่างที่ละลายอยู่ใน PBS เพื่อที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.6.3 การแยกบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์โปรตีน

ใช้เรซินโปรตีน A Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare, UK) ในการแยกบริสุทธิ์โดยนำเรซินแพคในคอลัมน์แก้ว ปรับ pH ด้วย 10mM PBS จากนั้นโหลดตัวอย่างที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ His-Tag และผ่านการ Dialysis มาผ่านคอลัมน์โปรตีน A ขณะเดียวกันเก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา เป็น flow-through หลังจากนั้นโหลด 100 mM Tris (pH 8.0) และ 10 mM Tris (pH 8.0) ตามลำดับ เพื่อที่จะชะล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการออกจากคอลัมน์ ขณะเดียวกันเก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา เป็น Wash หลังจากนั้นโหลด 100 mM glycine (pH 3.0) เพื่อชะโปรตีน

ที่ต้องการออกมาคือ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc โดยจะเก็บเป็น fraction ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อ fraction ที่มี 1 โมลาร์ Tris (pH 8.0) อยู่ในหลอดปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร

3.7 การทำให้โปรตีนเข้มข้น

ใช้ Amicon® Ultra - 0.5Centrifugal Filter Devices (Merck Millipore, Germany) ขนาด 30K เพื่อทำให้โปรตีนเข้มข้น โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์มาผ่านคอลัมน์ครั้งละ 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จะได้ส่วนบนและส่วนล่างของตัวกรอง นำส่วนล่างทิ้ง จากนั้นกลับคอลัมน์คว่ำลง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนที่ปั่นตกลงมา ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ต้องการ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน โดยใช้วิธี BCA protein assay ตามข้อที่ 3.5.2

3.8 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นำตัวอย่างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFV-Fc จากการแยกบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน ที่ได้จาก น้ำเลี้ยงเซลล์, ตัวอย่างที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ต่อ His-tag, ตัวอย่างที่ได้จากการ Dialysis, ตัวอย่างที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีน A และตัวอย่างที่ผ่านการทำให้เข้มข้น มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie Blue และ วิเคราะห์ร้อยละความบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนโดยใช้โปรแกรม Image J (htpp://rsb.info.nih.gov/iJ/) และนำไปคำนวณหาร้อยละผลผลิตได้จากสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{scFv}-\text{Fc}}{\text{scFv}-\text{Fc}_{\text{ตั้งต้น}}} \times 100$$

3.9 การวิเคราะห์ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในเซลล์ไลน์ Jurkat

3.9.1 การตรวจสอบการจับ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ของแอนติบอดีโดยวิธี Flow cytometry

นำรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc มาตรวจสอบการจับโดยใช้เซลล์ Jurkat ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Notch1 และ Notch2 โดยใส่ $1.5x10^5$ เซลล์ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นล้างด้วย 1% FBS ใน PBS 3 รอบ ใส่ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1, 5 และ 10 ไมโครกรัม ใน 1% FBS ใน PBS บ่มนาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้างด้วย 1% FBS ใน PBS 3 รอบ ใส่แอนติบอดีทุติยภูมิ Goat Anti-Human IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, USA) ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มนาน 30 นาทีในที่มืด และปั่นล้างด้วย 1% FBS ใน PBS 3 รอบ เตรียมเซลล์ใส่ในถาดหลุม 96 หลุม เข้าเครื่อง Flow cytometry (FC500, Beckman Coulter, USA) ผลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlowJo (Tree star, Inc., USA)

3.9.2 การตรวจสอบผลของแอนติบอดีต่อการตัดของ Notch1 โดยวิธี Western blot

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นับเซลล์ Jurkat ที่ $1.5x10^5$ ลงในถาดหลุม 12 หลุม ที่ถูกเติม รีคอมบิแนนท์ anti-Notch1 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1 ไมโครกรัม นำไปบ่มเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์มาวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน Cleaved Notch1 (Val1744) ด้วยวิธี Western blot โดยทำตามวิธีที่ 3.5.4 และตรวจสัญญาณการแสดงออกโดยวิธีchemilu minescence และ autoradiography ตามวิธีที่ 3.5.5

3.9.3 การวิเคราะห์ผลของแอนติบอดีต่อแสดงออกของยีน *HES1* และ *HEY1* โดยวิธี quantitative RT-PCR (qPCR)

3.9.3.1 การสกัด total RNA

นำเซลล์ Jurkat 1.5x10^5 เซลล์ ที่บำบัดโดย รีคอมบิแนนท์ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และตัวอย่างเซลล์ Jurkat ที่ได้รับ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ร่วมกัน ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง มาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol® (Invitrogen, UK) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด คือ เก็บเซลล์ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่ TRIzol® ปริมาตร 500 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอด ปิเปตขึ้นและลง 7-8 รอบ ผสมให้เข้ากัน บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติม Chloroform (Lab-Scan, Ireland) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ TRIzol® ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าขึ้นและลงแรงๆ เป็นเวลา 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสซึ่งเป็น โปรตีน ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติม isopropanol (Merck, Germany) ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อ TRIzol® ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ใน DEPC water ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ต่อ TRIzol® ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือตะกอนอยู่ก้นหลอด จากนั้นนำหลอดคว่ำลงบนกระดาษทิชชูจนตะกอนแห้งประมาณ 30 นาที และเติม DEPC water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิเปตขึ้นและลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หลายๆ ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดปริมาณ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Nanodrop (Thermo scientific, USA) แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.9.3.2 การทำ Reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

โดยใช้ความเข้มข้นของ RNA 1 ไมโครกรัม มาใช้เพื่อเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA จากนั้นเติม Random hexamers (Qiagen, Germany) ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วย DEPC water ให้ได้ 12.5 ไมโครลิตร นำตัวอย่างไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 5xRT buffer (Fermentas, Canada) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 10 mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Fermentas, Canada) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, Reverse transcriptase (Fermentas, Canada) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ RNase inhibitor (Fermentas, Canada) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละปฏิกิริยา ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันและนำไปใส่ในเครื่อง PCR Bioer Life Express (Bioer technology, China) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที, อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.9.3.3 การตรวจหาการแสดงออกของยีน HES1 และ HEY1 ด้วยวิธี qPCR

นำตัวอย่าง cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาใช้เป็นต้นแบบ โดยเจือจาง cDNA ด้วย Hypure water และเติม iQ™ SYBR® Green (Bio-Rad, USA), Forward primer, Reverse primer และ Hypure water ลงในแต่ละปฏิกิริยา ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากันและนำไป

ทำ PCR ในเครื่อง Bio-Rad CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดย primer ที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'- 3')	Annealing Temperature (ºC)	Product size (bp)	ที่มา
HES1	For ACGACACCGGATAAACCAAA Rev CGGAGGTGCTTCACTGTCAT	55	200	Kuncharin Y และคณะ, 2011 (56)
HEY1	For AACTGTTGGTGGCCTGAATC Rev GCGGTAAATGCAGGCGTAT	55	160	Li, HCH และคณะ, 2016 (57)
actin	For ACCAACTGGGACGACATGGAG Rev GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC	55	385	Palaga T และคณะ, 2008 (58)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.8.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลในงานวิจัยนี้วิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบข้อมูลเป็นคู่ (t-test) ซึ่ง * แสดง

ถึงค่า *p*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05, ** แสดงถึงค่า *p*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.01 และ *** แสดงถึงค่า *p*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.001 ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism (version 5.03) (GraphPad, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

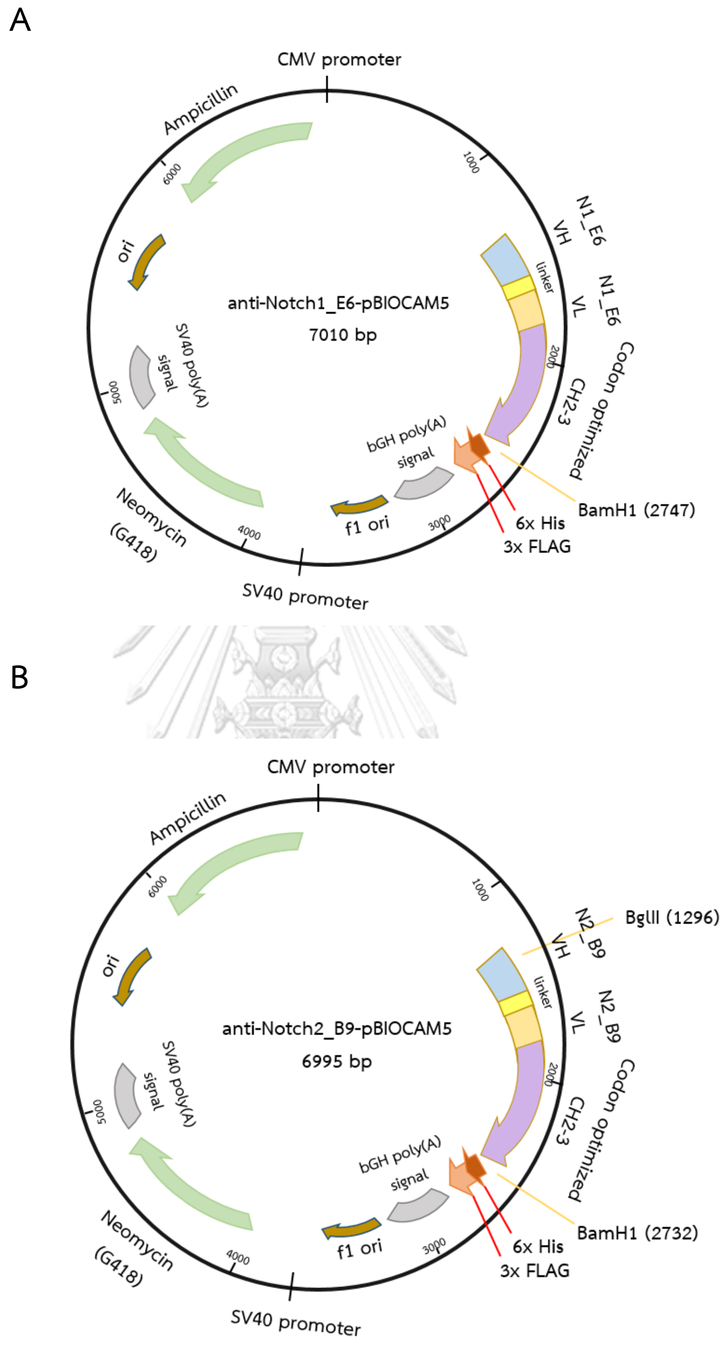
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การยืนยันพลาสมิดประมวลรหัสรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี และ การสร้าง Empty vector

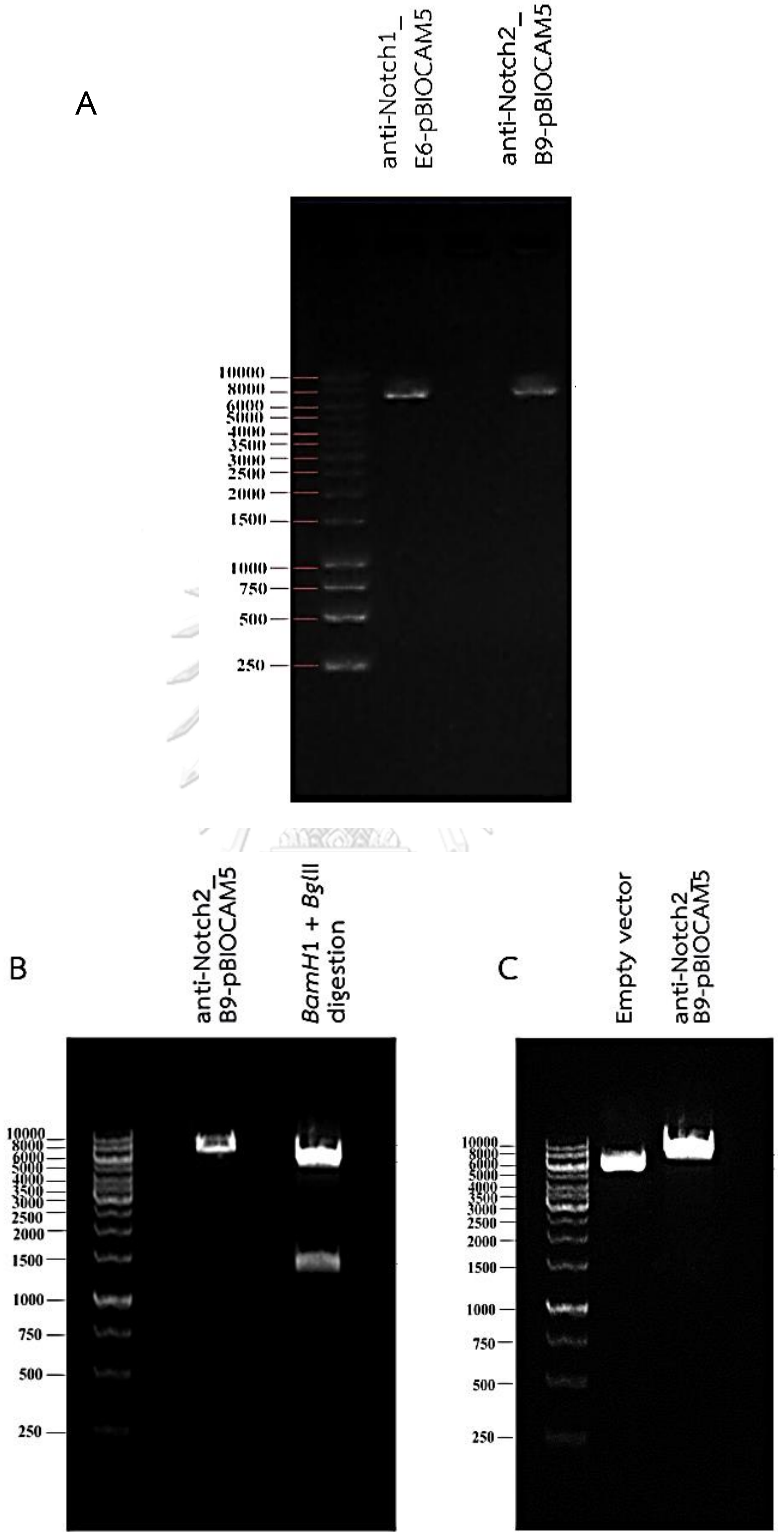
เพื่อยืนยันขนาดของพลาสมิด นำพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 (ภาพ 5A) และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 (ภาพ 5B) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส แสดงในภาพที่ 6A จากภาพปรากฏขนาดของพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 และขนาดของพลาสมิด anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 เป็นไปตามขนาดของพลาสมิดที่ระบุโดยผู้ผลิต

เพื่อสร้าง Empty vector เป็นชุดควบคุมลบ จึงนำพลาสมิด anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 และ *Bgl*II เพื่อตัดส่วน insert ที่ประมวลรหัสของแอนติบอดี scFv-Fc ออก แสดงในภาพที่ 6B พบว่า เมื่อตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 และ *Bgl*II ปรากฏแถบ 2 แถบ ซึ่งเทียบเท่าได้กับขนาดของ Empty vector และ scFv-Fc และเมื่อทำการเชื่อมตัว ในส่วนของ Empty vector พบว่า ปรากฏแถบเพียงแถบเดียว โดยปราศจากส่วนของ insert เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมิด anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 (ภาพที่ 6C) จากผลชี้ให้เห็นว่า ได้ Empty vector ที่เกิดจากการตัดพลาสมิด anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และไลเกทที่สมบูรณ์ เพื่อใช้ในชุดควบคุมลบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 5 แสดงแผนที่พลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 A) แผนที่พลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 B) แผนที่พลาสมิด anti-Notch2_B9-pBIOCAM5



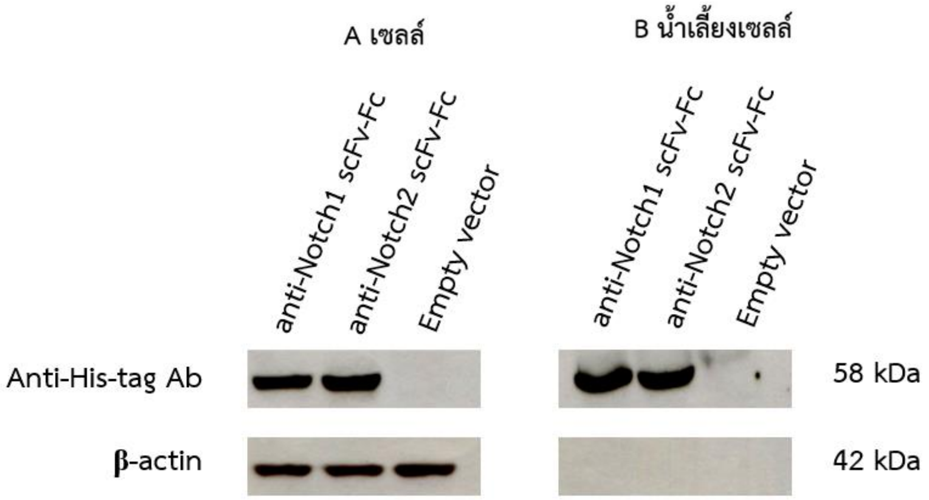
ภาพที่ 6 แสดงขนาดของพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5, anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 และ Empty vector

A) พลาสมิดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI การวัดขนาดของพลาสมิด โดยสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI วิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (1%) B) Empty vector ที่ได้จากการตัดของพลาสมิด anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะร่วมกันของ *Bam*H1 และ *Bgl*II วิเคราะห์ขนาดของ Empty vector โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (1%)

4.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในเซลล์ไลน์ HEK-293T

เพื่อยืนยันการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc จึงทำการทรานส์เฟคชันพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5, anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 และ Empty vector เข้าไปในเซลล์ไลน์ HEK-293T และเลี้ยงในอาหารที่มียา G418 เพื่อใช้ในการคัดเลือกเซลล์ เก็บตัวอย่างจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ มาวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ด้วยวิธี Western blot แสดงในภาพที่ 7 โดยให้เซลล์ที่ได้จากการทรานส์เฟคชัน*ด้วย* Empty vector เป็นชุดควบคุมลบ จากผลการทดลองพบว่าปรากฏแถบโปรตีนของ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 58 kDa ที่สามารถตรวจวัดโดยใช้แอนติบอดีต่อ His-tag ทั้งในตัวอย่างที่ได้จากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ ส่วนในชุดควบคุมลบไม่มีแถบโปรตีนปรากฏทั้งในเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 7A และ 7B) และใช้ **β**-actin เป็นตัวควบคุมปริมาณโปรตีน จากผลดังกล่าวแสดงว่าเซลล์ไลน์ HEK-293T มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc โดยมีการหลั่งออกภายนอกเซลล์ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

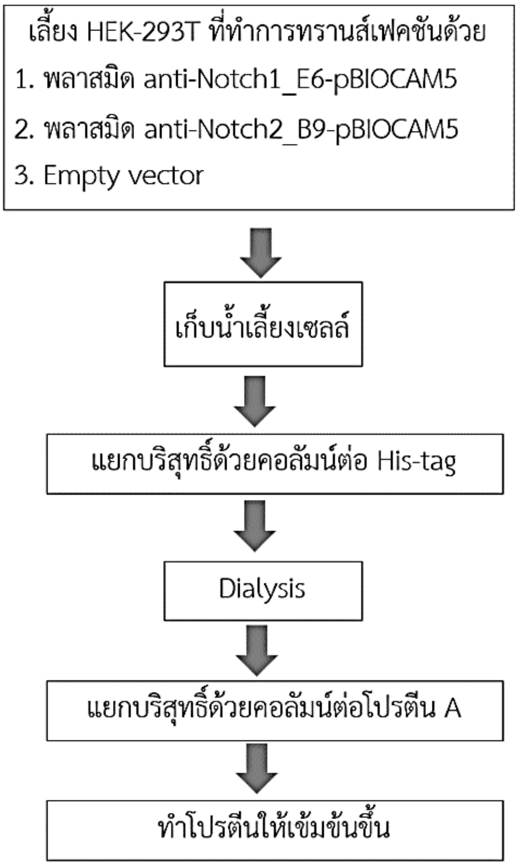


ภาพที่ 7 ผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนส์ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในเซลล์ไลน์ HEK-293T

A) โปรตีนจากเซลล์ B) โปรตีนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่นำมาวิเคราะห์หารีคอมบิแนนท์ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ด้วยวิธี Western blot

4.3 การแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc

เพื่อศึกษาการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc โดยนำเซลล์ HEK-293T ที่ถูกการทรานส์เฟคชันด้วยพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5, anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 หรือ Empty vector และคัดเลือกให้มีการแสดงออกอย่างเสถียร มาเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5-7 วัน เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ปริมาตร 240 มิลลิลิตร มาทำการแยกบริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc จากน้ำเลี้ยงเซลล์ HEK-293T โดยใช้ Empty vector เป็นชุดควบคุมลบในการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3.1 การแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และanti-Notch2 scFv-Fc โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF ที่จำเพาะต่อ His-tag

ทำการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc anti-Notch2 scFv-Fc และ *Empty vector* ซึ่งเป็นชุดควบคุมลบ ด้วยคอลัมน์ HisTrap™ FF ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเครื่อง AKTA START แสดงผลในภาพที่ 9, 10 และ 11 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ใน

ตัวอย่างที่ได้จากเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน anti-Notch1 scFv-Fc เมื่อชะออกมาด้วย Elution buffer ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ของ imidazole 500 มิลลิโมลาร์ เท่ากันทุก fraction และวัดด้วยความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ผ่านเครื่อง AKTA START พบมีโปรตีนสูงสุดอยู่ที่ 350 mAU ซึ่งปรากฏใน fraction 5, 6 และ 7 (แสดงในภาพที่ 9A) ส่วนในตัวอย่างที่ได้จากเซลล์ที่แสดงออกของโปรตีน anti-Notch2 scFv-Fc เมื่อถูกชะออกมาด้วย Elution buffer ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ imidazole 500 มิลลิโมลาร์ เท่ากันทุก fraction และวัดด้วยความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ผ่านเครื่อง AKTA START พบมีโปรตีนสูงสุดอยู่ที่ 800 mAU ซึ่งปรากฏใน fraction 5, 6 และ 7 (แสดงในภาพที่ 10A) จึงนำ fraction ที่คาดว่ามีคอมบิแนนท์โปรตีน anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ดังกล่าวไปตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot พบว่า จากวิธี SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie Blue มีแถบโปรตีน anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ใน fraction ที่ 5, 6 และ 7 ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa (แสดงในภาพที่ 9B และ 10B ตามลำดับ) และยังพบแถบโปรตีนปนเปื้อนอื่น ๆ ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 58 kDa ร่วมอยู่ด้วย (ภาพที่ 9B, 10B) และจากการตรวจสอบด้วยวิธี Western blot มีโปรตีน anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ใน fraction ที่ 5, 6 และ 7 ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa (แสดงในภาพที่ 9C และ 10C ตามลำดับ) โดยที่แถบโปรตีนปนเปื้อนอื่น ๆ ที่สูงกว่า 58 kDa ไม่ทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะกับแอนติบอดีต่อ His-tag (ภาพที่ 9C, 10C)

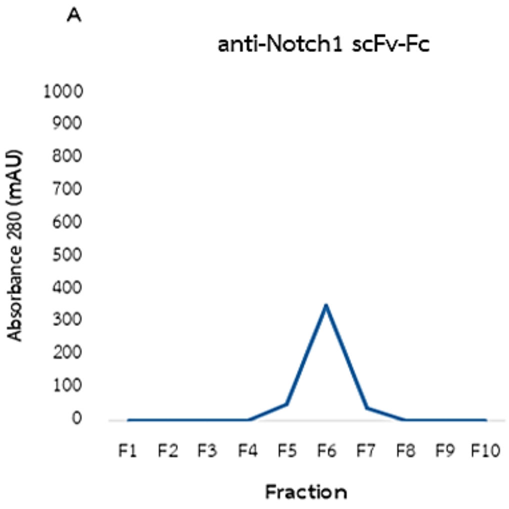
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

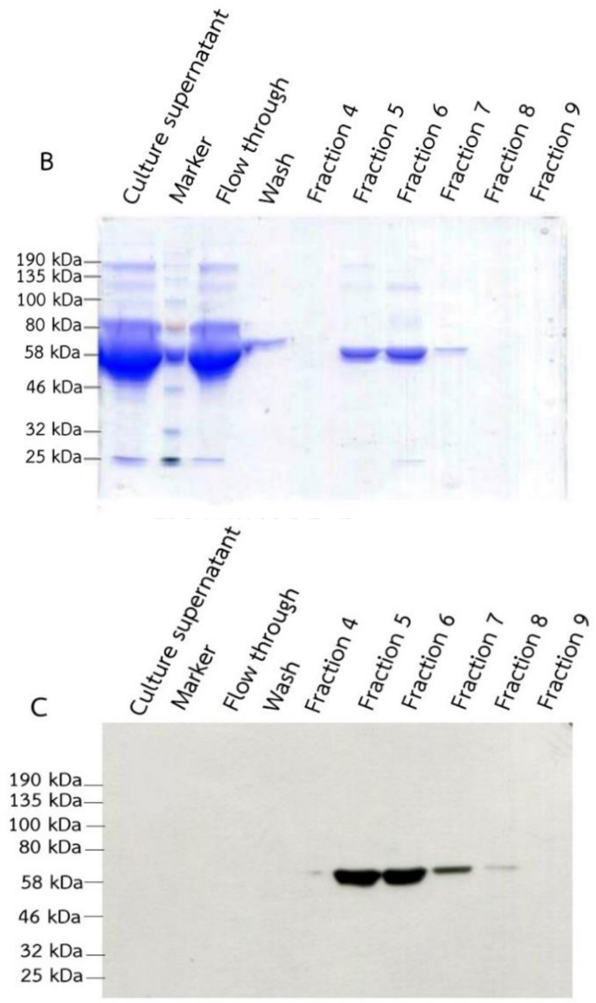
ผลการศึกษาโปรตีนที่ได้จากการทรานส์เฟคชันเซลล์ด้วย Empty vector ซึ่งเป็นชุดควบคุมลบ เมื่อชะออกมาด้วย Elution buffer และวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ผ่านเครื่อง AKTA START พบมีโปรตีนสูงสุดอยู่ที่ 90 mAU ซึ่งปรากฏใน fraction 5, 6 และ 7 (แสดงในภาพที่ 11A) จึงนำ fraction ดังกล่าวไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot พบว่า เมื่อย้อมด้วยสี Coomassie Blue มีโปรตีนใน fraction ที่ 5, 6 และ 7 ที่

ขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 58 kDa (ภาพที่ 11B) ซึ่งแถบที่ปรากฏเป็นแถบโปรตีนปนเปื้อนอื่น ๆ ที่ปรากฏเช่นเดียวกับการแยกบริสุทธิ์ของ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc และพบว่าไม่มีโปรตีนใน fraction ใดทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะกับแอนติบอดีต่อ His-tag ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa (ภาพที่ 11C)

ผลที่ได้บ่งชี้ว่า การแยกบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ต่อ His-tag ไม่สามารถแยกรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ได้อย่างบริสุทธิ์สมบูรณ์ เนื่องจากพบโปรตีนอื่นปะปนในตัวอย่าง ดังนั้น จึงต้องทำการแยกบริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อโปรตีน A เพื่อให้ได้แอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพสูงในการนำไปใช้งาน

นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่า การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ได้โปรตีนน้อยกว่า รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc ซึ่งดูได้จากค่าปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ แสดงในภาพ 9A และ 10A เท่ากับ 350 mAU และ 800 mAU

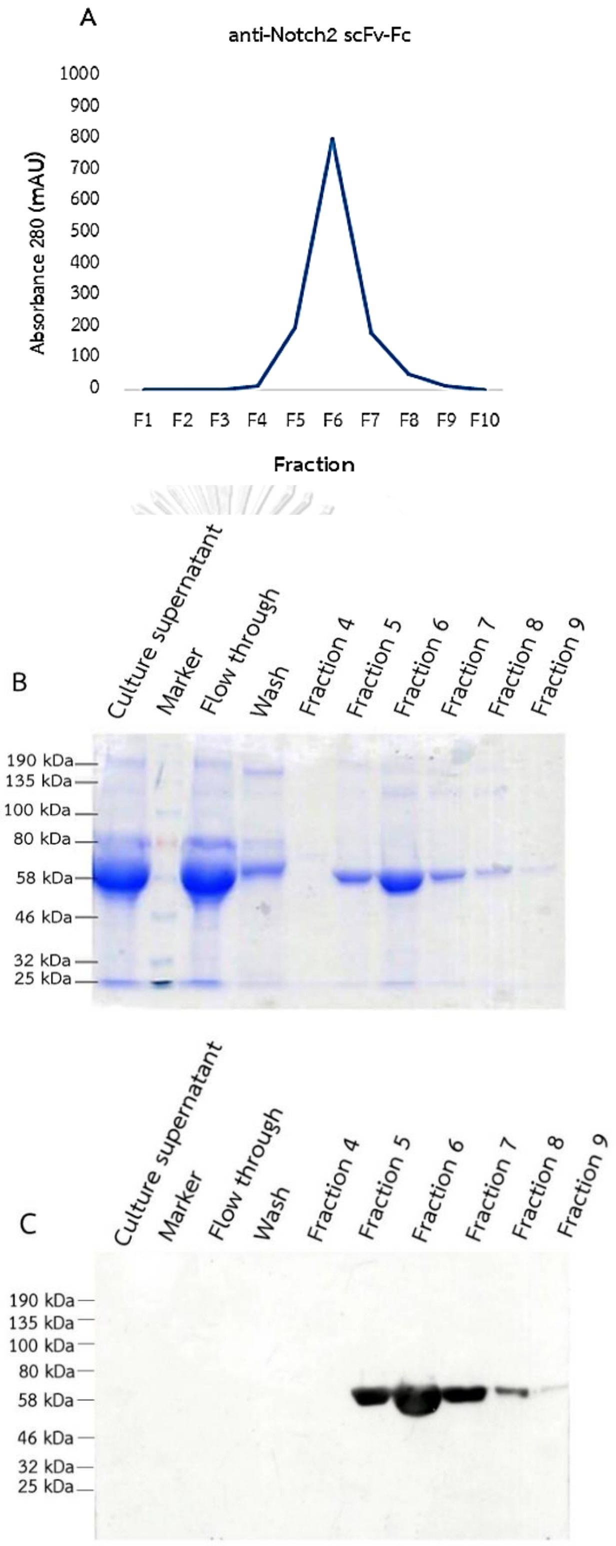




จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

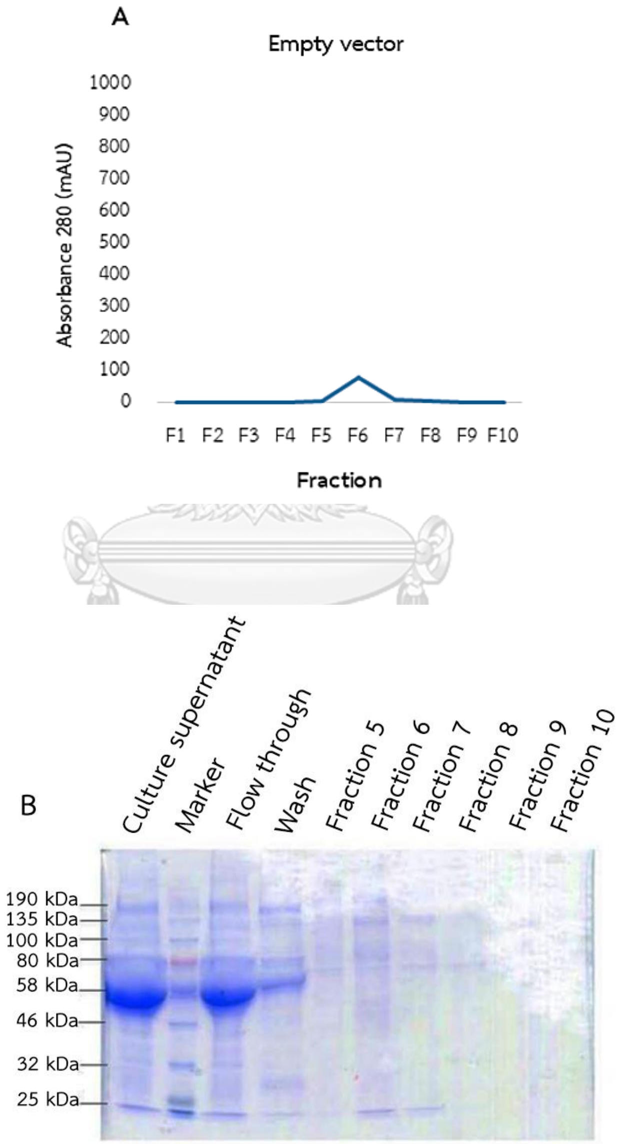
ภาพที่ 9 ผลการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF ที่จำเพาะต่อ His-tag

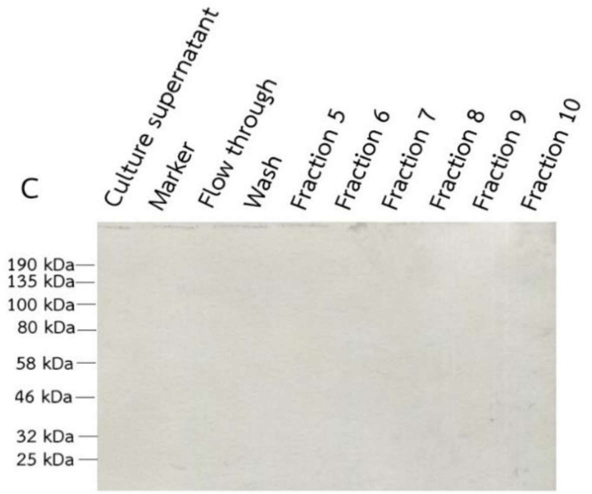
A) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรของโปรตีนในแต่ละ fraction B) ผลการตรวจวัดรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีโดยใช้ 8% SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie Blue C) ผลการตรวจวัดรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิต่อ His-Tag



ภาพที่ 10 ผลการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF ที่จำเพาะต่อ His-tag

A) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรของโปรตีนในแต่ละ fraction B) ผลการตรวจวัดรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีโดยใช้ 8% SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie Blue C) ผลการตรวจวัดรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิต่อ His-Tag





ภาพที่ 11 ผลการแยกบริสุทธิ์ของ Empty vector โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF ที่จำเพาะต่อ His-tag

A) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรของโปรตีนในแต่ละ fraction B) ผลการตรวจวัด Empty vector โดยใช้ 8% SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie Blue C) ผลตรวจวัดโปรตีน Empty vector ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิต่อ His-Tag

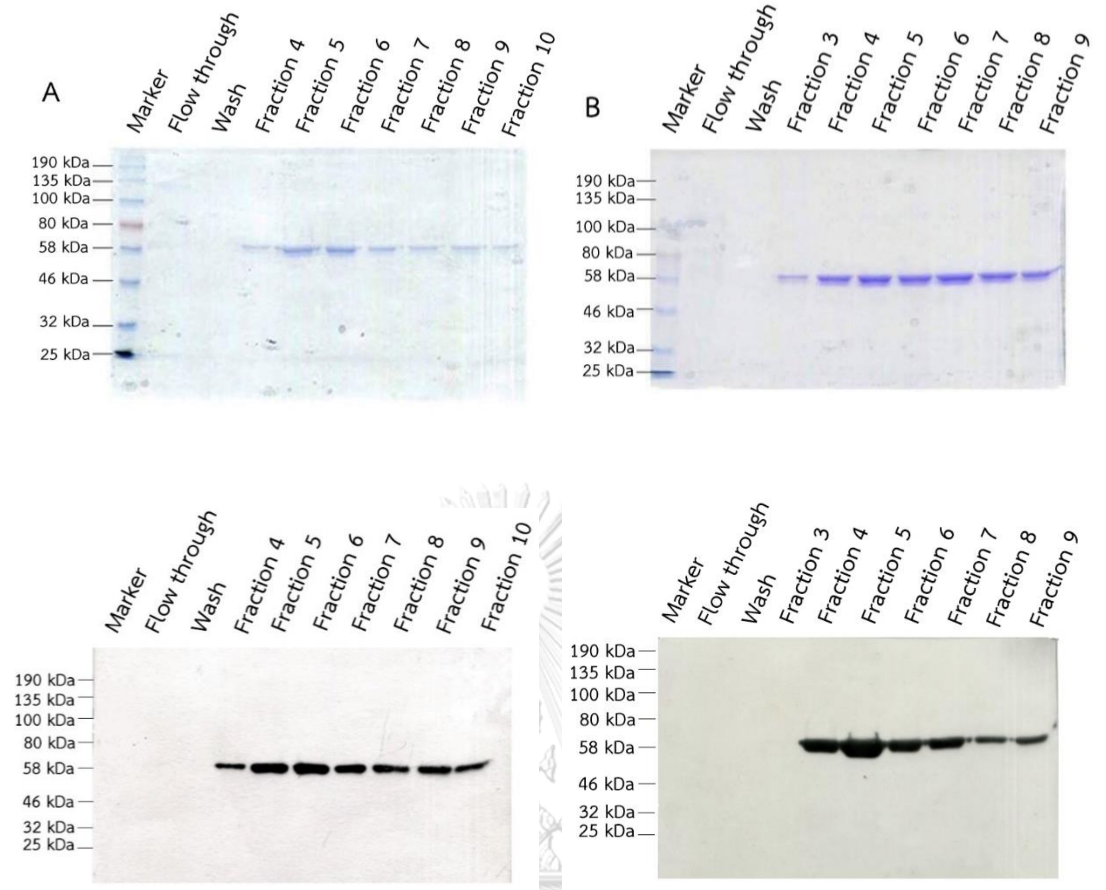
4.3.2 ผลการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์โปรตีน A

นำตัวอย่างที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ His-tag และผ่านการ Dialysis มาแยกบริสุทธิ์เพิ่มเติมด้วยคอลัมน์โปรตีน A และวัดความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละ fraction ด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000/2000c Spectro- photometer ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร เลือก fraction ที่อยู่ในช่วงที่มีความเข้มข้นโปรตีนที่สูง นำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot แสดงในภาพที่ 12 พบว่า เมื่อนำแต่ละ fraction มาวิเคราะห์ด้วยเจล 8% SDS-PAGE ย้อมสี Coomassie Blue ผลปรากฏแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลเทียบเท่าของ anti-Notch1

scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc เพียงแถบเดียวที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa ยกเว้นในตัวอย่างที่ได้จาก Flow through และ Wash ซึ่งไม่พบแถบโปรตีนใดๆ (ภาพที่ 12A และ 12B ตามลำดับ) จากผลแสดงว่าโปรตีน anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc จับจำเพาะต่อโปรตีน A ในคอลัมน์ และพบว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะกับแอนติบอดีต่อ His-tag ซึ่งปรากฏแถบเพียงแถบเดียวที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa (ภาพที่ 12A และ 12B ตามลำดับ) ผลดังกล่าวแสดงว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเมื่อผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีน A อีกครั้ง เมื่อเทียบกับผลการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ His-tag เพียงรอบเดียว

นอกจากนี้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีน A ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนจากการย้อมสี Coomassie Blue ของ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc (ภาพที่ 12A และ 12B ตามลำดับ) เป็นตัวอย่าง fraction ของโปรตีนทั้งสองในปริมาณที่เท่ากัน พบว่าแถบโปรตีนของ anti-Notch1 scFv-Fc มีความเข้มจางกว่า anti-Notch2 scFv-Fc แสดงถึงมีปริมาณโปรตีนที่น้อยกว่า ซึ่งเป็นผลมาจากการผ่านขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ของโปรตีนมาสองรอบและรวมถึงตั้งต้นของ anti-Notch1 scFv-Fc ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ต่อ His-tag พบมีปริมาณโปรตีนที่น้อย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 12 ผลการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์โปรตีน A

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A) ผลการตรวจวัดรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc B) ผลการตรวจวัดรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc วิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie Blue และวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิต่อ His-Tag

4.3.3 การเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์

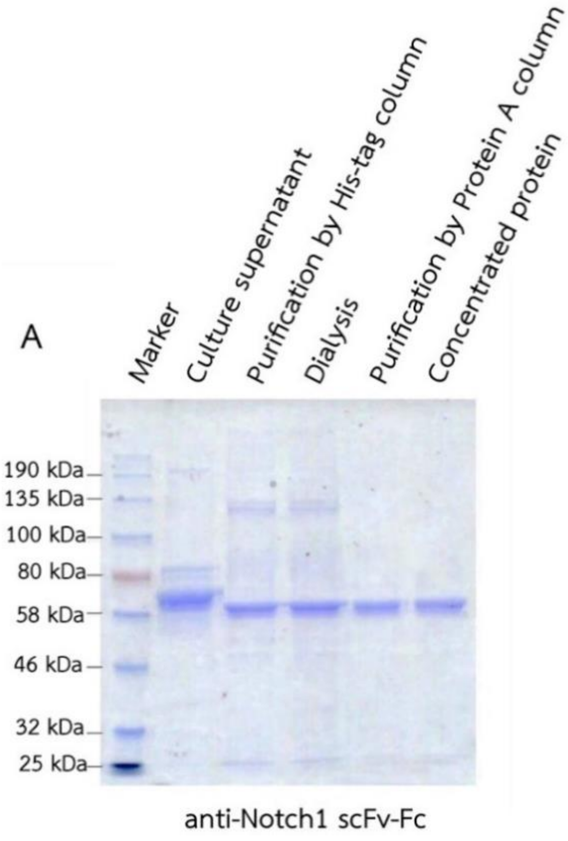
เพื่อเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFV-Fc ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ นำตัวอย่างที่เก็บจากน้ำเลี้ยงเซลล์, ตัวอย่างที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ต่อ His-tag, ตัวอย่างที่ได้จากการ Dialysis,

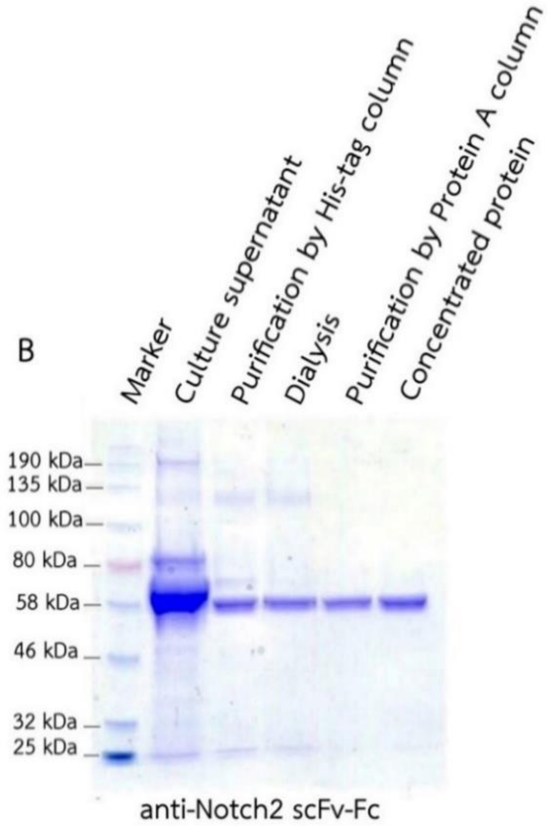
ตัวอย่างที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีน A และตัวอย่างที่ผ่านการทำให้เข้มข้นแล้ว มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie Blue แสดงดังภาพที่ 13 จากผล ปรากฏแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลเทียบเท่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc (ภาพที่ 13A) และ anti-Notch2 scFv-Fc (ภาพที่ 13B) ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นหลังจากการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ต่อ His-tag เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่เก็บจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรตีนอื่น ๆ ปะปนอยู่จำนวนมาก แต่ก็ยังพบว่ามีโปรตีนปนเปื้อนอื่น ๆ ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 58 kDa ปะปนร่วมอยู่ด้วยหลังจากการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ต่อ His-tag และเมื่อนำไปผ่านการ Dialysis เพื่อเปลี่ยนตัวทำละลาย ก็ยังปรากฏแถบโปรตีนอื่น ๆ ปะปนอยู่ด้วยเช่นเดียวกัน แต่หลังจากการผ่านการแยกบริสุทธิ์ครั้งที่สอง ด้วยคอลัมน์ต่อโปรตีน A พบว่า ปรากฏแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลเทียบเท่าของ anti-Notch1 scFv-Fc (ภาพที่ 13A) และ anti-Notch2 scFv-Fc (ภาพที่ 13B) เพียงแถบเดียว ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa และเมื่อนำไปผ่านการทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นก็ยังปรากฏแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลเทียบเท่าของ anti-Notch1 scFv-Fc (ภาพที่ 13A) และ anti-Notch2 scFv-Fc (ภาพที่ 13B) เพียงแถบเดียว ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa เช่นเดียวกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และผลผลิตที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc แสดงดังตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ จากผลแสดงให้เห็นว่า เมื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยโปรแกรม image J พบว่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดีทั้ง anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc มีร้อยละความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เมื่อผ่านการแยกบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน และพบว่าในขั้นตอนสุดท้ายของการแยกบริสุทธิ์ มีความบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc (ดังตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ) ในทางกลับกัน พบว่าระหว่างการแยกบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนเกิดการสูญเสียโปรตีนเป็นจำนวนมาก ทำให้ร้อยละผลผลิตที่ได้ลดลง โดยพบว่า ผลผลิต

สุดท้ายของ anti-Notch1 scFv-Fc ได้เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตสุดท้ายของ anti-Notch2 scFv-Fc ได้เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ) จากผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่า สามารถทำให้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc บริสุทธิ์ได้ โดยการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพต่อ His-tag และโปรตีน A ร่วมกัน แต่ผลผลิตที่ได้ต่ำ





ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์

A) ผลการตรวจวัดรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc B) ผลการตรวจวัดรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc ที่ได้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ 8% SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 ความบริสุทธิ์และผลผลิตของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ที่ได้จากการผลิตผ่านทางการแสดงออกในเซลล์ไลน์ HEK-293T

Purification step	Total protein[a] (mg)	anti-Notch1 scFv-Fc (mg)	Purity [b] (%)	Yield (%)
Culture supernatant starting material	880.08	1.76	0.2	100
Purification by Histrap FF column	1.79	1.11	62	63
Dialysis	1.30	0.83	64	47
Purification by Protien A column	0.45	0.42	95	24
Concentrated protein	0.01	0.01	100	1

ตารางที่ 5 ความบริสุทธิ์และผลผลิตของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc ที่ได้จากการผลิตผ่านทางการแสดงออกในเซลล์ไลน์ HEK-293T

Purification step	Total protein[a] (mg)	anti-Notch2 scFv-Fc (mg)	Purity [b] (%)	Yield (%)
Culture supernatant starting material	1080.48	3.78	0.35	100
Purification by Histrap FF column	3.53	2.97	84	78
Dialysis	1.90	1.69	89	45
Purification by Protien A column	1.28	1.25	98	33
Concentrated protein	0.20	0.20	100	5

[a]ความเข้มข้นของโปรตีนวิเคราะห์โดยใช้ชุดทดสอบ Bradford protein assay kit

[b]ความบริสุทธิ์ของโปรตีนวิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE และประเมินผลโดยโปรแกรม Image J

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4 การทดสอบการจับกับ Notch1 และ Notch2 ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในเซลล์ไลน์ Jurkat

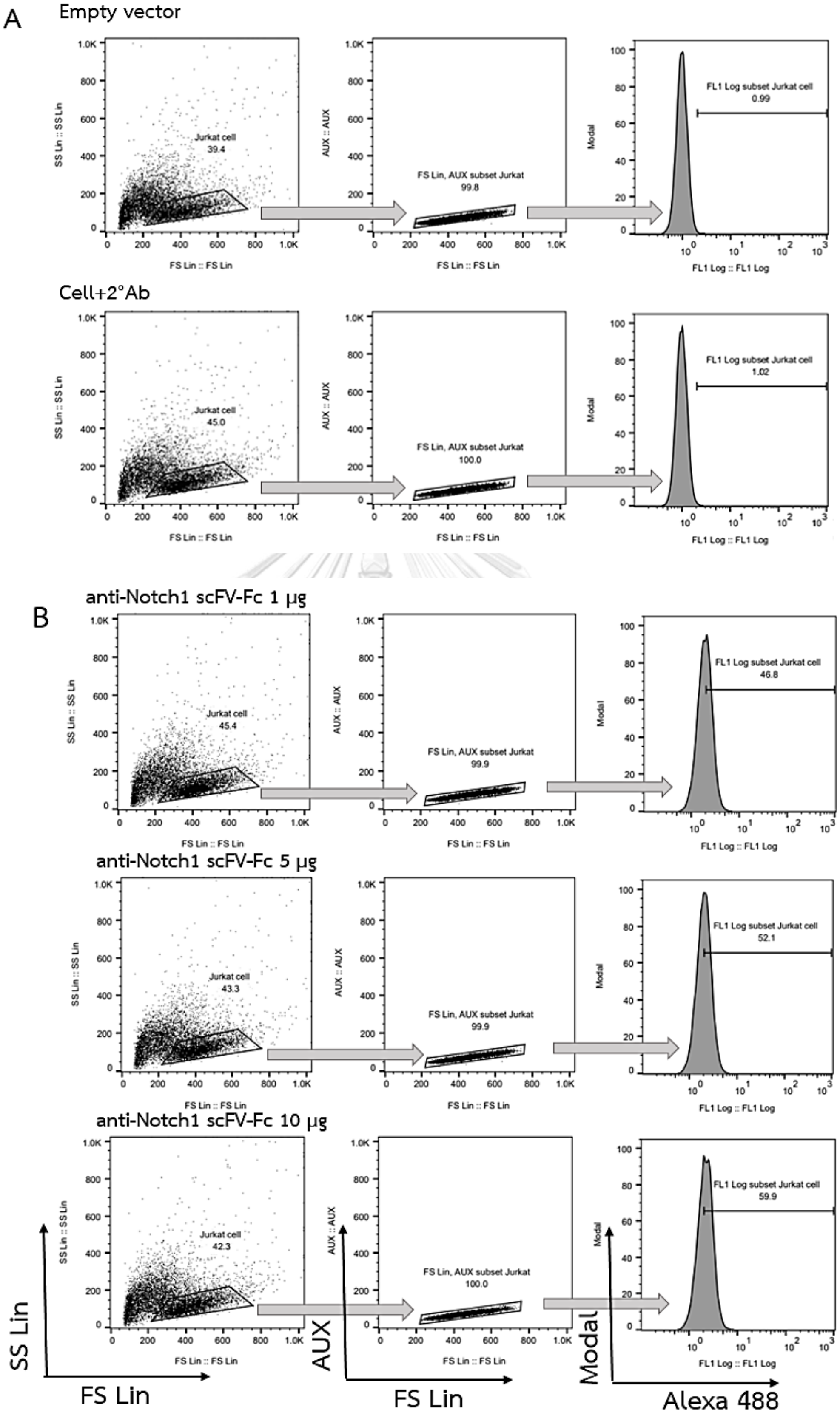
เพื่อทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีน Notch1 และ Notch2 ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc นำรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์ข้างต้นมาย้อมในเซลล์ไลน์ Jurkat และวิเคราะห์ด้วยวิธี Flow cytometry โดยนำเซลล์ Jurkat บ่มร่วมกับ anti-Notch1 scFv-Fc ปริมาณ 1, 5 และ 10 ไมโครกรัม แสดงในภาพที่ 14 และ anti-Notch2 scFv-Fc ปริมาณ 1, 5 และ 10 ไมโครกรัม แสดงในภาพที่ 15 โดยให้ Empty vector เป็นชุดควบคุมลบ โดยใช้ปริมาณ Empty vector ในการบ่มร่วมกับเซลล์ไลน์ Jurkat เทียบเท่าปริมาณแอนติบอดีที่สูงสุดที่ใช้ในการทดลอง และทดสอบร่วมกับเซลล์ไลน์ Jurkat ที่บ่มด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ Goat Anti-Human IgG (H+L) Alexa Fluor 488 หากแอนติบอดีมีความสามารถจับกับ Notch1 และ Notch2 ในเซลล์ไลน์ Jurkat ได้ จะสามารถตรวจจับได้โดยแอนติบอดีทุติยภูมิ ที่ติดสี Alexa Fluor 488 และผลที่ได้จะถูกวิเคราะห์เป็นร้อยละการย้อมติด เมื่อเทียบกับชุดควบคุมลบ โดยโปรแกรม FlowJo จากผลการทดลองพบว่า anti-Notch1 scFv-Fc ปริมาณ 1, 5 และ 10 ไมโครกรัม ให้ผลในการย้อมโดยมีร้อยละของเซลล์ที่ย้อมเป็นบวก 45.8, 52.1 และ 59.9 ตามลำดับ (ภาพที่ 14B) เมื่อเทียบกับ Empty vector ซึ่งเป็นชุดควบคุมลบ ให้ผลในการย้อมโดยมีร้อยละของเซลล์ที่ย้อมเป็นบวก 0.99 และผลการย้อมของเซลล์ด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิเพียงอย่างเดียวจะให้ผล การย้อมโดยมีร้อยละของเซลล์ที่ย้อมเป็นบวก 1.02 (ภาพที่ 14A) และเมื่อดูการเปรียบเทียบค่า Median Fluorescent intensity (MFI) แต่ละเซลล์ (ภาพที่14C) พบว่า anti-Notch1 scFv-Fc ปริมาณ 1, 5 และ 10 ไมโครกรัม ให้ค่า MFI เท่ากับ 1.95, 2.05 และ 2.20 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ Empty vector ซึ่งเป็นชุดทดสอบลบและเซลล์ที่บ่มด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิให้ค่า MFI เท่ากับ 0.98 และ 0.99 ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า anti-Notch1 scFv-Fc

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

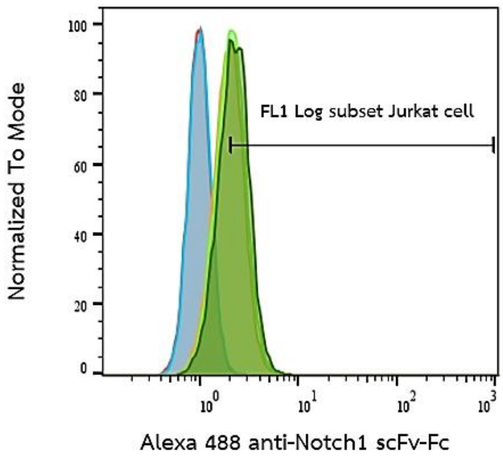
จับกับ Notch1 โดยปริมาณที่ให้ผลในการจับกันของ anti-Notch1 scFv-Fc ต่อ Notch1 ที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ดังนั้น ปริมาณของแอนติบอดีดังกล่าวถูกเลือกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

จากผลการทดลองของ anti-Notch2 scFv-Fc พบว่า anti-Notch2 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1, 5 และ 10 ไมโครกรัม ให้ผลในการย้อมโดยมีร้อยละของเซลล์ที่ย้อมเป็นบวก 1.43, 2.78 และ 45.6 ตามลำดับ (ภาพที่ 15B) เมื่อเทียบกับ Empty vector ซึ่งเป็นชุดควบคุมลบ ให้ผลในการย้อมโดยมีร้อยละของเซลล์ที่ย้อมเป็นบวก 1.00 และผลการย้อมของเซลล์ด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิเพียงอย่างเดียวจะให้ผล การย้อมโดยมีร้อยละของเซลล์ที่ย้อมเป็นบวก 0.63 (ภาพที่ 15A) และเมื่อดูการเปรียบเทียบค่า MFI แต่ละเซลล์ (ภาพที่ 15C) พบว่า anti-Notch2 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1, 5 และ 10 ไมโครกรัม ให้ค่า MFI เท่ากับ 0.96, 1.10 และ 2.17 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ Empty vector ซึ่งเป็นชุดทดสอบลบและเซลล์ที่บ่มด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ ให้ค่าการติดสีของแต่ละเซลล์เท่ากับ 0.94 และ 0.90 ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า anti-Notch2 scFv-Fc จับกับ Notch2 โดยความเข้มข้นที่ให้ผลในการจับกันของ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อ Notch2 ที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ปริมาณ 10 ไมโครกรัม ดังนั้น ความเข้มข้นของแอนติบอดีดังกล่าวถูกเลือกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University


A
Empty vector
Jurkat cell
39.4
FS Lin, AUX subset Jurkat
99.8
FL1 Log subset Jurkat cell
0.99
Cell+2°Ab
Jurkat cell
45.0
FS Lin, AUX subset Jurkat
100.0
FL1 Log subset Jurkat cell
1.02
B
anti-Notch1 scFV-Fc 1 μg
Jurkat cell
45.4
FS Lin, AUX subset Jurkat
99.9
FL1 Log subset Jurkat cell
46.8
anti-Notch1 scFV-Fc 5 μg
Jurkat cell
43.3
FS Lin, AUX subset Jurkat
99.9
FL1 Log subset Jurkat cell
52.1
anti-Notch1 scFV-Fc 10 μg
Jurkat cell
42.3
FS Lin, AUX subset Jurkat
100.0
FL1 Log subset Jurkat cell
59.9
SS Lin
FS Lin
AUX
FS Lin
Modal
Alexa 488

C

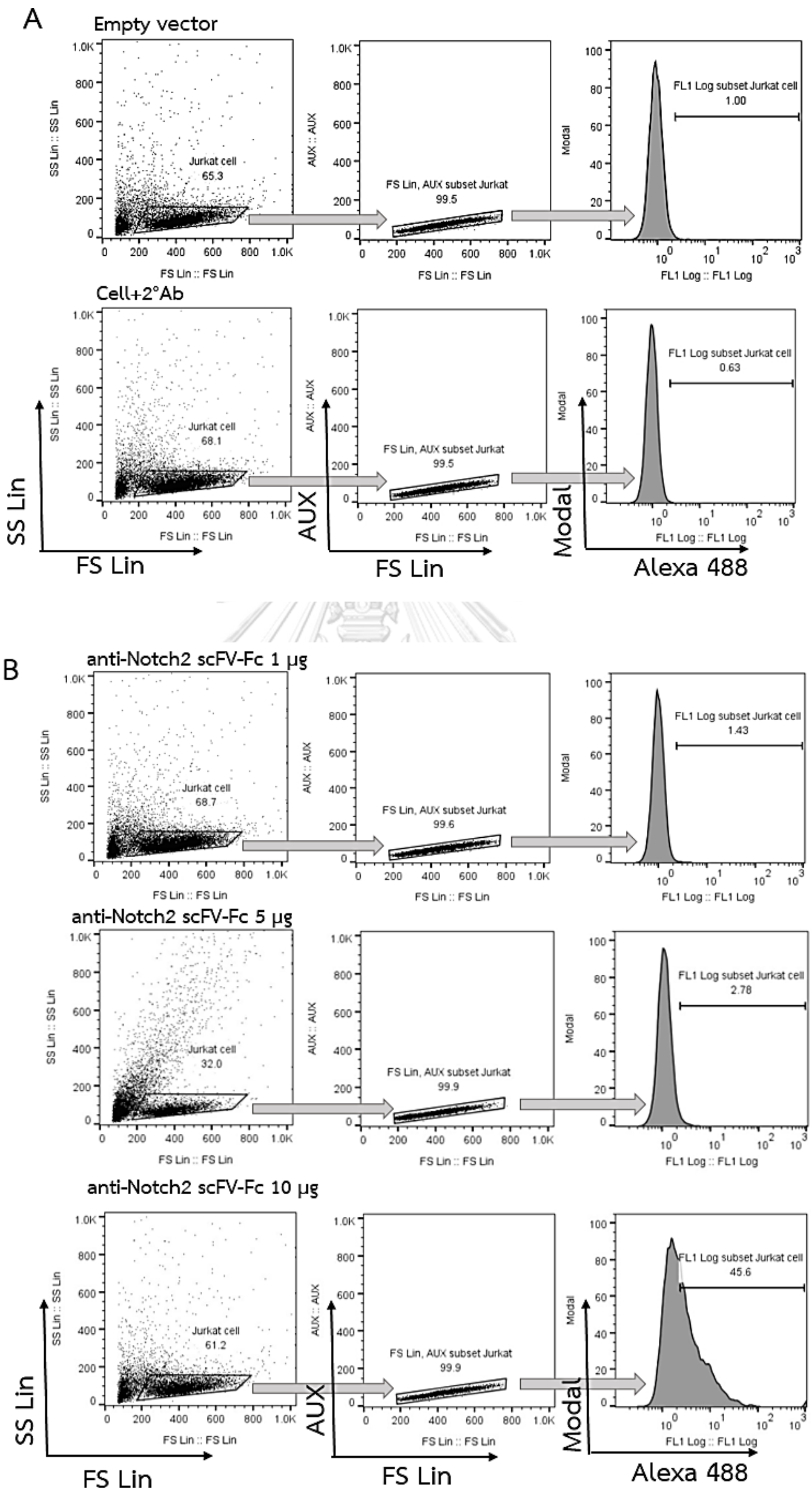


Sample Name	MFI
1 μg anti-Notch1 scFv-Fc	1.95
5 μg anti-Notch1 scFv-Fc	2.05
10 μg anti-Notch1 scFv-Fc	2.20
Cell+2° Ab	0.99
Empty vector	0.98

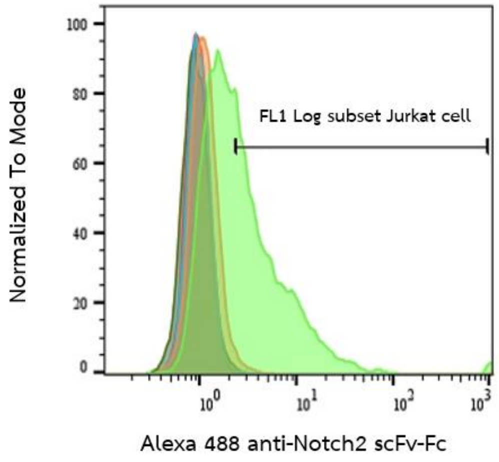
ภาพที่ 14 ผลการทดสอบการจับรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ต่อ Notch1 ในเซลล์ไลน์ Jurkat

A) แสดงผลของเซลล์ที่บ่มด้วย Empty vector และเซลล์ที่บ่มด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ B) แสดงผลของเซลล์ที่บ่มด้วยรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1, 5 และ 10 ไมโครกรัม ต่อ Notch1 ที่มีการแสดงออกในเซลล์ Jurkat โดยวิธี Flow cytometry ผลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlowJo C) แสดงค่า Median Fluorescent intensity (MFI) ในแต่ละตัวอย่าง ผลแสดงตัวแทนของการทดลอง 2 ซ้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY


A
Empty vector
Jurkat cell
65.3
FS Lin, AUX subset Jurkat
99.5
FL1 Log subset Jurkat cell
1.00
Cell+2°Ab
Jurkat cell
68.1
FS Lin, AUX subset Jurkat
99.5
FL1 Log subset Jurkat cell
0.63
SS Lin
FS Lin
AUX
FS Lin
Modal
Alexa 488
B
anti-Notch2 scFV-Fc 1 µg
Jurkat cell
68.7
FS Lin, AUX subset Jurkat
99.6
FL1 Log subset Jurkat cell
1.43
anti-Notch2 scFV-Fc 5 µg
Jurkat cell
32.0
FS Lin, AUX subset Jurkat
99.9
FL1 Log subset Jurkat cell
2.78
anti-Notch2 scFV-Fc 10 µg
Jurkat cell
61.2
FS Lin, AUX subset Jurkat
99.9
FL1 Log subset Jurkat cell
45.6
SS Lin
FS Lin
AUX
FS Lin
Modal
Alexa 488

C



Sample Name	MFI
1 µg anti-Notch2 scFv-Fc	0.96
5 µg anti-Notch2 scFv-Fc	1.10
10 µg anti-Notch2 scFv-Fc	2.17
Cell+2° Ab	0.94
Empty vector	0.90

ภาพที่ 15 ผลการทดสอบการจับรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc ต่อ Notch2 ในเซลล์ไลน์ Jurkat

A) แสดงผลของเซลล์ที่บ่มด้วย Empty vector และเซลล์ที่บ่มด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ B) แสดงผลของเซลล์ที่บ่มด้วยรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1, 5 และ 10 ไมโครกรัม ต่อ Notch2 ที่มีการแสดงออกในเซลล์ Jurkat โดยวิธี Flow cytometry ผลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlowJo C) แสดงค่า Median Fluorescent intensity (MFI) ในแต่ละตัวอย่าง ผลแสดงตัวแทนของการทดลอง 2 ซ้ำ

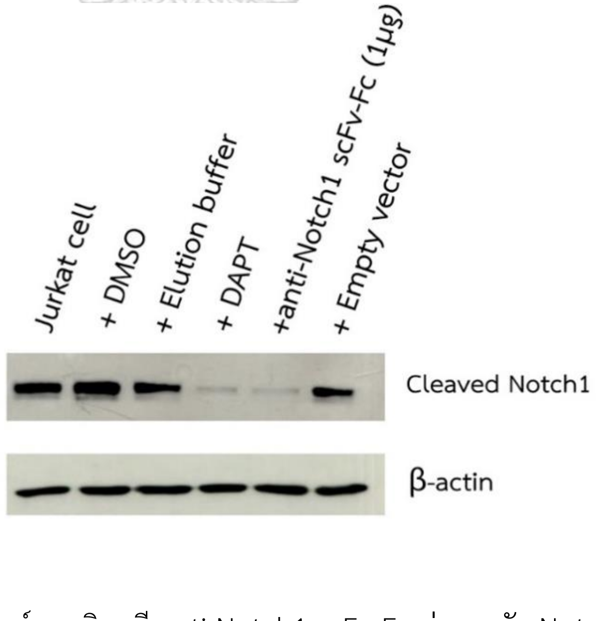
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.5 ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ต่อ วิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ไลน์ Jurkat

เพื่อศึกษาผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ต่อการตัดของ Notch1 จึงใช้เซลล์ไลน์ Jurkat โดยนำ anti-Notch1 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1 ไมโครกรัม บ่มกับเซลล์ไลน์ Jurkat เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ยากดแอคทิวิตีของแกมมาซีครีเทส DAPT 25 ไมโครโมลาร์ เป็นชุดควบคุมบวก และใช้ DMSO และ Elution buffer ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ DAPT และแอนติบอดี ตามลำดับ เป็นชุดควบคุมลบ ตรวจสอบวัดระดับ Cleaved Notch1 ด้วยวิธี Western

blot แสดงในภาพที่ 16 พบว่าในเซลล์ไลน์ Jurkat ปกติที่ไม่ได้บ่มด้วยแอนติบอดี จะพบการตัดของ Notch1 เมื่อใช้แอนติบอดีต่อ Cleaved Notch1 ทดสอบ ทำให้พบ Cleaved Notch1 เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับแอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ปริมาณ 1 ไมโครกรัม พบว่า สามารถยับยั้งการตัดของ Notch1 ในเซลล์ไลน์ Jurkat ได้ทำให้เกิดการแสดงออกของ Cleaved Notch1 ลดลง เช่นเดียวกับ DAPT ที่ 25 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นชุดควบคุมบวก และผลของการทดสอบตัวทำละลายของ DAPT และ แอนติบอดี พบว่า ไม่มีผลต่อการยับยั้งการตัดของ Notch1 ในเซลล์ไลน์ Jurkat ทำให้เกิดการแสดงออกของ Cleaved Notch1 เช่นเดียวกับชุดควบคุมลบ ผลที่ได้บ่งชี้ว่า รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมีความสามารถในการจับและมีผลต่อการตัดของ Notch1 ในเซลล์ไลน์ Jurkat นำไปสู่การยับยั้งการเกิดวิถีสัญญาณ Notch เทียบเท่ากับการใช้ DAPT

ในการศึกษาการยับยั้งการตัดของ Notch2 ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Western blot เนื่องจาก ไม่มีแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Cleaved Notch2 จำหน่าย



ภาพที่ 16 ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ต่อการตัด Notch1 ในเซลล์ไลน์ Jurkat

โดยใช้ยากดแอคทิวิตีของแกมมาซีครีเทส DAPT (25 ไมโครโมลาร์) เป็นชุดควบคุมบวก และใช้ DMSO และ Elution buffer เป็นชุดควบคุมลบ ตรวจสอบวัดระดับ Cleaved Notch1 ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ Cleaved Notch1 ผลแสดงตัวแทนของการทดลอง 2 ซ้ำ

4.6 ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch *HES1* และ *HEY1* ในเซลล์ไลน์ Jurkat

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc มีความสามารถในการจับกับ Notch1 และ Notch2 จึงศึกษาต่อว่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc มีความสามารถในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ได้หรือไม่ ดังนั้นเพื่อศึกษาผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ในระดับยีน โดยดูการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ได้แก่ *HES1* และ *HEY1* ในเซลล์ไลน์ Jurkat โดยใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ที่ปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.4 คือ ปริมาณ 1 ไมโครกรัม และ 10 ไมโครกรัม ตามลำดับ โดยนำเซลล์ jurkat บ่มกับ anti-Notch1 scFv-Fc ที่ปริมาณ 1 ไมโครกรัม anti-Notch2 scFv-Fc ที่ปริมาณ 10 ไมโครกรัม และใช้ anti-Notch1 scFv-Fc ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ร่วมกับ anti-Notch2 scFv-Fc ปริมาณ 10 ไมโครกรัม เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ DAPT ที่ 25 ไมโครโมลาร์ เป็นชุดควบคุมบวก ซึ่งแสดงผลในภาพที่ 17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อบ่มร่วมกับ anti-Notch1 scFv-Fc, anti-Notch2 scFv-Fc หรือบ่มร่วมกันทั้งสอง พบการแสดงออกของยีน *HES1* และ *HEY1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (*p*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.001) เมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนในเซลล์ชุดควบคุมลบทั้งที่ไม่ได้รับแอนติบอดีและที่บ่มด้วย Empty vector และพบว่าการแสดงออกของยีน *HES1* และ *HEY1* ของเซลล์ที่มีการบ่มด้วย Empty vector ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการ

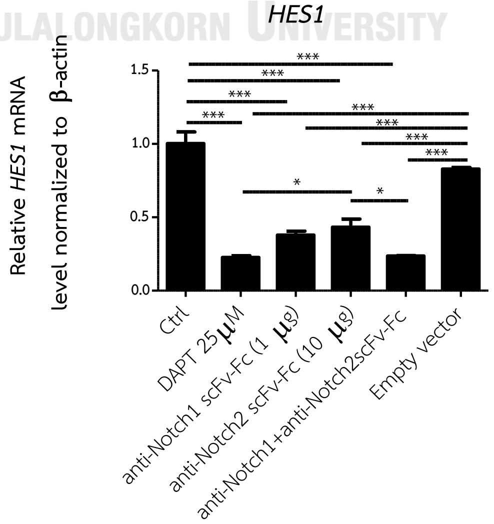
แสดงออกของยีนทั้งสองในเซลล์ที่ไม่ได้รับแอนติบอดี นอกจากนี้การที่เติม anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ร่วมกัน พบว่า การแสดงออกของยีนทั้ง *HES1* และ *HEY1* ลดลงเทียบเท่ากับชุดควบคุมบวก (DAPT) แสดงในภาพ 17A และ 17B

นอกจากนี้เมื่อเทียบผลการแสดงออกของยีน *HES1* และ *HEY1* ของการใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีร่วมกัน เทียบกับการใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีเพียงตัวเดียวพบว่า เมื่อใช้แอนติบอดีร่วมกันทำให้มีการแสดงออกของยีนทั้ง *HES1* และ *HEY1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (*p*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05) เมื่อเทียบกับใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch2 scFv-Fc เพียงชนิดเดียว แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc เพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 17A และ 17B)

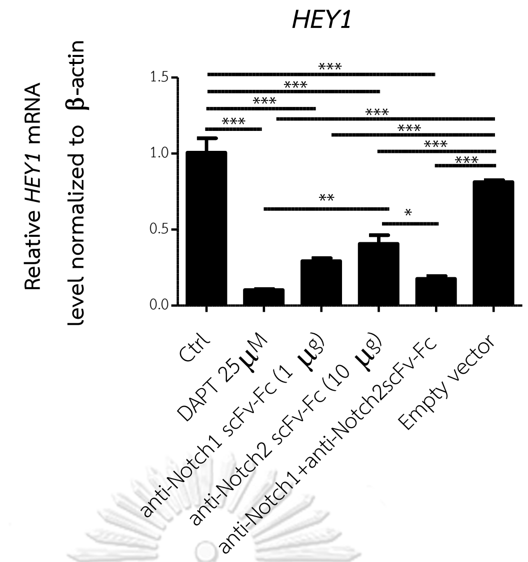
ผลที่ได้บ่งชี้ว่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ที่ผลิตขึ้น มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ไลน์ Jurkat ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งชนิดทีลิมโฟซัยท์ โดยการใช้แอนติบอดีร่วมกันทำให้การส่งสัญญาณของวิถี Notch ลดลงเทียบเท่ากับ DAPT

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A



B



ภาพที่ 17 ผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อระดับ mRNA ของยีน HES1 และ HEY1 ในเซลล์ไลน์ jurkat โดยวิธี qPCR

A) ผลของ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อยีน *HES1* B) ผลของ anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อยีน *HEY1* โดยใช้ anti-Notch1 scFv-Fc ที่ปริมาณ1 ไมโครกรัม และ anti-Notch2 scFv-Fc ที่ปริมาณ 10 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก (DAPT) ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และชุดควบคุมลบ (Ctrl) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ใส่แอนติบอดี * แสดงถึงค่า *p*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05, ** แสดงถึงค่า *p*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.01 และ *** แสดงถึงค่า *p*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.001

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิถีสัญญาณ Notch มีบทบาทสำคัญในการเจริญ การเพิ่มจำนวน ตลอดถึงการตายของเซลล์หลากหลายชนิด (1) ความผิดปกติของวิถีสัญญาณ Notch ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และนำไปสู่การเกิดโรคสำคัญ เช่น มะเร็ง เป็นต้น (12) ดังนั้น จึงมีความพยายามในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ในการบำบัด โดยพบว่าการศึกษาการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ที่ผ่านมาไม่สามารถยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ได้อย่างจำเพาะ โดยเฉพาะการใช้สารยับยั้งแกมมาซีครีเทส (GSI) ซึ่งยับยั้งทั้ง Notch รีเซบเตอร์ 4 ตัวเท่าเทียมกันและยังมีซับเสตรทอื่นด้วย ส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ เช่น เกิดความเป็นพิษในลำไส้ (37, 38) จึงนำไปสู่การออกแบบวิธีการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch โดยใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มี ความจำเพาะสูงต่อ Notch รีเซบเตอร์แต่ละชนิดและให้ผลข้างเคียงต่อมนุษย์น้อยที่สุด (39)

รีคอมบิแนนท์ชนิด scFv-Fc ได้รับความสนใจในการนำมาพัฒนาในการรักษาโรค เนื่องจากมีคุณสมบัติ สามารถเข้าถึงเนื้อเยื่อมะเร็งได้ดี และยังมีครึ่งชีวิตในซีรั่มยาวนานกว่า scFv (46, 47) ที่ผ่านมาจึงมีงานวิจัยที่มีการพัฒนารีคอมบิแนนท์ชนิด scFv-Fc นำไปศึกษากับโรคมากมาย โดยเฉพาะในโรคมะเร็ง ในปี ค.ศ. 2011 Girgis และคณะ ได้สร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc ต่อ carcinoembryonic antigen (CEA) ที่มีการแสดงออกในมะเร็งตับอ่อน เพื่อนำไปสู่การบำบัดรักษาโรคมะเร็งตับอ่อนต่อไป (50) นอกจากการนำไปพัฒนารักษามะเร็งแล้วยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับโรคอื่น ๆ เช่น ในปี ค.ศ. 2005 Gould และคณะ ได้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc ต่อไวรัส West Nile เพื่อบำบัดโรคติดเชื้อไวรัส West Nile (59)

ในปี ค.ศ. 2012 จากการศึกษาของ Flak และคณะ ได้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc ต่อ NRR ของ Notch1 และ Notch2 ซึ่งบริเวณ NRR เป็นบริเวณสำคัญในการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อให้มีการตัดของโปรตีนบน Notch รีเซบเตอร์ เข้าสู่ภายในเซลล์ เมื่อเกิดอันตรกิริยากับลิแกนด์ ซึ่งนำไปสู่การเกิดวิถีสัญญาณ Notch ต่อไป (42) NRR จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการนำไปสู่การยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch โดยคาดว่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดีจะสามารถยับยั้งอย่างจำเพาะต่อบริเวณ NRR และสามารถยับยั้งการตัดโปรตีนบน Notch รีเซบเตอร์ได้ และส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งได้ โดยคัดเลือกแอนติบอดีด้วยวิธี Phage display ศึกษาความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีโดยวิธี luciferase reporter gene assay พบว่า แอนติบอดีที่ได้สามารถยับยั้งวิถีสัญญาณอย่างจำเพาะผ่านทางรีเซบเตอร์ของ Notch1 และ Notch2 โดยไม่ข้ามชนิดของรีเซบเตอร์ และนำไปทดสอบการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ต้นกำเนิดประสาท (neural stem cells) พบว่า รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีส่งผลต่อการลดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch (*HES5*) ในเซลล์ต้นกำเนิดทั้งในหนูและมนุษย์ นอกจากนี้ยังมีการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อบริเวณที่จับกับลิแกนด์ (ligand-binding domain) แต่พบว่าไม่สามารถยับยั้งวิถีสัญญาณได้ (42) งานวิจัยนี้จึงสนใจนำรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อ NRR มาใช้ในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

พลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 เป็นพลาสมิดที่มีการศึกษาโดย Flak และคณะ (2012) โดยงานวิจัยนี้ผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีโดยใช้พลาสมิดดังกล่าวในเซลล์ไลน์ HEK-293T จากผลการศึกษาพบว่า เซลล์ไลน์ HEK-293T สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ซึ่งหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเซลล์ไลน์ HEK-293T มีคุณสมบัติในการทรานเฟคชันสูง มีการผลิตรีคอมบิแนนท์สูง รวมทั้ง สามารถผลิตโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ได้ (55) ในปี ค.ศ. 2013 Jager และคณะ มีการศึกษาการผลิตตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc ต่อ ไวรัส Epstein Barr virus (EBV) ใน

เซลล์ HEK-293T พบว่า ผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ได้ประมาณ 10-20 มิลลิกรัมต่อลิตร (52)

การทำ scFv-Fc บริสุทธิ์ สามารถใช้การแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพได้ เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ศึกษามีการเชื่อมกับ โปรตีน His-tag และ Human Fc ซึ่งเป็น Tag protein ใช้ในตรวจจับโปรตีนได้ (60, 61) จากการทดลองได้ศึกษาการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ ที่จำเพาะต่อ His-tag หรือ โปรตีน A (จากผลการศึกษาที่ 4.3) พบว่า ไม่สามารถแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพเพียงขั้นตอนเดียว อาจเป็นเพราะน้ำเลี้ยงเซลล์ มีโปรตีนอื่น ๆ ปนอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น โปรตีนจากเซรั่มลูกวัว (62) ทำให้การแยกบริสุทธิ์ภายในครั้งเดียวอาจไม่ได้โปรตีนบริสุทธิ์สูง จากการทดลอง จึงต้องทำการศึกษาการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีด้วยกันสองขั้นตอน จึงได้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่บริสุทธิ์นำไปทดสอบการทำงานต่อไป แม้ว่าจะได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่บริสุทธิ์สูง แต่ปริมาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มี ผลผลิตต่ำ เนื่องจากผ่านการแยกบริสุทธิ์มา 2 ขั้นตอนทำให้สูญเสียโปรตีนไปในระหว่างดำเนินการ ซึ่งอาจจะแก้ไขปัญหาโดยในขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ต่อ His-tag อาจใช้การ Elution แบบ Gradient elution ซึ่งเป็นการใช้สาร Elution ที่ความเข้มข้น imidazole ต่าง ๆ กัน โดยจะค่อย ๆ ไล่ตัวอย่างออกจากคอลัมน์ ซึ่งอาจจะได้ตัวอย่างที่บริสุทธิ์มากกว่าการ Elution แบบ Isocratic elution และอาจไม่ต้องนำไปผ่านคอลัมน์ด้วยโปรตีน A เป็นครั้งที่สอง ซึ่งอาจจะทำให้สูญเสียโปรตีนลดลงและได้ผลผลิตที่สูงกว่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เซลล์ไลน์ Jurkat เป็นเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดทีลิมโฟซัยท์ โดยในสภาวะปกติของเซลล์ไลน์ Jurkat พบว่า มีการแสดงออกของ Notch1 และ Notch2 (63) ในปี ค.ศ. 2008 จากการศึกษาของ Suwanjunee และคณะ ได้ศึกษาผลของ GSI ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเซลล์ไลน์ Jurkat ได้รายงานว่า เซลล์ไลน์ Jurkat มีการแสดงออกของ Notch1 และ Cleaved Notch1 และ

เมื่อนำมาทดสอบด้วย GSI พบว่า ส่งผลต่อการยับยั้ง Notch1 ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *HES1* ลดลง และส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์ Jurkat (64) งานวิจัยนี้จึงนำเซลล์ไลน์ Jurkat มาใช้ในการทดสอบลักษณะสมบัติของ รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี ที่ผลิตขึ้นที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ NRR ของ Notch1 และ Notch2 จากการทดลองพบว่า รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc มีความสามารถในการจับกับ Notch1 และ Notch2 ตามลำดับ และยังพบว่า anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc สามารถจับกับเซลล์ไลน์ Jurkat ได้ที่ปริมาณ 1 และ 10 ไมโครกรัม ตามลำดับ เมื่อศึกษาด้วยวิธี Flow cytometry (จากผลการศึกษาที่ 4.4)

ดังนั้น แอนติบอดีที่ได้ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการติดตามการแสดงออกของ Notch1 หรือ Notch2 โดยใช้วิธี Flow cytometry ได้อีกด้วย

เมื่อพบว่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc มีความสามารถในการจับกับบริเวณ NRR ของ Notch จึงมีการศึกษาต่อว่ามีผลต่อการตัดของ Notch เข้าสู่เซลล์หรือไม่ จึงทดสอบรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อการยับยั้งการตัดของ Notch เข้าสู่เซลล์ จากการศึกษา พบว่า รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc ส่งผลต่อการยับยั้งการตัดของ Notch1 (จากผลการศึกษาที่ 4.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc มีความจำเพาะต่อบริเวณ NRR บน Notch รีเซบเตอร์และนำไปสู่การยับยั้งการตัดของ Notch ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าหากมีการยับยั้งบริเวณ NRR จะมีผลต่อการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างบริเวณ NRR ทำให้บริเวณ NRR เกิดความเสถียร นำไปสู่การป้องกันการตัดโดย ADAM (บริเวณ S2) ทำให้ไม่เกิดการตัดของ Notch1 (65) ซึ่งในการทดสอบ การยับยั้งการตัดของ Notch2 ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Western blot เนื่องจาก แอนติบอดีไม่มีความจำเพาะต่อ Cleaved Notch2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ต่อจากนั้นจึงศึกษาการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch โดยดูระดับการแสดงออกของยีน โดยศึกษายีน *HES1* และ *HEY1* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch (55) พบว่า ที่ 48 ชั่วโมง รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ทำให้เกิดการลดลงของการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ทั้งใน *HES1* และ *HEY1* และนอกจากนี้พบว่าหากใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีร่วมกัน มีผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนลดลงเทียบเท่ากับการใช้ GSI (จากผลการศึกษาที่ 4.6) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Flak และคณะ (2012) ที่มีการศึกษารีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อการแสดงออกของยีน *Hes5* ในเซลล์ต้นกำเนิดประสาท พบว่ามีการแสดงออกของยีน *Hes5* ลดลง และหากใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีร่วมกัน มีผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนลดลงเทียบเท่ากับการใช้ GSI (42) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีเพียงตัวเดียวจะส่งผลต่อการยับยั้ง Notch รีเซบเตอร์เพียงชนิดเดียว นำไปสู่การลดการแสดงออกของยีนเป้าหมายของ Notch เพียงส่วนหนึ่ง เนื่องจากเซลล์ไลน์ Jurkat มีการแสดงออกของ Notch รีเซบเตอร์มากกว่าหนึ่งชนิด (63) เมื่อเทียบกับ การใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีสองชนิดร่วมกัน จะส่งผลต่อการลดการแสดงออกของยีนเป้าหมายของ Notch เพิ่มขึ้น ซึ่งจะให้ผลเช่นเดียวกับการใช้ GSI ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง Notch รีเซบเตอร์ได้ทั้ง 4 ชนิด (37) แต่ในการทดลองได้ทดสอบระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง เพียงระยะเวลาเดียวเท่านั้น ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าเมื่อใช้ในระยะเวลาในการบ่มที่สั้นกว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีจะเทียบเท่ากับการใช้ GSI หรือไม่

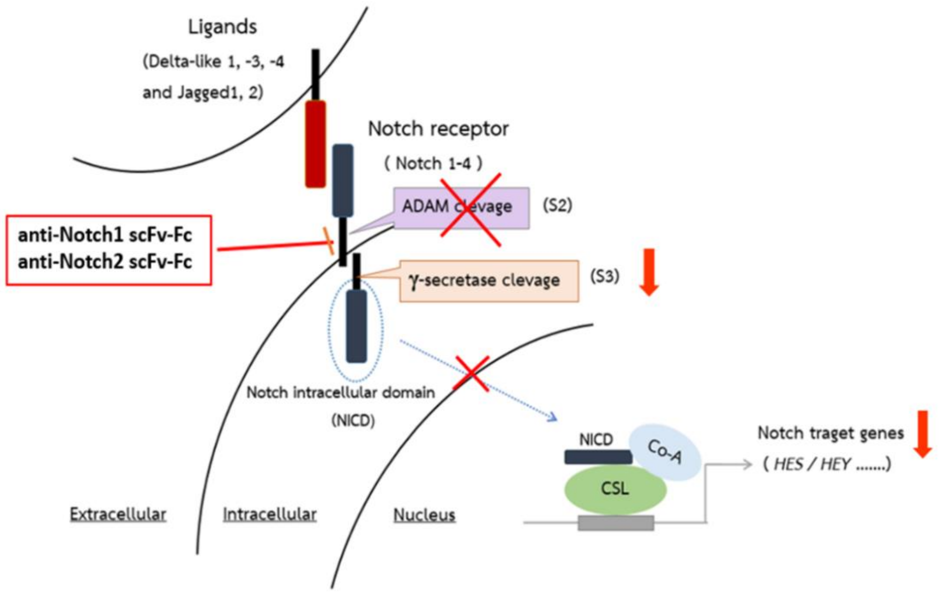
แม้ว่า GSI ให้ผลการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch เช่นเดียวกับรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี แต่ GSI ไม่สามารถยับยั้ง Notch แต่ละชนิดได้อย่างจำเพาะ เนื่องจากแกมมาซีครีเทสมีหลายซับเสรท ทำให้เมื่อใช้สารยับยั้งแกมมาซีเทรส จะมีการยับยั้งทั้ง 4 ชนิดของรีเซบเตอร์พร้อม ๆ กันและส่งผลกระทบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ต่อการยับยั้งการตัดของซับเสรทอื่น ๆ ด้วย ซึ่งนำไปสู่ผลข้างเคียง เช่น เกิดความเป็นพิษในลำไส้ ดังนั้นจึงไม่นิยมนำ GSI มาใช้ในการบำบัดรักษาโรค (37, 38)

ดังนั้น รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ที่ผลิตในเซลล์ไลน์ HEK-293T สามารถจับกับ NRR ของ Notch1 และ Notch2 และยับยั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณ NRR ส่งผลให้ไม่เกิดการตัดของ Notch เข้าสู่เซลล์ และทำให้ไม่สามารถประกอบเป็นสารประกอบ Notch/CSL/Co-activator ซึ่งนำไปสู่การลดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย แสดงในภาพที่ 18

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีการยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ Notch แต่ละชนิด ซึ่งในอนาคตอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาของ Notch แต่ละชนิดได้ และพัฒนานำไปใช้ในการบำบัดรักษาโรคได้ เช่น โรคมะเร็ง แทนการใช้ GSI



ภาพที่ 18 แบบจำลองการทำงานของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี anti-Notch1 scFv-Fc และ anti-Notch2 scFv-Fc ต่อวิถีสัญญาณ Notch

บรรณานุกรม

1. Joutel A, Tournier-Lasserve E, editors. Notch signalling pathway and human diseases. Seminars in Cell & Developmental Biology; 1998: Elsevier.

2. Fermino ML, Dylon LSD, Cecílio NT, Santos SN, Toscano MA, Dias-Baruffi M, et al. Lack of galectin-3 increases Jagged1/Notch activation in bone marrow-derived dendritic cells and promotes dysregulation of T helper cell polarization. Molecular Immunology. 2016;76:22-34.

3. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. Nature Immunology. 2004;5(3):247.

4. Fleming RJ, editor Structural conservation of Notch receptors and ligands. In Seminars in Cell & Developmental Biology; 1998: Elsevier.

5. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. Development. 2004;131(5):965-73.

6. Kopan R, Ilagan MXG. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. Cell. 2009;137(2):216-33.

7. Andersen P, Uosaki H, Shenje LT, Kwon C. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. Trends in Cell Biology. 2012;22(5):257-65.

8. Borggrefe T, Liefke R. Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. Cell Cycle. 2012;11(2):264-76.

9. Matsuno K, Diederich RJ, Go MJ, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S. Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. Development. 1995;121(8):2633-44.

10. Morel V, Schweisguth F. Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the Drosophila embryo. Genes & Development. 2000;14(3):377-88.

11. van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, et al. Notch/γ-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. Nature. 2005;435(7044):959-963.

12. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

degraded proteins: the PEST hypothesis. Science. 1986;234(4774):364-8.

13. Gordon WR, Vardar-Ulu D, Histen G, Sanchez-Irizarry C, Aster JC, Blacklow SC. Structural basis for autoinhibition of Notch. Nature Structural and Molecular Biology. 2007;14(4):295-300.

14. Hall RJ, Erickson CA. ADAM 10: an active metalloprotease expressed during avian epithelial morphogenesis. Developmental Biology. 2003;256(1):147-60.

15. Gordon WR, Roy M, Vardar-Ulu D, Garfinkel M, Mansour MR, Aster JC, et al. Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. Blood. 2009;113(18):4381-90.

16. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science. 2004;306(5694):269-71.

17. Wu F, Stutzman A, Mo Y-Y. Notch signaling and its role in breast cancer. Frontiers in Bioscience. 2007;12(1):4370-83.

18. Zhou W, Fu X, Zhang L, Zhang J, Huang X, Lu X, et al. The AKT1/NF-kappaB/Notch1/PTEN axis has an important role in chemoresistance of gastric cancer cells. Cell Death & Disease. 2013;4(10):e847.

19. Ma Y-C, Shi C, Zhang Y-N, Wang L-G, Liu H, Jia H-T, et al. The tyrosine kinase c-Src directly mediates growth factor-induced Notch-1 and Furin interaction and Notch-1 activation in pancreatic cancer cells. PLoS One. 2012;7(3):e33414.

20. Zhang Y, Li B, Ji ZZ, Zheng PS. Notch1 regulates the growth of human colon cancers. Cancer. 2010;116(22):5207-18.

21. Lefort K, Mandinova A, Ostano P, Kolev V, Calpini V, Kolfschoten I, et al. Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKα kinases. Genes & Development. 2007;21(5):562-77.

22. Viatour P, Ehmer U, Saddic LA, Dorrell C, Andersen JB, Lin C, et al. Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway. Journal of Experimental Medicine. 2011;208(10):1963-76.

23. Gupta A, Wang Y, Browne C, Kim S, Case T, Paul M, et al. Neuroendocrine

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

differentiation in the 12T-10 transgenic prostate mouse model mimics endocrine differentiation of pancreatic beta cells. The Prostate. 2008;68(1):50-60.

24. Parr C, Watkins G, Jiang W. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. International Journal of Molecular Medicine. 2004;14(5):779-86.

25. Louvi A, Artavanis-Tsakonas S, editors. Notch and disease: a growing field. In Seminars in Cell & Developmental Biology; 2012: Elsevier.

26. Talora C, Sgroi DC, Crum CP, Dotto GP. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. Genes & Development. 2002;16(17):2252-63.

27. Donnem T, Andersen S, Al-Shibli K, Al-Saad S, Busund LT, Bremnes RM. Prognostic impact of Notch ligands and receptors in nonsmall cell lung cancer: coexpression of Notch-1 and vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival. Cancer. 2010;116(24):5676-85.

28. Aster JC, Blacklow SC, Pear WS. Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. The Journal of Pathology. 2011;223(2):263-74.

29. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. Nature. 2005;437(7056):270-274.

30. McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, et al. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. The American Journal of Human Genetics. 2006;79(1):169-73.

31. De Strooper B, Annaert W. Novel research horizons for presenilins and γ-secretases in cell biology and disease. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2010;26:235-60.

32. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, et al. Mutation of the β-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β-protein production. Nature. 1992;360(6405):672-674.

33. Berezovska O, Jack C, McLean P, Aster JC, Hicks C, Xia W, et al. Aspartate mutations in presenilin and γ-secretase inhibitors both impair Notch1 proteolysis and

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

nuclear translocation with relative preservation of Notch1 signaling. Journal of Neurochemistry. 2000;75(2):583-93.

34. Wang S-H, Lu Q-Y, Guo Y-H, Song Y-Y, Liu P-J, Wang Y-C. The blockage of Notch signalling promoted the generation of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells with lower immunosuppression. European Journal of Cancer. 2016;68:90-105.

35. Hallahan AR, Pritchard JI, Hansen S, Benson M, Stoeck J, Hatton BA, et al. The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. Cancer Research. 2004;64(21):7794-800.

36. O'Neil J, Calvo J, McKenna K, Krishnamoorthy V, Aster JC, Bassing CH, et al. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. Blood. 2006;107(2):781-5.

37. De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. Nature Reviews Neurology. 2010;6(2):99-107.

38. Beel AJ, Sanders CR. Substrate specificity of γ-secretase and other intramembrane proteases. Cellular and Molecular Life Sciences. 2008;65(9):1311-34.

39. Dübel S, Reichert JM. Handbook of therapeutic antibodies: John Wiley & Sons; 2014.

40. Aste-Amézaga M, Zhang N, Lineberger JE, Arnold BA, Toner TJ, Gu M, et al. Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors. PLoS One. 2010;5(2):e9094.

41. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen Y, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. Nature. 2010;464(7291):1052-1057.

42. Falk R, Falk A, Dyson MR, Melidoni AN, Parthiban K, Young JL, et al. Generation of anti-Notch antibodies and their application in blocking Notch signalling in neural stem cells. Elsevier. 2012;58(1):69-78.

43. Qiu M, Peng Q, Jiang I, Carroll C, Han G, Rymer I, et al. Specific inhibition of Notch1 signaling enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in triple negative breast cancer through reduction of cancer stem cells. Cancer Letters. 2013;328(2):261-70.

44. Agnusdei V, Minuzzo S, Frasson C, Grassi A, Axelrod F, Satyal S, et al. Therapeutic antibody targeting of Notch1 in T-acute lymphoblastic leukemia xenografts.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Leukemia. 2014;28(2):278-22.
45. Tiyanont K, Wales TE, Siebel CW, Engen JR, Blacklow SC. Insights into Notch3 activation and inhibition mediated by antibodies directed against its negative regulatory region. Journal of Molecular Biology. 2013;425(17):3192-204.
46. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. British Journal of Pharmacology. 2009;157(2):220-33.
47. Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. The Journal of Immunology. 2006;176(1):346-56.
48. Olafsen T, Kenanova VE, Wu AM. Generation of single-chain Fv fragments and multivalent derivatives scFv-Fc and scFv-CH3 (minibodies). Antibody Engineering: Springer; 2010. p. 69-15.
49. Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA, et al. Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. The Journal of Immunology. 2002;169(9):5171-80.
50. Girgis MD, Olafsen T, Kenanova V, McCabe KE, Wu AM, Tomlinson JS. Targeting CEA in pancreas cancer xenografts with a mutated scFv-Fc antibody fragment. EJNMMI research. 2011;1(1):24-10.
51. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnology. 2004;22:1393.
52. Jäger V, Büssow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A, et al. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. BMC Biotechnology. 2013;13(1):52-13.
53. Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. Frontiers in Immunology. 2013;4:217.
54. Lifely MR, Hale C, Boyce S, Keen MJ, Phillips J. Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. Glycobiology. 1995;5(8):813-22.
55. Dyson MR. Fundamentals of expression in mammalian cells. Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization: Springer; 2016. p.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

217-24.

56. Kuncharin Y, Sangphech N, Kueanjinda P, Bhattarakosol P, Palaga T. MAML1 regulates cell viability via the NF-κB pathway in cervical cancer cell lines. Experimental Cell Research. 2011;317(13):1830-40.

57. Li L, Zhang J, Xiong N, Li S, Chen Y, Yang H, et al. Notch-1 signaling activates NF-κB in human breast carcinoma MDA-MB-231 cells via PP2A-dependent AKT pathway. Medical Oncology. 2016;33(4):33-44.

58. Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, Fauq AH, Golde TE, Kaufmann SH, et al. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. European Journal of Immunology. 2008;38(1):174-83.

59. Gould LH, Sui J, Foellmer H, Oliphant T, Wang T, Ledizet M, et al. Protective and therapeutic capacity of human single-chain Fv-Fc fusion proteins against West Nile virus. Journal of Virology. 2005;79(23):14606-13.

60. Anthony RM, Ravetch JV. A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. Journal of Clinical Immunology. 2010;30(1):9-14.

61. Woestenenk EA, Hammarström M, van den Berg S, Härd T, Berglund H. His tag effect on solubility of human proteins produced in Escherichia coli: a comparison between four expression vectors. Journal of Structural and Functional Genomics. 2004;5(3):217-29.

62. Miekus N, Oledzka I, Plenis A, Wozniak Z, Lewczuk A, Koszałka P, et al. Gel electrophoretic separation of proteins from cultured neuroendocrine tumor cell lines. Molecular Medicine Reports. 2015;11(2):1407-15.

63. Wang Y, Li Y, Wang J, Ke X. Expression of Notch signal molecules in human lymphoma cells and its significance. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2012;20(1):83-7.

64. Suwanjunee S, Wongchana W, Palaga T. Inhibition of gamma-secretase affects proliferation of leukemia and hepatoma cell lines through Notch signaling. Anti-Cancer Drugs. 2008;19(5):477-86.

65. Gordon WR, Aster JC. Application and evaluation of anti-Notch antibodies to

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

modulate Notch signaling. Notch Signaling: Springer; 2014. p. 323-33.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

1. Complete DMEM (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

DMEM	87	มิลลิลิตร
FBS	10	มิลลิลิตร
Penicillin Streptomycin	1	มิลลิลิตร
HEPE	1	มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1	มิลลิลิตร

2. Complete RPMI 1640 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

RPMI 1640	86.909	มิลลิลิตร
FBS	10	มิลลิลิตร
Penicillin Streptomycin	1	มิลลิลิตร
HEPE	1	มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1	มิลลิลิตร
β-mercaptoethanol	0.091	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเก็บเซลล์ระยะยาว (Freezing media) (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร)

Complete media	0.9	มิลลิลิตร
DMSO	0.1	มิลลิลิตร

4. Binding buffer

Sodium phosphate	20	มิลลิโมลาร์
NaCl	0.5	โมลาร์
Imidazole	40	มิลลิโมลาร์

คำนวณสารเคมีตามรายการ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (DDW) และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 7.4 จากนั้นนำไปกรองผ่าน filter ที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร

5. Elution buffer

Sodium phosphate	20	มิลลิโมลาร์
NaCl	0.5	โมลาร์
Imidazole	500	มิลลิโมลาร์

คำนวณสารเคมีตามรายการ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (DDW) และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 7.4 จากนั้นนำไปกรองผ่าน filter ที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร

6. สารละลาย 1M Tris-HCl, pH 6.8 (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

Tris base	60.57	กรัม
DDW	500	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. สารละลาย 1.5M Tris-HCl, pH 8.8 (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

Tris base	90.855	กรัม
DDW	500	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 8.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. สารละลาย 10% (w/v) Ammonium Persulfate (APS) (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร)

Ammonium Persulfate	0.1	กรัม
DDW	1	มิลลิลิตร

9. สารละลาย 10% (w/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

Sodium Dodecyl Sulfate	5	กรัม
DDW	50	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.2

10. 8% Seperating Gel (ปริมาตร 8 มิลลิลิตร)

DDW	4.236	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis-acrylamide solution	1.6	มิลลิลิตร
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2	มิลลิลิตร
10% APS	0.08	มิลลิลิตร
10% SDS	0.08	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผสมสารละลายทุกอย่างให้เข้ากันแล้วจึงใส่ TEMED เพื่อทำให้เจลแข็งตัว

11. 5% Stacking Gel (ปริมาตร 2 มิลลิลิตร)

DDW	1.204	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis-acrylamide solution	0.25	มิลลิลิตร
1M Tris-HCl, pH 6.8	0.504	มิลลิลิตร
10% APS	0.02	มิลลิลิตร

10% SDS	0.02	มิลลิลิตร
TEMED	0.002	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทุกอย่างให้เข้ากันแล้วจึงใส่ TEMED เพื่อทำให้เจลแข็งตัว

12. สารละลาย 2x Loading buffer (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

10% SDS	4	มิลลิลิตร
87% Glycerol	2.29	มิลลิลิตร
1.0M Tris-HCl, pH 6.8	1	มิลลิลิตร
DDW	2.71	มิลลิลิตร
Bromophenol Blue	0.001	กรัม

13. สารละลาย SDS Staining Dye (2x Dye) (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร)

β-mercaptoethanol	0.1	มิลลิลิตร
2x Loading buffer	0.9	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

14. สารละลาย Transfer buffer (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

Glycine	2.9	กรัม
Trisma-base	5.08	กรัม
SDS	0.37	กรัม
Absolute methanol	200	มิลลิลิตร

ชั่งสารเคมีตามรายการ ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร เติม absolute methanol ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

15. สารละลาย 5x running buffer (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

Trisma-base	15.1	กรัม
Glycine	94	กรัม
SDS	5	กรัม

ชั่งสารเคมีตามรายการ ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

16. Blocking solution (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

Skim milk	1.5	กรัม
1XPBST	50	มิลลิลิตร

17. สารละลายซับสเตรท

90 mM Coumaric acid

Coumaric acid	14.8	มิลลิกรัม
DMSO	1	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

250 mM Luminol

Luminol	44.3	มิลลิกรัม
DMSO	1	มิลลิลิตร

Solution A

100 mM Tris-HCL, pH8.5	2.5	มิลลิลิตร
90 mM coumaric acid	0.011	มิลลิลิตร

250 mM luminol	0.023	มิลลิลิตร

Solution B

100 mM Tris-HCL, pH 8.5	2.5	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.0015	มิลลิลิตร

18. Film developer and fixer

เตรียมสารละลาย developer และ fixer พร้อมใช้งานโดยทำการเจือจางกับน้ำในอัตราส่วน 1:4

19. สารละลาย Coomassie Brilliant Blue stock (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

PhastGelTM Blue R	1	เม็ด
Absolute methanol	120	มิลลิลิตร
Distilled water	80	มิลลิลิตร

20. สารละลาย Coomassie Blue working (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

Coomassie Blue stock solution	1	มิลลิลิตร
Destain solution	9	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

21. สารละลาย Destian (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

Absolute methanol	30	มิลลิลิตร
Acetic acid	10	มิลลิลิตร
Distilled water	80	มิลลิลิตร

22. 10X PBS (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

NaCl	80	กรัม
KCl	2	กรัม
Na2HPO4	36.3	กรัม
KH2PO4	2.4	กรัม
DDW	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

23. PBS (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	3.63	กรัม
KH_2PO_4	0.24	กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ชั่งสารเคมีตามรายการ ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

24. สารละลาย PBST (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

1X PBS	1000	มิลลิลิตร
Tween20	500	มิลลิลิตร

25. RIPA buffer

1M Tris-HCl pH 7.4	0.35	มิลลิลิตร
0.5M NaCl	2.1	มิลลิลิตร
100% Nonidet P-40	0.7	มิลลิลิตร
10% Sodium deoxycholate	0.35	มิลลิลิตร
20% SDS	0.035	มิลลิลิตร
DDW	3.095	มิลลิลิตร
Protease inhibitor (1 tablet/1.5 ml)	1	มิลลิลิตร
Phosphatase inhibitor 100X		

26. สารละลาย 0.01% DEPC water (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

เตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterile Double Distilled water) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม DEPC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (0.01% v/v) ผสมให้เข้ากัน บ่มสารละลายข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

27. สารละลาย 75% Ethanol in DEPC (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

เติม Ethanol ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย 0.01% DEPC water ปริมาตร 25 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

28. สารละลาย 50x TAE buffer (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

Trisma base	48.4	กรัม
Glarcial acetic acid	11.42	มิลลิลิตร
0.5M EDTA	20	มิลลิลิตร

ชั่งสารเคมีตามรายการ ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 8.0 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

29. 1% Agarose gel

สารละลาย 1x TAE buffer	20	มิลลิลิตร
Agarose gel	0.2	กรัม

30. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Lauria-Bertani (LB) broth (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

Bacto tryptone	10	กรัม
Yeast extracts	5	กรัม
NaCl	5	กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ชั่งสารเคมีตามรายการ ละลายในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนมีค่าเท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

31. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เติมวุ้น (Bacto agar) จำนวน 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตาราง นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

32. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียาแอมพิซิลลิน (LBA agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar) หลังจากนำไปนึ่งไปฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซียลเซียส เติมแอมพิซิลลินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว วรวรรณ บุญรัศมี
วัน เดือน ปี เกิด	24 กันยายน 2535
สถานที่เกิด	จ.สุโขทัย
วุฒิการศึกษา	ระดับปริญญาตรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	131/18 คงสินอพาร์ทเม้น ห้อง2302 ซ ราชปรารภ14 ถ.ราชปรารภ แขวง มักกะสัน เขต ราชเทวี 10400

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University