



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเตรียมแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลที่เป็นโมเลกุลโปรตีน
ของมนุษย์โดยสมบูรณ์ต่อสารพิษเอนเทอโรท็อกซินชนิดเอของ
เชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส โดยเทคนิคฟาจดิสเพลย์ เพื่อการ
พัฒนาต่อไปสำหรับใช้ในการรักษาโรค

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. (นางสาว) นิตยา อินทราวัฒนา

เดือนสิงหาคม ปี พ.ศ. 2557

สัญญาเลขที่ MRG5480086

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเตรียมแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลที่เป็นโมเลกุลโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์ต่อสารพิษเอนเทอโรท็อกซินชนิดเอของเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส โดยเทคนิคฟาจดิสเพลย์ เพื่อการพัฒนาต่อไปสำหรับการรักษาโรค

ผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิตยา อินทราวัฒนา
ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา นักวิจัยที่ปรึกษา ซึ่งให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และสารเคมี รวมทั้งสละเวลาอันมีค่าเป็นที่ปรึกษาโครงการโดยตลอด ทำให้การวิจัยเป็นไปได้อย่างเรียบร้อย สมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่านเป็นอย่างยิ่ง และขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณ ดร. เกษม กุลแก้ว ผู้พัฒนา human antibody library phage ซึ่งได้นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิทัศน์ สุขรุ่ง ผู้ให้คำแนะนำและสนับสนุนการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยมหิดลที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ซึ่งทำให้โครงการนี้เริ่มขึ้นได้และสำเร็จไปได้ด้วยดี

นิตยา อินทรวัดนา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
บทนำ	3
วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)	5
รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ	
- ออกแบบและสังเคราะห์ oligonucleotide primer สำหรับ amplify gene coding for SEA	9
- การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> และการสกัด genomic DNA	11
- การเพิ่มปริมาณ SEA gene ด้วย PCR ที่ optimized condition	11
- การ clone amplicon เข้าสู่ cloning vector ตรวจสอบความถูกต้องของ gene insert ที่ตัดออกมาจาก cloning vector แล้ว subclone gene ดังกล่าวเข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม	14
- การ transfect <i>E. coli</i> ด้วย expression vector และคัดเลือก transformant(s) ที่เหมาะสม	14
- ทำการ express recombinant staphylococcal enterotoxin A protein (rSEA) จาก transformant(s) และทำการ purify โปรตีน (recombinant SEA protein)	17
- ทำ Bio-panning เพื่อคัดเลือก phages ที่ display ScFv ที่มี ความจำเพาะต่อ recombinant SEA antigen	20
- Amplification of human scfv (huscfv)	22
- คัดเลือก infected <i>E. coli</i> cells ที่สามารถผลิต HuScFv ที่จำเพาะต่อ recombinant SEA ด้วยเทคนิค Western blot analysis การทำ Phage-ELISA	24
- การศึกษาความหลากหลายของ huscfv ใน transformed HB2151 <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Amplification of human scfv (huscfv)	25
- การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ recombinant SEA จาก เซลล์แบคทีเรียซึ่งถูก infect ด้วย phages ที่คัดเลือกได้ การตรวจสอบ หา huscfv ใน transformed HB2151 <i>E. coli</i>	28
- การ purify แอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการด้วยเทคนิคที่เหมาะสม	29

- การทดสอบความสามารถของ recombinant SEA ของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ผลิตได้ในการกระตุ้นการหลั่ง Proliferative cytokines ของ lymphocyte ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ใน in vitro assay	30
- การทดสอบความสามารถของ specific ScFv ในการยับยั้ง activity ของ rSEA ของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Inhibition of PBMCs proliferation	35
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	37
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	39
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยมหิดล	39
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	47

รายการรูปและตาราง

	หน้า
รูปที่ 1 แสดง nucleotide sequences ของ Staphylococcal enterotoxin A (SEA) ของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่มีรายงานในฐานข้อมูล (GenBank accession no. EF520720.1)	10
รูปที่ 2 PCR product ที่ได้จากการใช้ genomic DNA ของเชื้อ <i>S. aureus</i> strain ATCC 13565 เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ SEA-coding sequence ในการ amplify gene ให้ได้ปริมาณมากพอ	13
รูปที่ 3 แสดง Nucleotide and deduced amino acid sequences of cloned sea	15
รูปที่ 4 แสดงผลการนำ recombinant plasmid ที่คัดเลือกได้ว่ามี sea insert เข้าสู่ protein expression host, i.e., BL21DE3 <i>E. coli</i>	16
รูปที่ 5 SDS-PAGE pattern ของ affinity column purified-recombinant SEA ที่เตรียมจาก transformed <i>E. coli</i> ย้อมด้วยสี CBB	19
รูปที่ 6 Phagemid transformed HB2151 <i>E. coli</i> ที่ถูก infected ด้วย SEA-bound phage clones ที่ได้มาจากการทำ bio-panning สามารถเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารคัดเลือกได้	21
รูปที่ 7 แสดงผลการเพิ่มจำนวน huscfv ใน phagemid infected HB2151 <i>E. coli</i>	23
รูปที่ 8 Western blot analysis เพื่อวิเคราะห์หา huscfv-phagemid transformed HB2151 <i>E. coli</i> clones ที่สามารถ express HuScFv ได้	26
รูปที่ 9 DNA banding patterns for determining RFLP of Mval-cut huscfv sequences amplified from recombinant phagemids infected HB2151 <i>E. coli</i> clones no. B1 and B6	27
รูปที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ CDR1, CDR2 และ CDR3 ของ scFv clone no. 1 (B1) และ 2 (B6)	29
รูปที่ 11 PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ human β -actin-coding sequence ในการ amplify gene เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ cDNA ที่ผลิตขึ้น	32
รูปที่ 12 กราฟการแสดงออกของยีน IL-2 (A) และ IFN- γ (B) ใน hPBMCs ที่ถูกกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วย rSEA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	34
รูปที่ 13 Inhibition of PBMCs proliferation: กราฟการแสดงออกของ IL-2 (A) และ IFN- γ (B) ใน hPBMCs ที่ถูกกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วย rSEA ที่ความเข้มข้น 100 ng และ rSEA ที่ถูก neutralized ด้วย rSEA ต่อ ScFv clone no.B1 และ B6 ที่อัตราส่วนต่างๆ	36

ตารางที่ 1 แสดง oligonucleotide primers สำหรับการ amplify Staphylococcal enterotoxin A (SEA) ของเชื้อ *S. aureus* ในการศึกษาครั้งนี้

9

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480086

ชื่อโครงการ: การเตรียมแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลที่เป็นโมเลกุลโปรตีนของมนุษย์โดย
สมบูรณต่อสารพิษเอนเทอโรท็อกซินชนิดเอของเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส
โดยเทคนิคฟาจดิสเพลย์ เพื่อการพัฒนาต่อไปสำหรับการรักษาโรค

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. (นางสาว) นิตยา อินทราวัฒนา
ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล : tmniw@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนาลแอนติบอดีของมนุษย์ที่มีความสามารถในการจับกับพิษ Staphylococcal enterotoxin A (SEA) จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยใช้เทคนิคแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์ การวิจัยเริ่มจากการเพิ่มจำนวนยีน SEA จากเชื้อ *Staphylococcus aureus* strain ATCC 13565 แล้วนำ PCR product เข้าสู่ cloning vector และ *E. coli* host protein expression system และผ่านขั้นตอน protein purification โดยใช้ affinity resin ซึ่งนำ purify recombinant SEA (rSEA) ที่เตรียมได้มาใช้เป็นแอนติเจนคัดเลือกฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีจำเพาะต่อพิษด้วยเทคนิคไบโอแพนนิ่ง (bio-panning) ซึ่งสามารถคัดเลือกฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ rSEA ได้ 28 โคลน จากนั้นนำฟาจแต่ละโคลนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านชนิดเอชเชอริเชียโคไล (*E. coli*) แล้วตรวจสอบความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (genes coding for human monoclonal single chain variable fragments; *huscfv*) ในฟาจที่คัดเลือกไว้ด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ผลการวิเคราะห์พบว่ายีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์หรือ *huscfv* จากแบคทีเรียทั้ง 2 โคลนมีรูปแบบของท่อนดีเอ็นเอ (DNA bands) ที่แตกต่างกัน แสดงว่าแอนติบอดีจากยีนเหล่านี้จะมีความจำเพาะต่อเอพิโทปต่างกันหรืออย่างน้อยก็มีแอฟฟินิตีต่อเอพิโทปไม่เท่ากัน จากนั้นนำแบคทีเรียไปเลี้ยงแล้วทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรียสร้างแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ที่จับจำเพาะกับ rSEA ออกมา แล้วทำการแยกแอนติบอดีสายเดี่ยวออกมาจากโปรตีนอื่นๆ ของแบคทีเรีย โดยใช้ anti-E-tag resin จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีสายเดี่ยวในการจับกับ rSEA โดยตรวจดูว่าแอนติบอดีสายเดี่ยวเหล่านั้นจะสามารถยับยั้งการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน lymphocyte cells ใน PBMCs ด้วย rSEA ได้หรือไม่ ซึ่งพบว่าแอนติบอดีสายเดี่ยวจากแบคทีเรียจำนวน 1 โคลน สามารถยับยั้ง activity ได้ กล่าวได้ว่างานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตต้นแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่สามารถจับกับสารพิษ rSEA ซึ่งแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่ผลิตได้นี้สามารถที่จะนำไปพัฒนาต่อตามขั้นตอนที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษได้ในที่สุด ทั้งนี้เพราะแอนติบอดีต้นแบบเหล่านี้เป็นโมเลกุลโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์ย่อมไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ (anaphylaxis หรือ serum sickness) ในผู้รับ ดังที่มักจะเกิดเมื่อใช้แอนติบอดีจากสัตว์ในการรักษาผู้ป่วย

คำหลัก: เทคนิคฟาจดิสเพลย์ แอนติบอดีสำหรับรักษาโรค แอนติบอดีสายเดี่ยว แอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาล ฟาจดิสเพลย์ไลบรารี ฟาจมิด สแตปไฟโลค็อกคัส ออเรียส เอนเทอโรท็อกซิน เอ

Abstract

Project Code: MRG5480086

Project Title: Preparation of fully human monoclonal antibody to enterotoxin A (SEA) of *Staphylococcus aureus* by using phage display technology for further development to therapeutic antibody

Investigator: Asistant Professor Dr. (Ms) Nitaya Indrawattana
Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine,
Mahidol University

E-mail Address: tmniw@mahidol.ac.th

Project Period: 2 Years

This study aims to produce immunotherapeutic human monoclonal antibodies in the form of single chain antibodies (ScFv) against staphylococcal enterotoxin A (SEA) by using phage display human antibody library. Recombinant SEA protein (rSEA) was produced by amplified the sea full length from *Staphylococcus aureus* strain ATCC 13565 and subjected to host protein expression system. The purified rSEA was used in a "single-round" phage bio-panning against an established phage display human antibody library and the rSEA specific phage population was obtained. Twenty-eight individual phage clones with high binding affinity ScFv to the rSEA were obtained after a phage ELISA using the rSEA as an antigen to coat a microtiter ELISA plate and the bovine serum albumin as a negative antigen control. Individual phages were used to transfect non-suppressor *E. coli* bacteria for production of the human soluble ScFv. Two transformants carrying scFv-phagemids were obtained. The scFv derived from various *E. coli* transformants revealed high DNA banding pattern diversity (different RFLP) implying either epitope or affinity diversity of the expressed ScFv. Expressed ScFv was purified from individual *E. coli* transformants by using an anti-E-tag column. The efficiency of the ScFv in neutralizing the rSEA was investigated by inhibition of lymphocyte cells proliferation assay. The results showed one selected ScFv from phage clone is successes to inhibit the lymphocyte proliferation by rSEA. This study successfully produced human antibodies ScFv that can inhibit rSEA acitivity. These antibodies may be use for treatment in patient who got staphylococcal enterotoxin.

Keywords: Staphylococcus enterotoxin A, SEA, phage display, human single chain antibody, HuScFv

บทนำ

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรคที่มีอาการรุนแรงจนถึงเสียชีวิตในคนทั่วโลก เช่น เกิดอาการโลหิตเป็นพิษ เป็นฝีในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะสำคัญต่างๆ เช่น หัวใจ ไขสันหลังหรือจากการได้รับสารพิษ รวมทั้งอาหารเป็นพิษชนิดรุนแรงจนต้องได้รับการรักษาในโรงพยาบาล ทั้งนี้ด้วยกรรมวิธี (pathogenic mechanisms) และปัจจัยในการก่อโรครุนแรง (virulence factors) ต่างๆ ทั้งที่เชื้อผลิตออกมาขณะอยู่นอกโฮสต์และโฮสต์กินอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไป (preformed enterotoxins ทำให้เกิด food poisoning) และที่ผลิตออกมาภายหลังการที่โฮสต์ติดเชื้อ ซึ่งส่วนใหญ่เป็น โปรตีน เอนไซม์และสารพิษต่างๆ เช่น various enzymes, coagulase, exfoliative toxin, exotoxin TSST-1, staphylococcal enterotoxin A (SEA) โดยพบว่าร้อยละ 78 ของผู้ป่วยมีอาการป่วยจากการได้รับสารพิษ SEA ซึ่งเป็นสารพิษที่ทนทานต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีมาก เช่น ทนความร้อน (พิษไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน) และทนความเป็นกรด-ด่าง นอกจากนี้มีฤทธิ์เป็น enterotoxin และ neurotoxin ที่ทำให้มีอาการปวดเกร็งในท้องอย่างรุนแรง อาเจียน และอุจจาระร่วง เมื่อคนกินอาหารที่ถูกปนเปื้อนด้วย pre-formed SEA (หรือกินตัวเชื้อ *S. aureus* เข้าไปแล้วเชื้อผลิต SEA ออกมาภายหลัง) แล้ว SEA ยังเป็น “Superantigen” ซึ่งสามารถกระตุ้น $CD4^+$ T cells จำนวนมากในกระแสเลือด โดย SEA สามารถจับกับ variable region ของ T cell receptor สายบีต้า (β -chain of TCR) โดยตรง (โดยไม่จำเป็นต้องถูก processed ให้อยู่ใน peptide groove ของ MHC class II บน antigen presenting cell) และขณะเดียวกันก็จับกับ α -helix ของโมเลกุล MHC class II บนผิวของ antigen presenting cell พร้อมๆกัน มีผลทำให้ T cells นั้นๆ ถูกกระตุ้นให้หลั่งไซโตไคน์ (cytokines) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง proinflammatory cytokines คือ $TNF\alpha$ และ IL-1 ออกมามากผิดปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอาการต่างๆ เช่น มีไข้สูงมาก มีการอักเสบและบวมในอวัยวะสำคัญ มีการเพิ่มของ vascular permeability ความดันเลือดลดลงต่ำ เกิดอาการช็อค และทำให้เสียชีวิต ดังนั้น ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของประเทศสหรัฐอเมริกา (Center of Disease Control; CDC) จึงจัดให้ SEA อยู่ในกลุ่มสารพิษที่เป็นอาวุธชีวภาพ (Bio-weapon)

การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส สามารถทำได้โดยการให้ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าเชื้อ แต่ยาปฏิชีวนะไม่สามารถกลบล้างพิษต่างๆ ของสารพิษที่เชื้อผลิตออกมาแล้วได้ ในปี ค.ศ. 1959 ได้เกิดมีเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส ที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่เคยใช้ได้ผลดีในการฆ่าเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดมีสายพันธุ์ที่ดื้อยา methicillin (methicillin resistant *S. aureus*; MRSA) ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งทางการแพทย์ในการรักษาผู้ที่ติดเชื้อเหล่านี้ นอกจากดื้อยาปฏิชีวนะแล้ว MRSA ยังสามารถผลิต staphylococcal enterotoxins (SEs) ต่างๆ ได้มากกว่าเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาถึงกว่าสิบเท่า และทำให้ผู้ที่ติดเชื้อ

MRSA มีอัตราการเสียชีวิตสูง เนื่องจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะไม่ได้ผล และไม่สามารถยับยั้งกลไกการเกิดโรคจากสารพิษของเชื้อได้ และในขณะนี้ยังไม่มี SEA anti-dote นักจุลชีววิทยาหลายกลุ่มจึงขนานนาม MRSA ว่า “Formidable Superbug”

เนื่องจากในผู้ป่วยที่รอดชีวิต (convalescing subjects) จะมี anti-toxin antibody ในกระแสเลือด ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดว่าหากให้การรักษาผู้ติดเชื้อและเริ่มป่วยด้วยวิธี passive immunization (ให้ ready made antitoxin) เสียตั้งแต่ในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ (acute phase) ก็น่าจะสามารถยับยั้งฤทธิ์ของสารพิษของเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียสได้และก็น่าจะทำให้สามารถลดความรุนแรงของโรคและอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ติดเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส ลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม MRSA แต่การใช้แอนติบอดีจากคนที่หายป่วยเพื่อนำไปรักษาผู้ที่กำลังป่วยย่อมมีปริมาณแอนติบอดีไม่เพียงพอและขัดต่อจริยธรรม อีกทั้งการใช้แอนติบอดีที่เตรียมจากการ immunize สัตว์ก็มีข้อจำกัดหลายประการโดยเฉพาะอย่างยิ่ง adverse reactions ที่เกิดจาก anti-isotype response เช่น anaphylaxis หรือ serum sickness

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเสนอการสร้างและผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่มีความจำเพาะต่อ *Staphylococcal enterotoxin A* (SEA) ซึ่งเป็นสารพิษที่สำคัญของเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส ในลักษณะผลิตภัณฑ์ต้นแบบ โดยจะผลิตเป็นแอนติบอดีที่มีขนาดเล็ก (ขนาดโมเลกุลเพียง 27-35 กิโลดัลตัน ซึ่งเล็กกว่า conventional IgG ประมาณ 5 เท่า) ที่เรียกว่า แอนติบอดีสายเดี่ยว (human single chain variable fragments; HuScFv) คือประกอบด้วย heavy chain และ light chain ต่อกันเท่านั้น แอนติบอดีสายเดี่ยวจึงมี tissue penetrating ability สูงกว่า conventional antibody และไม่ก่อการอักเสบเพิ่มเติมขึ้นอีกในโฮสต์เพราะไม่มีส่วน Fc ทั้งนี้โดยใช้เทคนิคฟาจดิสเพลย์ (Phage Display Technology) แอนติบอดีสายเดี่ยวที่สร้างขึ้นจะมีโครงสร้างสอดคล้องกับระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ ซึ่งมีความสำคัญยิ่งสำหรับการพัฒนาต่อไปสำหรับรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษเอนเทอโรท็อกซิน ชนิด เอ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาตอบโต้หรือภาวะภูมิไวเกินในผู้ที่ได้รับการรักษา เพราะเป็นโมเลกุลโปรตีนของมนุษย์ด้วยตนเอง

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อผลิตแอนติบอดีของสายเดี่ยวมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาล (Human single chain monoclonal variable fragments; HuScFv) ที่มีความจำเพาะต่อ *Staphylococcal enterotoxin A* (SEA) ของเชื้อ *S. aureus* โดยใช้เทคนิคฟาจดิสเพลย์สำหรับการพัฒนาต่อไปเป็นแอนติบอดีสำหรับรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษเอนเทอโรท็อกซิน เอ ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อใช้แทนหรือเสริมกับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลม (coccal) ขนาดประมาณ 0.5 – 1.0 ไมครอน เซลล์มีการจับตัวกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (cluster) แต่อาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ มีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดครึ่งแข็งครึ่งเหลวมีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีของโคโลนีอาจเป็นสีครีม เหลือง หรือสีส้ม แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6 – 46 °C โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ 30 – 37 °C ทนความร้อนที่ 60 °C ได้นานประมาณ 30 นาที สามารถสร้างสารพิษที่อุณหภูมิมากกว่า 10 °C ค่า pH ที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง pH 4.0 – 10.0 โดยมีช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 7.0 – 7.5 และค่า water activity (AW) อยู่ในช่วง 0.85 – 0.999 แต่จะเจริญได้อย่างช้าๆ ที่ค่า AW น้อยกว่า 0.94 สามารถทนเกลือได้ที่ 18 – 20% แบคทีเรียชนิดนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe โดยสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน โดยปกติสามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูก เยื่อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และที่บาดแผลที่เป็นฝี หนอง นอกจากนี้ยังพบในดิน ผุ่นละออง รวมทั้งอาหารต่างๆ ที่มักมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *S. aureus* ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์จากไข่ และอาหารที่มี water activity น้อย เช่น เนยแข็ง กุนเชียง และซาลามี เป็นต้น การรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *S. aureus* แม้ว่าแบคทีเรียจะผลิตสารพิษ SE ในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ก็สามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ อาการของโรคอาหารเป็นพิษมักเกิดภายหลังจากรับประทานอาหารที่มีสารพิษปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1 – 6 ชั่วโมง (Bergdoll *et al.*, 1981) อาการป่วยคือ อาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วงอย่างรุนแรงจนอ่อนเพลียมาก ปวดท้องและเป็นตะคริวในท้อง ส่วนมากไม่มีไข้ ในรายที่มีอาการรุนแรงอาจช็อคได้ ในผู้สูงอายุ เด็กแรกเกิด และผู้ป่วยโรคเบาหวาน อาจมีอาการอื่นแทรกซ้อนด้วย แต่ส่วนใหญ่อาการจะดีขึ้นใน 8 – 24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานของร่างกายและปริมาณของสารพิษที่ได้รับเข้าไปในร่างกาย ซึ่งหากมีจำนวนของเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหารปริมาณ 100,000 เซลล์ต่ออาหารหนึ่งกรัม แบคทีเรียสามารถผลิต SEs ได้ในปริมาณสูงมาก

นอกจากอาหารเป็นพิษเพราะสารพิษพวก SE แล้ว การติดเชื้อที่แผลทำให้เป็นหนอง (pyogenic infection) ซึ่งสารพิษที่เชื้อผลิตที่บริเวณติดเชื้ออาจเข้าสู่กระแสเลือดแล้วทำให้เกิด systemic illness ต่างๆได้ หรือการติดเชื้อภายในร่างกาย (systemic infection) จะทำให้เกิดโรคแบบอื่น เช่น เป็นฝีที่มีหนองที่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะภายในต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อหัวใจ ปอด acute septicemia และ acute toxemia (Siriwong *et al.*; 2009, Wikipedia; 2010)

Staphylococcal enterotoxins (SEs) คือกลุ่มโปรตีนที่ออกซินซึ่งมีจำนวนมากกว่า 20 ชนิดที่เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถผลิตออกมาได้ แต่ละชนิดมีลักษณะโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ที่คล้ายคลึงกัน โปรตีนที่ออกซินเหล่านี้สามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้หลายแบบ เช่น ทำให้

เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และ toxic shock syndrome ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการประมาณการณืจำนวนผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *S. aureus* มากถึง 185,000 รายต่อปี (Mead *et al.*, 1999; Shinefield *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานอุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ในประเทศอื่นๆ เช่น ออสเตรเลีย (Schmid *et al.*, 2009) อิตาลี (Pape *et al.*, 2006) ญี่ปุ่น (Asao *et al.*, 2003) โปรตุเกส (Pereira *et al.*, 2009) เกาหลีใต้ (Bae *et al.*, 2007) ซึ่งพบว่าร้อยละ 78 ของผู้ป่วยทั้งหมดมีอาการซึ่งเกิดจากการได้รับสารพิษ Staphylococcal enterotoxin ชนิด A หรือ SEA

SEA ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Merlin Bergdoll และคณะ จาก The Food Research Institute, Wisconsin University จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ (Chu *et al.*; 1996) SEA เป็นสารพิษโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 233 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27 กิโลดัลตัน ทนความร้อนได้ดีตั้งกล่าวข้างต้น ไม่ถูกทำลายแม้ต้มเดือดนานถึงครึ่งชั่วโมง และทนความร้อนที่ 121 °C ได้นานถึง 15 นาที ละลายได้ในน้ำและสารละลายเกลือ เชื้อ *S. aureus* จะสร้างสารพิษต่างๆดังกล่าวแล้วได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C และเชื้อสามารถทนต่อรังสีแกมมาในปริมาณที่อนุญาตให้ใช้กับอาหารอีกด้วย (Rasooly *et al.*, 2010) กลไกการเกิดโรคจาก SEA สามารถแบ่งออกเป็นสองประเภท คือ ทำให้เกิดภาวะกระเพาะอาหารลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) และภาวะปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างรุนแรงเนื่องจาก SEA มีคุณสมบัติเป็น Superantigen (SAG) ซึ่งสามารถจับกับ T lymphocyte receptor (TCR) ที่บริเวณ variable (Vss) ของสายบีตา (Vβ) ได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องถูก presented ให้ TCR ผ่าน peptide-MHC class II และ SEA ยังสามารถจับกับบริเวณ α-helic ของโมเลกุล MHC class II ที่พบบริเวณผิวของ Antigen presenting cells (APCs) ซึ่งทำให้ SEA สามารถสร้าง bridge ระหว่าง APCs และ Tcells ได้โดยตรง ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T cells ที่มี common Vβ นั้นๆ ให้เพิ่มจำนวนมากขึ้น (~20-30%) และเหนี่ยวนำให้เกิด massive T cell activation ซึ่งหลั่ง cytokines/chemokines โดยเฉพาะอย่างยิ่ง proinflammatory cytokines เช่น TNFα และ IL-1 ออกมามาก (Peterson *et al.*, 2002) ก่อให้เกิดอาการของโรคในผู้ป่วยได้หลายแบบเช่น ผู้ป่วยเกิดอาการอาเจียน (emesis) (Hu *et al.*, 2009) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) (Tarkowski *et al.*, 2006) toxic shock syndrome (Da Cunha *et al.*, 2007) และโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis) (Ong *et al.*, 2008)

ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ *S. aureus* ด้วยยาปฏิชีวนะอาจไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนการแพร่ระบาดของแบคทีเรียในกลุ่ม MRSA (เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลประมาณร้อยละ 30 ถึง 60) มากขึ้นซึ่งเชื้อแบคทีเรียนี้ดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม beta-lactam หลายชนิด อีกทั้ง MRSA ยังมีแนวโน้มดื้อต่อยาปฏิชีวนะอีกหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ ในปี 2547 (มกราคม ถึง มิถุนายน 2547) ฝ่ายแบคทีเรียลำไส้ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์

สาธารณสุขแห่งชาติ ประเทศไทย รายงานการพบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจำนวนทั้งสิ้น 312 สายพันธุ์ เป็น MRSA จำนวน 90 สายพันธุ์ และเป็น methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) จำนวน 222 สายพันธุ์ (ประภาวดี และคณะ 2010) ในปี พ.ศ. 2552 Nickerson และคณะ ได้รายงานการแพร่ระบาดของเชื้อ *S. aureus* ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2549 ถึง เดือนพฤศจิกายน 2550 ในโรงพยาบาลแห่งหนึ่งที่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าอัตราการเสียชีวิตเนื่องมาจากการติดเชื้อ *S. aureus* สูงถึงร้อยละ 52 ของผู้เสียชีวิตทั้งหมด โดยร้อยละ 44 ของการเสียชีวิตเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม MSSA และร้อยละ 28 เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม MRSA (Nickerson *et al.*, 2009) จากข้อมูลการแพร่ระบาดชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *S. aureus* มีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นและมีการวิวัฒนาการสายพันธุ์ทำให้มีคุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด โดยแบคทีเรียที่เป็นปัญหาสำคัญได้แก่กลุ่ม MRSA ซึ่งทำให้เกิดอาการติดเชื้อรุนแรง รักษาหายได้ยาก เนื่องจากการดื้อยาและทำให้มีอัตราเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูง นอกจากนี้ยังมีการกลายพันธุ์จาก MRSA เป็นสายพันธุ์ใหม่ คือ vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) และ vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA) เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาแวนโคมัยซิน ซึ่งแวนโคมัยซินเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA ที่มีความรุนแรงและยาปฏิชีวนะอื่นๆรักษาไม่ได้ผล ดังนั้น MRSA, VISA และ VRSA จึงเป็นปัญหาโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในขณะนี้โดยเฉพาะในประเทศไทย

ดังนั้นจึงมีความพยายามในการพัฒนาวิธีการรักษาเพื่อกำจัดตัวเชื้อและสารพิษที่เชื้อ *S. aureus* ผลิตขึ้น โดยการพัฒนาตัวยา beta-lactam ให้จำเพาะต่อ penicillin binding protein 2a (PBP2a) ซึ่งเป็นซับสเตรตเริ่มต้นสำหรับการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* และเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ MRSA สามารถดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม beta-lactam ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* ในปัจจุบัน เนื่องจากยาเหล่านี้ไม่สามารถขัดขวาง PBP2a ที่แบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างขึ้น จึงส่งผลให้ยาไม่สามารถทำลายตัวเชื้อได้ ซึ่งในปัจจุบันยาปฏิชีวนะดังกล่าวยังอยู่ในระหว่างการพัฒนา (Lim *et al.*, 2002) สำหรับวิธีการขัดขวางการทำงานของสารพิษที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นโดยการให้ Intravenous anti-toxin therapy (IVIG) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการรักษา IVIG ประกอบด้วย anti-SE polyclonal antibodies (PABs) ซึ่งในการรักษาผู้ป่วยหนึ่งคนต้องรวบรวมซีรัมจากผู้บริจาคที่เคยติดเชื้อ *S. aureus* จำนวนมาก ซึ่ง anti-SE PABs นี้จะไปขัดขวางการจับกันระหว่าง SE และโมเลกุล MHC class II บนผิวของ APCs หรือการจับกันระหว่าง SE และ Vβ ของ TCR บนผิวของ T cells ซึ่งจะทำให้สามารถยับยั้งการหลั่ง proinflammatory cytokines/chemokines (Darenberg *et al.*, 2004; Yanagisawa *et al.*, 2007) แอนติบอดีที่ผลิตได้จากมนุษย์ด้วยกันเองนั้นมีข้อดี คือ นอกจากจะสามารถเลือกเฉพาะที่มี high binding affinity ต่อ SE แล้ว ยังไม่เป็นสิ่งแปลกปลอมในร่างกายของผู้ที่ได้รับการรักษา จึงไม่ค่อยมีอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ แต่มีข้อจำกัดที่มักผลิตได้ไม่พอกับความต้องการและขัดต่อจริยธรรม ผู้ป่วยอาจเกิด

ภาวะ acute renal failure, venous thrombosis, hepatitis อันเนื่องมาจากการได้รับแอนติบอดีชนิดต่างๆจำนวนมากจาก pooled IVIG หรือเกิดภาวะ pulmonary edema เนื่องจากได้รับของเหลวมากเกินไป อีกทั้งผู้ป่วยอาจได้รับเชื้อโรคอื่นๆ จากผู้บริจาคซีรัม เช่น HIV หรือ viral hepatitis (Graumann *et al.*, 2010)

ในปี ค.ศ. 1975 กลุ่มคณะวิจัย Kohler และ Milstein (Kohler G, Milstein C., 1975) ได้พัฒนาเทคนิคการผลิตแอนติบอดีโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ Hybridoma โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ชนิดนี้จัดอยู่ในประเภทโมโนโคลนอลแอนติบอดี เทคนิคดังกล่าวสามารถออกแบบให้แอนติบอดีมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่กำหนดได้ และไม่ต้องเสียเวลาในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ (immunization) อีก แต่เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากเซลล์ที่ใช้ผลิตแอนติบอดีนี้เป็นเซลล์ที่ได้มาจากหนูไมซ์เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้น แอนติบอดีที่เป็นโปรตีนของหนูไมซ์เหล่านี้เมื่อนำไปใช้รักษาโรคในคนมักกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับให้เกิด anti-isotype response ที่เรียกว่า human antibody to mouse antibody (HAMA) ส่งผลให้ผู้รับแอนติบอดีนี้เกิดภาวะภูมิแพ้หรือกลุ่มอาการ serum sickness อย่างรุนแรงได้ (Reichert, 2002; Goldsby *et al.*, 2003)

ตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1985 ความรู้ทาง Molecular/antibody engineering เริ่มแพร่หลายและได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ มากขึ้น อาทิ เช่น มีการนำเซลล์ต่างๆเช่นยีสต์ หรือ ไวรัสของแบคทีเรีย (bacteriophage; phage หรือ ฟาจ) มาประยุกต์ใช้การผลิตเปปไทด์ และโปรตีนรวมทั้งแอนติบอดี หรือที่เรียกว่า เทคนิคฟาจดิสเพลย์ (Phage display technology) (Smith, 1985; Smith and Petrenko, 1997) โดยใช้หลักการตัดต่อยีนซึ่งทำหน้าที่ผลิตโปรตีนเป้าหมายเช่นยีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีสายเดี่ยวของคน (gene sequences encoding human single chain variable fragments; *huscFv*) เข้าไปเชื่อมต่อกับ phage DNA ที่ encode โปรตีนโครงสร้างที่เป็นส่วนห่อหุ้มอนุภาคของฟาจ (phage capsid) ใน phage genome เมื่อฟาจเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย อนุภาคที่สมบูรณ์ของฟาจแต่ละอนุภาคก็จะ display โปรตีนที่ต้องการคือ HuScFv บนผิวของฟาจด้วย เมื่อทำการคัดเลือกฟาจที่ display HuScFv มีความจำเพาะต่อ epitope ที่เราต้องการด้วยวิธีการที่เรียกว่าการทำ Bio-panning แล้ว จะสามารถนำฟาจไปเพิ่มจำนวนใน *E. coli* สายพันธุ์พิเศษที่เมื่อ *E. coli* เพิ่มจำนวนก็จะให้ผลิตแอนติบอดี (HuScFv) ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งเราสามารถนำแอนติบอดีที่ได้นี้ไปผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ (purification) แล้วนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ ซึ่งข้อดีของเทคนิคฟาจดิสเพลย์นี้ คือใช้ระยะเวลาสั้นในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามต้องการ ไม่ต้องฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์หรือคน (without *in vivo* immunization) จึงไม่ต้องกังวลกับ immunogenicity และ toxicity ของสารที่จะนำไปฉีด และไม่มี *in vivo* immune regulation สามารถเตรียมแอนติบอดีได้มากหรือน้อยตามต้องการ แอนติบอดีมีคุณภาพคงที่ ไม่มี batch-to-batch variation หรือ animal/human-to-animal/human variation ปราศจากการปนเปื้อนด้วย non-specific animal/human serum proteins ในกรณีของการผลิต HuScFv จาก human antibody

phage display library ก็จะไม่เกิด anti-isotype response ในผู้ที่ได้รับการรักษาด้วย HuScFv นั้นๆ (Dall'Acqua and Carter, 1998; Griffiths, 1993) ในปัจจุบันมีการเตรียมและใช้ human antibody ที่เตรียมโดยใช้ phage display technology ในการรักษาผู้ป่วยโรคต่างๆ เช่น ออโตอิมมูน (Renner *et al.*, 1994) โรคติดเชื้อ (Sanna *et al.*, 1995; Maneewatch *et al.*, 2009; Pongpair *et al.*, 2010) การได้รับพิษ (Kulkeaw *et al.*, 2009) เป็นต้น

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการผลิต monoclonal anti-enterotoxin A (anti-SEA) โดยใช้ human antibody phage display library ที่ห้องปฏิบัติการของ mentor (ศาสตราจารย์ วันเพ็ญ ชัยคำภา) สร้างเอาไว้แล้ว เพื่อให้ได้ anti-enterotoxin A ที่เป็นโมเลกุลของมนุษย์โดยสมบูรณ์ ในรูปแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยวที่มีขนาดเล็กเพื่อให้แทรกผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ดี ไม่ก่อการอักเสบในร่างกายของคน มีคุณภาพแน่นอนและเหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดสำหรับรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสเตฟิโลค็อกคัส เอนเทอโรท็อกซิน ชนิด เอ (SEA) ของเชื้อสเตฟิโลค็อกคัส ออเรียส ได้ในที่สุด

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

- ออกแบบและสังเคราะห์ oligonucleotide primers สำหรับ amplify gene coding for SEA (กิจกรรมเดือนที่ 1-2)

ผู้วิจัยได้ออกแบบ oligonucleotide primers สำหรับยีนที่ encode Staphylococcal enterotoxin A (SEA) ของเชื้อ *S. aureus* (ตารางที่ 2.1) จาก gene sequence ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (รูปที่ 2.1) ซึ่งผู้วิจัยพบว่า full length gene ดังกล่าวจะมีขนาดประมาณ 774 base pairs (bp)

ตารางที่ 2.1 แสดง oligonucleotide primers สำหรับการ amplify Staphylococcal enterotoxin A (SEA) ของเชื้อ *S. aureus* ในการศึกษาครั้งนี้

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'-3')
FSEA_BamHI	ACGGATCCGATGAAAAACAGCATTTATA
RSEA_HindIII	TTAAGCTTCTCGAGACTTGTATATAAATATATATC


```
1 atgaaaaaaaa cagcatttat actactttta ttcattgccc taacgtggac aacaagtcca
61 cttgtaaatg gtagcgagaa aagcgaagaa ataaatgaaa aagatttgcg aaaaaagtct
121 gaattgcagg gaacagcttt aggcaatctt aaacaaatct attattacaa tgaaaaagct
181 aaaactgaaa ataaagagag tcacgatcaa tttttacagc atactatatt gtttaaaggc
241 ttttttacia atcattcatg gtataacgat ttattagtag attttgattc aaaggatatt
301 gttgataaat ataaagggaa aaaagtagac ttatatgggtg cttattatgg ttatcaatgt
361 gcgggtggta caccaaacia aacagcttgc atgtatgggtg gtgtaacgtt acatgataat
421 aatcgattga ccgaagagaa aaaagtgcc aatcaatttat ggctagacgg taaacaaaat
481 acagtacctt tggaaacggt taaaacgaat aagaaaaatg taactgttca ggagttggat
541 cttcaagcaa gacgttattt acaggaaaaa tataatttat ataactctga tgtttttgat
601 gggaagggtc agaggggatt aatcgtgttt catacttcta cagaaccttc ggttaattac
661 gatttatttg gtgctcaagg acagaattca aatacactat taagaatata tagagataat
721 aaaacgatta actctgaaaa catgcatatt gatatatatt tatatacaag ttaa
```

รูปที่ 2.1 แสดง nucleotide sequences ของ Staphylococcal enterotoxin A (SEA) ของเชื้อ *S. aureus* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล (GenBank accession no. EF520720.1)

- **ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และการสกัด genomic DNA**

(กิจกรรมเดือนที่ 1-2)

เพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อ *Staphylococcus aureus* strain ATCC 13565 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 37°C ใน shaking incubator เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นำ cell suspension ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 2.0 มล. ปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ความเร็วรอบ 14,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย PBS ปั่นล้างเซลล์เพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียออก แล้วนำตะกอนเซลล์ไปสกัด genomic DNA โดยใช้ extraction kit (Geneaid, Taiwan) ตามคำแนะนำในคู่มือที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา เติม Lysozyme buffer (20 mg/ml lysozyme; 20 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; pH 8.0) ปริมาตร 200 μ l ละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติม Proteinase-K (10 mg/ml) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 15 นาที เติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที เติม absolute ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเขย่าด้วย Vortex mixer นาน 10 วินาที นำ cell suspension ใส่ลงใน GD column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ย้าย purification column ใส่ลงหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ย้าย column ใส่ลงหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม washing buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ย้าย column ใส่ลงหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม elution solution ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของ genomic DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

- **ทำการเพิ่มปริมาณ SEA gene ด้วย PCR ที่ Optimized condition (กิจกรรมเดือนที่ 3-4)**

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ SEA gene ผู้วิจัยได้ใช้ gradient PCR เพื่อหาอุณหภูมิสำหรับ annealing ที่เหมาะสมที่สุด ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ประกอบด้วย การเตรียม PCR mixture และ Thermal cycles ดังต่อไปนี้

A. PCR mixture (25 μ l)

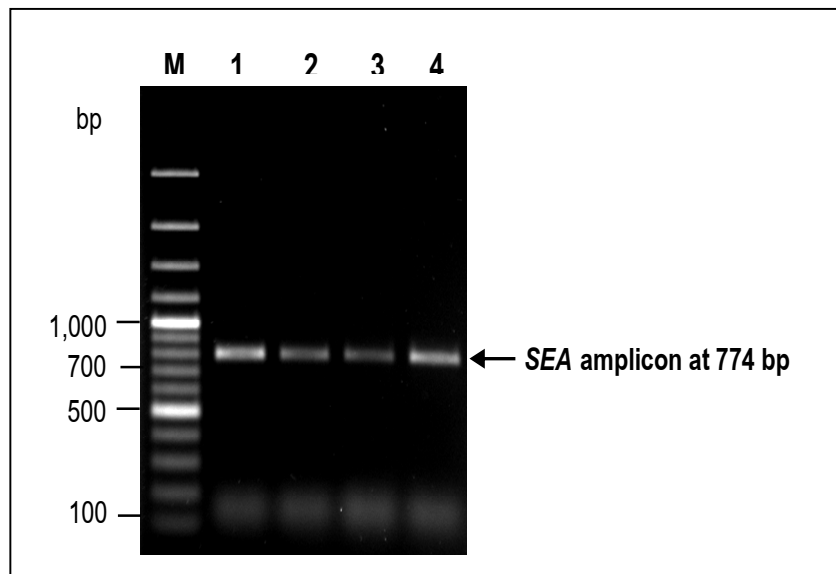
Ingredient	Volume (μ l)	Final concentration
Sterile ultra-pure distilled water (UDW)	16.8	-
PCR buffer (10x)	2.5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	1.5 mM
dNTP (2.5 mM each)	2.0	0.2 mM
FSEA_ <i>Bam</i> HI primer (20 μ M)	0.5	0.4 μ M
RSEA_ <i>Hind</i> III primer (20 μ M)	0.5	0.4 μ M
DNA template	1.0	-
DNA polymerase (5 units / μ l)	0.2	1.0 unit

B. Thermal cycles

First Denaturation	at 94°C for 5 minutes
30 Cycles of Denaturation,	at 94°C for 30 seconds
Annealing,	at 55°C - 58°C for 30 seconds
and Extension	at 72°C for 40 seconds
Final Extension	at 72°C for 7 minutes

ผลการทดลอง

ผู้วิจัยได้ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ Annealing ที่ให้ PCR amplicon มากที่สุด จากการทดสอบข้างต้นคือ 55°C เพื่อเพิ่มปริมาณ SEA gene ดังแสดงผลใน **รูปที่ 2.2**



รูปที่ 2.2 PCR product ที่ได้จากการใช้ genomic DNA ของเชื้อ *S. aureus* strain ATCC 13565 เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ SEA-coding sequence ในการ amplify gene ให้ได้ปริมาณมากพอ

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lanes 1-4, SEA amplicons at annealing temperature 55°C, 56°C, 57°C และ 58°C ตามลำดับ

วิเคราะห์โดย 1.2 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)

ลูกศรชี้ SEA gene amplicon ที่ขนาด 774 bp

- ทำการ clone amplicon เข้าสู่ cloning vector ตรวจสอบความถูกต้องของ gene insert ที่ตัดออกมาจาก cloning vector แล้ว subclone gene ดังกล่าวเข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม (กิจกรรมเดือนที่ 4-5)

ผู้วิจัยได้ทำการ clone SEA amplicon เข้าสู่ cloning vector และนำ recombinant vector เข้าสู่ *E. coli* host เพื่อเก็บเป็น gene stock ดังนี้

นำ amplified DNA ที่ได้มาเชื่อมต่อกับ cloning vector (pGem-T easy vector) โดยใช้ เอนไซม์ ligase และ incubated ที่ 4°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง นำ ligation mixture ไป transformed เข้าสู่ competent *E. coli* host cells โดยใช้วิธี heat-shock transformation จากนั้นนำ transformed *E. coli* preparation ไป spread บน selective agar plate (LB agar ที่เติม ampicillin) และ incubated ที่ 37°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง Screened หา transformed *E. coli* clones ที่ carry recombinant plasmid ที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ SEA gene พบว่า transformed *E. coli* ที่เลือกมา มี genes เป้าหมาย ทุก clones จากนั้นสกัด recombinant plasmid ออกจาก transformed *E. coli* clone โดยวิธี alkaline lysis และตรวจลำดับ nucleotides ด้วยการทำให้ DNA sequencing ทั้งนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของ PCR amplified-DNA sequence ว่าเป็น sequences ของ gene เป้าหมายจริง คือ SEA gene (รูปที่ 2.3)

- ทำการ transfect *E. coli* ด้วย expression vector และคัดเลือก transformant(s) ที่เหมาะสม (กิจกรรมเดือนที่ 5-6)

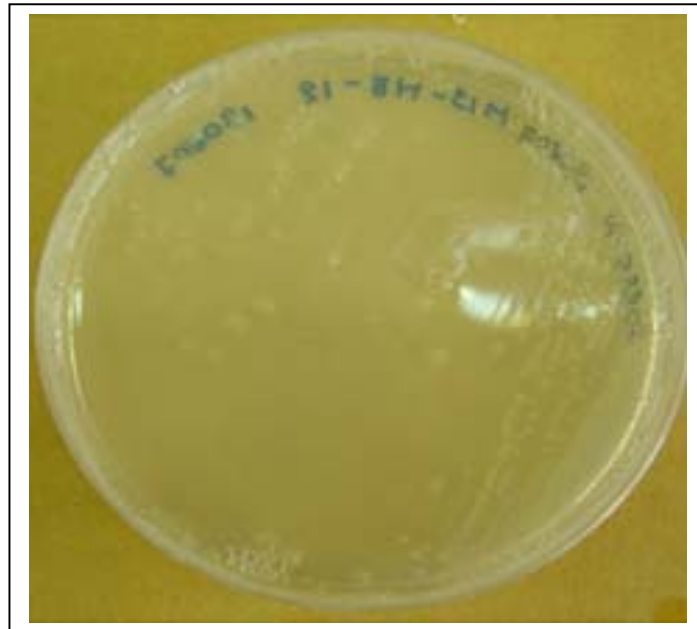
นำ recombinant plasmid จาก transformed clone ที่เลือกได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonucleases) ทำการ subclone เข้าสู่ pET23b+ vector (protein expression vector) (รูปที่ 2.4) จากนั้นนำ recombinant plasmids ไปใส่ใน competent *E. coli* เลือก *E. coli* transformants ที่เหมาะสม แล้วนำไปเพาะเลี้ยงพร้อมกับการ induced ให้สร้างโปรตีนเป้าหมาย (SEA) ต่อไป

```

atgaaaaaaaaacagcatttatattactttttattcattgccctaacggttgacaacaagtcca
M K K T A F I L L L F I A L T L T T S P
cttgtaaatggtagcgagaaaaagcgaagaaataaatgaaaaagatttgcgaaaaaagtct
L V N G S E K S E E I N E K D L R K K S
gaattgcagggaacagcctttaggcaatcttaaacaatctattattacaatgaaaaagct
E L Q G T A L G N L K Q I Y Y Y N E K A
aaaactgaaaaataaagagagtcacgatcaatttttacagcatactatattgtttaaaggc
K T E N K E S H D Q F L Q H T I L F K G
ttttttacagatcattcgtggtataacgatttattagtagattttgattcaaaggatatt
F F T D H S W Y N D L L V D F D S K D I
gttgataaatataaagggaaaaaagtagacttgtagtggtgcttattatgggttatcaatgt
V D K Y K G K K V D L Y G A Y Y G Y Q C
gcgggtggttacaccaaaaaaacagccttgtagtggtggtgtaacggttacatgataat
A G G T P N K T A C M Y G G V T L H D N
aatcgattgaccgaagagaaaaaagtgccgatcaatttatggctagacggtaaacaaaaat
N R L T E E K K V P I N L W L D G K Q N
acagtacctttggaaacggttaaaacgaataagaaaaatgtaactgttcaggagttggat
T V P L E T V K T N K K N V T V Q E L D
cttcaagcaagacggttattttacaggaaaaatataattttatataactctgatgtttttgat
L Q A R R Y L Q E K Y N L Y N S D V F D
gggaagggttcagaggggattaatcgtgtttcatacttctacagaaccttcggttaattac
G K V Q R G L I V F H T S T E P S V N Y
gattttatttgggtgctcaaggacagtattcaaatacactattaagaatatatagagataat
D L F G A Q G Q Y S N T L L R I Y R D N
aaaacgattaactctgaaaacatgcatattgatatatattttatatacaagt
K T I N S E N M H I D I Y L Y T S

```

รูปที่ 2.3 แสดง Nucleotide and deduced amino acid sequences of cloned sea



รูปที่ 2.4 แสดงผลการนำ recombinant plasmid ที่คัดเลือกได้ว่ามี sea insert เข้าสู่ protein expression host, *i.e.*, BL21DE3 *E. coli*

- ทำการ **express recombinant staphylococcal enterotoxin A protein (rSEA)** จาก **transformant(s)** และทำการ **purify โปรตีน (recombinant SEA protein)** (กิจกรรมเดือนที่ 6-7)

Induce การผลิต recombinant SEA protein ใน E. coli host

ในการเตรียม SEA recombinant protein ผู้วิจัยได้นำ *E. coli* clone ซึ่ง carry recombinant protein expression vector ซึ่งมี recombinant sea gene insert ไปเพาะเลี้ยงใน medium ที่เหมาะสมซึ่งมียาปฏิชีวนะผสมอยู่แล้ว incubated with shaking ที่ 37°C จนได้ log phase ของ *E. coli* culture จากนั้นเติม IPTG ลงไปเพื่อกระตุ้น *E. coli* cells ให้เกิดการ express โปรตีนที่ต้องการทำการเลี้ยง *E. coli* cells ต่อไปอีก 4 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ *E. coli* cells โดยการทำการปั่นที่ความเร็วรอบ 4,000 x g เป็นเวลา 20 นาที

สกัด recombinant SEA protein ออกจาก whole cell homogenate ของ E. coli cells

นำ *E. coli* pellet ที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง ultrasonic disintegrator ซึ่งจะเรียก preparation ที่ได้ว่า *E. coli* homogenate จากนั้นนำ *E. coli* homogenate ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 20 นาที นำโปรตีนที่ได้ทั้งสองส่วน คือ soluble fraction (lysate) และ insoluble fraction (โปรตีนจากการ solubilize pellet หรือ inclusion) ไปตรวจสอบหา recombinant protein โดยใช้วิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis โดยผู้วิจัยพบว่า recombinant SEA protein สามารถตรวจสอบได้ในส่วนของ inclusion

การ Purify recombinant protein ออกจาก E. coli homogenates โดยใช้ affinity resin

ผู้วิจัยทำการ purify recombinant SEA protein โดยใช้ affinity resin และสามารถ purify recombinant SEA protein ซึ่งมีขนาดประมาณ 65 kDa ออกจากโปรตีนอื่นๆ ของ *E. coli* ได้ ดังแสดงใน **รูปที่ 2.5** ซึ่งผู้วิจัยจะทำการ identify โปรตีนนี้ด้วยวิธี mass spectrometry

การเตรียม SDS polyacrylamide gel

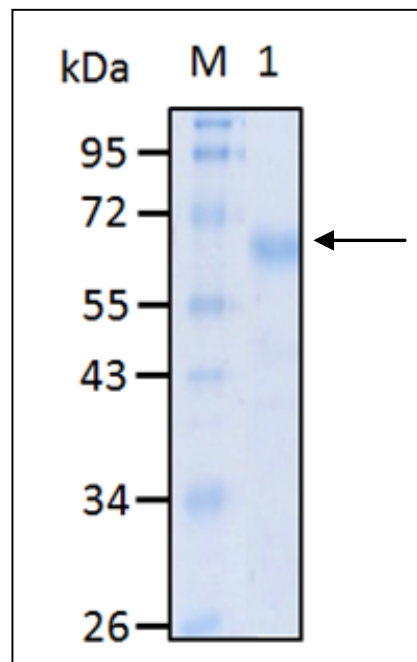
เจลที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Stacking gel สำหรับเติมโปรตีนลงในเจล และ Separating gel สำหรับการแยกโปรตีนในเจลด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Components	Separating gel	Stacking gel
Acrylamide stock (30%)	16.0 ml	1.62 ml
Tris- HCl/SDS pH 8.45	10.0 ml	3.2 ml
Autoclaved dH ₂ O	0.64 ml	7.78 ml
Glycerol	3.2 ml	-
Ammonium persulfate (10%)	150 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

สำหรับเตรียม polyacrylamide gel ได้ 4 แผ่น (ขนาด 7 cm x 10 cm)

การเตรียมตัวอย่าง

นำ Recombinant SEA protein ที่เตรียมได้จำนวน 5 ไมโครกรัม ผสมกับ 4X SDS sample buffer 10 ไมโครลิตร แล้วต้มสารละลายนี้ที่อุณหภูมิ 95°C เพื่อ denature โปรตีน นำตัวอย่างที่เตรียมแล้วเติมลงในเจลที่เตรียมไว้ แล้วทำการแยกโปรตีนโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Tris- HCl, pH 8.45 กระแสไฟฟ้าที่ 50 milliAmpares นาน 60 นาที จากนั้นแช่เจลใน fixative buffer นานประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) แล้ว destained สีส่วนเกินออก ซึ่งพบว่า recombinant SEA protein ที่เตรียมได้มีขนาดประมาณ 65 kDa ดังแสดงใน **รูปที่ 2.5**



รูปที่ 2.5 SDS-PAGE pattern ของ affinity column purified-recombinant SEA ที่เตรียมจาก transformed *E. coli* ย้อมด้วยสี CBB
Lane M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range
Lane 1, SDS-PAGE pattern ของ recombinant SEA (SEA at ~ 65 kDa; arrow)
ตัวเลขด้านซ้ายมือคือ Protein molecular weights เป็น kDa

- ทำ Bio-panning เพื่อคัดเลือก phages ที่ display ScFv ที่มีความจำเพาะต่อ recombinant SEA antigen (กิจกรรมเดือนที่ 8-9)

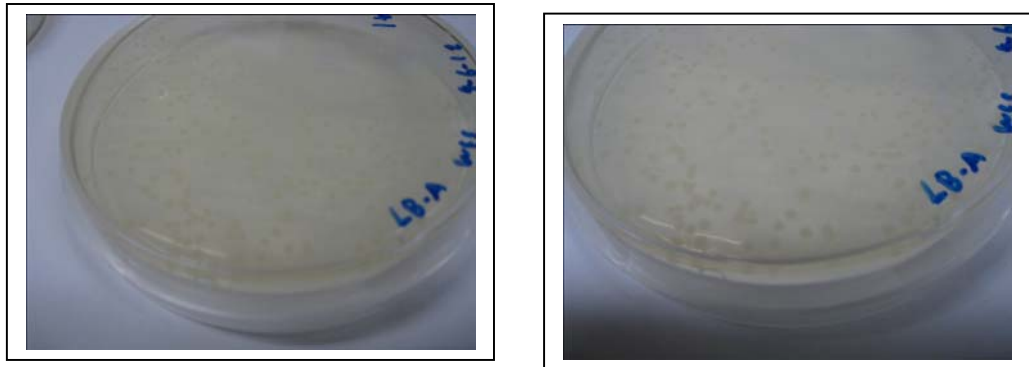
ผู้วิจัยนำ Purified recombinant SEA ที่ผลิตได้และ verified ด้วย LC-MS/MS แล้วว่าเป็น SEA จริง ไปใช้เป็นแอนติเจนเพื่อคัดเลือกฟาจที่แสดงแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนี้ บนผิวของฟาจด้วยวิธี Biopanning ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

การตรึงแอนติเจน

เริ่มจาก นำ purified recombinant SEA antigen ที่เตรียมได้ในข้างต้นมาละลายใน coating buffer ให้แอนติเจนมีความเข้มข้น 2 µg/100 µl แล้วตรึงบนผิวของ ELISA plate โดยเติมสารละลายดังกล่าว 100 µl/หลุม เก็บไว้ที่ 4°C นาน 12-18 ชั่วโมง หลังจากล้างหลุมเพื่อกำจัด unbound antigen ด้วย washing buffer (PBS-T) แล้วทำการ block พื้นผิวหลุมที่ไม่มีแอนติเจนตรึงอยู่โดยการเติม 100 µl 3% BSA แล้วเก็บไว้ที่ 37°C นาน หนึ่ง ชั่วโมง แล้วล้างหลุมดังกล่าวด้วย washing buffer

Bio-panning

นำ human antibody phage library (Kulkeaw et al., J Proteomics 2009) ใส่ลงในหลุม ELISA plate ข้างต้น แล้วเก็บไว้ที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างหลุมดังกล่าวด้วย washing buffer ซึ่ง phages ที่มี HuScFv จำเพาะต่อ purified recombinant SEA จะจับกับ purified recombinant SEA ที่ถูกตรึงไว้ในหลุมของ ELISA plate ส่วน phages ที่ไม่จับกับ purified recombinant SEA ได้ถูกกำจัดออกโดยการล้างหลายๆครั้ง จากนั้นเติม log phage *E. coli* HB2151 ซึ่งเป็น expression host แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เพื่อให้ phage ที่มีความจำเพาะดังกล่าว infect เข้าเชื้อ *E. coli* จากนั้นทำการคัดเลือก phagemid infected HB2151 *E. coli* โดยนำเชื้อ phagemid infected HB2151 *E. coli* ไป spread บน agar plate ที่มียา ampicillin ผสมอยู่ใน agar แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง แล้วอ่านผล โดยเชื้อ infected *E. coli* ซึ่งมี phage ที่จำเพาะที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจะสามารถเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารดังกล่าวได้ดังแสดงในรูปที่ 2.6 จากนั้นสุ่มคัดเลือกโคลนของ phagemid infected *E. coli* จำนวน 300 โคลนเพื่อตรวจสอบหายีน HuScFv ในกิจกรรมต่อไป



รูปที่ 2.6 Phagemid transformed HB2151 *E. coli* ที่ถูก infected ด้วย SEA-bound phage clones ที่ได้มาจากการทำ bio-panning สามารถเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารคัดเลือกได้

- Amplification of human *scfv* (*husc fv*) (กิจกรรมเดือนที่ 10-11)

นำ phagemids infected HB2151 *E. coli* ที่คัดเลือกได้ไปเพิ่มจำนวนโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ ampicillin ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วทำการสกัด phagemids ดังวิธีข้างต้น นำ phagemid ที่เตรียมได้ไปตรวจสอบหา *huscfv* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสจำเพาะต่อ phagemid คือ primers R1 และ R2 (Kulkeaw et al., 2009) และทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาและสภาวะดังต่อไปนี้

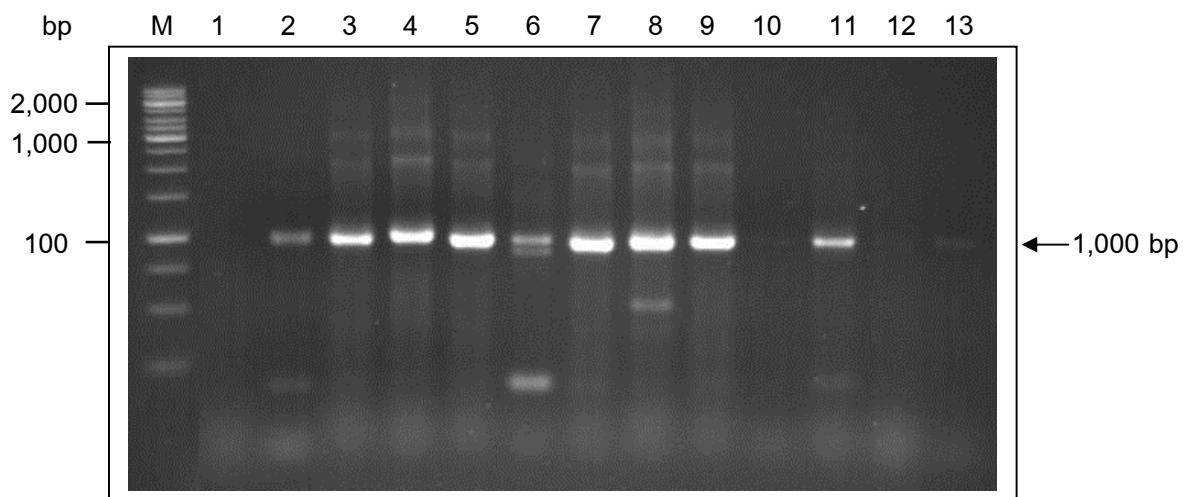
A. PCR mixture (25 μ l)

Ingredient	Volume (μl)	Final concentration
Sterile ultra-pure distilled water	16.8	-
(UDW)	2.5	1x
PCR buffer (10x)	1.5	1.5 mM
MgCl ₂ (25 mM)	2.0	0.2 mM
dNTP (2.5 mM each)	0.2	0.4 μM
Forward primer <i>R1</i> (50 μM)	0.	0.4 μM
Reverse primer <i>R2</i> (50 μM)	1.0	-
DNA template	0.2	1.0 unit
DNA polymerase (5 units / μl)		

B. Thermal cycles

First Denaturation	at 94°C for 5 minutes
30 Cycles of Denaturation,	at 94°C for 1 minute
Annealing,	at 55°C for 2 minutes
and Extension	at 72°C for 2 minutes
Final Extension	at 72°C for 10 minutes

ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis แล้วทำการย้อมเจลที่ได้ด้วย ethidium bromide และสังเกตแถบดีเอ็นเอด้วย UV illuminator ดังแสดงในรูปที่ 2.7 จากการสุ่มคัดเลือก phagemid infected *E. coli* จำนวน 300 โคลนเพื่อตรวจสอบหายีน HuScFv พบว่ามี phagemid infected *E. coli* จำนวน 32 โคลน มียีน HuScFv ซึ่งโคลนเหล่านี้จะนำไปทดสอบความสามารถในการผลิต HuSvFv ในกิจกรรมต่อไป



รูปที่ 2.7 แสดงผลการเพิ่มจำนวน *huscfv* ใน phagemid infected HB2151 *E. coli*

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lanes 1-13, *huscfv* amplicon จากตัวอย่างโคลนที่สุ่มเลือก

วิเคราะห์โดย 1.0 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)

ลูกศรชี้ *huscfv* amplicon ที่ขนาด 1,000 bp

- คัดเลือก infected *E. coli* cells ที่สามารถผลิต HuScFv ที่จำเพาะต่อ recombinant SEA ด้วยเทคนิค Western blot analysis (กิจกรรมเดือนที่ 10-11)

ผู้วิจัยทำการคัดเลือกโคลน phagemid infected HB2151 *E. coli* ที่สามารถผลิต HuScFv ที่จำเพาะต่อ recombinant SEA โดยมีขั้นตอนดังนี้

การเหี่ยวนำการผลิต Human ScFv

Pick single colony ของ infected HB2151 *E. coli* ที่คัดเลือกแล้วจากกิจกรรมข้างต้น ใส่ลงใน 2x YT-AG medium (100 mg/ml penicillin และ 2 M glucose) ปริมาตร 0.5 ml แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ขำคินโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm นำ overnight culture 0.5 ml เติมลงใน 50 ml fresh 2x YT-AG medium แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm ปั่นตกตะกอน bacterial cells ด้วย ความเร็ว 3,500x g ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 นาที ละลาย bacterial cells ด้วย 50 ml 2x YT-AI medium (100 mg/ml penicillin และ 0.5 mM IPTG) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm ปั่นตกตะกอน bacterial cells ด้วย ความเร็ว 3,500x g ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 นาที ละลาย bacterial cells ด้วย 0.75 ml sterile distilled water แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ปั่นตกตะกอนกากเซลล์ (debris) ด้วยความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เก็บน้ำส่วนใส (whole cell lysate) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

ตรวจหาโปรตีน HuScFv ด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blot analysis

นำ whole cell lysate ที่เตรียมได้จาก phagemid infected *E. coli* HB2151 มาทำการคัดเลือกไปแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนจากเจล (Acrylamide gel) ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose, NC) ด้วยสนามไฟฟ้า แล้วทำการ block พื้นที่ว่างบน NC โดยจุ่มแผ่น NC ลงในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ที่มีส่วนผสมของ 5% skim milk (blocking buffer) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเอา skim milk ออกด้วย PBS ที่มีส่วนผสมของ Tween-20 (PBS-T) ความเข้มข้น 0.05% (washing buffer) หนึ่ง ครั้ง จากนั้นจุ่ม NC ลงใน mouse anti-E-Tag mAb (จับกับ E-tag ที่ C-terminal ของ HuScFv) ที่เจือจาง 1:3,000 ใน washing buffer แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่น NC สามครั้งด้วย washing buffer ครั้งละ 5 นาที จากนั้นเติม goat-anti-mouse immunoglobulin-alkaline phosphatase conjugate ที่ dilution 1:3,000 แล้วเก็บกล่องไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่น NC สามครั้งด้วย washing buffer ครั้งละ 5 นาที

จากนั้น incubate แผ่น NC กับ BCIP/NBT phosphatase substrate (KPL) ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่น NC ด้วยน้ำกลั่น

จากการทดสอบพบว่า HuScFv ที่เตรียมได้มีขนาดประมาณ 34 kDa ดังแสดงใน **รูปที่ 2.8** และจาก phagemid infect HB2151 *E. coli* จำนวน 32 โคลน พบว่ามีโคลนจำนวน 2 โคลนที่สามารถผลิต HuScFv ได้ คือ clones no. B1 และ B6 ซึ่ง phagemid infect HB2151 *E. coli* ทั้งสองโคลนได้นำไปศึกษาความหลากหลายของ *huscfv* ในกิจกรรมต่อไป

- การศึกษาความหลากหลายของ *huscfv* ใน transformed HB2151 *E. coli* ด้วยเทคนิค

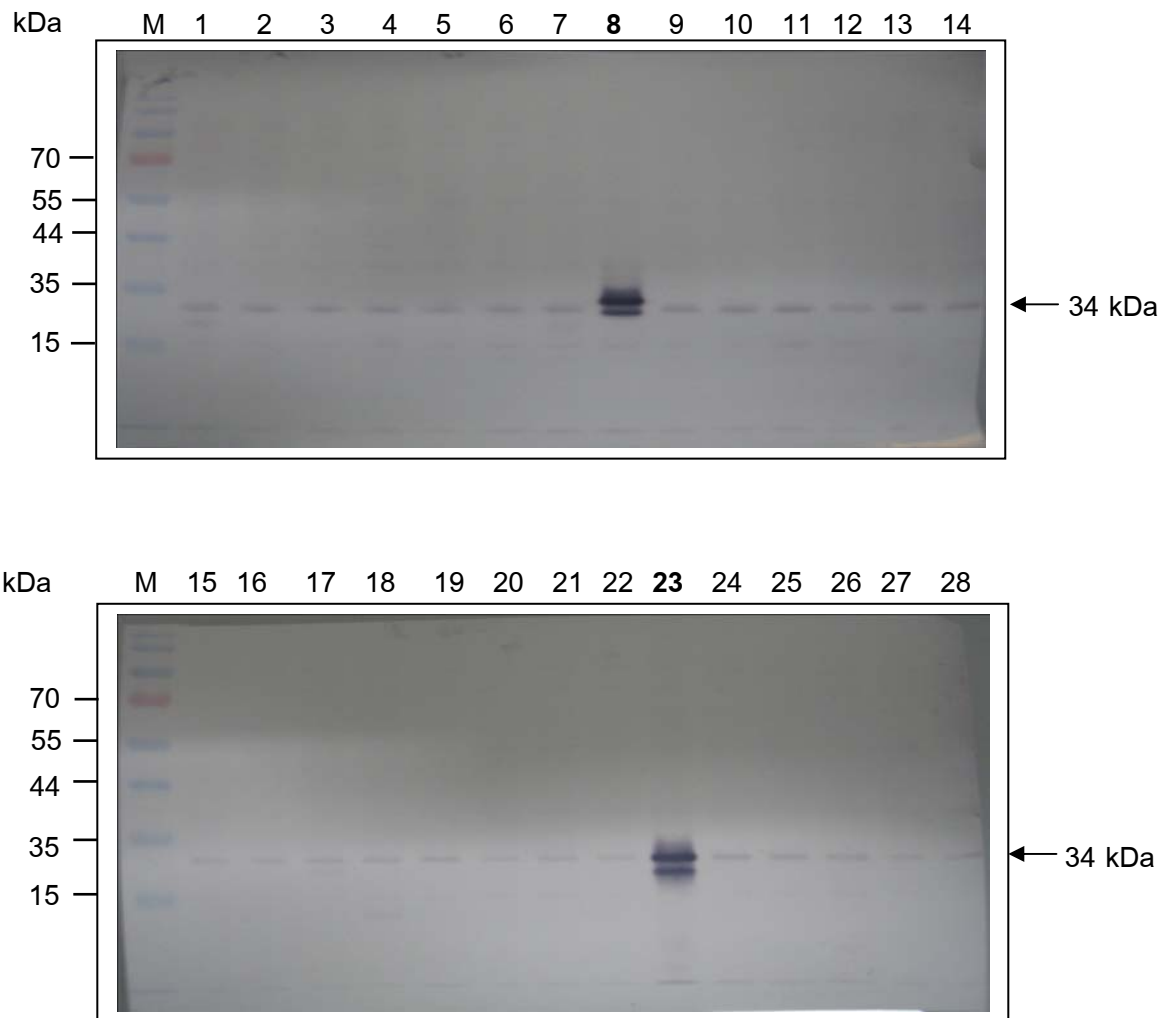
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (กิจกรรมเดือนที่ 11-12)

ทำการสกัด phagemids จากโคลนที่คัดเลือกได้จำนวน 2 โคลนข้างต้นไปเพิ่มจำนวนยีน *huscfv* ด้วยเทคนิค PCR ดังข้างต้น จากนั้น นำ *huscfv* PCR product ที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ fast digest *MvaI* restriction endonucleases ดังปฏิกิริยาข้างล่าง

Fast digest reaction mixture: for one reaction/30 µl

Fast digest buffer (10x)	2.0 µl
FastDigest® <i>MvaI</i>	1.0 µl
PCR product	10.0 µl
Distilled water	17.0 µl

นำส่วนผสมดังกล่าวไป Incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาประมาณ 10 นาที แล้ววิเคราะห์ความหลากหลายของ digested PCR product ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) *huscfv* PCR product ของเชื้อแต่ละโคลนมาย่อยด้วยเอนไซม์ *MvaI* แล้ววิเคราะห์ DNA band pattern ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า selected *huscfv*-phagemids แต่ละทั้ง 2 โคลนมี DNA band pattern ที่แตกต่างกัน (**รูปที่ 2.9**) แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของ *huscfv* ซึ่งอาจมีผลต่อการ neutralize SEA ด้วย โคลน phagemid infected HB2151 *E. coli* ทั้งสองโคลนไปใช้ในการเตรียม HuScFv ต่อไป



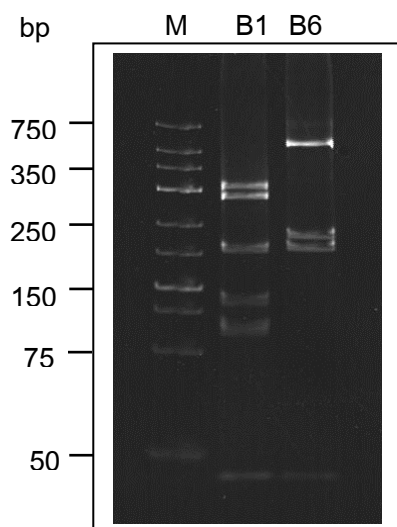
รูปที่ 2.8 Western blot analysis เพื่อวิเคราะห์หา *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* clones ที่สามารถ express HuScFv ได้

Lane M, Pre-stained SDS-PAGE Standards Broad Range

Lanes 1 - 28, SDS-PAGE-separated patterns of representatives of *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* probed with mouse monoclonal anti-E tag

พบว่ามีเพียง 2 clones ที่ผลิต HuScFv (~34 kDa) ได้คือ clones no. B1 (lane 8) และ B6 (lane 23)

ตัวเลขด้านซ้ายมือคือขนาดของโปรตีน เป็น kDa



รูปที่ 2.9 DNA banding patterns for determining RFLP of *M*vaI-cut *huscfv* sequences amplified from recombinant phagemids infected HB2151 *E. coli* clones no. B1 and B6

Lane M, Pre-stained SDS-PAGE Standards Broad Range

Lanes 1 and 2, DNA banding patterns ของ *huscfv* of clones no. B1 and B6, respectively

ตัวเลขด้านซ้ายมือคือ DNA sizes in bp

- ทำการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ recombinant SEA จากเซลล์
แบคทีเรียซึ่งถูก infect ด้วย phages ที่คัดเลือกได้ (กิจกรรมเดือนที่ 13-18)

Subclone amplified HuScFv gene เข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม

นำ Recombinant plasmid จาก transformed *E. coli* clones ที่เลือกได้ไปตัดด้วย เอนไซม์ *SfiI* และ *NotI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonucleases) ทำการ subclone เข้าสู่ pET23b+ vector (protein expression vector) ตรวจสอบความถูกต้องโดยวิธี DNA sequencing (รูปที่ 2.10) จากนั้นนำ recombinant plasmid ไปทำการ induce ให้สร้าง โปรตีนเป้าหมายต่อไป

Induce การผลิต HuScFv ใน *E. coli* host

นำ *E. coli* clones ซึ่ง carry recombinant protein expression vector ที่มี recombinant HuScFv gene insert ไป grow ใน medium ที่เหมาะสม และ induced recombinant protein expression ดังนี้

นำ *E. coli* clones ซึ่ง carry recombinant protein expression vector ที่มี recombinant gene insert ไป grow ใน medium ที่เหมาะสมซึ่งมียาปฏิชีวนะผสมอยู่แล้ว incubated with shaking ที่ 37°C จนได้ log phase ของ *E. coli* culture จากนั้นเติม IPTG ลงไปเพื่อกระตุ้น *E. coli* cells ให้เกิดการ express โปรตีนเป้าหมายที่ต้องการ ทำการเลี้ยง *E. coli* cells ต่อไปอีก 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ *E. coli* cells โดยการทำการปั่นที่ความเร็วรอบ 4,000 xg เป็นเวลา 20 นาที

สกัดโปรตีน เป้าหมายออกจาก whole cell homogenate ของ *E. coli* cells

นำ *E. coli* pellet ที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง ultrasonic disintegrator ซึ่งจะ เรียก preparation ที่ได้ว่า *E. coli* homogenate จากนั้นนำ *E. coli* homogenate ไปปั่นที่ ความเร็วรอบ 12,000 xg เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกโปรตีนส่วนเป็น soluble portion (supernatant) ออกจากส่วนที่เป็น insoluble portion (pellet) นำโปรตีนที่ได้ทั้งสองส่วนไป ตรวจสอบหา recombinant protein โดยใช้วิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis

จากผลของ SDS-PAGE และ Western blot analysis ผู้วิจัยพบว่า HuScFv protein อยู่ใน insoluble portion จึงนำมาทำการ purify ในขั้นตอนต่อไป

- ทำการ **purify** แอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการด้วยเทคนิคที่เหมาะสม
(กิจกรรมเดือนที่ 13-18)

การ purify recombinant protein ออกจาก *E. coli* homogenate โดยใช้ Ni-NTA affinity column

ผู้วิจัยพบว่า *E. coli* cells ได้ express HuScFv อยู่ในส่วน insoluble portion ของ *E. coli* homogenate ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำโปรตีนในส่วนดังกล่าวไปทำการ refold หลังจากนั้นจึง purify โดย Ni-NTA affinity column และสามารถ purify HuScFv protein ออกจากโปรตีนต่างๆ ของ *E. coli* ได้ ซึ่ง specific HuScFv ที่ผลิตขึ้นนี้จะนำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ Staphylococcal enterotoxin A (rSEA) ของเชื้อ *S. aureas*

VH					
FW1		CDR1	FW2	CDR2	FW3
SEA-ScFv-1: EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKAS		GYTFTSYG	ISWVRQAPGGGLEWMGW	ISAYNGDT	DYVQKYQGRVTMTDPSTSTAFMELRSLKSDDTAVYFC
SEA-ScFv-2: QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKAS		GYSFTAYY	IQWVRQAPGGGLEWMGW	INPNSSGT	NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRVSDDTAVYYC
CDR3		FW4			
SEA-ScFv-1: ARSSSAKNDV		WGHGTTIVTVSS	IGHV1		
SEA-ScFv-2: ARDPLEYELEFDF		WGQGTILVTIVSS	IGHV1		
VL					
FW1		CDR1	FW2	CDR2	FW3
SEA-ScFv-1: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS		QSVSNS	LAWYQQRPGQPIRLLIY	DAS	DRATGIPARFSGSGSGSDFTLTISSELPEDFAVYYC
SEA-ScFv-2: TIQMTQSPSAMSASVGRVTITCRAS		QSIISNY	LNWYQKSGKAPKLLIH	KAS	NLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDVATYYC
CDR3		FW4			
SEA-ScFv-1: QQRVRWPWT		FGQGTKVDIK	IGKV3		
SEA-ScFv-2: QRYNSAPPT		FGQGTKVEIK	IGKV1		

รูปที่ 2.10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ CDR1, CDR2 และ CDR3 ของ scFv clone no. 1 (B1) และ 2 (B6)

- ทำการทดสอบความสามารถของ recombinant SEA ของเชื้อ *S. aureus* ที่ผลิตได้ในการกระตุ้นการหลั่ง Proliferative cytokines ของ lymphocyte ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ใน *in vitro* assay (กิจกรรมเดือนที่ 17-24)

เนื่องจาก SEA มีคุณสมบัติเป็น “Superantigen” ซึ่งสามารถกระตุ้น $CD4^+$ T lymphocyte จำนวนมากในกระแสเลือด โดย SEA สามารถจับกับ variable region ของ T lymphocyte receptor สายบีตา (β -chain of TCR) โดยตรง และขณะเดียวกันก็จับกับ α -helix ของโมเลกุล MHC class II บนผิวของ antigen presenting cell พร้อมๆกัน มีผลทำให้ T lymphocytes ที่ถูกกระตุ้นหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) IL-2 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนของ T lymphocytes ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte นั้นๆ (เอกสารอ้างอิง 1-8) ดังนั้นในการทดลองการศึกษาความสามารถของ recombinant SEA ที่ผลิตได้ สามารถทำโดยกระตุ้น T lymphocyte cells ใน human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs) ด้วย rSEA ที่เตรียมได้ แล้วทำการตรวจวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยการตรวจวัดการแสดงออกของยีน IL-2, IFN- γ โดยเทคนิค Real-time PCR

การเตรียม Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

ทำการเจาะเลือดจำนวน 20 ml จากผู้บริจาคเลือดจำนวน 3 ราย (pool human peripheral blood จำนวน 60 ml) มาปั่นแยกส่วน buffy coat ซึ่งเป็นส่วนที่มี PBMCs แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย Trypan blue assay

การทดสอบหาปริมาณ rSEA ที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน PBMCs

นำ hPBMCs จำนวน 1.0×10^5 เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ supplemented ด้วย 5% fetal bovine serum (FBS) และ antibiotic ใน 6 well tissue culture plate แล้วเติม rSEA ปริมาณ 0.001, 0.010, 0.100, 1.000, 10.000 $\mu\text{g/ml}$ ลงในหลุมที่เพาะเลี้ยง hPBMCs การทดลองนี้มีกลุ่ม Positive control คือหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เติม 1.0 $\mu\text{g/ml}$ PHA และกลุ่ม Negative control คือ กลุ่มที่เติม *E. coli* lysate ที่ใช้ผลิต rSEA จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นเพาะเลี้ยงที่ภาวะ 37°C , 5% CO_2 , humidified เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ที่ถูกกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์

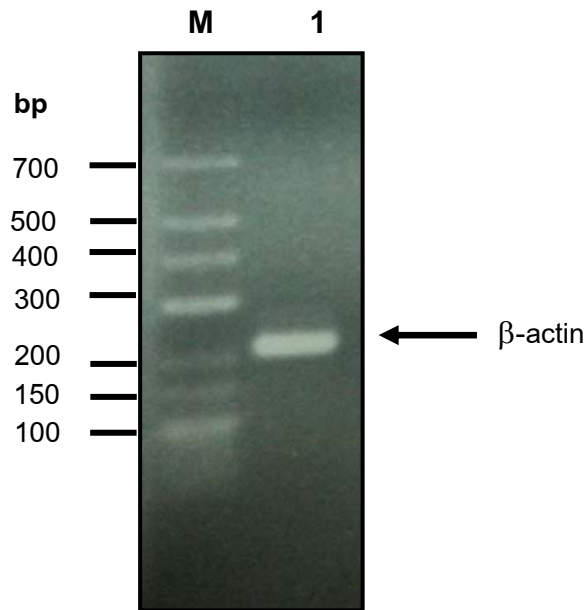
การสกัด total RNA, converted cDNA และการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR

นำ hPBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย rSEA จากการทดลองข้างต้นมาปั่นตกที่ความเร็วรอบ 60-100 $\times g$ เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วปั่นล้างเซลล์ที่ความเร็วรอบ 60-100 $\times g$ เป็นเวลา 10 นาที เติม lysis solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 400 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำ cell suspension ใส่ลงใน purification column ที่ใส่ไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ย้าย purification column ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม wash solution

ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เติมน DNase solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นเติมน DNase Wash Solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างอีก 1 ครั้ง แล้วย้าย column ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติมน elution solution ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที total RNA จะอยู่ในส่วนน้ำใสในหลอดทดลอง ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เมื่อพบว่า total RNA มีคุณภาพดีตามต้องการ จึงนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา Revert AidTM H Minus First Strand cDNA synthesis (Fermentas) ซึ่งประกอบด้วยการเตรียม PCR mixture และ Thermal cycles ดังต่อไปนี้

Ingredient	Volume (μl)
5X Reaction Buffer	4
10 mM dNTP (each)	2.0
Oligo primer	1.0
RiboLock RNase Inhibitor	1.0
Template RNA	5.0 (3 μg)
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase	1.0
DEPC water	6.0

นำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที นำ cDNA ที่เตรียมขึ้นมาตรวจสอบคุณภาพโดยการ amplify house keeping gene ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ β -actin gene ในการทดสอบ พบว่าสามารถ amplify β -actin gene (ขนาดประมาณ 250 bp) ได้จาก cDNA ที่เตรียมขึ้น (รูปที่ 2.11) ผู้วิจัยจึงใช้ cDNA ที่เตรียมขึ้นในการวิเคราะห์การแสดงออกของไซโตไคน์ IL-2, IFN- γ ที่มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนเซลล์ PBMCs ด้วยวิธี Real-time PCR ต่อไป



รูปที่ 2.11 PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ human β -actin-coding sequence ในการ amplify gene เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ cDNA ที่ผลิตขึ้น

Lane M, Low range DNA marker

Lanes 1, human β -actin amplicon

วิเคราะห์โดย 1 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)

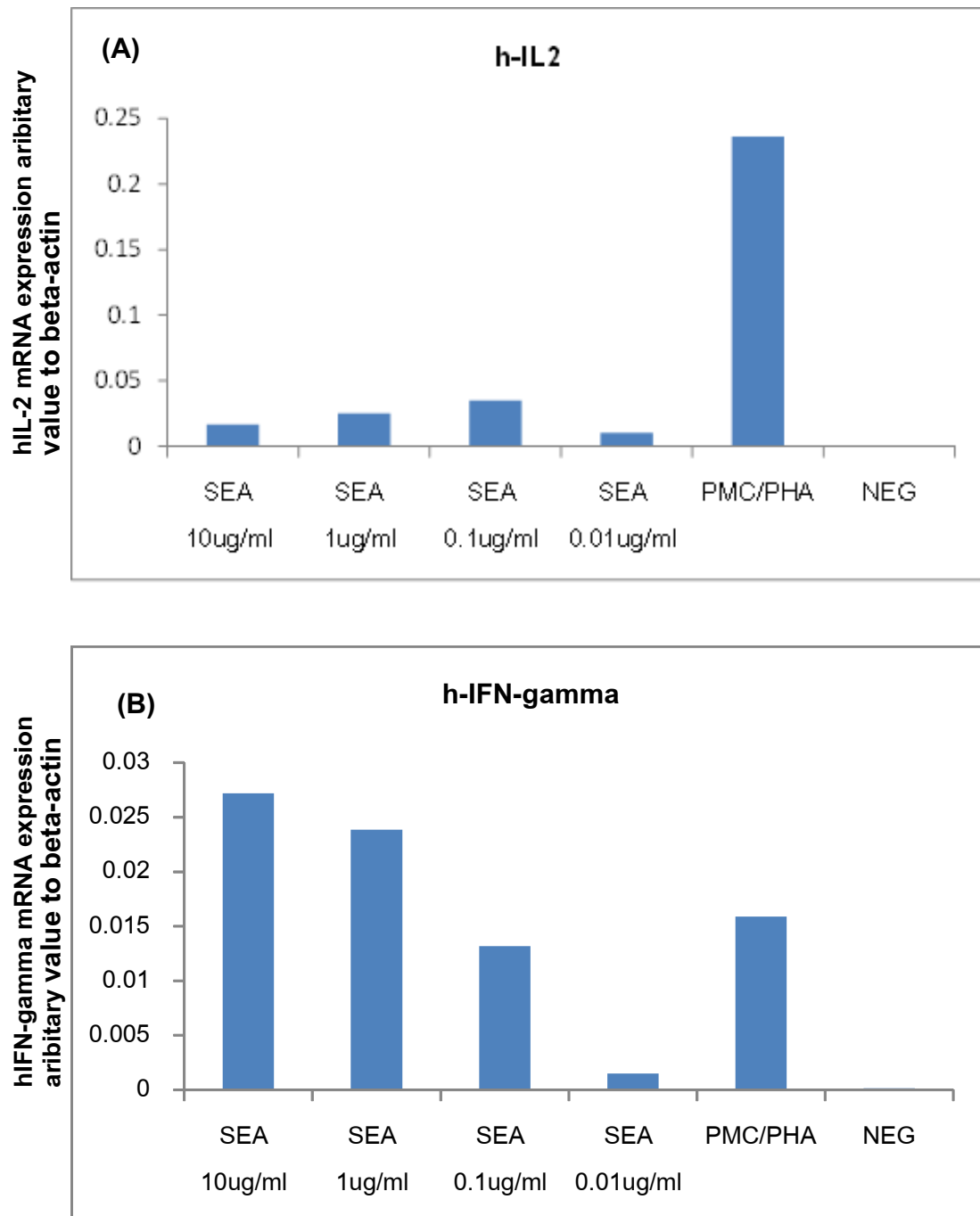
ลูกศรชี้ β -actin gene amplicon ที่ขนาด 250 bp

การวิเคราะห์การแสดงออกของไซโตไคน์ IL-2, IFN- γ ด้วยวิธี Real-time PCR

ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ hPBMCs เช่น IL-2, IFN- γ โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนดังกล่าวกับยีน β -actin การวิเคราะห์ดังกล่าวใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนดังนี้

Gene	Sequence (5'-3'):
IL-2 forward	TCA CCA GGA TGC TCA CAT TTA AGT
IL-2 reverse	GAG GTT TGA GTT CTT CTT CTA GAC ACT GA
IFN-gamma forward	CTA ATT ATT CGG TAA CTG ACT TGA
IFN-gamma reverse	ACA GTT CAG CCA TCA CTT GGA
β -actin forward	CAT CGA GCA CGG CAT CGT CA
β -actin reverse	TAG CAC AGC CTG GAT AGC

ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของแต่ละยีนโดยนำ cDNA ที่เตรียมได้ ปริมาตร 1 μ l มาเพิ่มจำนวนยีนดังข้างต้น ที่สภาวะ 95 °C นาน 10 นาที และ 40 cycles ของ 95 °C for 30 วินาที และ 56 °C for 30 นาที ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่าการแสดงออกของยีน IL-2 และ IFN- γ ของ PBMCs มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อทำการกระตุ้นด้วย rSEA ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ng (รูปที่ 2.12) ดังนั้นจึงเลือก rSEA ที่ความเข้มข้น 100 ng ทำการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte cel ใน hPBMCs สำหรับการทดสอบ neutralization ของ specific ScFv ที่เตรียมได้ต่อ rSEA ในการทดลองต่อไป

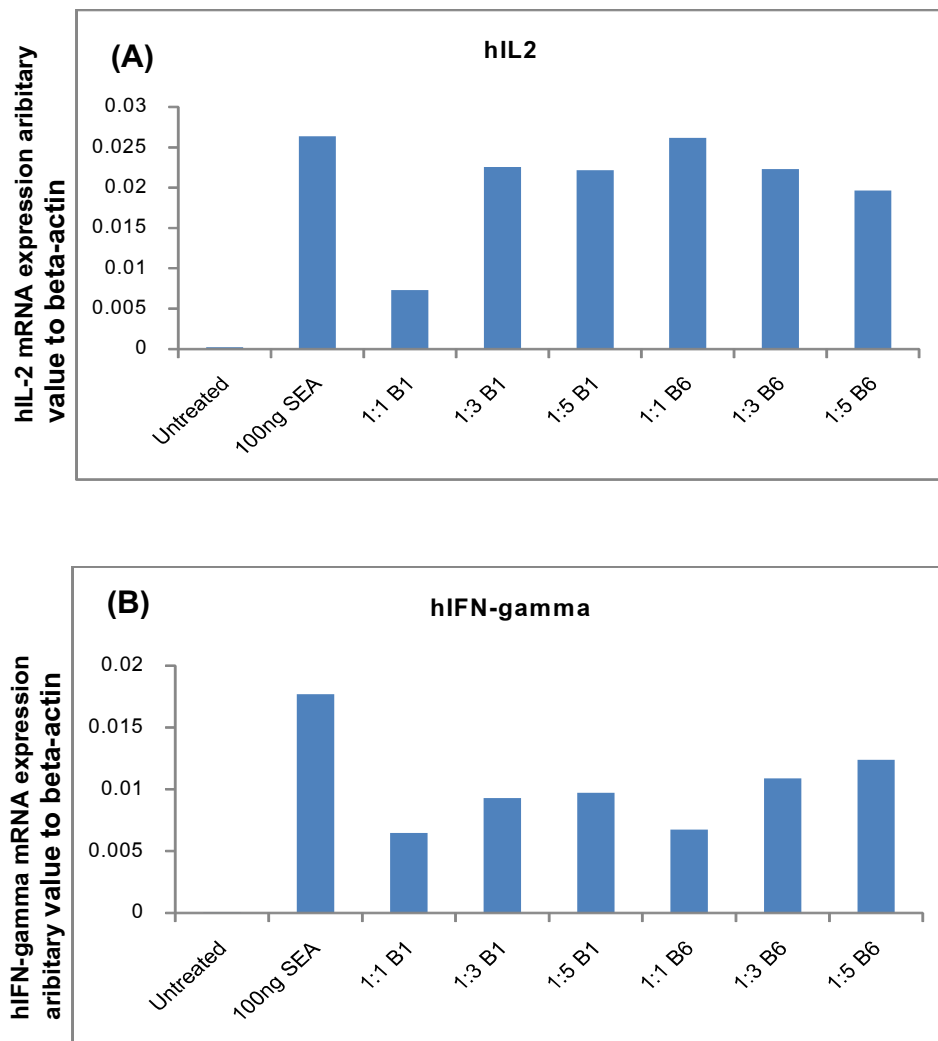


รูปที่ 2.12 กราฟการแสดงออกของยีน IL-2 (A) และ IFN- γ (B) ใน hPBMCs ที่ถูกกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วย rSEA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- ทำการทดสอบความสามารถของ **specific ScFv** ในการยับยั้ง **activity** ของ **rSEA** ของเชื้อ **S. aureus** ที่ผลิตได้ ด้วยวิธี **Inhibition of PBMCs proliferation** (กิจกรรมเดือนที่ 22-24)

การทดสอบประสิทธิภาพของ human ScFv antibody ในการยับยั้งพิษของ rSEA จากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทำโดยศึกษาประสิทธิภาพของ human ScFv antibody ในการยับยั้ง rSEA ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ lymphocyte ใน PBMCs (Inhibition of PBMCs proliferation) โดยนำ hPBMCs จำนวน 1.0×10^5 เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ supplemented ด้วย 5% fetal bovine serum (FBS) และ antibiotic ใน 6 well tissue culture plate แล้วเตรียม rSEA ปริมาณ 1.00 µg/ml ผสมกับ ScFv จากแต่ละโคลนในอัตราส่วน 1:1, 1:3 และ 1:5 นำส่วนผสมดังกล่าวมา incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที แล้วเติมลงในหลุมที่เพาะเลี้ยง hPBMCs การทดลองนี้มีกลุ่ม Positive control คือ หลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เติม 1.0 µg/ml PHA และกลุ่ม Negative control คือ กลุ่มที่เติม *E. coli* lysate ที่ใช้ผลิต rSEA แล้วนำเซลล์ไปบ่มเพาะเลี้ยงที่ภาวะ 37°C, 5% CO₂, humidified เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ที่แล้วตรวจสอบความสามารถ ScFv ในการยับยั้งการ activity ของ rSEA โดยวิเคราะห์จากการแสดงออกของยีน IL-2 และ IFN-γ ด้วยเทคนิค Real-time PCR ดังวิธีข้างต้น

จากผลการวิเคราะห์พบว่า recombinant SEA ที่ผสมกับ human ScFv antibody clone no. B1 ในอัตราส่วน 1:1 มีการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-2 และ IFN-γ ของ hPBMCs ลดลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย 100 ng rSEA เพียงอย่างเดียว หรือ ScFv + rSEA ที่อัตราส่วนอื่นๆ หรือ ScFv clone no. B6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า human ScFv antibody clone no. B1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งพิษของ rSEA ได้ดีโดยมีประสิทธิภาพเมื่อ rSEA ต่อ ScFv clone no. B1 ที่อัตราส่วน 1:1 (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 Inhibition of PBMCs proliferation: กราฟการแสดงออกของ IL-2 (A) และ IFN- γ (B) ใน hPBMCs ที่ถูกกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วย rSEA ที่ความเข้มข้น 100 ng และ rSEA ที่ถูก neutralized ด้วย rSEA ต่อ ScFv clone no.B1 และ B6 ที่อัตราส่วนต่างๆ

Bar 1; Untreated group = Cultured PBMCs

Bar 2; 100 ng SEA = PBMCs ถูกกระตุ้นด้วย 100 ng rSEA

Bar 3; 1:1 B1 = rSEA ต่อ ScFv clone no.B1 ที่อัตราส่วน1:1

Bar 4; 1:3 B1 = rSEA ต่อ ScFv clone no.B1 ที่อัตราส่วน1:3

Bar 5; 1:5 B1 = rSEA ต่อ ScFv clone no.B1 ที่อัตราส่วน1:5

Bar 6; 1:1 B1 = rSEA ต่อ ScFv clone no.B6 ที่อัตราส่วน1:1

Bar 7; 1:3 B1 = rSEA ต่อ ScFv clone no.B6 ที่อัตราส่วน1:3

Bar 8; 1:5 B1 = rSEA ต่อ ScFv clone no.B6 ที่อัตราส่วน1:5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

staphylococcal enterotoxin A (SEA) คือสารพิษที่เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* สร้างขึ้น ซึ่งเป็นสารพิษที่ทนทานต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีมาก เช่นทนความร้อน (พิษไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน) และทนความเป็นกรด-ด่าง มีฤทธิ์เป็น enterotoxin และ neurotoxin เมื่อคนกินอาหารที่ถูกปนเปื้อนด้วย pre-formed SEA (หรือกินตัวเชื้อ *S. aureus* เข้าไปแล้วเชื้อผลิต SEA ออกมาภายหลัง) สารพิษนี้ทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดเกร็งในท้องอย่างรุนแรง อาเจียน และอุจจาระร่วง นอกจากนี้ SEA ยังเป็น “Superantigen” ซึ่งสามารถกระตุ้น $CD4^+$ T cells จำนวนมากในกระแสเลือด โดย SEA สามารถจับกับ variable region ของ T cell receptor สายบีต้า (β -chain of TCR) โดยตรง (โดยไม่จำเป็นต้องถูก processed ให้อยู่ใน peptide groove ของ MHC class II บน antigen presenting cell) และขณะเดียวกันก็จับกับ α -helix ของโมเลกุล MHC class II บนผิวของ antigen presenting cell พร้อมๆกัน มีผลทำให้ T cells นั้นๆ ถูกกระตุ้นให้หลั่งไซโตไคน์ (cytokines) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง proinflammatory cytokines คือ $TNF\alpha$ และ IL-1 ออกมามากผิดปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอาการต่างๆ เช่นมีไข้สูงมาก มีการอักเสบและบวมในอวัยวะสำคัญ มีการเพิ่มของ vascular permeability ความดันเลือดลดต่ำ เกิดอาการช็อค และทำให้เสียชีวิต ดังนั้น ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของประเทศสหรัฐอเมริกา (Center of Disease Control; CDC) จึงจัดให้ SEA อยู่ในกลุ่มสารพิษที่เป็นอาวุธชีวภาพ (Bio-weapon)

การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส สามารถทำได้โดยการให้ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าเชื้อ แต่ยาปฏิชีวนะไม่สามารถลบล้างพิษต่างๆของสารพิษที่เชื้อผลิตออกมาแล้วได้ ในปี ค.ศ. 1959 ได้เกิดมีเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส ที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่เคยใช้ได้ผลดีในการฆ่าเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดมีสายพันธุ์ที่ดื้อยา methicillin (methicillin resistant *S. aureus*; MRSA) ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งทางการแพทย์ในการรักษาผู้ที่ติดเชื้อเหล่านี้ นอกจากดื้อยาปฏิชีวนะแล้ว MRSA ยังสามารถผลิต staphylococcal enterotoxins (SEs) ต่างๆได้มากกว่าเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาถึงกว่าสิบเท่า และทำให้ผู้ที่ติดเชื้อ MRSA มีอัตราการเสียชีวิตสูง เนื่องจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะไม่ได้ผลและไม่สามารถยับยั้งกลไกการเกิดโรคจากสารพิษของเชื้อได้ และในขณะนี้ยังไม่มี SEA antidote นักจุลชีววิทยาหลายกลุ่มจึงขนานนาม MRSA ว่า “Formidable Superbug”

เนื่องจากในผู้ป่วยที่รอดชีวิต (convalescing subjects) จะมี anti-toxin antibody ในกระแสเลือด ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดว่าการรักษาผู้ติดเชื้อและเริ่มป่วยด้วยวิธี passive immunization (ให้ ready made antitoxin) เสียตั้งแต่ในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ (acute phase) ก็น่าจะสามารถยับยั้งฤทธิ์ของสารพิษของเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียสได้และก็น่าจะทำให้สามารถลดความรุนแรงของโรคและอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ติดเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส ลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม MRSA แต่การใช้แอนติบอดีจากคนที่หายป่วยเพื่อนำไปรักษาผู้ที่กำลังป่วยย่อมมีปริมาณแอนติบอดีไม่เพียงพอและขัดต่อจริยธรรม

อีกทั้งการใช้แอนติบอดีที่เตรียมจากการ immunize สัตว์ก็มีข้อจำกัดหลายประการโดยเฉพาะอย่างยิ่ง adverse reactions ที่เกิดจาก anti-isotype response เช่น anaphylaxis หรือ serum sickness

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต monoclonal anti-enterotoxin A (anti-SEA) โดยใช้ human antibody phage display library ที่ห้องปฏิบัติการของ mentor (ศาสตราจารย์ วันเพ็ญ ชัยคำภา) สร้างเอาไว้แล้ว เพื่อให้ได้ anti-enterotoxin A ที่เป็นโมเลกุลของมนุษย์โดยสมบูรณ์ในรูปแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยวที่มีขนาดเล็กเพื่อให้แทรกผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ดี ไม่ก่อการอักเสบในร่างกายของคน มีคุณภาพแน่นอนและเหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดสำหรับรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสแตฟีโลค็อกคัส เอนเทอโรท็อกซิน ชนิด เอ (SEA) ของเชื้อสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส ได้ในที่สุด

จากการเพิ่มจำนวนยีน SEA จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* strain ATCC 13565 แล้วนำ PCR product เข้าสู่ cloning vector และ *E. coli* host protein expression system และผ่านขั้นตอน protein purification โดยใช้ affinity resin column ซึ่งสามารถ purify recombinant SEA protein มีขนาดประมาณ 65 kDa และนำ rSEA นี้ไปใช้เป็นแอนติเจนในขั้นตอน bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display human ScFv ที่มีความเฉพาะต่อ rSEA จาก human antibody phage display library พบว่า phages จำนวน 5 โคลน มีโมเลกุลของ human ScFv ที่มีความจำเพาะต่อ rSEA ดีที่สุด เมื่อทำการศึกษาลายหลายของยีนของ human ScFv (*huscfv*) ที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ *MvaI* พบว่า *huscfv* ของแต่ละโคลนมี DNA band pattern ที่แตกต่างกัน ซึ่งให้เห็นถึงความแตกต่างของยีน *huscfv* ในแต่ละ phage clone ซึ่งอาจมีผลต่อความจำเพาะต่อเอพิโทปหรือแอฟิไนตีที่ต่างกันของ human ScFv ต่อ tetanus toxin

จากการเหนี่ยวนำ selected phage *E. coli* ให้สร้าง human ScFv แล้วศึกษา localization ของ human ScFv protein ใน expression host *E. coli* cells ด้วยวิธี Western blot พบว่าสามารถเตรียม human ScFv protein โดยการสกัดจาก whole cell lysate ของแบคทีเรีย และพบว่า selected phage *E. coli* ทั้ง 2 โคลน (clone no. B1 และ B6) สามารถสร้าง human ScFv protein ได้

ในการทดสอบความสามารถของ human ScFv ในการยับยั้งพิษของ *Staphylococcal* enterotoxin A (SEA) ด้วยวิธี Inhibition of PBMCs proliferation เนื่องจาก SEA สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte cells ใน PBMCs เนื่องจาก SEA มีคุณสมบัติเป็น "Superantigen" ซึ่งสามารถกระตุ้น CD4+ T lymphocyte จำนวนมากในกระแสเลือด พร้อมๆ กัน มีผลทำให้ T lymphocytes ที่ถูกกระตุ้นหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) IL-2, IFN- γ ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนของ T cells ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte cells นั้นๆ (Dauwalder *et al.*, 2006; Porichis *et al.*, 2008) ดังนั้นในการทดลองในการศึกษาความสามารถของ recombinant *Staphylococcal* enterotoxin A (rSEA) ที่ผลิตได้ สามารถทำ

ได้กระตุ้น T lymphocyte cells ใน human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs) ด้วย rSEA แล้วทำการตรวจวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยการตรวจวัดการแสดงออกของยีน IL-2, IFN- γ โดยเทคนิค Real-time PCR จากการทดสอบพบว่า ScFv clone no. B1 สามารถ inhibit PBMCs proliferation จาก rSEA ได้โดยเลือกที่อัตราส่วน rSEA ต่อ ScFv ที่ 1:1

การศึกษานี้สามารถผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่สามารถบล้างพิษของ rSEA ได้ โดยใช้เทคนิคฟาจดิสเพลย์ (Phage Display Technology) แอนติบอดีที่ผลิตได้นี้เป็นแอนติบอดีต้นแบบ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อไปเป็นแอนติบอดีที่มีความปลอดภัยสำหรับการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษ Staphylococcal enterotoxin A (SEA) ได้

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ศึกษา mimotope / epitope ของ human ScFv ที่มีความสามารถในการบล้างพิษของ Staphylococcal enterotoxin A (SEA) เพื่อจะได้ทราบ protein sequence ที่เป็น neutralizing epitope ซึ่งอยู่บน Staphylococcal enterotoxin A (SEA)

ทดสอบประสิทธิภาพของ human ScFv *in vivo*

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และคณะกรรมการอุดมศึกษา

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. **Indrawattana N**, Sookrung N, Seasuy W, Kong-ngoen T, Tungtrongchitr A., Chongsang-nguan M, Chaicumpa W. Haman monoclonal ScFv that neutralize superantigen staphylococcal enterotoxin A. (Manuscript in preparation for Biomolecular Screening) คาดว่าจะได้รับการตีพิมพ์ภายในปี 2558
2. **Indrawattana N**, Promptmas C, Wat-Aksorn K, and Soontornchaid S. Real-time monitoring of DNA hybridization for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1. Anal. Methods 2014; DOI: 10.1039/c4ay01162g (เอกสารแนบหมายเลข 1)
3. Sookrung N, Khetsuphan T, Chaisri U, **Indrawattana N**, Reamtong O, Chaicumpa W, Tungtrongchitr A. Specific B-cell Epitope of Per a 1: A Major Allergen of American Cockroach (*Periplaneta americana*) and Anatomical Localization. Allergy Asthma Immunol Res. 2014 Jul;6(4):325-32. doi: 10.4168/aair.2014.6.4.325. Epub 2014 Feb 25. (เอกสารแนบหมายเลข 2)
4. Sookrung N, Wong-Din-Dam S, Tungtrongchitr A, Reamtong O, **Indrawattana N**, Sakolvaree Y, Visitsunthorn N, Manuyakorn W, Chaicumpa W. Proteome and

- Allergenome of Asian Wasp, *Vespa affinis*, Venom and IgE Reactivity of the Venom Components. J Proteome Res. 2014 Feb 4.(เอกสารแนบหมายเลข 3)
5. Meechan P, Tungtrongchitr A, Chaisri U, Maklon K, **Indrawattana N**, Chaicumpa W, Sookrung N. Intranasal, Liposome-Adjuvanted Cockroach Allergy Vaccines Made of Refined Major Allergen and Whole-Body Extract of *Periplaneta americana*. Int Arch Allergy Immunol 2013; 161(4):351-62. (เอกสารแนบหมายเลข 4)
 6. **Indrawattana N**, Sungkhachat O, Sookrung N, Chongsa-nguan M, Tungtrongchitr A, Voravuthikunchai PS, Kong-ngoen T, Kurazono H, Chaicumpa W. *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Thailand: prevalence of enterotoxin genes, molecular characteristics, antibiotic susceptibility and ability to form biofilm. Biomedical Research International 2013; 1-11. (เอกสารแนบหมายเลข 5)
 7. Tungtrongchitr A, Sookrung N, Chaicumpa W, **Indrawattana N**, Meechan T, Thavara U, Visitsunthorn N, Bunnag C. Comparison of allergenic components and biopotency in whole body extracts of wild and laboratory reared American cockroaches, *Periplaneta americana*. Asian Pac J Allergy Immunol. 2012 Sep;30(3):231-8. (เอกสารแนบหมายเลข 6)
 8. Tungtrongchitr A, Sookrung N, Chaicumpa W, **Indrawattana N**, Poolphol R, Sae-Lim N, Wankhom S, Bunnag C, Vichyanond P. Convenient, rapid and economic detection and semi-quantification of American cockroach allergen in the environment. Asian Pac J Allergy Immunol 2012; 30: 99-106. (เอกสารแนบหมายเลข 7)
 9. Chulanetra M, Sookrung N, Srimanote P, Indrawattana N, Thanongsaksrikul J, Sakolvaree Y, Chongsa-Nguan M, Kurazono H and Chaicumpa W. Toxic marine puffer fish in Thailand seas and tetrodotoxin they contained. Toxins 2011; 3(10):1249-62. . (เอกสารแนบหมายเลข 8)

ผลงานวิชาการอื่น ๆ

1. **Indrawattana N**, Sookrung N, Seasuy W, Kong-ngoen T, Tungtrongchitr A., Chongsa-nguan M , Chaicumpa W. Superantigen: recombinant staphylococcal enterotoxin A and its activity.ใน TRF seminar Series in Basic Research เรื่อง “โปรตีนดัดแปลงใหม่: จากงานวิจัยพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์” (Engineered proteins: from basic research to medical applications) โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้ “โครงการประสานงานและการพัฒนาเครือข่ายความร่วมมือเพื่อกลุ่มการกิจวิจัยพื้นฐานและผลิตนักวิจัย” ซึ่งมี ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา เป็นผู้ประสานงานการจัดสัมมนา ในวันที่ 24 กันยายน 2557 ณ

ห้องประชุมใหญ่ 101 ชั้น 1 อาคารเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษาฯ 5 ธันวาคม 2550 (ศูนย์วิจัยการแพทย์ศิริราช SiMR) (เอกสารแนบหมายเลข 9)

2. **Indrawattana N**, Kong-ngoen T, Sookrung N, Chongsa-nguan M, Tungtongchitr A, Buranasinsup A, Jangsangthong A, Kurazono H, Chaicumpa W. "Prevalence of enterotoxigenic and shiga toxin Escherichia coli isolated from diarrhea swine in Ratchaburee and Kanchanaburee, Thailand" ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ Joint International Tropical Medicine Meeting 2013 (JITMM 2013) "Towards Global Health: an Asian Paradigm of Tropical Medicine" เมื่อวันที่ 11-13 ธันวาคม 2556 ณ โรงแรมเซนทารา กรุงเทพฯ จัดโดยคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล (เอกสารแนบหมายเลข 10)
3. **Indrawattana N**, Sookrung N, Kong-ngoen T, Seesuy W, Chongsa-ngon M, Tungtongchitr A, Chaicumpa W. "Preparation of fully human monoclonal antibody to enterotoxin A (SEA) of Staphylococcus aureus by using phage display technology for further development to therapeutic antibody." ในงานประชุมวิชาการระดับชาติเรื่อง "นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส" ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ จังหวัดเพชรบุรี ระหว่างวันที่ 16-18 ตุลาคม 2556 จัดสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (เอกสารแนบหมายเลข 11)
4. Indrawattana N, Sungkhachat O, Sookrung N, Chongsa-nguan M, Tungtongchitr A, Voravuthikunchai PS, Kong-ngoen T, Kurazono H, Chaicumpa. "Staphylococcus aureus clinical isolates in Thailand: antibiotic susceptibility and molecular characteristics". ในงานประชุม ASIAHORCs Joint Symposium ครั้งที่ 4 "Bio Medical Research" ระหว่างวันที่ 11-14 พฤศจิกายน 2555 ณ เมือง Bu-Yeo สาธารณรัฐเกาหลี (นำเสนอผลงานแบบปากเปล่า) (เอกสารแนบหมายเลข 12)
5. Sookrung N, Wongdindan S, Indrawattana N, Tungtrongchitr A, Manuyakorn W, Pattanapanyasat K, Chaicumpa W. Allergenome of *Vespa affinis*. (นำเสนอผลงานแบบปากเปล่า) ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ "International Conference Molecular Medicine Conference (MMC 2012): Alternative Strategies against Cancer and Inflammation" เมื่อวันที่ 19-22 ธันวาคม 2555 ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กรุงเทพฯ จัดโดยโรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล (เอกสารแนบหมายเลข 13)
6. Meechan T, Tungtrongchitr A, Chaisri U, Maklon K, Indrawattana N, Chaicumpa W, Sookrung N, Cockroach Allergy and Therapeutic Vaccines. (นำเสนอผลงานแบบปากเปล่า) ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ "International Conference Molecular Medicine Conference (MMC 2012): Alternative Strategies against Cancer and

- Inflammation” เมื่อวันที่ 19-22 ธันวาคม 2555 ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กรุงเทพฯ จัดโดยโรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล (เอกสารแนบหมายเลข 14)
7. Mooksombat T, Sookrung N, Indrawattana N, Louisiriotchanakul S, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Chaicumpa W. Human ScFv that Neutralizes biological activity of HIV-1 Vpu protein (นำเสนอผลงานแบบปากโปสเตอร์) ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ “International Conference Molecular Medicine Conference (MMC 2012): Alternative Strategies against Cancer and Inflammation” เมื่อวันที่ 19-22 ธันวาคม 2555 ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กรุงเทพฯ จัดโดยโรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล (เอกสารแนบหมายเลข 15)
 8. Danpaiboon W, Reamtong O, Chavanayarn C, Sookrung N, Tungtrongchitr A, Indrawattana N, Srimanote O, Thanongsaksrikul J, Chaicumpa W. Venomic proteome of the King Cobra, *Ophiophagus hannah*. (นำเสนอผลงานแบบปากโปสเตอร์) ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ “International Conference Molecular Medicine Conference (MMC 2012): Alternative Strategies against Cancer and Inflammation” เมื่อวันที่ 19-22 ธันวาคม 2555 ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กรุงเทพฯ จัดโดยโรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล (เอกสารแนบหมายเลข 16)
 9. Nuanla-nong C, Tungtrongchitr A, Sookrung N, Sakolvaree Y, Indrawattana N, Chaicumpa W. Allergenome of house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, among atopic Thais. (นำเสนอผลงานแบบปากโปสเตอร์) ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ “International Conference Molecular Medicine Conference (MMC 2012): Alternative Strategies against Cancer and Inflammation” เมื่อวันที่ 19-22 ธันวาคม 2555 ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กรุงเทพฯ จัดโดยโรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล (เอกสารแนบหมายเลข 17)
 10. Indrawattana N, Kong-ngoen T, Sungkhachat O, Sookrung N, Chongsa-nguan M, Tungtrongchitr M, Chantratita N and Chaicumpa W. Prevalence of staphylococcal enterotoxin genes from Thai clinical isolates. Joint International Tropical Medicine Meeting 2011: “One world-One health”, Centara Grand Hotel, Bangkok, December 1-2, 2011. (เอกสารแนบหมายเลข 18)
 11. Sungkhachat O, Indrawattana N, Sookrung N, Kong-ngoen T, Chongsa-nguan M, Tungtrongchitr A, Chantratita N and Chaicumpa W. Antibiotic sensitivity pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from Thai clinical isolates. Joint International Tropical Medicine Meeting 2011: “One world-One health”, Centara Grand Hotel, Bangkok, December 1-2, 2011. (เอกสารแนบหมายเลข 19)

เอกสารอ้างอิง

- Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect* 2003; 130: 33-40.
- Bae HJ, Park HJ, Hazard analysis of *Staphylococcal aureus* in ready-to-eat sandwiches. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2007; 36: 938-943.
- Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP. A new staphylococcal infections. *New York: Academic Press*, 1983: 559-598.
- Boer De LM, Kum WSW, W Chow WA. Interaction of staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 and enterotoxin A on T cell proliferation and TNF secretion in human blood mononuclear cells. *Can J Infect Dis* 1999; 10(6): 403-409.
- Chu FS, Thadhani K, Schantz EJ, Bergdoll MS. Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A. *Biochemistry* 1966; 5: 3281-3289.
- Da Cunha MDLRS, Calsolari RAO, Araujo JPr. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin I genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 381-390.
- Darenberg J, Soderquist B, Normark HB, Norrby-Teglund A. Differences in potency of intravenous polyspecific immunoglobulin G against streptococcal and staphylococcal superantigens: implications for therapy of toxic shock syndrome. *CID* 2004; 38: 836-842.
- Dauwalder O, Thomas D, Ferry T, Debar A, Badiou D, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Monneret G. Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. *Journal of Leukocyte Biology* 2006; 80: 753-758.
- Filippos Porichis, Antigoni Morou, Stavroula Baritaki, Demetrios A. Spandidos, Elias Krambovitis. Activation-induced cell death signalling in CD4+ T cells by Olivier Dauwalder, Damien Thomas, Tristan Ferry, Anne-Lise Debar, Cedric Badiou, Francois Vandenesch, Jerome Etienne, Gerard Lina, and Guillaume Monneret. Comparative inflammatory properties of staphylococcal
- Friedman M, Rasooly R, Do MP, Henika RP. The olive compound 4-hydroxytyrosol inactivates *Staphylococcus aureus* bacteria and staphylococcal enterotoxin A (SEA). *Journal of Food Science* 2011; 76(8): M558-M563.

- Graumann A, MS-IV And Zawada TJ. Case report: acute renal failure after administering intravenous immunoglobulin. *Postgraduate Medicine* 2010; 122: 142–147.
- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fuse cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.
- Krakauer T. Measurment of proinflammatory cytokines and T-cell proliferative response in superantigen-activated human peripheral blood mononuclear cell. *Methods in Molecular Biology* 2003;214:137-49.
- Kulkeaw K, Sakolvaree Y, Srimanote P, Tongtawe P, Maneewatch S, Sookroong N, Tungtrongchitr A, Tapchaisri P, Kurazono H, Chaicumpa W. Human monoclonal ScFv neutralize lethal Thai cobra, *Naja kaouthia*, neurotoxin. *J Proteomics* 2009; 72(2):270-282.
- Lim D, Strynadka NC. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* 2002; 9: 870-876.
- LINA G, COZON G, FERRANDIZ J, GREENLAND T, VANDENESCH F, ETIENNE J. Detection of staphylococcal superantigenic toxins by a CD69-specific cytofluorimetric assay aeasuring T-cell activation. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 1998; 36(4): 1042–1045.
- Maneewatch S, Thanongsaksrikul J, Songsem T, Thueng-in K, Kulkeaw K, Tha-thai-song U, Srimanote P, Tongtawe P, Tapchaisri P, Chaicumpa W. Human single chain antibodies (HuScFv) that neutralize homologous and heterologous influenza A virus subtypes. *Antivir Ther* 2009; 14(2): 221-230.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect Dis* 1999; 5: 607-625.
- Nickerson KM, Hongsuwan M, Limmathurotsakul D, Wuthiekanun V, Shah RK, Srisomang P, *et al.* *Staphylococcus aureus* bactereamia in a tropical setting: patient outcome and impact of antibiotic resistance. *Plos One* 2009; 4: e4308.
- Ong PY, Patel M, Ferdman RM, Dunaway T, Church JA. Association of staphylococcal superantigen-specific immunoglobulin E with mild and moderate atopic dermatitis. *J Pediatr* 2008; 153: 803-806.
- Pepe O, Blaiotta G, Bucci F, Anastasio M, Aponte M, Villani F. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A in breaded chicken products: detection and behavior during the cooking process. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 7057-7062.

- Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Texeira P, Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcal aureus* isolates from various food in Portugal. *Food Microbiol* 2009; 26: 278-282.
- Peterson K, Thunnissen M, Forsberg G, Walse B. Crystal structure of a SEA variant in complex with MHC class II reveals the ability of SEA to crosslink MHC molecules. *Structure* 2002; 10: 1619-1626.
- Porichis F, Moroua A, Baritaki S, Spandidos AD, Krambovitis E. Activation-induced cell death signalling in CD4+ T cells by staphylococcal enterotoxin A. *Toxicology Letters* 2008; 176: 77–84.
- Poungpair O, Pootong A, Maneewatch S, Srimanote P, Tongtawe P, Songserm T, Tapchaisri P, Chaicumpa W. A human single chain transbody specific to matrix protein (M1) interferes with the replication of influenza A virus. *Bioconjug Chem* 2010; 21(7): 1134-1141.
- RASOOLY L, ROSE RN, SHAH BD, RASOOLY A. In vitro assay of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A activity in Food. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 1997; 63(6): 2361–2365.
- Rasooly R, Do MP, Friedman M. Inhibition of biological activity of *Staphylococcus enterotoxin A* (SEA) by apple juice and apple polyphenols. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 5421-5426.
- Reichert JM. Therapeutic monoclonal antibodies: trends in development and approval in the US. *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4: 110-118.
- Schmid D, Fretz R, Winter P, Mann M, Haeger G, Staeger A, Ruppitsch W, Ladstaetter J, Mayer N, De Martin A, Allerberger F. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Australia. *Wien Klin Wochenschr* 2009; 121: 125-131.
- Shinefield HR, Ruff NL. Staphylococcal infections: a historical perspective. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23: 1-15.
- Siriwong N, et al. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Songkla Med J* 2009; 27: 347-358.
- Smith GP, Petrenko VA. Phage display. *Chem Rev* 1997; 97: 391-410.
- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigen on the virion surface. *Science* 1985; 228: 1315-1317.

superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. *Journal of Leukocyte Biology* 2006;80:753-758. staphylococcal enterotoxin A. *Toxicology Letters* 176 (2008) 77–84.

Tarkowski A. Infectious arthritis. *Best Pract Res, Clin Rheumatol* 2006; 20: 1029-1044.

Wang S, Li Y, Xiong H, Cao J. A broad-spectrum inhibitory peptide against staphylococcal enterotoxin superantigen SEA, SEB and SEC. *Immunology Letters* 2008; 121: 167–172.

Wikipedia 2010. *Staphylococcus aureus*.

([http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus aureus](http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)) (Accessed on September 2010)

Yanagisawa C, Hanaki H, Natae T, Sunakawa K. Neutralization of staphylococcal toxins *in vitro* by human-origin intravenous immunoglobulin. *J Infect Chemother* 2007; 13; 368-372.

ประภาวดี ดิษยาธิคม สมใจ ไผ่สมบุญ สุธาดา แซ่ซื่อ และ วชิราภรณ์ พร้าเพรียง ข้อมูล *Staphylococcus aureus* ตัวยาทั้งแต่เดือน มกราคม 2546 - มิถุนายน 2547 ศูนย์ฝางแห่งชาติ (<http://narst.dmsc.moph.go.th/another/file/S%20aureus.htm>) (Accessed on September 2010)

ประภาวดี ดิษยาธิคม เชื้อ *Staphylococcus aureus* ก่อโรคอุจจาระร่วงจากอาหารเป็นพิษ ศูนย์ข้อมูลโรคติดต่อและพาหะนำโรค (http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nihR_search.asp?info_id=891) (Accessed on September 2010)