



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีฟาจไลบรารีเพื่อพัฒนาชุดตรวจโรคไข้หวัดนก

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ราม งามสุต

สัญญาเลขที่ RMU4880026

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

(๒๙ มกราคม พ.ศ. ๒๕๕๑ - ๒๙ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๑)

โครงการ การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีฟาจไลบรารีเพื่อพัฒนาชุดตรวจโรคไข้หวัดนก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ราม รามสูต

ภาควิชาเวชศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

มหาวิทยาลัยมหิดล 420/6 ถ.ราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Avian Influenza Virus is becoming the important public health problem in Thailand since the first emergent on 2003-2004. Worldwide, the total of 385 human cases of Avian Influenza Virus with 243 deaths were reported from WHO, which the total of 25 cases and 17 deaths came from Thailand. Moreover, it also caused a high number of economic losses in Asia including Thailand. For this reason, the diagnostic kit for this H5N1 avian influenza virus was set to be the one of national policy for controlling this disease. For production of diagnostic kit of this avian influenza virus antigen, monoclonal antibody has been well known as diagnostic reagent. To produce the monoclonal antibody, both traditional hybridoma technology and phage display technology can be applied, however, the latter is considered to be a much more feasible and cheaper. So, the objective of this study is construction and selection of Fab antibody phage library specific to H5N1 avian influenza virus using phage display technique. **Methods** – The immunized chimeric Chicken/Human Fab library were constructed with library size at 1.0×10^6 . Three white leg horn chickens were immunized with the dead H5N1. The chicken spleens were harvested and pooled together. Total RNA were then isolated from these chicken spleens using TRIzol reagent. Then, complementary DNA (cDNA) were reverse transcribed from the RNA. cDNA were further used as template for antibody gene amplification specific to chicken variable heavy chain (V_H) and light chain (V_λ). Moreover, human constant heavy chain (C_H1) and light chain (C_K) were also amplified from pComb3XTT vector. After that, overlap extension PCR were performed to amplify the heavy chain Fd (V_H - C_H1), Chimeric light chain (V_λ – C_K), and final Fab fragment. This Fab were then digested with restriction enzyme *Sfi*1 and ligated to phagemid vector pComb3XSS that is also previously cut with the same enzyme. The recombinant DNA was transformed in to ER2738 *E. coli* host cell, and rescue with wild type helper phage VCSM13. According to panning strategy with immobilized antigen, the hemagglutinin-specific antibodies were selected from a repertoire of this chimeric Fab library. **Result and Discussion** – Fab antibody library from H5N1 immunized chicken with a library size at 1.0×10^7 was successfully constructed and used for selection in panning. From panning, the specific phage clones were enriched in consecutive round tested by phage pool ELISA. Totally 86 clones were selected for single clone Fab ELISA. Among these clones, we found 3 clones that give positive result from ELISA. All binders were further analyzed by DNA-sequencing and tested for their specificity by western blotting. Sequencing result showed that all binders have 93% homology with chicken immunoglobulin gene, and it was found that there have high variations in CDR region. For western blot analysis, binder 1 was specifically bind with H5 antigen.

Keywords: phage display, antibody library, avian influenza virus

Project Code: RMU4880026

Project Title: Construction of monoclonal antibody phage library for developing avian influenza virus's diagnostic test

(ชื่อโครงการ) การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีฟาจไลบรารีเพื่อพัฒนาชุดตรวจโรคไข้หวัดนก

Investigator:

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ราม รามสูต

ภาควิชาเวชศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

มหาวิทยาลัยมหิดล 420/6 ถ.ราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

E-mail Address: pongrama@yahoo.com, tmprt@mahidol.ac.th

Project Period: (ระยะเวลาโครงการ) ๒๙ มกราคม พ.ศ. ๒๕๕๘ - ๒๘ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๙

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีฟาจไลบรารี จาก ม้ามของไก่ที่มีภูมิคุ้มกันจากเชื้อไข้หวัดนก
2. เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนก จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีฟาจไลบรารี ที่สร้างขึ้น

1. รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

ขณะนี้เราได้ทำการสร้างแอนติบอดีฟาจไลบรารีจากไก่เสร็จเรียบร้อยแล้ว โดยเราได้สร้างแอนติบอดีไลบรารีทั้งหมด 2 ชุด ทั้งจากไก่ที่มีภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (post-immunized library) และจากไก่ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (naïve library) โดยมีความหลากหลายที่ 2×10^8 และ 3.1×10^9 ตามลำดับ ซึ่งไลบรารีทั้งสองชุดนี้จะนำมาทำการคัดเลือกเพื่อให้ได้แอนติบอดีสายเดี่ยวที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในขั้นตอนการทำ panning ต่อไป นอกจากนี้ ในส่วนของ naïve library ที่สร้างขึ้นยังสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะกับโรคติดเชื้อของไก่ชนิดอื่นหรือแอนติเจนชนิดอื่นได้อีกด้วย

แต่จากที่ได้มีการปรึกษากับผู้ร่วมวิจัยท่านอื่น รวมทั้งผู้เชี่ยวชาญโดยตรง (Prof. Carlo F Barbas III แห่งสถาบันวิจัย The Scripps Research Institute) และจากการหาข้อมูลเพิ่มเติม จึงได้ปรับเปลี่ยนมาใช้รูปแบบของฟาจแอนติบอดีแบบ Fab antibody library ซึ่งข้อดีของการใช้ Fab คือแอนติบอดีที่ได้จะมีความเสถียรมากกว่า scFv เนื่องจาก Fab มีส่วนของ constant region ที่ช่วยเสริมให้ส่วนของ variable ที่มีหน้าที่

จับกับ epitope ของแอนติเจนมีความเสถียรมากขึ้นในการทำหน้าที่จับกับ epitope ดังกล่าว (Quintero-Hernandez V, *et al.*, 2007; Rothlisberger D, *et al.*, 2005)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่ด้วยการฉีดวัคซีนเชื้อตาย และการเก็บตัวอย่างและการเตรียมม้าม (Spleen) ของไก่ที่สร้างภูมิคุ้มกันที่สูงพอต่อเชื้อไข้หวัดนก

ไก่ที่ใช้ในการทดลองซึ่งได้รับการเลี้ยงด้วยวิธีปลอดเชื้อถูกฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเชื้อไข้หวัดนก ด้วย วัคซีนชนิดเชื้อตาย จะมีการตรวจสอบภูมิคุ้มกันด้วยวิธี ELISA จนกระทั่งไก่ได้รับการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการแล้วว่าสร้างภูมิคุ้มกันที่สูงพอต่อเชื้อไข้หวัดนก จากนั้นจึงเก็บแยกม้ามไก่โดยวิธีการที่ปลอดเชื้อ (Sterile) แล้วนำมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 ml. ที่มีสารละลาย Trizol อยู่ ก่อนที่จะนำมาเตรียม ribonucleic acid (RNA)

2.2 การเตรียม ribonucleic acid (RNA) จากม้ามของไก่ที่ฉีดเชื้อไข้หวัดนก

Ribonucleic acid (RNA) จากตัวอย่างม้ามของไก่ ได้ถูกแยกออกโดยใช้สารละลาย TRIzol reagent (Invitrogen, USA.) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 นำม้ามไก่ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml. ที่มีสารละลาย TRIzol (1 ml ต่อปริมาณเนื้อเยื่อ 100 mg) และบดม้ามไก่ให้เป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย TRIzol และทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.2.2 บั่นแยกส่วนขึ้นเนื้อที่ไม่ละลายออกที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และแยกส่วนสารละลายใสใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่

2.2.3 เติมสารละลาย chloroform ปริมาณ 0.2 ml ต่อ สารละลาย TRIzol 1 ml ที่ใช้ และเขย่าให้เข้ากันประมาณ 15 นาที และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2.2.4 บั่นแยกสารละลายที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.2.5 แยกสารละลายใสส่วนบนที่มี RNA อยู่ ใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่

2.2.6 เติมสารละลาย isopropanol 0.5 ml ต่อ สารละลาย TRIzol 1 ml ที่ใช้ และผสมให้เข้ากัน และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2.7 บั่นตกตะกอนสารละลายที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.2.8 เก็บตะกอน RNA และล้างด้วย 75% EtOH

2.2.9 บั่นตกตะกอน RNA อีกครั้ง และทิ้งสารละลายส่วนบน

2.2.10 ละลายตะกอน RNA ที่ได้ด้วย RNase-free water ใน sterile tube ขนาด 1.5 ml. แล้วเก็บสารละลาย RNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อใช้ในการเตรียม cDNA ในขั้นตอนต่อไป

2.3 การเตรียม cDNA จาก RNA

cDNA เตรียมได้จาก RNA โดยใช้ Superscript III Reverse Transcriptase โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 เตรียมส่วนผสมดังต่อไปนี้ (สำหรับการเตรียม cDNA 1 reaction, 20 µl)

RNA template	1 µg
Oligo(dT) primer	1 µl
dNTP	1 µl
Rnase-free water	7 µl

Incubate ส่วนผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในน้ำแข็งอีกเป็นเวลาอย่างน้อย 1 นาที

2.3.2 เตรียมส่วนผสม cDNA synthesis mix ดังนี้ (สำหรับการเตรียม cDNA 1 reaction)

10X RT buffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNaseOut (40 u/ µl)	1 µl
Superscript III RT (200 U/ µl)	1 µl

2.3.3 เติมน้ำตาลละลาย cDNA synthesis mix ที่เตรียม (10µl) ลงในส่วนผสม RNA/primer mixture (10µl) ผสมให้เข้ากัน และ incubate ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที และจึงหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำแข็ง

2.3.4 ปั่นตกสารละลายที่ติดข้างหลอด แล้วเติม เอนไซม์ RNaseH 1 µl แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที

2.3.5 หาปริมาณ และความบริสุทธิ์ ของ cDNA ที่ได้ ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm

2.4 การสร้าง Fab Fragment

2.4.1 การเพิ่มปริมาณแอนติบอดีใน ส่วน variable light chain (V_L) และ variable heavy chain (V_H) ของไก่

ส่วนของ variable light chain (V_L) และ variable heavy chain (V_H) ของแอนติบอดีไก่จะถูกเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนอนุรักษ์ (Conserve region) ของ variable light chain (V_L) และ variable heavy chain (V_H) แล้วเพิ่มปริมาณส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงหลากหลาย (variable) โดยเราเลือกใช้ linker ขนาดยาวโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 2 คู่ ดังนี้

V_H Primers

CHybVH (sense)

5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG TCC3'

CHyblg-B (reverse)

5' CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CCC3'

V_L Primers

CSCVK (sense)

5' GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC 3'

CHybL-B (reverse)

5' AGA TGG TGC AGC CAC AGT TCG TAG GAC GGT CAG GGT TGT CCC GGC 3'

หลังจากที่ได้ PCR product ของ V_H และ V_L แล้ว จึงนำ PCR product ที่ได้มาตกตะกอนด้วย EtOH และ NaOAc หลังจากนั้นจึงนำ PCR product ของ V_H และ V_L ที่ตกตะกอนแล้วทั้งหมดมา purify ผ่าน agarose gel อีกครั้งหนึ่ง

2.4.2 การเพิ่มปริมาณแอนติบอดียีนของมนุษย์ส่วน constant light chain (C_K) และ constant heavy chain (C_{H1})

ส่วนของแอนติบอดียีน constant light chain (C_K) และ constant heavy chain (C_{H1}) ของมนุษย์จะถูกเพิ่มปริมาณขึ้นจาก pComb3XTT vector โดยใช้ primers ทั้งหมด 2 คู่ ดังนี้

Human C_{H1} chain

HIgGCH1-F (sense)

5' GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC 3'

Dpseq (reverse)

5' AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3'

Human C_K region

HKC-F (sense)

5' CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'

Lead-B (reverse)

5' GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC 3'

หลังจากที่ได้ PCR product ของ C_{H1} และ C_K แล้ว จึงนำ PCR product ที่ได้มาตกตะกอนด้วย EtOH และ NaOAc หลังจากนั้นจึงนำ C_{H1} และ C_K ที่ตกตะกอนแล้วทั้งหมดมา purify ผ่าน agarose gel อีกครั้งหนึ่ง

2.4.3 การสร้างแอนติบอดียีนส่วน Chimeric heavy chain (Fd) และ Chimeric light chain

จากส่วนของ variable และ constant region ที่ได้ PCR product ส่วนของ variable heavy chain (VH) จะถูกนำมารวมกับส่วน constant heavy chain (CH1) ได้เป็น chimeric heavy chain Fd (VH-CH1) fragment

และส่วนของ variable light chain (V_L) จะนำมารวมกับส่วน constant light chain (C_K) ได้เป็น Chimeric light chain (V_L-C_K) โดยใช้วิธี overlap extension PCR โดยใช้ primer 2 คู่ดังนี้

VH-CH1 amplification

LeadVH (sense)

5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC 3'

Dpseq (reverse)

5' AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3'

VL-C_K amplification

CSC-F (sense)

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'

Lead-B (reverse)

5' GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC 3'

จากการเพิ่มปริมาณแอนติบอดียีนส่วน Chimeric heavy chain และ Chimeric light chain นี้ จะทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 750-800 bp

2.4.4 การสร้าง Fab fragment ด้วย Overlap Extension PCR รอบที่ 2

หลังจากที่ได้ V_H-C_H1 และ V_L-C_K ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว เราจะนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง Fab fragment โดยผ่านกระบวนการ Overlap Extension PCR รอบที่ 2 โดยใช้ primer อีก 1 คู่ ที่มี sequence ดังนี้

Fab amplification

CSC-F (sense)

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'

Dp-Ex (reverse)

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3'

จากการเพิ่มปริมาณแอนติบอดียีนส่วน Fab fragment นี้ จะได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 1500 bp ซึ่งจะต้องตกตะกอนและทำให้บริสุทธิ์ ด้วย NaOAc/EtOH และ purify ผ่าน agarose gel อีกครั้งหนึ่ง

2.5. การสร้าง Fab phage library

5.1 ทำการตัดชิ้นส่วน Fab ที่ได้ และ phagemid pComb3XSS ด้วย restriction enzyme *sfi*1

5.2 ต่อชิ้นส่วนทั้งสองเข้าด้วยกันด้วย enzyme T4 ligase และ incubate ที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 1 คืน

5.3 ทำสารละลาย ligation reaction ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย 3M NaOAc และ Ethanol และตกตะกอน DNA ที่อุณหภูมิ -70 °C และละลายตะกอน DNA ด้วย Nuclease free water 15 µl

5.4 นำ recombinant DNA ที่ทำให้บริสุทธิ์ที่ได้ (15 µl) transform เข้าใน ER2738 *E.coli* competent cell 300 µl ที่เตรียมไว้แล้ว ด้วยวิธี electroporation หลังจากนั้นจึงนำ *E. coli* cell ที่มี recombinant vector มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมนยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นการคัดเลือกเฉพาะ cell ที่มี recombinant vector เท่านั้น และเติม helper phage เพื่อช่วยในการสร้างโปรตีนที่จำเป็นเพื่อประกอบเป็นฟาจรุ่นลูกต่อไป

5.5 เชย้า phage infected *E. coli* culture ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน

5.6 ปั่นแยก *E. coli* cell ที่ไม่ต้องการออกด้วยความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

5.7 ตกตะกอนฟาจด้วยการเติมสารละลาย PEG8000/NaCl และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

5.8 ปั่นตกตะกอนฟาจด้วยความเร็วรอบ 9000 rpm เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C

5.9 resuspend ตะกอนฟาจที่ได้ใน 1 ml 1% BSA in TBS และปั่นแยกตะกอนออกอีกครั้งหนึ่งด้วยความเร็ว 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายใสส่วนบนที่เป็นแอนติบอดีไลบรารีเพื่อใช้ในการคัดเลือกในขั้นตอน panning ต่อไป หรือสามารถเก็บฟาจไลบรารีที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยการเติม Sodium azide ที่ความเข้มข้น 0.02%

5.10 ทำการหาขนาดของไลบรารีที่ได้ด้วยการทำ dilution ของไลบรารี ที่ 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}

5.11 infect 100 µl ER2738 *E. coli* ($OD_{600} \sim 0.8$) ด้วย 2 µl phage library dilution ที่ dilution ต่างๆ ที่เตรียมไว้เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5.12 plate 51 µl of infected cell ลงบน LB Agar plate ที่มียา Carbenicillin ที่ความเข้มข้น 100 µg/µl และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน

6. การคัดเลือกฟาจที่จับเฉพาะกับแอนติเจนในขั้นตอนการทำ panning

ในขั้นตอนการคัดเลือกฟาจที่จับเฉพาะกับแอนติเจนนั้น เราสามารถทำได้ 2 แบบ คือการเพิ่ม stringency ในการทำ panning ในแต่ละรอบ เช่นการลดปริมาณแอนติเจนที่ใช้ในแต่ละรอบของการทำ panning หรือการลดช่วงเวลากการจับกันของฟาจแอนติบอดีกับแอนติเจน หรือจะทำแบบไม่มีการเพิ่ม stringency ก็ได้ เพื่อที่จะดูการเพิ่มขึ้นของฟาจที่ได้ในแต่ละรอบอย่างชัดเจนขึ้น โดยในการทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกทั้ง 2 แบบ ซึ่งทำได้โดย

6.1 Coat แอนติเจนที่สนใจ (H5 antigen) บน microtiter plate โดยในการทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกทั้งแบบเพิ่ม stringency และแบบไม่มีการเพิ่ม stringency โดยปริมาณของแอนติเจนที่ใช้ในแต่ละรอบได้แยกทำเป็น ทั้งการลดปริมาณแอนติเจนในแต่ละรอบเป็น 100, 100, 50, และ 25 ng/well ตามลำดับ และการใช้แอนติเจนทุกรอบในปริมาณที่เท่ากันคือ 100 ng/well และ incubate ที่ 4 °C ข้ามคืน

6.2 block well ด้วย 300 μ l blocking solution (3% BSA in TBS) incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเทสารละลาย blocking ออก

6.3 เติม 100 μ l phage library ที่เตรียมไว้แล้วลงในหลุม และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรืออาจลดช่วงเวลา incubation เป็น 1 ชั่วโมง และ 45 นาที ตามลำดับ ในขณะเดียวกัน เลี้ยงเซลล์ *E. coli* เพื่อใช้สำหรับการ infection กับ ฟาจตั้งต้น และฟาจที่ elute ออกมา ฟาจที่ไม่จับกับแอนติเจนจะถูกล้างออกด้วย washing buffer (0.05% TBS-Tween) เป็นจำนวน 5 ครั้ง

6.4 elute phage ตัวที่จับเฉพาะกับแอนติเจนออกด้วยสารละลาย 10 mg/ml trypsin ใน TBS และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

6.5 phage ที่ถูก elute ออก จะนำมา infect กับ เซลล์ *E. coli* ที่เตรียมไว้แล้ว รวมถึง phage library ตั้งต้น เพื่อนำมาคำนวณหาจำนวนฟาจเริ่มต้นและฟาจที่ elute ออก

6.6 ฟาจที่ถูก elute ออกมาจะนำมาเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย ใส่ยา Carbenicillin เพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่ถูก infect ด้วยฟาจ จากนั้นจึงเติม helper phage (VCSM13) และ ยา kanamycin แล้วจึงเลี้ยงเซลล์ทิ้งไว้ 1 คืน

6.7 หลังจากที่ได้เพิ่มปริมาณขึ้น เซลล์แบคทีเรียจะถูกตกตะกอนลงมา โดยจะเก็บส่วน supernatant ที่มีฟาจอยู่ แล้วจึงเติมสารละลาย PEG8000/NaCl เพื่อตกตะกอนฟาจในน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ฟาจที่ได้จะนำมาใช้ในการคัดเลือกรอบต่อไป จนได้ฟาจที่จับเฉพาะกับแอนติเจน

7. การทดสอบความจำเพาะของฟาจด้วยวิธี ELISA

7.1 การเตรียม Fab เพื่อใช้ในการ ทำ phage pool ELISA

7.1.1 Output phage ที่ตกตะกอนได้ในแต่ละรอบจะนำมา infect กับเซลล์ *E. coli* ที่เลี้ยงจนได้ OD600 ~ 0.6 โดยจะใช้ phage:cell ratio (ROI) ที่ 1:1 คือประมาณ 1 μ l ของฟาจกับ 2 ml ของเซลล์ *E. coli* หลังจากนั้นจึงทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เติมยา Carbenicillin แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 1 คืน

7.1.2 Dilute overnight culture ที่ได้ในอัตราส่วน 1:100 ใน SB medium ที่มียา carbenicillin แล้วจึงเลี้ยงเซลล์ให้ได้ OD600 ที่ประมาณ 0.6-0.7 แล้วจึงเติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.5 mM แล้วจึงเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 1 คืน

7.1.3 ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication จากนั้นจึงปั่นเศษเซลล์ตกที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วน supernatant เพื่อใช้ในการทำ ELISA

7.2 การเตรียม Fab เพื่อใช้ในการ ทำ single clone ELISA

7.2.1 จาก output plate ที่มี single colony ของฟาจที่ผ่านการคัดเลือกลมาแล้ว แต่ละ colony ถูกคัดเลือกลมาแบบสุ่ม แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา Carbenicillin เป็นเวลา 1 คืน

7.2.2 Dilute overnight culture ที่อัตราส่วน 1:100 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา Carbenicillin จนได้ OD600 ที่ประมาณ 0.6-0.7 แล้วจึงเติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.5 mM แล้วจึงเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 1 คืน

7.2.3 ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication จากนั้นจึงปั่นเซลล์ตกที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วน supernatant เพื่อใช้ในการทำ ELISA

7.3 การทดสอบการจับกันของ H5 Ag กับ Fab antibody (โดยการคัดเลือกแบบสุ่ม) ด้วยวิธี ELISA

7.3.1 coat H5 แอนติเจนปริมาณ 100 ng/well ลงบน microtiter plate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน

7.3.2 เท H5 Ag ออก แล้วล้างด้วย washing buffer

7.3.3 เติม supernatant ที่เตรียมไว้แล้วลงในหลุมที่ไม่ได้ coat แอนติเจนไว้ เพื่อใช้เป็น expression level control และเติม blocking buffer ลงในหลุมที่ coat แอนติเจนเอาไว้แล้ว และที่ไม่ได้ coat แอนติเจนไว้ เพื่อใช้เป็น BSA negative control จากนั้นจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.3.3 ล้างหลุมด้วย washing buffer (0.05% PBST) 3 ครั้ง จากนั้นจึงเติม supernatant ลงในหลุมที่ coat แอนติเจน และหลุม negative control เติม blocking buffer ลงในหลุม expression level control บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.3.4 ล้างหลุมด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติม Anti-HA-peroxidase ที่ความเจือจาง 1:1000 ปริมาณ 100 µl ลงในทุกหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.3.5 ล้างหลุมด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลาย ABTS substrate ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จนกว่าจะเกิดสี และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm.

7.4 Clone ที่คัดเลือกได้จะนำมาทำ ELISA เพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

8. การวิเคราะห์ลำดับเบสของแอนติบอดียีนของ single clone ที่คัดเลือกได้

จาก single phage clone ที่คัดเลือกได้ ฟาจมีด DNA จะถูกสกัดออกมาเพื่อนำไปทำ DNA-sequencing เพื่อหาลำดับเบสของแอนติบอดียีน จากนั้นจึงนำลำดับเบสของแอนติบอดียีนที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทาง Bioinformatics

9. การทดสอบความจำเพาะของ binders ที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี Western Blot

9.1 การทำ SDS-PAGE

Hemagglutinin antigen ปริมาณ 500 ng (สำหรับ 1 ตัวอย่างที่จะใช้เพื่อจับกับ Fab antibody ในขั้นตอนการทำ western blot) ซึ่งนำมาผสมกับ sample buffer ในอัตรา 1:1 จะถูก load ลงใน well ของ 12 % polyacrylamide gel จากนั้นจึงแยกขนาดโปรตีนดังกล่าวด้วยกระแสไฟฟ้า

9.2 การทำ Western Blotting

9.2.1 จาก polyacrylamide gel ที่มีโปรตีนที่สนใจอยู่ โปรตีนดังกล่าวจะถูก transfer ลง PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า ที่ 100 V เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่งถึง 2 ชั่วโมง

9.2.2 จากนั้น Block membrane ด้วย blocking buffer (5% skim milk) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

9.2.3 ล้าง membrane ด้วย washing buffer (0.05% PBST) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

9.2.4 Dry membrane และตัด membrane เป็นชิ้นสำหรับใช้กับ Fab antibody แต่ละตัว

9.2.5 ล้าง membrane ด้วย washing buffer (0.05% PBST) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

9.2.6 นำชิ้น membrane ที่ตัดแล้วมา incubate กับ Fab antibody ที่เตรียมไว้ (เช่นเดียวกับ การทำ ELISA ข้างต้น) ที่ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน

9.2.7 ล้าง membrane ด้วย washing buffer (0.05% PBST) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

9.2.8 นำชิ้น membrane มา incubate กับ Anti-HA-HRP ที่อัตราส่วน 1:1000 ที่เจือจางใน blocking buffer แล้ว incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

9.2.9 ล้าง membrane ด้วย washing buffer (0.05% PBST) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

9.2.10 เติมสารละลาย DAB solution และรอจนเกิดสี (ประมาณ 5-10 นาที)

3. ผลการทดลอง

3.1 การเตรียม ribonucleic acid (RNA) และ cDNA จากม้ามไก่ที่สร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดนก

RNA ได้ถูกเตรียมจากตัวอย่างม้ามไก่ โดยใช้ สารละลาย TRIzol ตามที่ได้กล่าวข้างต้น จากนั้นจึงทำ Reverse Transcription เพื่อเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยใช้ Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)

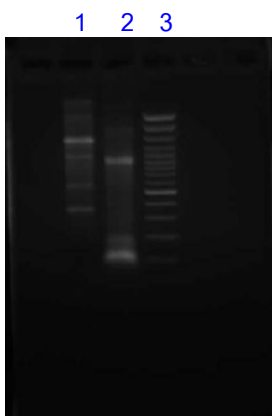
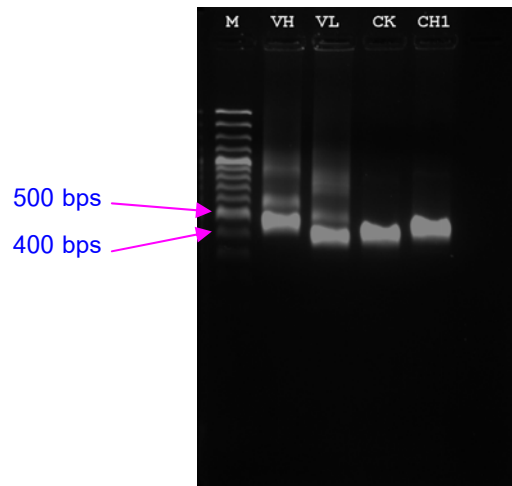


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of isolated RNA. Lane 1, RNA ladder; Lane 2, isolated RNA, Lane 3, 100 bp DNA ladder

3.2 การสร้าง Fab antibody library

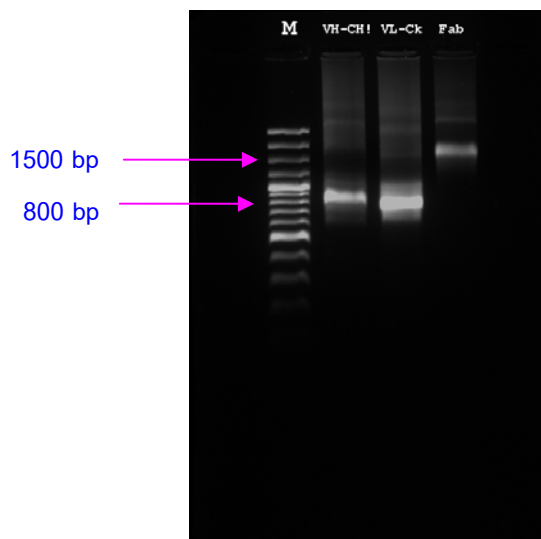
3.3.1 การเพิ่มปริมาณแอนติบอดียีน ส่วน variable light chain (V_L), variable heavy chain (V_H), constant light chain (C_K), และ constant heavy chain (C_{H1})

หลังจากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณส่วน V_L , V_H , C_K , และ C_{H1} แล้วจะได้ PCR Product ของ light chain และ heavy chain ที่มีขนาดประมาณ 350 และ 400 bps ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 Agarose gel electrophoresis of V_H , V_L , C_K , C_{H1} fragment. Lane 1: 100 bps DNA ladder plus, Lane 2 : ~400 bps of V_H fragment, Lane 3 : ~350 bps of V_L fragment, Lane4 : ~350 bps of C_K fragment, Lane 5: ~400 bps of C_{H1} fragment

3.3.2 การสร้าง Chimeric light chain และ Fd fragment ด้วย Overlap Extension PCR
จากการเชื่อมกันของ variable heavy chain กับ constant heavy chain และ variable light chain กับ constant light chain จะได้ผลผลิต PCR ส่วนของ $VH-C_{H1}$ และ $VL-C_K$ ที่มีขนาด ~800 bps ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 Agarose gel electrophoresis of scFv fragment. Lane 1: 100 bps DNA ladder plus. Lane 2: ~800 bps of VH-C_H1 fragment. Lane 3: VL-C_K fragment. Lane4: Fab fragment

3.3.3 การสร้างชิ้นส่วน Fab โดย Overlap Extension PCR

ชิ้นส่วน Fab ที่สร้างขึ้นจากการเชื่อมกันระหว่าง V_H-C_H1 และ V_L-C_K จะมีขนาดประมาณ 1500 bp ดังรูปที่ 3

3.3.4 การสร้าง phage antibody library

หลังจากใส่ชิ้นส่วน Fab ที่ได้เข้าใน ฟาจมิด pComb3XSS จึงได้ Fab antibody library ที่มีขนาด 1×10^6 ซึ่งจะใช้ในการคัดเลือกในขั้นตอนการทำ panning ต่อไป

3.4 การคัดเลือกฟาจที่จับเฉพาะกับ Hemagglutinin (H5 antigen)

ในขั้นตอนการคัดเลือกฟาจในขั้นตอนการทำ panning นั้นพบว่า output phage ที่ได้ในแต่ละรอบนั้นยังไม่สามารถเห็นการเพิ่มขึ้นของ specific clone อย่างชัดเจน

ตารางที่ 1

	Ag coated (ng)	Incubation time	Washing time
st 1 round	100	2 hrs	5
nd 2 round	100	1 hr	5
rd 3 round	25	1 hr	5
th 4 round	20	45 mins	5

ตารางที่ 2

	Input phage	Output phage
1 st round	1.1×10^{12}	3.0×10^6
2 nd round	7.5×10^{11}	2.0×10^5
3 rd round	2.5×10^{11}	1.6×10^5
4 th round	6.3×10^{11}	3.6×10^5

ตารางที่ 1 และ 2 แสดงการทำ panning โดยการเพิ่ม stringency และแสดงปริมาณฟาจ Input และ output ที่ได้

ตารางที่ 3

	Ag coated (ng)	Incubation time	Washing time
1 st round	100	2 hrs	5
2 nd round	100	2 hr	5
3 rd round	100	2 hr	5
4 th round	100	2 hr	5

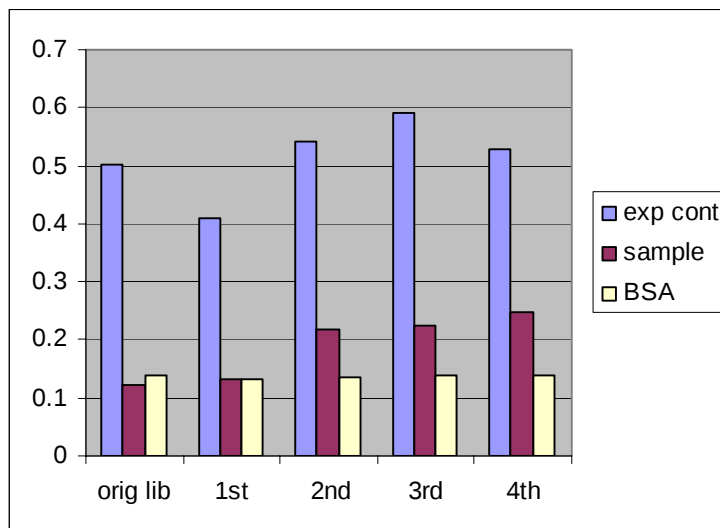
ตารางที่ 4

	Input phage	Output phage
1 st round	1.1×10^{12}	3.0×10^6
2 nd round	7.5×10^{11}	2.0×10^5
3 rd round	2.5×10^{11}	1.6×10^5
4 th round	6.3×10^{11}	3.6×10^5

ตารางที่ 3 และ 4 แสดงการทำ panning โดยไม่มีการเพิ่ม stringency และแสดงปริมาณฟาจ Input และ output ที่ได้

3.5 การทดสอบความจำเพาะของฟาจที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี ELISA

3.5.1 การทำ phage pool ELISA เพื่อแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของ specific phage clone ในแต่ละรอบ ซึ่งพบว่าในแต่ละรอบของ output phage ที่ได้ มีปริมาณของ phage clone ที่จำเพาะกับแอนติเจนที่เราสนใจมากขึ้น ดังแสดงได้ในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA โดยวัดค่าที่ OD405

Blue color show the expression level control without H5 antigen coated

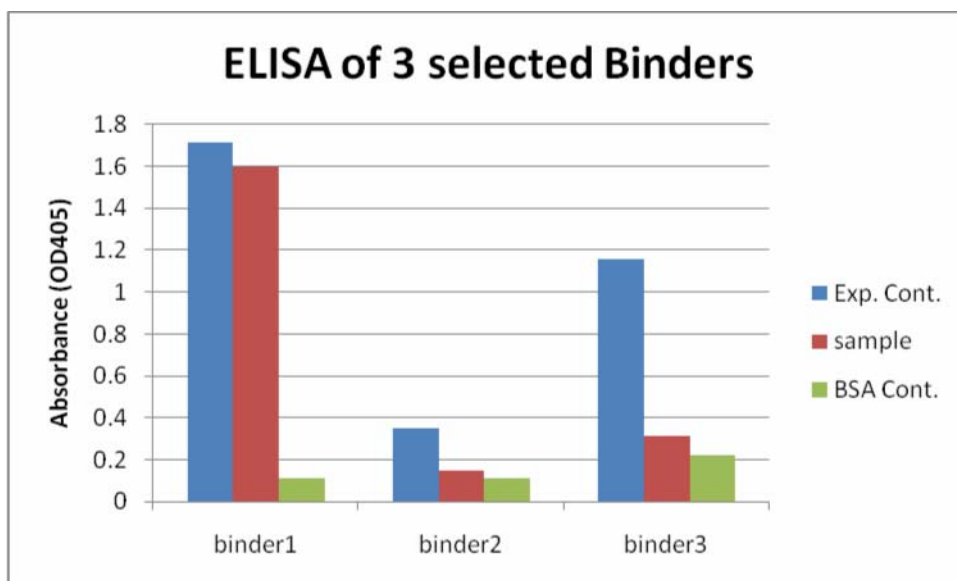
Red color show the amount of signal of sample

Yellow color show the ELISA signal from negative control with BSA

3.5.2 การคัดเลือก single clone ของฟาจที่จับเฉพาะกับ H5 แอนติเจน

จาก single clone ทั้งหมดที่คัดเลือกมาแบบสุ่มจาก output plate ของการคัดเลือกรอบที่ 3 และ 4 ทั้งหมด 86 clones เพื่อมาทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี ELISA พบว่ามี 3 clone ที่ให้ผลของ ELISA เป็นบวก (data not shown)

3.5.3 การทำ ELISA เพื่อยืนยันผลของ binder ทั้ง 3 clone ที่คัดเลือกได้

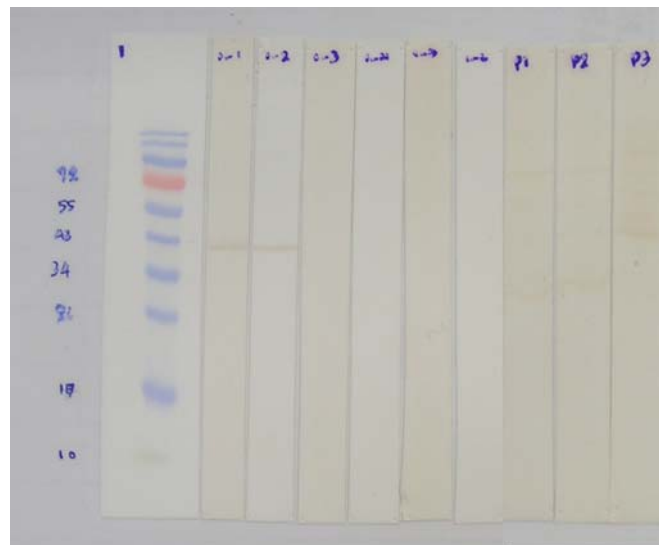


จากผลการทำ ELISA เพื่อยืนยันพบว่า binder 1 เป็น clone ที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตามทั้ง 3 clone นี้ได้นำไปทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี Western Blot อีกครั้งหนึ่ง

3.6 การทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี Western Blotting

จากการทดสอบความจำเพาะของ binder ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ตัว ด้วยวิธี Western Blotting Binder 1 สามารถจับกับ Hemagglutinin antigen ได้อย่างจำเพาะ ดังแสดงได้จากรูปที่ 5

รูปที่ 5



Lane 1: Prestained Protein ladder (Fermentus)

Lane 2: H5 Ag + Fab supernatant of binder 1

Lane 3: H5 Ag + Fab supernatant of binder 1 (1:10)

Lane 4: H5 Ag + Fab supernatant of binder 2

Lane 5: H5 Ag + Fab supernatant of binder 2 (1:10)

Lane 6: H5 Ag + Fab supernatant of binder 3

Lane 7: H5 Ag + Fab supernatant of binder 3 (1:10)

Lane 8: Fab positive of binder 1

Lane 9: Fab positive of binder 2

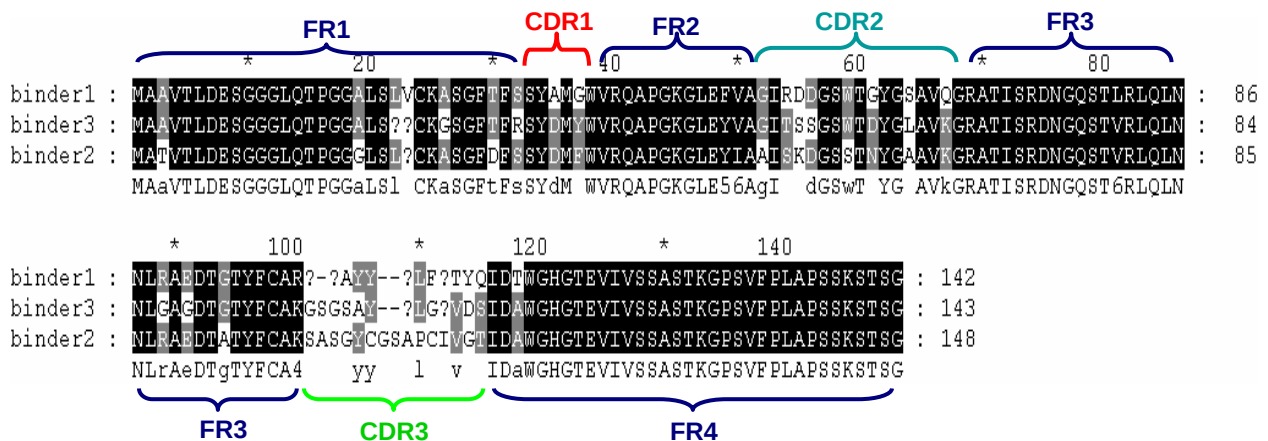
Lane 10: Fab positive of binder 3

จากผลการทดลองพบว่า binder 1 สามารถจับกับ H5 Ag ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งจะเห็นได้จาก band ที่เกิดขึ้นที่ขนาดประมาณ 40 kDa ซึ่งเป็นขนาดของ Hemagglutinin protein

3.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของแอนติบอดียีนของ single clone ที่คัดเลือกได้

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของแอนติบอดีที่ได้กับแอนติบอดียีนของไก่จาก database พบว่ามีค่าความเหมือนที่ 93% homology

และเมื่อนำลำดับเบสนี้มาเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโน และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของไก่ และเปรียบเทียบระหว่าง clone ที่คัดเลือกมาได้พบว่าทั้ง 3 clone มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในส่วน variable region โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ CDR3 region ดังแสดงได้ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ heavy chain ของทั้ง 3 binders

อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการคัดเลือกฟาจที่จับเฉพาะกับแอนติเจน H5 จากที่คัดเลือกมาทั้งหมด 86 clones พบว่ามีเพียง 3 clones เท่านั้น ที่ให้ผลบวกจากการทดสอบด้วยวิธี ELISA อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Western Blotting ยังพบว่าแอนติบอดีที่คัดเลือกมาไม่สามารถจับกับแอนติเจนอย่างมีความจำเพาะ คณะผู้วิจัยจึงได้คิดแก้ปัญหาโดยการสร้างแอนติบอดีไลบรารีใหม่ ซึ่งในครั้งนี้จะทำการสร้างไลบรารีจากม้ามของไก่ที่ฉีดเชื้อด้วย recombinant protein ของ H5 และ M1 แอนติเจน ซึ่งจะทำการสร้างไลบรารีที่เฉพาะกับ H5 และ M1 แอนติเจน ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการคัดเลือกแอนติบอดีที่จับเฉพาะกับแอนติเจนดังกล่าวต่อไป โดยในขณะนี้ได้ทำการฉีด recombinant protein ดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว และทำการวัดค่าภูมิคุ้มกันของไก่ที่ได้ด้วยวิธี ELISA และ confirm ด้วยวิธี Western Blot อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งผลการทดลองทั้งหมดได้แสดงไว้ในส่วนต่อไป ดังนี้

1. การฉีดไก่ด้วย recombinant protein H5 และ M1

ไก่ที่เลี้ยงด้วยวิธีปลอดเชื้อ จำนวน 3 ตัว จะถูกฉีดด้วย recombinant protein H5 ปริมาณ 150 µg ที่ผสมกับ adjuvants alpha-tocopherol (vitamin E) based ในอัตราส่วน 1:1 โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยเว้นช่วงระหว่างการฉีดแต่ละครั้งเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการฉีดกระตุ้นทั้งสิ้น 4 ครั้ง โดยก่อนฉีดแต่ละครั้งจะทำการเจาะเลือดไก่เพื่อนำ serum ไก่มาใช้ในการทำ ELISA และ Western Blot

เช่นเดียวกัน สำหรับ recombinant protein M1 จะฉีดไก่เป็นจำนวน 5 ตัว ในปริมาณ 250 µg/ครั้ง โดยผสมกับ adjuvants alpha-tocopherol (vitamin E) based ในอัตราส่วน 1:1 โดยเว้นช่วงระหว่างการฉีดแต่ละ

ครั้งเป็นเวลา 7 วัน และทำการฉีดกระตุ้นทั้งหมด 4 ครั้งโดยก่อนฉีดแต่ละครั้งจะทำการเจาะเลือดไก่เพื่อนำ serum ไก่มาใช้ในการทำ ELISA และ Western Blot โดยรายละเอียดการฉีดกระตุ้น และการเจาะเลือดได้แสดงไว้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 รายละเอียดการฉีดกระตุ้น และการเจาะเลือดไก่

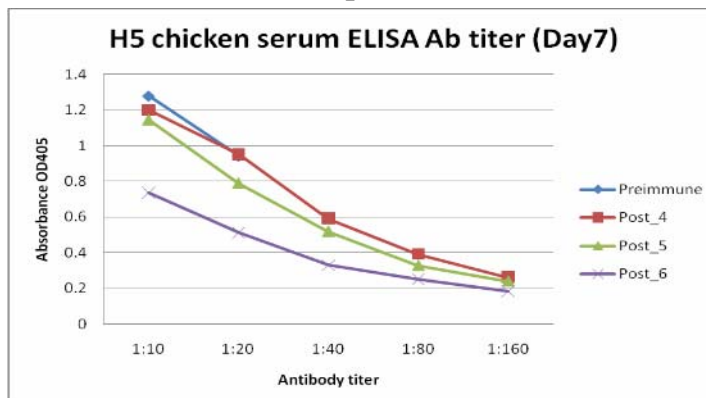
Chicken No.	Day0 (1 st)	Day7 (2 nd)	Day14 (3 rd)	Day21	Day28	Day35
4	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml เก็บม้าม
5	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml เก็บม้าม
6	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	เจาะเลือด 1 ml	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (H5)	ไก่ตาย
1	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml เก็บม้าม
2	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml เก็บม้าม
3	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml เก็บม้าม
7	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml เก็บม้าม
8	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml	เจาะเลือด 1 ml ฉีดกระตุ้น (M1)	เจาะเลือด 1 ml เก็บม้าม

2. การทดสอบหาความเข้มข้นของภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนที่สนใจด้วยวิธี ELISA

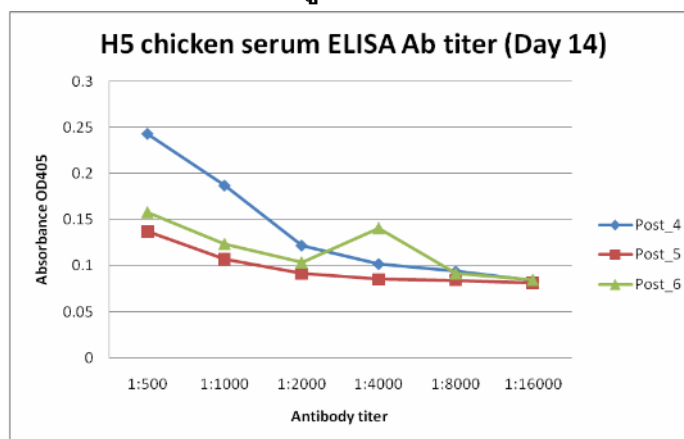
แอนติเจนที่สนใจ (H5 และ M1) จะถูก coat ลงบน microtiter plate ปริมาณ 300 ng/well จากนั้นจึงนำมาเติมซีรัมของไก่ที่ dilute ไว้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600) จากนั้นจึงเติม secondary antibody Anti-chicken IgY-HRP conjugated แล้ว develop สีด้วย ABTS substrate จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ซึ่งผลการทำ ELISA ได้แสดงไว้ตามรูปที่ 7 และ 8

รูปที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ของ H5 แอนติเจน กับ serum ไข่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (7a : Day7, 7b : Day14, 7c : Day21, 7d : Day28, 7e : Day35)

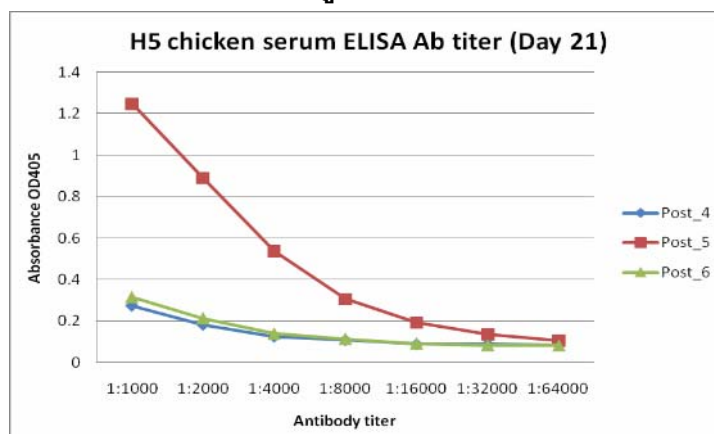
รูปที่ 7a



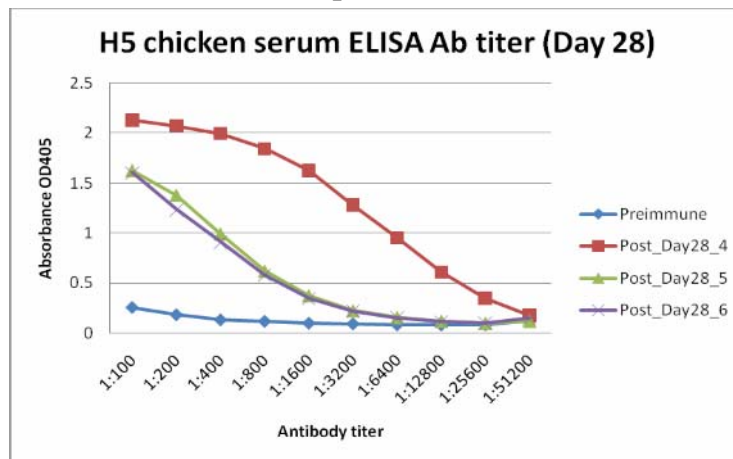
รูปที่ 7b



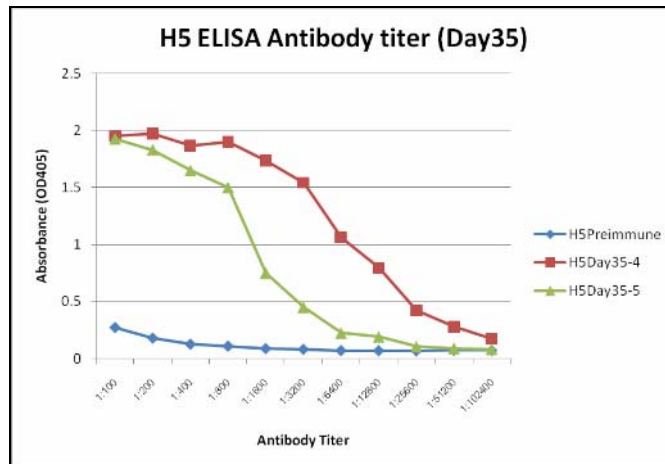
รูปที่ 7c



รูปที่ 7d

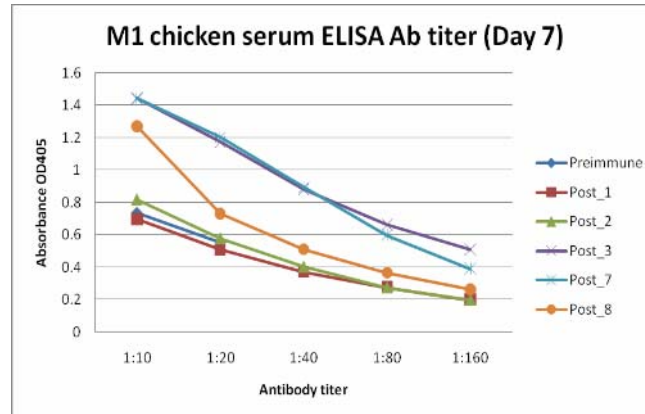


รูปที่ 7e

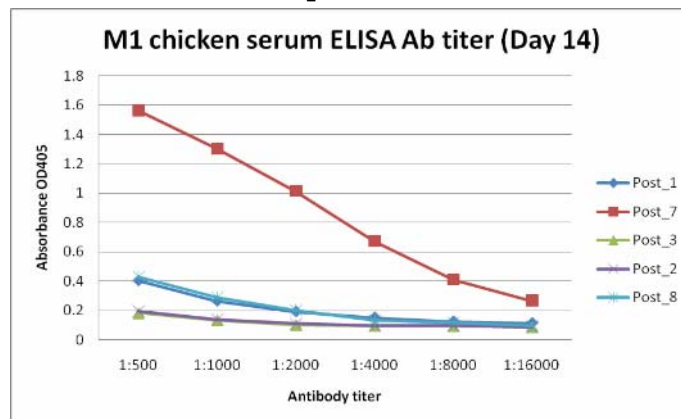


รูปที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA จอง M1 แอนติเจน กับ serum ไข่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (8a : Day7, 8b : Day14, 8c : Day21, 8d : Day28, 8e : Day35)

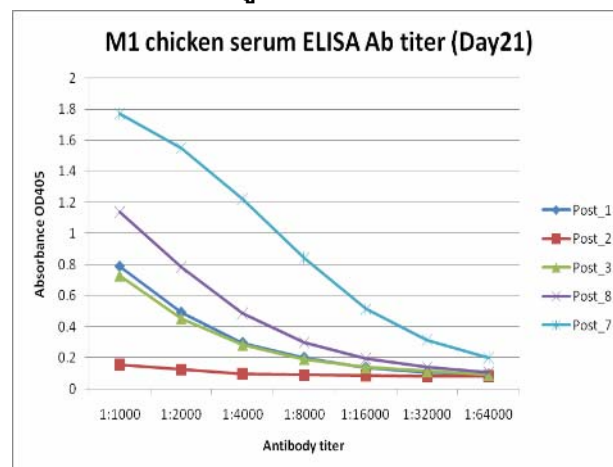
รูปที่ 8a



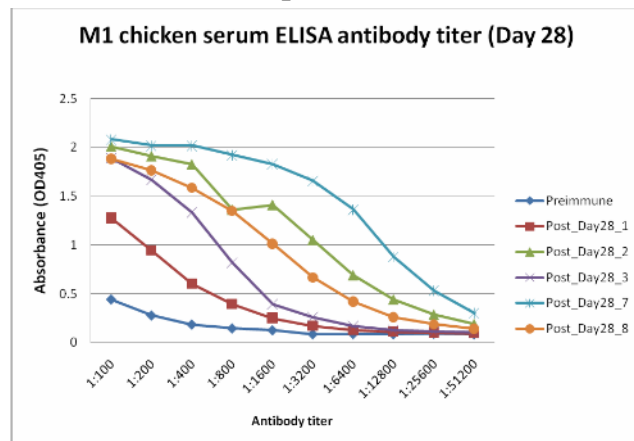
รูปที่ 8b



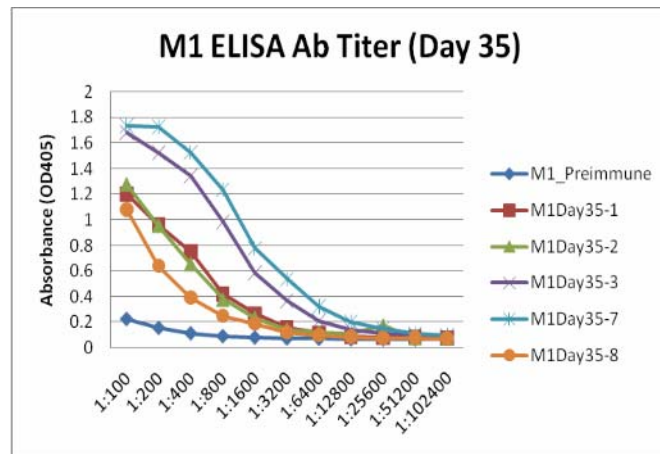
รูปที่ 8c



รูปที่ 8d



รูปที่ 8e



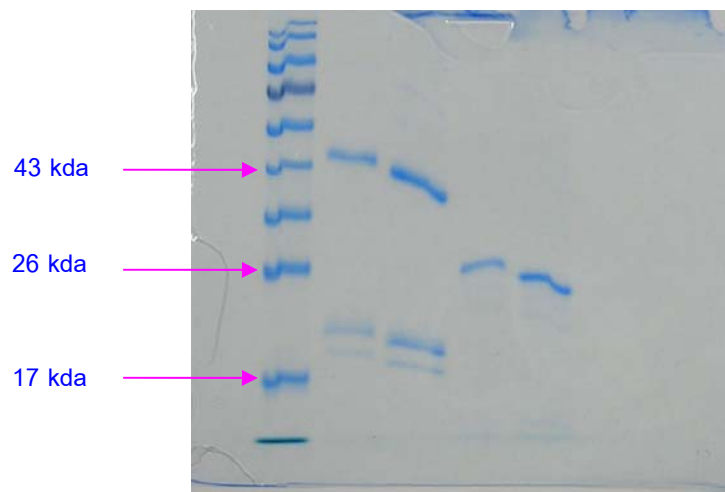
จากผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA ทำให้สามารถคาดประมาณค่า Antibody Titer ของไก่แต่ละตัวได้ดังนี้

- ไก่ตัวที่ 4 (H5 Ag) ได้ค่า Ab titer ที่ 1:12800
- ไก่ตัวที่ 5 (H5 Ag) ได้ค่า Ab titer ที่ 1:3200
- ไก่ตัวที่ 1 (M1 Ag) ได้ค่า Ab titer ที่ 1:1200
- ไก่ตัวที่ 2 (M1 Ag) ได้ค่า Ab titer ที่ 1:1200
- ไก่ตัวที่ 3 (M1 Ag) ได้ค่า Ab titer ที่ 1:2400
- ไก่ตัวที่ 7 (M1 Ag) ได้ค่า Ab titer ที่ 1:3200
- ไก่ตัวที่ 8 (M1 Ag) ได้ค่า Ab titer ที่ 1:400

3. การทดสอบความจำเพาะของ serum ไก่กับแอนติเจนที่ใช้ด้วยวิธี Western Blot

แอนติเจน (H5 หรือ M1) ปริมาณ 500 ng จะถูกนำมา run ใน polyacrylamide gel จากนั้นจึง transfer ลง PVDF membrane แล้วจึงนำมาจับกับ serum ไก่ของวันที่ 35 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงได้ดังรูปที่ 9 และ

รูปที่ 9 แสดง SDS-PAGE ของโปรตีน H5 และ M1



Lane 1: PageRuler Prestained protein ladder (Fermentus)

Lane 2: 500 ng of H5 protein (HA1 domain at 40 kda, HA2 domain at 20 kda)

Lane 3: 1000 ng of H5 protein (HA1 domain at 40 kda, HA2 domain at 20 kda)

Lane 4: 500 ng of M1 protein at 27 kda

Lane 5: 1000 ng of M1 protein at 27 kda

รูปที่ 10 แสดงผลการทำ Western blot เพื่อดูความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้จาก serum ไข่ กับ
แอนติเจน H5 และ M1

รูปที่ 10.1 แสดงผลการ Western blot เพื่อดูความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้จาก serum ไข่ กับ
แอนติเจน H5 และ M1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



Lane 1: PageRuler Prestained protein ladder (Fermentus)

Lane 2: H5 protein + H5 chicken serum preimmune at dilution 1: 500

Lane 3: H5 protein + H5 chicken serum chicken number 4 at dilution 1: 8000

Lane 4: H5 protein + H5 chicken serum chicken number 5 at dilution 1: 2000

Lane 5: H5 protein + H5 chicken serum chicken number 5 at dilution 1: 4000

Lane 6: M1 protein + M1 chicken serum preimmune at dilution (1:500)

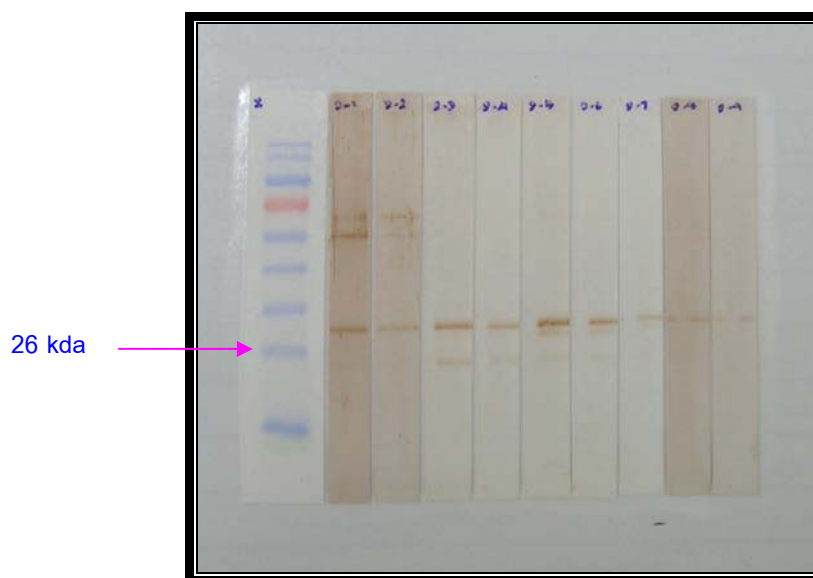
Lane 7: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 1 at dilution 1:800

Lane 8: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 1 at dilution 1:1600

Lane 9: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 8 at dilution 1:800

Lane 10: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 8 at dilution 1:1600

รูปที่ 10.2 แสดงผลการ Western blot เพื่อดูความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้จาก serum ไก่ กับ แอนติเจน M1



Lane 1: PageRuler Prestained protein ladder (Fermentus)

Lane 2: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 2 at dilution 1:800

Lane 3: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 2 at dilution 1:1600

Lane 4: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 2 at dilution 1:3200

Lane 5: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 3 at dilution 1:1600

Lane 6: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 3 at dilution 1:3200

Lane 7: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 3 at dilution 1:6400

Lane 8: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 7 at dilution 1:4000

Lane 9: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 7 at dilution 1:8000

Lane 10: M1 protein + M1 chicken serum chicken number 8 at dilution 1:16000

เอกสารอ้างอิง

1. Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. (2000) Phage Display: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
2. Harlow E, Lane D. (1988) Antibodies: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
3. Quintero-Hernandez V, Juarez-Gonzalez VR, Ortiz-Leon M, Sanchez R, Possani LD, Becerril B. (2007) The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies. Mol Immunol. 44: 1307-1315.
4. Rothlisberger D, Honegger A, Pluckthun A. (2005) Domain interaction in the Fab fragment: A comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. J Mol Biol. 347: 773-789.

Output

1. Pitaksajakul P., Songserm T., Lekcharoensuk P., Leungwutiwong P., Barbas CF III., Ramasoota P. Construction and Selection of Fab antibody library specific to H5N1 Avian Influenza virus. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008.(ICTM 2008) International Convention Center Jeju, Jeju Island, Korea. September 29-October3, 2008.
2. Pitaksajakul P., Songserm T., Lekcharoensuk P., Leungwutiwong P., Barbas CF III., Ramasoota P. Construction and Selection of Fab antibody library specific to H5N1 Avian Influenza virus. Bangkok International Conference on Avian Influenza 2008. 23 January – 25 January 2008, Thailand.
3. Pitaksajakul P., Songserm T., Lekcharoensuk P., Leungwutiwong P., Barbas CF III., Ramasoota P. Construction and Selection of Fab antibody library specific to H5N1 Avian Influenza virus. Shizuoka University. Shizuoka, Japan. 21 January 2008.
4. Pannamthip Pitaksajakul, Taweesak Songserm, Porntipa Lekcharoensuk, Carlos F Barbas III, Pongrama Ramasoota. Construction of single chain antibody library specific to H5N1 Avian Influenza Virus. Joint International Tropical Medicine Meeting 2006. 29 Nov – 1 Dec, 2006
5. Pongrama Ramasoota. Construction of single chain antibody library specific to H5N1 Avian Influenza virus. Bird Flu Annual Meeting. 2006. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.