

รหัสโครงการ : RSA4680014

ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์คุณสมบัติของ respiratory syncytial virus fusion protein โดย phage display

ชื่อนักวิจัย : นายชัชชัย ตะยาภิวัฒนา

แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ ม.เชียงใหม่

E-mail Address : asimi002@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

ระบบการสร้าง recombinant proteins จาก *Escherichia coli* โดย phage display technique ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อสร้างส่วน F protein domains (F0, F1 และ F2) ของ respiratory syncytial virus (RSV) บน M13 filamentous phage สำหรับใช้เป็น immunogen ในการสร้าง monoclonal antibodies ต่อไป ซึ่งวิธีการนี้สามารถแสดงให้เห็นความสำเร็จเมื่อใช้ CD147 เป็นต้นแบบในการศึกษา เนื่องจาก F protein มีความซับซ้อนของโครงสร้างโมเลกุลมาก คือมีตำแหน่ง disulfide bonds หลายตำแหน่ง และมีส่วนที่เป็น hydrophobic มาก ทำให้การ display F protein เป็นไปได้ได้น้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้เป็น immunogen ได้ แต่ได้นำไปใช้พิสูจน์ความสามารถของ phage-displayed F2 domain ในการยับยั้งการเข้าสู่ HeLa cell ของ RSV ได้ จากประสิทธิภาพที่ต่ำในการ display F protein domain ผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่าอาจเกิดจากการพับทบของโมเลกุลอย่างรวดเร็วภายใน cytoplasm ทำให้ F protein ไม่สามารถนำส่งผ่าน Sec machinery ได้ ผู้วิจัยจึงพัฒนา phagemid ใหม่ที่นำส่ง completely folded polypeptide ผ่าน Tat pathway ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่า phagemid ที่ใช้โดยทั่วไปซึ่งอาศัย Sec pathway เมื่อใช้ CD147 เป็นต้นแบบในการศึกษา แต่เมื่อนำ phagemid ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการ display F protein ปรากฏว่าไม่สามารถแก้ปัญหาได้ ซึ่งอาจเกิดจากพื้นที่จำกัดของ periplasm ทำให้ปริมาณ F protein ที่แสดงบน M13 มีไม่มากพอ ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาระบบใหม่ในการสร้าง recombinant protein ที่เชื่อมต่อกับ biotin carboxyl carrier protein (BCCP) เพื่อทำ *in vivo* biotinylation ภายใน high oxidizing cytoplasm ของ *E. coli* Origami B strain และทำการแยก recombinant fusion protein ด้วย streptavidin coated magnetic bead เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้น BALB/c สำหรับเตรียม hybridoma โดยใช้ survivin เป็นต้นแบบ และประสบความสำเร็จได้ monoclonal antibodies ที่ดี จึงได้นำเทคโนโลยีใหม่ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในการสร้าง recombinant F-BCCP fusion protein ปรากฏว่าสามารถสร้าง monoclonal anti-F2 antibodies ซึ่งยังไม่มีผู้ผลิตได้ เทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นนี้ทำให้สามารถสร้าง monoclonal anti-F1 antibodies ได้อีกหลาย clones ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการพิสูจน์เอกลักษณ์ monoclonal anti-F domains จะถูกนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการรักษาโรค และงานวิจัยพื้นฐานต่อไป

**Keywords :** phage display technique, F protein, BCCP, monoclonal antibody

## Abstract

---

**Project Code :** RSA4680014

**Project Title :** Analysis of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein using Phage Display

**Investigator :** Mr. Chatchai Tayapiwatana

Div. of Clinical Immunology, Fac. of Associated Medical Sciences  
Chiang Mai University

**E-mail Address :** asimi002@chiangmai.ac.th

**Project Period :** 3 year

Phage display technology was firstly selected for displaying F protein domains of respiratory syncytial virus i.e. F0, F1 and F2 on M13 filamentous phage particle. The displayed molecules were aimed to use as an immunogen for monoclonal antibody production. This strategy has been previously reported in production of anti-CD147 antibodies. Regarding the complexity of F protein, high number of disulfide bonds and hydrophobicity, the displayed F protein domains was lower than expectation, thus, not suitable for using as an immunogen. However, the constructed phage-displayed F2 domain demonstrated the blocking phenomenon of RSV infection in HeLa cell. To overcome the problem of low displaying level, the novel phagemid delivering the recombinant molecule *via* Tat pathway was constructed. This innovated technique was successfully demonstrated higher level of displaying of CD147 molecule than Sec pathway. Anyway, it could not solve the problem in case of F protein which presumably due to small periplasmic space. Thus, we introduced another technique for producing recombinant protein in high oxidizing cytoplasm of *E. coli* Origami B strain. The recombinant protein was fused with biotin carboxyl carrier protein (BCCP) for *in vivo* biotinylation. The produced molecule could be easily sorted out by streptavidin coated magnetic bead for being an immunogen. The technique was proved for its success in production of monoclonal anti-survivin antibodies. When applied to F protein domain, a hybrid secreting novel anti-F2 antibody was generated. In addition, this strategy has been currently used for production of monoclonal anti-F1 domain. Many clones are generated and being characterized. These mAbs will be further validated for their potential for therapeutic purposes and basic researches.

**Keywords :** phage display technique, F protein, BCCP, monoclonal antibody