RSA4680014 ผศ.ดร.ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์คุณสมบัติของ respiratory syncytial virus fusion protein โดย phage display

ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา

สิงหาคม 2549

ห้องสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์คุณสมบัติของ respiratory syncytial virus fusion protein โดย phage display

ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา

สิงหาคม 2549

สัญญาเลขที่ RSA4680014

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์คุณสมบัติของ respiratory syncytial virus fusion protein โดย phage display

ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา
แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนประเภท ทุนพัฒนานักวิจัย ประจำปี 2546 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณาจารย์, บุคลากร และนักศึกษา ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ที่มีส่วนร่วมอำนวยความสะดวก และสนับสนุนในเชิงวิชาการ โดยเฉพาะ รศ.ดร.วัชระ กสิณฤกษ์ ที่สนับสนุนการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี ตลอดการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ช่วยประสานงานทุกด้าน

ท้ายนี้ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.สถิตย์ สิริสิงห ซึ่งเปรียบเสมือนบิดาในทางวิทยาศาสตร์ของผู้วิจัย

บทคัดย่อ

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 เป็นไปได้น้อยกว่าที่คาดการไว้ 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 periplamic 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-survivn 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

สารบัญ

	PAGE
บทนำ	1
วิธีทำ และ ผลการทดลอง	3
สรุป และ วิจารณ์	41
ผลที่ได้รับ	42
REPRINT & ACCEPTED MANUSCRIPT	44

บทนำ

ยีนส์ที่กำหนดการสร้าง RSV F-protein ส่วนต่างๆ จาก NAB12 vector ที่มี full-length gene ของ F-protein อยู่ ได้ถูกทำการตัดต่อเข้าสู่ phagemid vector, pComb3H โดยวิธี PCR cloning technique โดยเลือกโครงสร้างหลักที่สำคัญคือ F0, F2 และ HR-1 จากนั้นทำการพิสูจน์การปรากฏอยู่ของ RSV F-gene fragments ต่างๆ โดยการตัดด้วย restriction enzymes และทำการ reamplify ชิ้นส่วนที่ตัดต่อเข้าไป พบว่าสามารถคัดเลือกโคลนของ *E. coli* สายพันธ์ TG-1 ที่มี gene กำหนดการสร้าง F-protein fragments ได้จากการตรวจสอบด้วยการทำ agarose gel electrophoresis หลังจากนั้น phagemids ที่ได้จะถูกนำไปสร้าง F-protein fragments เพื่อนำเสนอบน phage particle เนื่องจากมีรายงานการศึกษาพบว่า F2 protein เป็นบริเวณสำคัญในการเข้าสู่เซลล์อย่าง species specific และยังไม่มีผู้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อส่วนต่างๆบน F2 ได้ ดังนั้น F2 จึงเป็น F-protein fragment แรกที่จะทำการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี ก่อนที่จะทำการสร้าง phage-displayed F2 ได้ดำเนินการหาลำดับ DNA ของ F2 gene ที่โคลนเข้าสู่ pComb3H พบว่า insert gene ที่ได้เป็น F2 fragment จริง phage-displayed F2 ได้ถูกสร้างจาก TG-1 โดยได้ปรับสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมจนได้ phage ที่มีการแสดงออกของ F2 ได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถทำการพิสูจน์การแสดงออกของ F2-gp3 fusion protein โดยวิธี Western blotting จากนั้นนำ phage-displayed F2 ไป immunize BALB/c mouse เพื่อกระตุ้นการตอบสนองต่อส่วน F2 โดยอาศัย phage particle เป็น carrier protein และ T-cell epitope เนื่องจาก F2 มีขนาดที่เล็กมาก (10 kDa) ซึ่งไม่เป็น immunogen ที่ดี polyclonal antibody ใน immunized mouse ได้ถูกนำมาทดสอบเพื่อหา anti-RSV components โดยวิธี indirect ELISA พบว่า antibodies ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับ RSV particle ที่ได้รับมาจาก Dr. Mark E. Peeples (ที่ปรึกษาโครงการ) ได้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า phage มีการแสดงออกของ F2 และ F2 สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูเพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ ดังนั้นจึงได้ทำการเตรียม hybridoma โดยใช้ spleen cell จาก phage-displayed F2 immunized mouse ต่อไป ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการ screen clones ที่สร้างแอนติบอดีอยู่ การศึกษาในขั้นนี้จะใช้เป็นระบบต้นแบบสำหรับ F-protein fragments อื่นต่อไป

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบ binding activity ของ F2 ที่ปรากฏบน phage particle ว่าสามารถจับได้กับ RSV particle ได้หรือไม่ เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโครงสร้างของ F-protein ในบริเวณ F2 และ HR-1 และ HR-2 มีลักษณะเป็น heptad repeat ซึ่งมีความสำคัญต่อการผ่านเข้าสู่ผลังเซลล์เมื่อมีการติดเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า phage-displayed F2 สามารถจับได้กับ RSV particle อย่างจำเพาะเมื่อเทียบกับ phage control โดยใช้วิธี ELISA ที่ประยุกต์เพื่อนำมาศึกษาการจับกัน ขณะนี้ทาง Dr. Peeples ได้ให้ความสนใจมากเนื่องจากยังไม่มีผู้รายงานมาก่อน และได้ส่ง Parainfluenza virus มาให้เพื่อทำการทดสอบยืนยัน

ความจำเพาะ การค้นพบนี้อาจนำไปสู่การศึกษาวิธีการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสเพื่อใช้ในการรักษาได้

วิธีทำ และ ผลการทดลอง

สร้าง, ตรวจสอบ และคัดเลือก phagemids ที่มียีนส์ของ F protein fragments

ในการนำเสนอครั้งนี้จะขอใช้ตัวอย่างการเตรียม phagemid ที่มีชิ้นส่วนของ F2 fragment เป็นหลัก เนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการทบทวนวารสารและพบว่าเป็นส่วนที่น่าจะมีความสำคัญมากที่สุด เนื่องจากมีรายงานว่า F2 มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงจากสัตว์ต่างสายพันธ์กัน อีกทั้งยังไม่มีผู้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อส่วน F2 มาก่อน ดังนั้นในรายงานขั้นต้นนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาคุณสมบัติของ F2 เป็นหลัก

ออกแบบชุด primers เพื่อใช้ในการทำ PCR

ลำดับเบสที่กำหนดการสร้าง F protein ซึ่งสืบค้นจากฐานข้อมูล Genbank (accession no. U39661) ได้ถูกนำมาออกแบบ primers เพื่อเพิ่มจำนวนสาย polynucleotide กำหนดการสร้าง F-protein fragments จากต้นฉบับ (template) ที่ปรากฏอยู่ใน NAB12 vector (ได้รับจาก Dr. Mark E. Peeples) โดย polymerase chain reaction ดังแสดง เนื่องจาก amplified products ที่ได้จะถูกนำไปตัดต่อเข้าสู่ pComb3H phagemid ในตำแหน่ง Sfi I cloning sites (รูปที่ 1) ดังนั้น primers ทุกสายจึงต้องออกแบบให้มี 5' overhang ของ Sfi I (ตัวอักษรขีดเส้นใต้) สำหรับตำแหน่งของ primers ที่จะเข้าจับ (anneal) กับ template กำหนดให้เป็นตัวอักษรเอียง

F0 (coding for amino acid no. 24-524)

F24Ex 5'GAGGAGGAGGTGGCCCAGGCGGCC*TCTGGTCAAAACATCACT* 3'

F524Ex 5'GAGGAGGAGCTGGCCGGCCTGGCC*ATTTGTGGTGGATTTACC* 3'

HR-1 (coding for amino acid no. 153-209)

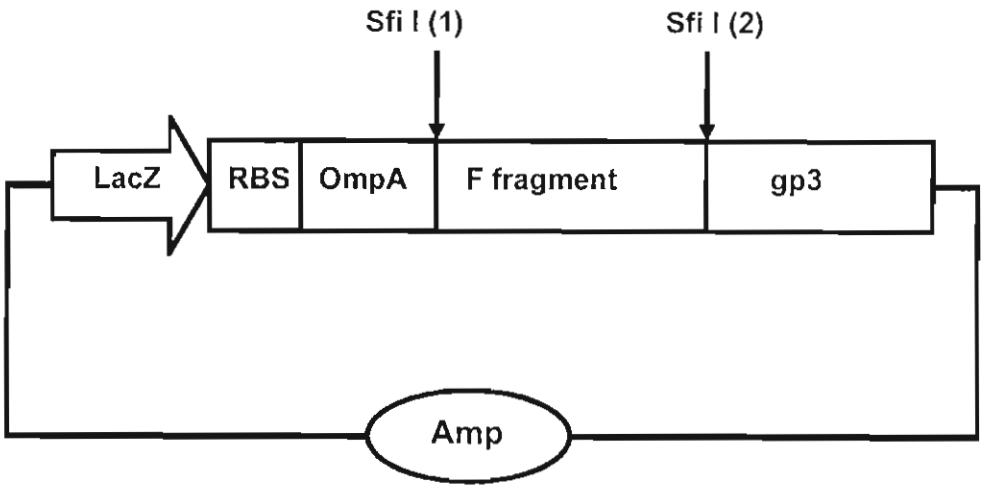
F153EX 5'GAGGAGGAGGTGGCCCAGGCGGCC*GTATCTAAGGTCCTGCAC* 3'

F209EX 5'GAGGAGGAGCTGGCCGGCCTGGCC*TTGCTTGTTCACAATAGG* 3'

F2 (coding for amino acid no. 24-109)

F24Fw 5' GAGGAGGAGGTGGCCCAGGCGGCC*TCTGGTCAAAACATC* 3'

F109Rev 5' GAGGAGGAGCTGGCCGGCCTGGCC*TCTTCTGGCTCGATT* 3'



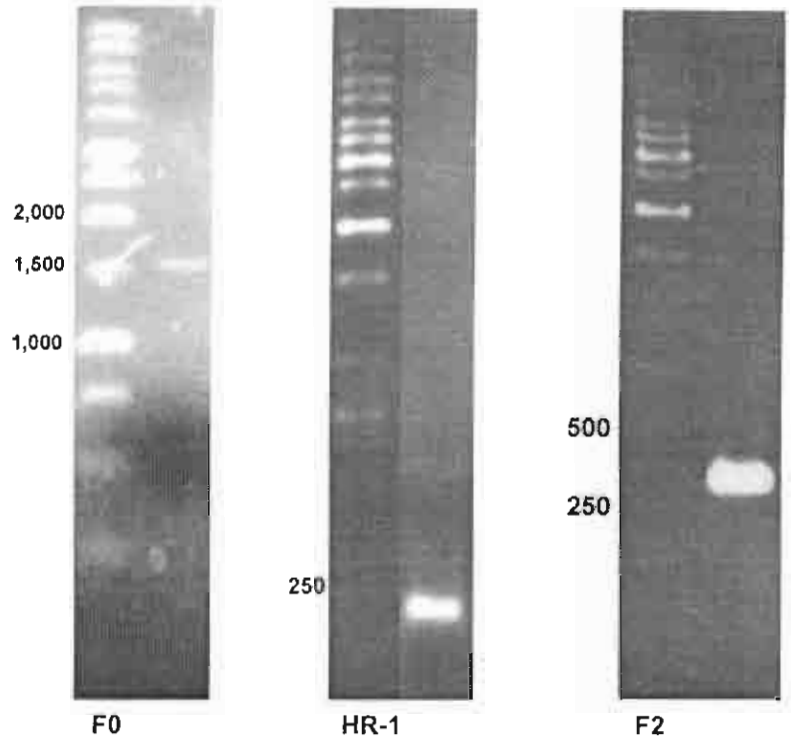
รูปที่ 1 แสดงแผนภาพของ pComb3H phagemid ที่ใช้ในการตัดต่อชิ้นส่วนของ F-protein fragments เข้าสู่ตำแหน่ง Sfi I

การเพิ่มจำนวน polynucleotide โดยวิธี PCR

NAB12 ได้ถูกนำมาใช้เป็น template สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ F-protein ส่วนต่างๆ โดยใช้ primers ชุดที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น และใช้ Proofstart DNA polymerase (QIAGEN) ในการเพิ่มจำนวน ภายใต้โปรแกรมดังนี้

hot start, 85^{0}C (4 นาที); denaturation, 95^{0}C (50 วินาที); primer annealing, 42^{0}C (50 วินาที); primer extension, 72^{0}C (90 วินาที) ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ และเมื่อรอบสุดท้ายให้ complete extension, 72^{0}C (10 นาที)

ทำการตรวจสอบผล PCR ว่าได้ fragment ของ product ในขนาดที่ต้องการซึ่งสัมพันธ์กับการคำนวณหรือไม่โดยวิธี agarose gel electrophoresis (รูปที่ 2)



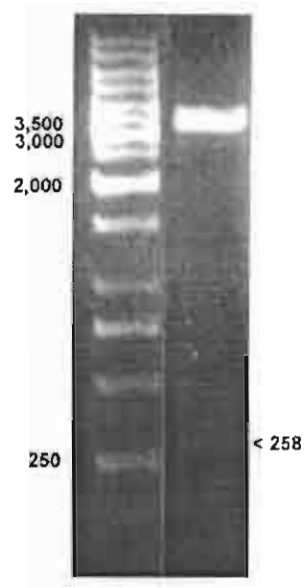
รูปที่ 2 แสดง amplified product ขนาดที่ถูกต้องของ F0 (~1.5 kbp), HR-1 (~180 bp) และ F2 (~260 bp) fragments จาก phagemid ที่เตรียมจาก TG-1 ที่ถูก transform ด้วย pComb3H ที่มีการ insert ยีนส์ที่กำหนดการสร้าง fragments ต่างๆ

การตัดต่อยีนส์ที่กำหนดการสร้าง F-protein fragments เข้าสู่ pComb3H

ผลผลิต amplified products ที่ได้จากการทำ PCR แล้วจะนำไปทำการ purify ด้วยชุดน้ำยา QIAGEN PCR purification kit เพื่อนำไปทำการตัดด้วย Sfi I restriction enzyme ทำให้ได้ปลายเหนียวที่สามารถ anneal ได้กับปลายเหนียวของ Sfi I ที่ปรากฏอยู่บน pComb3H phagemid (ได้รับจาก Dr. Carlos Barbas) ซึ่งได้ทำการตัดเปิดช่องด้วย Sfi I ไว้แล้ว และทำการเชื่อมต่อสาย insert เข้ากับ phagemid ด้วยเอนไซม์ DNA ligase (Fermentas) ที่ 4^{0}C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำ ligated products ที่ได้ไปทำ transformation เข้าสู่ *E. coli* สายพันธ์ TG-1 หรือ XL-1 Blue โดยวิธีมาตรฐาน จากนั้นนำ transformed *E. coli* ไปเทลงบน LB agar ที่มี 100 ug/ml ampicilin อยู่เพื่อคัดเลือก *E. coli* ที่รับ phagemid เข้าไป ทำการ incubate ข้ามคืนที่ 37^{0}C

เมื่อครบเวลาเลือก *E. coli* ที่เจริญบน agar มาประมาณ 5-10 colonies เพื่อทำการสกัดเอา phagemid ออกจากเซลล์ โดยวิธี alkaline lysis มาตรฐาน และตรวจสอบ product ที่เตรียมได้โดย agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการตัดด้วย Sfi I เพื่อพิสูจน์ขนาดของชิ้น PCR products ที่ได้ทำการตัดต่อเข้าสู่ pComb3H หากพบว่า *E. coli* โคลนใดมี pComb3H ที่มี

ชิ้นส่วนของยีนส์ที่กำหนดการสร้าง F-protein fragments อยู่ก็จะทำการเพิ่มจำนวนและเก็บโคลนนั้นไว้เพื่อทำการศึกษาต่อ ตัวอย่างเช่นการตัดต่อยีนส์กำหนดการสร้าง F2 (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงการตรวจสอบ recombinant phagemid ที่มียีนส์ F2 อยู่ โดยการใช้ Sfi I restriction analysis พบ insert ที่ 258 bp

นอกจากการใช้ restriction enzyme analysis แล้ว ยังได้นำเอา phagemid ที่ตัดพิสูจน์และได้ขนาดของชิ้น insert ที่ถูกต้องมาเป็น template ในการ reamplify ด้วย PCR โดยใช้ primers ชุดที่ได้ใช้ในการ amplify F-protein fragments เพื่อพิสูจน์ยืนยันว่าชิ้นส่วนของ insert ที่มีขนาดสอดคล้องกับการคำนวณนั้น เป็นส่วนที่น่าจะเป็นชิ้น insert ที่ถูกต้องจริง อย่างไรก็ตามเพื่อให้แน่ใจว่าลำดับของ nucleotide ที่กำหนด F-protein fragments ต่างๆ มีความถูกต้องก่อนที่จะทำ protein expression ได้ทำการ sequence หาลำดับของ inserted DNA ด้วยวิธี BigDye terminator kit (Phamacia) และพบว่าเป็น sequence ในส่วนของ F2 จริง

การเตรียม phage-displayed F2

เมื่อทำการคัดเลือก ที่มี phagemid ซึ่งมียีนส์กำหนดการสร้าง F2 (ตั้งชื่อว่า pComb3H-F2) ได้แล้ว จึงเตรียมผลิต phage ที่มีการสร้าง F2 fragment อยู่บนผิวของ VCSM13 phage โดยผ่านทาง gp3 ซึ่งเป็น minor coat protein ของ phage โดยวิธี phage display technique จาก *E. coli* สายพันธุ์ TG-1 จึงมีวิธีการเตรียม phage- displayed F2 อยู่ 2 วิธี ดังต่อไปนี้

The pComb3H-F2 plasmid was transformed into TG-1 strain precultured in 2X TY broth (1.6%[wt/vol] tryptone, 1%[wt/vol] yeast extract, and 0.5%[wt/vol] sodium chloride) containing ampicillin (100 ug/ml) until an OD600 of 0.8 was reached. The precultured bacteria were subsequently propagated in 100 ml of the same medium containing 2 ml of 50% glucose. After 2 h, the 30 ml of culture was infected with 2.4 ml of 10^{12} t.u. of the VCSM13 helper phage and kept at 37^{0}C or 25^{0}C without shaking for 30 min. Phage-infected TG-1 was spun down at 1100 g, 4^{0}C for 10 min. The pellet was reconstituted with 30 ml of 2X TY broth containing ampicillin (100 ug/ml) and kanamycin (70 ug/ml). Fifteen milliliters of culture was resuspended in 250 ml of the same medium and shaken at 180 rpm for 18 h at 37^{0}C or 25^{0}C. The bacteriophages were harvested by precipitation with PEG8000/NaCl solution. Finally, the phages were reconstituted with 0.15 M PBS pH 7.2 and stored at 70^{0}C.

การทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของ recombinant phage

ความเข้มข้นของ recombinant phage ที่เตรียมได้สามารถหาได้สองวิธีคือ วิธีที่ 1 ทำการเจือจาง phage solution ให้ได้ปริมาณที่เหมาะสม เพื่อ reinfect TG-1 ซึ่งเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระยะ log-phase จากนั้น plate ลงบน LB agar ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ incubate ที่ 37^{0}C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบน agar และคำนวณกลับเป็นความเข้มข้น

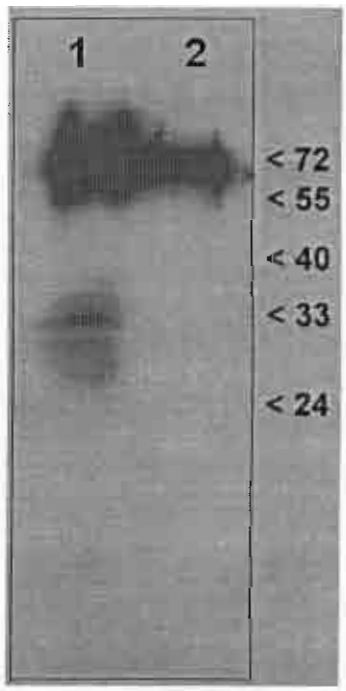
วิธีที่ 2 direct ELISA ได้ถูกนำมาใช้ในการทดสอบการปรากฏของ phage ที่เตรียมได้ โดยนำ solution ของ phage มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1:100 ใน carbonate coating buffer และเคลือบลงบนหลุมของ 96-well ELISA plate (Nunc) และตรวจสอบด้วย monoclonal anti-gp8 conjugated HRP และเติม TMB substrate เพื่อวัดระดับปฏิกิริยา เมื่อได้ค่า OD450 นำมาคำนวณเพื่อเทียบกับ standard phage เพื่อทราบความเข้มข้นต่อไป

การตรวจสอบคุณสมบัติของ phage-displayed F2 ที่เตรียมได้

Western immunoblotting

ทำการแยกโปรตีนจาก recombinant phage ที่เตรียมได้ด้วยวิธี SDS-PAGE (10^{10} t.u./lane) ในภาวะ denaturing condition โดยใช้ 12% separating gel จากนั้นทำ Western blot เพื่อส่งโปรตีนที่แยกได้ไปยัง PVDF membrane ในการตรวจสอบการสร้าง F2 จะใช้ monoclonal anti-gp3 antibody (specifically react with linear epitope) เนื่องจาก F2 จะถูกสร้างเป็น fusion protein กับ gp3 ของ phage แถบโปรตีนบน PVDF ที่มี monoclonal anti-

gp3 antibody จับอยู่จะถูกติดตามโดย rabbit anti-mouse Ig conjugated HRP และแสดงให้เห็นแถบโปรตีนจำเพาะโดยใช้ chemiluminescent substrate หากมี F2 ปรากฏอยู่ใน phage solution จะพบ extra band ที่ขนาดประมาณ 30 kDa (truncated gp3 18 kDa + F2 10 kDa) นอกเหนือจากแถบโปรตีนของ wild-type gp3 แสดงน้ำหนักโมเลกุลที่ตำแหน่ง 72 kDa ซึ่งสามารถพบได้ทั้งใน recombinant phage และ wild-type phage solution (รูปที่ 4) รูปแบบการประเมินการสร้าง recombinant protein บน phage particle นี้จะถูกนำไปใช้ในกรณีของการสร้าง F-protein fragments อื่นๆต่อไป

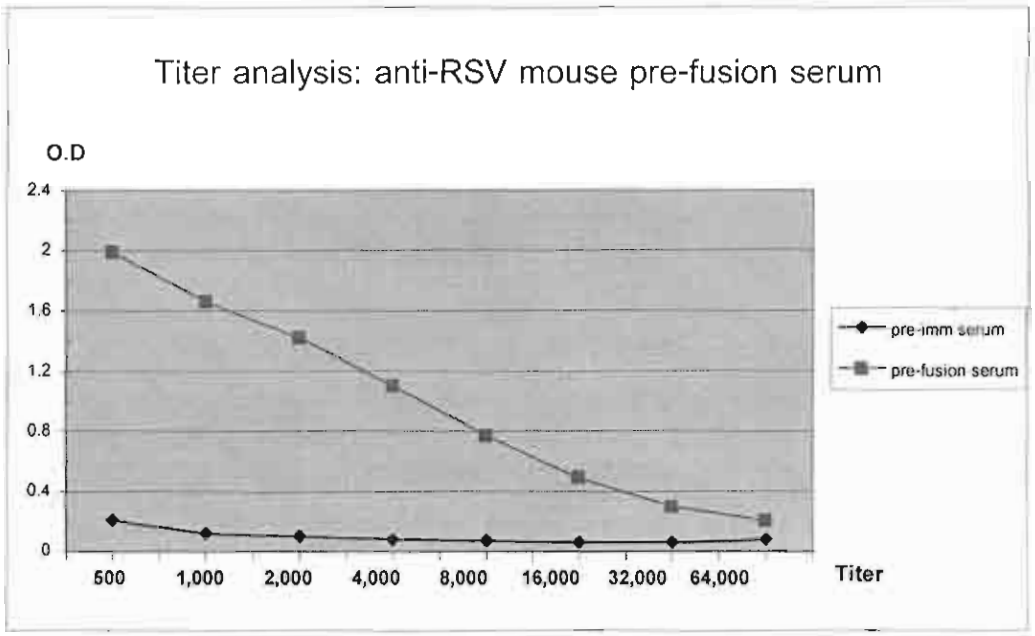


รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของ reactive band ที่ 30 kDa (lane 3) ซึ่งเป็น fusion protein ระหว่าง F2-gp3 ซึ่งปรากฏอยู่บน recombinant phage particle ที่เตรียมได้ ซึ่งถูกจับด้วย monoclonal anti-gp3 antibodies (linear epitope) โดยไม่พบแถบโปรตีนตำแหน่งนี้ใน lane 4 ซึ่งเป็น wild-type control phage มีเพียง reactive band ที่ 72 kDa ซึ่งเป็นตำแหน่งของ full-length gp3

Hybridoma production

Phage-displayed F2 ที่ผลิตขึ้นภายใต้การเพาะเลี้ยงที่หลังจาก infect ด้วย helper phage 25^{0}C ได้ถูกนำไปฉีดกระตุ้นหนู BALB/c เพื่อทดสอบการตอบสนองต่อ F2 fragment โดยฉีดกระตุ้น recombinant phage ในปริมาณคงที่ 10^{12} t.u. จำนวน 5 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ ในการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 1 มีการผสม Freund's Complete Adjuvant ส่วนครั้งที่ 2-4 มีการผสม Freund's Incomplete Adjuvant ครั้งที่ 5 ไม่มีการผสม Adjuvant ก่อนทำการฆ่าหนู

เพื่อเตรียม spleen cells ในการ fusion กับ myeloma cells (X63-Ag8.653) ต่อไป ซีรั่มที่เก็บจากหนูก่อนฆ่าได้ถูกนำมาทำการทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อทั้ง phage-displayed F2 และ RSV particle (ได้รับจาก Dr.Peeples) โดยวิธี indirect ELISA (รูปที่ 5) เพื่อตรวจสอบความเป็น immunogen ของ F2 ที่เชื่อมต่ออยู่กับ phage particle หากได้ผลบวกต่อทั้ง phage-displayed F2 และ แอนติเจน RSV particle หมายถึงหนู BALB/c มีการสร้างแอนติบอดีส่วนหนึ่งตอบสนองต่อส่วน F2 และแอนติบอดีส่วนนี้สามารถจับกับส่วนประกอบของ F2 epitope ที่ปรากฏอยู่บน RSV particle การทดสอบนี้สามารถแสดงให้เห็นว่ามีโอกาสได้ hybrid cells ที่สร้างแอนติบอดีต่อ F2 fragment ได้ ซึ่งในขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการเพาะเลี้ยง hybrid cells เพื่อตรวจสอบแอนติบอดี โดยใช้วิธี indirect ELISA ต่อไป หากสามารถคัดเลือกโคลนที่สร้างแอนติบอดีต่อ F2 fragment ได้ จะเป็นวิธีการที่สะดวกและสามารถประยุกต์ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ polypeptide ขนาดเล็กที่มีความเป็น immunogen ต่ำ โดยอาศัย phage display technique ต่อไป โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ F2 ที่ได้สามารถนำมาศึกษาเพื่อยืนยันความสำคัญของ F2 ว่าเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสต่อไปโดยวิธี neutralization



รูปที่ 5 แสดงการทดสอบระดับแอนติบอดีต่อ RSV particle จากซีรั่มของ phage-displayed F2 immunized BABL/c mouse

การทดสอบ ligand-receptor binding

นอกจากการนำ phage-displayed F2 ไปทำการกระตุ้น BALB/c เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้ว phage-displayed F2 ยังถูกนำไปทำการทดสอบการจับกับ RSV

particle เอง เนื่องจากผลการทำนายโครงสร้างโมเลกุลของ F-protein พบว่ามีบริเวณสำคัญที่มีลักษณะ heptad repeat อยู่ในส่วน F1 2 บริเวณ (HR-1 และ HR-2) และ F2 1 บริเวณ ในกรณีของ heptad repeat ในส่วนของ F1 ได้มีผู้ศึกษาจำนวนหนึ่งพบว่า heptad repeat ในส่วน HR-1 และ HR-2 มีการจับกันเอง และรวมกลุ่มกันเป็น six-helix bundle structure และส่งผลให้เกิดการแทรกผ่านของไวรัสเข้าสู่ผนังเซลล์ที่ติดเชื้อ จากการที่ F2 มีส่วน heptad repeat เช่นกันแต่ยังไม่มีผู้ทำการศึกษาความสำคัญของบริเวณนี้ มีเพียงรายงานที่สำคัญว่า F2 มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อแบบ species specific ดังนั้นจึงได้ใช้ประโยชน์จาก phage-displayed F2 ที่ผลิตขึ้นเพื่อศึกษาว่ามีการจับกับ RSV particle หรือไม่

การทดสอบถูกแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะโดยประยุกต์เทคนิค ELISA ในการทดสอบคือ
แบบที่ 1 ทำการเคลือบหลุมด้วย RSV particle ล้างแล้วเติม phage-displayed F2 ล้าง จากนั้นทำการติดตามการจับกันด้วย monoclonal anti-gp8 conjugated HRP (ตารางที่ 1)
แบบที่ 2 ทำการเคลือบหลุมด้วย phage-displayed F2 ล้างแล้วเติม RSV particle ล้าง จากนั้นทำการติดตามการจับกันด้วย monoclonal anti-F1 antibodies clone 1243 (ได้รับจาก Dr.Peeples) ปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายถูกติดตามด้วย rabbit anti-mouse Ig conjugated HRP (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 การจับกันระหว่าง RSV particle (target) กับ phage-displayed F2

Phage / Coat	Phage-displayed F2 10^{11} t.u	Wild-type M13 10^{11} t.u	No phage
RSV	1.38	0.23	0.06
No coat	0.10	0.06	Not done

ตารางที่ 2 การจับกันระหว่าง phage-displayed F2 (target) กับ RSV particle

Coat	RSV	
	+	-
Phage- displayed F2	0.86	0.21
Wild-type M13	0.26	0.19

หมายเหตุ ทั้งสองตารางแสดงค่าเปรียบเทียบเป็น absorbance unit ที่ OD 450 nm หลังจากเติม TMB substrate

การทดสอบครั้งนี้สามารถแสดงให้เห็นว่า recombinant phage สามารถจับได้กับ RSV particle ได้อย่างจำเพาะ จึงสามารถสรุปได้ว่า มีโมเลกุลบางอย่างบน RSV particle ที่ F2 สามารถเข้าจับได้ โดย control phage ไม่สามารถจับได้ การค้นพบนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการกลไกเข้าสู่เซลล์ของไวรัส และอาจนำองค์ความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการติดเชื้อได้ โดย phage-displayed F2 นี้จะถูกนำไปศึกษาการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของ RSV ในหลอดทดลองภายใต้ความร่วมมือกับ Dr.Peeples ต่อไป หากพบความสามารถในการยับยั้งจริงจะทำการศึกษาโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการจับของ F2 บน RSV เพื่อให้ได้ข้อมูลใหม่

การสร้าง phagemid ใหม่ที่อาศัย Tat pathway

เนื่องจากการทดสอบการแสดง F0 full-length บน phage particle ยังไม่สามารถตรวจสอบ recombinant F0-gp3 fusion protein ได้ จึงได้ทำการสร้าง phagemid ใหม่โดยดัดแปลง pComb8 จากการใช้ Sec pathway ในการส่ง protein สู่ periplasm เป็น Tat pathway ซึ่งโครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งที่ได้รับทุนส่งเสริมกลุ่มนักวิจัยอาชีพจาก BIOTEC ซึ่งมี รศ.ดร.วัชระ กษิณฤกษ์ เป็นหัวหน้าโครงการ จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่า Tat pathway สามารถส่ง protein เพื่อนำเสนอบน phage particle ได้ดีกว่าเมื่อทดสอบโดยใช้ CD147 เป็นโมเลกุลต้นแบบในการศึกษา ดังนั้นการศึกษาในระยะต่อไปสำหรับ F0 ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนและมีขนาดใหญ่ จะมีการเปลี่ยน phagemid จาก pComb3H เป็น pTat8 ซึ่งได้สร้างสำเร็จแล้วแทน

สร้าง phage-diplayed F2 โดย Tat pathway และผลิต hybridoma

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถผลิตโคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ โคลนที่ได้ตอบสนองต่อ phage M13 protein อาจเนื่องจากความเป็น immunogen ของ F2 ต่ำ หรือมีการแสดง F2 บน phage น้อยมาก อุปสรรคสำคัญคือไม่มีโมโนโคลนอลต่อ F2 ที่สามารถใช้ทดสอบการแสดง F2 ได้ อย่างไรก็ตามวิธีการแสดง F2 ผ่าน Tat pathway ผู้วิจัยพบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่า Sec pathway เมื่อใช้ CD147 เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยได้แนบ manuscript มาด้วย

ผลิต hybridoma จากหนูที่ฉีดกระตุ้นโดย RSV

ไม่สามารถผลิตโมโนโคนอลได้ เนื่องจาก myeloma ที่ใช้มีการ contaminate ของ Mycoplasma

การผลิต recombinant F2-BCCP fusion protein

จากการที่มีรายงานเรื่องการสร้าง recombinant molecule ได้ใน cytoplasm ของ *E. coli* สายพันธ์ Origami ที่มีการ mutate gene *trx*B และ *gor* ทำให้มีสภาวะ oxidizing condition

สูงขึ้นใน cytoplasm ทำมีการพับทบโปรตีนได้ถูกต้อง และความสามารถของ *E. coli* ในการเติม biotin เข้ากับ Biotin Carboxy Carrier Protein (BCCP) domain ทำให้นำมาสู่วิธีการใหม่ในการสร้าง recombinant molecule ที่ติดฉลากด้วย biotin ภายใน *E. coli* strain Origami โดยทำการ clone F2 เข้าสู่ vector **pAK400CB** (Ville Santala, University of Turku, Finland) วิธีการใหม่นี้ทำให้สามารถลดขั้นตอนการทำ chemical conjugation ได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำ streptavidin magnetic bead มาทำการคัดเลือกจับ biotinylated F2 เพื่อใช้เตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้น BALB/c ได้ เนื่องจาก avidin ที่ coat บน bead เป็น streptavidin ทำให้สามารถตัดปัญหาในขั้นตอนการตรวจสอบเพื่อ screen clone ที่สร้าง anti-F2 ได้สะดวกขึ้น โดยเปลี่ยน avidin ที่ coat บน ELISA well เป็น egg white avidin ทำให้สามารถ exclude clone ที่สร้าง anti-streptavidin จากข้อเด่นนี้ทำให้สามารถผลิต monoclonal antibodies ต่อโมเลกุลต่างๆได้สะดวกขึ้นโดยไม่ต้องมีขั้นตอน purify antigen วิธีการนี้ได้นำไปใช้แล้วในการผลิต monoclonal anti-survivin antibodies โดยได้ clone จำนวนมาก (กำลังอยู่ในระหว่างเตรียม manuscript) ผู้วิจัยจึงนำวิธีการนี้มาแก้ไขปัญหาของงานวิจัยนี้

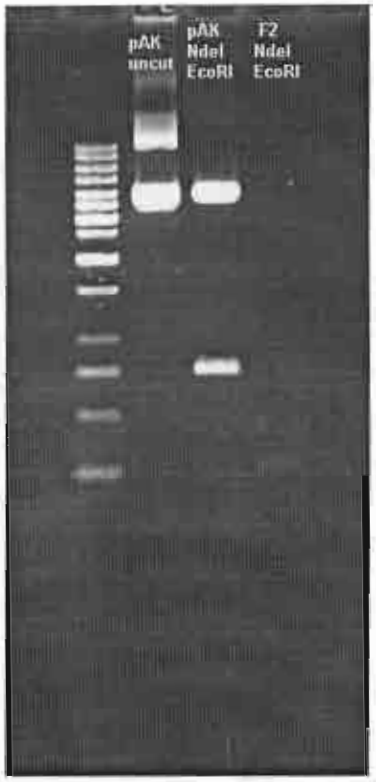
การ clone F2 เข้าสู่ pAK400CB

1. amplify F2 coding sequence จาก NAB12 โดยให้มี overhang ที่ถูกตัดได้ด้วย Nde I และ EcoR I (upstream และ downstream ตามลำดับ) (รูปที่ 1)
2. digest F2 amplified product ด้วย Nde I และ EcoR I พร้อมกับตัดเปิดปลาย vector pAK400CB ด้วย enzyme เดียวกัน (รูปที่ 2)
3. ligate F2 กับ pAK400CB ด้วย T4 ligase แล้ว transform เข้าใน TG1 จากนั้นเลือกมา 10 clones มาทำ miniprep (รูปที่ 3) แล้วเลือกมา 5 clones เพื่อทำการ re-amplify insert (รูปที่ 4)
4. เลือกมา 1 clone เพื่อตัดพิสูจน์ด้วย Nde I และ EcoR I (รูปที่ 5)
5. transform plasmid จาก clone ดังกล่าวเข้าไปใน Origami B
6. คัดเลือกมา 5 clones มาทำ miniprep (รูปที่ 6)
7. เลือกมา 2 clones มาทำ re-amplification และ digestion (รูปที่ 7)
8. เลือก clone 2 มาทำ protein expression ต่อไป

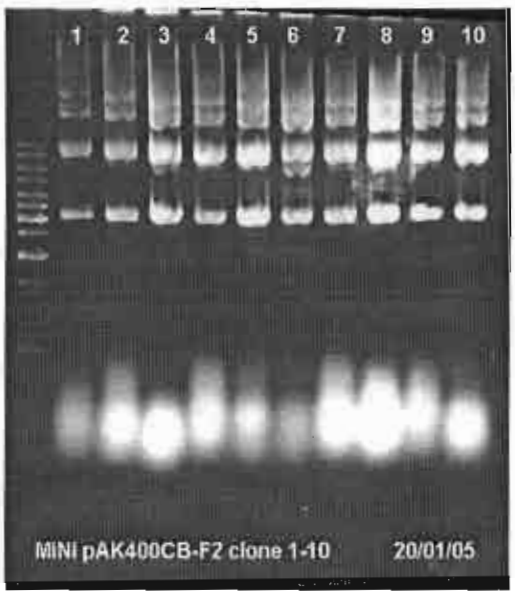
1

F2 PCR product
tube
1 2
500
250

2


pAK uncut
pAK NdeI EcoRI
F2 NdeI EcoRI

3


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
MINI pAK400CB-F2 clone 1-10 20/01/05

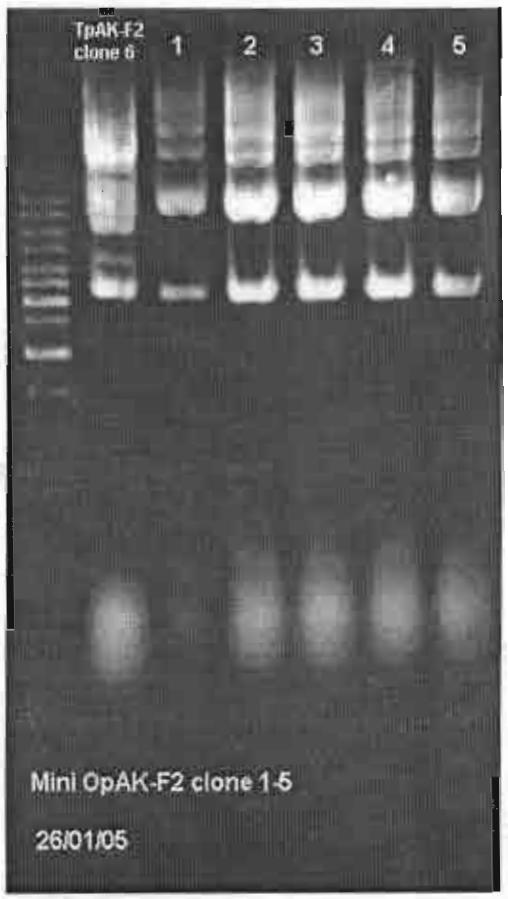
4

1 2 3 5 6 + -
PCR TpAK-F2, 5 clones 21/01/05

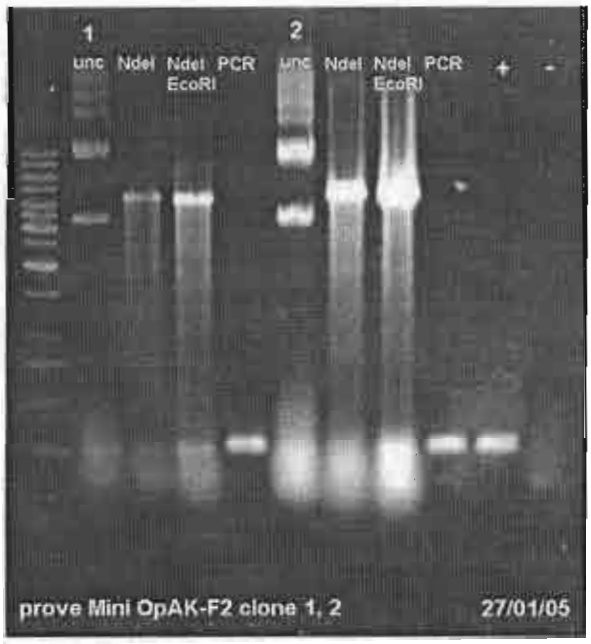
5

uncut
NdeI
EcoRI
Mini pAK-F2 clone 6 cut RE
23/01/05

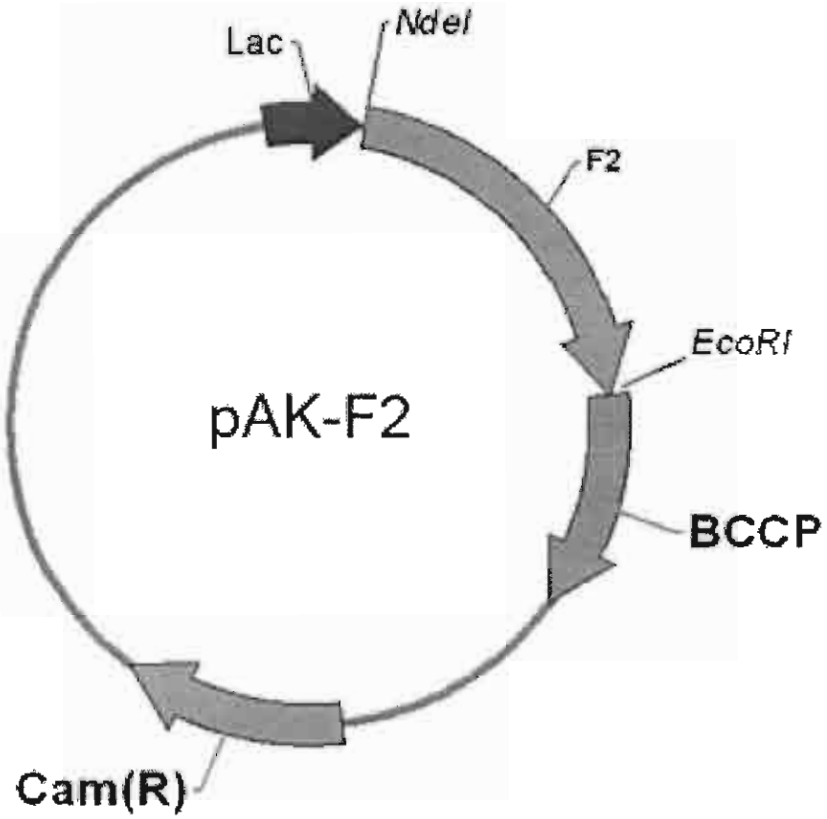
6


TpAK-F2 clone 6
1
2
3
4
5
Mini OpAK-F2 clone 1-5
26/01/05

7

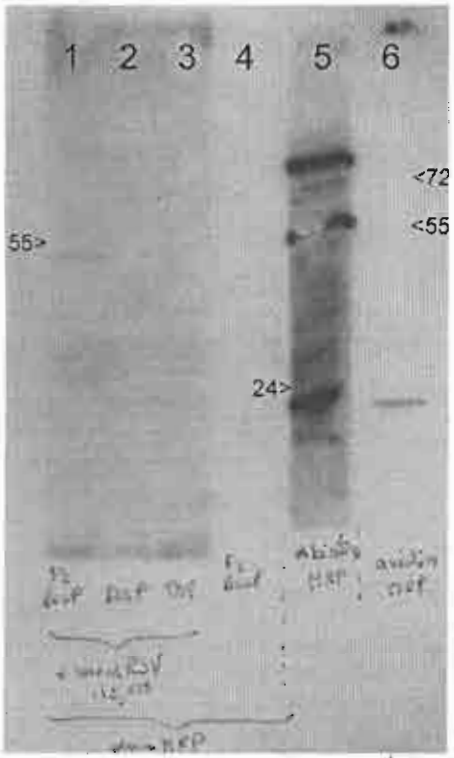

1
unc
NdeI
NdeI EcoRI
PCR
2
unc
NdeI
NdeI EcoRI
PCR
+
-
prove Mini OpAK-F2 clone 1, 2
27/01/05

แผนภาพ vector pAK-F2 ที่ construct ขึ้น



F2-BCCP expression

1. นำเชื้อ Origami B ที่ถูก Transfrom เข้าด้วย Plasmid vector pAK400CB-F2 clone 2 ไป culture ใน 10 ml SB medium ที่มีส่วนผสมของ Biotin 4 uM, glucose 0.05%, Tetracyclin 10 ug/ml, chloramphenical 25 ug/ml และ kanamycin 15 ug/ml นำไป culture ที่ 300 rpm, 37°C จนกระทั่งวัด OD_{600} = 0.5
2. นำเชื้อที่ culture ได้ ไปเติมลงใน 40 ml SB medium ที่มีส่วนผสมดังข้อ 1แล้วนำไป culture ที่ 300 rpm, 37° C จนกระทั่งวัด OD_{600} = 2 (mid-log phase)
3. กระตุ้นด้วย 100 uM IPTG แล้วนำไป culture 200 rpm ที่ 24 °C นาน 22 ชั่วโมง
4. ปั่นเก็บ cell ที่ 3,000 rpm, 4 C นาน 15 นาที
5. แตกเซลล์ด้วยน้ำยา BUGBUSTER™ MASTERMIX และนำ extract ที่ได้ไปทำ dialysis แล้วนำไปทำให้แห้งโดย lyophilization
6. นำ protein extract มาแยกด้วย SDS-PAGE แล้วทำ western blotting โดยใช้ avidin-HRP และ anti-avidin-HRP ในการทำปฏิกิริยา ดังรูป



Lane 1. F2-BCCP
2. BCCP
3. Origami
4. F2-BCCP
5. F2-BCCP **+anti-Biotin HRP**
6. F2-BCCP **+avidin HRP**

+Anti-RSV mouse serum

+Anti-mouse HRP

จากผลการทดลอง ไม่พบ band ขนาด ~20k บน strip ที่ย้อมด้วย mouse serum ในขณะที่พบ band ขนาดดังกล่าวใน lane ที่ย้อมด้วย avidin HRP และ anti-biotin HRP ดังนั้นจึงบอกได้ว่า การ express F2 ด้วยระบบนี้น่าจะได้โปรตีนที่ต้องการ แต่การฉีดกระตุ้นหนูด้วย RSV ไม่อาจทำให้ได้ Ab ต่อ F2 หรือได้เฉพาะ Ab ต่อ native form ของ F2

ใน lane ของ F2-BCCP ที่ย้อมด้วย mouse serum ยังพบ band ขนาด ~55k ซึ่งไม่พบทั้งใน Origami และ Origami-BCCP extract ที่ย้อมด้วย mouse serum เหมือนกัน ยังบอกไม่ได้ว่าคืออะไร ส่วนใน lane ที่ย้อมด้วย anti-Biotin HRP นอกจาก band ที่ ~20k ยังมีอีกสอง band ที่ ~55k และ 80k ซึ่งน่าจะเกิดจาก non-

specific or cross-binding ของ anti-biotin HRP กับ protein ใดๆของ origami เพราะใน lane ที่ย้อมด้วย avidin HRP ไม่เกิด band ที่สองตำแหน่งนี้

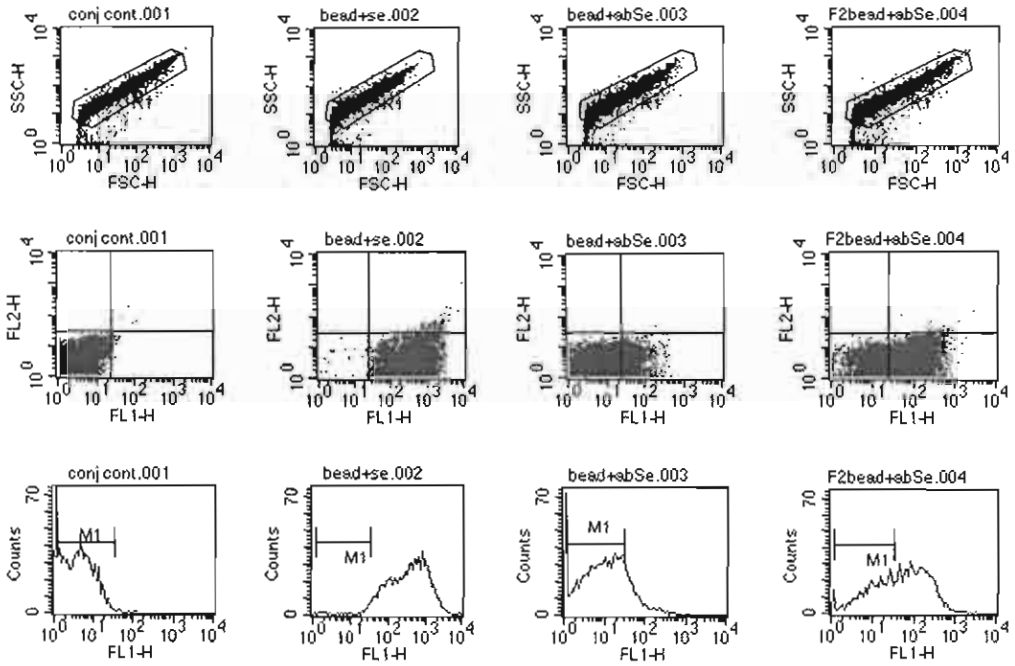
การ coat F2-BCCP ไว้บน streptavidin-magnetic bead

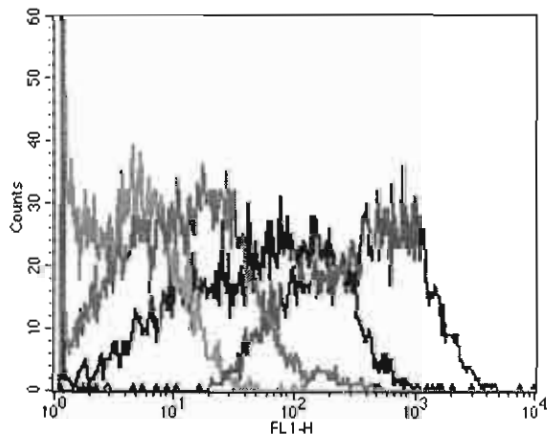
1. ดูด streptavidin-magnetic bead (stock $5x10^8$ bead/ml) 100 ul มาล้างด้วย sterile 1x PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาทีใน tube ก้นแบน โดยใช้สนามแม่เหล็กดูดเม็ด bead ไว้
2. resuspend กลับใน 1x PBS ปริมาตรเท่าเดิม
3. เติม F2-BCCP ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ลงไป 20 ul ผสมให้เข้ากัน
4. นำไป rotate)หรือใช้การ mix ทุกๆ 5 นาที (เป็นเวลา 30 นาที ที่ RT
5. ล้างด้วย sterile 1x PBS 4 ครั้ง ครั้งละ 3 นาทีโดยใช้สนามแม่เหล็ก resuspend กลับใน 1x PBS ปริมาตรเท่าเดิม

การตรวจพิสูจน์ F2-BCCP-bead ด้วย Flow Cytometry

1. เจือจาง mouse serum ที่ฉีดกระตุ้นด้วย svv-BCCP-bead ให้เป็น 1:100 ใน 1% BSA in PBS/NaN_3 แล้วนำมา 100 ul ผสมกับตะกอน uncoated bead)จาก stock 10 ul) ที่ล้างแล้ว 3 ครั้ง
2. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที โดย rotate หรือใช้การ mix ทุกๆ 5 นาที
3. ใช้สนามแม่เหล็กดูดเม็ด bead ไว้แล้วดูดสารละลายออกมา ใช้สารละลาย 50 ul นำไปผสมกับตะกอนของ F2-BCCP-bead หรือ uncoated bead ที่มาจาก stock 5 ul
4. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที โดย rotate หรือใช้การ mix ทุกๆ 5 นาที
5. resuspend กลับในปริมาตร 25 ul
6. เม็ด bead ที่เหลือในข้อ 3) ให้ resuspend กลับในปริมาตรเท่าเดิม (10 ul) นำมา 5 ul ผสมกับ 1% BSA in PBS/NaN_3 20 ul
7. เติม sheep anti-mouse Ig conjugated FITC เจือจาง 1:40 ด้วย 1% BSA in PBS/NaN_3 ลงไป 25 ul ทุก tube
8. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีในที่มืด โดย rotate หรือใช้การ mix ทุกๆ 5 นาที
9. ล้างเม็ด bead 3 ครั้งด้วย 1% BSA in PBS/NaN_3 โดยใช้สนามแม่เหล็ก
10. ละลายตะกอนกลับด้วย 1% paraformaldehyde 400 ul
11. นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

ผลการทดสอบ





1 = green = conjugate control

2 = pink = uncoated bead + unabsorbed serum

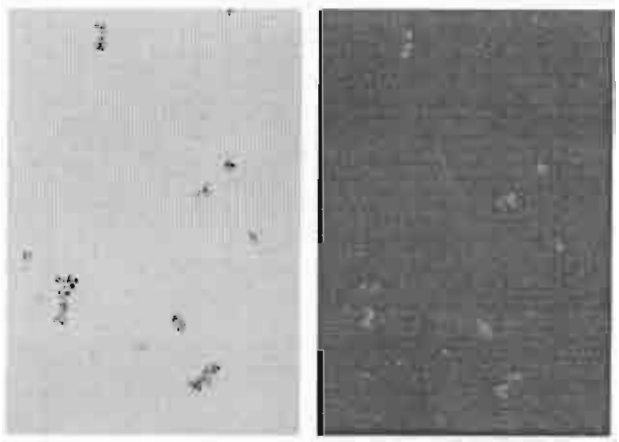
3 = blue = uncoated bead + absorbed serum

4 = black = F2-bead + absorbed serum

จากผลการทดลอง สีเขียวคือ background ส่วนสีชมพูคือ Ab reactivity against streptavidin-bead ซึ่งให้ค่าใกล้เคียงกับ reactivity against F2-bead (previous assay, data not shown) แต่เมื่อ absorb เอา anti-strepavidin ออกไป แล้วเอามาทดสอบกับ streptavidin-bead และ F2-bead อีกครั้ง ปรากฏว่า reactivity ต่อ streptavidin-bead ลดลงไปมาก)สีน้ำเงิน (แต่ reactivity ต่อ F2-bead ลดลงไปน้อยกว่าอย่างชัดเจน) สีดำ (แสดงว่า bead ที่ทำการ coat F2-BCCP มีโปรตีนเกาะอยู่จริง เพราะมี signal ของ anti-BCCP activity นั่นเอง

การพิสูจน์ว่า F2-BCCP ปรากฏอยู่บน magnetic bead ด้วยวิธี immunofluorescence

เนื่องจากในงานวิจัยที่ได้รับทุนจาก BIOTEC ได้มีการเตรียม monoclonal anti-SVV antibodies โดย strategy เดียวกัน คือฉีดกระตุ้นหนูด้วย streptavidin coated bead ซึ่ง capture SVV-BCCP อยู่ ในงานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกโคลนที่สร้าง monoclonal anti-BCCP antibodies ได้ จึงได้นำ monoclonal anti-BCCP antibodies มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพการเคลือบ streptavidin magnetic bead ด้วย F2-BCCP ซึ่งจะช่วยยืนยันผล flow cytometry ข้างต้นได้ โดยทำการย้อม magnetic bead ที่ผ่านขั้นตอนการ capture F2-BCCP ด้วย monoclonal anti-BCCP จากนั้นติดตามการจับด้วย FITC conjugated anti-mouse Igs เปรียบเทียบกับ magnetic bead ที่ไม่ได้มีการ capture F2-BCCP พบว่าให้ผลบวกเฉพาะ magnetic bead ที่มีการ capture F2-BCCP เท่านั้น (แสดงดังรูป) วิธีการนี้จะทำให้สามารถตรวจสอบแอนติเจนที่เคลือบอยู่บน magnetic bead ได้ในทุกกรณีถึงแม้จะไม่มี specific antibody เพื่อใช้ในการทดสอบก็ตาม



Bright light Fluorescence

ภาพแสดงการเรืองแสงของ streptavidin magnetic bead ที่ capture F2-BCCP โดยการย้อมด้วย monoclonal anti-BCCP antibodies และตรวจสอบด้วย rabbit anti-mouse Igs conjugated FITC กรณีของ control bead ไม่พบการเรืองแสงเลย

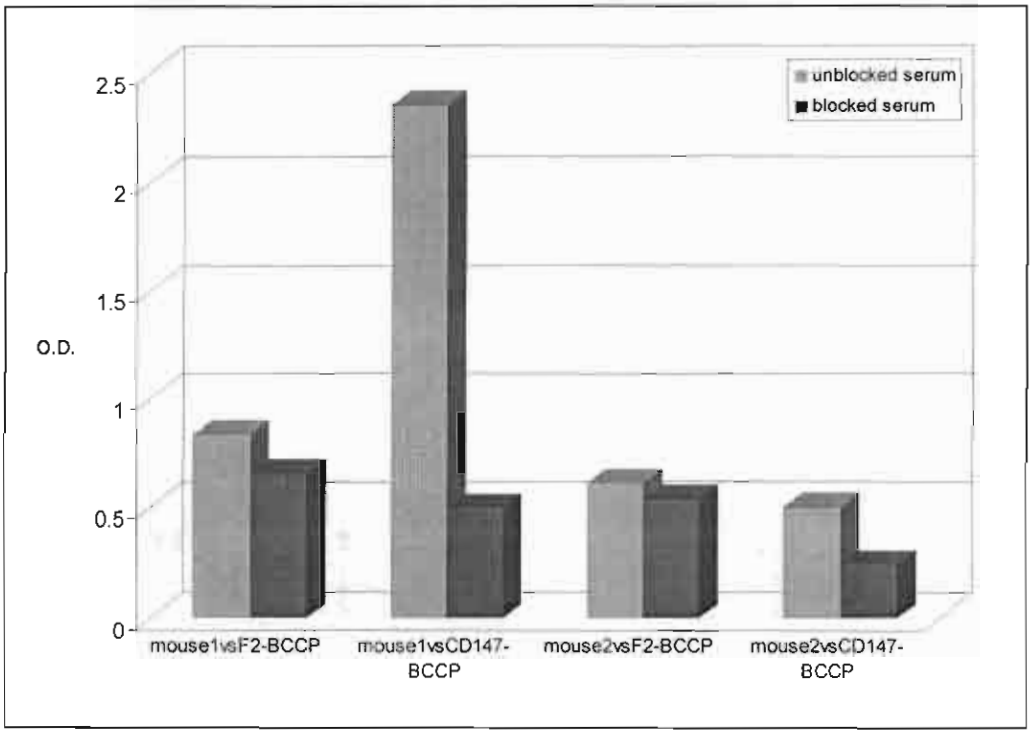
การฉีดกระตุ้นหนูด้วย F2-BCCP-bead

1. การฉีดกระตุ้น 1 dose ใช้เม็ด bead $5x10^7$ bead/ml ในปริมาตร 500 ul
2. วิธีเตรียมคือใช้ bead ที่ทำการ coat แล้ว 100 ul ($5x10^7$ bead/ml) ทำให้เป็น 500 ul ด้วย sterile 1x PBS ฉีดกระตุ้นหนู 1 ตัวทาง IP
3. ฉีดหนูทั้งหมด 2 ตัว ตัวละ 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์
4. ก่อนฉีดครั้งแรกให้เก็บ pre-immunized serum และให้เก็บ serum หนูก่อนที่จะมีการฉีดครั้งต่อไปทุกครั้ง

การตรวจพิสูจน์ serum หนูโดย inhibition ELISA (2nd serum)

1. coat plate ด้วย avidin 10 ug/ml, 50 ul
2. block ด้วย 2% skim milk/PBS 200 ul
3. เติม F2-BCCP ที่ 100 ug/ml หลุมละ 50 ul โดยใช้ CD147-BCCP เป็น control ที่ปริมาณเท่ากัน
4. เติม mouse serum ที่ dilute 1:1000 ใน 2% skim milk/PBS ลงไปทั้งในหลุมที่มี F2-BCCP และ CD147-BCCP ในขณะเดียวกันให้ dilute mouse serum เป็น 1:1000 ใน 2% skim milk/PBS ที่มี CD147-BCCP อยู่ 100 ug/ml แล้ว incubate 1 hr RT จึงนำไปเติมลงไปทั้งในหลุมที่มี F2-BCCP และ CD147-BCCP
5. เติม rabbit anti-mouse Ig-HRP 1:2000, 50 ul
6. แผนผังการทำ, control ต่างๆ และค่า O.D. แสดงในภาพ

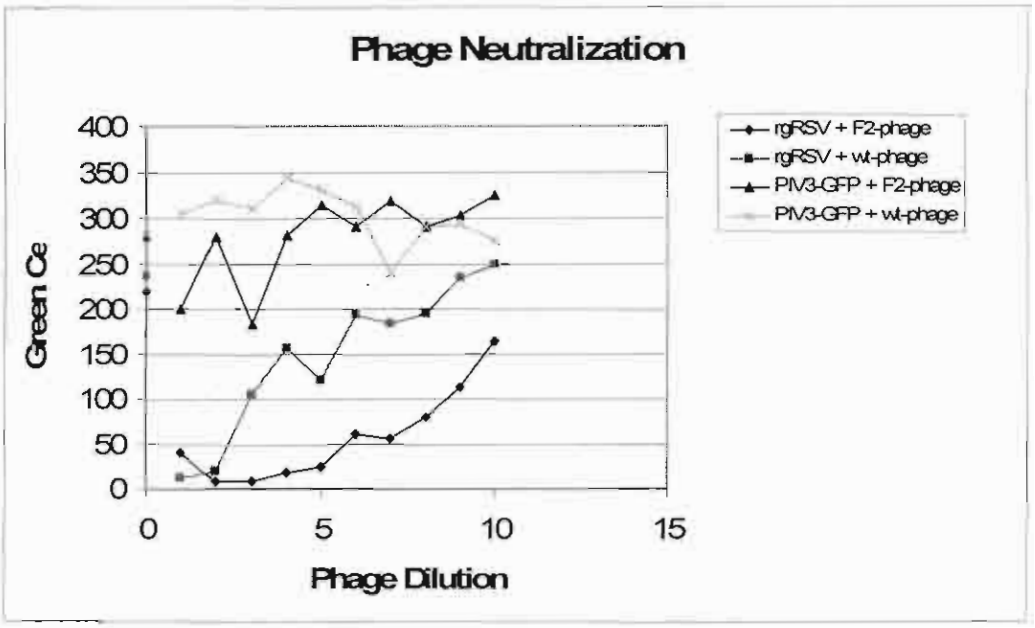
		Avidin + F2-BCCP	Avidin + CD147-BCCP	Avidin only	No coat
Mouse 1	Serum	0.836	2.350	0.260	0.408
	Inhibited serum	0.655	0.499	0.343	0.285
Mouse 2	Serum	0.610	0.502	0.187	0.215
	Inhibited serum	0.536	0.243	0.202	0.212
	No serum	0.137	0.133	0.103	0.124



จากกราฟ พบว่าซีรัมที่ถูก block ด้วย CD147-BCCP จะจับกับ CD147-BCCP ที่อยู่ในหลุมได้ลดลงทั้งหนู 1 และ 2 โดยเฉพาะหนู 1 จะเห็นได้ชัดเจนเนื่องจากมีการตอบสนองต่อส่วน BCCP ที่ฉีดเข้าไปมากกว่า แต่ในหลุมที่มี F2-BCCP ค่า O.D. ไม่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าอาจมี Ab ที่ไม่ถูกยับยั้งโดย CD147-BCCP ลงไปจับกับบางอย่างในหลุม ซึ่งน่าจะเป็น Ab ต่อ F2 เพราะเป็นการฉีดกระตุ้นด้วย F2-BCCP

การทดสอบการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ RSV

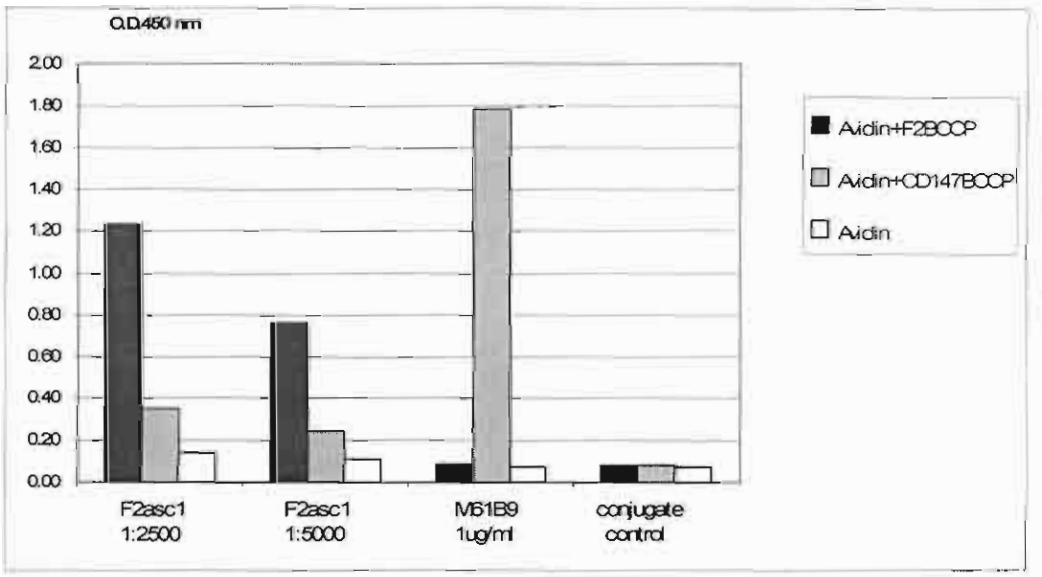
วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาหน้าที่ของ F protein คือการค้นหา domain ที่สำคัญในการจับกับ receptor บนผิว target cell ผู้วิจัยได้ร่วมมือกับ Dr. Mark E. Peeples ในการทดสอบ phage displayed F2 ในการยับยั้งการเข้าสู่ HeLa cell โดยใช้ recombinant RSV ที่มี reporter gene GFP (rgRSV) เปรียบเทียบกับ recombinant PIV (Parainfluenza virrus) ที่มี reporter gene GFP (PIV3-GFP) โดยนับจำนวนเซลล์ที่เรืองแสงสีเขียว เพื่อเปรียบเทียบ



จากการศึกษาพบว่า phage displayed F2 สามารถยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ RSV ได้อย่างมีนัยสำคัญ และมีความจำเพาะคือไม่สามารถยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ PIV ในขณะที่ control wild-type phage M13 มีผลยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ได้น้อยกว่าใน dilution ของ phage ที่เท่ากัน ที่สำคัญคือ ผลของการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์แปรผันตาม dilution ของ phage displayed F2

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ F2-BCCP

ได้ทำการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c จำนวน 2 ตัวด้วย F2-BCCP เพื่อเตรียม hybridoma ในขั้นตอนการ screening พบว่ามี hybrid 1 โคลนที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อ F2 protein จากการทดสอบโดยวิธี avidin capture ELISA โดยใช้รูปแบบการทดสอบเช่นเดียวกับการใช้ CD147-BCCP เป็นตัวอย่างในการศึกษาตามที่ได้รายงานไว้ในรายงานครั้งที่ 4 นอกจากนี้ monoclonal antibody ที่ได้ยังสามารถจับกับ RSV ซึ่งทำการพิสูจน์โดย indirect ELISA ได้ hybridoma ที่ได้ จากนั้นได้ทำการเตรียม ascitic fluid และ purify เพื่อนำไปศึกษาความจำเพาะของ anti-F2 antibody กับ F2-BCCP โดยเทียบกับ CD147-BCCP พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับส่วน F2 domain



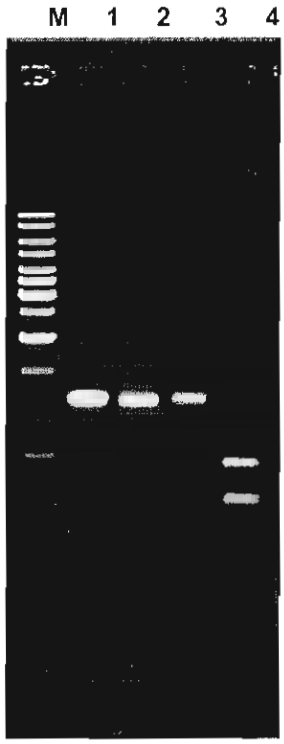
การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ F1-BCCP

หลังจากประสบความสำเร็จในการสร้าง monoclonal anti-F2 แล้วจึงได้นำเทคโนโลยีเดียวกันมาใช้ในการสร้าง monoclonal anti-F1 ต่อไป F1 เป็น subunit หนึ่งของ fusion glycoprotein ของ RSV มีขนาดที่เป็น unglycosylated form ประมาณ 45 kDa F1 gene มีขนาดเท่ากับ 1,164 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์หาขนาดของ F1 protein โดยใช้โปรแกรม SeqQCDemo พบว่ามีขนาดประมาณ 43 kDa

การศึกษานี้เราต้องการ clone F1 gene เข้าสู่ pAk400CB vector ซึ่งมี cloning sites ที่มี recognition sites ของ *Nde*1 และ *Eco*R1และทำ transformation เข้าสู่ Origami B competent cells เพื่อศึกษา F1-protein expression และนำไปเป็น immunogen เพื่อผลิต anti-F1monoclonal antibody

ขั้นตอนการศึกษา

1. เนื่องจาก F1 gene มี recognition site ของ *Nde*1 จึงต้องทำ site-directed mutagenesis โดยเริ่มจากนำ QXpC3H-Fo cloneที่ 1 มาทำ site-directed mutagenesis ด้วย Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit
2. Transform เข้าสู่ XL1-Blue competent cells และสกัด plasmid
3. พิสูจน์ผล mutation ของ F1 gene โดย amplify MF1 จาก XMpC3H-Fo cloneที่ 8 ด้วย F1 primers และตัดด้วย *Nde*1



1: QPCR MF1 clone 8

2: QPCR MF1 clone 8 treated by *Nde*1

3: QPCR F1 clone 1

4: QPCR F1 clone 1 treated by *Nde*1

4. Amplify MF1 gene ด้วย Proofstart DNA polymerase และตัดปลาย MF1 gene ด้วย *Nde*1 และ *Eco*R1เพื่อเตรียม clone สู่ pAk400CB vector
5. ทำ ligation ระหว่าง MF1และ pAk400CB vector ที่ผ่านการตัดด้วย *Nde*1 และ *Eco*R1แล้ว transform สู่ XL1-Blue competent cells
6. Amplify MF1 gene จาก X pAk400CB-MF1clone1 และตัดพิสูจน์ด้วย *Nde*1 ซึ่งพบว่าไม่สามารถตัดได้แสดงว่าF1 gene ที่อยู่ใน X pAk400CB-MF1 clone1เป็น mutated F1

7. สกัด X pAk400CB-MF1 จาก XL1-Blue competent และ transform สู่ Origami B competent cells
8. Amplify MF1 gene จาก O pAk400CB-MF1 clone 1และตัดพิสูจน์ด้วย *Nde1* ซึ่งพบว่าไม่สามารถตัดได้แสดงว่าF1 gene ที่อยู่ใน O pAk400CB-MF1 clone1 เป็น mutated F1
9. ทำ Growth curve ของ O pAk400CB-MF1 clone1
10. เลี้ยง O pAk400CB-MF1 clone1 จน OD600nm เท่ากับ 1 และกระตุ้น expression ด้วย 100 µM IPTG
11. แตกเซลล์และเก็บโปรตีน

ทดสอบ F1-BCCP protein ด้วย indirect ELISA

Avidin	10 µg/ml
F1-BCCP	1:100
antiF1 mAbs 5 clones (L4, 1129, 1269, antiF, 1243)	1:1,000
antiBCCP	1:250
RSV	1:100

Stop 17 นาที

Coated antigens	Proteins	1° Antibodies	Anti-mouseIgS-HRP	OD600 nm
avidin	**F1-BCCP**	**L4**	**+**	**1.104**
avidin	F1-BCCP	1129	+	0.982
avidin	F1-BCCP	1269	+	1.063
avidin	F1-BCCP	Anti-F	+	1.050
avidin	F1-BCCP	1243	+	1.022
-	F1-BCCP	L4	+	0.079
-	F1-BCCP	1129	+	0.086
-	F1-BCCP	1269	+	0.084
-	F1-BCCP	Anti-F	+	0.072
-	F1-BCCP	1243	+	0.068

RSV	**2%skimmilk**	**L4**	**+**	**0.302**
RSV	**2%skimmilk**	**1129**	**+**	**0.208**
RSV	**2%skimmilk**	**1269**	**+**	**0.280**
RSV	**2%skimmilk**	**Anti-F**	**+**	**0.297**
RSV	**2%skimmilk**	**1243**	**+**	**0.333**
-	2%skimmilk	L4	+	0.076
-	2%skimmilk	1129	+	0.070
-	2%skimmilk	1269	+	0.082
-	2%skimmilk	Anti-F	+	0.068
-	2%skimmilk	1243	+	0.066

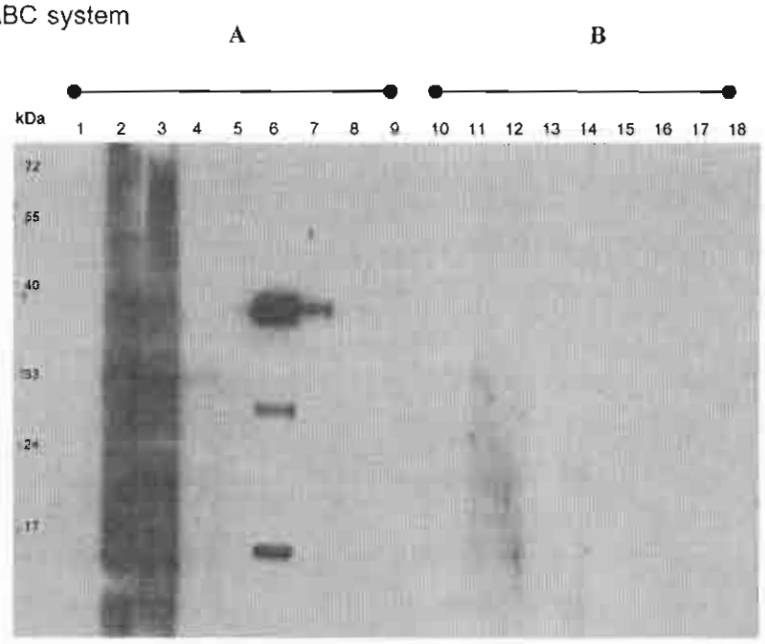
avidin	**F1-BCCP**	**Anti-BCCP**	**+**	**2.132**
-	2%skimmilk	Anti-BCCP	+	0.061

จากผล indirect ELISA พบว่า F1-BCCP สามารถ react ได้กับantiF1 mAbs ทั้ง 5 clones

แต่พบว่าขาด conjugate control จึงทำการทดลองซ้ำอีกครั้งพบว่า goat-anti mouse IgS-HRP สามารถจับได้กับ F1 จึงยังสรุปไม่ได้ว่า สามารถ express F1 protein ได้

ทดสอบ F1-BCCP protein โดย Western Immuno blotting

F1-BCCP	5 mg/ml
Anti F1mAbs 5 clones (L4, 1129, 1269, antiF, 1243)	1:1,000
Anti RSV pAb (จากหนูตัวที่ 10)	1:5,000
Anti CD147 mAb(M61B9)	10 µg/ml
Anti BCCP (culture supernate)	1:500
ABC system	



A: F1BCCP 5 mg/ml, B: Origami protein 5 mg/ml

1, 10: L4

2, 11: 1129

3, 12: 1269

4, 13 anti-F

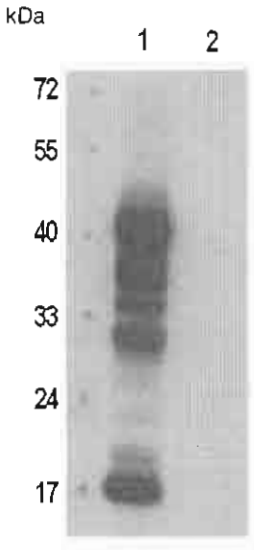
5, 14: 1243

6, 15: anti-BCCP

7, 16: anti-RSV pAb

8, 17: anti-CD147 (M61B9)

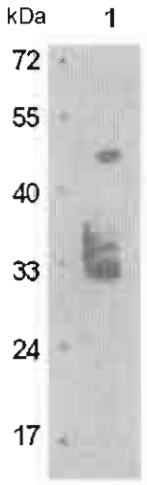
9, 18: conjugate control



ABC System

1: F1-BCCP 5 mg/ml

2: Origami protein 5 mg/ml

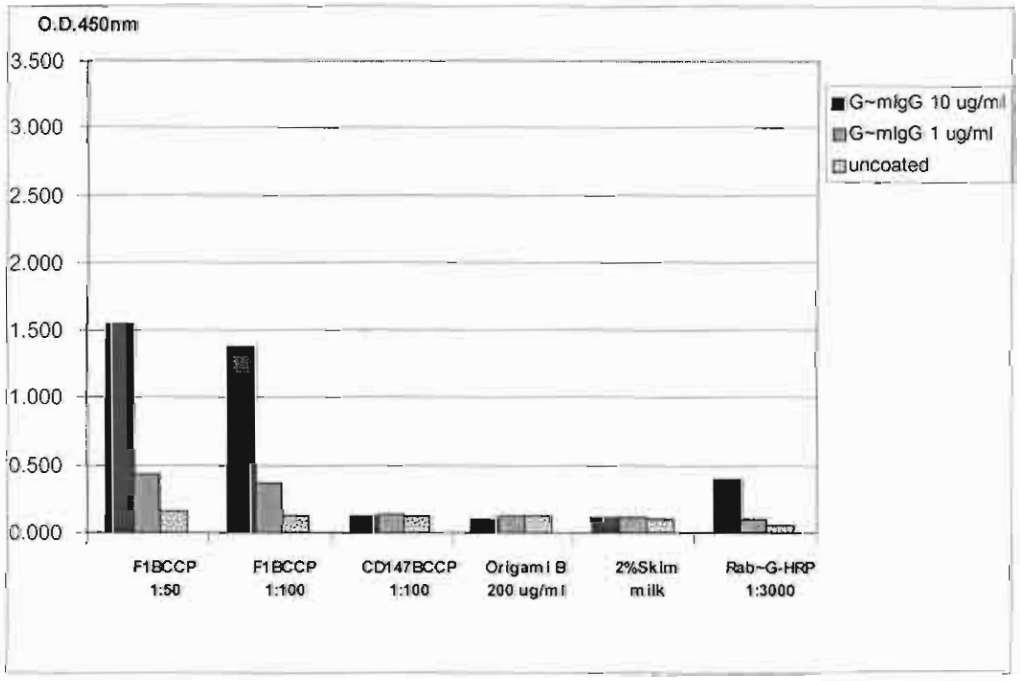


1: RSV ที่ probe ด้วย anti-RSV pAb

การทดสอบว่า F1 มี epitope คล้ายกับ mouse Ig(ใช้ avidin-HRP 1:1000)

	G~mIgG 10 ug/ml	G~mIgG 1 ug/ml	uncoated
F1BCCP 1:50	1.549	0.431	0.159
F1BCCP 1:100	1.372	0.363	0.129
CD147BCCP 1:100	0.125	0.135	0.128
Origami 200ug/ml	0.103	0.120	0.124
2%Skm	0.110	0.116	0.107
Rab~G-HRP 1:3000	0.400	0.098	0.055
	F1BCCP 1:50	F1BCCP 1:100	
	3.346	3.363	
	CD147BCCP 1:100	uncoated	
	3.046	0.099	

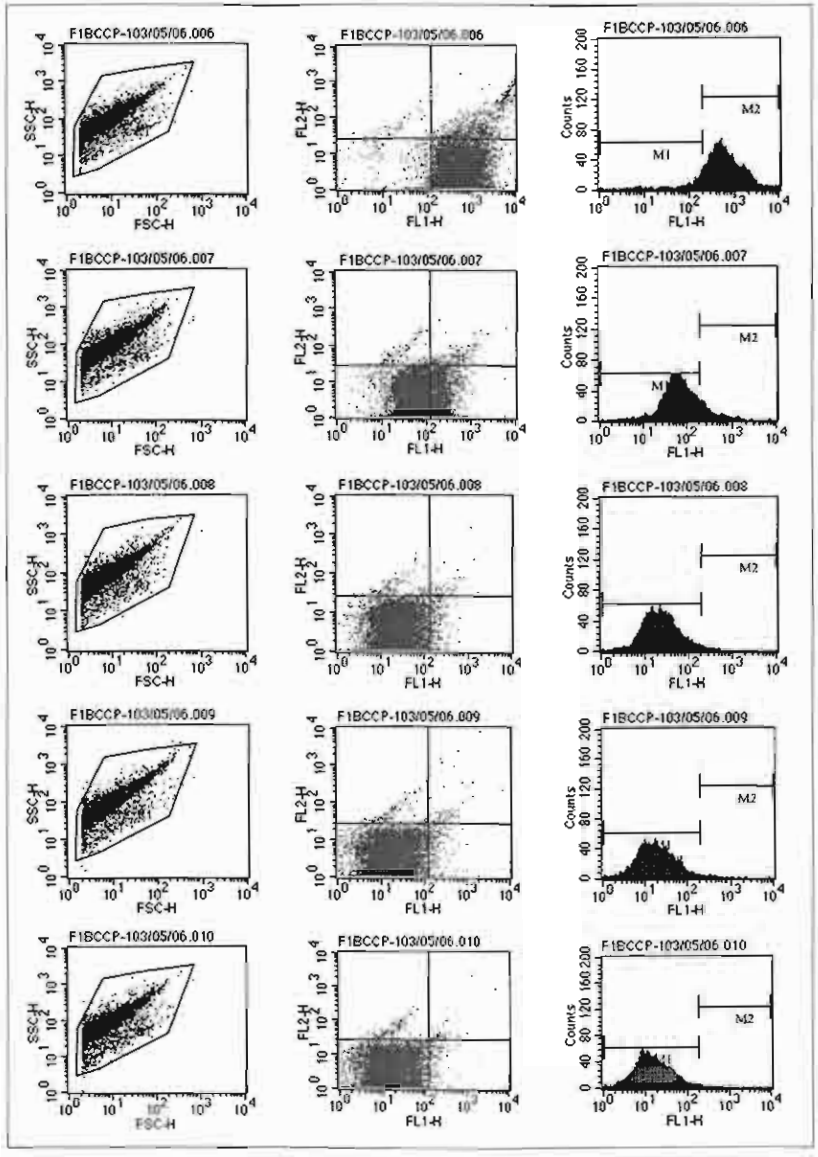
Stop 15 min



12. Coat Streptavidin Beads ด้วย F1BCCP 2 ความเข้มข้น คือ 1 mg/ml และ 7.6 mg/ml เพื่อฉีด immunize หนูทดลอง

1st-immunization 3/5/06

1 mg/ml



Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.006 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9993	100.00	99.93	784.98	525.47	117.75	503.29	478
M1	1, 202	947	9.48	9.47	135.38	103.56	44.52	158.20	196
M2	202, 9910	9072	90.78	90.72	851.12	620.85	111.05	547.37	478

Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.007 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9993	100.00	99.93	100.34	68.53	156.73	63.21	65
M1	1, 202	9003	90.09	90.03	70.14	57.83	61.91	57.77	65
M2	202, 9910	1014	10.15	10.14	370.79	317.26	103.08	273.84	205

Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.008 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9991	100.00	99.91	32.81	21.61	151.43	20.35	20
M1	1, 202	9883	98.92	98.83	29.35	20.99	95.65	19.99	20
M2	202, 9910	108	1.08	1.08	349.73	310.38	67.21	276.32	203

Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.009 Gate: G1

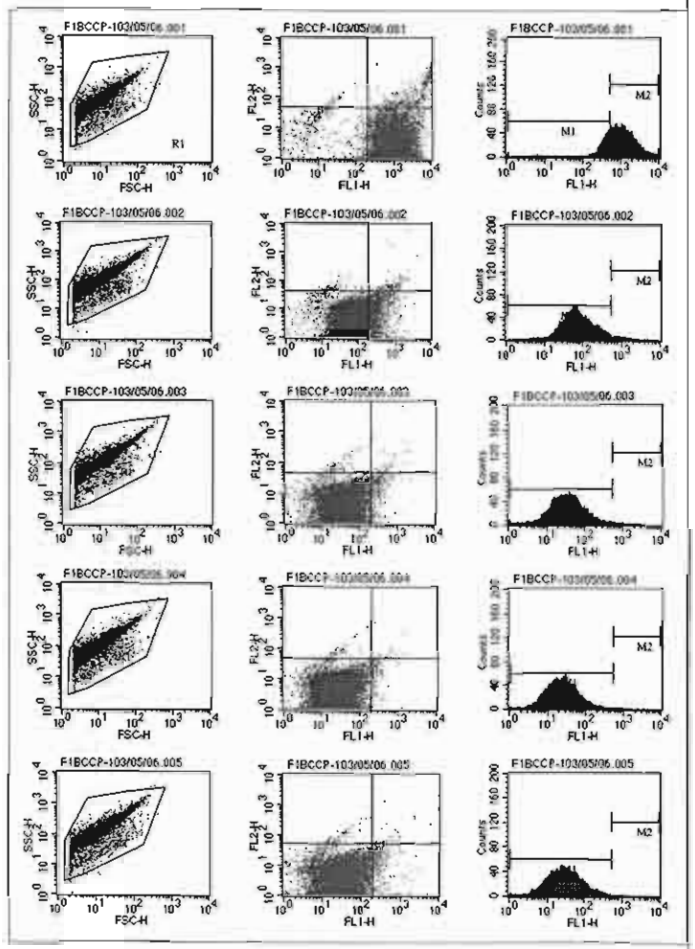
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9989	100.00	99.89	29.59	17.18	292.10	15.96	17
M1	1, 202	9880	98.91	98.80	24.78	16.62	104.69	15.68	17
M2	202, 9910	110	1.10	1.10	483.37	355.92	141.85	299.61	299

Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.010 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9993	100.00	99.93	26.47	15.18	531.41	14.07	8
M1	1, 202	9934	99.41	99.34	22.20	14.89	108.81	13.95	8
M2	202, 9910	60	0.60	0.60	736.15	377.31	224.80	280.07	210

1st-immunization 3/5/06 *7.6 mg/ml*



Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.001 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9991	100.00	99.91	1225.60	784.28	103.31	850.53	704
M1	1, 552	3060	30.63	30.60	346.02	246.53	44.00	375.16	547
M2	552, 9910	8977	89.83	89.77	1606.93	1299.85	83.58	1175.74	704

Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.002 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9983	100.00	99.83	119.55	71.50	188.21	64.94	50
M1	1, 552	9727	97.44	97.27	95.70	66.88	93.79	63.21	50
M2	552, 9910	259	2.59	2.59	1020.34	897.94	88.82	813.12	593

Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.003 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9992	100.00	99.92	55.20	33.44	170.44	32.34	36
M1	1, 552	9948	99.56	98.48	51.01	32.86	116.47	32.20	36
M2	552, 9910	44	0.44	0.44	1002.83	891.83	56.16	743.18	562

Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.004 Gate: G1

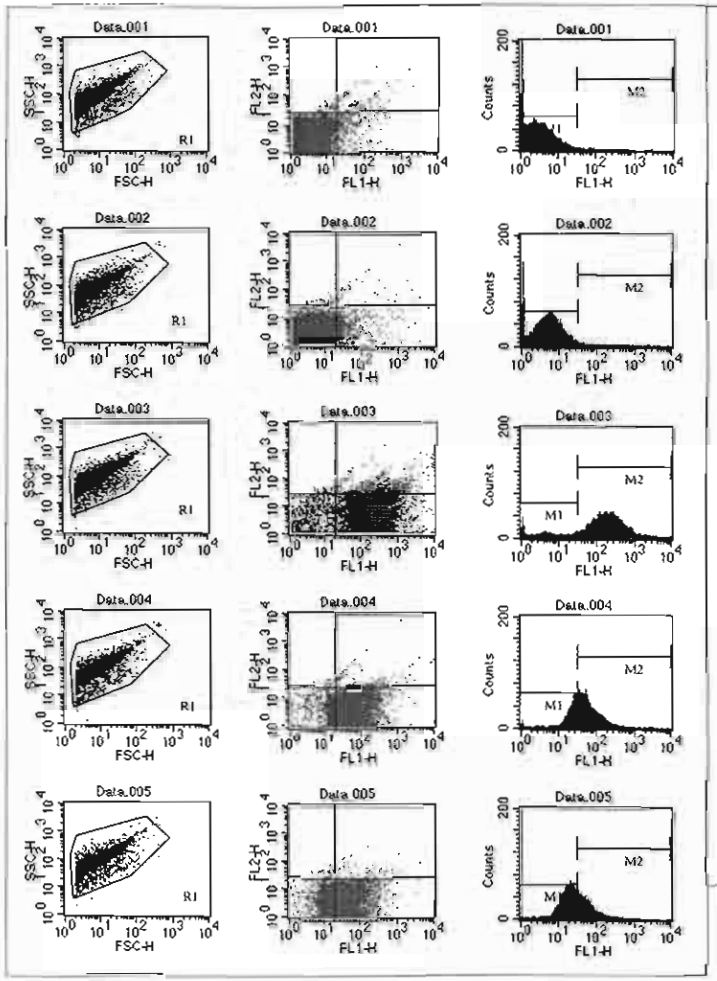
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9995	100.00	99.95	36.45	23.65	147.68	22.88	29
M1	1, 552	9982	99.87	99.82	35.23	23.54	114.74	22.88	29
M2	552, 9910	13	0.13	0.13	971.98	922.88	33.33	913.98	820

Histogram Statistics

File: F1BCCP-103/05/06.005 Gate: G1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9985	100.00	99.85	56.94	29.89	320.52	28.90	23
M1	1, 552	9925	99.40	99.25	47.79	29.23	123.07	28.64	23
M2	552, 9910	60	0.60	0.60	1569.73	1177.86	104.93	922.24	913

2nd-immunization 18/5/06 1 mg/ml



File: Data.001 Sample ID: congugate control

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	63	0.63	0.63	10.09	8.41	37.59	36.04
UR	111	1.11	1.11	156.82	83.43	91.71	59.75
LL	9560	95.90	95.60	3.83	2.90	4.57	3.18
LR	235	2.36	2.35	57.21	40.97	8.98	8.31

File: Data.002 Sample ID: media control

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	58	0.56	0.56	10.95	9.64	37.84	36.25
UR	53	0.53	0.53	378.33	110.19	174.88	74.22
LL	9260	92.71	92.60	5.97	4.76	4.22	2.92
LR	619	6.20	6.19	98.67	42.53	5.93	4.01

File: Data.003 Sample ID: anti-BCCP2

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	65	0.65	0.65	11.37	10.19	41.42	39.26
UR	918	9.19	9.18	917.83	363.30	83.80	50.82
LL	884	8.85	8.84	6.00	4.21	4.95	3.16
LR	8117	81.30	81.17	273.39	174.62	5.74	3.58

File: Data.004 Sample ID: polyclonal 1-50

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	29	0.29	0.29	12.72	11.80	39.06	37.47
UR	195	1.95	1.95	413.54	162.07	81.50	41.59
LL	1237	12.38	12.37	13.83	11.95	4.69	3.02
LR	8529	85.38	85.29	68.72	52.41	4.92	3.24

File: Data.005 Sample ID: polyclonal 1-100

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	46	0.46	0.46	11.85	11.16	35.92	34.59
UR	115	1.15	1.15	273.49	123.40	46.81	39.44
LL	3636	36.39	36.36	13.50	12.56	4.18	2.81
LR	6198	62.00	61.96	53.38	41.97	5.00	3.35

File: Data.001 Sample ID: congugate control

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	6.81	3.22	545.11	2.81	1
M1	1, 3(	9798	97.98	97.98	4.18	3.01	100.61	2.74	1
M2	33, 9910	204	2.04	2.04	133.52	84.64	168.46	65.52	80

File: Data.002 Sample ID: media control

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	16.70	5.58	1158.49	5.33	1
M1	1, 3(	9697	96.97	96.97	6.76	5.10	81.54	5.19	1
M2	33, 9910	307	3.07	3.07	330.94	102.12	319.71	65.52	41

File: Data.003 Sample ID: anti-BCCP2

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	309.96	131.63	240.99	162.53	170
M1	1, 3(	1215	12.15	12.15	10.70	6.50	91.05	6.38	1
M2	33, 9910	8793	87.93	87.93	351.06	199.20	224.39	187.09	170

File: Data.004 Sample ID: polyclonal 1-50

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	71.69	44.55	312.31	42.17	51
M1	1, 3(	3619	36.19	36.19	22.11	19.95	33.87	23.29	27
M2	33, 9910	6430	64.30	64.30	99.30	69.85	277.26	58.82	51

File: Data.005 Sample ID: polyclonal 1-100

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	43.76	27.28	383.85	25.48	20
M1	1, 3(	6321	63.21	63.21	18.67	16.90	39.43	18.11	20
M2	33, 9910	3721	37.21	37.21	86.27	61.66	312.93	52.33	34

2nd-immunization 18/5/06 7.6 mg/ml

File: Data.001 Sample ID: conjugate control

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	168	1.68	1.68	13.56	10.01	27.35	22.43
UR	220	2.20	2.20	143.11	93.39	72.05	29.92
LL	9214	92.15	92.14	6.83	4.71	3.01	2.33
LR	397	3.97	3.97	54.43	50.15	6.21	4.85

File: Data.002 Sample ID: media control

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	145	1.45	1.45	15.80	12.20	22.22	19.66
UR	290	2.90	2.90	167.60	92.87	68.57	28.91
LL	9110	91.10	91.10	7.10	4.98	3.04	2.36
LR	455	4.55	4.55	48.96	46.39	6.73	5.63

File: Data.003 Sample ID: anti-BCCP2

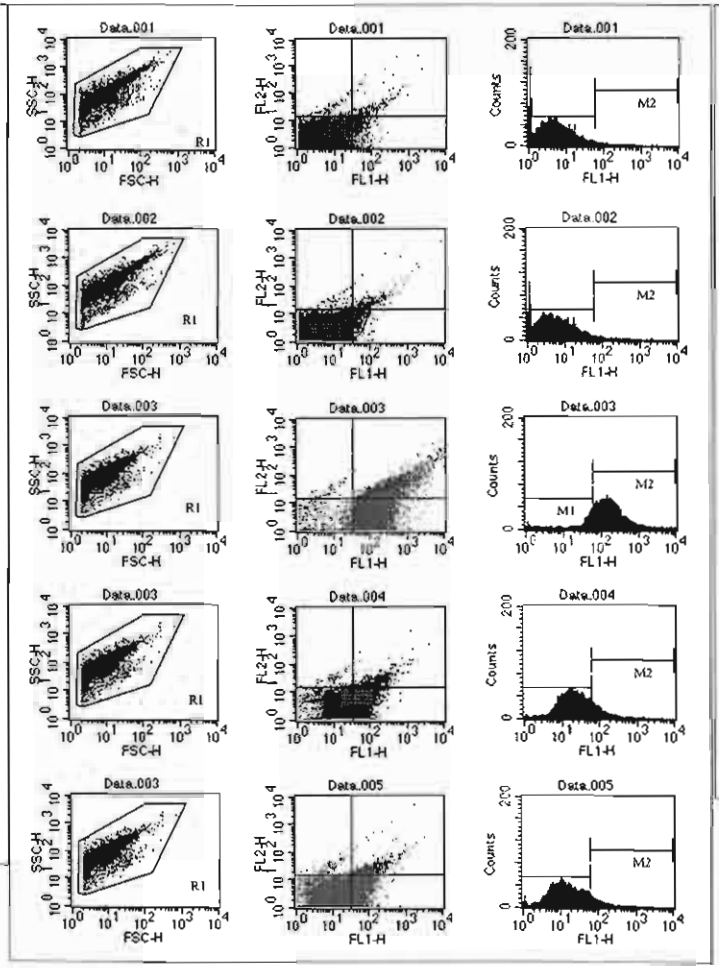
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	51	0.51	0.51	8.52	6.81	28.51	25.14
UR	3253	32.53	32.53	492.59	280.83	42.16	28.90
LL	411	4.11	4.11	12.95	7.38	3.64	2.69
LR	6284	62.85	62.84	138.12	111.39	4.85	3.58

File: Data.004 Sample ID: polyclonal 1-50

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	116	1.16	1.16	13.68	11.04	23.26	20.77
UR	720	7.20	7.20	161.90	119.41	28.70	22.56
LL	6455	64.56	64.55	15.54	13.41	3.19	2.43
LR	2708	27.08	27.08	61.07	55.09	4.93	3.75

File: Data.005 Sample ID: polyclonal 1-100

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	133	1.33	1.33	12.13	9.41	24.68	21.69
UR	670	6.70	6.70	144.75	103.07	38.49	23.21
LL	7314	73.15	73.14	11.93	9.65	3.15	2.41
LR	1882	18.82	18.82	57.09	52.16	5.40	4.22



File: Data.001 Sample ID: conjugate control

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	11.64	5.59	351.49	4.91	1
M1	1, 66	9795	97.95	97.95	8.37	5.24	119.10	4.78	1
M2	66, 9910	207	2.07	2.07	167.26	124.67	136.02	100.90	93

File: Data.002 Sample ID: media control

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	13.78	6.08	696.60	5.28	1
M1	1, 66	9765	97.65	97.65	9.16	5.65	115.81	5.09	1
M2	66, 9910	238	2.38	2.38	204.15	126.36	286.59	98.22	66

File: Data.003 Sample ID: anti-BCCP2

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	247.61	132.63	230.60	133.35	134
M1	1, 66	1991	19.91	19.91	42.68	32.45	44.80	48.26	63
M2	66, 9910	8039	80.39	80.39	297.69	187.48	210.50	164.00	134

File: Data.004 Sample ID: polyclonal 1-50

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	38.38	22.96	189.72	21.67	16
M1	1, 66	8676	86.76	86.76	22.89	17.93	67.37	18.43	16
M2	66, 9910	1342	13.42	13.42	138.93	115.05	116.82	99.10	75

File: Data.005 Sample ID: polyclonal 1-100

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	29.33	15.52	226.19	13.76	9
M1	1, 66	9111	91.11	91.11	18.11	12.76	84.38	12.19	9
M2	66, 9910	903	9.03	9.03	143.07	114.64	125.45	98.22	89

3rd-immunization 31/5/06 1 mg/ml

File: Data.002 Sample ID: 1 mg/ml con

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	380	3.80	3.80	21.17	18.94	58.36	46.55
UR	232	2.32	2.32	325.34	176.41	189.00	68.74
LL	9070	90.72	90.70	12.16	8.65	4.74	3.17
LR	316	3.16	3.16	112.21	85.38	9.86	7.48

File: Data.003 Sample ID: 1 mg/ml medi

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	289	2.89	2.89	20.78	16.44	53.38	43.58
UR	187	1.87	1.87	206.63	142.22	195.09	86.03
LL	9290	92.93	92.90	12.18	8.75	4.73	3.19
LR	231	2.31	2.31	70.83	68.52	9.77	7.44

File: Data.004 Sample ID: 1 mg/ml anti-BCCP2

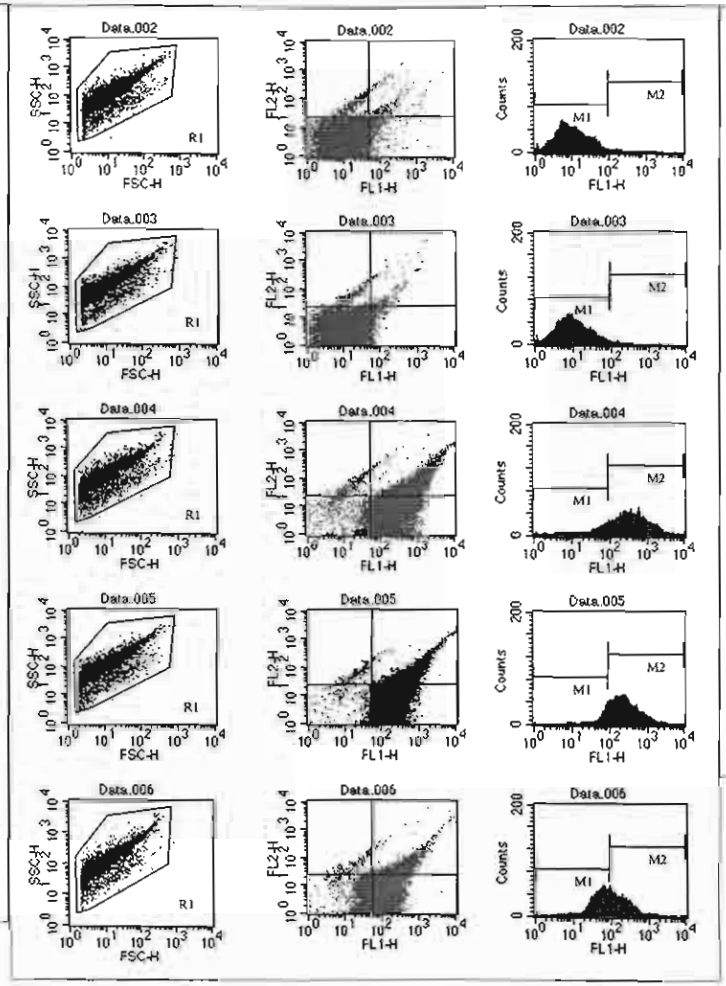
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	275	2.75	2.75	21.01	16.88	68.68	56.55
UR	3574	35.76	35.74	1004.49	690.94	103.59	62.33
LL	738	7.38	7.38	27.53	18.35	5.90	3.89
LR	5407	54.10	54.07	282.18	216.05	7.02	4.59

File: Data.005 Sample ID: 1 mg/ml poly1_20

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	176	1.76	1.76	22.72	19.13	83.58	54.21
UR	2883	28.84	28.83	705.94	470.38	83.91	51.73
LL	355	3.55	3.55	30.02	19.91	6.25	4.01
LR	6584	65.85	65.84	207.20	169.73	6.85	4.47

File: Data.006 Sample ID: 1 mg/ml poly1_100

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	213	2.13	2.13	25.62	20.27	53.66	43.39
UR	1414	14.14	14.14	457.29	304.49	82.70	45.29
LL	3042	30.42	30.42	35.38	32.50	4.84	3.14
LR	5330	53.31	53.30	132.81	113.49	6.90	4.65



File: Data.002 Sample ID: 1 mg/ml con

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9998	100.00	99.98	22.93	10.23	571.48	9.22	5
M1	1, 9(	9756	97.58	97.56	14.28	9.47	102.44	8.98	5
M2	96, 9910	242	2.42	2.42	371.69	229.80	204.65	181.06	138

File: Data.003 Sample ID: 1 mg/ml medi

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9997	100.00	99.97	17.42	9.85	262.67	9.14	7
M1	1, 9(	9857	98.60	98.57	13.98	9.44	99.84	8.98	7
M2	96, 9910	140	1.40	1.40	260.16	196.26	106.40	153.99	133

File: Data.004 Sample ID: 1 mg/ml anti-BCCP2

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9994	100.00	99.94	514.50	254.43	146.06	283.87	518
M1	1, 9(	1963	19.64	19.63	49.52	35.58	57.74	51.86	85
M2	96, 9910	8044	80.49	80.44	627.29	410.55	127.16	371.80	518

File: Data.005 Sample ID: 1 mg/ml poly1_20

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9998	100.00	99.98	341.48	203.09	161.15	198.10	139
M1	1, 9(	1968	19.68	19.68	63.95	52.98	40.45	71.05	96
M2	96, 9910	8071	80.73	80.71	407.90	280.76	145.46	243.62	139

File: Data.006 Sample ID: 1 mg/ml poly1_100

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9999	100.00	99.99	146.77	85.98	205.53	79.15	91
M1	1, 9(	5859	58.60	58.59	51.72	45.47	43.60	50.03	91
M2	96, 9910	4185	41.85	41.85	279.29	210.01	154.65	186.01	96

3rd -immunization 31/5/06 7.6 mg/ml

File: Data.007 Sample ID: 7.6 mg/ml con

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	802	8.04	8.02	19.14	12.69	44.98	29.53
UR	591	5.93	5.91	254.82	160.72	60.29	31.14
LL	8199	82.21	81.99	13.82	8.75	3.20	2.43
LR	381	3.82	3.81	162.28	114.75	6.12	4.83

File: Data.008 Sample ID: 7.6 mg/ml medi

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	694	6.94	6.94	21.78	14.55	40.12	29.84
UR	621	6.21	6.21	176.28	151.55	64.81	31.69
LL	8352	83.55	83.52	13.97	8.97	3.15	2.39
LR	330	3.30	3.30	97.43	92.91	6.79	5.88

File: Data.009 Sample ID: 7.6 mg/ml anti-BCCP2

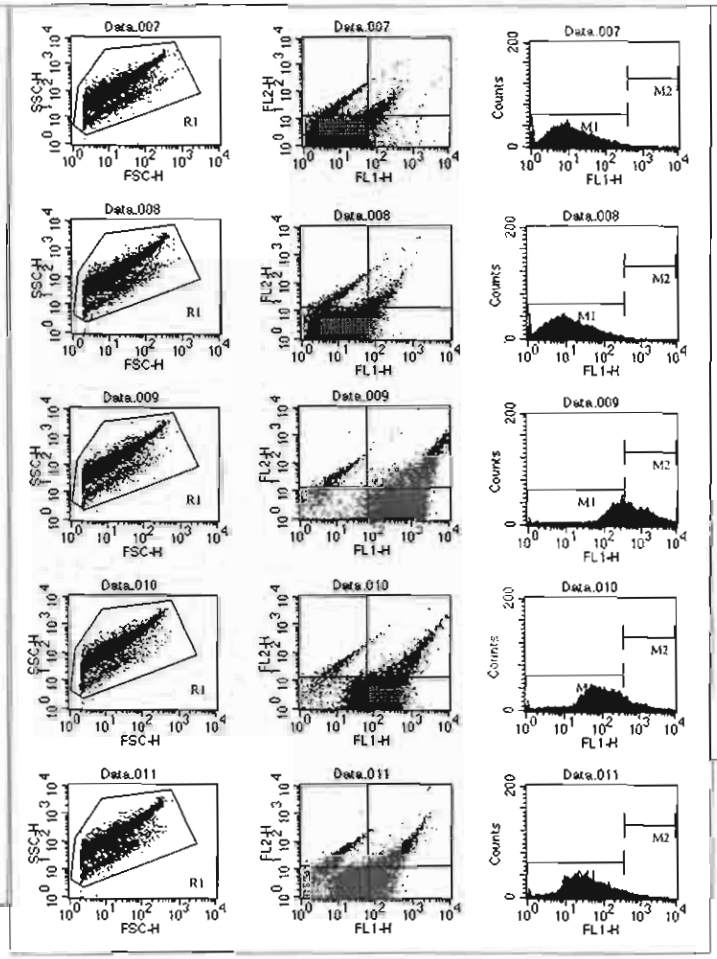
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	377	3.77	3.77	13.53	10.28	44.56	33.82
UR	1973	19.73	19.73	2812.79	1795.88	177.52	73.45
LL	495	4.95	4.95	24.09	9.97	4.36	3.13
LR	7154	71.55	71.54	534.17	373.23	2.88	2.11

File: Data.010 Sample ID: 7.6 mg/ml poly1_20

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	342	3.42	3.42	16.93	11.84	36.81	29.56
UR	1304	13.05	13.04	1133.72	707.97	114.77	49.55
LL	3491	34.92	34.91	40.18	34.17	2.78	2.07
LR	4859	48.61	48.59	202.06	164.62	3.38	2.49

File: Data.011 Sample ID: 7.6 mg/ml poly1_100

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	607	6.07	6.07	16.92	11.98	41.93	31.20
UR	1095	10.96	10.95	474.14	346.98	78.82	37.15
LL	6541	65.44	65.41	25.43	19.76	2.97	2.26
LR	1752	17.53	17.52	130.74	117.88	4.33	3.28



File: Data.007 Sample ID: 7.6 mg/ml con

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9973	100.00	99.73	34.20	11.82	560.03	9.82	1
M1	1, 396	9926	99.53	99.26	26.19	11.57	173.49	9.73	1
M2	396, 9910	47	0.47	0.47	1725.95	1077.28	123.83	777.37	433

File: Data.008 Sample ID: 7.6 mg/ml medi

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9997	100.00	99.97	27.35	11.95	198.85	10.18	1
M1	1, 396	9968	99.71	99.68	25.69	11.82	165.16	10.09	1
M2	396, 9910	29	0.29	0.29	598.57	558.52	46.16	491.37	406

File: Data.009 Sample ID: 7.6 mg/ml anti-BCCP;

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9999	100.00	99.99	938.90	371.45	159.21	388.91	9910
M1	1, 396	5061	50.62	50.61	185.00	119.65	59.94	184.34	276
M2	396, 9910	4963	49.63	49.63	1704.95	1179.86	105.94	1045.00	9910

File: Data.010 Sample ID: 7.6 mg/ml poly1_2(

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9996	100.00	99.96	260.73	105.08	223.22	95.60	53
M1	1, 396	8617	86.20	86.17	111.64	74.46	84.02	77.74	53
M2	396, 9910	1404	14.05	14.04	1178.19	891.39	99.73	763.51	395

File: Data.011 Sample ID: 7.6 mg/ml poly1_10(

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9995	100.00	99.95	92.53	35.88	224.16	31.34	20
M1	1, 396	9508	95.13	95.08	56.71	30.83	125.46	29.16	20
M2	396, 9910	490	4.90	4.90	789.33	692.26	65.82	607.02	406

4th-immunization 30/6/06 7.6 mg/ml

File: Data.001 Sample ID: Conj control

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1001	10.03	10.01	16.38	10.55	35.07	25.46
UR	664	6.65	6.64	347.00	204.96	129.07	38.81
LL	7894	79.07	78.94	12.11	6.71	3.02	2.34
LR	425	4.26	4.25	130.94	99.17	4.87	3.92

File: Data.002 Sample ID: Anti-BCCP2

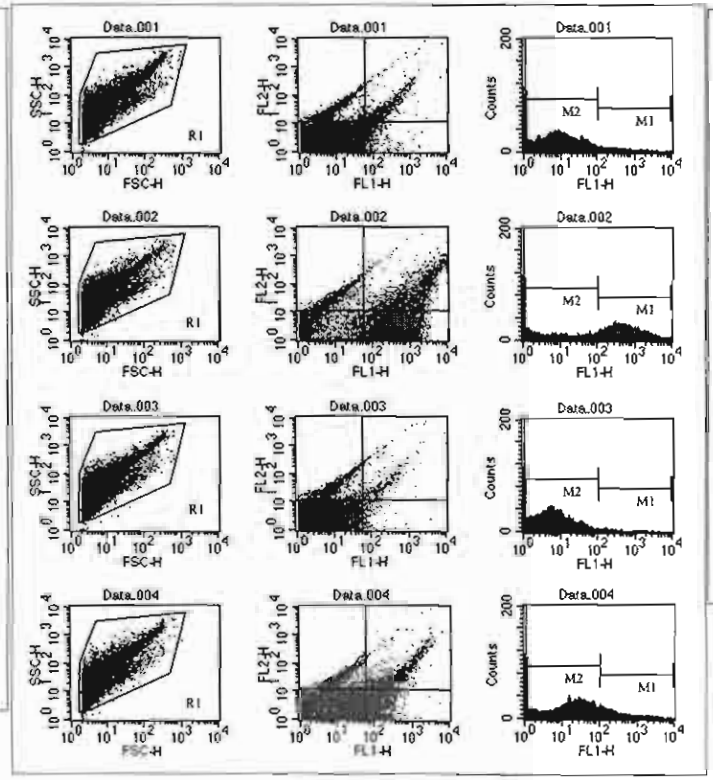
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	895	8.98	8.95	13.95	9.51	39.12	29.13
UR	1738	17.44	17.38	2128.96	1112.35	142.41	54.03
LL	2531	25.39	25.31	9.06	3.16	3.34	2.56
LR	4803	48.19	48.03	547.68	383.28	2.74	2.07

File: Data.003 Sample ID: Poly1_20

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1164	11.68	11.64	13.68	9.04	35.15	25.71
UR	356	3.57	3.56	327.39	186.49	204.34	51.71
LL	8326	83.41	83.26	9.10	5.28	3.04	2.35
LR	136	1.36	1.36	142.66	99.25	5.09	4.10

File: Data.004 Sample ID: Poly1_100

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	793	7.95	7.93	19.19	13.97	31.57	24.07
UR	924	9.27	9.24	572.24	335.21	105.56	38.60
LL	6600	66.19	66.00	19.36	10.43	2.94	2.27
LR	1655	16.60	16.55	142.32	118.69	3.67	2.83



File: Data.001 Sample ID: Conj control

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	40.16	9.86	525.98	8.82	1
M1	114, 9910	575	5.75	5.75	431.73	282.23	180.52	232.91	117
M2	1, 114	9428	94.28	94.28	16.32	8.04	126.87	8.06	1

File: Data.002 Sample ID: Anti-BCCP2

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	836.61	96.55	204.59	222.67	1
M1	114, 9910	6050	60.50	60.50	1039.24	587.27	148.85	513.97	9910
M2	1, 114	3957	39.57	39.57	20.14	8.12	148.78	4.18	1

File: Data.003 Sample ID: Poly1_20

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	22.76	6.63	719.19	5.88	1
M1	114, 9910	280	2.80	2.80	425.42	264.84	208.29	213.83	161
M2	1, 114	9717	97.17	97.17	11.16	5.96	135.78	5.67	1

File: Data.004 Sample ID: Poly1_100

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	90.75	21.88	324.64	25.25	1
M1	114, 9910	1542	15.42	15.42	439.84	284.28	146.48	224.68	121
M2	1, 114	8470	84.70	84.70	27.24	13.75	98.67	19.11	1

prefusion-immunization 24/7/06 *7.6 mg/ml*

File: Data.001 Sample ID: Conjugate control

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	230	2.31	2.30	10.09	8.81	68.65	62.06
UR	187	1.88	1.87	599.53	269.10	256.47	133.61
LL	9029	90.72	90.29	5.42	4.27	3.56	2.43
LR	507	5.09	5.07	96.63	67.15	11.14	7.83

File: Data.002 Sample ID: Poly 1_100

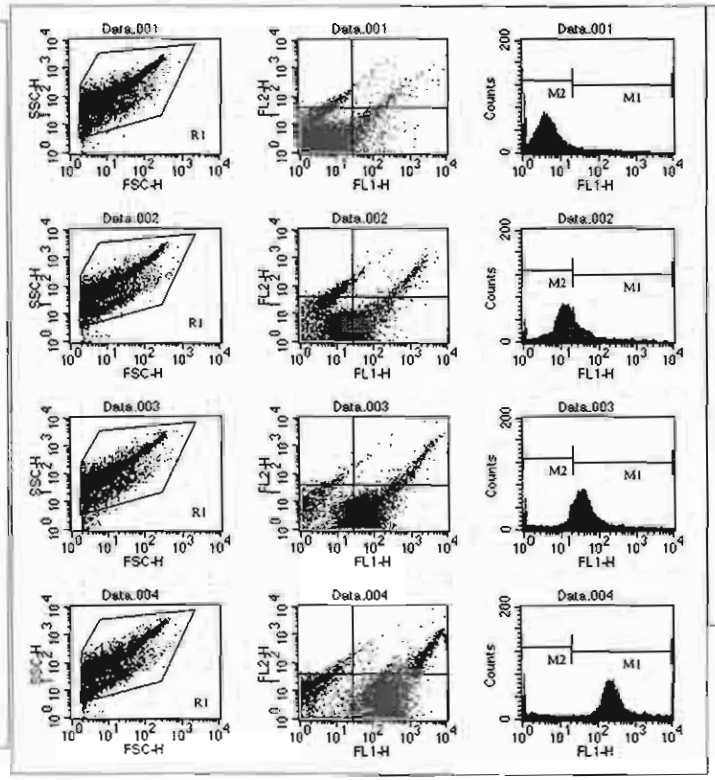
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	481	4.85	4.81	11.05	9.57	71.43	64.61
UR	333	3.36	3.33	814.46	433.29	265.19	157.64
LL	7416	74.75	74.18	12.75	10.78	3.95	2.54
LR	1691	17.04	16.91	77.43	56.79	6.19	3.93

File: Data.003 Sample ID: Poly 1_20

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	92	0.93	0.92	9.14	7.85	66.61	57.74
UR	380	3.84	3.80	1514.20	926.46	388.14	185.45
LL	3703	37.46	37.03	17.53	13.44	4.31	2.72
LR	5711	57.77	57.11	68.92	55.03	4.42	2.83

File: Data.004 Sample ID: Anti-BCCP2 1_2

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	180	1.81	1.80	10.39	8.55	64.10	57.72
UR	1091	10.96	10.91	3726.23	2180.10	374.34	206.98
LL	1134	11.39	11.34	4.93	3.02	11.29	7.29
LR	7547	75.83	75.47	261.61	214.09	4.75	2.77



File: Data.001 Sample ID: Conjugate control

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9953	100.00	99.53	21.33	5.40	904.80	4.45	1
M1	21, 9734	904	9.08	9.04	183.87	70.64	335.87	53.52	23
M2	1, 2'	9053	90.96	90.53	5.10	4.18	68.62	4.14	1

File: Data.002 Sample ID: Poly 1_100

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9921	100.00	99.21	50.60	16.21	431.31	14.07	10
M1	21, 9734	3012	30.36	30.12	141.37	54.53	269.38	36.54	20
M2	1, 2'	6969	70.24	69.69	11.11	9.61	44.27	11.14	10

File: Data.003 Sample ID: Poly 1_20

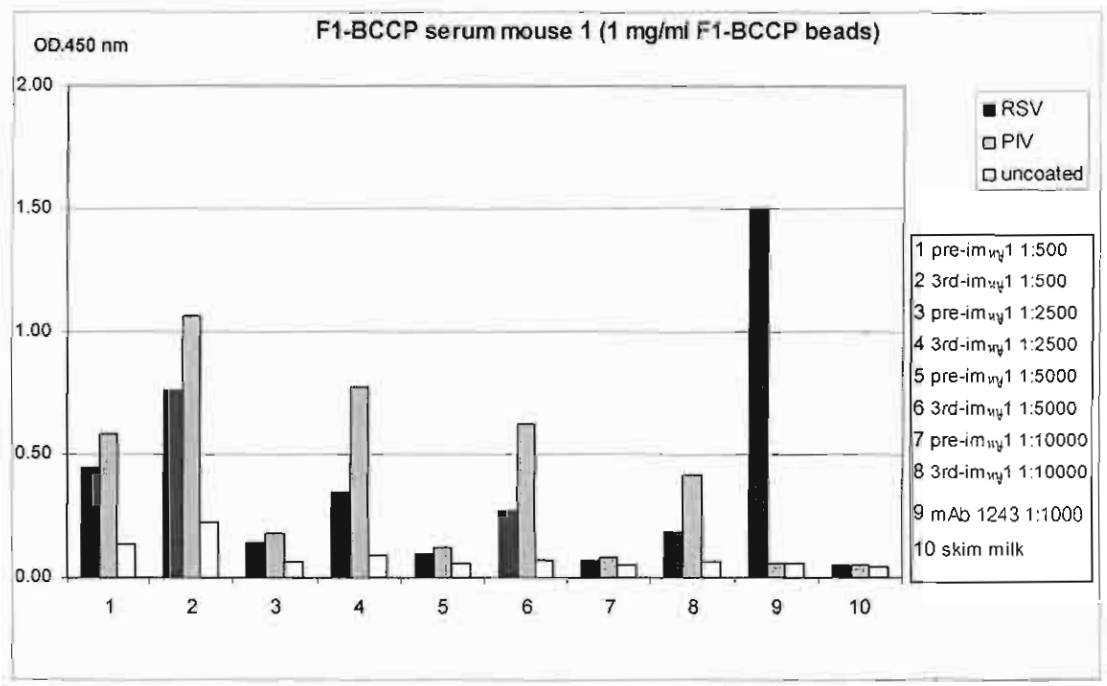
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9886	100.00	98.86	105.24	35.53	401.80	34.29	35
M1	21, 9734	7785	78.75	77.85	126.78	52.87	341.31	40.68	35
M2	1, 2'	2141	21.66	21.41	11.56	8.21	60.17	13.48	1

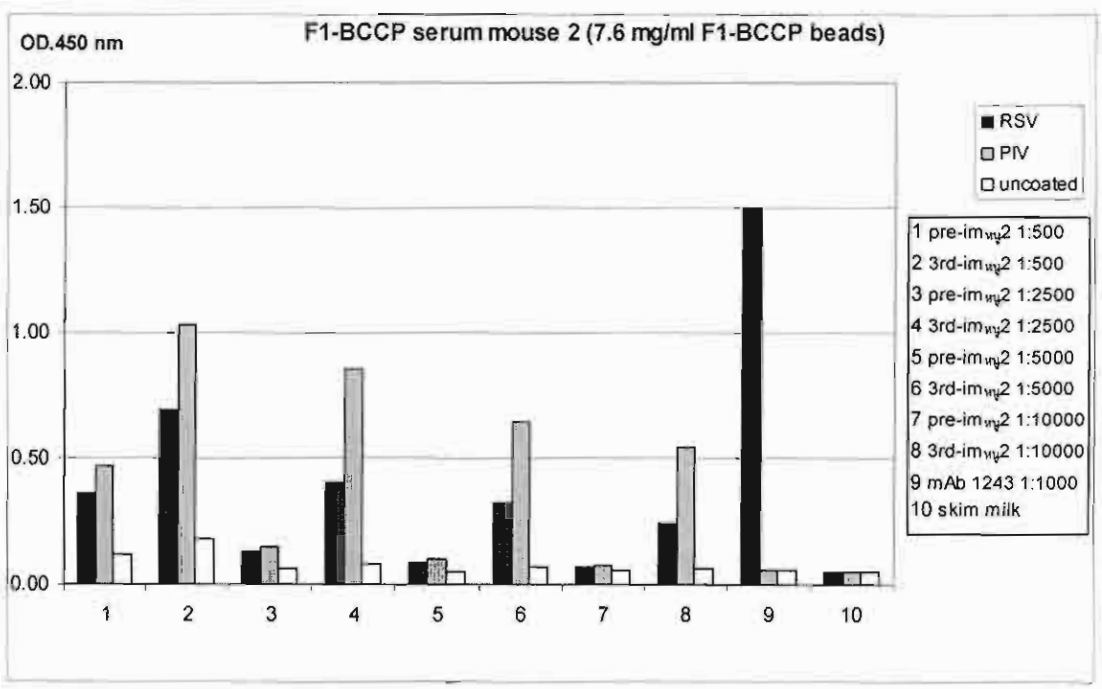
File: Data.004 Sample ID: Anti-BCCP2 1_2

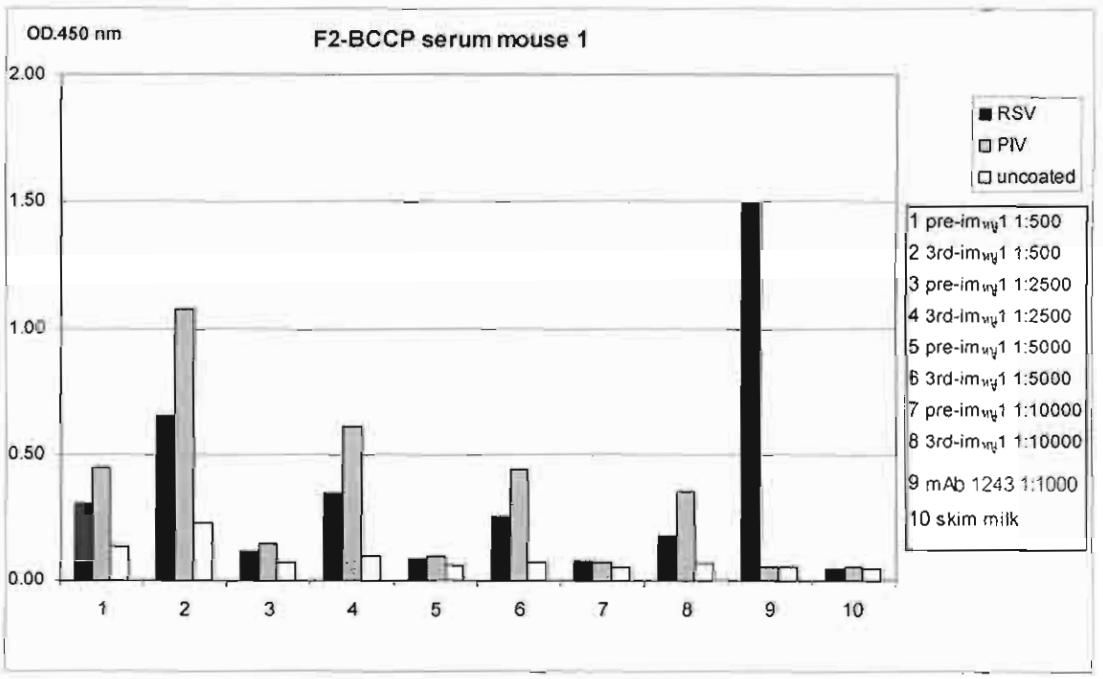
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	9952	100.00	99.52	607.63	180.31	254.55	205.35	9910
M1	21, 9734	8608	86.50	86.08	564.95	266.41	218.01	226.71	187
M2	1, 2'	1226	12.32	12.26	4.33	3.03	96.74	2.64	1

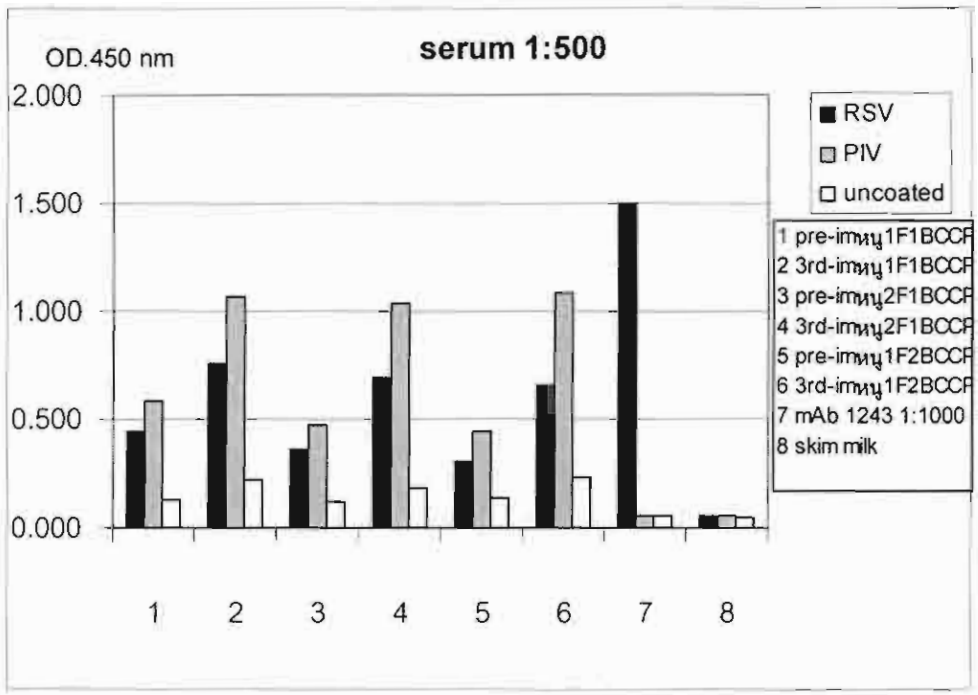
13. ทดสอบ serum หนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย F1-BCCP ไปแล้ว 3 ครั้งด้วย ELISA

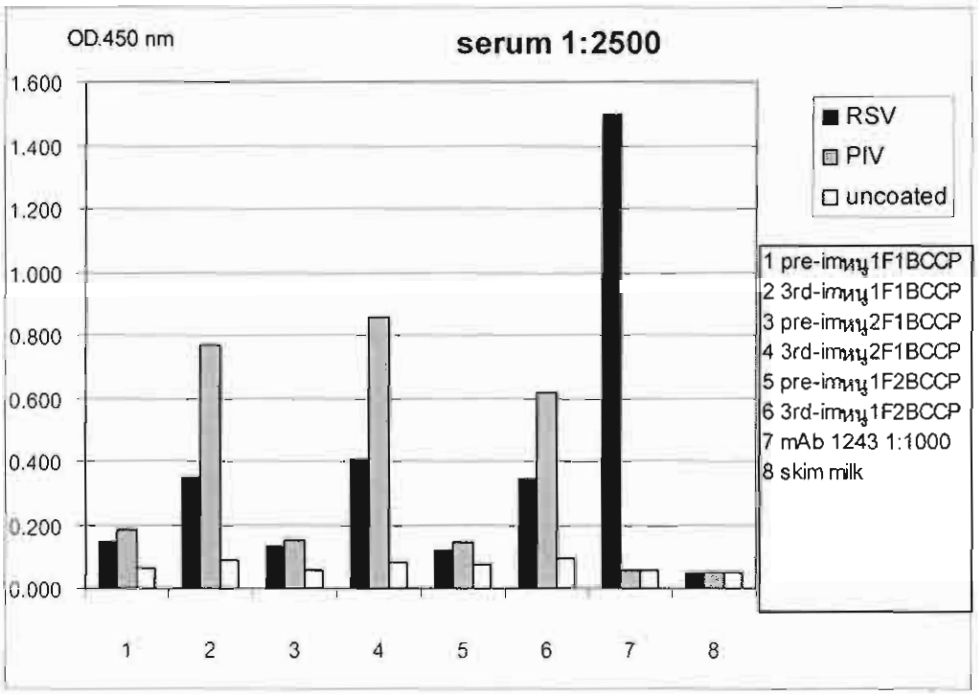
	serum หนู 1 F1-BCCP	RSV	PIV	uncoated	serum หนู 2 F1-BCCP	RSV	PIV	uncoated	serum หนู 1 F2-BCCP	RSV	PIV	uncoated
1	pre-imหนู1 1:500	0.447	0.584	0.133	pre-imหนู2 1:500	0.361	0.470	0.118	pre-imหนู1 1:500	0.307	0.449	0.135
2	3rd-imหนู1 1:500	0.761	1.064	0.222	3rd-imหนู2 1:500	0.693	1.034	0.184	3rd-imหนู1 1:500	0.657	1.079	0.228
3	pre-imหนู1 1:2500	0.144	0.183	0.063	pre-imหนู2 1:2500	0.131	0.150	0.060	pre-imหนู1 1:2500	0.121	0.147	0.077
4	3rd-imหนู1 1:2500	0.347	0.769	0.088	3rd-imหนู2 1:2500	0.409	0.854	0.084	3rd-imหนู1 1:2500	0.346	0.613	0.097
5	pre-imหนู1 1:5000	0.097	0.123	0.056	pre-imหนู2 1:5000	0.089	0.098	0.053	pre-imหนู1 1:5000	0.086	0.098	0.063
6	3rd-imหนู1 1:5000	0.268	0.627	0.068	3rd-imหนู2 1:5000	0.326	0.642	0.069	3rd-imหนู1 1:5000	0.255	0.444	0.073
7	pre-imหนู1 1:10000	0.072	0.084	0.054	pre-imหนู2 1:10000	0.069	0.075	0.056	pre-imหนู1 1:10000	0.078	0.076	0.056
8	3rd-imหนู1 1:10000	0.186	0.416	0.064	3rd-imหนู2 1:10000	0.241	0.545	0.063	3rd-imหนู1 1:10000	0.179	0.354	0.068
9	mAb 1243	1.498	0.055	0.055	mAb 1243	1.498	0.055	0.055	mAb 1243	1.498	0.055	0.055
10	skim milk	0.051	0.053	0.048	skim milk	0.051	0.053	0.048	skim milk	0.051	0.053	0.048

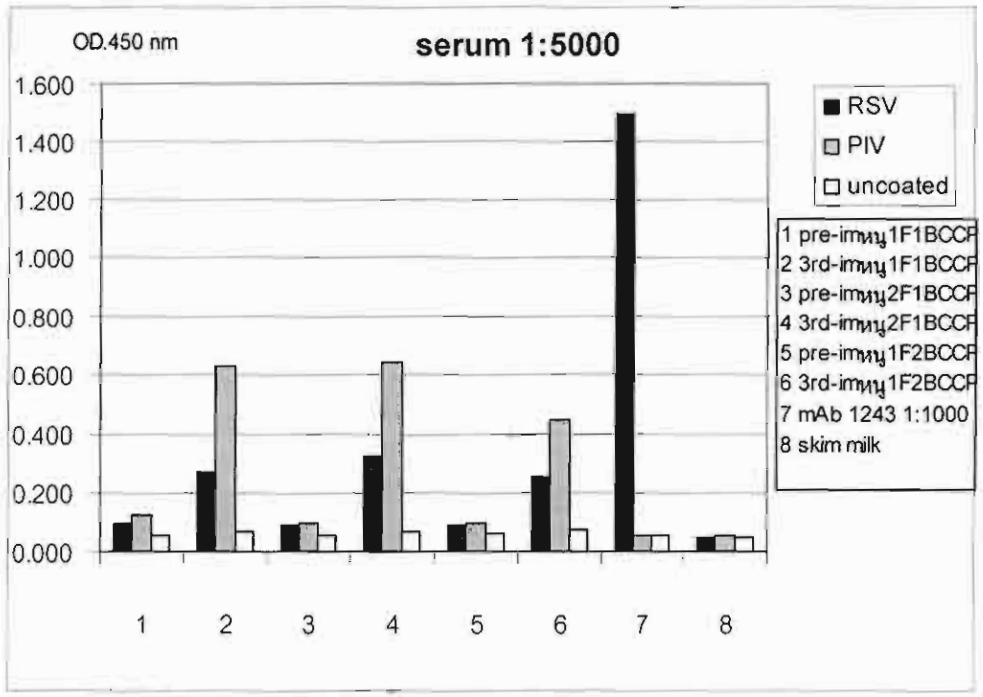


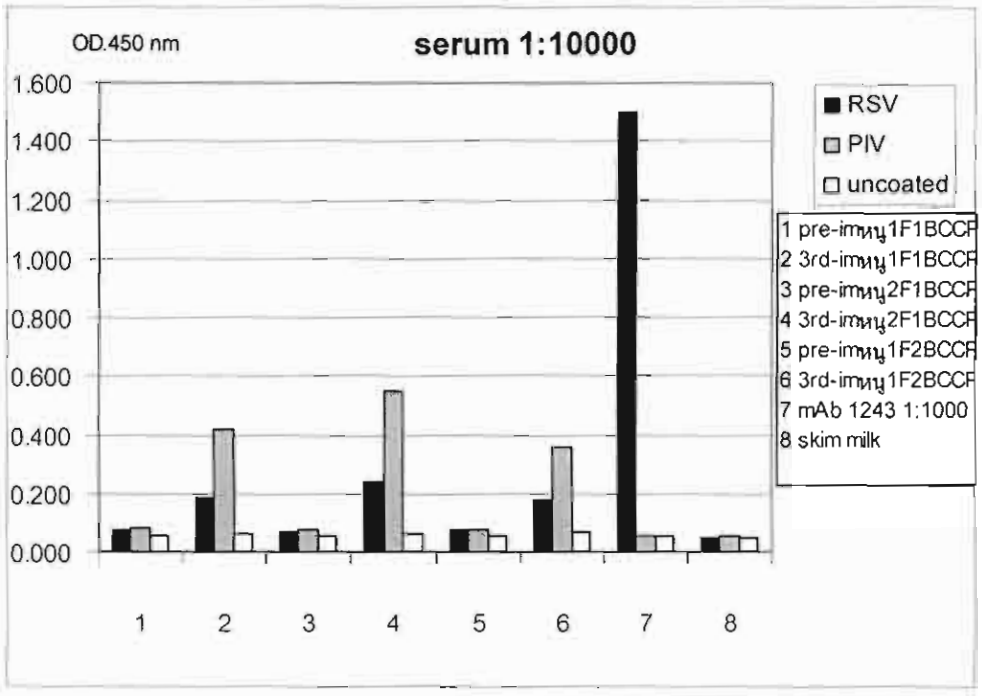

OD.450 nm
F1-BCCP serum mouse 2 (7.6 mg/ml F1-BCCP beads)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
RSV
PIV
uncoated
1 pre-im$_{mu}$2 1:500
2 3rd-im$_{mu}$2 1:500
3 pre-im$_{mu}$2 1:2500
4 3rd-im$_{mu}$2 1:2500
5 pre-im$_{mu}$2 1:5000
6 3rd-im$_{mu}$2 1:5000
7 pre-im$_{mu}$2 1:10000
8 3rd-im$_{mu}$2 1:10000
9 mAb 1243 1:1000
10 skim milk


OD.450 nm
F2-BCCP serum mouse 1
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
RSV
PIV
uncoated
1 pre-im$_{mu}$1 1:500
2 3rd-im$_{mu}$1 1:500
3 pre-im$_{mu}$1 1:2500
4 3rd-im$_{mu}$1 1:2500
5 pre-im$_{mu}$1 1:5000
6 3rd-im$_{mu}$1 1:5000
7 pre-im$_{mu}$1 1:10000
8 3rd-im$_{mu}$1 1:10000
9 mAb 1243 1:1000
10 skim milk


serum 1:500
OD.450 nm
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
1 2 3 4 5 6 7 8
RSV
PIV
uncoated
1 pre-immu1F1BCCP
2 3rd-immu1F1BCCP
3 pre-immu2F1BCCP
4 3rd-immu2F1BCCP
5 pre-immu1F2BCCP
6 3rd-immu1F2BCCP
7 mAb 1243 1:1000
8 skim milk


serum 1:2500
OD.450 nm
1.600
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
1 2 3 4 5 6 7 8
RSV
PIV
uncoated
1 pre-immu1F1BCCP
2 3rd-immu1F1BCCP
3 pre-immu2F1BCCP
4 3rd-immu2F1BCCP
5 pre-immu1F2BCCP
6 3rd-immu1F2BCCP
7 mAb 1243 1:1000
8 skim milk


OD.450 nm
serum 1:5000
1.600
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
1
2
3
4
5
6
7
8
RSV
PIV
uncoated
1 pre-immu1F1BCCR
2 3rd-immu1F1BCCR
3 pre-immu2F1BCCR
4 3rd-immu2F1BCCR
5 pre-immu1F2BCCR
6 3rd-immu1F2BCCR
7 mAb 1243 1:1000
8 skim milk


OD.450 nm
serum 1:10000
1.600
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
1
2
3
4
5
6
7
8
RSV
PIV
uncoated
1 pre-immu1F1BCCR
2 3rd-immu1F1BCCR
3 pre-immu2F1BCCR
4 3rd-immu2F1BCCR
5 pre-immu1F2BCCR
6 3rd-immu1F2BCCR
7 mAb 1243 1:1000
8 skim milk

สรุป และ วิจารณ์

เทคนิคที่เหมาะสมที่สุดในการสร้าง recombinant protein จาก *E. coli* เพื่อใช้เป็น immunogen สำหรับผลิต monoclonal antibody คือการใช้ BCCP fusion protein ซึ่งสามารถ purify ได้ง่ายโดยอาศัย streptavidin coated magnetic bead เมื่อเทียบกับการทำ phage display technique อาจไม่มีความเหมาะสมหากโครงสร้าง protein มีความซับซ้อนมาก ซึ่งส่งผลให้ปริมาณการ display น้อยและไม่สามารถนำไปเป็น immunogen ได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้เทคนิค phage display เพื่อศึกษา domain สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์ของ respiratory syncytial virus ซึ่งคือ F2 domain

ผลที่ได้รับ

1. วิธีการใหม่ในการ display recombinant protein บน phage particle เพื่อใช้เป็น immunogen
2. Phagemid ใหม่ที่สามารถ display recombinant protein ผ่านทาง Tat pathway
3. วิธีการใหม่ในการสร้าง recombinant protein เพื่อใช้เป็น immunogen โดยสร้างเป็น fusion protein กับ biotin carboxyl transferase
4. วิธีการใหม่ในการประยุกต์ใช้ phage display technique เพื่อศึกษาหน้าที่ของ ligand-receptor
5. Monoclonal anti-F2 antibody เพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่ และประยุกต์ใช้ในการรักษา
6. Publication จำนวน 3 เรื่อง
    - Thammawong P, Kasinrerk W, Turner RJ and **Tayapiwatana C**. Twin-arginine signal peptide attributes effective display of CD147 to filamentous phage. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 69:697-703. (impact factor 2.358)
    - Intasai N, Kasinrerk W, Mai S and **Tayapiwatana C**. Binding of multivalent CD147 phage induces apoptosis of U937 cells. Int Immunol 2006; 18:1159-69. (impact factor 3.543)
    - **Tayapiwatana C**, Chotpadiwetkul R and Kasinrerk W. A novel approach of using streptavidin magnetic bead sorting in vivo biotinylated survivin for monoclonal antibody production. (J Immunol Methods 2006, in press) (impact factor 2.464)
7. รางวัลจากผลงานวิจัย
    - Young Scientist Award 2006 for The 22nd National Congress on Allergy and Immunology from **Thai Society of Allergy and Immunology**.
    - AAI Junior Faculty Award 2006 for The Annual Meeting of AAI 2006 in Boston, USA from **The American Association of Immunologists**.