บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4580003

ชื่อโครงการ : การสร้างฟาจซึ่งแสดงแอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์หรือโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์เพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่

ชื่อนักวิจัย : นายชัชชัย ตะยาภิวัฒนา

ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ ม.เชียงใหม่

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

ระยะเวลาโครงการ : 1 ปี

โดยขบวนการ VCSM13 filamentous phage display technique โปรตีนที่มีความแตกต่างกันจำนวน 4 ชนิด คือ CD99, CD147, single chain Fv (ScFv) และ GFP ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นในลักษณะที่มีการรวมตัวกับ gpIII และ/หรือ gpVIII ของ VCSM13 filamentous phage คุณภาพและปริมาณของโปรตีนที่แสดงออกบนผิวของฟาจเหล่านี้ได้ถูกทดสอบโดยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา คือ ELISA และ Western Immunoblotting ชุดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถจับได้กับ CD99 หรือ CD147 ได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการพับทบของ epitopes บนโมเลกุลที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นบนผิวของฟาจ สิ่งที่น่าสนใจคือฟาจซึ่งแสดงโมเลกุล CD99 สามารถยับยั้งความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD99 (CD99/1) ในการกระตุ้นให้เซลล์ Jurkat เกิดการจับกลุ่มได้ ซึ่งหมายถึงการปรากฏอยู่ของ bioactive domain บน CD99 ที่อยู่บนผิวของฟาจ ส่วนกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD147 ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาตำแหน่งของ CD147 epitopes ซึ่งปรากฏอยู่บนผิวของฟาจผ่าน gpIII โดยวิธี competitive ELISA สายพันธุ์เชื้อ *Escherichia coli* (XL-1 Blue และ TG-1) ที่นำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการแสดงออกของ CD147 ซึ่งพับทบอย่างถูกต้องได้ถูกแสดงในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้การแสดง CD147 ผ่านโมเลกุล gpVIII เพื่อเพิ่มจำนวน CD147 ที่ปรากฏอยู่ให้มากกว่าหนึ่งครั้งบนผิวของฟาจได้ถูกนำมาทำการศึกษาในการเพาะเลี้ยงหลายสภาวะซึ่งแสดงประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ทั้ง CD99 และ CD147 ที่ปรากฏอยู่บนผิวของฟาจได้ถูกนำไปศึกษาเบื้องต้นเพื่อกระตุ้นเซลล์หลายชนิด และยังมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในการค้นหา ligand-partner ต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้เตรียมวิธีการดึงเอาฟาจซึ่งสร้าง ScFv บนผิวผ่าน gpIII ที่สามารถจับกับเซลล์ Jurkat และ Daudi ได้ออกจาก libraries โดยเทคนิค intact cell-panning เพื่อปรับปรุงและพัฒนาศักยภาพของ phage display technique ในการศึกษาการจับกันของโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วยวิธี fluorescence technique จึงได้เตรียมฟาจที่แสดง GFP บนผิวผ่าน gpVIII สำหรับใช้ร่วมกับการแสดงโมเลกุลชนิดอื่นๆบนผิวของฟาจผ่าน gpIII ทำให้สะดวกมากยิ่งขึ้นในการศึกษา

Keywords : phage display technique, surface molecule, GFP, ScFv, expression

Abstract

Project Code : TRG4580003

Project Title : Constuction of Phage Display of Antibody Specific to Human Leukocyte Surface Molecule or Human Leukocyte Surface Molecule for Functional Studies

Investigator : Mr. Chatchai Tayapiwatana

Dept. of Clinical Immunology, Fac. of Associated Medical Sciences

Chiang Mai UNiversity

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

Project Period : 1 year

By VCSM13 filamentous phage display technique, four different proteins i.e. CD99, CD147, single chain Fv (ScFv) and GFP were synthesized as fusion protein of gpIII and/or gpVIII. The quality and quantity of these displayed proteins were characterized using immunological techniques: ELISA, Western Immunoblotting. Panels of monoclonal antibodies specifically reacted with CD99 or CD147 were used for determining the folding efficiency of certain epitopes appeared on CD99 or CD147 harbored on phage particles. Interestingly, the constructed CD99-phages inhibited CD99 mAb, MT99/1, induced Jurkat cell aggregation indicating the reservation of CD99 bioactive domain. CD147 MAbs were used for mapping the CD147 epitopes appeared on phage coated, gpIII by competitive ELISA. The influence of *Escherichia coli* host strains, XL-1 Blue and TG-1 was demonstrated in display of CD147. In addition, phage-displayed multivalent CD147 via gpVIII of VCSM13 was produced in various culturing conditions which resulted in different degrees of display. Both CD99 and CD147 linking on phage particles were preliminary experimented for cellular activations of certain cell-lines and will be further applied for ligand tracing. In an order to modify the phage display technique for cell surface molecule studies, phage-displayed GFP via gpVIII was produced. Construction of phage-displayed green fluorescence protein (GFP) via gpVIII suggested the possibility to deliver GFP to periplasmic space of *E. coli* by Sec pathway which contradicted with former reports. This GFP-phage could simultaneously display with any recombinant molecules via gpIII for applying in one step fluorescence technique to monitor ligand-receptor binding on cell surface. Apart from displaying of CD molecule, the method for intact cell-panning of phage-displayed ScFv recognizing surface molecules on Jurkat and Daudi cells out of the combinatorial libraries was established.

Keywords : phage display technique, surface molecule, GFP, ScFv, expression