การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอคโตโดเมนของ NOTCH3

นางสาวสิริภาภรณ์ ผุยกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ECTODOMAIN OF NOTCH3

Miss Siripaporn Phuygun

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

521091

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอคโตโดเมนของ NOTCH3
โดย	นางสาวสิริภาภรณ์ ผุยกัน
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ

(ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิริภาภรณ์ ผุยกัน : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอคโตโดเมนของ NOTCH3. (PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ECTODOMAIN OF NOTCH3) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, 121 หน้า.

Notch3 เป็นโพรโทออนโคยีน (protooncogene) ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการเจริญ การแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะและกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซีส ในระบบภูมิคุ้มกัน Notch3 ควบคุมการพัฒนาของ regulatory T cell และกระบวนการแปรสภาพเพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะของ helper T cell ความผิดปกติของ Notch3 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งและโรคในระบบประสาท งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอคโตโดเมนของ Notch3 โดยทำการออกแบบไพร์เมอร์เพื่อสร้างตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะภายในเอคโตโดเมนของยีน *mNotch3* ที่บริเวณ EGF repeats 9-14 ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน *mNotch3* กับเวกเตอร์ pET-15b ซึ่งมีส่วนของฮีสติดีนแทกแทรกอยู่ที่ปลายทางด้าน 5' จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLyS และ Rosetta gami B (DE3) pLyS ภายหลังการชักนำพบว่า *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLyS สามารถผลิตโปรตีน mNotch3 ได้โปรตีนขนาดประมาณ 33 kDa จึงคัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์นี้ในการหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อผลิตโปรตีน mNotch3 ให้ได้มากที่สุด จากผลการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2-0.8 นาน 6 ชั่วโมง ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป His-Select Nickel beads column affinity โปรตีน mNotch3 บริสุทธิ์ใช้เป็นแอนติเจนสำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมานำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วยเทคนิค Western blot พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 4 โคลน ได้แก่ 4/D8-D6, 2/D5-F6, 2/D5-G6 และ 2/D5-E2 และเมื่อทดสอบความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับ mNotch3 ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ 293T ที่มีบริเวณเอคโตโดเมนของ mNotch3 ด้วยเทคนิค Cell ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน 4/D8-D6 และ 2/D5-F6 มีความจำเพาะต่อรีเซบเตอร์ที่ผิว ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษาการแสดงออกของ Notch3 ในเซลล์และเนื้อเยื่อต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต สิริภาภรณ์ ผุยกัน

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ธนาภัทร ปาลกะ

ปีการศึกษา 2552

4872609023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : Notch 3 / Recombinant Protein/ Monoclonal Antibody / Cell-ELISA

SIRIPAPORN PHUYGUN: PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ECTODOMAIN OF NOTCH 3. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASST.PROF.TANAPAT PALAGA, Ph.D., 121 pp.

Notch 3 encodes cell surface receptor protein which is essential for development, and apoptosis of various cell types. In the immune system, Notch 3 regulates the development of regulatory T cell and differentiation of helper T cell. Dysregulation of Notch 3 is linked to cancer and neurological disorders. Aim of this research was to produce monoclonal antibodies against ligand-binding ectodomain of Notch 3. Primer sets overlapping the EGF 9-14 of Notch 3 were designed and the restriction enzymes recognition site was introduced at both ends. PCR amplification using this primer set and plasmid pcDNA-Notch 3 as template was carried out. The PCR products were digested and inserted into pET-15b expression vector in frame with histidine tag to created recombinant plasmid. The recombinant plasmid was introduced in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS and Rosettagami B (DE3) pLysS. After induction using IPTG, it was found that only Rosettagami B(DE3) pLysS yielded expected protein product on SDS-PAGE with the size of 33 kDa. Therefore, Rosettagami B (DE3) pLysS harboring the recombinant plasmid gene was chosen as expression system for further optimization for productivity. Optimal conditions for recombinant protein production were obtained by cultivation at 37°C, with IPTG induction time of 6 hr. The recombinant protein was purified using His-select Nickel beads column affinity and used as antigen to immunize BALB/c mice. After somatic cell fusions, culture supernatants were screened by Western blot and cell-ELISA for antibodies which recognizes native Notch 3. Four clones producing antibodies reacting specifically with Notch3 were obtained. Two clones (4/D8-D6 and 2/D5-F6) reacted specifically to Notch 3 in 293T cell line overexpressing mNotch 3 by cell-ELISA. These monoclonal antibodies are useful for monitoring Notch 3 expression in cells and tissues.

Department : Microbiology Student's Signature Siripaporn Phuygun

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature Tanapat Pal

Academic Year : 2009

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวการทำวิจัย จนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ดร.นันทิกา คงเจริญพร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย และขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยทุกชิ้น

ขอขอบพระคุณพี่ๆ โดยเฉพาะคุณทรงจันทร์ ภู่ทอง เพื่อนๆน้องๆในห้องปฏิบัติการ 403 และภายในภาควิชาจุลชีววิทยา และที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ได้ให้คำช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งกำลังใจที่มีให้ในทุกๆเรื่อง

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่สังเวียน และคุณพ่อบุญช่วย ผุยกัน คุณน้าสุพิชชา อินปัญญา คุณยาย คุณปู่คุณย่า น้องชาย และญาติพี่น้องทุกคนที่ให้ความรัก ให้ความสนับสนุนและกำลังใจในการทำวิจัยเสมอมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฎ

สารบัญภาพ.....ฑ

สัญญลักษณ์และคำย่อ.....ณ

บทที่ 1.....1

บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....2

บทที่ 2.....4

ปริทรรศน์วรรณกรรม.....4

วิถีสัญญาณ Notch.....4

Notch3 กับการเกิดมะเร็ง.....6

Notch3 ในระบบภูมิคุ้มกัน.....8

แอนติบอดี.....9

โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดี.....9

โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....11

ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดี.....11

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ของหนู.....13

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....17

บทที่ 3.....19

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....19

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....19

หน้า

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ 22
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 24
3.3.1 แบคทีเรีย 24
3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 25
3.5 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง 26
3.6 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot 26
3.7 วิธีเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ 27
3.7.1 การเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ของ *E.coli* DH5α 27
3.7.2 การโอนถ่ายพลาสมิดเข้าไปในแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Heat shock 27
3.7.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย 28
3.7.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของพลาสมิด 29
3.8 สร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่มีบริเวณเอคโตโดเมนของ *mNotch3* 29
3.8.1 การโคลนยีน *mNotch3* เข้าไปในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก 29
3.8.1.1 การเตรียมเวกเตอร์ pET-15b สำหรับเชื่อมต่อกับยีน *mNotch3* 29
3.8.1.2 การวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 29
3.8.1.3 การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุด QIAgen Gel Extraction Kit 30
3.8.1.4 การเตรียมยีน *mNotch3* เพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET-15b สำหรับแสดงออก 30
3.8.1.4.1 การสังเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 30
3.8.1.4.2 การเตรียมซิ้นยีน *mNotch3* เพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET-15b 32
3.8.1.4.3 การเชื่อมต่อยีน *mNotch3* เข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-15b 32
3.8.1.5 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน *mNotch3* 33
3.8.1.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสยีน *mNotch3* 34
3.9 การทรานสฟอร์มเวกเตอร์ pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียเพื่อการแสดงออก 34

หน้า

3.9.1 การทรานสฟอร์ม pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียเพื่อการแสดงออก....34
3.9.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยวิธี SDS-PAGE....34
3.9.2.1 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 repeats EGF 9-14 จากตะกอนเซลล์ทั้งหมด....35
3.9.2.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 36
3.9.2.2.1 การแปรผันอุณหภูมิในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14....36
3.9.2.2.2 การแปรผันเวลาในการผลิตภายหลังการชักนำด้วย IPTG 36
3.9.3.2.3 การแปรผันค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ก่อนการชักนำด้วย IPTG....38
3.9.2.2.4 การแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14....38
3.10 การสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์ *E. coli* ด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator39
3.10.1 คัดเลือกบัฟเฟอร์สำหรับแตกเซลล์ที่สมบูรณ์....39
3.10.2 การแปรผันระยะเวลาในการ sonication ก่อนทำโปรตีนบริสุทธิ์ 39
3.11 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ His-Select Nickel affinity gel.... 39
3.12 การเตรียมเซลล์และแอนติเจน mNotch3 เพื่อใช้ในการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี.... 40
3.12.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ 293T สำหรับการทรานสเฟคชั่น.... 40
3.12.2 การทำทรานสเฟคชันพลาสมิด pcDNA-*mNotch3* ใน เซลล์ไลน์ 293T.... 40
3.12.3 การสกัดโปรตีนจากเซลล์ไลน์ 293T ที่ทำทรานสเฟคชันอย่างถาวรด้วยบัฟเฟอร์ RIPA.... 41
3.12.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay) 41
3.12.5 โอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidine fluoride (PVDF) membrane....42
3.12.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 ของเซลล์ไลน์ 293T ที่ทำทรานสเฟคชันอย่างถาวร ด้วยวิธี Western blot.... 42

หน้า

3.12.7 การตรวจสอบสัญญาณด้วยวิธี Chemiluminescence และ autoradiography. 43
3.13 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3..... 44
3.13.1 การเตรียมแอนติเจนและกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง.....44
3.13.2 การเตรียมซีรัม..... 44
3.13.3 การตรวจวัดระดับของแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี Indirect ELISA 44
3.14 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาสำหรับผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 45
3.14.1 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา NSI..... 45
3.14.2 การเตรียมเซลล์ม้าม..... 45
3.14.3 การหลวมรวมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์มัยอีโลมา..... 46
3.15 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์..... 46
3.16 การคัดกรองไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 โดยวิธี Western blot 46
3.17 การคัดแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution..... 47
3.18 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว..... 47
3.19 การนำเซลล์ไฮบริโดมากลับขึ้นมาเลี้ยงใหม่..... 48
3.20 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T ด้วยเทคนิค Cell-ELISA..... 48
3.21 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 49
บทที่ 4.....50
ผลการทดลอง.....50
4.1 การเตรียมพลาสมิดที่มียีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 และ พลาสมิดควบคุม..... 50
4.2 การเตรียมพลาสมิด pET-15b.....52
4.3 วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยวิธี SDS-PAGE 55
4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 58
4.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 59

หน้า

4.4.2 เวลาที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังการชักนำด้วย IPTG 60
4.4.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมก่อนที่จะชักนำด้วย IPTG 62
4.4.4 ความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมในการชักนำการสร้างโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 64
4.5 ความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 หลังทำบริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป 65
4.5.1 ผลการคัดเลือกบัฟเฟอร์ในการทำให้เซลล์แตกเพื่อสกัดโปรตีน 65
4.5.2 ผลการแปรผันระยะเวลาในการ sonication ก่อนทำโปรตีนบริสุทธิ์ 67
4.6 การเตรียมเซลล์ที่มีการแสดงออก Notch3 เกินเพื่อใช้ในการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทำทรานสเฟคชันอย่างถาวรในเซลล์ไลน์ 293T 69
4.7 ผลการปลูกภูมิคุ้มกันของหนูทดลองโดยรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 70
4.8 ผลการหลอมรวมไมอีโลมาเซลล์เข้ากับเซลล์ม้าม 72
4.8.1 ผลการหลอมรวมไมอีโลมาเซลล์เข้ากับเซลล์ม้ามครั้งที่ 1 (Fusion 1) 72
4.8.2 ผลการหลอมรวมไมอีโลมาเซลล์เข้ากับเซลล์ม้ามครั้งที่ 2 (Fusion 2) 80
4.9 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ mNotch 3 ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ไลน์ 293T/pcDNA-mNotch3 ด้วยเทคนิค Cell-ELISA 82
4.10 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 84
บทที่ 5 86
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 86
รายการอ้างอิง 90
ภาคผนวก ก 97
ภาคผนวก ข 100
ภาคผนวก ค 111
ภาคผนวก ง 119
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 121

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 จีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 24
ตารางที่ 3.2 ลักษณะสมบัติของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง 25
ตารางที่ 3.3 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง 25
ตารางที่ 3.4 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง 26
ตารางที่ 3.5 แสดงแอนติบอดีต่อ mNotch3 ที่ใช้ในการทำ western blot 26
ตารางที่ 3.6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 31
ตารางที่ 3.7 สารละลายที่เป็นส่วนประกอบในการเชื่อมต่อชิ้นยีนกับเวกเตอร์ 33
ตารางที่ 4.1 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม T-DNA primer design ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการออกแบบจะมีขนาด 697 คู่เบส 50
ตารางที่ 4.2 โคดอนของกรดอะมิโนที่พบได้ในความถี่ต่ำในแบคทีเรียภายในเอคโตโดเมนของยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 58
ตารางที่ 4.3 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของหนู 2 ตัวหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่ทำให้บริสุทธิ์ 71
ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 จำนวน 2 ตัวด้วยวิธี Indirect ELISA 72
ตารางที่ 4.5 สรุปผลการหลอมรวมเซลล์ อัตราส่วนเซลล์ไฮบริโดมาและหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดกรอง ภายหลังการหลอมรวมเซลล์ 73
ตารางที่ 4.6 ผลการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 ที่แสดงออกโดยเซลล์ไลน์ 293T ด้วยเทคนิค Western blot 74
ตารางที่ 4.7 แอนติบอดีไตเตอร์ของหนูตัวที่ 5-7 ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่บริสุทธิ์ 80
ตารางที่ 4.8 การทดสอบระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 จำนวน 3 ตัวด้วยวิธี Indirect ELISA 81
ตารางที่ 4.9 การทดสอบความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับ mNotch 3 ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ที่มีบริเวณเอคโตโดเมนของ mNotch3 83
ตารางที่ 4.10 สรุปผลการหลอมรวมเซลล์ไมอีโลมากับเซลล์ม้ามทั้งหมด 2 ครั้ง 84

หน้า

ตารางที่ 4.11 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA.....85
ตารางที่ ง.1 รหัสหลุมของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1.....119
ตารางที่ ง.2 รหัสหลุมของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2.....120

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ Notch receptor 4
รูปที่ 2.2 วิถีสัญญาณ Notch.....5
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ Notch3 receptor.....6
รูปที่ 2.4 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดี.....10
รูปที่ 2.5 ไดอะแกรมแสดงการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT selection).....14
รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....16
รูปที่ 3.1 การแปรผันเวลาในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังการชักนำด้วย IPTG.....37
รูปที่ 3.2 การโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง PVDF membrane และ western blot.....43
รูปที่ 4.1 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส.....51
รูปที่ 4.2 ผลการตัดชิ้นยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....51
รูปที่ 4.3 ผลการตัดพลาสมิด pET-15b ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....52
รูปที่ 4.4 ผลการตัดชิ้นยีน *mNotch3* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....53
รูปที่ 4.5 ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pET-mNotch3 (สร้างรูปโดยโปรแกรม BVTech Plasmid) 54
รูปที่ 4.6 ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ใน *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS.....55
รูปที่ 4.7 ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ใน *E.coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS.....56
รูปที่ 4.8 แสดงโครงสร้างและสมบัติละลายได้ในน้ำของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 57
รูปที่ 4.9 ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS เมื่อแปรผันอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ 59
รูปที่ 4.10 ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 2 ถึง 8 ชั่วโมง ตามลำดับ.....61

หน้า

รูปที่ 4.11 ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังการแปรผันค่าดูดกลืนแสงก่อนการชักนำด้วย IPTG.....63
รูปที่ 4.12 การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ 64
รูปที่ 4.13 ผลการตรวจหาโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังการแปรผันบัฟเฟอร์ในการทำให้เซลล์แตกและหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด His-Select Nickel affinity gel....66
รูปที่ 4.14 ผลการตรวจหาโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 เมื่อ sonication 20 ครั้งเป็นเวลา 5 วินาทีต่อครั้งและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด His-Select Nickel affinity gel.....67
รูปที่ 4.15 การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด His-Select Nickel affinity gel ที่ภาวะที่เหมาะสม.....68
รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์การทำทรานสเฟคชั่นอย่างถาวรในเซลล์ไลน์ 293T โดยวิธี Western blot เมื่อบ่มด้วยแอนติบอดีต่อ Notch3 (5E1 monoclonal antibody).....70
รูปที่ 4.17 ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีของหนูตัวที่ 3 และ 4 ที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน mNotch3 EGF repeats 9-14 ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และใช้ซีรัมของหนูทดลองเจือจาง 1:10000ถึง 1:390625000.....71
รูปที่ 4.18 ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีของหนูตัวที่ 5, 6 และ 7 ที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน mNotch3 EGF repeats 9-14 ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และใช้ซีรัมของหนูทดลองเจือจาง 1:500 ถึง 1:512,000.....81
รูปที่ 4.19 กราฟแสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T-mNotch3 ด้วยเทคนิค Cell-ELISA ที่ปริมาณเซลล์ 100,000 เซลล์ต่อหลุม.....83

HAT	aminopterine, hypoxanthine, thymidine
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradise peroxidase
HT	hypoxanthine และ thymidine
kDa	กิโลดาลตัน
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
no.	number
OD	optical density
PBS	phosphate buffer saline
PBST	phosphate buffer saline-tween
pcDNA Notch3	plasmid cDNA3 with full length Notch3
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
pH	ความเป็นกรด-ด่าง
PVDF	polyvinylidine fluoride
S.D.	standard deviation
SDS -PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อและสัญลักษณ์

%	เปอร์เซ็นต์
μM	ไมโครโมลาร์
/	per
:	ต่อ
5x	5 เท่า
293T- mNotch3	293T cell lines harbored plasmid cDNA3 with full length Notch3
ATCC	American type culture collection
BCA assay	bicinchoninic acid assay
bp	base pair
cDNA	complementary DNA
ddH_2O	deionized distilled water
dH_2O	distilled water
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TMB	3,3',5.5'-Tetramethyl-benzidine, not below 98% TLC
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขระดับโลก เพราะมีประชากรโลกจำนวนมากเจ็บป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง ในแต่ละปีมีประชากรโลกเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งมากกว่า 6,000,000 คนหรือร้อยละ 13 ของการเสียชีวิตของประชากรโลกทั้งหมด องค์การอนามัยโลกคาดว่าในปี พ.ศ.2558 จะมีประชากรโลกป่วยเป็นโรคมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นจากปีละ 10,100,000 คน เป็น 15,700,000 คน และจะมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็นปีละ 10,000,000 คน (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2005) มะเร็ง คือ กลุ่มของโรคที่เกิดขึ้นจากการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ และการที่เซลล์เหล่านี้เข้าไปทำลายเนื้อเยื่ออื่น ๆ อาจโดยการที่เซลล์เจริญเติบโตเข้าไปยังเนื้อเยื่ออื่น ๆ (การบุกรุก) หรือการกระจายเซลล์ไปยังอวัยวะอื่น ๆ (การแพร่กระจายของเนื้อร้าย) การเจริญเติบโตที่ไม่สามารถควบคุมได้นี้ อาจเกิดจากการสะสมของการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอภายในเซลล์ ทำให้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่จำเป็นในการควบคุมการทำงานของเซลล์สูญเสียหน้าที่ไป ทำให้เซลล์มีสมบัติที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อร้ายและแพร่กระจายไปในอวัยวะต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีววิทยาโมเลกุล ทำให้มีการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องและเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งจำนวนมากมาย เช่น กลุ่มยีน *Notch* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่ประมวลรหัสโปรตีนรีเซบเตอร์ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์ วิถีสัญญาณ Notch มีหน้าที่ควบคุมการแปรสภาพเพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ ควบคุมการเจริญของเซลล์และยังเกี่ยวข้องกับกลไกการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซีสด้วย ความผิดปกติของวิถีสัญญาณ Notch นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิด มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ มะเร็งปอด เป็นต้น ซึ่งมีรายงานถึงการพบการแสดงออกในระดับที่สูงเกินของโปรตีน Notch ในมะเร็งเหล่านี้

ยีน *Notch3* เป็นหนึ่งในสมาชิกกลุ่มยีน *Notch* โดยมีรายงานว่ายีน *Notch3* มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนากล้ามเนื้อที่บริเวณผนังหลอดเลือดเล็กในสมองในกระบวนการแปรสภาพเพื่อไปทำหน้าที่เป็นหลอดเลือด นอกจากนี้มีรายงานว่าวิถีสัญญาณ Notch3 ที่มีการแสดงออกที่สูง

เกินจะส่งเสริมการเจริญของมะเร็งปอด อีกทั้ง ยังมีรายงานถึงบทบาทของ Notch3 ในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำหน้าที่เป็นโปรตีนซึ่งควบคุมการทำงานของ regulatory T cell และการแปรสภาพของ helper T cell

ปัจจุบันความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันได้ถูกนำมาใช้อธิบายถึงการเกิดโรคต่างๆ มีการประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคและการบำบัดรักษาอย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะสูง เช่น การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจและรักษาโรคมะเร็ง ดังนั้น จึงมีความสนใจที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อบริเวณด้านนอกหรือเอคโตโดเมนของ Notch3 ซึ่งอาจมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นโปรตีนควบคุมการส่งสัญญาณของ Notch3 ทั้งในแง่บวกและลบ เนื่องจากบริเวณเอคโตโดเมนเป็นบริเวณสำคัญที่โปรตีน Notch3 ใช้ในการจับกับลิแกนด์เพื่อกระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ ซึ่งงานวิจัยนี้อาจจะเป็นแนวทางเลือกใหม่ในการบำบัดรักษาโรคมะเร็งแบบจำเพาะในอนาคตได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอคโตโดเมนของ Notch3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอคโตโดเมนของ Notch3 ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ Notch3 ในเซลล์ชนิดต่างๆ รวมถึงเซลล์มะเร็งด้วย

1.3.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอคโตโดเมนของ Notch3 นั้น ยังสามารถนำไปใช้เป็นสารควบคุมการส่งสัญญาณของ Notch3 ซึ่งประยุกต์ใช้ได้กับการรักษาโรคมะเร็งแบบจำเพาะและมีความแม่นยำสูง

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

1.4.2 ทำการสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่มีบริเวณเอคโตโดเมนของ Notch3 EGF repeats 9-14

1.4.3 ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli*

1.4.3.2 หาเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ที่สามารถผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ได้

1.4.3.1 หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14

1.4.4 สกัดแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนและทำให้บริสุทธิ์

1.4.5 ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอคโตโดเมนของ Notch3 EGF repeats 9-14

1.4.5.1 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ mNotch3 EGF repeats 9-14

1.4.5.2 เตรียมไฮบริโดมาที่มีความสามารถต่อการสร้างแอนติบอดี

1.4.5.3 คัดแยกเซลล์ให้เป็นโมโนโคลนที่สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยวิธี limiting dilution และวิเคราะห์ isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1.4.5.4 ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์โดยวิธี Cell-ELISA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

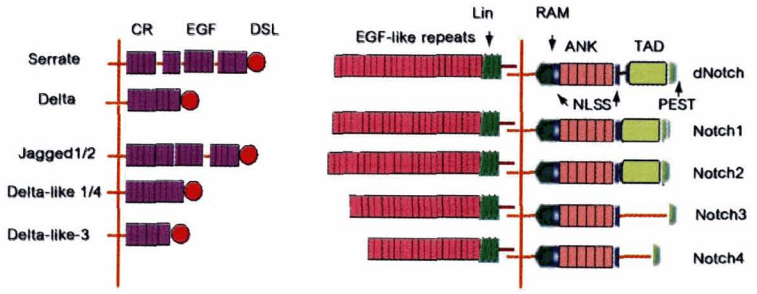
บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 วิถีสัญญาณ Notch

กลุ่มยีน *Notch* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1917 โดย Morgan (1928) ใน *Drosophila melanogaster* โดยเป็นยีนที่ทำให้มีความผิดปกติในการพัฒนาการของปีกแมลง กลุ่มยีน *Notch* ประมวลรหัสโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ โดยได้มีการอนุรักษ์ไว้ในระหว่างที่มีพัฒนาการของสัตว์ชั้นสูง โปรตีน Notch มีหน้าที่ควบคุมการเจริญของเซลล์ (proliferation) การแปรสภาพเพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) เกี่ยวข้องกับกลไกการตายของเซลล์ (cell death) ในระหว่างการพัฒนาของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Artavanis-Tsakonas และคณะ, 1999)

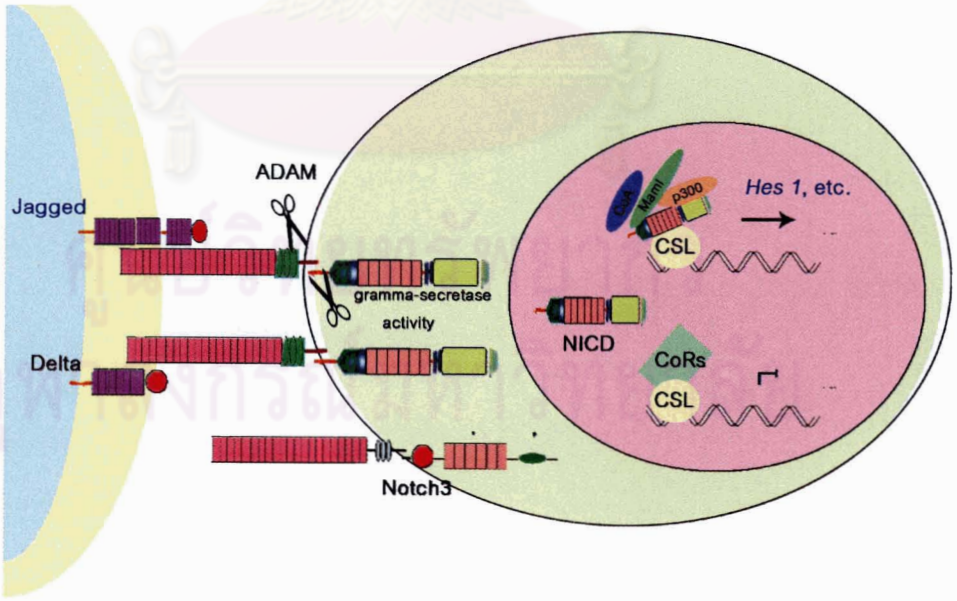
สมาชิกของกลุ่มยีน *Notch* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี 4 ชนิด คือ *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, และ *Notch4* (Larsson และคณะ, 1994) โครงสร้างของโปรตีน Notch ประกอบด้วยส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Notch extracellular domain; NEC) ซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญ ได้แก่ Epidermal growth factor (EGF)-like repeat ซึ่งเป็นบริเวณที่ซ้ำๆ กันตั้งแต่ 34-36 ซ้ำขึ้นอยู่กับชนิดของ Notch มีความสำคัญในการทำอันตรกิริยาแบบจำเพาะกับลิแกนด์ และ Lineage (Lin) domain ส่วนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Notch transmembrane domain; NTM) และบริเวณที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular Notch; ICN) ซึ่งประกอบด้วย RAM domain บริเวณที่ซ้ำกันของ ankyrin repeat, Nuclear localization sequences (NLS) 2 ตำแหน่ง Transactivation domain (TAD) ซึ่งพบเฉพาะใน Notch1 และ 2 และ PEST domain (Artavanis-Tsakonas และคณะ, 1999; Lardelli และคณะ, 1994; Gallahan และ Callahan, 1997; Maillard และคณะ, 2005) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ Notch receptor

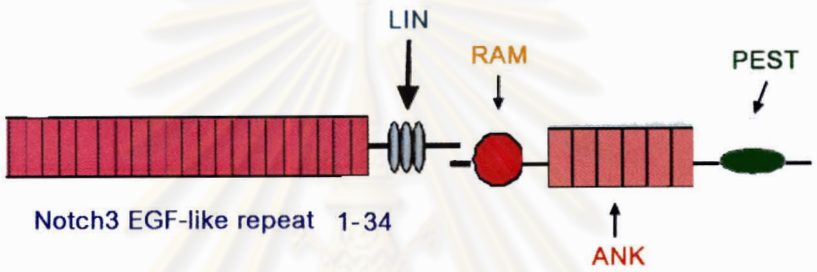
ลิแกนด์ของ Notch มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ เมื่อจับกับ Notch receptor ซึ่งมีการแสดงออกบนผิวเซลล์ ลิแกนด์ของ Notch receptor มี 5 ชนิด คือ Jagged 1, 2, Delta-like 1, 3, 4 มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย Epidermal growth factor (EGF)-like repeat, DSL (Delta/Serrate/Lag) และบริเวณ Cysteine-rich region ซึ่งพบเฉพาะใน Jagged 1 และ Jagged 2 เท่านั้น (Radtke และคณะ, 2004)

วิถีสัญญาน Notch เริ่มเมื่อ Notch receptor ทำอันตรกิริยากับลิแกนด์จากเซลล์ข้างเคียง ส่งผลให้ Notch receptor ถูกตัดด้วยเอนไซม์ tumor necrosis factor-alpha convertase (TACE) ในบริเวณ NEC (Brou และคณะ, 2000) เอนไซม์แกมมาซีครีเทส (γ- secretase) ตัดที่บริเวณ NTM (De Strooper และคณะ , 1999) ปลดปล่อย ICN จากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ICN เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและทำอันตรกิริยากับโปรตีน CSL ซึ่งเป็น DNA-binding protein ชักนำ transcription coactivator (CoA) มารวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง ICN และ CSL นำไปสู่การกระตุ้นยีนเป้าหมาย ให้มีการถอดรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) ซึ่งยีนเป้าหมายมีหน้าที่หลากหลายเช่น การยับยั้งการแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ ควบคุมการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Artavanis-Tsakonas และคณะ, 1999; Takebayashi และคณะ, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วิถีสัญญาณ Notch

ยีน *Notch3* เป็นหนึ่งในสมาชิกของกลุ่มยีน *Notch* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 19 (19p13.2-19p13.1) ในมนุษย์ และในหนูไมซ์มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 17 ซึ่งยีน *Notch3* มีการประมวลรหัสโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2,321 เรซิดิวส์ ประกอบด้วยบริเวณ N-terminal extracellular domain ที่มี Epidermal growth factor (EGF)-like repeat จำนวน 34 ซ้ำ ซึ่งทำหน้าที่จับกับลิแกนด์ที่ EGF-like repeat ตำแหน่งที่ 11-12 (Joutel และคณะ, 2000) มี cysteine-rich Notch/Lin 12 repeats 3 ซ้ำ (LIN/2), Single transmembrane domain และบริเวณ Intracellular domain ซึ่งมี tandem ankyrin repeats จำนวน 6 ซ้ำ



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ Notch3 receptor

ยีน *Notch3* มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนากล้ามเนื้อที่บริเวณผนังหลอดเลือดเล็กในสมอง โดยการแสดงออกของยีน *Notch3* จะสัมพันธ์กับการพัฒนาของระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system) (Dang และคณะ, 2005; Joutel และคณะ, 2000) และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาบทบาทของยีน *Notch3* พบว่าหนูไมซ์ที่มีการตัดต่อสารพันธุกรรมทำให้ไม่มียีน *Notch3* สามารถที่จะเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ได้ปกติ แต่จะมีความผิดปกติในเส้นเลือดโดยเฉพาะหลอดเลือดแดงในสมอง พบว่ายีน *Notch3* มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแปรสภาพของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่เป็นเซลล์หลอดเลือด (arterial differentiation) และก่อนการพัฒนาไปเป็น vascular smooth muscle cell (Domanga และคณะ, 2004)

Notch3 กับการเกิดโรคและมะเร็ง

Dichgans และคณะ (2002) ศึกษาการกลายพันธุ์ของโปรตีน Notch3 พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกรดอะมิโน cysteine ภายใน EGF-like repeats ในส่วน

Extracellular domain ส่งผลให้เกิดโรค CADASIL ที่ทำให้เกิดการเสื่อมของกล้ามเนื้อของผนังหลอดเลือดในระบบประสาททำให้มีอาการปวดศีรษะอย่างรุนแรงและอาการทางประสาทอื่นๆ เช่น อาการวิกลจริต ซึ่งยังไม่เป็นที่ชัดเจนว่าผลจากการกลายพันธุ์ทำให้วิถีสัญญาณ Notch มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นหรือลดลง

Haruki และคณะ (2005) รายงานว่า เมื่อได้ตรวจชิ้นเนื้อมะเร็งปอดของมนุษย์ด้วยวิธี Immunohistochemistry ร่วมกับเทคนิค Microarray พบการแสดงออกเกินของ Notch3 และเมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ Notch3 ด้วยการสร้างพลาสมิดที่มียีน *Notch3* เฉพาะบริเวณที่จับกับลิแกนด์แต่ไม่มีบริเวณ ICN ทำให้จำนวนและขนาดของโคโลนีบน Soft Agar ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า วิถีสัญญาณ Notch3 มีบทบาทสำคัญในการเจริญของมะเร็งปอด

Konishi และคณะ (2007) รายงานว่าวิถีสัญญาณ Notch3 มีบทบาทในมะเร็งปอดโดย พบว่าเมื่อยับยั้งวิถีสัญญาณของ Notch3 ด้วย MRK 003 gramma-secretase inhibitor สามารถลดการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์เนื้องอก และเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซีส

Gramantieri และคณะ (2006) พบการแสดงออกที่ผิดปกติของของ Notch3 และ Notch4 ใน Human hepatocellular carcinoma โดยพบว่ามีการกระตุ้นสัญญาณผ่านทาง Notch3 จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ Notch3 และ Notch4 พบว่าในเซลล์ปกติและในเซลล์ของผู้ที่ป่วยเป็นโรคตับอักเสบชนิดเรื้อรังไม่พบการแสดงออกของ Notch3 และ Notch4 แต่พบการแสดงออกของ Notch4 ใน hepatocytes ที่บริเวณขอบของเซลล์และในบริเวณเนื้อเยื่อข้างเคียง และใน hepatic vain ที่มีการสร้างใหม่แต่จะพบการเพิ่มการแสดงออกของ *Notch3* mRNA มากถึง 95% และพบมีการลดลงของ Notch4 ที่ 80%

Dang และคณะ (2007) พบการแสดงออกเกินของ Notch3 ในมะเร็งตับอ่อน โดยตรวจสอบเนื้อเยื่อของตับอ่อนด้วยแอนติบอดีต่อบริเวณ extracellular domain ของ Notch3 สามารถตรวจสอบระดับการแสดงออกได้ จึงชี้ให้เห็นว่า Notch3 มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์

Hu และคณะ (2006) ได้รายงานว่าการแสดงออกของ Intracellular domain (NICD) ของ Notch1 และ Notch3 จะไปขัดขวางการพัฒนาของต่อมน้ำนมและชักนำให้เกิดมะเร็งเต้านมในหนูทดลองดัดแปรพันธุกรรมได้ เมื่อนำโปรไวรัส MMTV ติดเชื้อเข้าไปในหนูทดลองดัดแปลงพันธุกรรมเพศเมีย ให้มีการแสดงออกเกินของ Notch1 intracellular domain ในต่อมน้ำนม (MMTV/Notch1^{intra} Transgenic mice) พบว่าหนูทดลองไม่สามารถสร้างน้ำนมได้ เนื่องจากมีความผิดปกติเกิดขึ้นในระหว่างที่มีการพัฒนาของต่อมน้ำนม ทำให้การผลิต β-casein ลดลงซึ่งเป็นผลมาจาก MMTV/Notch1^{intra} ไปยับยั้งการแสดงออกของโปรโมเตอร์ของยีน β-casein ทำให้

เกิดการพัฒนาเป็นมะเร็งเต้านมในหนูทดลอง และเมื่อศึกษาการแสดงออกของ Notch3 Intracellular domain (MMTV/Notch3^{intra} Transgenic mice) ในหนูทดลองลักษณะเดียวกัน พบว่าแสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ที่คล้ายคลึงกันมากเหมือนกับใน MMTV/Notch1^{intra} จึงใช้หนูทดลองเหล่านี้เป็นแบบจำลองสำหรับศึกษาบทบาทของ Notch1 และ Notch3 ในกระบวนการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในต่อมน้ำนม

Wang และคณะ (2008) พบว่า วิถีสัญญาณ Notch3 เป็นตัวกำหนดความอยู่รอดของ vascular smooth muscle cell โดยเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตอย่างมีขีดจำกัดในการตอบสนองต่อหลอดเลือดที่ได้รับความเสียหาย โดย Notch3 ที่ถูกกระตุ้นจะป้องกันกระบวนการอะพอพโทซีสและสนับสนุนกระบวนการอยู่รอดของ vascular smooth muscle cell อีกทั้งยังควบคุมการเจริญเติบโตของ vascular smooth muscle cell ด้วย

Notch3 ในระบบภูมิคุ้มกัน

Bellavia และคณะ (2003) ได้รายงานถึงหน้าที่ของ Notch3 ในระบบภูมิคุ้มกันว่า Notch3 มีบทบาทจำเพาะในการควบคุม pre-TCR checkpoint ระหว่างพัฒนาการของเซลล์ในต่อมไธมัส โดยพบว่าการแสดงออกของ Notch3 มีการแสดงออกสูงใน Double negative thymocyte ($CD4^-/CD8^-$) ที่ยังเจริญและพัฒนาการไม่สมบูรณ์ ก่อนที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น Double positive thymocyte ($CD4^+/CD8^+$) ที่เจริญเต็มที่แล้ว ซึ่งการแสดงออกจะลดต่ำลงในระยะนี้ ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่าง Notch3, pre-TCR และ NF-κB ในการส่งสัญญาณร่วมกัน ซึ่งจะส่งผลต่อการอยู่รอดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ Notch3 ยังทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของกลุ่มเซลล์ Regulatory T cell (Talora และคณะ, 2006) และการแปรสภาพของ Helper T cell ในอวัยวะส่วนปลายของภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Maekawa และคณะ, 2003)

Jurynczyk และคณะ (2008) พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ γ-secretase inhibitor และแอนติบอดีเป็นตัวขัดขวางรีเซบเตอร์ของ Notch และเมื่อยับยั้งรีเซบเตอร์ของ Notch3 เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการยับยั้งรีเซบเตอร์ของ Notch1 พบว่ามีการตอบสนองของ Th1 และ Th17-type ของ proteolipid protein (PLP) reactive T cells ยิ่งกว่านั้นการยับยั้งรีเซบเตอร์ของ Notch3 ใน T cell แบบจำเพาะ พบว่ามีความสัมพันธ์กับการแสดงออกที่ลดต่ำลงของ Protein Kinase C (PKC) ซึ่ง PKC มีความสำคัญในการควบคุมการทำหน้าที่ภายใน T cell ที่มีพัฒนาที่สมบูรณ์แล้ว

ดังนั้น การยับยั้งรีเซบเตอร์ของ Notch3 จึงมีความสำคัญต่อการตอบสนองของ peripheral T cell และมีศักยภาพเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการใช้รักษาโรค autoimmune ได้

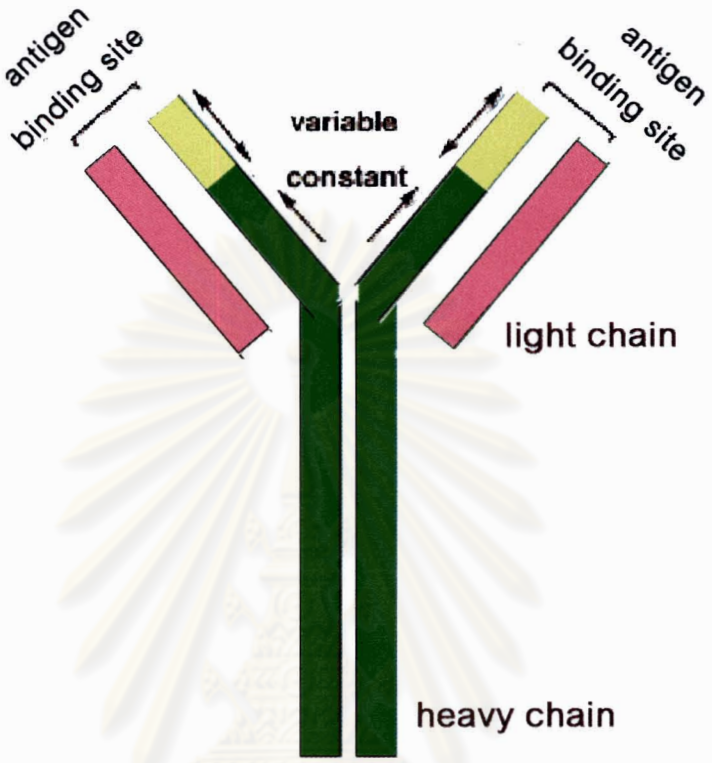
แอนติบอดี (Antibody)

แอนติบอดี คือ ไกลโคโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์และหลั่งออกมาจาก B lymphocyte เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม แอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมนั้นเรามักเรียกว่า Antiserum ซึ่งสามารถตรวจสอบหาปริมาณได้ (Abbas และ Lichtman, 2005) นอกจากนี้ยังพบในส่วนน้ำอื่นๆ ของร่างกายและในเนื้อเยื่อ เช่น ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง น้ำนม น้ำลาย น้ำตา ต่อมน้ำเหลือง ม้าม และนอกจากนี้ยังพบมีการแสดงออกบนผิวของ B lymphocyte อีกด้วย (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2543)

โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดี

เนื่องจากแอนติบอดีเป็นโกลบูลินที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงเรียกกอีกชื่อหนึ่งว่าอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) หรือ Ig ซึ่งมีอย่างน้อย 5 ชนิด ในมนุษย์และสัตว์จำพวกฟันแทะ คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ซึ่งมีโครงสร้างโดยทั่วไปคือ

1. ประกอบด้วยโมเลกุลสายเบา (light chain) 2 สาย โดยแต่ละสายมีขนาดประมาณ 24 kD และสายหนัก (heavy chain) 2 สาย แต่ละสายมีขนาดประมาณ 55-70 KD โดยมีพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลสายเบา และสายหนัก และระหว่างสายหนักเข้าด้วยกัน สายโมเลกุลทั้งเบาและหนักของแอนติบอดี มีการม้วนตัวกันอยู่ในรูป globular โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 110 ตัว เพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่างต่างๆ กันไป เรียกโครงสร้างสามมิตินี้ว่า “ Immunoglobulin domain” โครงสร้างดังกล่าวนี้จัดเป็นโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ด้วย จึงรวมเรียกโมเลกุลที่มีส่วนประกอบร่วมกันนี้ว่า “Ig super-family” (Abbas และ Lichtman, 2005) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดี

2. โครงสร้างของแอนติบอดีถูกจัดจำแนกออกไปในระดับ “class” และ “subclass” ตามความแตกต่างของโครงสร้างและการทำงานของโมเลกุลสายหนัก โดยจัดเป็น 5 class ดังนี้ คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE โมเลกุลที่มีลักษณะเดียวกันใน class เดียวกันจะเรียกว่ามี isotype เดียวกัน โดย IgA isotype จะถูกแบ่งย่อยเป็น 2 subclasses คือ IgA1 และ IgA2 ส่วน IgG แบ่งเป็น 4 subclasses คือ IgG1, IgG2, IgG3 และ IgG4 โดยมีคุณสมบัติทางเคมี และชีวภาพที่แตกต่างกัน (Abbas และ Lichtman, 2005)

3. โมเลกุลของแอนติบอดีของแต่ละบุคคลมีความหลากหลายในรูปแบบได้สูงถึง 10^9 รูปแบบ ทั้งนี้เกิดจากการที่ B lymphocyte แต่ละเซลล์สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีลักษณะพิเศษเฉพาะตัวได้ 1 ชนิด ความหลากหลายดังกล่าวจะจำกัดอยู่ในส่วนของบริเวณที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจน (Antigen-binding site) เท่านั้นเรียกว่าบริเวณ variable (V) ในขณะที่ทางด้าน constant region (C) ไม่มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นโครงสร้างของ

ส่วนนี้ และในส่วน V region พบว่ามีบริเวณที่มีความแปรผันของกรดอะมิโนสูงเป็นพิเศษเรียกว่า "hypervariable region" ซึ่งมีอยู่สามช่วงทั้งในสายหนักและสายเบา ส่วนประกอบดังกล่าวนี้จะม้วนตัวเข้าหากัน เพื่อประกอบเป็นพื้นผิวจับเกาะกับแอนติเจนแบบจำเพาะ (Abbas และ Lichtman, 2005)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจาก B lymphocyte ตั้งต้นเซลล์เดียว โดยทุกโมเลกุลของแอนติบอดีจะมีสมบัติเหมือนกัน คือ จำเพาะต่อ epitope ของแอนติเจนเดียวกัน และลำดับกรดอะมิโนของ heavy chain และ light chain ซึ่งเป็นตัวกำหนดสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีนั้นจะเหมือนกันทั้งหมด (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2543)

ในภาวะปกติ ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีหลายชนิดรวมกันที่เรียกว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) แต่จะมีกรณีที่มีการสร้างแอนติบอดีคล้ายโมโนโคลนอลแอนติบอดี เมื่อเป็นมีการเกิดมะเร็งของของ B lymphocyte หรือ เซลล์พลาสมา โดยที่เซลล์พลาสมาปกติ 1 เซลล์เปลี่ยนไปเป็นเซลล์มะเร็ง (myeloma cell) เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์เหล่านี้อย่างไม่หยุดยั้ง และสร้างแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกมาทำให้สามารถตรวจพบได้ (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2543)

การสร้างแอนติบอดีในระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปเมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น ตำแหน่งของ antigenic determinant หรือ epitope บนแอนติเจน อาจมีได้หลายตำแหน่ง ทำให้แอนติบอดีที่สร้างขึ้นมาเป็นผลผลิตผสมผสานกันของแอนติบอดีหลายชนิดจากหลายเซลล์ หรือ พอลิโคลนอลแอนติบอดี

ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี และพอลิโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมองในระดับโมเลกุลแล้ว พอลิโคลนอลแอนติบอดี คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจน โดยมีความแตกต่างกันดังนี้คือ

1. แหล่งกำเนิดและวิธีการผลิต

โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่ว่าจะผลิตโดยทางใด ต้องอาศัยเทคโนโลยีจำเพาะ และต้องใช้กระบวนการทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเทียบกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตโดยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของคนหรือสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนให้สร้างแอนติบอดีที่ต้องการออกมาในซีรัม หลังจากนั้นจึงแยกแอนติบอดีออกจากซีรัม การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี จึงมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่า และทำได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ผลิตในสัตว์ต่างชนิดหรือแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่คนละตัว ก็อาจมีส่วนประกอบของแอนติบอดีที่แตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แต่ละครั้งมีปริมาณจำกัดและอาจต้องใช้คนหรือสัตว์จำนวนมาก ดังนั้นในการผลิตจึงต้องมีวิธีการควบคุมคุณภาพของพอลิโคลนอลที่ผลิตขึ้นทุกครั้ง ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถผลิตได้อย่างไม่จำกัดด้านปริมาณและคุณภาพ เนื่องจากทั้งยีนและเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีนั้นจะถูกเก็บรักษาไว้ได้ตลอด

2. ความจำเพาะต่อแอนติเจน (antigen specificity)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อ epitope ชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีหลายชนิดที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่อ epitope ของตนเอง พอลิโคลนอลแอนติบอดีจึงมีความจำเพาะต่อหลาย epitope ต่างๆ กันบนโมเลกุลของแอนติเจน และเมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะและการทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามแล้วพบว่า พอลิโคลนอลมีปฏิกิริยาข้ามได้มากกว่าเพราะประกอบด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ epitope หลายชนิด แต่ในบางกรณีโมโนโคลนอลแอนติบอดีก็สามารถมีปฏิกิริยาข้ามได้ เช่น epitope ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับอย่างจำเพาะนั้นเป็น epitope ที่มีอยู่บนโมเลกุลของแอนติเจนชนิดอื่น

3. Affinity และ avidity ของแอนติบอดี

Affinity และ avidity เป็นสมบัติภายในของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล ซึ่งกำหนดโดยลักษณะโครงสร้างของส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งก็คือส่วนของ variable region นั้นเอง affinity เป็นคุณลักษณะจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละชนิดและเป็นผลของกระบวนการที่เกิดในธรรมชาติ โดยในระหว่างพัฒนาการของ B lymphocyte จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrange) ของ immunoglobulin gene ในแบบต่างๆทำให้เกิดแอนติบอดีที่มีความ affinity มากน้อยต่างกันได้

ดังนั้นหากต้องการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มี affinity ดีมากน้อยเพียงใดก็ขึ้นกับวิธีการในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของโมโนโคนอลแอนติบอดีนั้น วิธีการทางพันธุวิศวกรรม ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลง affinity ของแอนติบอดีนั้นๆ ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีนของอิมมูโนโกลบูลินทำให้ได้แอนติบอดีที่มี affinity ดีขึ้นจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก B lymphocyte ที่สร้างแอนติบอดีขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีนั้นมี affinity ที่เป็นผลเฉลี่ยจาก affinity ของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมักอยู่ในระดับปานกลางถึงดี

4. Effector function

เป็นสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีแต่ละชนิด ได้แก่ความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ การจับกับรีเซบเตอร์ของส่วน Fc ของอิมมูโนโกลบูลินบนผิวเซลล์ ซึ่งสมบัติเหล่านี้แตกต่างกันในแต่ละ isotype และ subclass ของอิมมูโนโกลบูลินนั้นๆ ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ให้มีคุณสมบัติทางชีวภาพในด้านต่างๆ แตกต่างกัน ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีมักจะมีความสามารถในด้าน effector function ในระดับปานกลางถึงดีในทุกด้าน เนื่องจากอาศัยคุณสมบัติของแอนติบอดีหลายๆ ชนิดเฉลี่ยกัน ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2543)

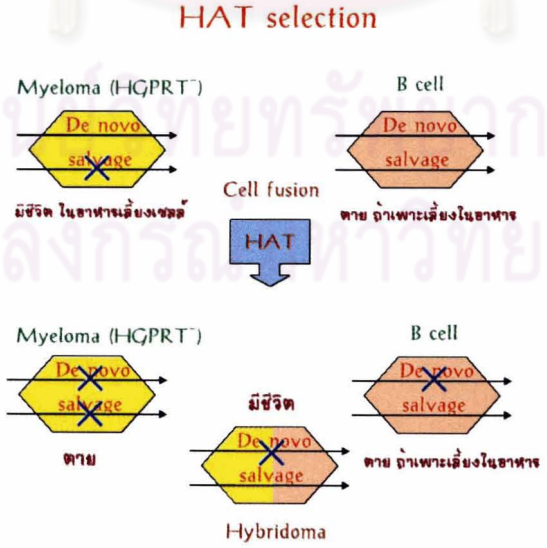
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ของหนู

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำกันในปัจจุบัน มีขั้นตอนและหลักการคล้ายคลึงกับเทคนิคที่ Kohler และ Milstein ได้พัฒนาและรายงานไว้ในปี ค.ศ. 1975 (Kohler และ Milstein, 1975) โดยมีขั้นตอนสำคัญดังต่อไปนี้

1. การปลูกภูมิคุ้มกัน (Immunization) ของหนูไมซ์ เพื่อให้ได้ B lymphocyte ที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจน ซึ่งสามารถแยกได้จากม้ามและต่อมน้ำเหลือง วิธีกระตุ้นหนูไมซ์ให้สร้างภูมิคุ้มกันให้ได้ผลดีนั้น ขึ้นกับปัจจัยหลายๆ อย่างได้แก่ ช่องทางที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย (route) ปริมาณของแอนติเจนที่ให้และช่วงห่างของระยะเวลาระหว่างการปลูกภูมิแต่ละครั้ง ซึ่งอาจแตกต่างกันสำหรับแอนติเจนแต่ละประเภท แต่ที่สำคัญการให้แอนติเจนกระตุ้นครั้งสุดท้าย 3 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์จะทำให้ได้จำนวนของโคลนของเซลล์ลูกผสมที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้มากที่สุด (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2543)

2. การกำจัดเซลล์ที่ไม่ถูกหลอมรวม

การกำจัดเซลล์ที่ไม่ถูกหลอมรวม เช่น เซลล์ myeloma และ เซลล์ม้าม ออกจากเซลล์ไฮบริโดมาที่เกิดขึ้น สามารถทำได้โดยเซลล์ม้ามไม่สามารถจะเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ จึงไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการคัดกรอง แต่เซลล์ myeloma สามารถเจริญในหลอดทดลองได้อย่างไม่จำกัด และอาจเติบโตเบียดบังเซลล์ลูกผสมที่มีอยู่จำนวนน้อยกว่าในระยะแรกหลังจากเชื่อมต่อเซลล์ใหม่ๆ ทำให้ไม่ได้เซลล์ลูกผสมที่ต้องการ เหตุนี้จึงต้องมีวิธีการกำจัดเซลล์ myeloma ที่ไม่ต้องการออกไปโดยเลือกใช้เซลล์ myeloma ที่มีความบกพร่องของเอนไซม์ HGPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase) มาใช้ในการหลอมรวมซึ่งเอนไซม์นี้มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของ salvage pathway โดยเซลล์ปกติจะสามารถใช้ de novo หรือ salvage pathway ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ แต่เซลล์ที่ขาดเอนไซม์ HGPRT จำเป็นต้องใช้ de novo pathway เท่านั้น ดังนั้นภายหลังการหลอมรวมเซลล์ myeloma กับเซลล์ม้าม เซลล์ myeloma ที่ไม่ถูกหลอมรวมจะถูกกำจัดไปได้โดยเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT media) โดย aminopterin จะยับยั้ง denovo pathway ของการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ (ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ dihydrofolate reductase) ส่วนเซลล์ลูกผสมสามารถเจริญได้ใน HAT media โดยใช้ salvage pathway ซึ่งอาศัย hypoxanthine และ thymidine จาก HAT media และอาศัยเอนไซม์ HGPRT จากยีนปกติของเซลล์ม้าม (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2543)



รูปที่ 2.5 **ไดอะแกรมแสดงการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา** (HAT selection)

3. การหลอมรวมเซลล์

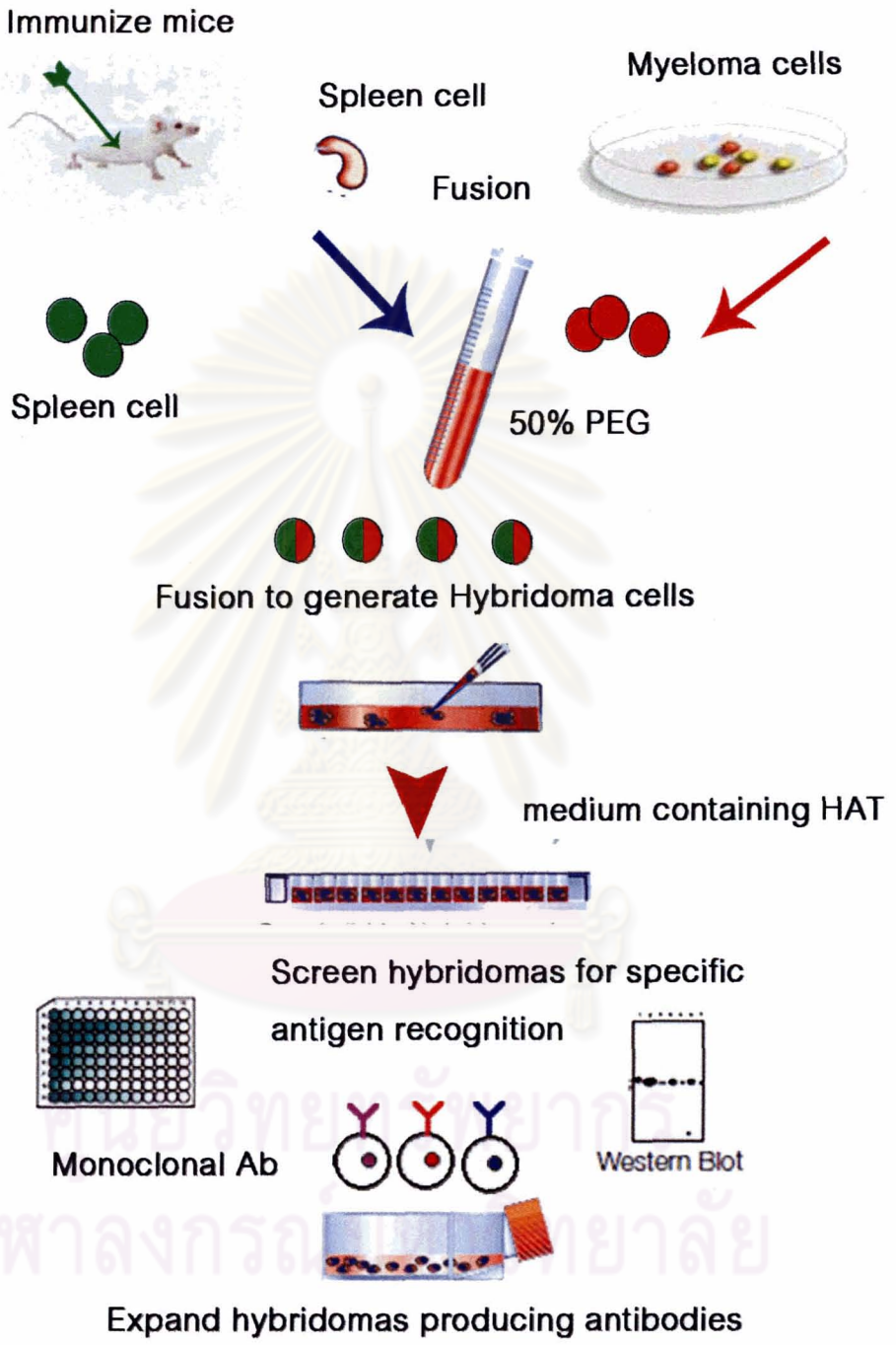
เป็นการหลอมรวมเซลล์ myeloma กับเซลล์ม้ามโดยที่เซลล์ทั้งสองอยู่ในระยะที่กำลังจะแบ่งตัวโดยอาศัยสาร polyethylene glycol (PEG) ซึ่งทำให้ผิวนอกของเซลล์ 2 เซลล์ที่อยู่ในระยะ mitotic phase หลอมรวมเป็นเซลล์เดียวกัน ทำให้เกิดการรวมกันของโครโมโซมจากเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสอง เซลล์ลูกผสมที่ได้จะมีจำนวนเป็น tetraploidy ซึ่งเท่ากับจำนวนรวมของโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิดและมีส่วนประกอบทางพันธุกรรมของเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองเซลล์ หลังจากนั้นเมื่อเซลล์ลูกผสมแบ่งตัวเพิ่มจำนวน อาจมีการสูญหายของโครโมโซมบางอันไปบ้าง เช่น ถ้าโครโมโซมที่สูญหายมียีนของอิมมูโนโกลบูลินก็จะเป็นผลให้เซลล์ลูกผสมนั้นหยุดสร้างแอนติบอดี ถ้าโครโมโซมที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัวในระหว่างการเพาะเลี้ยงสูญหายไป ก็จะทำให้กลุ่มเซลล์ลูกผสมนั้นหยุดเจริญ เป็นต้น เซลล์ลูกผสมจะเป็นเซลล์กลุ่มเดียวที่มีความทนทานต่อ HAT media และสามารถเพิ่มจำนวนและหลั่งแอนติบอดีออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ให้ตรวจพบได้

4. การคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่ต้องการ

ทำโดยตรวจคัดแอนติบอดีที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ตามคุณสมบัติที่ต้องการ อาจใช้วิธีทดสอบต่างๆทางห้องปฏิบัติการ เช่น ELISA, Western blot, agglutination หรือ neutralization เป็นต้น แล้วแต่วัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ หลังจากนั้นก็นำเซลล์ ลูกผสม 1 เซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการมาเลี้ยงเพื่อให้ได้กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เป็นกลุ่มเดียวกันหมด คือเป็นต้นกำเนิดจากเซลล์ต้นแบบเดียวกัน

5. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ในปริมาณมาก

นิยมผลิตโดยการทำให้หนูเกิดภาวะท้องมานและมีน้ำในช่องท้อง (ascites) โดยการฉีดเซลล์ลูกผสมเข้าไปช่องท้องหนูหลังการกระตุ้นด้วยสาร pristane ประมาณ 7-14 วัน ก็จะเกิดเซลล์ลูกผสมมากมายและมีน้ำในช่องท้องซึ่งมีแอนติบอดีผสมอยู่เป็นจำนวนมาก (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2543)



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Li และคณะ (2008) ได้ผลิตและคัดกรองโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถยับยั้งหรือกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ proteolytic cleavages ใน Notch3 โดยพบว่าแอนติบอดีจะจับกับ epitope ที่มีบริเวณที่ซ้อนทับกันภายใน juxtamembrane negative regulatory region (LNR/HD region) ซึ่งจะป้องกัน Notch3 จากการถูกตัดและยับยั้งวิถีสัญญาณอย่างอัตโนมัติ เมื่อศึกษาการใช้แอนติบอดีไปยับยั้งวิถีสัญญาณของ Notch3 ในเซลล์ไลน์ 293T พบว่าเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและอยู่รอดมากขึ้น ในทางตรงกันข้ามการใช้แอนติบอดีเป็นตัวกระตุ้นวิถีสัญญาณ Notch3 พบว่ามีการทำงานที่เลียนแบบลิแกนด์โดยจะเหนี่ยวนำให้ Notch3 ถูกตัดและนำไปสู่กระบวนการกระตุ้นยีนเป้าหมายต่อไป

Joutel และคณะ (2000) ได้ทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Notch3 ซึ่งมีกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัวเชื่อมกับโปรตีน Notch3 ของบริเวณ EGF-repeats 17-21 และบริเวณที่ไม่ใช่ส่วนที่มีการอนุรักษ์ ภายใน intracellular ของโปรตีน Notch3 ของมนุษย์ในเซลล์ไลน์ของแมลง Sf9 โดยทำให้ติดเชื้อด้วย recombinant baculoviruses จากผลการทดลองโดยใช้แอนติบอดีนี้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ Notch3 ในเนื้อเยื่อปกติ และค้นหาตำแหน่งที่สำคัญของการกลายพันธุ์บน Notch3 ที่มีการแสดงออกในเซลล์ที่ถูกทรานสเฟคชันและในส่วนเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วย CADASIL พบว่าในเนื้อเยื่อปกติการแสดงออกของ Notch3 ถูกจำกัดอยู่ภายในบริเวณกล้ามเนื้อของผนังหลอดเลือด และเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Western blot จะได้ชิ้นส่วนที่ถูกตัดของ Extracellular ของ Notch3 ขนาดประมาณ 210 kDa และส่วน intracellular ขนาดประมาณ 97 kDa เมื่อศึกษาในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยโรค CADASIL พบหลักฐานว่ามีการสะสมของ cleavage Notch3 ขนาดประมาณ 210 kDa ดังนั้น ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของ Notch3 เป็นสาเหตุมาจากผลของการเปลี่ยนแปลงภายในกล้ามเนื้อของผนังหลอดเลือดในสมอง

Joutel และคณะ (2001) ได้ทำการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค immunostaining skin biopsy ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Notch3 ที่ระบุในการศึกษาข้างต้น พบว่าสามารถใช้เป็นหลักฐานที่น่าเชื่อถือในการวินิจฉัยโรค CADASIL ซึ่งเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของเอคโตโดเมนของ Notch3 ซึ่งมีการสะสมอยู่ภายในหลอดเลือดได้

ปัจจุบันนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในแง่การวินิจฉัยโรค และการวิจัย ในงานทางจุลชีววิทยานั้น ได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อจุลินทรีย์ต่างๆ หลายชนิดทั้งไวรัส แบคทีเรีย ปรสิต และนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบหาชนิดหรือคุณสมบัติต่างๆ ทางแอนติเจนของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถตรวจพบสายพันธุ์ใหม่ของจุลินทรีย์

ซึ่งมีความแตกต่างของ antigenic determinat จากสายพันธุ์เดิมได้ง่ายขึ้น เช่น การตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ใหม่เป็นต้น

ทางด้านการวินิจฉัยโรคนั้น มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมน เอนไซม์ และ Tumor marker ซึ่งมีระดับต่ำมากในเลือดหรือสิ่งคัดหลั่งเพื่อนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี immunoassays เช่นวิธี radioimmunoassay, วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) นอกจากนี้ยังมีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้หาตำแหน่งของก้อนมะเร็งโดยใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากกับมันตภาพรังสี แล้วใช้เครื่อง scan หาตำแหน่งมะเร็ง

ทางด้านการรักษาใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นตัวพาพวกยาท็อกซินหรือกัมมันตภาพรังสีไปสู่เซลล์เป้าหมายที่ต้องการ โดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงอย่างสูงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีต่อเซลล์เป้าหมายนั้น ซึ่งจะทำให้เกิดการรักษาที่ได้ผลเต็มที่ ซึ่งมีการนำมาใช้รักษาโรคที่หายยาก เช่น โรคมะเร็ง

ดังนั้น โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอคโตโดเมน Notch3 สามารถนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกของ Notch3 ในเซลล์ชนิดต่างๆ และอาจนำไปใช้เป็นสารควบคุมการส่งสัญญาณของ Notch3 ต่อไป เนื่องจากบริเวณเอคโตโดเมนเป็นบริเวณที่โปรตีน Notch3 ใช้ในการจับกับลิแกนด์ ซึ่งเป็นแนวทางที่ดีในการนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งต่างๆ ในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, JAPAN
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert, Germany
- เครื่องชั่งรุ่น PG-200-S และ AG 285 ของบริษัท METLER TOLEDO, Switzerland
- เครื่องชั่งรุ่น AG285 ของบริษัท Metter Toledo
- เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scienctific Industries, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น stratagene® ของบริษัท Profuge
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 3700 ของบริษัท Kubota, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น BV-124 ของบริษัท International scientific supply
- ตู้บ่มแบคทีเรียชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Oven Vacuum) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memert, Geramany
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S20-K ของบริษัท Metter Toldo
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รุ่น ULT 1786 ของบริษัท FORMA Scientific, USA
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U322 ของบริษัท SANYO Electric, Japan
- ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (agarose gel electrophoresis) รุ่น Mupid-2 Advance ของบริษัท Cosmo Bio

- ชุดเครื่องทำ SDS-polyacrylamind gel electrophoresis (Protein III System) ของบริษัท Bio-Rad, USA
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) ของบริษัท LG
- เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) ของบริษัท Clifton Ceraplate
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Axygen Scientific, USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
- Heat block รุ่น Thermomixer compact ของบริษัท Eppendroft
- เครื่องดูเจลด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต (gel documentation) ของบริษัท Bio-Rad, USA
- เครื่องเครื่องฉายรังสี UV รุ่น Foto/Prep I ของบริษัท Fotodyne
- เครื่องเขย่าแบบหมุน (rotary shaker) รุ่น Innova 2300 ของบริษัท New Brunswick Scientific
- เครื่องหมุนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก (Mini Rotator) รุ่น Bio RS-24 ของบริษัท Biosan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสูญญากาศ รุ่น concentrator 5301 ของบริษัท Eppendrof, Germany
- เครื่องปั่นเหวี่ยงจานเลี้ยงเซลล์รุ่น Model universal 32R ของบริษัท HETTICH
- เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated incubator shaker) ของบริษัท New Brunswick Scientific
- ชุดเครื่องมือทำ semi-dry electrophoretic transfer cell รุ่น Trans-Blot® SD ของบริษัท Bio-Rad, USA
- เครื่องปั๊มอากาศ (air pump)
- หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Corning Incorporation, USA
- ขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
- หัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
- ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) รุ่น 34 HC ยี่ห้อ Taylor-Wharton
- Cryogenics ของบริษัท Harsco Corporation, USA
- Cane ใส่หลอดเก็บเซลล์

- ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well) ยี่ห้อ NUNC™ , Denmark
- ถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (tissue culture plate 24 well) ยี่ห้อ NUNC™ , Denmark
- จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร x 10 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Corning Incorporation, USA
- ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (Tissue culture Flask ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ยี่ห้อ Corning Incorporation, USA
- กล้อง inverted microscope ของบริษัท Olympus
- ปิเปตต์แก้ว (seropipette) 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- กระดาษกรอง (filter paper)
- ฮีโมไซโทมิเตอร์ (Haemacytometer) ของบริษัท Boeco, Germany
- ฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (Kodak Medical x-ray flim)
- แคสเซ็ตสำหรับฟิล์มเอกซ์เรย์ ของบริษัท OKAMOTO
- เข็มฉีดยา
- กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- Cover Slip
- ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P2 P20 P100 และ P1000 ของบริษัท Gilson, France

- ปริมาตร	0.01 – 2	ไมโครลิตร
- ปริมาตร	0.1 – 20	ไมโครลิตร
- ปริมาตร	10 – 100	ไมโครลิตร
- ปริมาตร	100 –1000	ไมโครลิตร

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 ของบริษัท Bio-tek instrument
- พาราฟิล์ม (Parafilm)
- กระบอกตวง (cylinder)
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
- พลาสติกใส (Wrap membrane)
- Polyvinylidine fluoride (PVDF) membrane ของบริษัท Amersham Biosciences, UK
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีเครื่องเขย่า (shaker)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- HEAT systems ultrasonic sonicator รุ่น W-385, Newyork, USA

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. Dimethysulfoxide (DMSO) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
2. Trisma base (tris[hydroxymethyl] aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
3. Sodium azide ของบริษัท Merck, Germany
4. Alcohol 70%
5. Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
6. Potassium chloride (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
7. Sodium Chloride (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
8. Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
9. Sodium di-hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
10. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) ยี่ห้อ Anala® ของบริษัท BDH, UK
11. Trypsin-EDTA ของบริษัท Hyclone
12. Sodium pyruvate ของบริษัท Hyclone
13. HPLC water ของบริษัท Merck, Germany
14. dNTP mix ของบริษัท Fermentus, Canada
15. Agarose gel ของบริษัท Research organics
16. Absolute alcohol ของบริษัท Merck, Germany
17. Isopropanol ของบริษัท Merck, Germany
18. Ethidium bromide
19. Protease inhibitor ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
20. Sodium dodecyl sulfate (SDS) ของบริษัท Sigma, USA
21. Acrylamide/Bisacrylamide 40% solution ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
22. TEMED (N,N,N′,N′-Tetramethyethylenediamide) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
23. Ammonium persulfate ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
24. β-mercapto-ethanol ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA

25. Dithiothreitol (DTT) ของบริษัท USB corporation, USA
26. Absolute methanol ของบริษัท Merck, Germany
27. Prestain molecular weight marker ของบริษัท Fermentus, Canada
28. Bromphenol blue ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
29. BCA™ protein assay ของบริษัท PIERCE
30. Bovine serum albumin (BSA) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
31. น้ำยาล้างฟิล์ม ของบริษัทเจเนเซ่น
32. Fetal Bovine Serum (FBS) ของบริษัท Hyclone
33. อาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI 1640) ของบริษัท Hyclone
34. อาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ของบริษัท Hyclone
35. G418 (Geneticin) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
36. Trypan blue 0.5%w/v ของบริษัท Biochrom AG, Germany
37. FugenHD reagent ของบริษัท Roche, Germany
38. สารปฏิชีวนะ Ampicillin ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
39. สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
40. DNase I DN25 ของบริษัท Sigma, USA
41. Trptone (ทริปโตน) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
42. Skimmilk ของบริษัท Difco Laboratories, USA
43. Yeast extract (ผงสกัดจากยีสต์) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
44. lysozyme (ไลโซไซม์) ของบริษัท Sigma, USA
45. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
46. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรส QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
47. GeneRuler™ 100 bp DNA LADDER ของบริษัท Fermentus, USA
48. GeneRuler™ 1 Kb DNA LADDER ของบริษัท Fermentus, USA
49. Restriction enzyme (เอนไซม์ตัดจำเพาะ) *Nde* I และ *Bam* HI ของบริษัท Fermentus, USA
50. T4 DNA ligase (เอนไซม์ทีโฟร์ดีเอ็นเอไลเกส) ของบริษัท Fermentus, USA
51. ชุดทำบริสุทธิ์ His-Select Nickle Affinity Gel ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA

52. Coomassie brilliant blue R250 ของบริษัท Fluka, Germany
53. IPTG (isopropyl thio-β-D-galactoside) ของบริษัท Bio basic inc, Canada
54. PEG (polyethylene glycol) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
55. Imidazole ของบริษัท Bio basic inc, Canada
56. RbCl (รูบิเดียมคลอไรด์) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
57. Diethyl ether ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
58. Hypoxanthine ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA
59. 3, 3', 5, 5'-Tetramethyl-benzidine (TMB) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียและจีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 จีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	จีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
Escherichia coli DH5α	*supE*44, *deoR*, Δ*lac*U169(φ80*lacZ*ΔM15), *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1	Hanahan, 1983
Escherichia coli BL21(DE3)pLysS	F-*omp T hsdS*$_B$(r_B-m_B-) *gal dcm* (DE3)pLysS (CamR)	Novagen, Germany
Escherichia coli Rosetta-Gami B (DE3)pLyS	F-*omp T hsdSB(rB-mB-) gal dcm lacY1 ahpc* (DE3) *gor522::*Tn*10 trxB* pLysSRARE (CamR, KanR, TetR)	Novagen, Germany

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 ลักษณะสมบัติของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิด	ลักษณะสมบัติ	แหล่งที่มา
pET-15b vector (Cloning vector)	Ap' , PT7	บริษัท Novagen, (San Diego, CA)
pcDNA3	Ap', Neomycin, PT7	บริษัท Invitrogen
pcDNA-notch3	Ap', พลาสมิด pcDNAnotch3 vector มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ mNotch3 ขนาด 7,943 คู่เบส แทรกอยู่	Dr U.Lendahl, Karolinska Institute, Sweden

ตารางที่ 3.3 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	Anealing Temp	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	แหล่งที่มา
mNotch3-F	66	GGGAATTCCATATGCCCTGCCATGA	ออกแบบในการวิจัยนี้ (โปแกรม T-DNA primer)

ไพรเมอร์	Anealing Temp	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	แหล่งที่มา
mNotch3-R	66	ACTCATCCACCTGGCTCTCAC	ออกแบบในการวิจัยนี้ (โปรแกรม T-DNA primer)

3.5 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.4 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง

เซลล์ไลน์	ATCC no.
293T (Human Embryonic Kidney 293 cells)	ATCC no. CRL-1573™
NSI myeloma cells	ATCC no. CRL-1580™

3.6. แอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot

แอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 แสดงแอนติบอดีต่อ mNotch3 ที่ใช้ในการทำ Western blot

แอนติบอดีปฐมภูมิและอัตราส่วนในการเจือจาง	แอนติบอดีทุติยภูมิและอัตราส่วนในการเจือจาง	แหล่งที่มา
5E1 Monoclonal Ab (1:1000)	Sheep anti-mouse IgG-HRP (1:5000)	Dr. Anne Joutel, INSERM E365, Faculté de Médecine Lariboisère, Paris, France

แอนติบอดีปฐมภูมิและอัตราส่วนในการเจือจาง	แอนติบอดีทุติยภูมิและอัตราส่วนในการเจือจาง	แหล่งที่มา
BC2- polyclonal Ab (1:5000)	Donkey anti-rabbit IgG-HRP (1:4000)	Dr. Anne Joutel, INSERM E365, Faculté de Médecine Lariboisère, Paris, France

3.7 วิธีเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

3.7.1 การเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ของ *E. coli* DH5α (ภาคผนวก ข)

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ไปยัง klett flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 50 มิลลิลิตร และเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (A_{600}) ประมาณ 0.2-0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อไปยังหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และแช่หลอดเซนตริฟิวส์ที่มีตะกอนเซลล์ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย RF I ที่เย็น 5 มิลลิลิตร โดยกระจายเซลล์ให้เข้ากับสารละลาย เติมสารละลายRF I ที่เย็นเพิ่มอีก 12 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วค่อยๆเติมสารละลาย RF II ที่เย็นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอนเซลล์ ค่อยๆกระจายเซลล์และตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 20 นาที ดูดแบ่งใส่หลอดเซนตริฟิวส์ที่เย็นหลอดละ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาให้แน่นแช่หลอดในไนโตรเจนเหลว 30 วินาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียสทันที

3.7.2 การโอนถ่ายพลาสมิดเข้าไปในแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Heat shock

พลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการโอนถ่ายเข้าไปในแบคทีเรียคือ เวกเตอร์ pET-15b ซึ่งมีขนาด 5.7 กิโลเบส จุดเด่นคือมีกรดอะมิโนฮีสติดีนเชื่อมต่อ 6 หมู่ ทางด้าน N-terminal และมียีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และพลาสมิด pcDNA-Notch3 ซึ่งมีชิ้นยีน *mNotch3* ขนาด 7,943 คู่เบสแทรกอยู่ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr U.Lendahl, Karolinska Institute, Sweden) ดังแสดงในภาคผนวก ค ขั้นตอนการทดลองโดยนำคอมพลีเทนท์ของ *E. coli* DH5α ออกจากตู้แช่

แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ปิเปตต์สารละลายคอมพลีเทนท์ใส่ไปในหลอดเซนตริฟิวส์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลอด และเติมพลาสมิด pET-15b และ pcDNA-mNotch3 (ควรมีปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร) ลงในหลอดที่ 1 และ 2 และหลอดที่ 3 ซึ่งไม่เติมพลาสมิด ทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock โดยย้ายหลอดทั้งหมดจุ่มในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที และย้ายไปวางบนอ่างน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที ปิเปตต์สารละลายในแต่ละหลอดลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตต์สารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งเติมแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เกลี่ยเชื้อให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง

3.7.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย (QIAprep Spin Miniprep kit)

นำ *E. coli* DH5α ที่ได้รับพลาสมิด pcDNA-notch3 และ pET-15b จากการทดลองที่ 3.7.2 มาสกัดพลาสมิด โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ซึ่งเติมแอมพิซิลลินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 3-5 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร ผสมกันโดยกลับหลอดไปมาจนสารละลายเริ่มหนืดภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที เติมบัฟเฟอร์ N3 350 ไมโครลิตร ผสมทันทีและกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จะเกิดตะกอนสีขาวที่สารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสลงใน QIAprep Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง แล้วย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที พลาสมิดดีเอ็นเอจะถูกชะออกจากคอลัมน์ เก็บสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียส

3.7.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของพลาสมิด

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอที่ความยาว 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) ความเข้มข้นของดีเอ็นเอคำนวณได้จากสูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)= A_{260} x 50 x dilution Factor ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอคำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่าง A_{260} และ A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

3.8 สร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่มีบริเวณเอคโตโดเมนของ *mNotch3*

3.8.1 การโคลนยีน *mNotch3* เข้าไปในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก

3.8.1.1 การเตรียมเวกเตอร์ pET-15b สำหรับเชื่อมต่อกับยีน mNotch3

นำเวกเตอร์ pET-15b มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *BamH*I และ *Nde* I โดยผสมสารละลายต่างๆลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 35 ไมโครลิตร ดังนี้ เวกเตอร์ pET-15b 28 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ อาร์ 3.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *BamH*I (400 units) 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Nde* I (500 units) 1 ไมโครลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนปริมาตรครบ 35 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกลงที่ก้นหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 2-3 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วิเคราะห์ผลโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (Agarose gel electrophoresis) และสกัดพลาสมิดออกจากเจลโดยใช้ QIAgen Gel Extraction kit

3.8.1.2 การวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

เตรียมอะกาโรสเจล 1% ในบัฟเฟอร์ 1XTAE (ภาคผนวก ข) ละลายเจลด้วยไมโครเวฟ จนกระทั่งผงเจลละลายหมด เทลงในถาดสำหรับขึ้นรูปเจล รอจนกระทั่งเจลแข็ง และนำเจลที่เตรียมไว้วางลงบนเครื่องอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรเซีส และโหลดตัวอย่างลงไปโดยผสมกับ 6X loading buffer ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X และใช้ GeneRuler™ 100 bp DNA LADDER (Fermentas, USA) หรือ GeneRuler™ 1 Kb DNA LADDER (Fermentas, USA)

เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หยุดให้กระแสไฟฟ้า ปิดเครื่อง และนำเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation System

3.8.1.3 การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุด QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข)

ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยใบมีดและใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุก 1-2 นาที จนกระทั่งชิ้นเจลหลอมละลายหมด เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดลงใน Qiaquick column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ลงไป 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม เทส่วนใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อจำกัดน้ำที่เหลือส่วนเกินออก ย้ายคอลัมภ์มายังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที สารละลายดีเอ็นเอจะอยู่ในส่วนน้ำใส นำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.8.1.4 การเตรียมยีน *mNotch3* เพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET-15b สำหรับแสดงออก

3.8.1.4.1 การสังเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ถูกนำมาใช้ในการออกแบบตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะภายในชิ้น*ยีน* *mNotch3* ให้มีบริเวณตัดเหมือนกับในเวกเตอร์ pET-15b ทำการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์โดยใช้ฐานข้อมูลของโปรแกรม T-DNA primer design ผลของการออกแบบบริเวณฟอร์เวิทไพรเมอร์จะจำเพาะกับตำแหน่งตัดทางด้าน 5' ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และรีเวิทไพร์เมอร์ถูกออกแบบมาเพื่อให้ครอบคลุมตำแหน่งตัดทางด้าน 3' ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI ที่ตำแหน่งตัดอยู่ภายในชิ้นยีน *mNotch3* และครอบคลุมบริเวณ EGF-Repeat ตำแหน่งที่ 9-14 ของยีน *mNotch3* ซึ่งครอบคลุมตำแหน่งที่จับกับลิแกนด์ (EGF-repeat 11-12) ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบแสดงในตารางที่ 3.3 ทำการเพิ่มชิ้นยีนที่มี

ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25
ไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Taq 10X buffer	10 เท่า	2.5 ไมโครลิตร	1 เท่า
dNTP mix	10 มิลลิโมลาร์	1.6ไมโครลิตร	0.64 มิลลิโมลาร์
Forward Primer	10 มิลลิโมลาร์	0.5 ไมโครลิตร	0.2 ไมโครโมลาร์
Reverse Primer	10 มิลลิโมลาร์	0.5 ไมโครลิตร	0.2 ไมโครโมลาร์
Taq polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	1.5 ไมโครลิตร	2.5 ยูนิต/ไมโครลิตร
Mg^{2+}	2.5 มิลลิโมลาร์	2 ไมโครลิตร	2 มิลลิโมลาร์
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		7.4 ไมโครลิตร	
cDNA		10 ไมโครลิตร	
ปริมาตรสุทธิ		25 ไมโครลิตร	

ภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

Hot Start	ที่อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ	62	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
Extention	ที่อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
Final Extention	ที่อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ตามวิธีในข้อ 3.8.1.2 โดยใช้ความเข้มข้นของ

อะกาโรสเจล 2 % กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นตัดเจลบริเวณที่ที่ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 800 เบส และ 700 เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.8.1.3

3.8.1.4.2 การเตรียมชิ้นยีน *mNotch3* เพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET-15b

ตัดชิ้นยีน *mNotch3* ที่สกัดได้จากการทดลอง 3.8.1.4.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI (400 units) และ *Nde* I (500 units) อย่างสมบูรณ์โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้คือ

ชิ้นยีน *mNotch3*	26	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์อาร์	3.5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Bam* HI (400 units)	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Nde* I (500 units)	1	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 35 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วิเคราะห์ผลโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส และสกัดพลาสมิดออกจากเจลด้วย QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.8.1.2 และ 3.8.1.3

3.8.1.4.3 การเชื่อมต่อยีน *mNotch3* เข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pET-15b

นำชิ้นยีน *mNotch3* ที่ได้จากข้อ 3.8.1.4.2 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกในแบคทีเรีย pET-15b ที่ได้จากข้อ 3.8.1.1 โดยผสมสารละลายต่างๆลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ในอัตราส่วน Vector :Insert เป็น 1:5 และ 1:3 ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 สารละลายที่เป็นส่วนประกอบในการเชื่อมต่อชิ้นยีนกับเวกเตอร์

ส่วนประกอบ	อัตราส่วน เวกเตอร์ : อินเซอร์ท (1:5)	อัตราส่วน เวกเตอร์ : อินเซอร์ท (1:3)
เวกเตอร์ pET-15b จากข้อ 3.8.1.1	11.25 นาโนกรัม	11.25 นาโนกรัม
ชิ้นยีน *mNotch3* จากข้อ 3.8.1.4.2	25.62 นาโนกรัม	15.37 นาโนกรัม
ดีเด็นเอไลเกส (Ligase)	400 หน่วย (1 ไมโครลิตร)	400 หน่วย (1 ไมโครลิตร)
10X บัฟเฟอร์ไลเกส	1.5 ไมโครลิตร	1.5 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	3.96 ไมโครลิตร	1.10 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพลีเทนท์เซลล์ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี Heat shock ตามวิธีในข้อ 3.7.2 แต่ภายหลังการบ่มให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป กระจายเซลล์ให้ทั่วอาหารเหลวจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.8.1.5 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน *mNotch3*

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน *mNotch3* แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์ พลาสมิด ซึ่งจะต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน มาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.7.3 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ เอนไซม์ *Bam* HI และ *Nde* I ตามลำดับโดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้ รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI 0.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I 0.5 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ R 1.5 ไมโครลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรครบ 15 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส ตามวิธีในข้อ 3.8.1.2

3.8.1.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสยีน *mNotch3*

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 แทรกอยู่ซึ่งวิเคราะห์ได้จากการทดลองที่ 3.8.1.5 มาทำทรานสฟอร์เมชั่นตามวิธีในข้อ 3.7.2 และสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย (QIAprep Spin Miniprep kit) ตามวิธีในข้อ 3.7.3 มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการของบริษัท 1st Base (สิงคโปร์) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 ด้วยโปรแกรม Blastx, Clustal w, Expasy และ EBI เวกเตอร์ pET-15b ที่มีชิ้นยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 แทรกอยู่หลังโปรโมเตอร์และต่อกับ Histag ตั้งชื่อว่า pET-mNotch3

3.9 การทรานสฟอร์มเวกเตอร์ pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียเพื่อการแสดงออก

3.9.1 การทรานสฟอร์ม pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียเพื่อการแสดงออก

นำ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta-Gami B (DE3) pLysS และ BL21(DE3) pLysS มาเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ตามวิธีในข้อ 3.7.1 จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-mNotch3 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง (ภาคผนวก ค) เข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์โดยทำการคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้นและนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 ต่อไป

3.9.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

เขี่ยโคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์จากการทดลองที่ 3.9.1 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้น 34 ไมโครลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำหัวเชื้อที่เตรียมใส่ลงไปในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลินและคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นเท่าเดิมปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อเมื่อเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.35-0.4 เติม IPTG (ภาคผนวก ข) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์และนำไปเขย่าที่อุณหภูมิเดิมต่ออีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เก็บตัวอย่าง 1มิลลิลิตรสำหรับวิเคราะห์ตะกอนเซลล์ทั้งหมดและส่วนที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำ SDS-PAGE ตามวิธีดังต่อไปนี้

3.9.2.1 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 จากตะกอนเซลล์ทั้งหมด

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 1XPBS (ภาคผนวก ข) และ 2x sample buffer (ภาคผนวก ข) นำมาผ่านเข็มฉีดยาขนาดของหัวเข็ม 0.27 เพื่อลดความหนืดและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที วิเคราะห์ผลโดยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีต่อไปนี้

- เตรียม Seperating Gel ความเข้มข้น 12% โดยผสมสารละลายต่างๆดังนี้

dH_2O	3.436	6.872	มิลลิลิตร
40% Acrylamide	2.4	4.8	มิลลิลิตร
1.5M Tris-HCl (ภาคผนวก ข)	2.0	4.0	มิลลิลิตร
10% SDS (ภาคผนวก ข)	0.08	0.16	มิลลิลิตร
10% APS	0.08	0.16	มิลลิลิตร
Temed	0.004	0.008	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	8.0	16.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันพยายามอย่าทำให้เกิดฟอง จากนั้นโหลดสารผสมลงในช่องกระจกสำหรับเตรียมเจลความหนา 1.5 มิลลิเมตร และโหลดทับผิวหน้าเจลด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนเจลมีการพอลิเมอไรเซชัน

- เตรียม Stacking gel โดยผสมสารต่างๆดังนี้

dH_2O	1.024	2.408	มิลลิลิตร
40% Acrylamide	0.25	0.50	มิลลิลิตร
0.8 Tris-HCl (ภาคผนวก ข)	0.504	1.008	มิลลิลิตร

10% SDS (ภาคผนวก ข)	0.02	0.04	มิลลิลิตร
10% APS	0.02	0.04	มิลลิลิตร
Temed	0.002	0.004	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	2.0	4.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เทน้ำที่ปิดทับผิวหน้าเจลออกให้หมด จากนั้นโหลด Stacking gel ในช่องกระจกจนเต็ม ใส่หวีเพื่อเป็นช่องโหลดตัวอย่าง รอจนกระทั่งเจลมีการพอลิเมอไรเซชัน ดึงหวีออกและนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยนำตัวอย่างโหลดลงในเจลที่เตรียมไว้ เติม 1X running buffer (ภาคผนวก ข)ให้ท่วมเจลด้านในและท่วมขดลวดนำไฟฟ้าด้านนอก ตั้งค่าความต่างศักย์ของเครื่อง อิเล็กโทรโฟเรซีส 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue staining (ภาคผนวก ข) นาน 45 นาที ล้างสีส่วนเกินที่ไม่ติดโปรตีนออกด้วย destaining solution (ภาคผนวก ข) เปลี่ยน destaining ทุก 1 ชั่วโมง จนกระทั่งพื้นหลังใส และนำไปถ่ายรูปบันทึกผล

3.9.2.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14

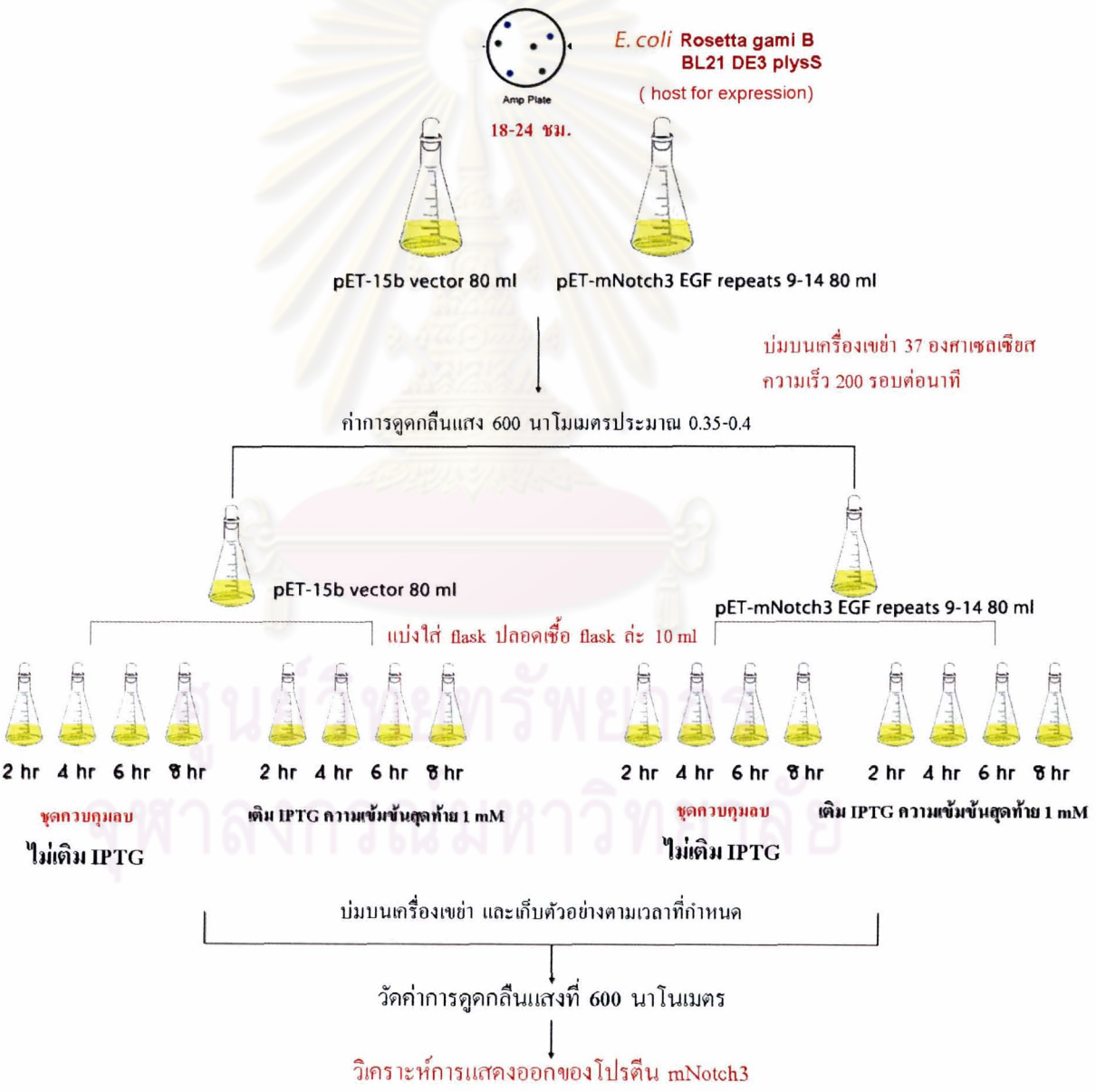
3.9.2.2.1 การแปรผันอุณหภูมิในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14

นำหัวเชื้อทรานสฟอร์แมนที่มีพลาสมิด pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 40 มิลลิลิตรให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เมื่อเริ่มต้นของเชื้อเป็น 0.1 จากนั้นบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียสตามลำดับ เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.30-0.45 เติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิเดิม 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.12.2 โดยตัวอย่างที่โหลดในแต่ละช่องจะมีปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน ที่ค่าการดูดกลืนแสงเดียวกัน

3.9.2.2.2 การแปรผันเวลาในการผลิตภายหลังการชักนำด้วย IPTG

นำหัวเชื้อทรานสฟอร์แมนที่มีพลาสมิดลูกผสม pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 และ พลาสมิด pET-15b ที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลินความ

เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ ที่ให้การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 สูงสุดที่ได้จากข้อ 3.9.2.2.1 เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.35-0.4 ให้แบ่งเชื้อที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 และ pET-15b ใส่ลงใน flask ปลอดเชื้อปริมาตรละ 10 มิลลิลิตร เพื่อเก็บตัวอย่างที่ 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ จำนวน 8 flask และเติม IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 **การแปรผันเวลาในการผลิตโปรตีน** mNotch3 EGF repeats 9-14 **ภายหลังการชักนำด้วย** IPTG

จากนั้นบ่มเขย่าที่อุณหภูมิเดิม และเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.9.2.1

3.9.3.2.3 การแปรผันค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ก่อนการชักนำด้วย IPTG

นำหัวเชื้อทรานสฟอร์แมนที่มีพลาสมิดลูกผสม pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 4 flask บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่ให้การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 สูงสุดจากข้อ 3.9.2.2.1 จากนั้นชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ใส่ลงใน flask ที่ 1-4 ตามลำดับ บ่มเขย่าต่อที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลาที่ให้การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 สูงสุดที่ได้จากข้อ 3.9.2.2.2 เมื่อครบเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสไว้วิเคราะห์โปรตีนในส่วน soluble เก็บตะกอนเซลล์ไว้วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.9.2.1

3.9.2.2.4 การแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14

นำหัวเชื้อทรานสฟอร์แมนที่มีพลาสมิดลูกผสม pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิที่ให้การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 สูงสุดจากข้อ 3.9.2.2.1 เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับค่าดูดกลืนแสงที่ให้การแสดงออกของโปรตีนสูงสุดจากข้อ 3.9.2.2.3 แล้วให้แบ่งเชื้อที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-mNotch3 EGF repeats 9-14 ใส่ลงใน flask ปลอดเชื้อปริมาตรละ 20 มิลลิลิตรจำนวน 4 flask ชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.3, 0.5, 0.7 และ 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ บ่มเขย่าต่อที่อุณหภูมิเดิมนานเท่ากับเวลาที่ให้การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 สูงสุดที่ได้จากข้อ 3.9.2.2.2 เมื่อครบเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเก็บตัวอย่างวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.9.2.1

3.10 การสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์ *E. coli* ด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator

3.10.1 คัดเลือกบัฟเฟอร์สำหรับแตกเซลล์ที่สมบูรณ์

นำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการสร้างโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 มาสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์โดยใช้ไลซิสบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบดังนี้คือ 50mM Na_2HPO_4 pH 8.0, 0.3M NaCl, 1X protease inhibitor และ DNase I ที่มี $MgCl_2$ (ภาคผนวก ข) และแปรผันส่วนประกอบของบัฟเฟอร์โดยเติม 8M Urea และ ไม่เติม 8M Urea จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4° นาน 10 นาที และนำไปแตกเซลล์ด้วยเสียงความถี่สูง ด้วยเครื่อง sonicator ควรวางตัวอย่างลงบนน้ำแข็งในระหว่างที่มีการแตกเซลล์ จำนวน 20 ครั้ง ครั้งละ 4 วินาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนใสไว้วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.9.2.1 ต่อไป

3.10.2 การแปรผันระยะเวลาในการ sonication ก่อนทำโปรตีนบริสุทธิ์

นำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการสร้างโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 มาสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์โดยใช้ไลซีสบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.10.1 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และนำไปแตกเซลล์ด้วยเสียงความถี่สูง ด้วยเครื่อง sonicator (ควรวางตัวอย่างลงบนน้ำแข็งในระหว่างที่มีการ sonication) แปรผันเวลาและจำนวนครั้งในการ sonication คือ sonicate จำนวน 20 ครั้งเป็นเวลา 4 วินาทีต่อครั้ง และ sonicate จำนวน 4 ครั้ง เป็นเวลา 20 วินาทีต่อครั้ง จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์โปรตีน His-Select nickel affinity gel (Sigma-Aldrich) ตามวิธีในข้อ 3.11

3.11 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ His-Select Nickel affinity gel

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่สกัดด้วยวิธี sonication มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ His-Select nickel affinity gel ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำดังนี้คือเติม His-Select Nickel affinity gel ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้งอย่างระมัดระวังก่อนที่จะเติม Equilibration buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000

รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้งอย่างระมัดระวังจากนั้นเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ค่อยๆผสมนาน 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเก็บส่วนใสและล้าง affinity gel 3 ครั้งด้วย wash buffer (ภาคผนวก ข) และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีดูดส่วนใสทิ้งอย่างระมัดระวัง ทำการชะโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 จำนวน 2 ครั้งด้วย Elution buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเก็บส่วนใสไว้ทำการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.9.2.1

3.12 การเตรียมเซลล์และแอนติเจน mNotch3 เพื่อใช้ในการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.12.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ 293T สำหรับการทรานสเฟคชัน

นำหลอด 293T เซลล์ไลน์ที่แช่อยู่ในถังไนโตรเจนเหลวมาละลายอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ปราศจากซีรัม (Serum free media) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอน 293T เซลล์ไลน์ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี Fetal bovine serum (FBS) (Complete media, ภาคผนวก ข) ให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นดูดใส่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ และบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 อยู่ 5%

3.12.2 การทำทรานสเฟคชันพลาสมิด pcDNA-*mNotch3* ใน เซลล์ไลน์ 293T

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ 293T เซลล์ไลน์อยู่ในระยะเอกโปเนนเชียล ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรดูดสารละลาย PBS ทิ้งเติม trypsin-EDTA ความเข้มข้น 0.25% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมินาน 1 นาทีและสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเซลล์เริ่มหดตัวแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตรทันที ดูดสารละลายเพื่อชะเซลล์ให้หลุดจากภาชนะเลี้ยงเซลล์และดูดใส่หลอดเซนตริฟิวจ์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นับและปรับจำนวนเซลล์ให้เท่ากับ $5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม ใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม จำนวน 3 หลุม บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 5% นาน

24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะที่จานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำพลาสมิด pcDNA-mNotch3 และ pcDNA3 มาทำ ทรานสเฟคชั่นโดยใช้ Fugene HD (บริษัท Roche) โดยเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนในอัตราส่วน 4:2 (Fugene HD:DNA) ซึ่ง DNA มีความเข้มข้น 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ปราศจากซีรัม (Serum free media) ให้ปริมาตรสุดท้ายของสารประกอบเชิงซ้อนเป็น 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารที่ความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 วินาที บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยดสารประกอบเชิงซ้อน Fugene-pcDNA3, Fugene-pcDNAmNotch3, และตัวควบคุม Fugene ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไปเติมในจานเลี้ยงเซลล์ 293T ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าจานเลี้ยงเซลล์เบาๆ เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 อยู่ 5% นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารปฏิชีวนะ G418 ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตรเพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์ 293T ที่ได้รับพลาสมิด (stable transfection) บ่มเลี้ยงเซลล์ต่อไปเปลี่ยนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ G418 ทุกๆ 3 วัน และสังเกตด้วยกล้อง inverted microscope ทุกวัน ประมาณ 2-3 อาทิตย์ จะสังเกตเห็นกลุ่มเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด ทำการถ่ายเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และสกัดโปรตีน mNotch3 จาก 293T เซลล์ไลน์ วิเคราะห์การผลิตโปรตีน mNotch3 อย่างถาวรด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidine fluoride (PVDF) membrane ด้วยเทคนิค Western blot ต่อไป

3.12.3 การสกัดโปรตีนจากเซลล์ไลน์ 293T ที่ทำทรานสเฟคชันอย่างถาวรด้วยบัฟเฟอร์ RIPA

นำเซลล์ไลน์ 293T ที่ทำทรานสเฟคชั่นถาวรมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติมยาปฏิชีวนะ G418 ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม นานข้ามคืน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 1XPBS ที่เย็นปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 ครั้งและดูดทิ้งเติม RIPA Buffer (ภาคผนวก ข) 40 ไมโครลิตร และ Protease inhibitor (stock 10X) 4 ไมโครลิตร บ่มบนน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 ต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสรอวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Western blot ต่อไป

3.12.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ protein assay kit ของบริษัท PIERCE ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้ เตรียม working reagent ด้วยการ

ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน A:B = 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA และสารตัวอย่าง โดยทำการเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมซึ่งสารมาตรฐาน BSA จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เจือจางลง 2 เท่าด้วยน้ำปลอดประจุที่ความเข้มข้น 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเข้มข้น 1:10 จำนวน 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ (ทำสองหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง) เติม working reagent ลงไปในหลุม ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader

3.12.5 โอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidine fluoride (PVDF) membrane

หลังจากแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วตัด Stacking gel ออกทิ้งวัดขนาดของเจล และนำเจลไปแช่ใน transfer buffer (ภาคผนวก ข) และวางบนเครื่องเขย่าประมาณ 5 นาที ตัดกระดาษกรองจำนวน 6 แผ่น และ PVDF membrane 1 แผ่น ให้มีขนาดเท่ากับเจลที่วัด นำแผ่น PVDF membrane แช่ใน absolute methanol ให้ทั่วทั้งแผ่น ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ 1 ครั้ง และแช่ PVDF membrane ลงใน transfer buffer นำกระดาษกรองแช่ใน transfer buffer 3 แผ่น วางบนเครื่อง semi-dry transfer apparatus ตามด้วย PVDF membrane 1 แผ่น , เจล และกระดาษกรองที่แช่ใน transfer อีก 3 แผ่น ปิดทับส่วนบน ไล่ฟองอากาศโดยใช้หลอดแก้วกลิ้งบนกระดาษกรองเบาๆ 3 ครั้ง ในทิศทางเดียวกัน หยด transfer buffer ปริมาณเล็กน้อยปิดฝาเครื่อง semi-dry Western blot เพื่อทำการโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 60 มิลลิแอมแปร์เป็นเวลา 90 นาที ต่อ 1 เจล

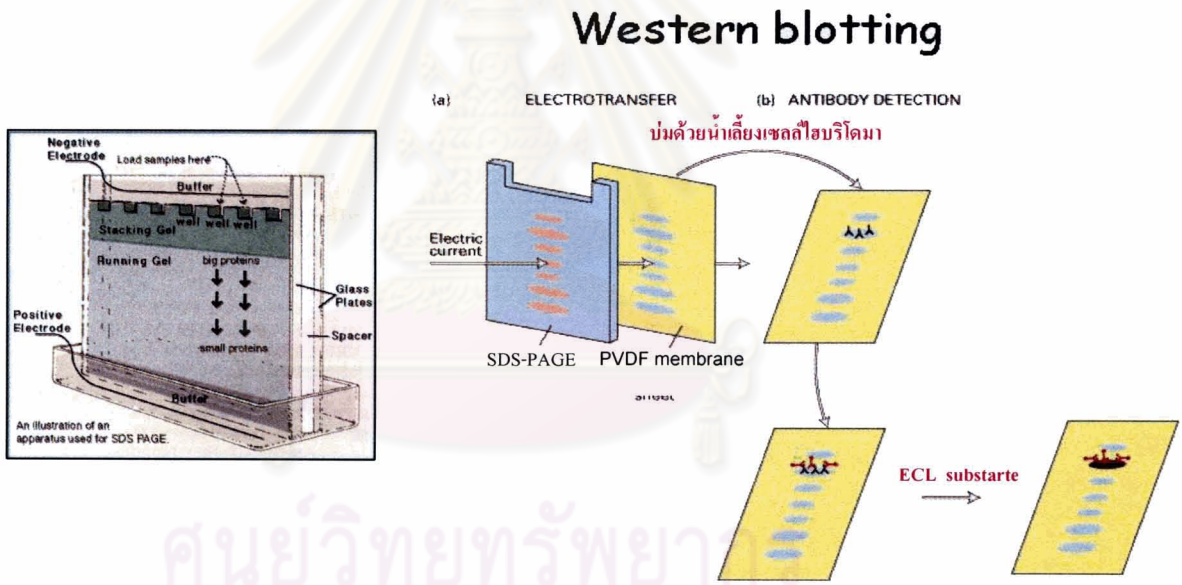
3.12.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 ของเซลล์ไลน์ 293Tที่ทำทรานสเฟคชันอย่างถาวร ด้วยวิธี Western blot

นำแผ่น PVDF membrane ที่ได้รับการโอนถ่ายโปรตีนเสร็จแล้วมาแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้งและนำไปบ่มกับแอนติบอดีต่อ Notch3 (5E1 monoclonal antibody) ที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:1,000 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที ล้าง PVDF membrane ด้วยสารละลาย PBST (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง และ 15 นาที 2 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (sheep anti mouse IgG-HRP) ที่เจือจางใน blocking solution

อัตราส่วน 1:5,000 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที ล้าง PVDF membrane ด้วยสารละลาย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้งและ 15 นาที 3 ครั้ง

3.12.7 การตรวจสอบสัญญาณด้วยวิธี Chemiluminescence และ autoradiography

เตรียมส่วนผสมซับสเตรทของเอนไซม์ horse-radish peroxidase (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำ PVDF membrane แช่ลงในซับสเตรทนาน 1 นาที และใช้ปากคีบหนีบเมมเบรนวางลงบนพลาสติกใส และปิดทับเมมเบรน ใช้กรรไกรตัดพลาสติกใสโดยรอบ เมมเบรน นำไปวางลงบนถาดประกบฟิล์ม ใช้เทปกาวติดทั้ง 4 มุม ปิดฝาถาดและนำไปประกบฟิล์ม X-ray และล้างฟิล์ม X-Ray ในห้องมืด



รูปที่ 3.2 **การโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง** PVDF membrane **และ** western blot

แหล่งที่มา : http://www.bbioo.com/bio101/2007/21006_5.html

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.13 การปลูกภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14

3.13.1 การเตรียมแอนติเจนและปลูกภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.11 มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์สายพันธุ์ Balb/c เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ โดยฉีดกระตุ้น 3 ครั้ง ทุก 2 สัปดาห์ ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก จะใช้โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ปริมาณ 30 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ในสารละลาย PBS 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) โดยผสมให้เป็น emulsion โดยฉีดเข้าไปภายในช่องท้อง และทำการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 ซึ่งห่างจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรก 2 สัปดาห์ โดยผสมโปรตีน mNotch3 ปริมาณ 30 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ในสารละลาย PBS กับ Freund's incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 (v/v) จากนั้นประมาณ 7-10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูจากปลายหาง เพื่อแยกซีรัมมาทดสอบดูระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี indirect ELISA ถ้าระดับแอนติบอดีอยู่ในระดับต่ำ ก็ฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยวิธีเดิมทุก 2 สัปดาห์ เมื่อระดับแอนติบอดีสูงมากพอแล้ว ทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายด้วยโปรตีน mNotch3 ปริมาณ 30 ไมโครกรัมผสมกับน้ำเกลือเพื่อฉีดเข้าช่องท้อง ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 5 วันถัดไป

3.13.2 การเตรียมซีรัม

หลังจากเจาะเลือดจากหางหนูแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกส่วนน้ำใส (ซีรัม) ออกมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.13.3 การตรวจวัดระดับของแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี Indirect ELISA

นำโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.11 ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาตรึงบนจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หรือ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแอนติเจนส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 1XPBS จำนวน 3 ครั้งแล้วเติม Blocking solution (5% skim milk ที่ละลายในสารละลาย 1XPBS) ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS-Tween20 (PBST) (ภาคผนวก ข) ซึ่งเป็น washing solution 3 ครั้ง แล้วเติมซีรัมของหนูที่เจือจางแล้วที่ระดับ

ต่างๆจาก 1:500 ถึง 1: 512,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร และมีซีรัมหนูก่อนได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนเป็นชุดควบคุมลบ ที่ระดับความเจือจางเท่ากับซีรัมที่ต้องการทดสอบจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (Sheep anti-mouse IgG-HRP) ที่เจือจาง 1:10,000 เท่าด้วย Blocking solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBST 3 ครั้ง แล้วจึงเติมสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม บ่มในที่มืดเป็นเวลา 10-30 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยการเติม 1MH_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

3.14 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาสำหรับผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.14.1 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา NSI

นำเซลล์มัยอีโลมา NSI มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สำเร็จรูป RPMI-1640 High glucose เติม 10 % FBS (v/v) (fetal bovine serum) เลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล ประมาณ 4-5 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที รอบสุดท้ายแขวนลอยตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 with L-glutamine ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนับเซลล์ที่มีชีวิตโดยนำมาย้อมด้วยสีทริปแพนบลู และนับเซลล์ที่มีชีวิตให้มีจำนวนเซลล์มากกว่า 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเก็บเซลล์ไว้ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รอจนกว่าจะหลอมรวมกับเซลล์ม้าม

3.14.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

นำหนูไมซ์สายพันธ์ Balb/c ที่มีไตเตอร์ต่อโปรตีน mNotch3 สูงที่สุดซึ่งถูกคัดเลือกมาทำการรุณฆาตโดยใช้ไดเอทิลอีเทอร์ ทำการเจาะเลือดออกจากหัวใจด้วยวิธี cardiac puncture เพื่อเก็บไว้ใช้เป็นชุดควบคุมบวกในขั้นตอนการ screening antibody จากนั้นเปิดช่องท้องหนูด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำม้ามออกมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆบนตะแกรงลวดตาถี่ ใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ช่วยในการบดม้ามให้ละเอียด นำเอาเซลล์ม้ามมาปั่นล้างด้วย RPMI 1640 with L-glutamine ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติม 10% FBS 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ม้ามไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา

3.14.3 การหลวมรวมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์มัยอีโลมา

ผสมเซลล์ม้ามกับเซลล์มัยอีโลมา ในอัตราส่วนเซลล์ม้ามต่อเซลล์มัยอีโลมาประมาณ 1:3 ผสมรวมกันในหลอดฝาเกลียว ขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆเพื่อให้เซลล์ทั้ง 2 ผสมกัน ก่อนจะนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง รอบสุดท้าย แขวนลอยตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 with L-glutamine ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (serum free) นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ค่อยๆเติม 50% พอลิเอทิลีนไกลคอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ที่อุ่นรอไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงในตะกอนเซลล์พร้อมกับหมุน Pasteur pipette เบาๆ และช้าๆ โดยควบคุมให้สารละลาย 50% พอลิเอทิลีนไกลคอล ไหลให้หมดภายใน 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 with L-glutamine เพื่อล้าง 50%พอลิเอทิลีนไกลคอลออกแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วเติม HAT medium ที่มี 10% FBS อยู่ (v/v) ลงไป ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นำเซลล์ไปเลี้ยงบนจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 อยู่ 5%

3.15 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์

ภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์ผ่านไปแล้วเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้สังเกตเซลล์ไฮบริโดมา และควรเปลี่ยนอาหารในหลุมโดยจะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี FBS 10% เซลล์มัยอีโลมาที่ไม่ถูกหลอมรวมเป็นเซลล์ไฮบริโดมานั้นจะตาย สำหรับโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาจะมีลักษณะกลมวาวและโปร่งแสง เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ปริมาณครึ่งของพื้นที่ก้นหลุม ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ประมาณ 100 ไมโครลิตรมาตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และ western blot ภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์ผ่านไปประมาณ 3 สัปดาห์ ให้เปลี่ยนไปใช้อาหาร HT medium เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเหมือนที่ใช้เลี้ยงมัยอีโลมา

3.16 การคัดกรองไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 โดยวิธี Western blot

เมื่อไฮบริโดมาเซลล์เจริญได้ครึ่งหนึ่งของพื้นที่ก้นหลุมตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยการทำ Western blot โดยในขั้นตอนนี้ทำร่วมกับเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.7 โดยโหลดโปรตีน mNotch3 ที่สกัดได้จากเซลล์ไลน์ 293T ในการทดลองที่ 13.12.3 และตัวอย่างโปรตีนจากพลาสมิด pcDNA ที่ไม่มีการสร้างโปรตีน mNotch3 โหลดขนานกันเพื่อเป็นตัวแปรควบคุมลบ และแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ที่พอลิอะครีเอไมด์สัดส่วน 6 % จากนั้นโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidine fluoride (PVDF) membrane ตามวิธีการในข้อ 3.12.5 นำแผ่น PVDF membrane ที่ได้รับการโอนถ่ายโปรตีนเสร็จแล้วมาตัดเป็นชิ้นขนาดยาวประมาณ 8.5 เซนติเมตรและกว้างขนาด 2 เซนติเมตรให้ช่องโหลดโปรตีนครอบคลุม 2 หลุม จากนั้นนำมาแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง และนำไปใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ต้องเจือจางจากโคลนของไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบ และใช้ซีรัมที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:10,000 เพื่อเป็นชุดควบคุมบวก และหมุนข้ามคืนด้วยเครื่อง mini Rotator (บริษัท Biosan) ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหมุนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ล้าง PVDF membrane ด้วยสารละลาย PBST (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง และ 15 นาที 2 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (sheep anti mouse IgG-HRP) ที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:5,000 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที ล้าง PVDF membrane ด้วยสารละลาย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้งและ 15 นาที 3 ครั้ง จากนั้นตรวจสอบสัญญาณด้วยวิธี Chemiluminescence และ autoradiography ตามวิธีการในข้อ 3.12.7

3.17 การคัดแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

เป็นการพิสูจน์ว่าเซลล์ไฮบริโดมาเจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน จึงนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตแอนติบอดีได้ มาเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ ต่อ 1 หลุม และเมื่อเซลล์เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวในหลุม แล้วจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบหาแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 เซลล์ไฮบริโดมาโคลนไหนที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 ทำการเพิ่มปริมาณเซลล์ และเก็บเซลล์ไฮบริโดมาลงในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

3.18 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว

เมื่อเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาอยู่ในระยะเอกโปเนนเชียลนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส และเติมน้ำยาเก็บเซลล์ที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 10% (v/v) เติมไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ เพื่อผสมเซลล์ให้เข้ากันพอดี ก่อนถ่ายเซลล์ลงไปในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวต่อไป

3.19 การนำเซลล์ไฮบริโดมากลับขึ้นมาเลี้ยงใหม่

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 ขึ้นมาจากไนโตรเจนเหลว นำไปละลายอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเจือจางใน RPMI+L- glutamine ที่ไม่มี 10% FBS ผสมอยู่ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนไฮบริโดมาเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI+L-glutamine ที่มี 10% FBS และนำไปเลี้ยงในภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ และบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 อยู่ 5%

3.20 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T ด้วยเทคนิค Cell-ELISA

นำเซลล์ไลน์ 293T ที่ทำทรานสเฟคชั่นอย่างถาวรด้วยพลาสมิด pcDNA3 และ pcDNA-notch3 มาเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระยะเอกโพเนนเชียล จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตรดูดสารละลาย PBS ทิ้งและเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ค่อยๆเป่าให้เซลล์ไลน์ 293T หลุดออกมาซึ่งจะแขวนลอยอยู่ในสารละลาย PBS จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใส นับและปรับจำนวนเซลล์ให้เท่ากับ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดก้นหลุมรูปตัวยูขนาด 96 หลุม และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลุมของจานเพาะเลี้ยงรูปตัวยู จากนั้นนำส่วนใสออกอย่างระมัดระวังและล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.2% BSA ในสารละลาย PBS จำนวน 2 ครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปหลุมละ 100 ไมโครลิตรลงในหลุมที่มีเซลล์ 293T-mNotch3 และหลุมที่มีเซลล์ 293T-pcDNA (ชุดควบคุมลบ) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.2%BSA ในสารละลาย PBS 3 ครั้ง ในการล้างแต่ละครั้งจะปั่นเหวี่ยงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (Sheep anti-mouse IgG-HRP) ที่เจือจาง 1:10,000 เท่าด้วย Blocking solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย 0.2%BSA ใน PBS 5 ครั้ง แล้วจึงเติมสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม บ่มในที่มืดเป็นเวลา

10-30 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยเติม 1MH_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

3.21 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยชุดตรวจสอบ isotyping kit โดยเตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไอโซไทป์ต่างๆ ได้แก่ IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgA และ IgM มาเจือจางที่ 1:1000 เท่าในสารละลาย PBS จากนั้นเติมลงหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย PBST (ภาคผนวก ข) และเติมแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ Fab (Anti-Mouse IgG (Fab specific)-peroxidase) ที่เจือจาง 1:2000 ในสารละลาย PBST และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBST 3 ครั้ง และเติมสารละลายสับสเตรท (OPD และ H_2O_2 ในสารละลายฟอสเฟตซิเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 5.0) หลุมละ 150 ไมโครลิตรเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

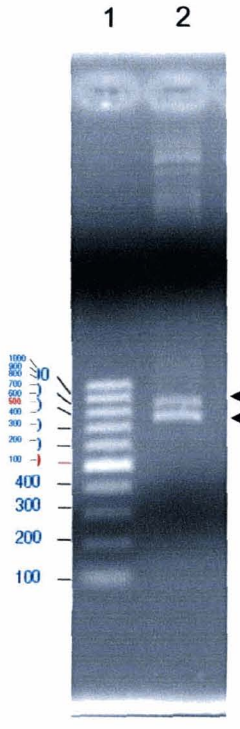
ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 และพลาสมิดชุดควบคุม

ในการโคลนชิ้นยีน *mNotch3* บริเวณที่ตรงกับ EGF repeats ที่ 9-14 เข้าสู่พลาสมิด pET-15b ให้มีการแสดงออกใน *E. coli* นั้น พลาสมิด pET-15b มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *BamH* I ที่บริเวณมัลติเพิลโคลนนิง (multiple cloning site) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้แทรกชิ้นยีน *mNotch3* เข้าไปในพลาสมิด pET-15b แต่ภายในยีน *mNotch3* ซึ่งอยู่ในพลาสมิด pcDNA นั้น (ภาคผนวก ง) ไม่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I จึงออกแบบไพร์เมอร์เพื่อเพิ่มตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I เข้าทางด้าน 5' ของชิ้นยีน *mNotch3* โดยใช้โปรแกรม T-DNA Primer Design ได้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากนั้นใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีในข้อ 3.8.1.4.1 โดยมีพลาสมิด pcDNA-mNotch3 เป็นต้นแบบ ซึ่งผลจากการออกแบบไพร์เมอร์จะได้ขนาดของผลิตภัณฑ์ 697 คู่เบส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสตามวิธีในข้อ 3.8.1.2 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 700 คู่เบสและ 800 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.2 โดยผลิตภัณฑ์ขนาด 700 คู่เบสเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งได้จากการออกแบบและมีขนาดที่ถูกต้อง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ขนาด 800 คู่เบสที่เกิดขึ้นนั้น คาดว่าเกิดจากความไม่จำเพาะของไพร์เมอร์จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชิ้น จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในข้อ 3.8.1.2 และนำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาดประมาณ 700 คู่เบส ไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pET-15b ต่อไป

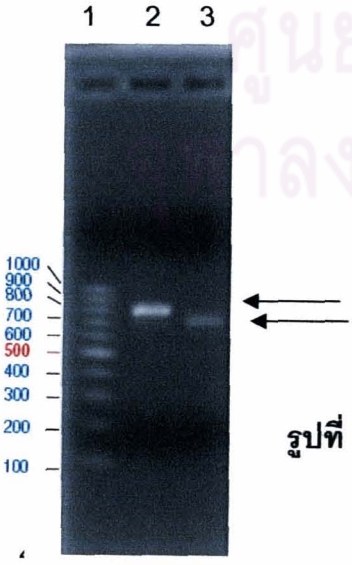
ตารางที่ 4.1 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม T-DNA primer design ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการออกแบบจะมีขนาด 697 คู่เบส (ภาคผนวก ค)

ไพร์เมอร์	Annealing Temp	ลำดับนิวคลีโอไทด์(5'-3')	แหล่งที่มา
mNotch3-F	66	GGGAATTCCATATGCCCTGCCATGA	ออกแบบในงานวิจัยนี้
mNotch3-R	66	ACTCATCCACCTGGCTCTCAC	ออกแบบในงานวิจัยนี้



รูปที่ 4.1 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ชิ้นยีน *mNotch*3 EGF repeats 9-14 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

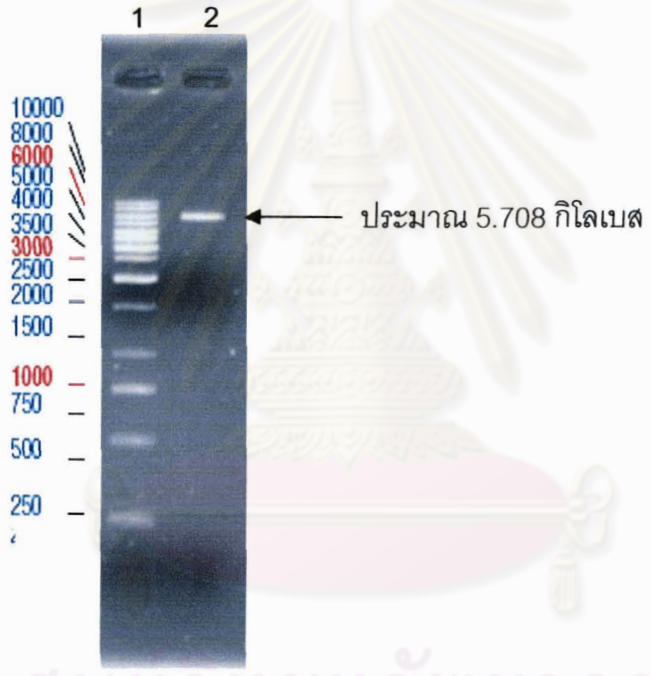
หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากเจลด้วยชุดสกัด QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) และตัดชิ้นยีน *mNotch3* EGF repeats ที่ 9-14 ที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Nde* I และ *Bam* HI ซึ่งผลการทำแยกโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส แสดงดังรูปที่ 4.1 สกัดชิ้นยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 จากเจลด้วยชุดสกัด QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) อีกครั้ง



รูปที่ 4.2 ผลการตัดชิ้นยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 **ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ชิ้นยีน *mNotch*3 ขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบส
ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ชิ้นยีน *mNotch*3 ขนาดประมาณ 0.7 กิโลเบส

4.2 การเตรียมพลาสมิด pET-15b

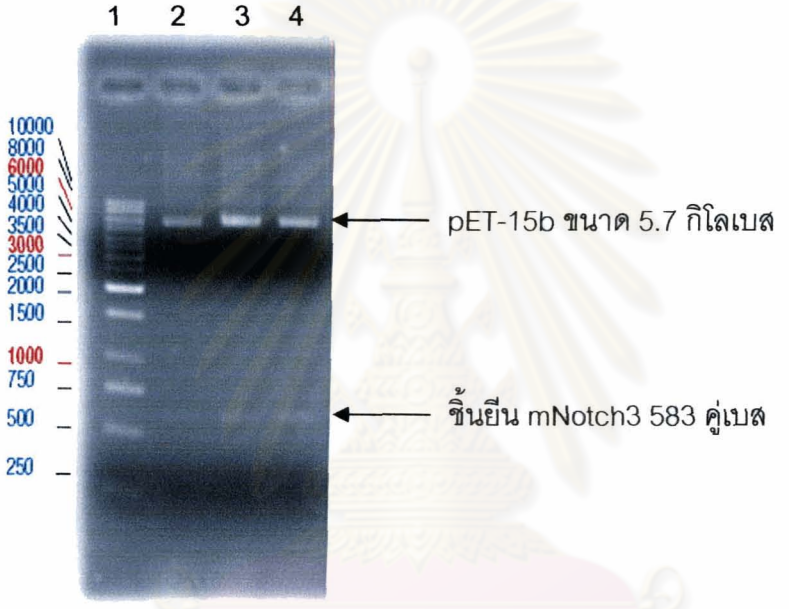
นำพลาสมิด pET-15b มาทำการโอนถ่ายพลาสมิดเข้าไปในแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และทำการสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อยตามวิธีในข้อ 3.7.2 และ 3.7.3 ตามลำดับ จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam* HI และ *Nde* I และสกัดพลาสมิดออกจากเจลด้วยชุดสกัด QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ผลการตัดพลาสมิด pET-15b ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.0 Kb DNA Ladder
ช่องที่ 2 pET-15b ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Nde* I

จากนั้นเชื่อมพลาสมิดเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอ *mNotch3* ที่ได้ข้างต้นเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ T4 ไลเกส และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock คัดเลือกทรานสฟอร์แมนที่ต้านทานยาแอมพิซิลลินมาสกัดพลาสมิด และยืนยันการโคลนนิงโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัด

จำเพาะ *Bam* HI และ *Nde* I พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.7 กิโลเบสและ 583 คู่เบส ตามลำดับซึ่งผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส แสดงในรูปที่ 4.4 ต่อจากนี้เรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ว่า pET-mNotch3 โดยเรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *mNotch3* EGF repeats ที่ 9-14 กับเวกเตอร์ในอัตราส่วน 1:3, 1:5 ว่า pET-mNotch3A pET-mNotch3B และ pET-mNotch3c โคลนที่ 1 และโคลนที่ 2 ตามลำดับโดยไดอะแกรมการสร้างพลาสมิดแสดงไว้ในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.4 ผลการตัดชิ้นพลาสมิด pET-mNotch3 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Nde* I

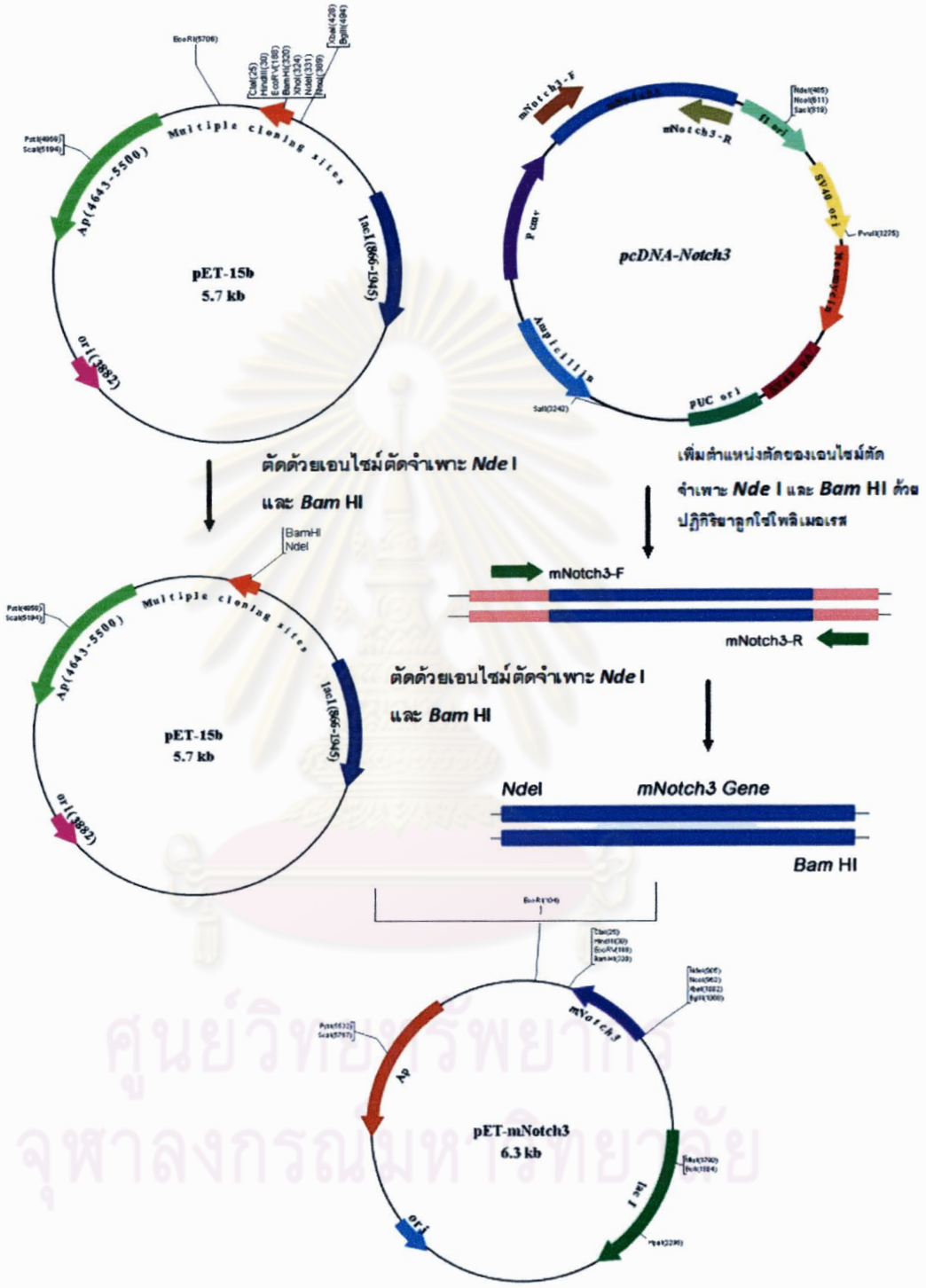
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.0 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 pET-mNotch3A จากการเชื่อมต่อยีนกับเวกเตอร์ที่อัตราส่วน 1:3

ช่องที่ 3 pET-mNotch3B จากการเชื่อมต่อยีนกับเวกเตอร์ที่อัตราส่วน 1:5 โคลนที่ 1

ช่องที่ 4 pET-mNotch3C จากการเชื่อมต่อยีนกับเวกเตอร์ที่อัตราส่วน 1:5 โคลนที่ 2

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ได้มีการเชื่อมต่อกันระหว่างชิ้นยีน *mNotch3* และพลาสมิด pET-15b ในทิศทางที่ถูกต้องและได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากการทดลองนี้ 3 พลาสมิด

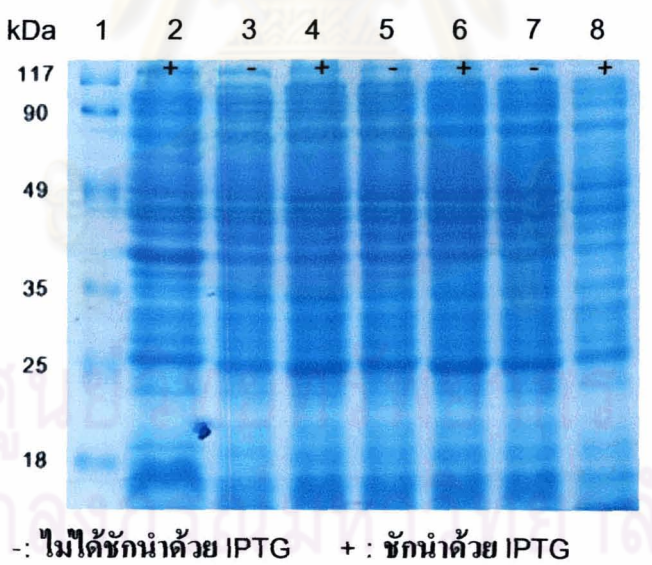


รูปที่ 4.5 ไดอะแกรมการสร้างพลาสมิด pET-mNotch3 (สร้างรูปโดยโปรแกรม BVTech Plasmid)

จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-mNotch3 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกเข้าสู่พลาสมิด ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์โดยใช้ไพร์เมอร์ T7 promoter และไพร์เมอร์ T7 terminator เพื่อให้ทราบจุดเชื่อมต่อของเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ตามลำดับและยืนยันความถูกต้องของเฟรมสำหรับการแปรรหัสเป็นโปรตีนจากยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในภาคผนวก ค โดยพบว่าชิ้นยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 ที่แทรกอยู่ภายในเวกเตอร์ pET-15b มีขนาด 583 คู่เบสและมีโคดอนสำหรับแปรรหัสเป็นโปรตีนฮีสติดีน 6 ตัวทางด้าน 5'

4.3 วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยวิธี SDS-PAGE

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-mNotch3 ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสำหรับการแสดงออก คือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS และ Rosetta gami B (DE3) pLysS และเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ IPTG ตามวิธีที่แสดงในข้อ 3.9.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนของเซลล์ทั้งหมดด้วยเทคนิค SDS-PAGE แสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7



รูปที่ 4.6 ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS

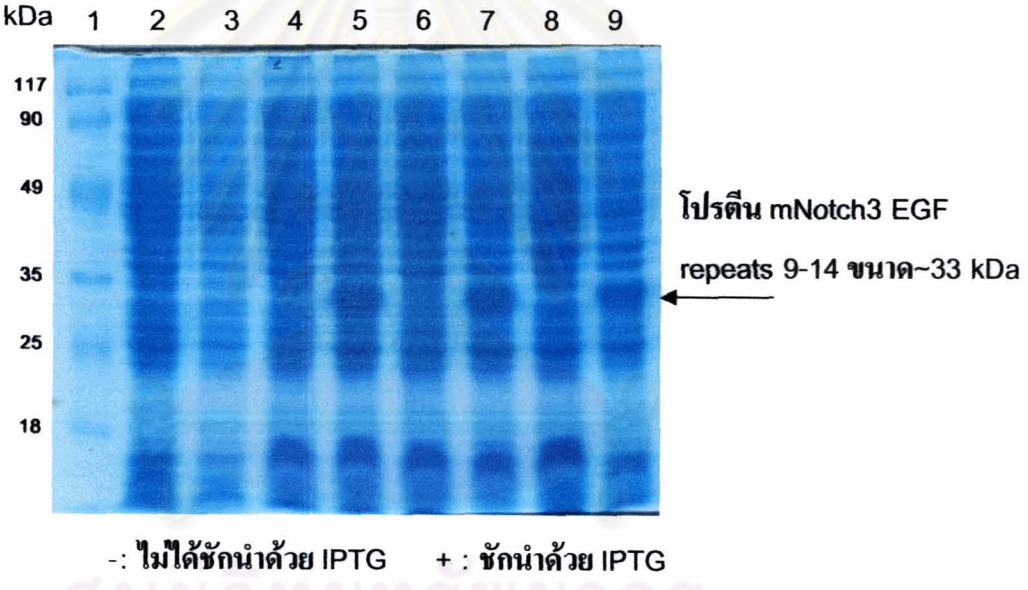
ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (Molecular weight marker)

ช่องที่ 2 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิดควบคุม (pET-15b) ภายหลังชักนำด้วย IPTG 1 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 3-4 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิด pET-mNotch3 ในโคลนที่ 1 ช่องที่ 3 แสดงชุดควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 4 ชักนำด้วย IPTG 1 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 5-6 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิด pET-mNotch3 ในโคลนที่ 2 ช่องที่ 5 แสดงชุดควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 6 ชักนำด้วย IPTG 1 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 7-8 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิด pET-mNotch3 ในโคลนที่ 3 ช่องที่ 7 แสดงชุดควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 8 ชักนำด้วย IPTG 1 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 4.7 ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (Molecular weight marker)

ช่องที่ 2-3 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิดควบคุม (pET-15b) 1 ช่องที่ 2 แสดงชุดควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 3 ชักนำด้วย IPTG 1 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 4-5 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิด pET-mNotch3 ในโคลนที่ 1 ช่องที่ 4 แสดงชุด ควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 5 ชักนำด้วย IPTG 1 มิลลิโมลาร์

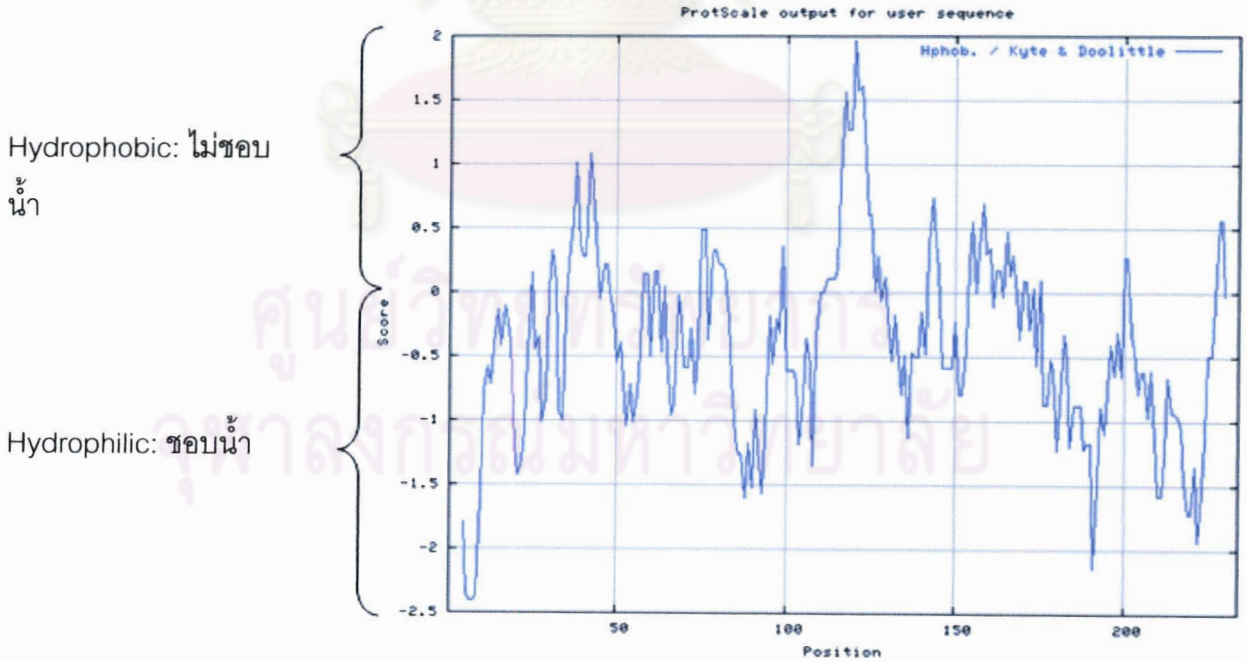
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่องที่ 6-7 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิด pET-mNotch3 ในโคลนที่ 2 ช่องที่ 6 แสดงชุด ควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 7 ชักนำด้วย IPTG 1 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 8-9 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิด pET-mNotch3 ในโคลนที่ 3 ช่องที่ 8 แสดงชุดควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 9 ชักนำด้วย IPTG 1 มิลลิโมลาร์

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 มีการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS และไม่พบการสร้างโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS เป็นเจ้าบ้านสำหรับการผลิตโปรตีนในปริมาณมาก

จากการนำผลของการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 ไปวิเคราะห์และศึกษาดูลักษณะของโปรตีน โดยการใช้ฐานข้อมูลทาง bioinformatics (Expasy) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 โครงสร้างและสมบัติการละลายได้ในน้ำของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 (Gasteiger และคณะ, 2005)

จากกราฟในรูปที่ 4.8 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์โดยใช้ ฐานข้อมูล Expasy พบว่าสัดส่วนที่เป็น Hydrophilic มากกว่า Hydrophobic ดังนั้นจึงบอกได้ว่าโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 สามารถละลายในน้ำได้ และเมื่อทดลองวิเคราะห์หาการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนพบว่าชิ้นยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 มีโคดอนที่พบได้ทั่วไปน้อยทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ CCC, ATA, AGA, CTA, CGG และ CGA ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และมี cysteine ทั้งหมด 30 ตัวซึ่ง Rosetta gami B (DE3) pLysS เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกโปรตีนที่ถูกออกแบบมาเพื่อเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่จะผลิตโปรตีนที่แปลรหัสมาจากเซลล์ยูคาริโอต จึงคาดว่าจะสามารถแปลรหัสโคดอนดังกล่าวได้ ดังนั้น จึงเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 4.2 โคดอนของกรดอะมิโนที่พบได้ในความถี่ต่ำในแบคทีเรียภายในเอคโตโดเมนของยีน *mNotch3* EGF repeats 9-14 (ตาราง Genetic code (Beaumont and Hoare, 2003))

โคดอน	แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน	จำนวนทั้งหมด
CCC	Proline	5
ATA	Isoleucine	1
AGA	Arginine	1
CTA	Leucine	4
CGG	Arginine	3
CGA	Arginine	2
รวม		16 ตัว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

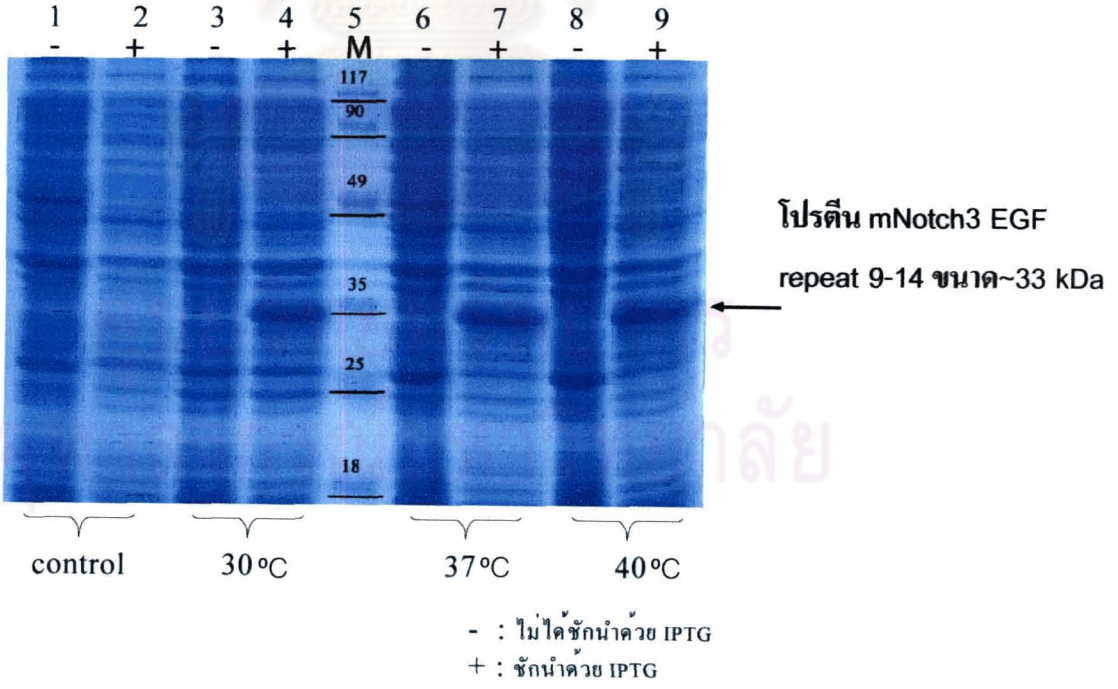
4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14

จากการทดลองผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ในเซลล์เจ้าบ้านพบว่า *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS สามารถผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ได้ และเพื่อผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ให้ได้มากขึ้น จึงหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยแปรผันอุณหภูมิ และเวลาในการผลิตภายหลังการชักนำให้มีการถอดรหัสด้วย IPTG และยังหาค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมก่อนการชักนำด้วย

IPTG และ ความเข้มข้นของ IPTG ที่ใช้ในการชักนำการสร้างโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วย

4.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* Rosetta gami B (DE3) pLysS ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-mNotch3 และชักนำให้ผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยบ่มเขย่าที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียสและ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้พอลิอะคริลเอไมด์เจลที่สัดส่วน 12% ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูป 4.9 จากผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบขนาดความหนาของแถบโปรตีน ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไปใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากเป็นอุณหภูมิมาตรฐานที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.9 ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS เมื่อแปรผันอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

ช่องที่ 1-2 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิดควบคุม (pET-15b) ช่องที่ 1 แสดงชุดควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 2 ชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 3-4 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิด pET-mNotch3 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ช่องที่ 3 แสดงชุดควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 4 ชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

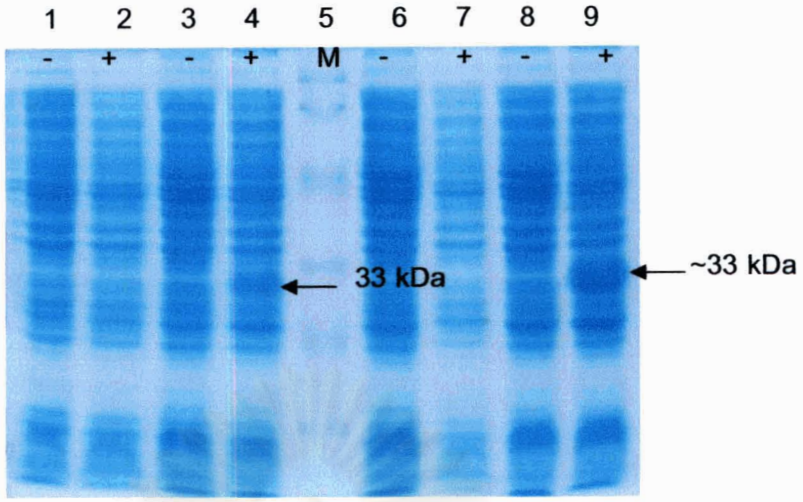
ช่องที่ 5 โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 6-7 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิด pET-mNotch3 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่องที่ 6 แสดงชุดควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 7 ชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 8-9 การแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิด pET-mNotch3 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ช่องที่ 8 แสดงชุดควบคุมลบ (ไม่ชักนำด้วย IPTG) ช่องที่ 9 ชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

4.4.2 เวลาที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังการชักนำด้วย IPTG

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* Rosetta gami B (DE3) pLysS ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-mNotch3 และชักนำให้ผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ความเข้มข้นของ IPTG 1 มิลลิโมลาร์ และเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง ภายหลังการชักนำด้วย IPTG และวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้พอลิอะคริลเอไมด์เจลที่สัดส่วน 12% ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2–6 การผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 มีอัตราการผลิตโปรตีนเพิ่มขึ้นแปรผันตามระยะเวลาและหลังจากชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป การผลิตโปรตีนมีปริมาณที่คงที่ ดังนั้นเวลาที่ 6 ชั่วโมงจึงเหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 ให้ได้มากที่สุด ภายหลังการชักนำด้วย IPTG



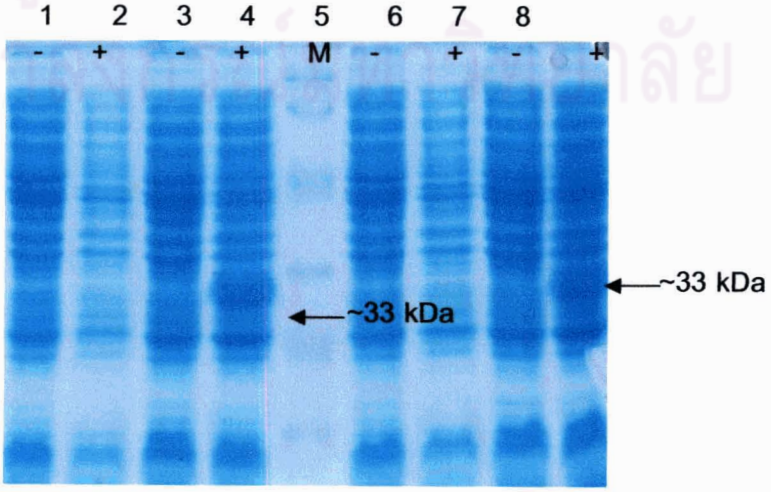
+ ชักนำด้วย IPTG **- ไม่ชักนำด้วย** IPTG

รูปที่ 4.10A ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

ช่องที่ 1-4 รีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังจากการชักนำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ช่องที่ 1-2 แสดงโปรตีนจากพลาสมิดควบคุม ช่องที่ 3-4 แสดงโปรตีนจาก pET-mNotch3 EGF repeats 9-14

ช่องที่ 5 โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 6-9 รีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังจากการชักนำเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ช่องที่ 6-7 แสดงโปรตีนจากพลาสมิดควบคุม ช่องที่ 8-9 แสดงโปรตีนจาก pET-mNotch3 EGF repeats 9-14



+ ชักนำด้วย IPTG **- ไม่ชักนำด้วย** IPTG

รูปที่ 4.10B ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 6 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

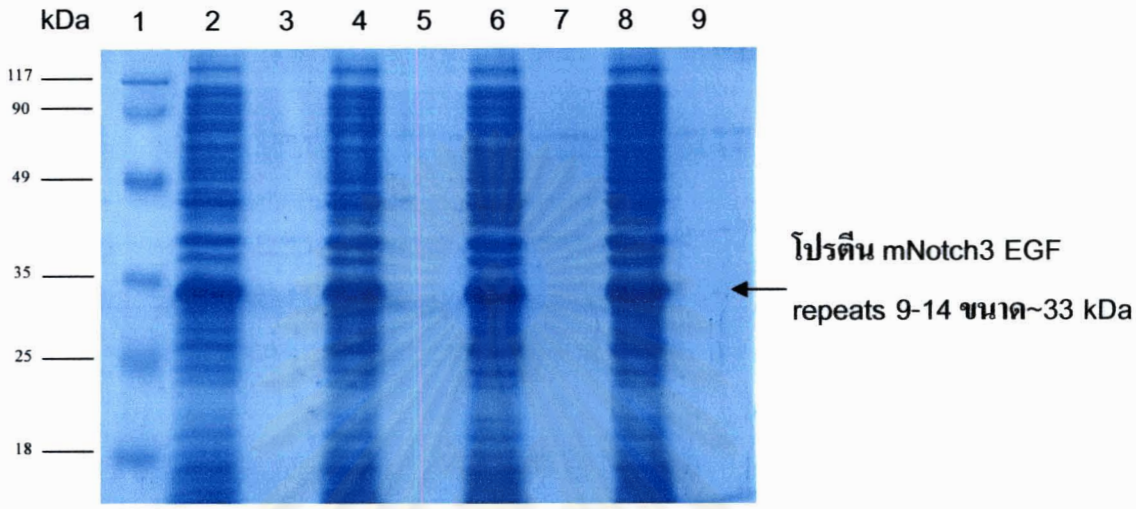
ช่องที่ 1-4 รีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังจากการชักนำเป็นเวลา 6ชั่วโมง ช่องที่ 1-2 แสดงโปรตีนจากพลาสมิดควบคุม ช่องที่ 3-4 แสดงโปรตีนจาก pET-mNotch3 EGF repeats 9-14

ช่องที่ 5 โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 6-9 รีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังจากการชักนำเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ช่องที่ 6-7 แสดงโปรตีนจากพลาสมิดควบคุม ช่องที่ 8-9 แสดงโปรตีนจาก pET-mNotch3 EGF repeats 9-14

4.4.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมก่อนที่จะชักนำด้วย IPTG

เลี้ยง *E. coli* Rosetta gami B (DE3) pLysS ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-mNotch3 และชักนำให้ผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 600 นาโนเมตรต่างๆ (OD600) ดังนี้ คือ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ตามลำดับ จากนั้นเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และเก็บตัวอย่างภายหลังการชักนำ 6 ชั่วโมง วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้พอลิอะคริลเอไมด์เจลที่สัดส่วน 12%ตามวิธีในข้อ 3.9.3.2.3 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าการเติม IPTG OD600 ที่ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ให้อัตราการผลิตโปรตีนที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อปรับปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ OD600 ต่างๆ ให้เท่ากัน แสดงให้เห็นว่า OD600 ของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการเติม IPTG เพื่อชักนำการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 นั้นมีช่วงกว้างคือ 0.2-0.8 ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อมีการเจริญที่สูงและอยู่ในช่วง Log phase มีอัตราการผลิตโปรตีนคงที่ ดังนั้น OD600 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ 0.2-0.8 ก่อนการชักนำด้วย IPTG จึงเหมาะสมในการใช้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือกค่าดูดกลืนแสง OD600 ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 0.4 ไปใช้ในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ให้ได้มากที่สุด เนื่องจากเป็นระยะที่เชื้อพร้อมที่จะได้รับการชักนำและเจริญอยู่ใน Log phase ใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและสะดวกในการปฏิบัติงาน



รูปที่ 4.11 ผลการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังการแปรผันค่าดูดกลืนแสงก่อนการชักนำด้วย IPTG

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 ชักนำด้วย IPTG ที่ OD600 เท่ากับ 0.2

ช่องที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อจากการชักนำด้วย IPTG ที่ OD600 เท่ากับ 0.2

ช่องที่ 4 ชักนำด้วย IPTG ที่ OD600 เท่ากับ 0.4

ช่องที่ 5 อาหารเลี้ยงเชื้อจากการชักนำด้วย IPTG ที่ OD600 เท่ากับ 0.4

ช่องที่ 6 ชักนำด้วย IPTG ที่ OD600 เท่ากับ 0.6

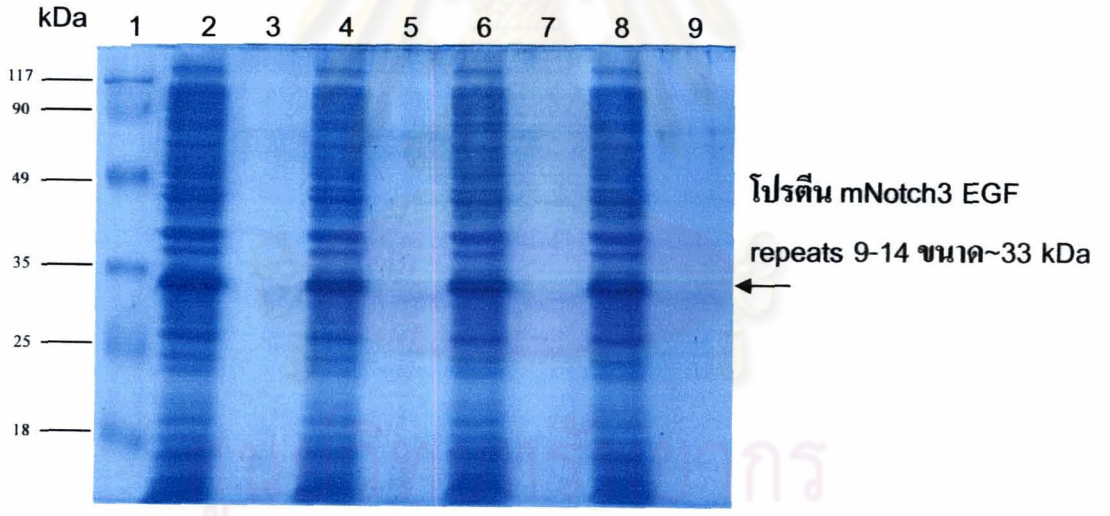
ช่องที่ 7 อาหารเลี้ยงเชื้อจากการชักนำด้วย IPTG ที่ OD600 เท่ากับ 0.6

ช่องที่ 8 ชักนำด้วย IPTG ที่ OD600 เท่ากับ 0.8

ช่องที่ 7 อาหารเลี้ยงเชื้อจากการชักนำด้วย IPTG ที่ OD600 เท่ากับ 0.8

4.4.4 ความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมในการชักนำการสร้างโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* Rosetta gami B (DE3) pLysS ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-mNotch3 เมื่อค่าดูดกลืนแสง OD600 ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 0.4 จะชักนำให้ผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยใช้ความเข้มข้น IPTG ที่แตกต่างกันคือ 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 มิลลิโมลาร์และเก็บตัวอย่างภายหลังการชักนำ 6 (1)ชั่วโมง วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 โดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 3.9.3.2.4 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.12 โดยพบว่าที่ทุกความเข้มข้นของ IPTG ชักนำการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ในอินคลูชันบอดีและชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ได้ในปริมาณที่เท่ากัน ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้น IPTG 0.3 มิลลิโมลาร์ไปใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถชักนำให้ผลิตโปรตีน mNotch3 ได้



รูปที่ 4.12 การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 ชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อจากการชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 4 ชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 5 อาหารเลี้ยงเชื้อจากการชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 6 ชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 7 อาหารเลี้ยงเชื้อจากการชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 8 ชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 7 อาหารเลี้ยงเชื้อจากการชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์

จากการทดลองข้างต้น พบว่าภาวะที่เหมาะสมของการชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ให้ได้มากที่สุด คือ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า OD600 ก่อนการชักนำด้วย IPTG เท่ากับ 0.4 ความเข้มข้น IPTG 0.3 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

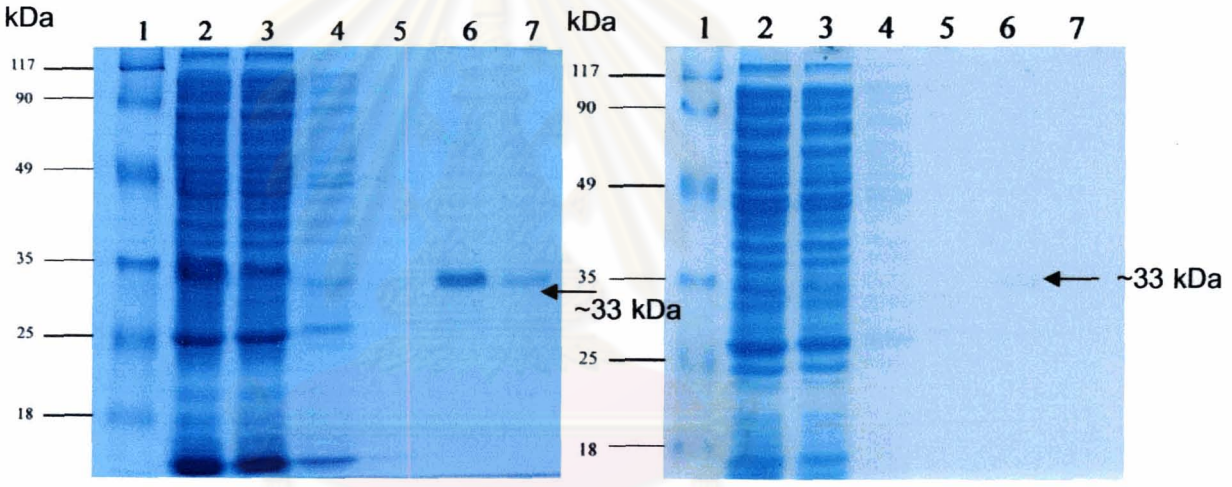
4.5 ความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 หลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป

เมื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 และการสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากเซลล์ได้แล้ว จึงนำโปรตีนลูกผสม mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่ผลิตมาทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งจากหลักการจะใช้ไอออนของโลหะนิกเกิลจับกับฮีสติดีนแทก ซึ่งเป็นบริวณที่มีกรดอะมิโนฮีสติดีนเชื่อมต่อกัน 6 ตัว ซึ่งสายเพปไทด์บริเวณนี้จะมีประจุเป็นลบ และจับกับไอออนของโลหะนิกเกิลซึ่งเป็นประจุบวกด้วยพันธะไอออน ดังนั้น โปรตีนอื่นๆ ที่มีอยู่ในสารละลายที่สกัดอย่างหยาบ จะไม่สามารถจับกับไอออนของโลหะนิกเกิลได้ และเมื่อล้างด้วย wash buffer โปรตีนที่จับกับโลหะนิกเกิลไม่ได้ หรือจับด้วยแรงอย่างอ่อนจะหลุดออกมา และถูกล้างออกไป จากนั้นจะชะโปรตีนซึ่งมีฮีสติดีนแทกอยู่ด้วย elution buffer (ภาคผนวก ข) โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 จึงหลุดออกจากคอลัมน์ ทำให้โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ และไม่ปนเปื้อนจากโปรตีนชนิดอื่นๆ ซึ่งยืนยันโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนทั้งหมด

4.5.1 ผลการคัดเลือกบัฟเฟอร์ในการทำให้เซลล์แตกเพื่อสกัดโปรตีน

นำ *E. coli* ที่ผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 มาสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์โดยใช้ไลซิสบัฟเฟอร์ ตามวิธีในข้อ 3.10.1 มาแปรผันส่วนประกอบของบัฟเฟอร์โดยเติม 8M ยูเรีย และ ไม่เติม 8M ยูเรีย จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และนำไป

sonicate ด้วยเครื่อง sonicator จำนวน 20 ครั้ง ครั้งละ 4 วินาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด His-Select Nickel affinity gel และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าไลซิสบัฟเฟอร์ที่มียูเรียสามารถแตกเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากยูเรียมีบทบาทในการช่วยให้เซลล์แตกและทำให้โปรตีนที่อยู่ภายในคลี่ออกมาได้ และสามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยชุด His-Select Nickel affinity gel ซึ่งเป็นการยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 มีการเชื่อมต่อกับฮีสทิดีน 6 ตัว (รูปที่ 4.13A) ในขณะที่บัฟเฟอร์ที่ไม่มี Urea ไม่สามารถแตกเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 4.13B)



A. **ไลซิสบัฟเฟอร์ที่มียูเรียเป็นส่วนประกอบ** B. **ไลซิสบัฟเฟอร์ที่ไม่มียูเรีย**

รูปที่ 4.13 ผลการตรวจหาโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังการแปรผันบัฟเฟอร์ในการทำให้เซลล์แตกและหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ His-Select Nickel affinity gel

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 โปรตีนที่สกัดได้จากบัฟเฟอร์ที่แปรผันและนำไปทำ sonication

ช่องที่ 3 โปรตีนที่ไม่จับกับ nickel beads

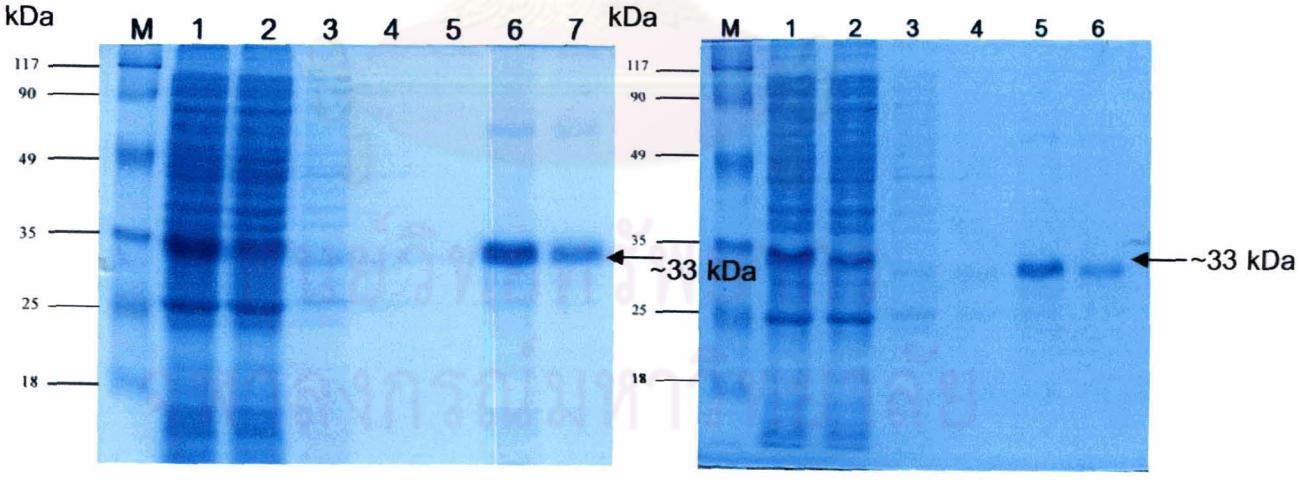
ช่องที่ 4-5 ตัวอย่าง Fraction ที่ล้างคอลัมน์ 2 ครั้ง

ช่องที่ 6 Fraction จากการชะครั้งที่ 1

ช่องที่ 7 Fraction จากการชะครั้งที่ 2

4.5.2 ผลการแปรผันระยะเวลาในการ sonication ก่อนทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

นำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 มาสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์โดยคัดเลือกไลซิสบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 4.2.1 ภายหลังบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และนำไปแตกเซลล์ด้วยเสียงความถี่สูงด้วยเครื่อง sonicator และแปรผันเวลาและจำนวนครั้งในการแตกเซลล์ คือ sonicate จำนวน 20 ครั้ง เป็นเวลา 5 วินาทีต่อครั้ง และ sonicate จำนวน 4 ครั้ง เป็นเวลา 20 วินาทีต่อครั้ง จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์โปรตีน His-Select nickel affinity gel และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยเทคนิค SDS-PAGE ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบว่าเวลาและจำนวนครั้งในการ sonication สามารถสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 ได้ในปริมาณที่เท่าเทียมกัน และสามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยชุด His-Select Nickel affinity gel รูปที่ 4.14A แสดงการทำ sonication จำนวน 20 ครั้งเป็นเวลา 5 วินาทีต่อครั้ง รูปที่ 4.14B แสดงการทำ sonication จำนวน 4 ครั้งเป็นเวลา 20 วินาทีต่อครั้ง จากผลที่ได้นี้ จึงเลือกการทำ sonication จำนวน 20 ครั้ง เป็นเวลา 4 วินาทีต่อครั้ง เพราะสามารถสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้สมบูรณ์และได้โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่ละลายอยู่ในสารละลายในปริมาณมาก



A. sonication จำนวน 20 ครั้งเป็นเวลา วินาทีต่อครั้ง

B. sonication จำนวน 4 ครั้งเป็นเวลา 20 วินาทีต่อครั้ง

รูปที่ 4.14

A. ผลการตรวจหาโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 เมื่อ sonication 20 ครั้งเป็นเวลา 5 วินาทีต่อครั้งและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด His-Select Nickel affinity gel

ช่องที่ M โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 1 สารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากการ sonication 20 ครั้ง เป็นเวลา 4 วินาที/ ครั้ง

ช่องที่ 2 สารละลายโปรตีนที่ไม่จับกับ nickel beads

ช่องที่ 3-5 ตัวอย่าง Fraction ที่ล้างคอลัมน์ 3 ครั้ง

ช่องที่ 6 Fraction จากการชะครั้งที่ 1 ด้วย elution buffer

ช่องที่ 7 Fraction จากการชะครั้งที่ 2 ด้วย elution buffer

B. ผลการตรวจหาโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 เมื่อ sonication 4 ครั้งเป็นเวลา 20 วินาทีต่อครั้งและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด His-Select Nickel affinity gel

ช่องที่ M โปรตีนมาตรฐาน

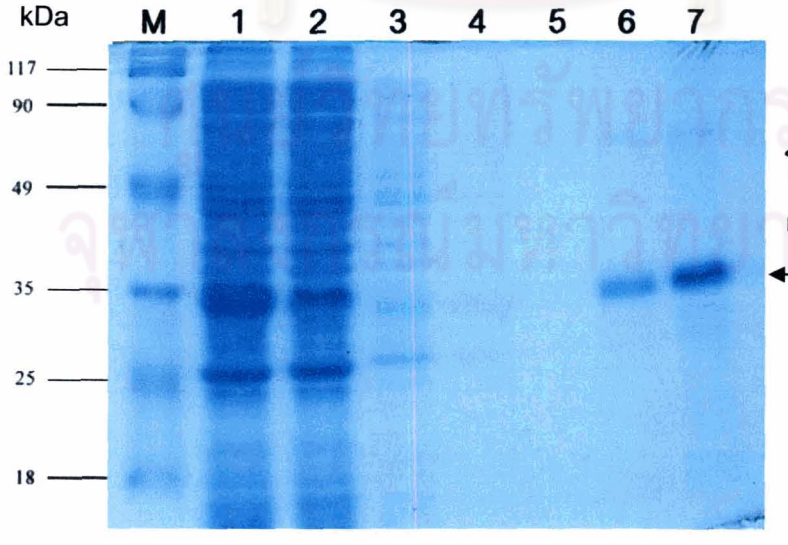
ช่องที่ 1 สารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากการ sonication 4 ครั้ง เป็นเวลา 20 วินาที/ ครั้ง

ช่องที่ 2 สารละลายโปรตีนที่ไม่จับกับ nickel beads

ช่องที่ 3-4 ตัวอย่าง Fraction ที่ล้างคอลัมน์ 2 ครั้ง

ช่องที่ 5 Fraction จากการชะครั้งที่ 1 ด้วย elution buffer

ช่องที่ 6 Fraction จากการชะครั้งที่ 2 ด้วย elution buffer



รูปที่ 4.15 การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ภายหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด His-Select Nickel affinity gel ที่ภาวะที่เหมาะสม

ช่องที่ M โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 1 สารละลายโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่สกัดด้วยไลซิสบัฟเฟอร์ที่มียูเรียและนำไปทำ sonication

ช่องที่ 2 สารละลายโปรตีนที่ไม่จับกับ nickel beads

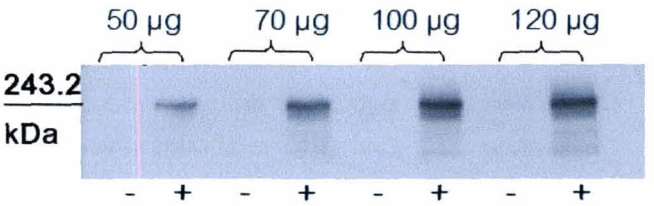
ช่องที่ 3-5 ตัวอย่าง Fraction ที่ล้างคอลัมน์ 3 ครั้ง

ช่องที่ 6-7 Fraction จากการชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer

จากผลการทดลองทำโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป His-Select Nickel affinity gel โดยเลือกอุณหภูมิในการสร้างโปรตีน mNotch3 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ชักนำการแสดงออกของโปรตีนโดยเติม IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.4 นำมาสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (ภาคผนวก ข) ที่มี 8M ยูเรียเป็นส่วนประกอบและนำไปทำให้เซลล์แตกโดยการ sonication จำนวน 20 ครั้ง ครั้งละ 5 วินาทีได้โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 บริสุทธิ์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 33 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดสูงกว่าปกติ ดังนั้นโปรตีนนี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 เพราะสามารถทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ดังนั้นจึงนำไปพิสูจน์ผลในการทดลองต่อไป

4.6 การเตรียมเซลล์ที่มีการแสดงออก Notch3 เกินเพื่อใช้ในการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทำทรานสเฟคชันอย่างถาวรในเซลล์ไลน์ 293T

หลังจากที่มีการทำทรานสเฟคชันอย่างถาวรในเซลล์ไลน์ 293T เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้พลาสมิด pcDNA-FLmNotch 3 ซึ่งมีซิ้นยีน ซึ่งประมวลรหัสโปรตีน mNotch 3 ทั้งสายและพลาสมิด pcDNA3 เปล่าเป็นพลาสมิดชุดควบคุม ทำการสกัดโปรตีน วัดปริมาณโปรตีน และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยเทคนิค Western blot ตามวิธีในข้อ 3.12 โดยใช้แอนติบอดีต่อเอคโตโดเมนของ mNotch3 ที่ได้มาจาก Dr. Anne Joutel พบว่าเซลล์ไลน์ 293T มีการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 อย่างชัดเจนและความเข้มของแถบโปรตีน mNotch3 มีการเพิ่มขึ้นตามปริมาณโปรตีนที่โหลดลงไปในแต่ละหลุม ดังนั้น จึงสามารถใช้เป็นแอนติเจนสำหรับคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้



- : pcDNA3

+ : pcDNA mNotch3

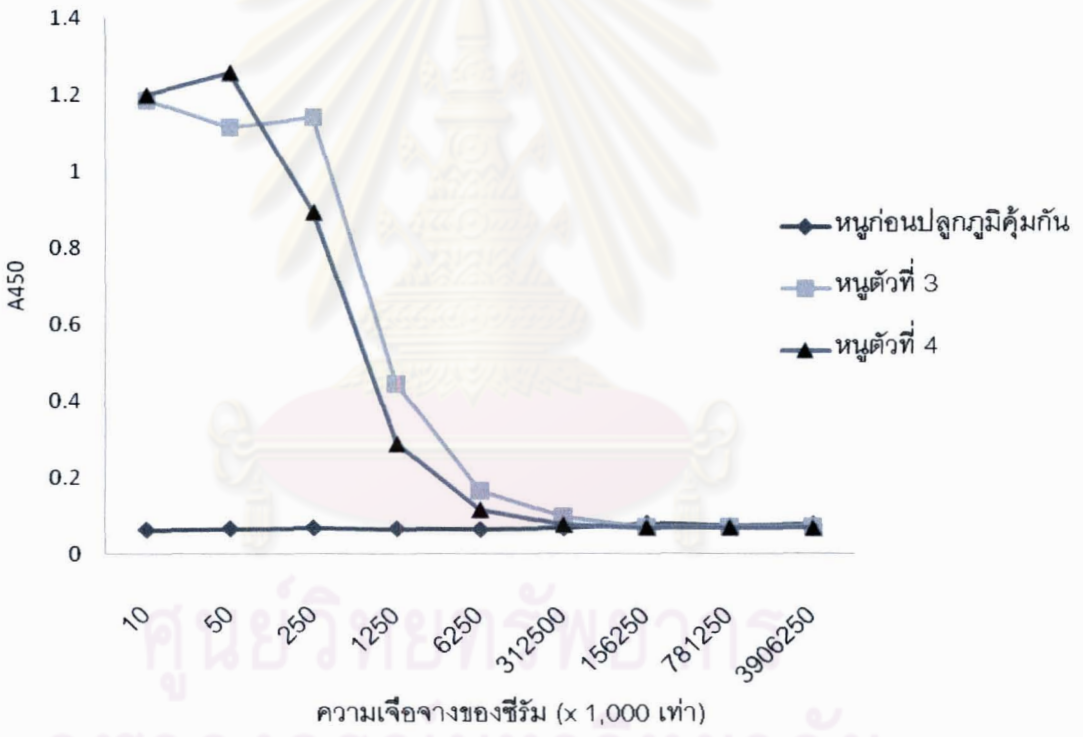
รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์การทำทรานสเฟคชั่นอย่างถาวรในเซลล์ไลน์ 293T โดยวิธี Western blot เมื่อบ่มด้วยแอนติบอดีต่อ Notch3 (5E1 monoclonal antibody)

4.7 ผลการปลูกภูมิคุ้มกันของหนูทดลองโดยรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14

ใช้หนูทดลองทั้งสิ้น 7 ตัว โดยปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ His-Select Nickel affinity gel โดยฉีดตัวละ 30 ไมโครกรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์นั้นได้นำซีรัมหนูมาทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA ทุกตัวโดยตรึงโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่ทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนไมโครไตรเตอร์เพลต 96 หลุม และตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA เพื่อหาปริมาณแอนติบอดี (IgG) ต่อแอนติเจนที่ฉีดในซีรัมหนูหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้ว 3 ครั้งพบว่าหนูตัวที่ 1 ตาย และหนูอีก 3 ตัวที่เหลือให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ยังไม่สูงมากเนื่องจากการตอบสนองต่อแอนติเจนยังมีน้อยจึงฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 พบว่าหนูตัวที่ 2 ตายภายหลังจากการฉีดกระตุ้น นำหนูตัวที่ 3 และ 4 มาวัดระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี (ระดับไตเตอร์ :ค่า A_{450} ที่มีปริมาณเป็นสองเท่าของค่าที่ได้ก่อนการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง) ด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าหนูตัวที่ 3 และ 4 ตอบสนองต่อแอนติเจนได้สูงขึ้น ให้ค่าไตเตอร์ในระดับสูงที่สุดเท่าๆกัน คือ 1:128000 (รูปที่ 4.17) แต่ภายหลังจากการวัดระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีแล้วพบว่าหนูตัวที่ 3 ตายหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 6 จึงเลือกหนูตัวที่ 4 มาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1

ตารางที่ 4.3 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของหนู 2 ตัวหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่ทำให้บริสุทธิ์

หนูตัวที่	ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี	นำไปหลอมรวมเซลล์ครั้งที่
1	ตายหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3	-
2	ตายหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4	-
3	1:6250000 (ตายหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งที่ 6)	-
4	62500000	1



รูปที่ 4.17 ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีของหนูตัวที่ 3 และ 4 ที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน mNotch3 EGF repeats 9-14 ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และใช้ซีรัมของหนูทดลองเจือจาง 1:10000ถึง 1:390625000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 จำนวน 2 ตัวด้วยวิธี Indirect ELISA

ความเจือจางของซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450		
	ซีรัมหนูก่อนปลูกภูมิคุ้มกัน	หนูตัวที่ 3	หนูตัวที่ 4
1:10000	0.062±0.006	1.183±0.052	1.197±0.067
1:50000	0.065±0.005	1.112±0.005	1.255±0.061
1:250000	0.067±0.004	1.138±0.033	0.891±0.109
1:1250000	0.065±0.004	0.443±0.089	0.287±0.056
1:6250000	0.063±0.005	0.165±0.031	0.115±0.015
1:312500000	0.066±0.005	0.097±0.001	0.075±0.004
1:156250000	0.079±0.003	0.069±0.001	0.068±0.002
1:781250000	0.072±0.003	0.069±0.005	0.068±0.001
1:3906250000	0.076±0.005	0.070±0.004	0.066±0.001

4.8 ผลการหลอมรวมเซลล์มัยอีโลมาเซลล์เข้ากับเซลล์ม้าม

4.8.1 ผลการหลอมรวมมัยอีโลมาเซลล์เข้ากับเซลล์ม้ามครั้งที่ 1 (Fusion 1)

ผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 ใช้ม้ามจากหนูตัวที่ 4 ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนบริสุทธิ์ mNotch3 EGF repeats 9-14 ปริมาณ 30 ไมโครกรัม ภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์แล้ว เลี้ยงเซลล์ในจานสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จำนวน 5 จาน (456 หลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ในแต่ละหลุมด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ โคลนของเซลล์ไฮบริโดมาจะมีลักษณะโปร่งแสงและกลมวาว เซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมาที่ไม่ถูกหลอมรวมจะตาย หลังจากนั้นประมาณ 16 วัน เซลล์ไฮบริโดมาจะเจริญได้ประมาณครึ่งของพื้นที่ก้นหลุม โดยพบเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญจากหลุมทั้งหมด 400 หลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA ซึ่งเป็นการคัดกรองปฐมภูมิโคลนที่มีการสร้างแอนติบอดี แต่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าสร้างแอนติบอดีต่อฮีสติดีนแทก 6 ตัวที่เชื่อมอยู่กับโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 หรือสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 จึงยืนยันผลการ

ทดสอบด้วยเทคนิค Western blot ควบคู่ไปกับเทคนิค Indirect ELISA โคลนที่ให้ผลบวกต่อการสร้างแอนติบอดีต่อ mNotch3 ที่สกัดได้จากเซลล์ไลน์ 293T ที่มีการแสดงออกเกินของ Notch3 ด้วยเทคนิค Western blot ได้จะถูกนำไปเลี้ยงต่อในจานสำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม ซึ่งหลุมจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และให้เซลล์แข็งแรงก่อนที่จะนำเซลล์ไฮบริโดมาไปแยกให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ แต่พบว่ามีเซลล์บางส่วนเสียคุณสมบัติการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 อาจเนื่องจากว่าเซลล์ไฮบริโดมาต่อ mNotch3 โตช้ากว่าเซลล์อื่นจึงมีปริมาณน้อยกว่าเซลล์อื่นและอาจสูญเสียความเสถียรทางพันธุกรรมจึงทำให้เซลล์ตายไป จึงเสียคุณสมบัติในการผลิตแอนติบอดีไปในที่สุด

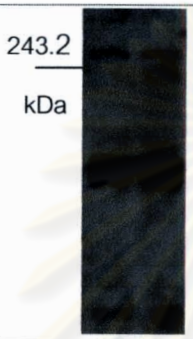
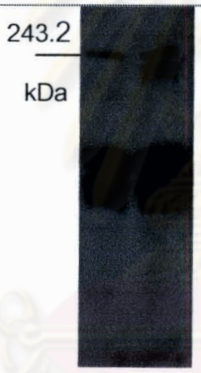
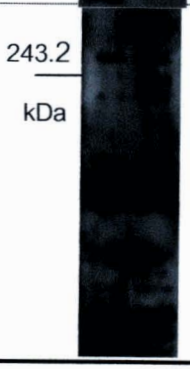
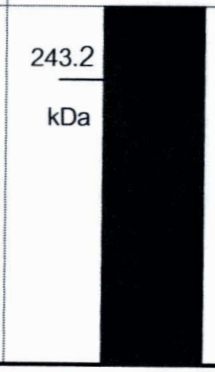
หลังทำการหลอมรวมเซลล์พบว่าเซลล์ไฮบริโดมาในหลุม 2D5/E2, 2D5/G6, 2D5/F6 และ 4D8/D6 ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Western blot เมื่อเทียบกับชุดควบคุมบวก จึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด ไปทดสอบความจำเพาะต่อรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ 293T-pcDNA notch3 และนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้งหมดไปตรวจสอบไอโซไทด์ต่อไป

ตารางที่ 4.5 สรุปผลการหลอมรวมเซลล์ อัตราส่วนเซลล์ไฮบริโดมาและหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดกรอง ภายหลังการหลอมรวมเซลล์

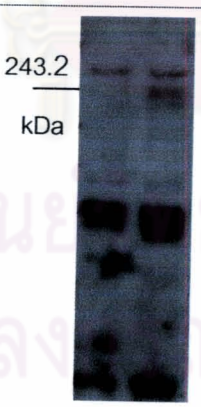
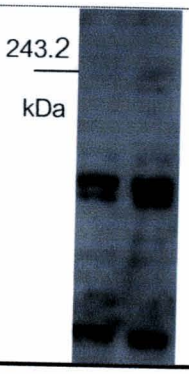
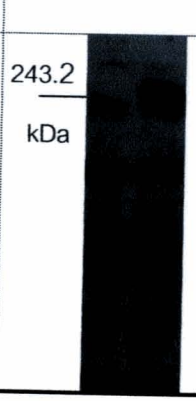
การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่	จำนวนหลุมทั้งหมด	อัตราส่วนที่ได้เซลล์ไฮบริโดมา		อัตราส่วนของหลุมที่ให้ผลบวก	
		จำนวนหลุมที่ได้เซลล์ไฮบริโดมา	เปอร์เซ็นต์ (%)	จำนวนหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดกรอง	เปอร์เซ็นต์ (%)
1	456	400	87.71	4	0.877

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

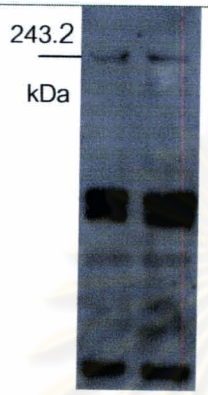
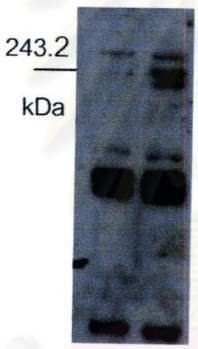
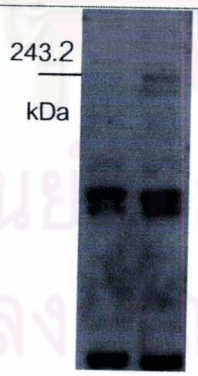
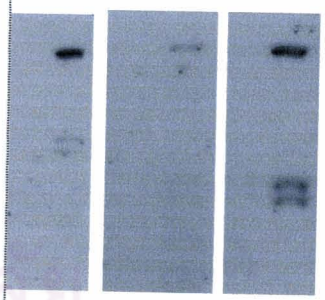
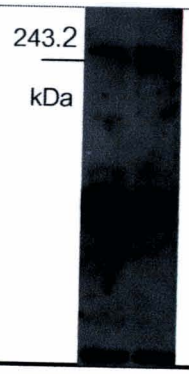
ตารางที่ 4.6 ผลการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 ที่แสดงออกโดยเซลล์ไลน์ 293T ด้วยเทคนิค Western blot

ลำดับ	รหัสโคลน	การคัดกรองปฐมภูมิ	การคัดกรองทุติยภูมิ	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
1	3G9			ยังไม่ได้ทำ limiting dilution
2	3F11			สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
3	3G11			ยังไม่ได้ทำ limiting dilution
4	4D8			

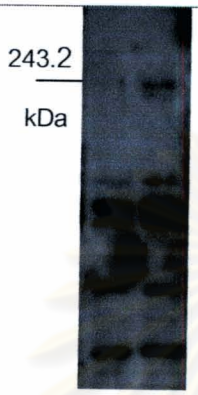
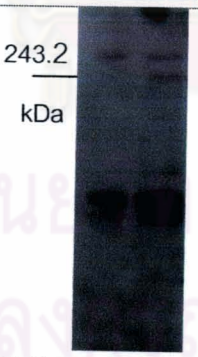
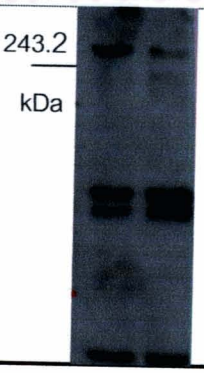
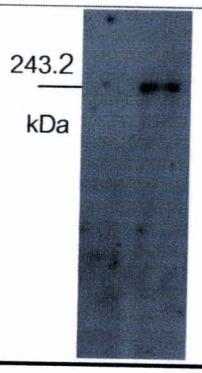
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

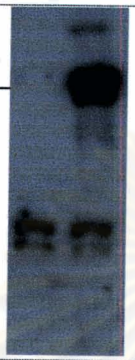
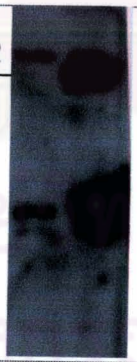
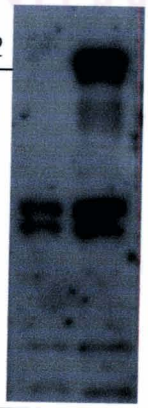
ลำดับ	รหัสโคลน	การคัดกรองปฐมภูมิ	การคัดกรองทุติยภูมิ	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
5	5E1			สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
6	5G7			สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
7	2C5			ยังไม่ได้ทำ limiting Dilution
8	2B10			ยังไม่ได้ทำ limiting Dilution

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับ	รหัสโคลน	การคัดกรองปฐมภูมิ	การคัดกรองทุติยภูมิ	โมโนโคลนอล แอนติบอดี
9	2C8			สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
10	2C12			สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
11	2D5			
12	1F8			ยังไม่ได้ทำ limiting Dilution

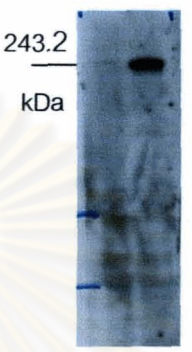
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับ	รหัสโคลน	การคัดกรองปฐมภูมิ	การคัดกรองทุติยภูมิ	โมโนโคลน
13	4H3			สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
14	1G11			สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
15	1C5			ยังไม่ได้ทำ limiting Dilution
16	1G6			สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab

ลำดับ	รหัสโคลน	การคัดกรองปฐมภูมิ	การคัดกรองทุติยภูมิ	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
17	1A9		สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab	-
18	1E11			สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
19	1H9		สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab	-
20	4D1		สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab	-

ลำดับ	รหัสโคลน	การคัดกรองปฐมภูมิ	การคัดกรองทุติยภูมิ	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
21	4H11	243.2 kDa	สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab	-
22	3E10	243.2 kDa	243.2 kDa	สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
23	1E8	243.2 kDa	243.2 kDa	สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab
24	3B9	243.2 kDa	สูญเสียความสามารถในการผลิต Ab	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

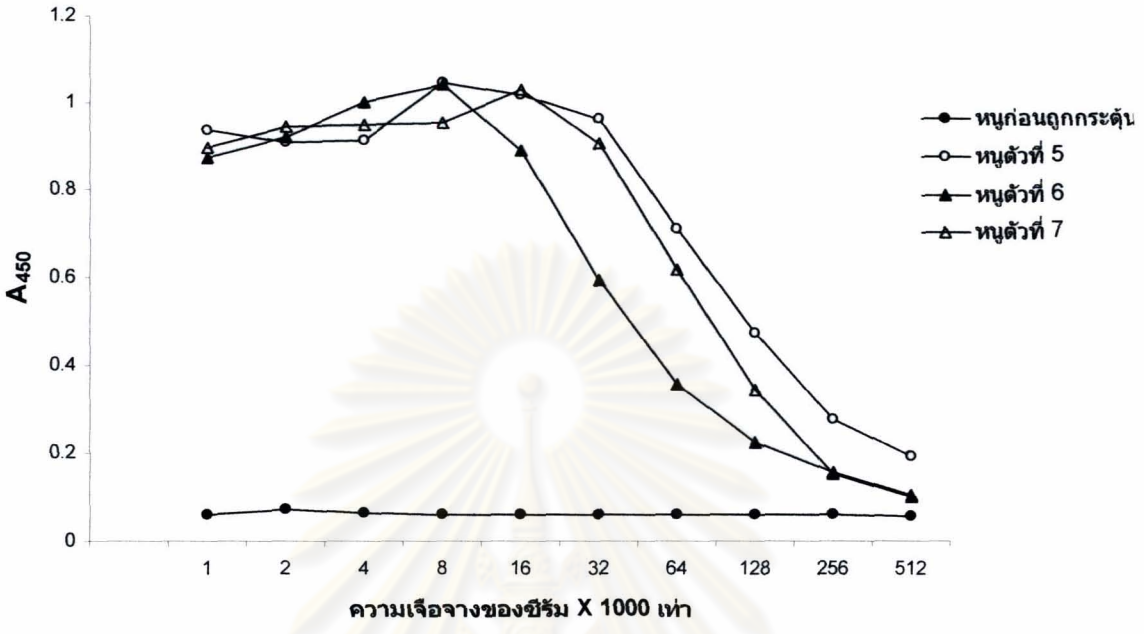
ลำดับ	รหัสโคลน	การคัดกรองปฐมภูมิ	การคัดกรองทุติยภูมิ	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
25	4B11			ยังไม่ได้ทำ limiting Dilution

4.8.2 ผลการหลอมรวมมัยอีโลมาเซลล์เข้ากับเซลล์ม้ามครั้งที่ 2 (Fusion 2)

ในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ใช้หนูตัวที่ 5 ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นไปทั้งหมด 4 ครั้งมาทำการหลอมรวมเซลล์ เมื่อหลอมรวมเซลล์ผ่านไปได้ 16 วันทำการทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วยเทคนิค Indirect ELISA และเทคนิค Western blot พบว่าได้หลุมที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วย Indirect ELISA ทั้งสิ้น 158 หลุม และไม่พบหลุมที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Western blot ดังนั้นจึงไม่ได้ monoclonal antibody จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งนี้

ตารางที่ 4.7 แอนติบอดีไตเตอร์ของหนูตัวที่ 5-7 ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่บริสุทธิ์

หนูตัวที่	ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี	นำไปหลอมรวมเซลล์ครั้งที่
5	1:512000	2
6	1:256000	-
7	1:256000	-



รูปที่ 4.18 ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีของหนูตัวที่ 5, 6 และ 7 ที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน mNotch3 EGF repeats 9-14 ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม และใช้ซีรัมของหนูทดลองเจือจาง 1:500 ถึง 1:512,000

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 จำนวน 3 ตัวด้วยวิธี Indirect ELISA

ความเจือจางของซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450			
	ซีรัมหนูก่อนปลูกภูมิคุ้มกัน	หนูตัวที่ 5	หนูตัวที่ 6	หนูตัวที่ 7
1:500	0.057±0.006	1.344±0.027	1.139±0.047	1.143±0.013
1:1000	0.061±0.001	0.935±0.013	0.874±0.004	0.895±0.017
1:2000	0.070±0.006	0.907±0.015	0.922±0.014	0.944±0.029
1:4000	0.063±0.002	0.913±0.006	0.999±0.023	0.950±0.022
1:8000	0.058±0.001	1.045±0.015	1.039±0.011	0.953±0.047

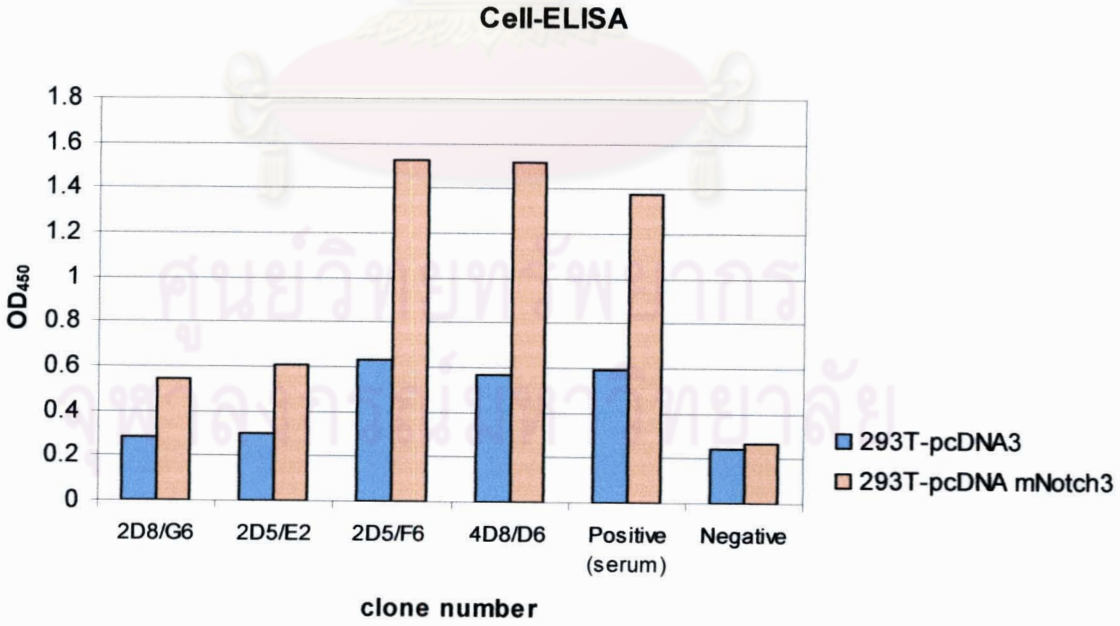
ความเจือจางของซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450			
	ซีรัมหนูก่อนปลูกภูมิคุ้มกัน	หนูตัวที่ 5	หนูตัวที่ 6	หนูตัวที่ 7
1:16000	0.061±0.001	1.045±0.007	0.889±0.025	1.029±0.008
1:32000	0.061±0.002	0.096±0.035	0.594±0.041	0.904±0.003
1:64000	0.060±0.001	0.706±0.044	0.357±0.008	0.617±0.019
1:128000	0.058±0.002	0.473±0.054	0.224±0.01	0.345±0.030
1:256000	0.060±0.002	0.277±0.03	0.156±0.001	0.153±0.094
1:512000	0.057±0	0.1925±0.029	0.106±0.002	0.1±0.043

4.9 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ mNotch 3 ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ไลน์ 293T/pcDNA-mNotch3 ด้วยเทคนิค Cell-ELISA

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 4 โคลนที่คัดเลือกด้วยเทคนิค Western blot แล้วให้ผลบวก มาทดสอบความสามารถในการจับกับรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T ที่ทำทรานสเฟคชั่นอย่างถาวรด้วยพลาสมิด pcDNA-mNotch3 และพลาสมิด pcDNA3 (ชุดควบคุมลบ) และใช้เซลล์ไลน์ 293T ที่ทำทรานสเฟคชั่นได้สำเร็จเป็นชุดการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ ซึ่งพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน 4D8/D6 และ 2D5/F6 สามารถจับกับรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T/pcDNA-mNotch3 ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน 2D5/E2 และ 2D5/G6 ตรวจไม่พบความจำเพาะระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T/pcDNA-mNotch3 ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 การทดสอบความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับ mNotch 3 ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ที่มีบริเวณเอคโตโดเมนของ mNotch3

รหัสโคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm	
	293T-pcDNA3 cell (ชุดควบคุม)	293T-pcDNA-mNotch3 cell
2D5/E2	0.297	0.612
2D5/G6	0.285	0.54
2D5/F6	**0.632**	**1.528**
4D8/D6	**0.569**	**1.516**
ชุดควบคุมบวก (serum)	**0.593**	**1.376**
ชุดควบคุมลบ (pre-immunized)	0.243	0.265



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T-mNotch3 ด้วยเทคนิค Cell-ELISA ที่ปริมาณเซลล์ 100,000 เซลล์ต่อหลุม

จากการทดลองพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน 4D8/D6 และ 2D5/F6 สามารถจับกับรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ได้ จากผลการทดลองที่ได้จึงสามารถนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกของ Notch3 ในเซลล์ชนิดต่างๆ และอาจนำไปใช้เป็นสารควบคุมการส่งสัญญาณของ Notch3 ต่อไปได้

ตารางที่ 4.10 สรุปผลการหลอมรวมเซลล์มัยอีโลมากับเซลล์ม้ามทั้งหมด 2 ครั้ง

ครั้งที่	หนูตัวที่	จำนวนหลุมตั้งต้น	เซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญ	จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดี (Western blot)	จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดี (cell ELISA)	รหัสโคลนที่ได้
1	4	456	400	4	2	4D8/D6, 2D5/F6
2	5	308	158	-	-	-

จากการหลอมรวมเซลล์มัยอีโลมากับเซลล์ม้ามทั้งหมด 2 ครั้งพบว่าได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 ทั้งหมด 4 โคลน และเมื่อนำไปทดสอบความจำเพาะกับ mNotch 3 ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ด้วยเทคนิค Cell-ELISA พบว่ามีเพียง 2 โคลนที่มีความจำเพาะกับ mNotch 3 ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ และผลจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ไม่ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งนี้ ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.10

4.10 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 4 โคลนโดยวิธี Indirect ELISA antigen capture โดยใช้แอนติเจนมาตรฐาน IgG_{2b} เป็นตัวควบคุม (ตารางที่ 4.11) พบว่าโมโนโคลนอลรหัสโคลน 4D8/D6 และ 2D5/E2 มีไอโซไทป์ IgG_1 และรหัสโคลน 2D5/F6 และ 2D5/G6 มีไอโซไทป์ IgM

ตารางที่ 4.11 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA

รหัสโคลน	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgA	IgM
4D8/D6	0.744	0.051	0.062	0.079	0.053	0.084
2D5/F6	0.114	0.053	0.132	0.127	0.050	1.957
2D5/G6	0.067	0.067	0.116	0.124	0.082	1.821
2D5/E2	0.442	0.048	0.075	0.066	0.047	0.087
IgG_{2b} (positive)	0.122	0.046	1.031	0.093	0.059	0.104

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่มีบริเวณเอคโตโดเมนของยีน *mNotch3* ซึ่งตรงกับบริเวณ EGF repeats 9-14 ในเวกเตอร์ pET-15b พบว่าได้พลาสมิดลูกผสมจำนวน 2 โคลน จากการเชื่อมต่อชิ้นยีนในอัตราส่วน 1:3 และในอัตราส่วน 1:5 ซึ่งเมื่อนำพลาสมิดลูกผสมทั้ง 2 โคลน ไปวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์พบว่ามีเพียง 1 โคลนที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นยีนในอัตราส่วน 1:3 ที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง และสามารถประมวลรหัสเป็นโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ได้ ในขณะที่โคลนที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นยีนในอัตราส่วน 1:5 พบการเปลี่ยนแปลงโคดอนภายในชิ้นยีน mNotch3 จากการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน serine เปลี่ยนเป็น proline (ภาคผนวก ค) ดังนั้น จึงคัดเลือกพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ mNotch3 จากการเชื่อมต่อชิ้นยีนในอัตราส่วน 1:3 ไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียต่อไป

เมื่อนำพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ mNotch3 ไปใช้ในการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ พบว่า *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS สามารถผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 เมื่อมีการชักนำการสร้างโปรตีนด้วยการเติม IPTG แต่กลับไม่พบการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ซึ่งเมื่อย้อนกลับไปตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน mNotch3 บริเวณ EGF repeats 9-14 ตรวจพบโคดอนที่พบมีการใช้ในความถี่ต่ำ (rare codon)ภายในชิ้นยีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ซึ่งจะไม่สามารถถอดรหัสและแปรรหัสใน *E. coli* สายพันธุ์ทั่วไป โดยได้มีรายงานว่า *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS มีลักษณะสมบัติเด่น คือ เป็นสายพันธุ์ที่มาจาก *E. coli* สายพันธุ์ Tuner (B Strain) ซึ่งได้ถูกดัดแปลงให้มีรหัสของ tRNA ที่เป็น rare codon ที่ประมวลรหัสกรดอะมิโนในยูคาริโอต ซึ่งจะพบน้อยใน *E. coli* ทำให้สายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถผลิตโปรตีนได้มากขึ้น (Graslund และคณะ, 2008) ซึ่ง rare codon นี้มี 6 โคดอน คือ AUA, AGG, AGA, CUA, CCC และ GGA ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS ทำให้การแปรรหัสของกรดอะมิโนมีประสิทธิภาพสูงและประสบความสำเร็จ ในขณะที่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ไม่สามารถแปลรหัส rare codon ได้ ทำให้กระบวนการแปรรหัสมีประสิทธิภาพต่ำ ซึ่งอาจจะมีการนำกรดอะมิโนที่ผิดเข้าไปเชื่อมต่อกับสายเพปไทด์ได้ ดังนั้นกระบวนการแปรรหัสของโปรตีนจึงไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นได้น้อย

ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ดังนั้น หากต้องการสร้างโปรตีนที่มีการแปรรหัสของยีนในยูคาริโอต ให้มีการแสดงออกในโปรคาริโอตโดยเฉพาะในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตโปรตีนที่แปรรหัสมาจากยูคาริโอต

Madan และ Gopal (2007) ได้รายงานว่า การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณที่สูงกว่า *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้

Graslund และคณะ (2008) ได้รายงานถึงการนำยีนมาแสดงออกใน *E. coli* นั้นว่าต้องมีปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการ ซึ่งได้แก่ ชนิดของเวกเตอร์ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย องค์ประกอบต่างๆ ในการเลี้ยงเชื้อ เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ อัตราความเร็วในการเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่า ความเข้มข้นของสารที่ใช้ชักนำ ระยะเวลาของการชักนำ ค่าดูดกลืนแสงของการชักนำ ซึ่งในแต่ละยีนที่ต้องการแสดงออกมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่สูงที่สุดตามที่ต้องการ สำหรับการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ให้ได้มากที่สุดนั้นพบว่า ต้องผลิตโปรตีน mNotch3 ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami B (DE3) pLysS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2-0.8 นาน 6 ชั่วโมงภายหลังการชักนำ จึงสามารถผลิตโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ได้มากที่สุด

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 มีขนาด 33 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ทั้งนี้ขนาดดังกล่าวใหญ่กว่าโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Protein Identification and Analysis Tools บนฐานข้อมูล ExPASy Server ที่ให้ผลการคำนวณขนาดของโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 เท่ากับ 24.693 kDa (ภาคผนวก ค) ผลการทดลองข้างต้นนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ สรรชัย (2550) ซึ่งพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แสดงออกมีขนาดใหญ่กว่าขนาดที่ได้จากการคำนวณเช่นกัน และสามารถอธิบายได้ว่า อาจมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนที่แสดงออกในระบบของโปรคาริโอต (Cook และ Unger, 2002) การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ในงานวิจัยนี้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สร้างขึ้นอยู่ในรูปแบบของอินคลูชันบอดี ซึ่งเป็นรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำงานได้ แต่รูปแบบของโปรตีนดังกล่าวส่งผลให้การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากโปรตีนอื่นทำได้ดีและง่ายขึ้น รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีความเสถียรและบริสุทธิ์สูง ไม่ถูกโปรติเอสย่อยได้ง่าย (Kane

และ Hartley, 1988) จากการทดลองโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 สามารถมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ His-select Nickel Affinity ได้ จึงค่อยนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำไปเป็นแอนติเจนก่อนปลูกภูมิคุ้มกันหนูต่อไป

ภายหลังจากการปลูกภูมิคุ้มกันหนูไมซ์ด้วยโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 แล้วนำเซลล์ม้ามหนูมารวมกับเซลล์ไมอีโลมา พบว่าในขั้นตอนการคัดกรองแอนติบอดีไม่สามารถคัดกรองแอนติบอดีด้วยเทคนิค Indirect ELISA ได้ เนื่องจากโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 ที่ใช้เป็นแอนติเจนสำหรับปลูกภูมิคุ้มกันหนูไมซ์นั้นมีส่วนของโปรตีน His-tag ด้วย ซึ่งทำให้ไม่สามารถคัดเลือกโคลนที่สร้างแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายหลังการหลอมรวมเซลล์ว่าจำเพาะต่อโปรตีน mNotch3 EGF repeats 9-14 หรือบริเวณ His-tag ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงคัดกรองแอนติบอดีด้วยเทคนิค Western blot และเทคนิค Cell-ELISA โดยทำทรานสเฟคชันอย่างถาวรในเซลล์ไลน์ 293T ด้วยพลาสมิด pcDNA-mNotch3 เพื่อยืนยันว่ารหัสโคลนที่ให้ผลบวกสามารถผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน mNotch3 ได้ เพราะโปรตีน mNotch3 ที่นำมาทดสอบไม่มีส่วนของโปรตีน His-tag และสามารถตรวจสอบความจำเพาะได้โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน mNotch3 จากเซลล์ไลน์ 293T-pcDNA3 (ชุดควบคุมลบ) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 4 โคลน คือ รหัสโคลน 2/D5-E2, 2/D5-G6, 2/D5-F6 และ 4/D8-D6 ในขณะที่การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ไม่ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเลย และเมื่อทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T-mNotch3 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน 4/D8-D6 และ 2/D5-F6 สามารถจับกับรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T-mNotch3 ซึ่งสามารถนำไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของ Notch3 ในเซลล์ได้ ในขณะที่รหัสโคลน 2/D5-E2 และ 2/D5-G6 ไม่มีความจำเพาะต่อรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ 293T-mNotch3 ในการทดลองจึงชี้ให้เห็นว่าเทคนิค Cell-ELISA นั้นมีความสำคัญในการใช้ตรวจสอบโมเลกุลที่ถูกสร้างและแสดงออกบนผิวเซลล์ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ Notch3 ในเซลล์ชนิดต่างๆ รวมถึงเซลล์มะเร็งด้วย

เมื่อตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี รหัสโคลน 4/D8-D6 และ 2/D5-E2 มีไอโซไทป์ IgG_1 รหัสโคลน 2/D5-F6 และ 2/D5-G6 มีไอโซไทป์ IgM ในขั้นตอนการทดสอบ western blot และ Cell-ELISA เพื่อคัดกรองหาโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นได้ใช้แอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ heavy chain ของ mouse IgG ซึ่งเป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ดังนั้นแอนติบอดีทุติยภูมิอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ mouse IgM ทำให้การคัดกรองได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์เป็น IgM ติดมาด้วย เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของไอโซไทป์

IgG พบว่าเป็นแอนติบอดีหลักที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนในครั้งที่ 2 เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีครึ่งชีวิตยาวนานที่สุด และพบปริมาณมากที่สุดถึง 70-75% ของอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมดในร่างกาย (Abbas และ Lichtman, 2005) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัสโคลน 4D8/D6 ไปใช้ประโยชน์ต่อเนื่องจากมีไอโซไทป์เป็น IgG_1 และมีความสามารถในการจับกับรีเซบเตอร์ที่ผิวของเซลล์ไลน์ที่มีการแสดงออกเกินของ Notch3 ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งสามารถนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกของ Notch3 ในเซลล์ชนิดต่างๆได้ และอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในอนาคตต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2548. โรคมะเร็งในประเทศไทย. สำนักบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยบูรพา [online]. แหล่งที่มา: http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/topic.asp?TOPIC_ID =1172[25 มิถุนายน 2552].

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ. 2543. อิมมูโนวิทยา. ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน. คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

สรรชัย จันทะจร. 2550. การสกัดและวิเคราะห์สารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจากกระเพราแดง (Ocimum sanpum Lin.) โดยใช้อินเตอร์ลิวคิน-2 เป็นดัชนีในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. 1994. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. Philadelphia: W. B Saunders Company.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science **284**: 770-776.

Bellavia, D., Campese, A.F., Vacca, A., Gulino, A., and Screpanti, I. 2003. Notch3, another Notch in T cell development. Semin Immunol **15**: 107-112.

Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., and Georgiou, G. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 13703-13708.

Biovisualtech. 2000. BVTech Plasmid(Version 4.0)[Computer software]. Available from: http://www.biovisualtech.com[2009, June 18]

Brennan K, B.A. 2003. Is there a role for Notch signalling in human breast cancer? Breast Cancer Res **5**: 69-75.

Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. Mol Cell **5**: 207-216.

Cook, W.S., and Unger, R.H. 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B: a potential leptin resistance factor of obesity. Dev Cell 2: 385-387.

Dang, L., Fan, X., Chaudhry, A., Wang, M., Gaiano, N., and Eberhart, C.G. 2006. Notch3 signaling initiates choroid plexus tumor formation. Oncogene **25**: 487-491.

Dang T, V.K., Washington K, Berlin J. 2007. The role of Notch3 signaling pathway in pancreatic cancer. Clinical oncology **25**: 21049.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., et al. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. Nature **398**: 518-522.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Dichgans, M., Holtmannspotter, M., Herzog, J., Peters, N., Bergmann, M., and Yousry, T.A. 2002. Cerebral microbleeds in CADASIL: a gradient-echo magnetic resonance imaging and autopsy study. Stroke **33**: 67-71.

Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L.T., Klonjkowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z., et al. 2004. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. Genes Dev **18**: 2730-2735.

Gallahan, D., and Callahan, R. 1997. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). Oncogene **14**: 1883-1890.

Gasperowicz, M., and Otto, F. 2008. The notch signalling pathway in the development of the mouse placenta. Placenta **29**: 651-659.

Gasteiger E., H.C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch. 2005. A.;Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server;(In) John M. Walker (ed). The Proteomics Protocols Handbook: 571-607.

Gramantieri, L., Giovannini, C., Lanzi, A., Chieco, P., Ravaioli, M., Venturi, A., Grazi, G.L., and Bolondi, L. 2007. Aberrant Notch3 and Notch4 expression in human hepatocellular carcinoma. Liver Int **27**: 997-1007.

Grãslund, S.e.a. 2008. Protein production and purification. Nat. Methods **5**: 135-146.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol **166**: 557-580.

Haruki, N., Kawaguchi, K.S., Eichenberger, S., Massion, P.P., Olson, S., Gonzalez, A., Carbone, D.P., and Dang, T.P. 2005. Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. Cancer Res **65**: 3555-3561.

Hu, C., Dievart, A., Lupien, M., Calvo, E., Tremblay, G., and Jolicoeur, P. 2006. Overexpression of activated murine Notch1 and Notch3 in transgenic mice blocks mammary gland development and induces mammary tumors. Am J Pathol **168**: 973-990.

Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C., and Tournier-Lasserve, E. 2000. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. J Clin Invest **105**: 597-605.

Joutel, A., Favrole, P., Labauge, P., Chabriat, H., Lescoat, C., Andreux, F., Domenga, V., Cecillon, M., Vahedi, K., Ducros, A., et al. 2001. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. Lancet **358**: 2049-2051.

Jurynczyk, M., Jurewicz, A., Raine, C.S., and Selmaj, K. 2008. Notch3 inhibition in myelin-reactive T cells down-regulates protein kinase C theta and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol **180**: 2634-2640.

Kane, J.F. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol **6**: 494-500.

Kane, J.F.a.H., D.L. 1998. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol **6**: 95-101.

Kohler, G., and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature **256**: 495-497.

Konishi, J., Kawaguchi, K.S., Vo, H., Haruki, N., Gonzalez, A., Carbone, D.P., and Dang, T.P. 2007. Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers. Cancer Res **67**: 8051-8057.

Lardelli, M., Dahlstrand, J., and Lendahl, U. 1994. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. Mech Dev **46**: 123-136.

Larsson, C., Lardelli, M., White, I., and Lendahl, U. 1994. The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. Genomics **24**: 253-258.

Li, K., Li, Y., Wu, W., Gordon, W.R., Chang, D.W., Lu, M., Scoggin, S., Fu, T., Vien, L., Histen, G., et al. 2008. Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3. J Biol Chem **283**: 8046-8054.

Maekawa, Y., Tsukumo, S., Chiba, S., Hirai, H., Hayashi, Y., Okada, H., Kishihara, K., and Yasutomo, K. 2003. Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. Immunity **19**: 549-559.

Maillard, I., Fang, T., and Pear, W.S. 2005. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. Annu Rev Immunol **23**: 945-974.

Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J., and MacDonald, H.R. 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. Nat Immunol **5**: 247-253.

Sambrook, J.a.R., D. W. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd ed. New York : Cold Spring Habor Laboratory.

Schreier, M., Kohlor, G., Hengartner, H., Berck, C., Trucco, M., Forni, L. 1980. Hybridoma Techniques. New York : Cold Spring Habor Laboratory.

Takebayashi, K., Akazawa, C., Nakanishi, S., and Kageyama, R. 1995. Structure and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-5. Identification of the neural precursor cell-specific promoter element. J Biol Chem **270**: 1342-1349.

Talora C, C.S., Christian, Palermo R. 2006. Cross talk among Notch3, pre-TCR, and Tal1 in T-cell development and leukemogenesis. Blood **107**: 3313-3320.

Thomas, M. 1928. The theory of the gene: Are mutant recessive genes produced by losses of genes. Yale University: 77-81.

Tournier-Lasserve, J.A.a.E. 1998. Notch signalling pathway and human diseases. Semin Cell Dev Biol **9**: 619-625.

Tsukumo, S., and Yasutomo, K. 2004. Notch governing mature T cell differentiation. J Immunol **173**: 7109-7113.

Wang, T., Baron, M., and Trump, D. 2008. An overview of Notch3 function in vascular smooth muscle cells. Prog Biophys Mol Biol **96**: 499-509.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10 กรัม
ผงสกัดจากยิสต์ (yeast extract)	5.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0 กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกันในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani Agar (LB Agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เติมวุ้น (Bacto agar) 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียาแอมพิซิลลิน (LBA Agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar) ภายหลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมแอมพิซิลลิน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียาแอมพิซิลลินและคลอแรมเฟนิคอล (LBAC agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar) ภายหลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมแอมพิซิลลิน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Stock Reagent)

ผงอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM สำเร็จรูป	13.40	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2.0	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 750 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับค่าความเป็นกรดเบส ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ลงในขวดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปลอดเชื้อขวดละ 100 มิลลิลิตร ปิดฝาและพันพาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10%

อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Stock reagent)	100.0	มิลลิลิตร
ซีรัม (Inactivated fetal bovine serum)	10.0	มิลลิลิตร
Streptomycin (500 µg/ml)	10.0	ไมโครลิตร
Pennicillin G (10^6 U/ml)	50.0	ไมโครลิตร
HEPES	1.0	มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1.0	มิลลิลิตร

7. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI High glucose (RPMI+L-glutamine) ที่มี Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10%

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI High glucose	100.0	มิลลิลิตร
ซีรัม (Inactivated fetal bovine serum)	10.0	มิลลิลิตร

Streptomycin (500 µg/ml)	10.0	ไมโครลิตร
Pennicillin G (10^6 U/ml)	50.0	ไมโครลิตร
HEPES	1.0	มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1.0	มิลลิลิตร

8. อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI High glucose	100.0	มิลลิลิตร
HAT 100X	1.0	มิลลิลิตร

9. อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI High glucose	100.0	มิลลิลิตร
HT 100X	1.0	มิลลิลิตร

10. การเตรียมน้ำยาแช่แข็งเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM หรือ RPMI High glucose	9.0	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	1.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารปฏิชีวนะ

แอมพิซิลลิน (Ampicillin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 มิลลิลิตรทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูป ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำออกมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 1 เดือน

คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenical) ความเข้มข้น 34 มิลลิกรัมต่อเอทานอล 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 1 เดือน

สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 มิลลิลิตรทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูป ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำออกมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 1 เดือน

เพนนิซิลลิน จี (Penicillin G) ความเข้มข้น 10^6 ยูนิต ต่อน้ำ 1 มิลลิลิตรทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูป ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำออกมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 1 เดือน

G418 (Geneticin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อน้ำปลอดประจุ 1 มิลลิลิตรให้ละลายจนหมด (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) และกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเมื่อนำมาใช้แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

2. สารเคมีสำหรับสกัดแยกพลาสมิดด้วย Plasmid minipreparation

- สารละลาย 4% Sodium dodecyl sulfate (SDS 4%)

Sodium dodecyl sulfate 4 กรัมละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดแล้วปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.2 เติมน้ำปลอดประจุให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย I

กลูโคส	50.0	มิลลิโมลาร์
สารละลาย Tris-HCl พีเอส 8.0	25.0	มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA พีเอส 8.0	10.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 นอร์มัล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.6 กรัมละลายในน้ำปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย III

สารละลายโพแทสเซียมอะซีเตรต (5.0 โมลาร์)	60.0	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	28.5	มิลลิลิตร

- สารละลาย RNase A (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

RNase A 10 มิลลิกรัมละลายในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer P3

Buffer PE

Buffer EB

RNase A

Collection tube

QIAprep Spin Column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใน Buffer P1 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเติมเอทานอลปริมาตร 24 มิลลิลิตร ใน Buffer PE

4. สารละลายสำหรับเตรียมคอมพลีเทนต์เซลล์ของแบคทีเรีย (*E .coli*)

- สารละลาย RF I

RbCl	6.0	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	4.9	กรัม
สารละลายโพแทสเซียมอะซีเตรท (1M, PH 7.5)	15.0	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.75	กรัม
กลีเซอรอล	75.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดประจุ 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 5.8 แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดประจุให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- สารละลาย RF II

สารละลาย MOPS (0.5 M, PH 6.8)	10.0	มิลลิลิตร
RbCl	0.6	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	5.5	กรัม
กลีเซอรอล	75.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้เท่ากับ 6.8 แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดประจุให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลายและบัฟเฟอร์สำหรับอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส

- สารละลายบัฟเฟอร์ 50XTAE

Trisma base	242.0	กรัม
กรดอะซีติก	57.1	กรัม
สารละลาย EDTA (0.5 M, PH 8.0)	100.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 750 มิลลิลิตรจนสารละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

- อะกาโรสเข้มข้น 1%

อะกาโรส (Agarose)	1.0	กรัม
สารละลายบัฟเฟอร์ 1XTAE	100.0	มิลลิลิตร

- สารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ในน้ำ

ละลายเอทิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สารละลาย isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ชั่งผง IPTG 0.12 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดแล้วกรองผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

7. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.8

Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$) 90.855 กรัม

ละลาย Trizma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 8.8 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH เติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 6.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) 12.114 กรัม

ละลาย Trisma base ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 6.8 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. สารละลาย 10% SDS

Sodium dodecyl sulfate จำนวน 5 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 40 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.2 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

10. สารละลาย 10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (APS)

Ammonium persulfate 0.5 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. สารละลาย 5X running buffer

Trisma base	15.1	กรัม
Glycine	94.0	กรัม
SDS	5.0	กรัม

ผสมสารทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายหมดแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้เจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

12. สารละลาย 2X laemmli buffer

10% SDS	4.0	มิลลิลิตร
Glycerol 87%	2.29	มิลลิลิตร
1.0 M Tris pH 6.8	1.0	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	2.71	มิลลิลิตร
Bromphenol blue	0.001	กรัม

ผสมสารทั้งหมดและนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ผสม 2-mercaptoethanol หรือ1M DTT ในอัตราส่วน 900 ไมโครลิตรต่อ 100 ไมโครลิตรของ 2-mercaptoethanol หรือ1M DTT

13. สารละลาย Dithiothreitol (DTT) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

DTT 3.09 กรัมละลายใน Sodium acetate ความเข้มข้น 0.01M pH 5.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรอง (filter disc) ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. Coomassie blue staining

Coomassie brilliant blue R250	2	กรัม
เอทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง (washman) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

15. Destaining solution

Methanol	300	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

16. สารละลาย Transfer buffer

Glycine	2.9	กรัม
Trisma base	15.1	กรัม
SDS	0.37	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ 700 มิลลิลิตร เติมเมทานอลสัมบูรณ์จำนวน 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

17. สารละลาย 10X phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	80.0	กรัม
KCl	2.0	กรัม
$NaHPO_4$	14.1	กรัม

KH_2PO_4	2.4	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 7.4 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีก่อนใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้ความเข้มข้นเป็น 1X

18. สารละลาย 10X phosphate buffer saline Tween20 (PBST)

1X phosphate buffer	1.0	ลิตร
Tween20	0.5	มิลลิลิตร

19. สารละลาย Blocking solution (PBST in 3% skimmilk)

PBST	200	มิลลิลิตร
Skimmilk	6.0	กรัม

20. สารละลายซับสเตรทสำหรับ Western blot

สารละลาย A

100 mM Tris pH 8.5 (4°)	2.5	มิลลิลิตร
Coumaric acid (-20°)	11	ไมโครลิตร
Luminol (-20 °)	25	ไมโครลิตร

สารละลาย B

100 mM Tris pH 8.5 (4°)	2.5	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	1.5	ไมโครลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ให้เข้ากันก่อนนำไปใช้เป็นซับสเตรทสำหรับเทคนิค Western blot

21. น้ำยาล้างฟิล์ม

Developer	1 ส่วน: น้ำ	4	ส่วน
Fixer	1 ส่วน: น้ำ	4	ส่วน

22. 2.5 M imidazole

Imidazole	0.851	กรัม

เตรียมสารละลาย imidazole ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรอง (filter disc) ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

23. ชุดทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย His-select™ Nickel Affinity Gel (Sigma)

Equilibration และ Wash buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 0.3 M sodium chloride และ 20 mM imidazole)

Elution buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 0.3 M sodium chloride และ 250 mM imidazole)

24. สารละลายยูเรียความเข้มข้น 15 โมลาร์

ยูเรีย	45.045	กรัม

เตรียมสารละลายยูเรียในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อและปรับปริมาตรให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°

25. สารละลาย RIPA Buffer สำหรับสกัดโปรตีนออกจากเซลล์ไลน์

0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)	1	มิลลิลิตร
1 M NaCl	1.5	มิลลิลิตร

NP-40 (100%)	100	ไมโครลิตร
5% Sodium deoxycholate	1	มิลลิลิตร
10% Sodium dodecyl sulfate	100	ไมโครลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°

26. สารละลาย 100X HT (Stock solution)

Hypoxanthine 0.1361 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
Thymidin 0.0388 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้งสองชนิดมาผสมกัน เติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

27. สารละลาย 100X HA (Stock solution)

Hypoxanthine 0.1361 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
Aminopterin 0.0018 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้งสองชนิดมาผสมกัน เติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

28. สารละลาย 50% PEG

ผสมสารละลาย PEG ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปลอดประจุปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

29. 0.1M Sodium acetate pH 4.0

ผงโซเดียมอะซีเตรท	0.8203	กรัม

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซีเตรท ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในน้ำปลอดประจุปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 4.0 ด้วย 1N HCl ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

30. Substrate TMB สำหรับทดสอบด้วยเทคนิค ELISA

3,3',5.5'-Tetramethyl-benzidine (TMB)	0.1	มิลลิกรัม
DMSO	100	ไมโครลิตร
0.1M Sodium acetate pH 4.0	9.9	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	3.33	ไมโครลิตร

ละลายผง TMB ในสารละลายทั้งหมด ซับสเตรท TMB ควรเตรียมสดทุกครั้ง

31. Substrate OPD

O-phenylenediamine	0.04	กรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer	100	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.04	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในขวดสีชา และควรเตรียมสดทุกครั้งก่อนใช้งาน

32. 1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	102	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	898	มิลลิลิตร

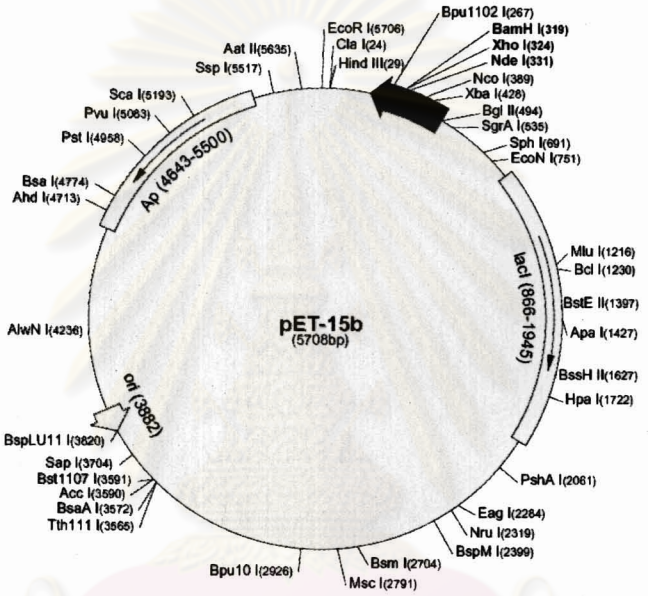
ค่อยๆเทกรดลงไปในน้ำปลอดประจุ ควรทำในตู้ดูดควันจะมีความร้อนเกิดขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

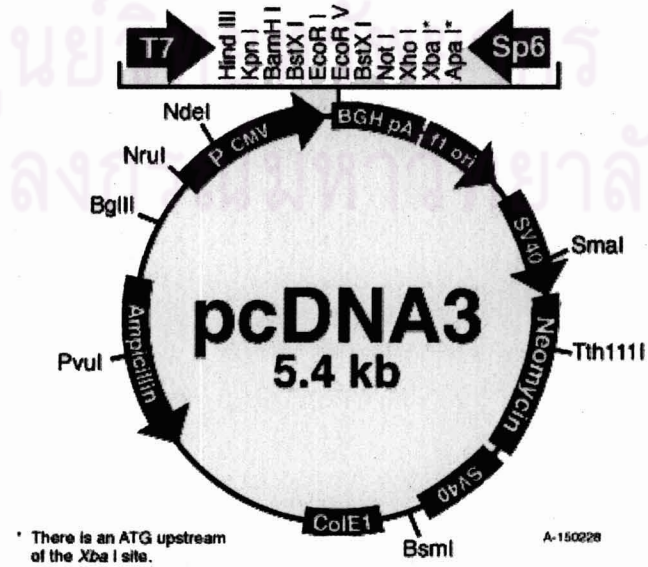
ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์และเวกเตอร์

1. เวกเตอร์ pET-15b (Novagen)

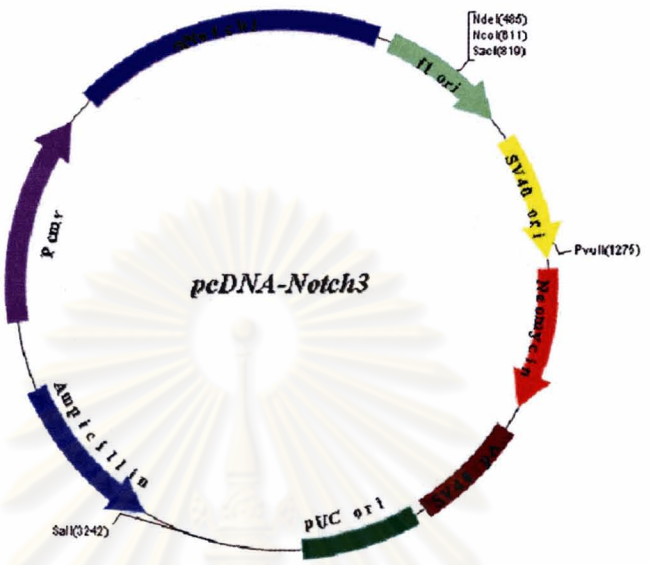


2. เวกเตอร์ pcDNA3 (Invitrogen)



3. เวกเตอร์

pcDNA-Notch3 (จาก Dr U.Lendahl, Karolinska Institute, Sweden)



4. **ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน** mNotch3

LOCUS NM_008716 7943 bp mRNA linear

DEFINITION Mus musculus Notch gene homolog 3 (Drosophila) (Notch3), mRNA.

```
   1 cgtgcccgga gccctgggaa agagggagga gggaggaggg agggtcgtgg ccggccgcca
  61 tggggctggg ggcccggggc cgccgccgcc gtcgtcgcct gatggccttg ccaccgccac
 121 caccgcccat gcgggcgctg cccctgctgc tgctgctagc ggggctgggg gctgcagcac
 181 ccccttgtct ggatggaagc ccatgtgcaa atggaggtcg gtgcacccac cagcagccct
 241 ccctggaggc tgcttgcctg tgcctgccag gctgggtggg tgagcggtgc cagctggaag
 301 acccttgcca ctcaggccct tgtgctggcc gaggcgtttg ccagagttca gtggtggcgg
 361 gcaccgcccg attctcctgt cgttgtctcc gtggcttcca aggcccagac tgctcccagc
 421 cagacccctg cgtcagcagg ccctgtgttc atggtgcccc ctgctcagtg gggccggatg
 481 gccgatttgc ctgtgcctgc ccacctggct accagggtca aagctgccaa agtgacatag
 541 atgagtgccg atctggtaca acttgccgtc atggtggtac ctgtctcaat acacctggat
 601 ccttccgctg ccagtgtcct cttggttata cagggctgct gtgtgagaac cccgtagtgc
 661 cctgtgcccc ttccccgtgt cgtaatggtg gcacctgtag gcagagcagt gatgtcacat
 721 atgactgtgc ttgccttcct ggcttcgagg gccagaactg tgaagtcaac gtggatgact
 781 gtcctggaca tcggtgtctc aatgggggaa cgtgtgtaga cggtgtcaat acttacaact
 841 gccagtgccc tccggagtgg acaggccagt tctgtacaga agatgtggat gagtgtcagc
 901 tgcagcccaa tgcctgccac aatgggggta cctgcttcaa cctactgggt ggccacagct
 961 gtgtatgtgt caatggctgg acgggtgaga gctgcagtca gaatatcgat gactgtgcta
1021 cagccgtgtg tttccatggg gccacctgcc atgaccgtgt ggcctctttc tactgtgcct
1081 gccctatggg gaagacaggc ctcttgtgtc atctggatga tgcatgtgtc agcaacccct
1141 gccatgagga tgctatctgt gacacaaacc ctgtgagtgg ccgggccatc tgcacctgcc
1201 cacctggctt cactggaggg gcatgtgacc aggatgtgga tgagtgctcg attggtgcca
```

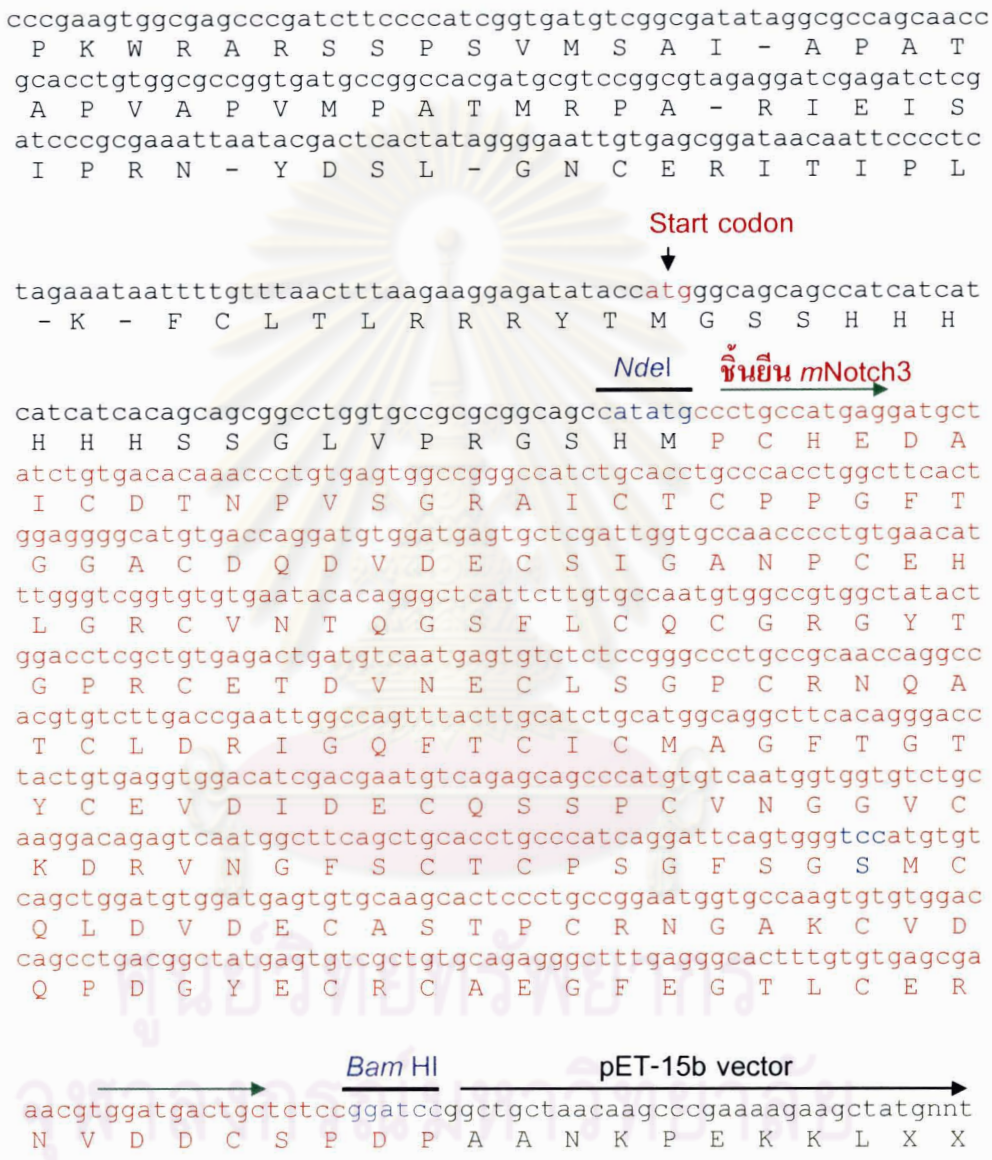
```
1261 acccctgtga acatttgggt cggtgtgtga atacacaggg ctcattcttg tgccaatgtg
1321 gccgtggcta tactggacct cgctgtgaga ctgatgtcaa tgagtgtctc tccgggccct
1381 gccgcaacca ggccacgtgt cttgaccgaa ttggccagtt tacttgcatc tgcatggcag
1441 gcttcacagg gacctactgt gaggtggaca tcgacgaatg tcagagcagc ccatgtgtca
1501 atggtggtgt ctgcaaggac agagtcaatg gcttcagctg cacctgccca tcaggattca
1561 gtgggtccat gtgtcagctg gatgtggatg agtgtgcaag cactccctgc cggaatggtg
1621 ccaagtgtgt ggaccagcct gacggctatg agtgtcgctg tgcagagggc tttgagggca
1681 ctttgtgtga gcgaaacgtg gatgactgct ctccggatcc ctgccaccac gggcgctgtg
1741 tcgatggcat tgctagcttc tcgtgtgctt gtgccccagg ctatacgggc atacgctgtg
1801 agagccaggt ggatgagtgc cgcagccagc cctgtcgata tgggggcaaa tgtctagact
1861 tggtggacaa gtacctctgc cgttgtcctc ccggaaccac aggtgtgaac tgtgaagtca
1921 acattgatga ctgtgccagt aacccctgta cctttggagt ttgccgtgat ggcatcaacc
1981 gttatgactg tgtctgtcag cctggattca cagggccctc ctgcaacgtg gagatcaatg
2041 agtgtgcatc cagcccatgt ggagagggtg gctcctgtgt ggatggggaa aatggcttcc
2101 actgcctctg tccacctggc tccctgcctc cactttgcct acctgcgaac catccctgtg
2161 cccacaagcc ctgtagtcat ggagtctgcc atgatgcacc aggcgggttc cgctgtgttt
2221 gtgagcccgg gtggagtggc cctcgctgta gccagagcct ggctccagat gcctgtgagt
2281 cccagccctg ccaggctggt ggcacctgca ccagtgatgg aataggcttt cgctgcacct
2341 gtgcccctgg attccagggc catcagtgtg aggtgctgtc cccctgtact ccaagcctct
2401 gtgagcacgg aggccactgt gagtctgacc ctgaccggct gactgtctgt tcctgtcccc
2461 caggctggca aggcccacga tgccagcagg atgtggatga atgtgccggt gcctcaccct
2521 gcggccccca tggtacctgc accaacctgc cagggaattt caggtgcatc tgccacaggg
2581 gatacactgg ccccttctgt gatcaagaca ttgacgactg tgaccccaac ccgtgcctcc
2641 atggtggctc ctgccaggat ggcgtgggct ccttttcctg ttcttgcctc gacggctttg
2701 ctggtcctcg ctgtgcccga gatgtggacg aatgtctgag cagcccctgt ggccctggca
2761 cctgtactga tcacgtggcc tccttcacct gtgcctgtcc acctggttat ggaggcttcc
2821 actgtgagat tgacttgccg gactgcagcc ccagttcctg cttcaatgga gggacctgtg
2881 tggatggcgt gagctccttc agctgtctgt gtcgccccgg ctacacaggc acacactgcc
2941 aatacgaggc tgacccctgc ttttcccggc cctgtctgca cgggggcatc tgcaacccca
3001 cccacccagg atttgaatgc acctgccggg agggcttcac tgggagtcag tgtcagaacc
3061 cagtggactg gtgcagccag gcaccctgtc agaatggggg tcgctgtgtc cagactgggg
3121 cttactgcat ttgtccacct ggatggagtg gccgcctgtg cgacatacaa agcctgccct
3181 gcacggaggc cgcagcccag atgggggtga ggttggagca gctgtgtcag gaaggtggaa
3241 agtgcataga caagggccgc tcccactact gtgtgtgtcc agagggccgt acgggtagtc
3301 actgtgaaca cgaggtggat ccctgcacgg cccagccttg ccagcacggg ggcacttgcc
3361 gtggttacat ggggggctat gtgtgtgagt gtccagctgg ctatgctggt gacagttgtg
3421 aggataatat agatgagtgt gcttcccagc cctgccagaa cggaggctcc tgtatcgatc
3481 ttgtggcccg ctatctctgt tcctgtcccc ctggcacact gggagttctc tgtgagatca
3541 atgaggacga ctgtgaccta ggcccatcct tggactcagg cgttcagtgc ctacacaatg
3601 gcacctgtgt ggacctggtg ggtggcttcc gctgtaactg tcccccagga tacacaggtc
3661 tgcactgtga ggcagacatc aatgagtgtc gcccgggtgc ctgccatgca gcgcatactc
3721 gggactgcct acaagatcca ggtgggcatt tccgctgcgt ctgccatcct ggcttcacag
3781 ggcctcgctg tcagattgct ctgtcccccc gtgagtccca gccatgtcag catggaggcc
3841 agtgccgtca cagcctaggc cgtggaggtg ggctgacctt cacctgtcac tgtgtcccgc
3901 cattctgggg tctgcgttgt gagcgggtgg cacgctcttg ccgagagctg cagtgcccag
3961 tgggtatccc atgccagcag acagcccgtg gaccacgctg cgcttgtcct ccggggctgt
4021 ccgggccctc ctgccgggtt tctagggcgt caccctcagg agctactaac gccagctgcg
4081 cctctgcccc ttgtctgcat gggggctcat gcctacctgt acagagtgtc cctttcttcc
4141 gctgtgtgtg cgctccgggc tggggcggcc cgcgttgtga gaccccttcc gcagcccctg
4201 aggtccccga ggagccacgg tgcccgcgag cggcttgcca ggccaagcga ggggaccaga
4261 actgcgatcg tgagtgcaac accccaggct gtggctggga tggcggtgac tgctcactga
4321 acgtggacga cccctggagg cagtgtgagg cactgcagtg ctggcgtctc ttcaacaaca
4381 gccggtgtga cccggcctgc agctctccag cctgcctcta tgacaacttt gactgctact
4441 ctggtggccg cgaccgcacc tgcaaccctg tttatgagaa gtactgcgcc gaccactttg
4501 cagatggccg ttgtgaccag ggctgcaaca ctgaggaatg cggctgggat gggctggact
4561 gtgccagcga ggtcccggcc cttttggccc gaggggttct ggtcctcaca gttcttctgc
4621 ctcctgaaga gttgctgcgc tccagtgccg actttctgca gcgactcagc gctattctgc
4681 gcacctcact gcgcttccgc ttggacgcac gtggccaggc catggtcttc ccctatcacc
4741 ggccaagccc tggctctgaa tcccgggtcc gtcgtgagct gggtcctgag gtgatcggct
4801 ctgtggtgat gctggagatt gacaaccggc tctgtctgca gtcagctgag aatgaccact
4861 gcttccctga tgcccagagt gctgctgact acctgggagc cttgtcagca gtggagcgac
4921 ttgatttccc atacccactt cgggatgtgc gaggagagcc gctggaggcc ccagagcaga
4981 gcgtgccact gctgccactg ctggtggcag gggctgtctt tctactcatc atcttcatcc
5041 tgggtgtcat ggttgccagg cgaaagcgag aacacagcac cctctggttc cctgagggtt
5101 ttgcattaca caaggacata gctgctggcc acaagggccg gagggagcct gtgggacaag
5161 atgcactggg aatgaagaac atggccaagg gtgagagtct gatgggggag gtggtcacag
```

```
5221 acttgaatga ctcagaatgt ccagaggcca agagactgaa ggtagaggag ccgggcatgg
5281 gtgcagagga gcctgaggac tgtcgccagt ggacccaaca ccacctggtt gctgctgata
5341 tccgtgtggc accagccaca gcgctgactc ctcctcaggg agatgcagat gcagacggag
5401 tggatgtcaa cgtccgaggg cctgatggct tcaccccact tatgctggcc tccttctgtg
5461 ggggagccct ggagccgatg ccagctgagg aggatgaggc ggatgacaca tcagccagca
5521 ttatctcaga tctgatctgt caaggggccc agctcggggc acggactgac cgcactggcg
5581 agaccgccct gcatttggct gcccgctatg ctagagcgga tgcagccaag cgtctcctgg
5641 atgctggggc ggacaccaac gcccaggatc attcgggccg cacccccctg cacaccgcag
5701 tgacagctga tgcccagggt gtcttccaga ttctcatcag gaaccgctcc actgacctgg
5761 atgcccgaat ggcagatggc tctactgcac tgatcctggc agcccgcctg gcagtggagg
5821 gcatggtgga agagctcatc gccagccatg ccgatgtcaa tgcagtggat gagcttggga
5881 aatctgcctt acactgggct gcagctgtga acaacgtgga ggctaccttg gctctgctga
5941 aaaatggagc caacaaggac atgcaggaca gcaaggaaga gacgccgctg ttcttggccg
6001 ctcgggaggg cagctatgag gctgccaagc tgctgctgga tcatctcgcc aaccgggaga
6061 tcacagatca cttggacagg ctgccccggg acgtggccca ggagcggctg caccaggaca
6121 ttgtgcggtt gctggaccag cccagtggac ctcgaagtcc ctctggtccc catggcttag
6181 ggccattgct ctgcccacca ggggccttcc ttcctggcct caaagcggtg cagtctggga
6241 ccaagaagag caggaggcca cctggcaaga ccgggctggg gccacaggga actcgtggtc
6301 ggggcaagaa gctgacacta gcctgtccag gacctctggc agacagctct gtcacactgt
6361 caccggtgga ctctctggac tcaccacggc ctttcagtgg gccccctgct tcccctggag
6421 gcttcccctt ggagggcccc tatgccacca cggccaccgc ggtgtccttg gcacagctag
6481 gcgcaagtag ggcgggtcct ctggggcgcc agcctcctgg gggctgtgtg ctcagctttg
6541 gtctgctcaa tcctgtagct gttcccctcg actgggccag gctgcctcca cctgcccctc
6601 cagggccctc attcctgctg cccctggctc cgggacccca gttgctcaac ccaggagccc
6661 cagtttctcc ccaagagcgg cccccaccct acctggctgc tccaggacat ggagaggaat
6721 atcctgcagc aggaacccgc agtagcccca ccaaggcccg cttcctgcgg gttcccagcg
6781 agcatcctta tttgaccccg tctcctgagt ccccagagca ctgggccagc ccatcccccc
6841 catccctctc agactggtct gactcaacac ctagcccagc aactgctacc aatgccacag
6901 cctctggagc cctgcctgct cagccacacc ccatatctgt tccctccctc cctcagtccc
6961 agactcagct gggaccccaa ccagaagtta cccccaagag gcaggtgatg gcctaagttc
7021 ttggatttga ggggtgctga agtgacactc ctctatgact tctttcttcc tccttttaa
7081 tcttactctc atccctttct ctctgtccca gccttcctgc acctctctgt cttgtagtgt
7141 gaccaagttg gtcaccagcc cagacccccа gtcttccttt atttataatg ggtaggggct
7201 gaccttccac caccttggcc ccctaaggga tctgggacct ccttttgatc cctctccctg
7261 cctcaacttc ctccccccccc tctttctgct tctcattgtc tcacactctg acaagagtga
7321 gttattattt ttttcttttt tacattttgt atagagacaa attcatttaa acaaacttat
7381 tattattatt atttttttaca aaatatatat atggagttgc tcccttcccc ccgctgcaaa
7441 ttcctccagc gcccccgtgg ggctgagtct gtgggcccgt ttggccaatc cggactctgt
7501 gtactgagta cacagatatg actagggctc cacgtactga gtatgtggcc ctcgtatgta
7561 ccaagtagcc agccttgggc acaccctccc ctggggtcag gggacatttg ggagcctcct
7621 tcccctcccc attccccttc ctcacttcac tgcattccag ataagacgtg tagactcact
7681 gggaaagggg tcttgtctgc tcaaagcctc aactccaggc tcacctccca gagcctggct
7741 caccttttag ggcctggggt gggggggcac gtcaggggag atgtattttg tatgcattcc
7801 acttctaatt gtaaatacag ggcagaaggt gggagtggct ctccctcttc ctgttgttct
7861 cttggctcag cctgcctaat agaaatgttt ttaggctgtt tttgtaatat ggcacctggt
7921 cacagtcctt tgtagctgaa ttc
```

(จากฐานข้อมูล NCBI)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mNotch3 ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET-15b ทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ จากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *mNotch3* กับเวกเตอร์ที่อัตราส่วน 1:3(1st_BASE pET-mNotch3-1)



ลำดับกรดอะมิโนของ *pET-mNOTCH3*

ส่วนของเวกเตอร์ pET-15b ส่วนของชิ้นยีน mNotch3

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMPCHEDAICDTNPVSGRAICTCPPGFTGGACDQDVDE
CSIGANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCRNQATCLDRIG
QFTCICMAGFTGTYCEVDIDECQSSPCVNGGVCKDRVNGFSCTCPSGFSGPMCQLDV
DECASTPCRNGAKCVDQPDGYECRCAEGFEGTLCERNVDDCSPDP**AANKARKEAELA
AATAEQ**

ส่วนปลายของเวกเตอร์ pET-15b

Number of amino acids: 234

Molecular weight: 24696.3 Da

Theoretical pI: 4.78

Formula: $C_{1004}H_{1563}N_{311}O_{351}S_{34}$

Total number of atoms: 3263 (ออกแบบโดยฐานข้อมูล EXPASY)

6. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mNotch3 ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET-15b ทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์จากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *mNotch3* กับเวกเตอร์ที่อัตราส่วน 1:5(1st_BASE pET-mNotch3-2)

Start codon

```
nnggnncattccctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatataccatgggc
 X  X  H  S  L  -  K  -  F  C  L  T  L  R  R  R  Y  T  M  G
```

NdeI

```
agcagccatcatcatcatcacagcagcggcctggtgccgcgcggcagccatatgccc
 S  S  H  H  H  H  H  H  S  S  G  L  V  P  R  G  S  H  M  P
```

ชิ้นยีน *m*Notch3

```
tgccatgaggatgctatctgtgacacaaaccctgtgagtggccgggccatctgcacctgc
 C  H  E  D  A  I  C  D  T  N  P  V  S  G  R  A  I  C  T  C
ccacctggcttcactggaggggcatgtgaccaggatgtggatgagtgctcgattggtgcc
 P  P  G  F  T  G  G  A  C  D  Q  D  V  D  E  C  S  I  G  A
aacccctgtgaacatttgggtcggtgtgtgaatacacagggctcattcttgtgccaatgt
 N  P  C  E  H  L  G  R  C  V  N  T  Q  G  S  F  L  C  Q  C
ggccgtggctatactggacctcgctgtgagactgatgtcaatgagtgtctctccgggccc
 G  R  G  Y  T  G  P  R  C  E  T  D  V  N  E  C  L  S  G  P
tgccgcaaccaggccacgtgtcttgaccgaattggccagtttacttgcatctgcatggca
 C  R  N  Q  A  T  C  L  D  R  I  G  Q  F  T  C  I  C  M  A
```

```
ggcttcacagggacctactgtgaggtggacatcgacgaatgtcagagcagcccatgtgtc
 G   F   T   G   T   Y   C   E   V   D   I   D   E   C   Q   S   S   P   C   V
aatggtggtgtctgcaaggacagagtcaatggcttcagctgcacctgcccatcaggattc
 N   G   G   V   C   K   D   R   V   N   G   F   S   C   T   C   P   S   G   F
agtgggcccatgtgtcagctggatgtggatgagtgtgcaagcactccctgccggaatggt
 S   G   P   M   C   Q   L   D   V   D   E   C   A   S   T   P   C   R   N   G
gccaagtgtgtggaccagcctgacggctatgagtgtcgctgtgcagagggctttgagggc
 A   K   C   V   D   Q   P   D   G   Y   E   C   R   C   A   E   G   F   E   G
```

Bam HI pET-15b vector

```
actttgtgtgagcgaaacgtggatgactgctctccggatccggctgctaacaagcccgaa
 T   L   C   E   R   N   V   D   D   C   S   P   D   P   A   A   N   K   P   E
agaagctactnnc
 R   S   Y   X
```

(หมายเหตุ:ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mNotch3 ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET-15b ทางด้านโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์จากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *mNotch3* กับเวกเตอร์ที่อัตราส่วน 1:5 พบว่ามีการแปรรหัสเป็นโปรตีน mNotch3 ที่ผิดไป 1 กรดอะมิโนจาก S เปลี่ยนเป็น P จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้สร้างโปรตีน mNotch3 ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย)

7. แสดงการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนภายในเอคโตโดเมนของยีน mNotch3

Number of amino acids: 234

Molecular weight: 24696.3

Theoretical pI: 4.78

Amino acid composition:

Ala (A)	17	7.3%
Arg (R)	12	5.1%
Asn (N)	10	4.3%
Asp (D)	17	7.3%
Cys (C)	30	12.8%
Gln (Q)	9	3.8%
Glu (E)	15	6.4%
Gly (G)	26	11.1%
His (H)	9	3.8%
Ile (I)	6	2.6%
Leu (L)	8	3.4%
Lys (K)	4	1.7%
Met (M)	4	1.7%
Phe (F)	7	3.0%
Pro (P)	15	6.4%
Ser (S)	16	6.8%
Thr (T)	14	6.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	3	1.3%
Val (V)	12	5.1%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 32
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 16

Atomic composition:

Carbon	C	1004
Hydrogen	H	1563
Nitrogen	N	311
Oxygen	O	351
Sulfur	S	34

Formula: $C_{1004}H_{1563}N_{311}O_{351}S_{34}$
Total number of atoms: 3263

8. แผนที่ของยีน mNotch3 แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ฐานข้อมูล BioLabs, NEB cutter)

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	NdeI-BamHI	11-593	583
2	BamHI-(RightEnd)	594-698	105
3	(LeftEnd)-NdeI	1-10	10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง.1 รหัสหลุมของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1

plate	รหัสหลุมที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์และสร้าง hybridoma	จำนวนหลุมทั้งหมด
1	A3/A4/A5/A6/A7/A8/A9/A10/A11	87 หลุม
	B2/B3/B4/B5/B6/B7/B8/B9/B10/B11/B12	
	C1/C2/C3/C4/C5/C6/C7/C8/C9/C10/C11/C12	
	D1/D2/D3/D4/D5/D6/D7/D8/D9/D11/D12	
	E1/E2/E3/E4/E5/E6/E7/E8/E9/E10/E11/E12	
	F1/F2/F3/F4/F5/F6/F7/F8/F11/F12	
	G1/G2/G3/G4/G5/G6/G7/G8/G9/G10/G11	
	H2/H3/H4/H5/H6/H7/H8/H9/H10/H11	
2	A2/A3/A5/A6/A7/A8/A9/A10/A11/A12	68 หลุม
	B2/B3/B4/B5/B6/B7/B8/B9/B10/B11/B12	
	C2/C3/C4/C5/C6/C7/C8/C9/C12	
	D2/D3/D4/D5/D6/D7/D8/D9/D11/D12	
	E2/E4/E5/E6/E7/E8/E9/E12	
	F2/F4/F5/F6/F7/F8/F9/F12	
	G2/G3/G4/G5/G6/G7/G8/G9	
	H4/H5/H6	
3	A2/A3/A4/A5/A6/A7/A8/A9/A10/A11	96 หลุม
	B2/B3/B4/B5/B6/B7/B8/B9/B10/B11/B12	
	C1/C2/C3/C4/C5/C6/C7/C8/C9/C10/C11/C12	
	D1/D2/D3/D4/D5/D6/D7/D8/D9/D10/D11/D12	
	E1/E2/E3/E4/E5/E6/E7/E8/E9/E10/E11/E12	
	F1/F2/F3/F4/F5/F6/F7/F8/F10/F11/F12	
	G1/G2/G3/G4/G5/G6/G7/G8/G9/G10/G11	
	H2/H3/H4/H5/H6/H7/H8/H9/H10/H11	
4	A2/A3/A4/A5/A6/A7/A8/A9/A10/A11	86 หลุม
	B2/B3/B4/B5/B6/B7/B8/B9/B11/B12	
	C3/C4/C5/C6/C7/C8/C9/C10/C11/C12	
	D1/D2/D3/D4/D5/D6/D7/D8/D9/D11	
	E2/E3/E4/E5/E6/E7/E8/E9/E10/E11/E12	
	F1/F2/F4/F5/F6/F7/F8/F10/F11/F12	
	G2/G3/G4/G5/G6/G7/G8/G9/G10/G11	
	H2/H3/H4/H5/H6/H7/H8/H9/H10/H11	
5	A1/A2/A3/A4/A5/A6/A7/A8/A9	63 หลุม
	31/B2/B4/B5/B6/B8/B9	
	C1/C2/C3/C4/C6/C8/C9	
	D1/D2/D3/D4/D5/D6/D7/D8/D9	
	E1/E2/E3/E4/E6/E7/E8/E9	
	F1/F2/F3/F4/F6/F7/F8	
	G1/G3/G4/G5/G6/G7/G8/G9	
	H1/H3/H4/H5/H6/H7/H8/H9	
	รวม	400 หลุม

ตารางที่ ง.2 รหัสหลุมของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2

plate	รหัสหลุมที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์และสร้าง hybridoma	จำนวนหลุมทั้งหมด
1	B2/B3/B5/B7/B10/B12	46 หลุม
	C2/C3/C5/C6/C7/C8/C9/C10/C11/C12	
	D2/D3/D4/D5/D6/D7/D9/D11/D12	
	E3/E4/E5/E6/E7/E8/E11/E12	
	F3/F5/F6/F7/F10/F11/F12	
	G5/G6/G7/G8/G9	
	H8	
2	B2/B3/B7/B8/B10/B11	51 หลุม
	C2/C3/C6/C7/C8/C9/C10/C11	
	D2/D3/D4/D5/D6/D8/D9/D11	
	E1/E3/E4/E5/E6/E8/E9/E10/E11	
	F1/F2/F3/F4/F5/F6/F7/F8/F9/F10/F11	
	G2/G3/G4/G5/G7/G8/G10	
	H6/H11	
3	B1/B3/B4/B5/B6/B7/B10	51 หลุม
	C1/C3/C4/C5/C6/C7/C8/C9/C10/C11	
	D2/D4/D5/D6/D7/D10/D11	
	E1/E3/E4/E5/E7/E8/E10/E11	
	F1/F2/F3/F4/F5/F6/F7/F8/F10/F12	
	G1/G2/G3/G4/G6/G8/G9	
	H3/H6/H7/H11	
4	B3/B8	10 หลุม
	C3/C5	
	F3	
	G2/G3	
	H3/H4/H5	
	รวม	158 หลุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสิริภาภรณ์ ผุยกัน เกิดเมื่อวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดเพชรบูรณ์ สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย