



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตและทดสอบรีคอมบิแนนท์ scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2 ที่ผลิตโดยเซลล์ไลน์ CHO-K1 เพื่อยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ชื่อบิลิต นายธนวันต์ อาชาวงศ์ รหัสประจำตัว 6032322023

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตและทดสอบรีคอมบิแนนท์ scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2 ที่ผลิต
โดยเซลล์ไลน์ CHO-K1 เพื่อยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
Production of recombinant scFv-Fc antibody to NOTCH1 and NOTCH2
from CHO-K1 cell line and their Notch signaling inhibitory ability in
leukemia cell line

ชื่อนิสิต นายธนวันต์ อาชาวงศ์

เลขประจำตัว 6032322023

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


หัวข้อโครงการ การผลิตและทดสอบรีคอมบิแนนท์ scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2 ที่ผลิตโดยเซลล์ไลน์ CHO-K1 เพื่อยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

โดย นายชนวันต์ อาชาวงศ์ เลขประจำตัว 6032322023


อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

ปีการศึกษา 2563

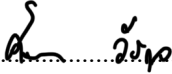
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312449 โครงการวิทยาศาสตร์

 หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงการ

 อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล)

 กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิตา วีรกุล)

รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การผลิตและทดสอบรีคอมบิแนนท์ scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2 ที่ผลิตโดยเซลล์ไลน์ CHO-K1 เพื่อยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

(Production of recombinant scFv-Fc antibody to NOTCH1 and NOTCH2 from CHO-K1 cell line and their Notch signaling inhibitory ability in leukemia cell line)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

นิสิตในโครงการ

นายธนวันต์ อาชาวงศ์

รหัสประจำตัวนิสิต 6032322023

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การผลิตและทดสอบรีคอมบิแนนท์ scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2 ที่ผลิตโดยเซลล์ไลน์ CHO-K1 เพื่อยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว	
นิสิตเสนอโครงการ	นายธนวันต์ อาชาวงศ์	รหัสนิสิต 6032322023
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ	
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563	

บทคัดย่อ

วิถีสัญญาณ Notch เป็นวิถีสัญญาณภายในเซลล์ที่มีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ การเพิ่มจำนวน และการตายของเซลล์ ความผิดปกติของการส่งวิถีสัญญาณ Notch นำไปสู่การเกิดมะเร็งหลายชนิด โดยพบการกลายพันธุ์ของยีนที่แสดงออกโปรตีน NOTCH1 มากกว่า 50% ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell (T cell acute lymphoblastic leukemia; T-ALL) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกลายพันธุ์ของยีนแสดงออกโปรตีน HD พบมากกว่า 40% ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell ซึ่งส่งผลให้วิถีสัญญาณ Notch เพิ่มขึ้นอย่างมาก หนึ่งในวิธียับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ที่เพิ่มขึ้นอย่างมากระยะนี้คือการใช้ gamma secretase inhibitor (GSI) อย่างไรก็ตามการใช้ GSI ก็ยังมีข้อเสียคือการมีสับสเตรทหลายชนิด (pan-inhibitor activity) เช่น APP ERBBP4 E-cadherin ephrinB2 และ CD44 เป็นต้น จึงเป็นสาเหตุที่การรักษาด้วย GSI ผลข้างเคียงตามมา การใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ที่มีความจำเพาะอย่างมากต่อ negative regulatory region (NRR) ของ NOTCH1 และ NOTCH2 (α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc) จึงเป็นทางเลือกที่มีความหวังในการรักษาโรค T-ALL ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ยีน *NOTCH* การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดจากเซลล์ไลน์ CHO-K1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการรักษาในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell ประกอบไปด้วยเซลล์ไลน์ Molt4 และ Jurkat ผลพบว่าเซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่ผลิต α N1 scFv-Fc and α N2 scFv-Fc มีผลิตภาพจำเพาะ 16.20 และ 28.96 พิโคกรัมต่อเซลล์ต่อวัน ภายใน 7 วันของการผลิตตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพันธ์ภาพถูกตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ Western Blot นอกจากนี้ Molt4 และ Jurkat ยังตรวจพบการแสดงออกของ NOTCH1 และ NOTCH2 ซึ่งบ่งบอกถึงการส่งวิถีสัญญาณ Notch ภายในเซลล์ การทดลองที่ควรทำเพิ่มเติมคือการลดระดับของวิถีสัญญาณ Notch การลดความเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิด (cancer stemness) และการตายของเซลล์ในเซลล์ไลน์ Molt4 และ Jurkat จากการให้ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc จำเป็นต้องถูกศึกษาในอนาคต การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดีสามารถนำไปใช้ในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการใช้ภูมิคุ้มกันบำบัดในการรักษาโรค T-ALL

Project title	Production of recombinant scFv-Fc antibody to NOTCH1 and NOTCH2 from CHO-K1 cell line and their Notch signaling inhibitory ability in leukemia cell line
Name of student	Thanawan Achawong ID No. 6032322023
Advisor	Prof. Tanapat Palaga
Department	Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Notch signaling is a highly conserved cellular signaling pathway in mammals which involves in cellular differentiation, proliferation and cell death. Dysfunctional Notch signaling is also oncogenic that drives various cancers. More than 50% of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) patients harbor mutation in NOTCH1. In particular, mutation in the HD domain (at least 40% of T-ALL patients) results in hyperactivated Notch signaling. One of the effective approaches against the Notch gain-of-function mutation is gamma secretase inhibitor (GSI) treatment. However, gamma secretase has many substrates including APP, ERBBP4, E-cadherin, ephrinB2 and CD44, which may cause undesirable side effect by GSI treatment. The use of highly specific scFv-Fc antibodies targeting negative regulatory region (NRR) of NOTCH1 and NOTCH2, α N1 scFv-Fc and α N2 scFv-Fc, is a promising alternative approach in treating T-ALL with *NOTCH* mutation. In this study, these recombinant antibodies were produced from stable CHO-K1 cell line with batch cultivation in order to test the efficacy against leukemic cell lines including Molt4 and Jurkat. The results showed that the specific productivity of α N1 scFv-Fc and α N2 scFv-Fc CHO-K1 were 16.20 and 28.96 pg/(cell*day) within 7 days of culture, respectively. Purification steps using affinity chromatography results in scFv-Fc on SDS-PAGE and Western Blot. Both Molt4 and Jurkat express NOTCH1 and NOTCH2 indicating that Notch signaling is activated. For further experiment, decreased Notch signaling, leukemic cancer stemness and cell viability by α N1 scFv-Fc and α N2 scFv-Fc treated Molt4 and Jurkat will be evaluated. Study will provide evidence whether recombinant scFv-Fc specific for Notch NRR can be used to successfully inhibit Notch signaling in T-ALL cell lines. The result will provide additional immunotherapeutic choices for T-ALL treatment.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไม่ได้หากขาดการสนับสนุนจากทุกฝ่าย โดยผู้อยู่เบื้องหลังความสำเร็จที่สำคัญที่สุดคือ ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้มอบความรู้ ให้คำปรึกษา ผู้เปิดมุมมอง และเป็นผู้ให้โอกาสกับเด็กน้อยอย่างผมได้รับโอกาสในการพัฒนาตนเอง ได้ทำตามความฝัน ได้รับประสบการณ์ดี ๆ ที่ไม่สามารถประเมินค่าได้ จนส่งผลสำเร็จให้โครงการวิจัยลุล่วงไปด้วยดี ด้วยโอกาสนี้จึงอยากขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ธนาภัทร ปาลกะ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ถ่ายทอดความรู้ ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการวิจัยตลอดจนผู้ทำวิจัยเอง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้อำนวยความสะดวกให้การทำงานวิจัยดำเนินไปได้อย่างราบรื่น

ขอขอบคุณทุนโปรแกรมเกียรติดีนิยม และทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในโครงการ

ขอกราบขอบพระคุณสมาชิกในแลป 2015 ที่เป็นทั้งที่ปรึกษา เป็นหน่วยให้กำลังใจ เป็นผู้ช่วยแก้ปัญหา และเป็นผู้ให้ความรู้คำแนะนำต่าง ๆ ทำให้โครงการวิจัยสำเร็จด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณครอบครัว ที่เข้าใจและสนับสนุนการเลือกทางเดินของชีวิต อยู่เบื้องหลังและผลักดัน ทำให้ผมได้ทำตามสิ่งที่ตัวเองต้องการตลอดมา

ธนวันต์ อาชาวงศ์

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ตัวรับสัญญาณ NOTCH ลิแกนด์ และวิถีสัญญาณ Notch	1
1.2 วิถีสัญญาณ Notch และบทบาทในการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell	3
1.3 การรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell โดยการใช้ γ -secretase inhibitor (GSI)	5
1.4 รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc	6
1.5 การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี	7
1.6 เซลล์มะเร็งต้นกำเนิด (cancer stem cell; CSC)	7
วัตถุประสงค์ของโครงการ	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการทดลอง	10
2.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	10
2.2 วิธีดำเนินการทดลอง	13
บทที่ 3 ผลการทดลอง	21
3.1 การทรานสเฟกชันเซลล์ไลน์ CHO-K1 เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2	21
3.2 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ (affinity column chromatography)	23
3.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของ NOTCH1 และ NOTCH2 ในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-ALL	24
บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก ก	35
ภาคผนวก ข	37

เรื่อง

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ง

หน้า

43

49

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 โพรตีนและการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ CSC ของมะเร็งเม็ดเลือดขาว	8
ตารางที่ 2 ตารางแสดงข้อมูลชนิด ประเภทการใช้งาน ความเข้มข้นที่ใช้งาน และบริษัทที่ผลิตแอนติบอดีที่ใช้ในโครงการ	17
ตารางที่ 3 ตารางแสดงข้อมูลของ primer ที่ใช้ในโครงการ	20
ตารางที่ ข1 ตารางแสดงสูตรการเตรียม Separating gel ที่ความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์	38
ตารางที่ ข2 ตารางแสดงสูตรการเตรียม Stacking gel	39
ตารางที่ ง1 ตารางแสดงผลการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟคชัน	51

สารบัญรูป

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 แสดงตัวรับสัญญาณ NOTCH ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mNOTCH1-4) และ <i>Drosophila</i> (dNotch) ลิแกนด์ของ NOTCH ชนิดต่าง ๆ	2
รูปที่ 2 แผนภาพการส่งสัญญาณของวิถีสัญญาณ Notch	3
รูปที่ 3 ตำแหน่งที่พบว่ามีการกลายพันธุ์บนโปรตีน NOTCH1 ในมะเร็งชนิด T-ALL	5
รูปที่ 4 scFv-Fc เปรียบเทียบกับ IgG และ recombinant antibody อื่น ๆ ในด้านขนาดและค่าครึ่งชีวิต	6
รูปที่ 5 แผนภาพแสดงแผนการศึกษาของโครงการ	15
รูปที่ 6 ผลการแสดงออกของยีนผลิตภัณฑ์คอมบิแนนท์แอนติบอดีในเซลล์ไลน์ CHO-K1	21
รูปที่ 7 การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ไลน์ CHO-K1	22
รูปที่ 8 ความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีจากเซลล์ไลน์ CHO-K1	22
รูปที่ 9 การแสดงออกของ NOTCH1 และ NOTCH2 ในเซลล์ไลน์ Molt4 และ Jurkat	24
รูปที่ 10 ผล SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์	25
รูปที่ 11 ผล Western Blot แสดงคุณภาพของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์	26
รูปที่ ง1 รูปแสดงการตายของเซลล์ไลน์ CHO-K1 ใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้ยา G418 ความเข้มข้นต่าง ๆ	50
รูปที่ ง2 รูปแสดงการวิเคราะห์คุณภาพของพลาสมิดหลังการสกัดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	53
รูปที่ ง3 แสดงความหนาแน่นของเซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่มีชีวิตซึ่งสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีได้	53
รูปที่ ง4 รูปแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนต่อการดำเนินไปของการทำให้บริสุทธิ์ของ α N1 scFv-Fc	54
รูปที่ ง5 รูปแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนต่อการดำเนินไปของการทำให้บริสุทธิ์ของ α N2 scFv-Fc	55
รูปที่ ง6 รูปแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนต่อการดำเนินไปของการทำให้บริสุทธิ์ของ NC	56
รูปที่ ง7 แสดงผล Western Blot ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ผ่านการ dialysis และทำให้เข้มข้น	57

บทที่ 1

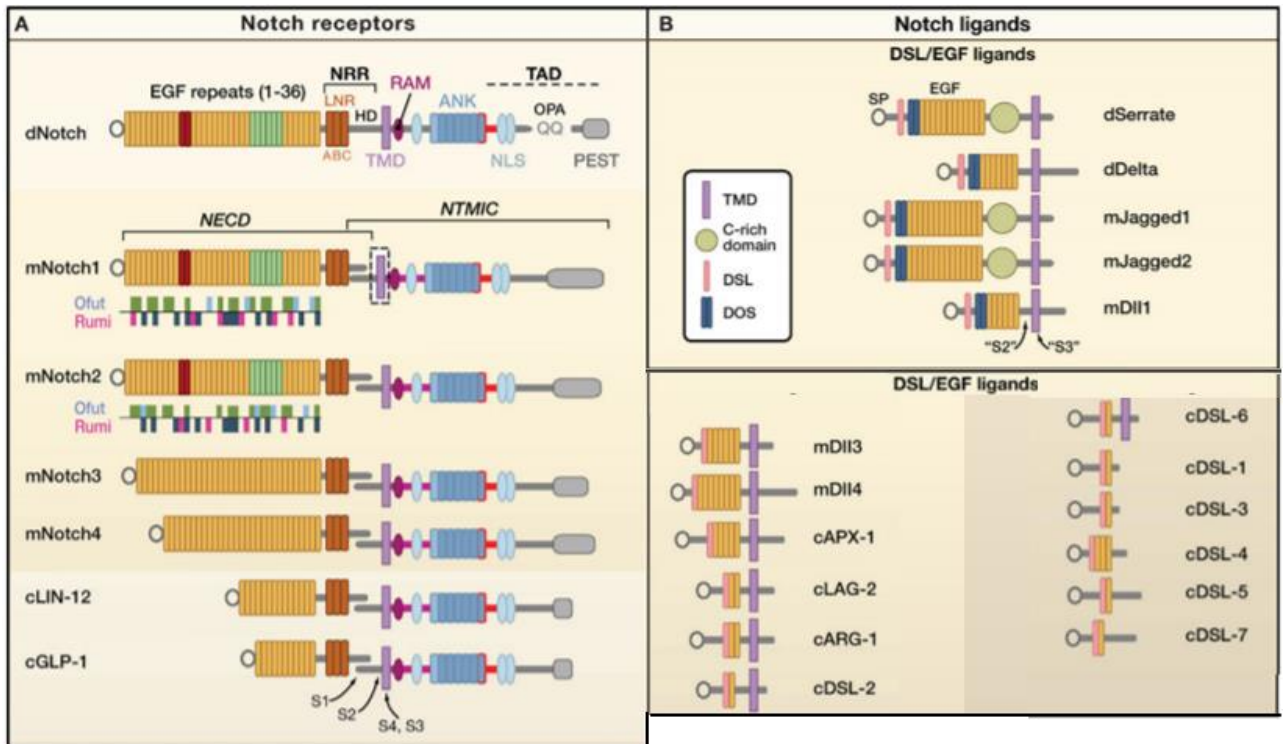
บทนำ

มะเร็งเป็นเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับที่ 6 ของโลกในการจัดอันดับของ World Health Organization (WHO) ในปี 2019 (WHO, 2021) โดยมะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือ Leukemia เป็นมะเร็งที่ถูกจัดอันดับให้เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับ 9 ของมะเร็งทั้งหมด (Roser & Ritchie, 2015) จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าโดยโรค acute lymphoblastic leukemia (ALL) เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีอัตราการรอดหลังจาก 5 ปีที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็ง (5-year survival rate) ของคนที่มีอายุตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไปเพียงแค่ 38% เท่านั้น (Statistics, 2021) ด้วยเหตุนี้ความเข้าใจในโรค ALL ซึ่งนำไปสู่วิธีการรักษาที่มีความถูกต้องแม่นยำจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ชีวิตความเป็นอยู่ของผู้ป่วยดีขึ้น

1.1 ตัวรับสัญญาณ NOTCH ลิแกนด์ และวิถีสัญญาณ Notch

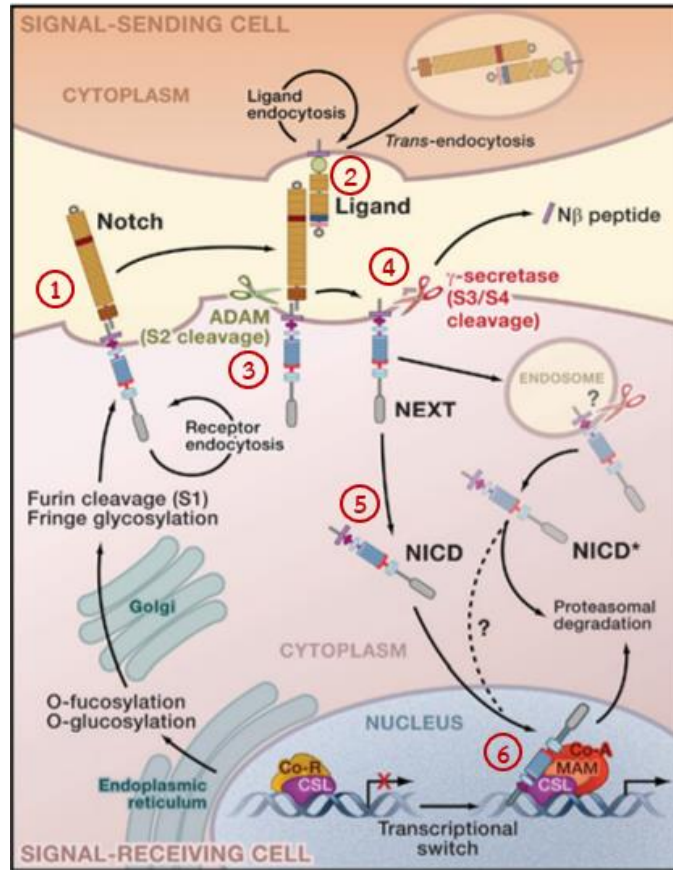
ใน *Drosophila melanogaster* มีตัวรับสัญญาณ NOTCH (NOTCH receptor) 1 ประเภทซึ่งมีลิแกนด์ของ NOTCH 2 ประเภทคือ Delta และ Serrate ในขณะที่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี NOTCH 4 ประเภทได้แก่ NOTCH1 NOTCH2 NOTCH3 และ NOTCH4 ซึ่งมีลิแกนด์หลายประเภทได้แก่ Delta-like ประกอบด้วย DLL1 DLL3 และ DLL4 และมี Jagged ได้แก่ JAG1 และ JAG2

ตัวรับสัญญาณ Notch ประกอบไปด้วยส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ซึ่งที่ปลายด้านนอกสุดเป็นปลาย amino เรียกว่า amino-terminal (NT) domain ถัดจากนั้นเป็นส่วน EGF ซ้ำกัน แต่จะมีส่วนที่เป็น EGF 11-12 โมเลกุล เป็นตำแหน่งที่มีปฏิสัมพันธ์กับลิแกนด์ของ Notch ตามด้วย Heterodimer ซึ่งมี 2 ส่วน เรียกว่า HDN และ HDC จับอยู่กับ cysteine-rich Lin12/Notch repeats (LNRs) ทั้ง Heterodimer และ LNRs รวมกันเรียกว่า negative regulatory region (NRR) ซึ่งเป็นตำแหน่งตัดของ ADAM proteases (S2 cleavage) ถัดจากนั้นเป็นตำแหน่ง transmembrane intercellular fragment ซึ่งเป็นตำแหน่งตัดของ γ -secretase (S3 cleavage) ถัดจากนั้นเป็นส่วนที่เรียกว่า Notch intracellular domain (NICD) ประกอบไปด้วย RBPJ-associated module (RAM), ankyrin (ANK) ซ้ำกันหลายโมเลกุล และ PEST domain อยู่ที่ปลาย carboxyl terminal ตามลำดับ (Bray, 2016)



รูปที่ 1 ตัวรับสัญญาณ NOTCH ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mNOTCH1-4) และ *Drosophila* (dNotch) ลิแกนด์ของ NOTCH ชนิดต่าง ๆ ดัดแปลงจาก (Kopan & Ilagan, 2009)

วิถีสัญญาณ Notch เป็นวิถีสัญญาณที่เกิดจากการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ที่มีตัวรับสัญญาณ NOTCH และเซลล์ที่มีลิแกนด์ของ NOTCH อยู่บนผิวเซลล์ ซึ่งข้อมูลการจับกันของลิแกนด์และตัวรับ NOTCH ถูกเขียนอยู่ในบทความของ Handford P. A. และคณะ (Handford, Korona, Suckling, Redfield, & Lea, 2018) การจับกันของลิแกนด์ของ NOTCH และตัวรับสัญญาณ NOTCH ทำให้เกิดการตัดของตัวรับสัญญาณ NOTCH สองครั้ง การตัดในครั้งแรกเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ ADAM-metalloproteases ตัดบริเวณ S2 cleavage การตัดครั้งที่ 2 เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ γ -secretase ทำให้เกิดการตัดบริเวณ S3 cleavage ซึ่งจะทำให้เกิดการปลดปล่อย Notch intracellular domain (NICD) ให้เคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวร่วมกระตุ้น (coactivator) จับกับ DNA binding protein RBP-J และทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่มี RBP-J binding site การแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับวิถีสัญญาณ Notch ให้ผลลัพธ์หลากหลายแบบ ยกตัวอย่างเช่น กลุ่มของยีน Hairy/enhancer of split (Hes) เป็นยีนที่มีการอนุรักษ์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ไว้ (Borggreve & Oswald, 2009) หรือกลุ่มของ Hey1 และ Hey2 ที่มีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์ไลน์หลายชนิดโดยการกระตุ้นจาก NICD (Iso et al., 2001) ดังนั้นเราจึงสามารถตรวจสอบวิถีสัญญาณ Notch ได้จากการติดตามการแสดงออกของยีนเหล่านี้ (Sharma et al., 2015)



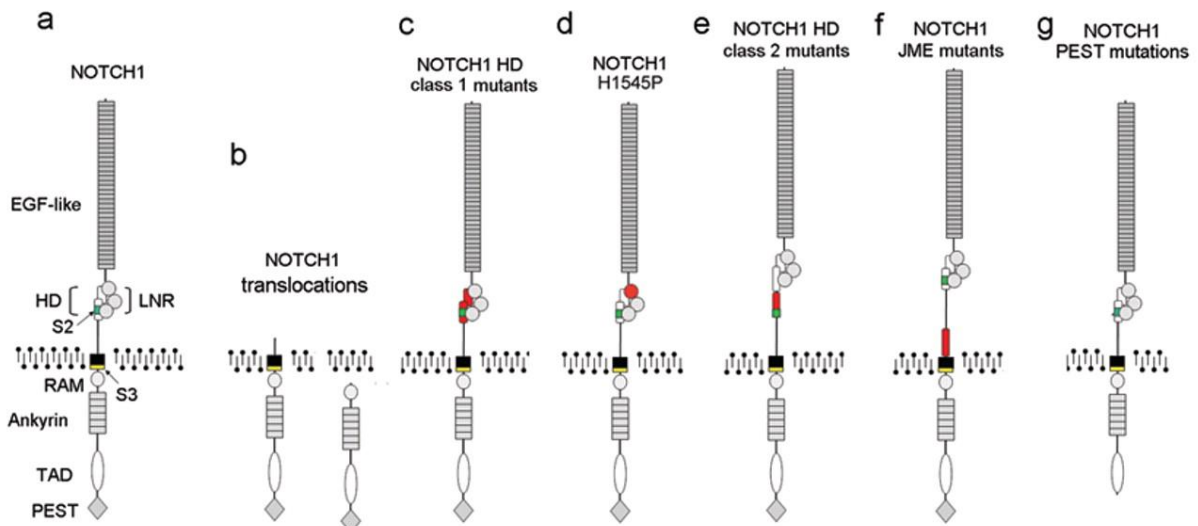
รูปที่ 2 แผนภาพการส่งสัญญาณของวิถีสัญญาณ Notch ดัดแปลงจาก (Kopan & Ilagan, 2009)

1.2 วิถีสัญญาณ Notch และบทบาทในการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell

หน้าที่อันหลากหลายของ Notch ที่มีความเกี่ยวข้องกับพัฒนาการ (development) ของอวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทำให้ความผิดปกติของวิถีสัญญาณ Notch เพิ่มโอกาสในการก่อโรคและมะเร็งได้ การกลายพันธุ์ของตัวรับสัญญาณ Notch และลิแกนด์ของ Notch ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในวิถีสัญญาณ Notch สามารถก่อโรคได้ เช่น Candasil (เกิดจากการกลายของ *NOTCH3*) หรือ Alagille syndrome (เกิดการกลายของ *JAGGED1*) และยังมีอาการกลายพันธุ์ของยีนอื่นที่ไม่ใช่ตัวรับสัญญาณ Notch และลิแกนด์ แต่สามารถทำให้เกิดความผิดปกติของวิถีสัญญาณ Notch เช่น Duchenne muscular dystrophy (DMD) ในขณะที่วิถีสัญญาณ Notch ก็มีบทบาทสำคัญกับการก่อมะเร็งด้วย ซึ่งการกลายของ *NOTCH* สามารถทำให้ *NOTCH* ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor gene กล่าวคือมีการส่งสัญญาณ Notch แบบ hypoactivated signaling หรือทำหน้าที่เป็น oncogene กล่าวคือมีการส่งสัญญาณ Notch แบบ hyperactivated signaling ตัวอย่างของมะเร็งที่เกิดจากการกลายของ *NOTCH* เช่น มะเร็งเต้านม (breast cancer) มะเร็งตับ (liver cancer) เนื้องอกในสมอง (brain tumors) (Siebel & Lendahl, 2017) เป็นต้น

ในส่วนของการกลายพันธุ์ในยีน *NOTCH* ซึ่งส่งผลต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) พบว่ามากกว่า 50% ของผู้ป่วยมีการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH1* แบบ gain-of-function (Weng et al., 2004) โดยการกลายพันธุ์ของ *NOTCH1* ที่ทำให้วิถีสัญญาณ Notch เป็น

แบบ gain-of-function เกิดขึ้นได้หลายบริเวณดังรูปที่ 3 ซึ่งแสดง wild type NOTCH ในรูปที่ 3a และแสดง NOTCH ที่เกิดจากการกลายไวดังรูปที่ 3b-g หากแบ่งประเภทตามวิธีการทำให้เกิดวิถีสัญญาณ Notch สามารถแบ่งลักษณะการกลายของ NOTCH ได้เป็น 2 ประเภทหลักได้แก่ 1. การทำให้เกิดวิถีสัญญาณโดยไม่จำเป็นต้องมี ligand มาจับ (ligand-independent NOTCH activation) 2. การทำให้เกิดวิถีสัญญาณโดยยังจำเป็นต้องมี ligand มาจับ (ligand-dependent NOTCH activation) ในประเภทของการกลายแรกสามารถแบ่งประเภทของการกลายออกได้เป็น 2 ประเภทดังนี้ ประเภทของการกลายที่ไม่จำเป็นต้องใช้ metalloprotease enzyme และ Gamma-secretase ในการเริ่มต้นของการเกิดสัญญาณ Notch โดยการกลายในรูปแบบนี้เกิดจากการแบบ NOTCH1 translocations ของ *NOTCH1* ในส่วน NOTCH extracellular domain และ transmembrane NOTCH จาก Chromosome ที่ 7 ไปยัง Chromosome ที่ 9 t(7,9) ซึ่งทำให้เซลล์ผลิต Intracellular domain NOTCH ออกมาตลอดเวลาดังรูปที่ 3b ประเภทต่อมาคือการกลายที่ไม่จำเป็นต้องใช้ metalloprotease enzyme ในการเริ่มสัญญาณ Notch ซึ่งมีการกลายหลายลักษณะที่สามารถให้เกิดการส่งสัญญาณในลักษณะนี้ได้ การกลายลักษณะแรกคือการกลายแบบ Translocation ที่ได้กล่าวไปข้างต้นแต่ยังเหลือส่วน transmembrane NOTCH และ NOTCH intracellular domain อยู่บน chromosome ที่ 7 อยู่ดังรูปที่ 3b การกลายลักษณะต่อมาคือการกลายที่บริเวณ NOTCH1 heterodimer domain การกลายแบบ HD class 1 (HD1) รูปที่ 3c คือการกลายที่แบบ substitution deletion หรือ insertion ที่ บริเวณ LNR domain ซึ่งโดยปกติ ทำให้ที่ ปกป้อง HD domain ไม่ให้ ถูกตัดด้วย metalloprotease ในขณะที่ไม่มี ligand มาจับ การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่งส่งผลถึงสเถียรภาพของ LNR domain ในขณะที่การกลายของ HD class 2 (HD2) คือการกลายแบบ insertion ของ HD domain ส่วนปลายจนทำให้ S2 cleavage site ไม่ถูกปกป้องโดย LNR domain และการกลายลักษณะที่ 3 เป็นการกลายที่บริเวณ HD domain ที่ถูกค้นพบล่าสุดโดย Gordon W.R. และคณะ (Gordon et al., 2009) เป็นการกลายที่บริเวณ LNR domain เรียกการกลายชนิดนี้ว่า *NOTCH1 H1545P* รูปที่ 3d ซึ่งสามารถทำให้เกิด ligand-independent NOTCH activation ได้เช่นเดียวกันแต่กลไกยังไม่เป็นที่แน่ชัด การกลายในประเภทต่อมาคือ ligand-dependent NOTCH activation การกลายประเภทนี้ประกอบไปด้วยการกลาย 2 ลักษณะ การกลายลักษณะแรกคือ การกลายที่ *JME NOTCH1* alleles ดังรูปที่ 3f ทำให้บริเวณ LNR-HD complex ห่างออกไปจาก transmembrane NOTCH มากขึ้น การส่งสัญญาณ Notch ใน NOTCH ลักษณะนี้เกิดขึ้นตามขั้นตอนปกติ แต่พบว่าวิถีสัญญาณ NOTCH1 มีปริมาณมากผิดปกติ (Ferrando, 2009) การกลายแบบสุดท้ายคือการกลายแบบ nonsense หรือ frameshift mutation ทำให้ Fbw7 และ WSSSSP ที่บริเวณปลาย Carboxyl ของ PEST domain หายไปดังรูปที่ 3g โดยปกติแล้ว Fbw7 จะถูกเติมหมู่ phosphate ด้วย C-CDK8 ที่ อยู่ใน nucleus การ phosphorylation นี้ ทำให้ NOTCH intracellular domain เกิด proteasomal degradation ซึ่งเป็นกลไกของเซลล์ในการป้องกันไม่ให้วิถีสัญญาณ Notch มากเกินระดับปกติ การหายไปของ Fbw7 จึงทำให้เกิด Notch gain-of-function ตามมา (Ferrando, 2009; N. Li et al., 2014; Wang, Zang, Liu, & Aster, 2015)



รูปที่ 3 ตำแหน่งที่พบว่ามี การกลายพันธุ์บนโปรตีน NOTCH1 ในมะเร็งชนิด T-ALL โดยสีเขียว แสดงถึงตำแหน่งตัด S2 ด้วยเอนไซม์ Metalloprotease ซึ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นของการส่งสัญญาณ Notch สีแดงแสดงถึงตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์บนตัวรับสัญญาณ Notch (Ferrando, 2009)

1.3 การรักษา มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell โดยการ ใช้ γ -secretase inhibitor (GSI)

การยับยั้ง γ -secretase ถูกศึกษาเนื่องจากต้องการที่จะยับยั้งการตัด amyloid β -protein precursor (APP) ให้กลายเป็น amyloid β -protein ซึ่งเป็นความสามารถของ γ -secretase เพื่อที่จะรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Selkoe & Kopan, 2003) การใช้ GSI ยังถูกนำมาปรับใช้ในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch โดยยับยั้งไม่ให้เกิดการตัดที่บริเวณ S3 cleavage และทำให้วัฏจักรของเซลล์ไลน์ T-ALL หยุดอยู่ที่ G₀/G₁ (G₀/G₁ arrest) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ไลน์ T-ALL ดังนั้น GSI จึงถูกใช้ในการศึกษาการรักษา มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการส่งสัญญาณ Notch อย่างแพร่หลาย (Lopez-Nieva et al., 2021)

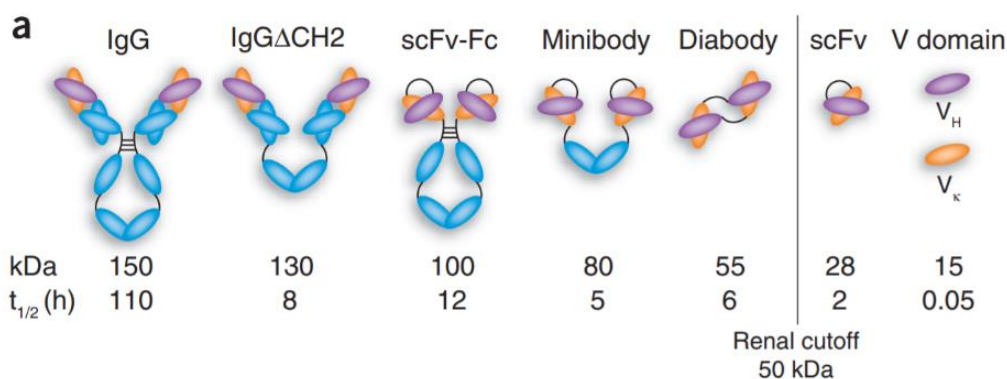
แต่การศึกษาการใช้ GSI ใน clinical trial ก็พบกับปัญหาจนต้องหยุดการศึกษากลางคัน ปัญหาแรก ที่พบคือผลกระทบทที่ตามมา (side effect) หลังจากที่ผู้ป่วยได้รับ GSI ในการรักษา มะเร็ง โดย side effect ที่พบเป็นครั้งแรกที่มีการรายงานในปี 2006 คือการพบการติดเชื้อและการเกิดมะเร็งผิวหนังหลังจากการใช้ยา (Staal & Langerak, 2008) รวมถึงมีรายงานว่าผู้ป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วง (diarrhea) (Deangelo et al.) และมีผลกระทบต่อ การพัฒนาของเซลล์เยื่อบุลำไส้ (intestinal epithelial differentiation) (Fre et al., 2005) ปัญหาต่อมาคือการที่ GSI สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนได้หลายชนิดในร่างกาย (Pan-GSI inhibitors) ตัวอย่างของโปรตีนที่เป็น substrate ของ GSI เช่น APP ERBBP4 E-cadherin ephrinB2 และ CD44 เป็นต้น ซึ่งการยับยั้งดังกล่าวย่อมเกิดผลกระทบต่อร่างกายตามมาเช่นการเกิดมะเร็ง (Golde, Koo, Felsenstein, Osborne, & Miele, 2013; Kopan & Ilagan, 2004; Lopez-Nieva et al., 2021; Ran et al., 2017) ด้วยปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นนี้การรักษา มะเร็งที่มีความเกี่ยวข้องกับ NOTCH1 gain of function

จึงจำเป็นจะต้องค้นหาโมเลกุลใหม่ ๆ ที่สามารถยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch ได้ แต่ไม่สามารถจับกับ substrate อื่นในร่างกาย หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่ามีโปรตีนเป้าหมาย (target) เฉพาะแค่โปรตีนในวิถีสัญญาณ Notch เท่านั้น

1.4 รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด scFv-Fc

ความก้าวหน้าของรีคอมบิแนนท์เทคโนโลยีทำให้มีการพัฒนาแอนติบอดีสำหรับภูมิคุ้มกันบำบัดตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันตัวอย่างที่เห็นได้อย่างชัดเจนได้แก่ chimerization และ humanization ในปัจจุบันมีการตัดต่อแอนติบอดีเพื่อทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็กลงแต่ยังคงความสามารถในการจับอย่างจำเพาะไว้อยู่

มีโมเลกุลหลายประเภทที่เกิดขึ้นจากรีคอมบิแนนท์เทคโนโลยีดังรูปที่ 4 เช่น scFv มีขนาดประมาณ 28 kDa หรือ Fab ที่มีขนาดประมาณ 55 kDa ในขณะที่ อิมมูโนโกลบูลินคลาสจี (IgG) มีขนาดประมาณ 150 kDa ทำให้ scFv หรือรีคอมบิแนนท์โมเลกุลที่มีขนาดเล็กสามารถแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อได้ดีกว่า IgG อย่างไรก็ตาม IgG มีครึ่งชีวิตในเซรุ่มนานกว่าเพราะมีส่วน Fc ซึ่งสามารถจับอย่างจำเพาะกับ neonatal Fc receptor (FcRn) ในขณะที่ scFv-Fc มีขนาดประมาณ 100 kDa เป็นรีคอมบิแนนท์โมเลกุลที่สามารถแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อในปริมาณมากพร้อมทั้งมีครึ่งชีวิตนานกว่ารีคอมบิแนนท์โมเลกุลชนิดอื่นเพราะมีส่วน Fc อยู่ในโมเลกุลด้วย (Holliger & Hudson, 2005)



รูปที่ 4 scFv-Fc เปรียบเทียบกับ IgG และ recombinant antibody อื่น ๆ ในด้านขนาดและค่าครึ่งชีวิต (Holliger & Hudson, 2005)

ก่อนหน้านี้มีรายงานของการสร้าง scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2 (α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc) ซึ่งมีความจำเพาะอย่างมากกับบริเวณ NRR1 และ NRR2 ทั้งในเซลล์ของหนูและของคนตามลำดับ (Falk et al., 2012) การศึกษาในครั้งนี้จึงสนใจที่จะนำ scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2 ใช้เป็นโมเดลในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว

1.5 การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี

เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมถูกใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมผลิตยาเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เพราะว่าเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมสามารถแปลรหัส (translation) แล้วตัดแต่ง (modification) ให้ได้โปรตีนที่มีความเสถียรและมีประสิทธิภาพ (Le Fourn, Girod, Buceta, Regamey, & Mermoud, 2014)

ตัวอย่างของเซลล์ไลน์ที่โดยปกติมักจะถูกใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ประกอบไปด้วยเซลล์ไลน์ NS0, SP2/0 ซึ่งเป็น murine lymphoid cell lines เซลล์ไลน์ murine hybridoma และ Chinese hamster ovary (CHO) (Chu & Robinson, 2001; Wurm, 2004) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ไลน์ CHO เป็นเซลล์ไลน์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากเป็นเพราะประสิทธิภาพในการถอดรหัส (transcription) (Jiang, Huang, & Sharfstein, 2006) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงนำ CHO-K1 มาใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี

1.6 เซลล์มะเร็งต้นกำเนิด (cancer stem cell; CSC)

ภายในก้อนมะเร็งประกอบไปด้วยเซลล์หลายชนิดซึ่งมีลักษณะ การทำงานที่ไม่เหมือนกันจึงทำให้เกิดความหลากหลายภายในก้อนมะเร็ง เซลล์มะเร็งต้นกำเนิดเป็นหนึ่งในประชากรของก้อนมะเร็งนั้นมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวซึ่งเป็นสาเหตุของการเจริญของมะเร็ง (tumor progression) และการเจริญอีกครั้งหลังจากได้รับการรักษา (disease recurrence) ด้วยเหตุนี้การพัฒนาวิธีการรักษาซึ่งมุ่งเน้นไปที่การกำจัด CSC เป็นที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน (Zhao, Li, & Zhang, 2017)

Leukemia เป็นมะเร็งที่สามารถพบ CSC ได้เรียกว่า Leukemia stem cell (LSC) โดยรายงานของ Gentles และคณะได้ศึกษา LSC จากผู้ป่วย acute myelogenous leukemia (AML) จำนวน 1,047 คนพบ 52 ยีนที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่าง LSC และ Leukemia progenitor cell (LPC) ซึ่งสามารถใช้ในการจากจัดจำแนกผู้ป่วยโดยคำนวณ LSC score จากปริมาณการแสดงออกของ 52 ยีนนั้น โดยผู้ป่วยที่มี LSC score สูงอัตราการเสียชีวิตจึงสูงและมี LSC score ต่ำอัตราการเสียชีวิตจึงต่ำ (Gentles, Plevritis, Majeti, & Alizadeh, 2010) แม้ว่า AML จะมีความเกี่ยวข้องกับ LSC แต่วิถีสัญญาณ Notch กลับไม่มีความจำเป็นกับการเจริญของเซลล์ AML (Tohda, 2014) ในขณะที่ T-ALL ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของ NOTCH1 ทำให้มีการส่งสัญญาณมากเกินไป (gain of function) และมีรายงานก่อนหน้านี้ว่า การลดการส่งสัญญาณ Notch โดยใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับบริเวณ NRR ของ Notch1 สามารถลดประชากรของ LSC ในผู้ป่วย T-ALL ได้ (Sharma et al., 2015) ดังนั้นวิถีสัญญาณ Notch อาจมีความเกี่ยวข้องกับ LSC ใน T-ALL

การระบุเซลล์ที่เป็น CSC จำเป็นต้องใช้โมเลกุลที่เป็นตัวชี้วัด (marker) หลายโมเลกุลในการบ่งชี้ ซึ่งโมเลกุลเหล่านั้นเป็นได้ทั้งโปรตีนภายในเซลล์หรือปริมาณ RNA ของยีนจำเพาะที่แสดงความเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิด (cancer stemness) (Saygin, Matei, Majeti, Reizes, & Lathia, 2019) โดย Huang และคณะได้รายงาน cancer stemness marker ในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemic cell line) Molt4 โดย

ตรวจสอบจาก CD34 CD38 CD44 และ CXCR4 ซึ่งเป็นโปรตีน marker และตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *sox2 oct4 c-myc klf4 nanog* และ *bmi-1* (Huang et al., 2016) Zhao และคณะได้รวบรวม cancer stemness marker ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวดังที่แสดงในตารางที่ 1 (Zhao et al., 2017) โดยวิถีสัญญาณ Notch เคยถูกรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ c-Myc ในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Palomero et al., 2006) ดังนั้นรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดอาจสามารถใช้ในการลดตัวบ่งชี้ความเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดได้ และยังสามารถเปิดเผยความสัมพันธ์ของวิถีสัญญาณ Notch กับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย

ตารางที่ 1 โปรตีนและการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ CSC ของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

Stemness related transcriptional factor markers in Leukemia					
marker	<i>oct4</i>	<i>klf4</i>	<i>c-myc</i>	<i>sall4</i>	
Function in stem cell	Self-renew and pluripotency maintenance	Self-renew and pluripotency maintenance	Self-renewal	Self-renew, pluripotency maintenance and Differentiation	
Stemness related protein marker in Leukemia					
marker	CD34	CD38	CD44	CD47	SALL4
	CD123	BMI-1	c-Myc	OCT4	
	CD96	CD117	TIM3	KLF4	

การทดลองใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) ที่ทำให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ตามมา จึงเป็นเหตุผลที่วิธีการรักษาอื่น ๆ ที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยมากกว่าจะต้องถูกศึกษาและพัฒนาโดยเร็วที่สุด การใช้ภูมิคุ้มกันบำบัด (immunotherapy) เป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่มีความปลอดภัยมากกว่า โดย α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นเป็นวิธีการรักษาแบบภูมิคุ้มกันบำบัดอีกหนึ่งในตัวเลือกที่ยังไม่มีรายงานใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการรักษา T-ALL ทั้งในด้านของการลดระดับการส่งสัญญาณ Notch ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว การเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis และฤทธิ์ในการลดจำนวนประชากรของเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดในมะเร็งเม็ดเลือดขาว ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ต้องการที่จะทดสอบฤทธิ์ของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ต่อการลดลงของการส่งสัญญาณ Notch ในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt4 และ Jurkat รวมถึงฤทธิ์ในการทำให้เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิดเกิดการ apoptosis รวมถึงความสามารถในการลดตัวบ่งชี้ความเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดนี้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อผลิต scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2 โดยใช้เซลล์ไลน์ CHO-K1
2. เพื่อศึกษาผลของ scFv-Fc ต่อการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch และความเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
3. เพื่อศึกษาผลของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อการตายของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบประสิทธิภาพของ scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2 ต่อการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch และการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T cell เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการรักษามะเร็งด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดในอนาคต

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 อุปกรณ์

- 1) หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ทิวป์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen, USA)
- 2) หลอดเซ็นทริฟิวจ์ ทิวป์ (Conical tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 3) ถาดเลี้ยงเซลล์ 6 12 24 และ 96 หลุม (Thermo Scientific, USA)
- 4) ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 2 20 100 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Gilson)
- 5) ปิเปตทิป (pipette tips) ขนาด 0.5-10 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- 6) จานเพาะเชื้อ (Petri dish) (Hyclone)
- 7) Pipette filler (Thermo Scientific, USA)
- 8) Serological pipette ขนาด 25 มิลลิลิตร (SPL Life Sciences, Korea)
- 9) เครื่องชั่งสาร รุ่น L2220 P (Scientific promotion)
- 10) เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 (Tom, Japan)
- 11) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น BV-124 (ISSCO)
- 12) ตู้เย็น (refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (MITSUBISHI, Japan)
- 13) ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (SHARP, Japan)
- 14) ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- 15) เครื่องทำน้ำแข็งรุ่น F 146 (Newton, Thailand)
- 16) เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G569E (Scientific industries, USA)
- 17) หลอด cryovial (SPL Life Sciences, Korea)
- 18) ฮีโมไซโตมิเตอร์ (ISOLAB Laborgerate GnbH, Germany)
- 19) ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
- 20) เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Anthos 2010 (Biochrom Ltd, England)
- 21) เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Varioskan Flash Multimode (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 22) เครื่องชั่งรุ่น PG6002-S และ AG285 (Mettler Toledo, Switzerland)
- 23) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Mettmert, Germany)
- 24) กล้องจุลทรรศน์ CKX3-SLP (OLYMPUS, Japan)
- 25) ขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีฝาปิดตัวกรองขนาด 25 ซม² (Nunc Thermo Fisher Scientific, USA)
- 26) ขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีฝาปิดตัวกรองขนาด 75 ซม² (Nunc Thermo Fisher Scientific, USA)

- 27) ตู้บ่มเซลล์ที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide incubator) รุ่น 311 (Thermo Electron Corporation, USA)
- 28) Mettler Toledo pH meter (Merck, Germany)
- 29) ขวด Duran ขนาด 50 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร (SCHOTT, Germany)
- 30) Zymo PURE™ II Plasmid Midiprep Kit (ZYMO RESEARCH)
- 31) NanoDrop™ 2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific, USA)
- 32) PowerPac™ Basic Power Supply (BIO-RAD, USA)
- 33) PowerPac™ 1000 Power Supply (BIO-RAD, USA)
- 34) HorizeBLOT 2M semidry transfer system (ATTO SupportingLifeResearch, Japan)
- 35) TT-200BI Biological Indicator Incubator (Hercuvan Lab Systems)
- 36) HisTrap™ FF (GE Healthcare, Sweden)
- 37) ชุดเครื่องมือทำ agarose gel electrophoresis
- 38) ชุดเครื่องมือทำ SDS-PAGE
- 39) ชุดเครื่องมือทำ semi-dry electrophoretic transfer
- 40) Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane
- 41) เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA
- 42) Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare)
- 43) อุปกรณ์ถ่ายภาพ Gel document (Uvitec Ltd, UK)
- 44) ทิปปลอด RNase (RNase-free tip) ปริมาตร 2, 20, 200 ไมโครลิตร
- 45) หลอด PCR (PCR tube)
- 46) เครื่องเขย่า (shaker)

2.2.2 เคมีภัณฑ์

- 1) RPMI-1640 Medium (1X) (Cytiva, USA)
- 2) F-12 Kaighn's Modification of Ham's F-12 with L-glutamine (ATCC and Hyclone, USA)
- 3) DMEM/High Glucose (Cytiva, USA)
- 4) Hyclone SFM4CHO Medium (Cytiva, USA)
- 5) Hyclone HEPES buffer (Cytiva, USA)
- 6) Hyclone 100mM Sodium pyruvate solution (Cytiva, USA)
- 7) Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)

- 8) Trypan blue (Gibco, USA)
- 9) β -mercapto-ethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- 10) DAPT
- 11) G418 (Geneticin) (InvivoGen Innovation within reach, USA)
- 12) MTT reagent (Sigma-Aldrich, USA)
- 13) Ethanol
- 14) OmniPur[®] Sodium Chloride (Merck, Germany)
- 15) Potassium Chloride (Merck, Germany)
- 16) Sodium Phosphate, Dibasic (Merck, Germany)
- 17) Potassium Phosphate, Monobasic (Merck, Germany)
- 18) Tris (BIO-RAD, USA)
- 19) Nonidet P40 Substitute (Merck, Germany)
- 20) Sodium Deoxycholate (Merck, Germany)
- 21) SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (BIO-RAD, USA)
- 22) Protease inhibitor (Cell Signaling Technology, USA)
- 23) Pierce[™] Bovine Serum Albumin Standard Ampules (Thermo Scientific, USA)
- 24) Pierce[™] BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Scientific, USA)
- 25) Pierce[™] BCA Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific, USA)
- 26) Bacto[™] Tryptone (Thermo Scientific, USA)
- 27) Bacto[™] Yeast Extract (Thermo Scientific, USA)
- 28) Agarose Basic (PanReac AppliChem ITW Reagents)
- 29) Agarose (BIO-RAD, USA)
- 30) Glycine (BIO-RAD, USA)
- 31) Methanol (Merck, Germany)
- 32) Difco[™] Skim Milk (BD Biosciences, USA)
- 33) OmniPur[®] Polyxyethylene (20) Sorbitan Monooleate (Merck, Germany)
- 34) 40% Acrylamide/Bis Solution (BIO-RAD, USA)
- 35) Ammonium Persulfate (APS) (BIO-RAD, USA)
- 36) TEMED (BIO-RAD, USA)
- 37) Trizol reagent (Life Technoligises, USA)

- 38) DEPC
- 39) Hypure water
- 40) Random hexamer
- 41) 5x Reverse transcriptase buffer (Thermo Scientific, USA)
- 42) dNTP mix (Thermo Scientific, USA)
- 43) Reverse transcriptase
- 44) RNase inhibitor
- 45) Chloroform
- 46) Isopropanol (Merck, Germany)
- 47) Ampicillin
- 48) Fixer
- 49) developer
- 50) Opti-MEM
- 51) FuGENE[®] HD Transfection reagent (Promega, USA)

2.2 วิธีดำเนินการทดลอง

2.2.1 การเลี้ยงเซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ CHO-K1 จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยง Ham's F-12K (Kaighn's modification) (Cat num. SH30526.01, Hyclone; Cat num. ATCC[®] 30-2004™, ATCC) ที่ประกอบด้วย 10% Gibco™ Fetal bovine serum (FBS) (Cat num. 10-082-139, Gibco) (Complete F-12K) (**ภาคผนวก ก1.**) เซลล์ไลน์ Molt4 และ Jurkat จะถูกเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 (Cat num. SH30027.02, Hyclone) ที่ประกอบไปด้วย 10% FBS 1 mM Sodium pyruvate solution (Cat num. SH30239.01, Hyclone) และ 10 mM HEPES buffer (Cat num. SH30237.01, Hyclone) (Complete RPMI) (**ภาคผนวก ก2.**) เซลล์ไลน์ทั้งหมดนี้ จะถูกเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Thermoelectron corporation) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นสัมพัทธ์ 95%

2.2.2 การเก็บรักษาเซลล์ไลน์และการละลายเซลล์ไลน์ (cell preservation and thawing)

สำหรับการเก็บรักษา (cell preservation) เซลล์ไลน์ CHO-K1 จะถูกเก็บรักษาในอาหาร Completed F-12K ที่ประกอบด้วย 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Cat num. D2650, Sigma-Aldrich) เป็นไครโอโพรเทกแทนต์ (cryoprotectant) (**ภาคผนวก ก3.**) เซลล์ไลน์ Jurkat และ Molt4 จะถูกเก็บรักษาในอาหาร Completed RPMI ที่ประกอบด้วย 10% และ 5% DMSO ตามลำดับ

(ภาคผนวก ก3.) เซลล์จะถูกเก็บอยู่ใน Nunc® Cryotube® (Cat num. 377267, Nunc) และเก็บในตู้ทำความเย็น ที่อุณหภูมิ -80°C

ในการละลายเซลล์ไลน์ (cell Thawing) หลังจากที้นำเซลล์ไลน์ที่ออกมาจากตู้ทำความเย็นแล้ว เซลล์ไลน์จะถูกนำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นนำเซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่ละลายแล้วไปผสมกับ F-12K ในอัตราส่วน 9 ส่วนของอาหารและ 1 ส่วนของเซลล์ไลน์ ทำเช่นเดียวกันกับเซลล์ไลน์ Molt4 และ Jurkat ในอาหาร RPMI 1640 นำเซลล์ที่ผสมอาหารแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 400 rcf เป็นเวลา 5 นาที ที่ทั้งส่วนใสและใส Complete F-12K เพื่อละลายตะกอนของเซลล์ไลน์ CHO-K1 และ Complete RPMI เพื่อละลายตะกอนของ Jurkat และ Molt4 อาหารที่มีเซลล์ละลายอยู่นี้จะถูกนำไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป

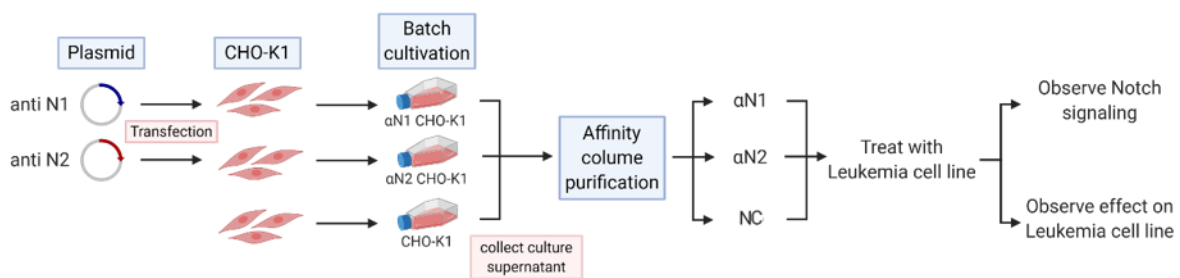
2.2.3 การผลิต scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2

พลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 (Addgene, USA) ซึ่งผลิต scFv-Fc ต่อ NOTCH1 (α N1 scFv-Fc) และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 (Addgene, USA) ซึ่งผลิต scFv-Fc ต่อ NOTCH2 (α N2 scFv-Fc) จะถูกทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) เข้าสู่ *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α จากนั้นนำ *E. coli* DH5 α ที่ได้รับพลาสมิดมาคัดเลือกบนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลือกลโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงต่อใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะดังกล่าวในสภาวะที่กล่าวไปข้างต้น จากนั้นเก็บเซลล์จากการปั่นตกมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) และตรวจสอบปริมาณของพลาสมิดด้วย Nanodrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร และความสมบูรณ์ของพลาสมิดที่ด้วย agarose gel electrophoresis ดังรูปที่ ๖2

ทรานสเฟค (stable transfection) เซลล์ไลน์ CHO-K1 (เซลล์คล้ายเซลล์เยื่อบุผนังรังไข่จาก Chinese hamster) ด้วยพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 (Addgene, USA) โดยใช้ CHO-K1 เป็นชุดควบคุมลบ (negative control; NC) (สามารถดูข้อมูลเพิ่มเติมของลำดับนิวคลีโอไทด์และ plasmid map ของพลาสมิดทั้ง 2 ชนิดได้ในภาคผนวก ค) โดยใช้พลาสมิด ปริมาณ 1 ไมโครกรัมและทรานสเฟคชันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ๖2.) หลังจากนั้นคัดเลือกเซลล์ที่ประสบความสำเร็จในการทรานสเฟคชันโดยคัดเลือกด้วย Geneticin 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Gibco) (ภาคผนวก ๖1.) เป็นเวลา 2 สัปดาห์จะเห็นการตายของเซลล์ที่ทรานสเฟคชันไม่สำเร็จในช่วงแรกและเซลล์จะเพิ่มจำนวนหลังจากนั้น เมื่อได้เซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่ผลิต α N1 scFv-Fc (α N1 scFv-Fc CHO-K1) และ α N2 scFv-Fc (α N2 scFv-Fc CHO-K1) ที่เสถียรแล้วยังคงเลี้ยงในอาหาร

เลี้ยงที่มี Geneticin 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปทดสอบเพื่อยืนยันการผลิต α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ด้วย Western blot พร้อมทั้งเก็บรักษาเซลล์ไลน์ที่เสถียรแล้ว

การผลิต α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc เริ่มจากการเปลี่ยนอาหารเลี้ยง complete F-12K ของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc CHO-K1 เป็นอาหารเลี้ยงซีรัมฟรี (serum-free media) SFM4CHO liquid media with L-glutamine (Cat num. SH30549.02, Cytiva) เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 7 วันและเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ (การผลิต α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc สามารถผลิตได้ใน passage ที่ 3-5 หลังจากละลายเซลล์)



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงแผนการศึกษาของโครงการ

2.2.4 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ (affinity column chromatography)

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการผลิตมาผสมกับ binding buffer (ภาคผนวก ข1.) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปกรองด้วย filter ที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร (Pall Corporation, USA) และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ HisTrap™ FF (GE Healthcare, UK) ขนาด 1 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง AKTA START (GE Healthcare, UK)

เริ่มจากการล้างสายของ AKTA ด้วย 20% เอทานอล (ethanol) และใส่คอลัมน์ HisTrap โดยไม่ให้มีฟองอากาศจากนั้นปรับ pH ภายในคอลัมน์ด้วย binding buffer โดยอัตราเร็วของของเหลวที่ผ่านคอลัมน์คือ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ผ่านคอลัมน์ พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างที่ไหลผ่านคอลัมน์ (flow-through) ไว้ในกรณีคอลัมน์ไม่สามารถจับกับตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือตัวอย่างมีปริมาณมากเกินไปที่คอลัมน์จะสามารถจับได้ ชะล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer เพื่อล้างโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการออกพร้อมทั้งเก็บ binding buffer ที่ไหลผ่านคอลัมน์เรียกว่า wash เมื่อล้างเสร็จจึงเข้าขั้นตอนการสกัดโปรตีน (Elution) โดยใช้ Elution buffer (ภาคผนวก ข2.) เพื่อชะโปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์เป็น fraction เมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้ว ต้องทดสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างได้แก่ flow-through wash และโปรตีนในแต่ละ fraction ด้วยการทำให้ SDS-PAGE

2.2.5 การทำ Western blot

เพื่อที่จะยืนยันการผลิต α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ในเซลล์ไลน์ CHO-K1 ของเหลวภายในเซลล์ (cell lysate) และจะถูกนำมาทำ Western Blot โดยใช้แอนติบอดี anti-human IgG-HRP เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ และน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture supernatant) จะถูกเก็บในวันที่ 3 5 7 9 ของการผลิต จะถูกนำมาทำ Western Blot โดยใช้แอนติบอดี anti-His-Tag เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และใช้แอนติบอดี anti-rabbit-HRP เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ

การตรวจสอบวิถีสัญญาณ Notch จากของเหลวภายในเซลล์จากเซลล์ไลน์ Jurkat และ Molt4 ทำการทดลองโดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรใน 24 well-plate พร้อมกับ treat เซลล์โดยใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ NC ความเข้มข้นในหน่วยร้อยละโดยปริมาตรที่มากที่สุดที่ใช้ในการให้ α N1 scFv-Fc หรือ α N2 scFv-Fc และอนุมานว่าหลุมที่ใส่สารละลายในความเข้มข้นน้อยกว่าจะส่งผลกระทบต่อเซลล์น้อยกว่าเช่นกัน และใช้ elution buffer เป็นชุดควบคุมลบของการทดลองซึ่งใช้ความเข้มข้นของ elution buffer ในหน่วยร้อยละโดยปริมาตรที่มากที่สุดที่ใช้ในการ treat เซลล์ และใช้ 25 ไมโครโมลาร์ DAPT เป็นชุดควบคุมบวก โดยใช้ DMSO ในหน่วยร้อยละโดยปริมาตรที่เท่ากับการ treat เซลล์ด้วย DAPT เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม โดย treat เซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการติดตามวิถีสัญญาณ Notch1 ใช้ anti-Cleaved Notch1 (Val1744) เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และใช้ anti-rabbit-HRP เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ และติดตามตัวรับสัญญาณ Notch1 ทั้งหมด (total Notch1) จากการใช้ anti-Notch1 เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิและใช้ anti-rabbit-HRP เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ การทดลองดังกล่าวนี้จะใช้ปริมาณของ GAPDH เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) โดยตรวจสอบจากการใช้ anti-GAPDH เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิและใช้ anti-rabbit-HRP เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ เช่นเดียวกับการติดตามตัวรับสัญญาณ Notch2 ใช้ anti-Notch2 เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และใช้ anti-rabbit-HRP เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิความเข้มของแถบโปรตีน (intensity) มีการวัดด้วยโปรแกรม image J

ตารางที่ 2 ตารางแสดงข้อมูลชนิด ประเภทการใช้งาน ความเข้มข้นที่ใช้ และบริษัทที่ผลิตแอนติบอดีที่ใช้ในโครงการ

Antibody	Utilization	Concentration	Cat num.	Company
α Cleaved Notch1 (Val1744) Rabbit mAb	Western Blot	1:1000	4147S	Cell signaling technology
α Notch1 Rabbit mAb	Western Blot	1:2000	3608S	Cell signaling technology
α Notch2 Rabbit mAb	Western Blot	1:2000	5732S	Cell signaling technology
α GAPDH Rabbit pAb	Western Blot	1:5000	AHP1628	Bio-Rad
α His-Tag Antibody	Western Blot	1:4000	2365S	Cell signaling technology
α Anti-Rabbit IgG-HRP	Western Blot	1:4000	7074S	Cell signaling technology
α Anti-Human IgG-HRP	Western Blot ELISA	1:4000 1:5000	2040-05	SouthernBiotech

2.2.6 การทำ ELISA

เพื่อที่จะยืนยันการผลิต **α**N1 scFv-Fc และ **α**N2 scFv-Fc ในเซลล์ไลน์ CHO-K1 ในเชิงปริมาณ น้ำเลี้ยงเซลล์จะถูกเก็บในวันที่ 3 5 7 ของการผลิต โดยจะใช้ PBS (ภาคผนวก ข3.) เป็นตัวทำละลาย และใช้ **α**N1 scFv-Fc ที่ทำให้บริสุทธิ์ และรู้ความเข้มข้นแล้วสร้าง standard curve ในชุดทดลอง เมื่อตรึง **α**N1 scFv-Fc **α**N2 scFv-Fc และ **α**N1 scFv-Fc ที่ทำให้บริสุทธิ์ บน 96-well plate (Thermo Scientific, USA) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืนแล้ว เทของเหลวที่อยู่ในหลุมออกและล้างด้วย PBST buffer (ภาคผนวก ข16.) จากนั้นตรึงพื้นที่ว่างของหลุม (blocking) ด้วย 3% skim milk (Cat num. 232100, Difco™) (ภาคผนวก ข17.) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมาเทสารละลายในหลุมทิ้งและล้างด้วย PBST buffer ตามด้วยการบ่ม anti-human-HRP เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิในแต่หลุมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วย PBST buffer ใส่ substrate (ภาคผนวก ข 21.) และหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกและตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วย MULTISKAN FC microplate reader (Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

การหาผลิตภาพจำเพาะ (specific productivity) ของ **α**N1 scFv-Fc และ **α**N2 scFv-Fc คำนวณจากความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในวันที่ 7 หารด้วยพื้นที่ใต้กราฟของกราฟที่มีแกน Y เป็นความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell density) และแกน X คือระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตจะคำนวณได้ตามสมการดังต่อไปนี้

$$Q_p = \frac{s}{\int_0^t y dt}$$

Q_p = ผลิตภาพจำเพาะ

S = ความเข้มข้นของรีคอมบแนนท์แอนติบอดีของเวลาที่ t ที่ใช้ในการผลิต

t = เวลาที่ใช้ในการผลิตและหาผลิตภาพจำเพาะ

y = ความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิต

2.2.7 การทำ quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

เพื่อที่จะติดตามวิถีสัญญาณ Notch สกัด total RNA เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ได้แก่ *hes1* และ *hey1* ทำการทดลอง treat เซลล์เช่นเดียวกับที่บรรยายไว้ในหัวข้อการทำ Western Blot และสกัด RNA โดยเติม TRIzol® (Invitrogen, UK) ลงไปในหลอดที่ปั่นตกเซลล์แล้วเปิดให้เข้ากัน 7-8 ครั้ง บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม Chloroform (Lab-Scan, Ireland) 100 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 วินาที พร้อมบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง 12,000 rcf ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสใส้หลอดใหม่และเติม isopropanol (Merck, Germany) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พร้อมกับกลับหลอดอย่างนุ่มนวล 10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 rcf ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ใน DEPC water ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมให้กลายเป็นสารเนื้อเดียวและนำไปปั่นเหวี่ยง 7,500 rcf ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและคว่ำหลอดบนกระดาษชำระจนตะกอนแห้ง (30 นาที) และเติม DEPC water 20 ไมโครลิตรเพื่อละลายตะกอน พร้อมบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดคุณภาพของ RNA จากการสกัดด้วย Spectrophotometer Nanodrop (Thermo scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำ RNA ดังกล่าวมาทำ reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) โดยใช้ RNA ที่ได้จากการสกัด 1 ไมโครกรัมเป็นแม่แบบ เติม Random hexamers (Qiagen, Germany) 0.2 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วย DEPC water ให้ได้ปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเติม 5xRT buffer (Fermentas, Canada) 2 ไมโครลิตร Reverse transcriptase (Fermentas, Canada) 1 ไมโครลิตร 10 มิลลิโมลาร์ deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Fermentas, Canada) 2 ไมโครลิตร และ RNase inhibitor (Fermentas, Canada) 0.5 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอดปฏิกิริยา ผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากันและนำไปใส่ในเครื่อง PCR Bioer Life Express (Bioer technology, China) โดยตั้งค่าให้เครื่องทำงานดังต่อไปนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที เพิ่มอุณหภูมิไปที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เป็นขั้นตอนสุดท้าย จึงได้ cDNA พร้อมใช้ในการทำ qRT-PCR ซึ่งทำได้โดยนำตัวอย่าง cDNA มาเจือจางใน Hypure water และเติม iQ™ SYBR® Green (Bio-Rad, USA) Forward และ

Reverse primer ของ *hes1* และ *hey1* และเติม Hypure water และนำไปทำ PCR โดยใช้เครื่อง Bio-Rad CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad, USA) โดยการทดลองนี้จะวัดระดับการแสดงออกของยีน *actin* เพื่อใช้เป็น internal control

เพื่อจะทดสอบฤทธิ์ของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ต่อการความเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิด เซลล์ไลน์ Molt4 และ Jurkat จะถูก treat ด้วยรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีตั้งที่กล่าวไว้ในหัวข้อการทำ Western Blot มาสกัด RNA และทำ Reverse transcription เพื่อเปลี่ยนให้เป็น cDNA ด้วยวิธีที่กล่าวข้างต้น และนำ cDNA มาทำ qRT-PCR เพื่อหาระดับการแสดงออกของยีนที่เป็น cancer stem cell marker ได้แก่ *cd44* ซึ่งแสดงออกเป็นโปรตีน CD44 (non-kinase transmembrane glycoprotein) เมื่อจับกับ Hyaluronan ซึ่งเป็นลิแกนด์จะทำให้เกิดการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ โอกาสการอยู่รอดของเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Chen, Zhao, Karnad, & Freeman, 2018) *oct4* และ *nanog* ซึ่งแสดงออกเป็นโปรตีน Oct4 และ Nanog ตามลำดับซึ่งเป็น transcription factor ของยีนที่เกี่ยวข้องกับความ เป็น stem cell (Yin et al., 2015) *c-myc* เป็นยีนที่แสดงออกเป็น transcription factor c-Myc ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Delmore et al., 2011) โดยใช้การแสดงออกของยีน *actin* ซึ่งเป็น internal control

2.2.8 ทดสอบฤทธิ์ของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ต่อการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยวิธี MTT assay

เพื่อที่จะตรวจสอบว่าฤทธิ์ของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือไม่ เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt4 และ Jurkat จะถูกเลี้ยงลงในหลุมของ 96-well plate และ treat ด้วยรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีตั้งที่กล่าวไว้ในหัวข้อ การทำ Western Blot บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เติม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในหลุม 10 ไมโครลิตร และบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ละลายตะกอน formazan ที่เกิดขึ้นใน DMSO 200 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยใช้ complete RPMI เป็น blank และนำไปคำนวณหาร้อยละ cell viability ด้วยสูตร

$$\% \text{cell viability} = ((A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})) \times 100$$

โดย A คือค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 540 nm

2.2.9 ทดสอบฤทธิ์ของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc การแสดงออกของเครื่องหมายบ่งชี้เซลล์มะเร็งต้นกำเนิด

เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt4 และ Jurkat มีการให้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีตามที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ การทำ Western Blot ถูกนำมาย้อมด้วย anti-CD44 เพื่อติดตามความแตกต่างระหว่างประชากรในกลุ่มที่มี CD44 แสดงออกบนผิวเซลล์อยู่ในปริมาณมากของเซลล์ที่ผ่านการ treat ด้วยรีคอม

บิแนนท์แอนติบอดีและเซลล์ชุด control โดยใช้เครื่อง Flow cytometer (FC500, Beckman Coulter) ผลที่ได้จะถูกระบุด้วยโปรแกรม FlowJo (Tree star, Inc.)

2.2.10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลองความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในวันที่ 7 ของการผลิต และค่าผลิตภาพจำเพาะของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc CHO-K1 จะถูกเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากเซลล์ไลน์ CHO-K1 โดยใช้ unpaired T test ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, USA) โดย * หมายถึงผลการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่าความเชื่อมั่น 0.05 ($p < 0.05$) และ ** หมายถึง $p < 0.01$

ตารางที่ 3 ตารางแสดงข้อมูลของ primer ที่ใช้ในโครงการ

Role of the gene	Gene	Sequence (5'-3')	Annealing Temperature (°C)
Notch target gene	<i>hes1</i>	For ACGACACCGGATAAACCAAA	55
		Rev CGGAGGTGCTTCACTGTCAT	
	<i>hey1</i>	For AACTGTTGGTGGCCTGAATC	55
		Rev GCGGTAAATGCAGGCGTAT	
Cancer stem cell marker	<i>cd44</i>	For TGCCGCTTTCAGGTGTAT	60
		Rev GGCCTCCGTCGAGAGA	
	<i>oct4</i>	For CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	68
		Rev CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	
	<i>c-myc</i>	For AATGAAAAGGCCCAAGGTAGTTATCC	60
		Rev GTCGTTTCCGCAACAAGTCCTCTTC	
	<i>nanog</i>	For CTCTCCTCTTCCTCCTCCAT	60
		Rev TTGCGACTCTTCTCTG	
Internal control	<i>actin</i>	For ACCAACTGGGACGACATGGAG	55
		Rev GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC	

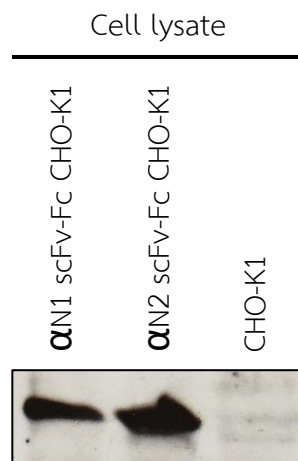
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การทรานสเฟกชันเซลล์ไลน์ CHO-K1 เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี scFv-Fc ต่อ NOTCH1 และ NOTCH2

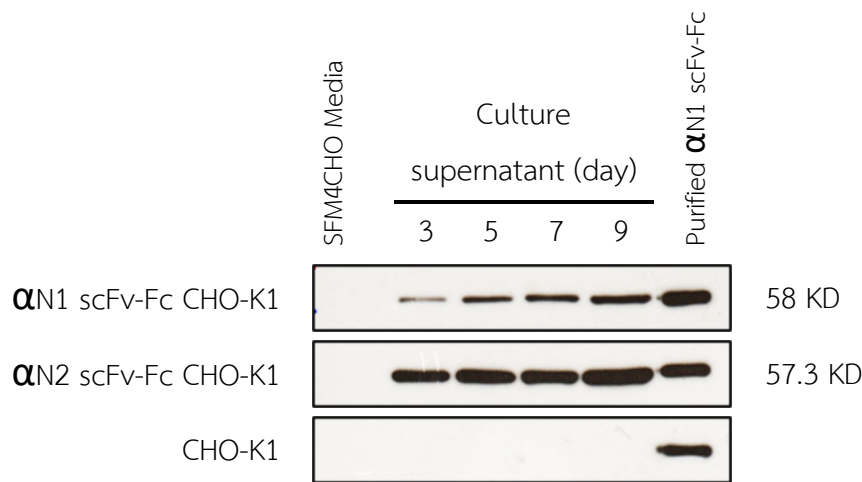
เพื่อทดสอบการผลิต α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ในเซลล์ไลน์ CHO-K1 จึงทำการทรานสเฟกชันโดยใช้พลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 และนำเซลล์ไลเซตไปวิเคราะห์หาโปรตีน scFv-Fc โดยใช้วิธี Western Blot ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 6 โดยพบว่าโปรตีนมีขนาด 58 และ 57.3 KD ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดโมเลกุลโดยปกติของ scFv-Fc ที่คาดการณ์ไว้

เพื่อทดสอบว่าเซลล์ไลน์ CHO-K1 สามารถผลิต α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc สามารถหลั่ง α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้หรือไม่ เนื่องจากน้ำเลี้ยงเซลล์ถูกนำไปทำให้กลายเป็น α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc บริสุทธิ์ต่อไป จึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 5 7 และ 9 วัน จะถูกนำมาทำ Western Blot เพื่อตรวจสอบการผลิตของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ ผลพบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์จากการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในวันที่ 3 5 7 และ 9 จากเซลล์ไลน์ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc CHO-K1 มี α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์จริงและมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดช่วงการผลิตดังรูปที่ 7

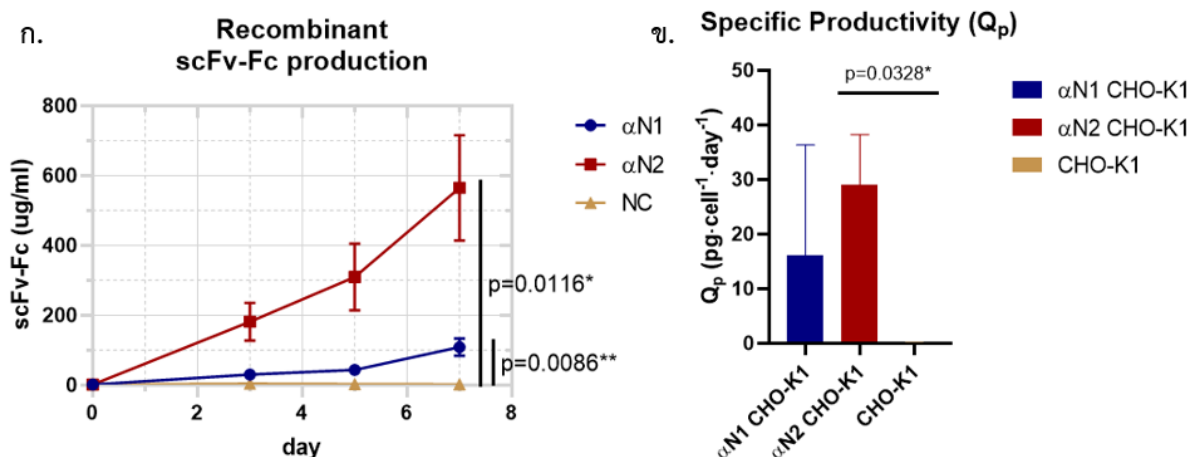


รูปที่ 6 ผลการแสดงผลของยีนผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในเซลล์ไลน์ CHO-K1 โดย cell lysate ของเซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่ผ่านการทำทรานสเฟกชันของพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 ถูกวิเคราะห์โดยใช้วิธี Western Blot ด้วย anti-human Fc domain-HRP โดยใช้ CHO-K1 ที่ไม่ได้ผ่านการทำทรานสเฟกชันเป็นชุดควบคุมลบ

เพื่อตรวจวัดปริมาณการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อหาผลิตภาพจำเพาะ (specific productivity; Q_p) ของการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีแต่ละชนิด จึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์หาปริมาณรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีด้วยวิธี ELISA และนับความเข้มข้นของเซลล์ไลน์ที่มีชีวิตในช่วงการผลิต (viable cell density) (ภาคผนวก ง4.) จากการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน เพื่อหาผลิตภาพจำเพาะของเซลล์ไลน์ $\alpha N1$ scFv-Fc และ $\alpha N2$ scFv-Fc CHO-K1 พบว่าในน้ำเลี้ยงเซลล์มี $\alpha N1$ scFv-Fc และ $\alpha N2$ scFv-Fc เข้มข้น 108.79 และ 565.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการผลิตตามลำดับ และ $\alpha N1$ scFv-Fc และ $\alpha N2$ scFv-Fc CHO-K1 มีผลิตภาพจำเพาะ 16.20 และ 28.96 พิโคกรัมต่อเซลล์ต่อวัน ตามลำดับดังรูปที่ 8



รูปที่ 7 การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ไลน์ CHO-K1 โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์จาก $\alpha N1$ scFv-Fc $\alpha N2$ scFv-Fc CHO-K1 จากวันที่ 3 5 7 และ 9 ของการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีมาทำ Western Blot โดยใช้แอนติบอดี anti-His tag โดยใช้ CHO-K1 เป็นชุดควบคุมลบ



รูปที่ 8 ความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีจากเซลล์ไลน์ CHO-K1 ก. ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยนำรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไลน์ $\alpha N1$ scFv-Fc และ $\alpha N2$ scFv-Fc CHO-K1 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ จากวันที่ 3 5 และ 7

ของการผลิตมาตรวจสอบในเชิงปริมาณด้วย ELISA โดยใช้แอนติบอดี anti-human Fc domain-HRP และใช้น้ำเลี้ยงเซลล์จาก CHO-K1 เป็นชุดควบคุม **ข**. ค่า specific productivity ที่บ่งบอกถึงปริมาณของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc CHO-K1 ผลิตต่อเซลล์ต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้ CHO-K1 เป็นชุดควบคุมลบ รูปแสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากผลการทดลอง 3 ครั้ง โดย * หมายถึงผลการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่าความเชื่อมั่น 0.05 ($p < 0.05$) และ ** หมายถึง $p < 0.01$

3.2 การทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ (affinity column chromatography)

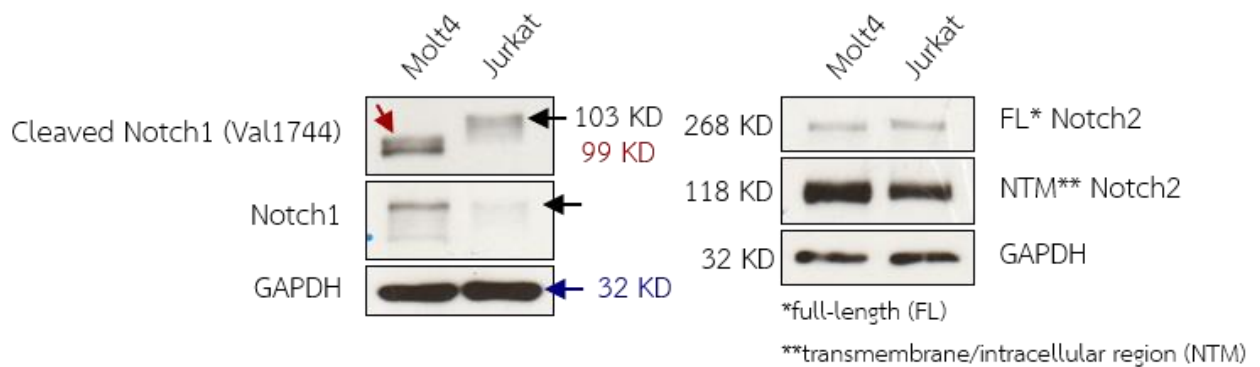
ขณะ Elute รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีออกจากคอลัมน์ เครื่อง AKTA วัดค่าดูดกลืนแสงและแสดงผลออกมาซึ่งทำให้ทราบได้ว่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ออกมาอยู่ใน fraction ใด ดังรูปที่ 4-6 โดยนำ Fraction ดังกล่าวมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE ดังรูปที่ 10 และยืนยันคุณภาพของโปรตีนด้วย Western Blot ดังรูปที่ 11 พบแถบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีจากการทำ Western Blot และนำรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีใน fraction ดังกล่าวไป dialysis และทำให้เข้มข้นต่อไป

เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ นำ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ใน Elution buffer มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie blue ดังรูปที่ 10 และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการใช้โปรแกรม ImageJ พบว่าทุก Fraction ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีมีความบริสุทธิ์มากกว่า 83%

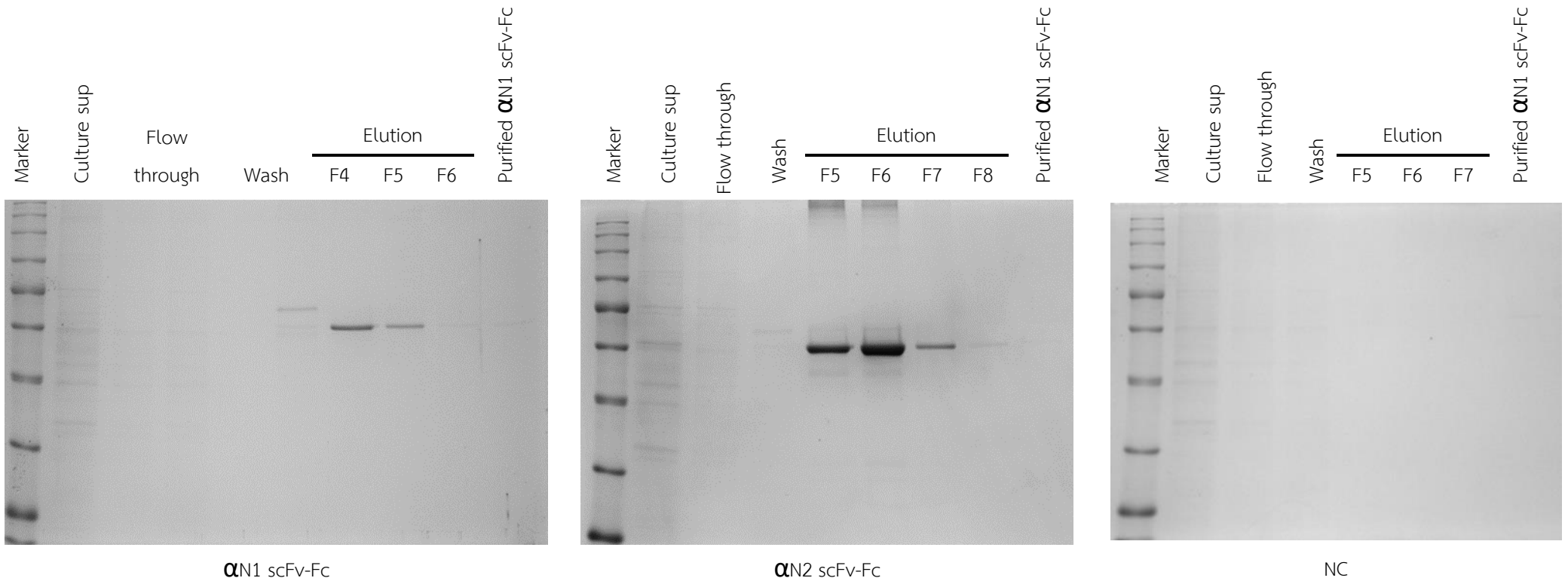
รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และในสารละลายที่มี imidazole เป็นส่วนประกอบซึ่งมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าสามารถลดการ apoptosis ของเซลล์ได้ด้วยการลดความเป็นกรดภายในเซลล์ (Gottlieb, Nordberg, Skowronski, & Babior, 1996) รวมถึงมีรายงานว่า imidazole เป็น polyamide ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้ (Yang et al., 2013) จึงมีความจำเป็นที่จะต้อง dialysis ให้ Elution buffer เปลี่ยนเป็น PBS รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ผ่านการ dialysis จะถูกทำให้เข้มข้น และนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปทำ Western Blot เพื่อตรวจสอบคุณภาพของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี พบว่าเมื่อผ่านขั้นตอน dialysis และทำให้เข้มข้นแล้วยังคงมีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในตำแหน่งที่ถูกต้องซึ่งพร้อมที่จะนำไปทดสอบกับเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไปดังรูปที่ 7

3.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของ NOTCH1 และ NOTCH2 ในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-ALL

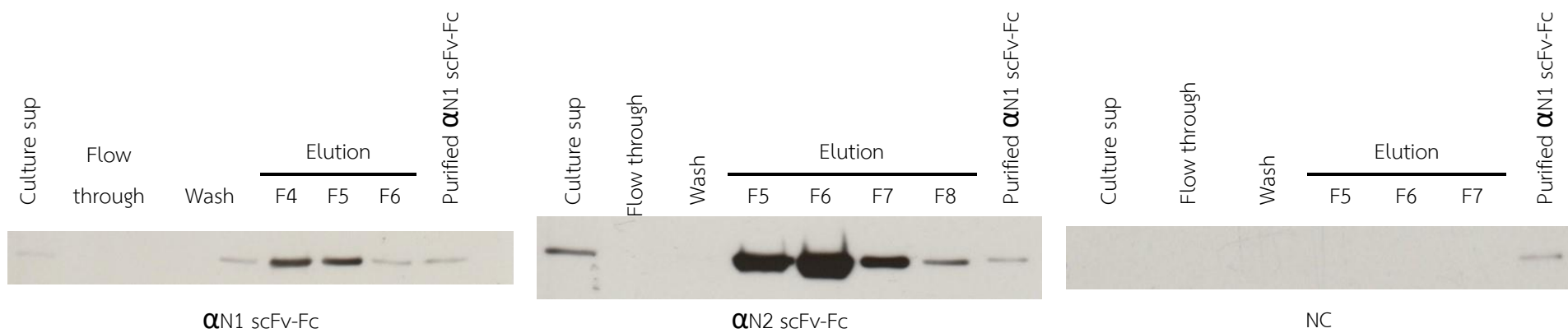
เพื่อที่จะเลือกเซลล์ไลน์มะเร็งที่จะใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch จึงจะต้องเลือกเซลล์ไลน์มะเร็งที่มีการส่งสัญญาณ Notch ภายในเซลล์ เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt4 และ Jurkat จึงถูกเก็บ cell lysate และนำไปตรวจสอบวิถีสัญญาณ Notch ด้วย Western Blot พบว่าทั้ง Molt4 และ Jurkat มีการแสดงออกของ NOTCH1 และ NOTCH2 และสามารถพบวิถีสัญญาณ Notch 1 ได้จากการตรวจสอบ Cleaved Notch1 ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 การแสดงออกของ NOTCH1 และ NOTCH2 ในเซลล์ไลน์ Molt4 และ Jurkat โดยการนำ cell lysate มาทำ Western Blot โดยใช้แอนติบอดี anti-NOTCH1 และ anti-NOTCH2 รวมถึงผล Western Blot แสดงการส่งสัญญาณของ NOTCH1 ที่ตรวจสอบพบ cleaved Notch1 ภายในเซลล์ไลน์ทั้ง Molt4 และ Jurkat โดยใช้แอนติบอดี anti-cleaved Notch1



รูปที่ 10 ผล SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีสัมพรรคภาพเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำให้บริสุทธิ์ ประกอบด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ (culture sup) น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านคอลัมน์ (flow through) binding buffer ที่ใช้ล้างคอลัมน์ (wash) และ fraction ของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในขั้นตอนการสกัด (elution)



รูปที่ 11 ผล Western Blot แสดงคุณภาพของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีสัมพรรคภาพเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำให้บริสุทธิ์ ประกอบด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ (culture sup) น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านคอลัมน์ (flow through) binding buffer ที่ใช้ล้างคอลัมน์ (wash) และ fraction ของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในขั้นตอนการสกัด (elution) โดยใช้แอนติบอดี anti-His tag

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ในปัจจุบันรีคอมบิแนนท์โปรตีนกว่า 70% ถูกผลิตจากเซลล์ไลน์ที่มีต้นกำเนิดจาก CHO โดยความสามารถในการผลิตโดยปกติจะถูกวัดจากค่า specific productivity ซึ่งในเซลล์ไลน์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี specific productivity อยู่ในช่วงประมาณ 20-70 พิโคกรัมต่อเซลล์ต่อวัน หากเลี้ยงเป็นเวลา 10-14 วัน ในลักษณะ fed-batch cultivation (F. Li, Vijayasankaran, Shen, Kiss, & Amanullah, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของการผลิต α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc จากเซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่ผลิตเป็นเวลา 7 วัน และเลี้ยงเซลล์แบบ batch cultivation ให้ค่า specific productivity เท่ากับ 16.20 และ 28.96 พิโคกรัมต่อเซลล์ต่อวัน ตามลำดับ ดังรูปที่ 8ข แต่การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนยังสามารถทำได้อีกหลายวิธีแต่หัวใจสำคัญของการเพิ่มความสามารถในการผลิตคือการเลือกเซลล์ที่มีประสิทธิภาพและการกำจัดเซลล์ที่ไร้ความสามารถในการผลิต นักวิทยาศาสตร์พยายามหาวิธีต่าง ๆ เพื่อให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้มากขึ้น ซึ่งหมายถึงต้นทุนที่ถูกลง (F. Li et al., 2010)

ขั้นตอนการพัฒนาเซลล์ไลน์เพื่อใช้ในการผลิตเป็นขั้นตอนที่สำคัญส่วนหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตมีมากขึ้น ซึ่งขั้นตอนนี้มีประเด็นสำคัญหลายประเด็นที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิต ปัจจัยแรกคือการสร้างพลาสมิดโดยองค์ประกอบแรกที่จะทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนยีนสามารถทรานสคริป (transcript) ให้ mRNA ในระดับที่สูงคือการเลือกใช้ Promotor ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ CMV promotor (รูปที่ ค1-2) ซึ่งเป็น strong promotor โดยรายงานของ Zúñiga R. A. และคณะ ได้พัฒนา Chimeric promotor ที่เกิดจากการผสมกันของ CMV promotor และ RegCG ทำให้เซลล์ไลน์ CHO ผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในปริมาณเฉลี่ยได้มากกว่าเซลล์ไลน์ CHO ที่ได้รับเพียง CMV promotor ถึง 4 เท่า (Zuniga et al., 2019) และในปี 2019 งานวิจัยของ Dahodwala H. และคณะ ทำ ChIP-RT-qPCR พบว่าโปรตีนหลักที่จับกับ CMV promotor ในเซลล์ไลน์ CHO ที่มีผลผลิตสูงคือ CREB1 (Dahodwala et al., 2019) การศึกษานี้เป็นหนึ่งในหนทางนำไปสู่การพัฒนาความสามารถการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ไลน์ CHO อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการนำข้อมูลของงานวิจัยดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ ส่วนต่อมาก็คือ signal sequence ที่จับกับ signal recognition particle (SRP) นำ mRNA และ ribosome ไปที่บริเวณผิวของ rER โดยการจับกันของ SRP และ SRP receptor บน rER และเกิดทรานสเลทชัน (translation) ต่อไป (Owji, Nezafat, Negahdaripour, Hajiebrahimi, & Ghasemi, 2018) โดยการทดลองนี้ใช้ signal sequence เป็น BGH poly A signal (รูปที่ ค1-2) โดยรายงานของ Azzoni A. R. และคณะ พบว่า BGH poly A signal ทำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระดับที่สูงกว่าการใช้ SV40 poly A signal รวมถึงป้องกันการสลายของ RNA ได้ดีกว่า การใช้ SV40 poly A signal อีกด้วย นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของ BGH poly A signal ให้ระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่ำลง และเกิดการสลายของ RNA เพิ่มขึ้นด้วย (Azzoni, Ribeiro, Monteiro, & Prazeres, 2007)

นอกจากนี้ Real G. และคณะ รายงานการพัฒนา signal sequence โดยการนำ BGH poly A ต่อกับ WPRE พบว่า HEK-293T ที่มี signal sequence ดังกล่าวมีระดับการแสดงออกของ GFP มากกว่า HEK-293T ที่รับรับเพียงพลาสมิดที่มีแค่ BGH poly A (Real, Monteiro, Burger, & Alves, 2011)

วิธีการเลือกไว้เพียงเซลล์ไลน์ที่มีความสามารถในการผลิตสูง โดยปกติแล้วพลาสมิดจะประกอบไปด้วย selectable marker ที่จะทำให้เซลล์ไม่ตายในอาหารที่มี selective reagent ซึ่งการคัดเลือกในลักษณะนี้ทำให้มีเฉพาะเซลล์ที่มีความสามารถในการผลิตมากใช้สารอาหารในอาหารเลี้ยงและผลิตภัณฑ์คอมบิแนนท์โปรตีน ออกเป็นผลตอบแทน Fan L. และคณะ รายงานการพัฒนาเซลล์ไลน์โดยการนำยีนผลิต Glutamine synthase (GS) ออกจากจีโนมของเซลล์ไลน์ CHOK1SV (GS-knockout CHOK1SV cell) เพื่อที่จะลดปริมาณเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดแต่ยังคงอยู่รอดในอาหารที่มี Methionine sulfoximine (MSX) ผลพบว่า GS-knockout CHOK1SV cell สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ 3 เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ไลน์ CHOK1SV ที่ไม่ได้นำยีนผลิต GS ออก (Fan et al., 2012)

เซลล์ที่มีพลาสมิดที่ถูกคัดเลือกแล้วจะถูกคัดเลือกอีกครั้งเพื่อหาโคลนที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด 12-24 โคลนเพื่อนำไปเลี้ยงแบบ fed-batch cultivation ต่อและหาโคลนที่มีความสามารถในการผลิตสูงสุดมายกระดับการผลิต (scale up) ต่อไป (F. Li et al., 2010) โดยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch สามารถเพิ่มผลผลิตได้มากกว่าการเลี้ยงแบบ batch เป็นอย่างมากดังรายงานของ Fourn V. L. และคณะ พบว่าการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch สามารถทำให้เซลล์ไลน์ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ในเซลล์ไลน์ CHO ได้มากกว่าวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ batch มากกว่า 3.5 เท่า (Le Fourn et al., 2014) แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้คัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการผลิตสูงสุด คัดเลือกเพียงเซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่มีพลาสมิดมาผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีแบบ batch cultivation เท่านั้น

ความสามารถในการจับของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ที่บริเวณ NRR ของ NOTCH ยับยั้งไม่ให้ metalloprotease มาตัดครั้งที่ 1 ที่บริเวณ S2 cleavage (Falk et al., 2012) อาจสามารถจับกับ NRR ที่กลายพันธุ์แบบ Missense mutation ซึ่งทำให้กรดอะมิโนเพียงตำแหน่งเดียวเปลี่ยนแปลงไปในเซลล์ไลน์และเซลล์จากผู้ป่วย T-ALL (Weng et al., 2004) และฤทธิ์ของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc อาจมีความใกล้เคียงกับการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch โดยใช้ GSI เนื่องจาก GSI มีผลยับยั้งการตัดครั้งที่ 2 ที่บริเวณ S3 cleavage ซึ่งเป็นขั้นตอนถัดจากการตัดโดย metalloprotease (Bray, 2016) ดังนั้น ผลการทดลองในส่วนฤทธิ์ของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc ต่อการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch การตายของเซลล์ และการลดความเป็น cancer stemness ในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt4 และ Jurkat อาจให้ผลที่คล้ายคลึงกับการใช้ GSI โดยรายงานของ Suwanjune S. และคณะ ใช้ DAPT ยับยั้งการทำงานของ NOTCH1 ในเซลล์ไลน์ Jurkat เป็นเวลา 4 วันพบว่า *Hes1* mRNA มีระดับที่ลดลงเมื่อเทียบกับ control (Suwanjune, Wongchana, & Palaga, 2008) ดังนั้น การใช้ α N1 scFv-Fc อาจจะสามารถลดปริมาณ NICD1 พร้อมกับ

ระดับของ *Hes1* และ *Hey1* mRNA ได้ นอกจากนี้รายงานดังกล่าวยังพบการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตรอดจากการทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดยการให้ยา DAPT แก่ Jurkat ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลงกว่า 30% ภายใน 4 วัน (Suwanjune et al., 2008) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Liu S. และคณะ พบว่าการใช้ Compound E ยับยั้งการทำงานของ NOTCH1 สามารถเพิ่มอัตราการ apoptosis ในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิด (Liu, Breit, Danckwardt, Muckenthaler, & Kulozik, 2009) ดังนั้นการใช้ α N1 scFv-Fc อาจสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ไลน์ Molt4 และ Jurkat โดยการตรวจสอบด้วยวิธี MTT หรือ apoptotic assay ในขณะที่การกลายของ *notch2* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรค B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) มากกว่า และยังไม่พบรายงานการกลายของ *notch2* ในผู้ป่วย T-ALL (Moore, Annett, McClements, & Robson, 2020; Siebel & Lendahl, 2017) จึงเป็นเหตุผลที่ไม่เคยมีรายงานการนำกลยุทธ์วิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการยับยั้งการส่งสัญญาณของ Notch2 ในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-ALL อย่างไรก็ตามการใช้ α N2 scFv-Fc ในการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch2 อาจสามารถทำได้ในเซลล์ไลน์ Jurkat และ Molt4 ที่มีการแสดงออกของ NOTCH2 อยู่มาก (รูปที่ 9) แต่อาจไม่ช่วยในการรักษาโรค T-ALL

Sharma A. และคณะ เคยรายงานการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ NOTCH1 สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน CD-34 ซึ่งเป็น cancer stemness marker บน peripheral blood lymphocyte ของผู้ป่วย T-ALL (Sharma et al., 2015) นอกจากนี้รายงานของ Suwanjune S. พบว่าการใช้ DAPT ยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน NOTCH1 สามารถลดระดับการแสดงออกของ c-Myc (cancer stemness marker) ในเซลล์ไลน์ Jurkat ได้ (Suwanjune et al., 2008) ดังนั้นการใช้ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc อาจสามารถลดระดับการแสดงออกของ cancer stemness marker ต่าง ๆ บนเซลล์ไลน์ Molt4 และ Jurkat ได้เช่นเดียวกัน

อย่างไรก็ตามวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้ตั้งเพื่อศึกษาฤทธิ์ของ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc เฉพาะใน *in vitro* ความสามารถของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อการรักษามะเร็งในสัตว์ทดลองอาจให้ภาพความเข้าใจเกี่ยวกับ α N1 scFv-Fc และ α N2 scFv-Fc มากขึ้น และมีความจำเป็นต่อการพัฒนาวิธีการรักษาโดยใช้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิดนี้ รวมถึงการทดลองยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดอื่นก็จำเป็นเช่น การใช้ α N2 scFv-Fc ในการทดสอบกับเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด B-ALL เพื่อตีงประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดนี้ออกมาให้ได้มากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- Azzoni, A. R., Ribeiro, S. C., Monteiro, G. A., & Prazeres, D. M. (2007). The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J Gene Med*, *9*(5), 392-402. doi:10.1002/jgm.1031
- Borggreffe, T., & Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci*, *66*(10), 1631-1646. doi:10.1007/s00018-009-8668-7
- Bray, S. J. (2016). Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *17*(11), 722-735. doi:10.1038/nrm.2016.94
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol*, *11*(1), 64. doi:10.1186/s13045-018-0605-5
- Chu, L., & Robinson, D. K. (2001). Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol*, *12*(2), 180-187. doi:10.1016/s0958-1669(00)00197-x
- Dahodwala, H., Kaushik, P., Tejwani, V., Kuo, C. C., Menard, P., Henry, M., . . . Sharfstein, S. T. (2019). Increased mAb production in amplified CHO cell lines is associated with increased interaction of CREB1 with transgene promoter. *Curr Res Biotechnol*, *1*, 49-57. doi:10.1016/j.crbiot.2019.09.001
- Deangelo, D. J., Stone, R. M., Silverman, L. B., Stock, W., Attar, E. C., Fearen, I., . . . Aster, J. A. (2016). A phase I clinical trial of the notch inhibitor MK-0752 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and other leukemias. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(18).
- Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., . . . Mitsiades, C. S. (2011). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*, *146*(6), 904-917. doi:10.1016/j.cell.2011.08.017
- Falk, R., Falk, A., Dyson, M. R., Melidoni, A. N., Parthiban, K., Young, J. L., . . . McCafferty, J. (2012). Generation of anti-Notch antibodies and their application in blocking Notch signalling in neural stem cells. *Methods*, *58*(1), 69-78. doi:10.1016/j.ymeth.2012.07.008
- Fan, L., Kadura, I., Krebs, L. E., Hatfield, C. C., Shaw, M. M., & Frye, C. C. (2012). Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. *Biotechnol Bioeng*, *109*(4), 1007-1015. doi:10.1002/bit.24365

- Ferrando, A. A. (2009). The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 353-361. doi:10.1182/asheducation-2009.1.353
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 435(7044), 964-968. doi:10.1038/nature03589
- Gentles, A. J., Plevritis, S. K., Majeti, R., & Alizadeh, A. A. (2010). Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*, 304(24), 2706-2715. doi:10.1001/jama.2010.1862
- Golde, T. E., Koo, E. H., Felsenstein, K. M., Osborne, B. A., & Miele, L. (2013). gamma-Secretase inhibitors and modulators. *Biochim Biophys Acta*, 1828(12), 2898-2907. doi:10.1016/j.bbamem.2013.06.005
- Gordon, W. R., Roy, M., Vardar-Ulu, D., Garfinkel, M., Mansour, M. R., Aster, J. C., & Blacklow, S. C. (2009). Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. *Blood*, 113(18), 4381-4390. doi:10.1182/blood-2008-08-174748
- Gottlieb, R. A., Nordberg, J., Skowronski, E., & Babior, B. M. (1996). Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(2), 654-658. doi:10.1073/pnas.93.2.654
- Handford, P. A., Korona, B., Suckling, R., Redfield, C., & Lea, S. M. (2018). Structural Insights into Notch Receptor-Ligand Interactions. *Adv Exp Med Biol*, 1066, 33-46. doi:10.1007/978-3-319-89512-3_2
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*, 23(9), 1126-1136. doi:10.1038/nbt1142
- Huang, X., Xiong, M., Jin, Y., Deng, C., Xu, H., An, C., . . . Zhang, Q. (2016). Evidence that high-migration drug-surviving MOLT4 leukemia cells exhibit cancer stem cell-like properties. *Int J Oncol*, 49(1), 343-351. doi:10.3892/ijo.2016.3526
- Iso, T., Sartorelli, V., Chung, G., Shichinohe, T., Kedes, L., & Hamamori, Y. (2001). HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding. *Mol Cell Biol*, 21(17), 6071-6079. doi:10.1128/mcb.21.17.6071-6079.2001
- Jiang, Z., Huang, Y., & Sharfstein, S. T. (2006). Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number,

- mRNA level, and protein expression. *Biotechnol Prog*, 22(1), 313-318. doi:10.1021/bp0501524
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. (2004). Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(6), 499-504. doi:10.1038/nrm1406
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2), 216-233. doi:10.1016/j.cell.2009.03.045
- Le Fourn, V., Girod, P. A., Buceta, M., Regamey, A., & Mermod, N. (2014). CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion. *Metab Eng*, 21, 91-102. doi:10.1016/j.ymben.2012.12.003
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. Y., Kiss, R., & Amanullah, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*, 2(5), 466-479. doi:10.4161/mabs.2.5.12720
- Li, N., Fassl, A., Chick, J., Inuzuka, H., Li, X., Mansour, M. R., . . . Sicinski, P. (2014). Cyclin C is a haploinsufficient tumour suppressor. *Nat Cell Biol*, 16(11), 1080-1091. doi:10.1038/ncb3046
- Liu, S., Breit, S., Danckwardt, S., Muckenthaler, M. U., & Kulozik, A. E. (2009). Downregulation of Notch signaling by gamma-secretase inhibition can abrogate chemotherapy-induced apoptosis in T-ALL cell lines. *Ann Hematol*, 88(7), 613-621. doi:10.1007/s00277-008-0646-x
- Lopez-Nieva, P., Gonzalez-Sanchez, L., Cobos-Fernandez, M. A., Cordoba, R., Santos, J., & Fernandez-Piqueras, J. (2021). More Insights on the Use of gamma-Secretase Inhibitors in Cancer Treatment. *Oncologist*, 26(2), e298-e305. doi:10.1002/onco.13595
- Moore, G., Annett, S., McClements, L., & Robson, T. (2020). Top Notch Targeting Strategies in Cancer: A Detailed Overview of Recent Insights and Current Perspectives. *Cells*, 9(6). doi:10.3390/cells9061503
- Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A., & Ghasemi, Y. (2018). A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *Eur J Cell Biol*, 97(6), 422-441. doi:10.1016/j.ejcb.2018.06.003
- Palomero, T., Lim, W. K., Odom, D. T., Sulis, M. L., Real, P. J., Margolin, A., . . . Ferrando, A. A. (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(48), 18261-18266. doi:10.1073/pnas.0606108103

- Ran, Y., Hossain, F., Pannuti, A., Lessard, C. B., Ladd, G. Z., Jung, J. I., . . . Golde, T. E. (2017). gamma-Secretase inhibitors in cancer clinical trials are pharmacologically and functionally distinct. *EMBO Mol Med*, *9*(7), 950-966. doi:10.15252/emmm.201607265
- Real, G., Monteiro, F., Burger, C., & Alves, P. M. (2011). Improvement of lentiviral transfer vectors using cis-acting regulatory elements for increased gene expression. *Appl Microbiol Biotechnol*, *91*(6), 1581-1591. doi:10.1007/s00253-011-3392-2
- Roser, M., & Ritchie, H. (2015, November 2019). Cancer. Retrieved from <https://ourworldindata.org/cancer>
- Saygin, C., Matei, D., Majeti, R., Reizes, O., & Lathia, J. D. (2019). Targeting Cancer Stemness in the Clinic: From Hype to Hope. *Cell Stem Cell*, *24*(1), 25-40. doi:10.1016/j.stem.2018.11.017
- Selkoe, D., & Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*, *26*, 565-597. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131334
- Sharma, A., Gadkari, R. A., Ramakanth, S. V., Padmanabhan, K., Madhumathi, D. S., Devi, L., . . . Dighe, R. R. (2015). A novel Monoclonal Antibody against Notch1 Targets Leukemia-associated Mutant Notch1 and Depletes Therapy Resistant Cancer Stem Cells in Solid Tumors. *Sci Rep*, *5*, 11012. doi:10.1038/srep11012
- Siebel, C., & Lendahl, U. (2017). Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev*, *97*(4), 1235-1294. doi:10.1152/physrev.00005.2017
- Staal, F. J., & Langerak, A. W. (2008). Signaling pathways involved in the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, *93*(4), 493-497. doi:10.3324/haematol.12917
- Statistics. (2021). Leukemia - Acute Lymphocytic - ALL: Statistics. *Cancer.Net*. Retrieved from <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-acute-lymphocytic-all/statistics>
- Suwanjune, S., Wongchana, W., & Palaga, T. (2008). Inhibition of gamma-secretase affects proliferation of leukemia and hepatoma cell lines through Notch signaling. *Anticancer Drugs*, *19*(5), 477-486. doi:10.1097/CAD.0b013e3282fc6cdd
- Tohda, S. (2014). NOTCH signaling roles in acute myeloid leukemia cell growth and interaction with other stemness-related signals. *Anticancer Res*, *34*(11), 6259-6264.
- Wang, H., Zang, C., Liu, X. S., & Aster, J. C. (2015). The role of Notch receptors in transcriptional regulation. *J Cell Physiol*, *230*(5), 982-988. doi:10.1002/jcp.24872

- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., . . . Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, *306*(5694), 269-271. doi:10.1126/science.1102160
- WHO. (2021). Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability. Retrieved from <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*, *22*(11), 1393-1398. doi:10.1038/nbt1026
- Yang, F., Nickols, N. G., Li, B. C., Marinov, G. K., Said, J. W., & Dervan, P. B. (2013). Antitumor activity of a pyrrole-imidazole polyamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(5), 1863-1868. doi:10.1073/pnas.1222035110
- Yin, X., Zhang, B. H., Zheng, S. S., Gao, D. M., Qiu, S. J., Wu, W. Z., & Ren, Z. G. (2015). Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling. *J Hematol Oncol*, *8*, 23. doi:10.1186/s13045-015-0119-3
- Zhao, W., Li, Y., & Zhang, X. (2017). Stemness-Related Markers in Cancer. *Cancer Transl Med*, *3*(3), 87-95. doi:10.4103/ctm.ctm_69_16
- Zuniga, R. A., Gutierrez-Gonzalez, M., Collazo, N., Sotelo, P. H., Ribeiro, C. H., Altamirano, C., . . . Molina, M. C. (2019). Development of a new promoter to avoid the silencing of genes in the production of recombinant antibodies in chinese hamster ovary cells. *J Biol Eng*, *13*, 59. doi:10.1186/s13036-019-0187-y

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และเชื้อแบคทีเรีย

1. Complete F-12K media

F-12K medium	36	มิลลิลิตร
FBS	4	มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	40	มิลลิลิตร

เท F-12K medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติม FBS 4 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากัน เติม F-12K เพิ่มเข้าไป 10 มิลลิลิตร และเขย่าให้อาหารเลี้ยงเซลล์เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย F-12K จนได้ 40 มิลลิลิตร

2. Complete RPMI 1640

RPMI 1640 medium	35.2	มิลลิลิตร
FBS	4	มิลลิลิตร
HEPES	400	ไมโครลิตร
Sodium pyruvate	400	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	40	มิลลิลิตร

เท RPMI 1640 medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติม FBS 4 มิลลิลิตร HEPES และ Sodium pyruvate 400 ไมโครลิตร พร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากัน เติม RPMI 1640 เพิ่มเข้าไป 10 มิลลิลิตร และเขย่าให้อาหารเลี้ยงเซลล์เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย RPMI 1640 จนได้ 40 มิลลิลิตร

3. อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเก็บเซลล์ระยะยาว (Freezing media)

Freezing media สำหรับเซลล์ไลน์ Molt4

Complete media	9	มิลลิลิตร
DMSO	1	มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	10	มิลลิลิตร

Freezing media สำหรับเซลล์ไลน์ Jurkat และ CHO-K1

Complete media	9.5	มิลลิลิตร
DMSO	0.5	มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	10	มิลลิลิตร

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Lauria-Bertani (LB) broth (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

Bacto™ Tryptone	10 กรัม
Bacto™ Yeast Extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม

ช่างสารเคมีตามรายการและนำมาละลายด้วย DI ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารละลายกลายเป็นเนื้อเดียว ปรับ pH ให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB agar (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

Bacto™ Tryptone	10 กรัม
Bacto™ Yeast Extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม

ให้ความร้อนเพื่อทำละลาย Tryptone Yeast Extract และ NaCl ด้วย DI ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 7.4 เติม Agar ลงไปให้ความร้อนอีกครั้งจน Agar ละลายและปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียาแอมพิซิลลิน (LBA agar)

นำ LB agar ที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วมาทำละลายและเติม Ampicillin ในอาหารให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สูตรและการเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย

1. Binding buffer pH 7.4

Sodium phosphate	20 มิลลิโมลาร์
NaCl	0.5 โมลาร์
Imidazole	40 มิลลิโมลาร์

คำนวณสารตามสูตรด้านบนละลายใน DI ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4 จากนั้นนำไปกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

2. Elution buffer pH 7.4

Sodium phosphate	20 มิลลิโมลาร์
NaCl	0.5 โมลาร์
Imidazole	500 มิลลิโมลาร์

คำนวณสารตามสูตรด้านบนละลายใน DI ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4 จากนั้นนำไปกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3. 1x PBS pH 7.4

NaCl	8 กรัม
KCl	0.2 กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24 กรัม
ปริมาตรสุทธิ	1 ลิตร

ละลายสารต่าง ๆ ข้างต้นด้วยน้ำ DI ปริมาตร 800 มิลลิลิตรและปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับ ปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สารละลาย 1 M Tris-HCl pH 6.8

Tris base	60.57 กรัม
ปริมาตรสุทธิ	500 มิลลิลิตร

ทำละลายสารข้างต้นด้วย DI ปริมาตร 400 มิลลิลิตรและปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 6.8 จากนั้นปรับ ปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลาย 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Tris base	90.855	กรัม
ปริมาตรสุทธิ	500	มิลลิลิตร

ละลายสารข้างต้นด้วย DI ปริมาตร 400 มิลลิลิตรและปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. สารละลาย 10% (W/V) Ammonium Persulfate (APS)

APS	0.1	กรัม
ปริมาตรสุทธิ	1	มิลลิลิตร

7. สารละลาย 10% (W/V) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) pH 7.2

SDS	5	กรัม
ปริมาตรสุทธิ	50	มิลลิลิตร

ละลายสารข้างต้นด้วย DI ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.2 จากนั้นปรับปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร

8. การเตรียมเจลเพื่อทำ SDS-PAGE

การเตรียม Separating gel

ตารางที่ ข1 ตารางแสดงสูตรการเตรียม Separating gel ที่ความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์

สารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมเจล	8% เจล	10% เจล	หน่วย
Type I water	4.236	3.836	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis	1.6	2	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2	2	มิลลิลิตร
10% SDS	0.08	0.08	มิลลิลิตร
10% APS	0.08	0.08	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	0.004	มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	8	8	มิลลิลิตร

การเตรียม Stacking gel

ตารางที่ ข2 ตารางแสดงสูตรการเตรียม Stacking gel

สารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมเจล	5% เจล	หน่วย
Type I water	1.204	มิลลิลิตร
40% Acrylamide/Bis	0.25	มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	0.504	มิลลิลิตร
10% SDS	0.02	มิลลิลิตร
10% APS	0.02	มิลลิลิตร
TEMED	0.002	มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	2	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Separating gel และ Stacking gel ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร โดยที่ยังไม่ได้ใส่ TEMED หลังจากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากันโดยเกิดฟองน้อยที่สุด แล้วเติม TEMED ลงในสารละลาย Separating gel พร้อมทั้งผสมให้เข้ากันโดยเกิดฟองน้อยที่สุดและเทสารละลาย Separating gel ลงในกระจกเตรียมเจลที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว และเติมน้ำ Type I ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ปกคลุมผิวหน้าของ Separating gel ทันทันที และทิ้งไว้ 45 นาที เพื่อให้ Separating gel แข็งตัว เมื่อครบเวลาเทน้ำ Type I ออกจาก Separating gel แล้วเติม TEMED ลงในสารละลาย Stacking gel แล้วผสมให้เข้ากันโดยให้เกิดฟองน้อยที่สุด จากนั้นเทสารละลาย Stacking gel ลงบน Separating gel และใส่หัวที่ทันทีเมื่อเทสารละลายเสร็จพร้อมทิ้งไว้เป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว

9. สารละลาย 2x Loading buffer

10% SDS	4 มิลลิลิตร
87% Glycerol	2.29 มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	1 มิลลิลิตร
Type I water	2.71 มิลลิลิตร
Bromophenol Blue	1 มิลลิกรัม
ปริมาตรสุทธิ	10 มิลลิลิตร

10. สารละลาย 2x Loading dye

β -mercaptoethanol	100 ไมโครลิตร
2x Loading buffer	900 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	1 มิลลิลิตร

11. RIPA buffer

Tris-HCl	50 มิลลิโมลาร์
NaCl	150 มิลลิโมลาร์
Nonidet P40 Substitute	1% (V/V)
Sodium Deoxycholate	0.5% (W/V)
SDS	0.1% (W/V)
100x Protease inhibitor	1x
Type I water	

12. 5x Running buffer

Trisma-base	15.1 กรัม
Glycine	94 กรัม
SDS	5 กรัม
ปริมาตรสุทธิ	1 ลิตร

ละลายสารต่าง ๆ ข้างต้นด้วยน้ำ DI ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

13. Transfer buffer

Trisma-base	5.08 กรัม
Glycine	2.9 กรัม
SDS	0.37 กรัม
Absolute methanol	200 มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	1 ลิตร

ละลายสารต่าง ๆ ข้างต้นด้วยน้ำ DI ปริมาตร 700 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Absolute methanol 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

14. Film developer

Developer	10 มิลลิลิตร
Type II water	40 มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 มิลลิลิตร

15. Film fixer

Fixer	10 มิลลิลิตร
Type II water	40 มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 มิลลิลิตร

16. PBST

1x PBS	1000 มิลลิลิตร
Tween20	500 ไมโครลิตร

17. Blocking solution

Skim milk	3 กรัม
PBST	100 มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	100 มิลลิลิตร

ละลาย skim milk ใน PBST ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จนเห็นเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรให้กลายเป็น 100 มิลลิลิตร

18. สารละลายซึบสเตรทสำหรับ Western Blot

90 mM Coumaric acid	11 ไมโครลิตร
250 mM luminol	25 ไมโครลิตร
H ₂ O ₂	1.5 ไมโครลิตร
100 mM Tris-HCl, pH 8.5	5 มิลลิลิตร

เติม 100 mM Tris-HCl, pH 8.5 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด หลอดที่ 1 เติม Coumaric acid และหลอดที่ 2 เติม luminol และ H₂O₂ เก็บสารละลายทั้ง 2 หลอดไว้ในที่ที่ไม่มีแสงตลอดช่วงเวลาก่อนใช้งาน

19. Destain solution

Absolute methanol	30 มิลลิลิตร
Acetic acid	10 มิลลิลิตร
Type II water	60 มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	100 มิลลิลิตร

ผสมข้างต้นให้เข้ากัน และปรับปริมาตรสุทธิด้วยน้ำ Type II ให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

20. Soak gel solution

Absolute methanol	300 มิลลิลิตร
Glycerol	50 มิลลิลิตร
Type II water	650 มิลลิลิตร
ปริมาตรสุทธิ	1 ลิตร

ผสมข้างต้นให้เข้ากัน และปรับปริมาตรสุทธิด้วยน้ำ Type II ให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

21. สารละลายยับยั้งสำหรับ ELISA

TMB	5 มิลลิกรัม
TMB buffer	20 มิลลิลิตร
DMSO	500 ไมโครลิตร
H ₂ O ₂	5 ไมโครลิตร

ชั่ง TMB ตามปริมาณที่ต้องการ ละลายด้วย DMSO และเก็บไว้ในที่ที่ไม่มีแสงเมื่อนำมาใช้งานเติม H₂O₂ แล้วนำสารละลายทั้งหมดมาผสมกับ TMB buffer จึงพร้อมใช้งาน

ภาคผนวก ค

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่ใช้ในโครงการ

1. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี

anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 sequence 7010 bps

1	GGTACCGAAT	TCACATTGAT	TATTGACTAG	TTATTAATAG	TAATCAATTA	CGGGGTCATT	AGTTCATAGC
71	CCATATATGG	AGTTCCGCGT	TACATAACTT	ACGGTAAATG	GCCCCGCTGG	CTGACCGCCC	AACGACCCCC
141	GCCCAATTGAC	GTCAATAATG	ACGTATGTTC	CCATAGTAAC	GCCAATAGGG	ACTTTCCATT	GACGTCAATG
211	GGTGGAGTAT	TTACGGTAAA	CTGCCCACTT	GGCAGTACAT	CAAGTGATC	ATATGCCAAG	TCCGCCCCCT
281	ATTGACGTCA	ATGACGGTAA	ATGGCCCGCC	TGGCATTATG	CCCAGTACAT	GACCTTACGG	GACTTTCCTA
351	CTTGGCAGTA	CATCTACGTA	TTAGTCATCG	CTATTACCAT	AGTGATGCGG	TTTTGGCAGT	ACACCAATGG
421	GCGTGGATAG	CGGTTTGACT	CACGGGGATT	TCCAAGTCTC	CACCCCAATTG	ACGTCAATGG	GAGTTTGTTT
491	TGGCACCAAA	ATCAACGGGA	CTTTCCAAAA	TGTCGTAATA	ACCCCGCCCC	GTTGACGCAA	ATGGGCGGTA
561	GGCGTGTACG	GTGGGAGGTC	TATATAAGCA	GAGCTCGTTT	AGTGAACCGT	CAGATCCTCA	CTCTCTCCG
631	CATCGCTGTC	TGCGAGGGCC	AGCTGTTGGG	CTCGCGGTTG	AGGACAACT	CTTCGCGGTC	TTTCCAGTAC
701	TCTTGGATCG	GAAACCCGTC	GGCCTCCGAA	CGGTACTCCG	CCACCGAGGG	ACCTGAGCGA	GTCCGCATCG
771	ACCGGATCGG	AAAACCTCTC	GTGAAAGGCG	TCTAACCACT	CACAGTCGCA	AGGTAGGCTG	AGCACCGTGG
841	CGGGCGCGAG	CGGGTGCGGG	TCGGGGTTGT	TTCTGGCGGA	GGTGCTGCTG	ATGATGTAAT	TAAAGTAGGC
911	GGTCTTGAGA	CGGGCGATGG	TCGAGGTGAG	GTGTGGCAGG	CTTGAGATCC	AGCTGTTGGG	GTGAGTACTC
981	CCTCTCAAAA	GCGGGCATT	CTTCTGCGCT	AAGATTGTCA	GTTTCCAAAA	ACGAGGAGGA	TTTGATATTC
1051	ACCTGGCCCG	ATCTGGCCAT	ACACTTGAGT	GACAATGACA	TCCACTTTGC	CTTTCTCTCC	ACAGGTGTCC
1121	ACTCCCAGGT	CCAAGTTTGT	GGAAATTAAT	ACGACGTGGC	CACCATGAGT	TGGAGCTGTA	TCATCCTCTT
1191	CTTGGTAGCA	ACAGCTACAG	GTAAGGGGTT	AACAGTAGCA	GGCTTGAGGT	CTGACATAT	ATATGGGTGA
1261	CAATGACATC	CACCTTGCCT	TTCTCTCCAC	AGGCGCCATG	GCCCAGGTAC	AGCTGCAGCA	GTGAGTCCA
1331	GGACTGTTGA	AGCCCTCGCA	GACCCCTCA	CTCACCTGTG	CCATCTCCGG	GGACAGTGTG	TCTAGCAACA
1401	GTGCTGCTTG	GAACTGGATC	AGGACAGTCCC	CATCGAGAGG	CCTTGAGTGG	CTGGGAAGGA	CATACTACAG
1471	GTCCAAGTGG	TATAATGATT	ATGCAGTATC	TGTGAAAAGT	CGAATAACCA	TCAACCCAGA	CACATCCAAG
1541	AACCAAGTCT	CCCTGCAGCT	GAACTCTGTG	ACTCCCGAGG	ACACGGCTGT	GTATTACTGT	GCAAGGGGGG
1611	GGGAGAACTG	GGGATTCGGG	TTTGACTACT	GGGGCCAGGG	AACCTGGTCT	ACCGTCTCCT	CACTCGAGGG
1681	TGGAGGCGGT	TCAGGCGGAG	GTGGCTCTGG	CGGTGGCGCT	AGCCAGTCTG	TGCTGACTCA	GCCACCCTCA
1751	GCGTCTGGGC	CCCCCGGGCA	GAGGGTCACC	ATCTCGTGT	CTGGGAAGCAG	GTCCAACATC	GGGGCTATA
1821	CTGTAAACTG	GTACCAGCAC	CTCCCAGGGA	CGGCCCCCAA	AGTCATCATC	CATAGTAATA	AGCAGCGGCC
1891	CTCAGGGGTC	CCTGACCGAT	TCTCTGGCTC	CAAGTCTGGC	ACCTCAGCCT	CCCTGGCCAT	CACTGGGCTC
1961	CAGGCTGAAG	ATGAGGCTGA	TTATTACTGC	CAGTCGTATG	ACAGCAGGCT	GCGCGGCTGG	GTCTTCGGCG
2031	GAGGGACCAA	GCTGACCGTC	CTAGGTGCGG	CCGCAGACAA	GACCCACACC	TGCCCTCCAT	GTCTGCCCC
2101	TGAGCTGCTG	GGCGGACCCCT	CCGTGTTCTT	GTTCCCTCTT	AAGCCTAAGG	ACACCTGAT	GATCTCCCGG
2171	ACCCCTGAAG	TGACCTGCGT	GGTGGTGGAC	GTGTCCCACG	AAGATCCTGA	AGTGAAGTTC	AATTGGTACG
2241	TGGACGCGGT	GGAGGTGCAC	AACGCCAAGA	CCAAGCCTCG	GGAGGAACAG	TACAACCTCA	CCTACCGGGT
2311	GGTGTCTGTG	CTGACCGTGC	TGCACCAAGGA	CTGGCTGAAC	GGCAAAGAAT	ACAAGTGCAA	GGTGTC AAC
2381	AAGGCCCTGC	CTGCCCCTAT	CGAAAAGACC	ATCTCCAAGG	CTAAGGGCCA	GCCACGGGAA	CCTCAGGTCT
2451	ACACACTGCC	TCCTAGCCGG	GACGAGCTGA	CCAAGAACCA	GGTGTCCCTG	ACCTGTCTGG	TGAAGGGCTT
2521	CTACCCCTCC	GATATCGCCG	TGGAGTGGGA	GTCTAACGGC	CAGCCTGAGA	ACAACCTACAA	GACCACCCTT
2591	CCTGTGCTGG	ACTCCGACGG	CTCCTTCTTC	CTGTACTCCA	AGCTGACCGT	GGACAAGTCC	CGGTGGCAGC
2661	AGGGCAACGT	GTTCTCCTGC	TCCGTGATGC	ACGAGGCCCT	GCACAACCAC	TACACCAGA	AGTCCCTGTC
2731	CCTGTCTCCT	GGCAAGGGAT	CCCATCATCA	TCACCATCAC	AAGCTGGACT	ACAAAGACCA	TGACGGTGAT
2801	TATAAAGATC	ATGACATCGA	TTACAAGGAT	GACGATGACA	AGTAATAAAA	GCTTACGACG	TGATCAGCCT
2871	CGACTGTGCC	TTCTAGTTGC	CAGCCATCTG	TTGTTTGCCC	CTCCCCGTG	CCTTCTTGA	CCCTGGGAAGG
2941	TGCCACTCCC	ACTGTCTTTT	CCTAATAAAA	TGAGGAAATT	GCATCGCATT	GTCTGAGTAG	GTGTCAATTCT
3011	ATTCTGGGGG	GTGGGGTGGG	GCAGGACAGC	AAGGGGGAGG	ATTGGGAAGA	CAATAGCAGG	CATGTGGGGG
3081	ATGGCCCGGG	CTCTATGGCT	TCTGAGGCGG	AAAGAACCAG	CTGGGGCTCT	AGGGGGTATC	CCCACGCGCC
3151	CTGTAGCGGC	GCATTAAGCG	CGGCGGGTGT	GGTGGTTACG	CGCAGCGTGA	CCGCTACACT	TGCCAGCGCC
3221	CTAGCGCCCG	CTCCTTTCGC	TTTTCTCCCT	TCCTTTCTCG	CCACGTTTCG	CGGCTTCCC	CGTCAAGCTC
3291	TAAATCGGGG	GCTCCCTTTA	GGGTTCCGAT	TTAGTGCTTT	ACGGCACCTC	TCCCCCAAAA	AACTTGATTA
3361	GGGTGATGGT	TCACGTAGTG	GGCCATCGCC	CTGATAGACG	GTTTTTCGCC	CTTTGACGTT	GGAGTCCACG

3431	TTCTTTAATA	GTGGACTCTT	GTTCCAAACT	GGAACAACAC	TCAACCCTAT	CTCGGTCTAT	TCTTTTGATT
3501	TATAAGGGAT	TTTGCCGATT	TCGGCCTATT	GGTTAAAAAA	TGAGCTGATT	TAACAAAAAT	TTAACGCGAA
3571	TTAATCTGT	GGAAATGTGTG	TCAGTTAGGG	TGTGAAAAGT	CCCCAGGCTC	CCCAGCAGGC	AGAAGTATGC
3641	AAAGCATGCA	TCTCAATTAG	TCAGCAACCA	GGTGTGAAA	GTCCCCAGGC	TCCCCAGCAG	GCAGAAGTAT
3711	GCAAAGCATG	CATCTCAATT	AGTCAGCAAC	CATAGTCCCG	CCCCTAACTC	CGCCCATCCC	GCCCCTAACT
3781	CCGCCAGTT	CCGCCAATC	TCCGCCCTA	GGCTGACTAA	TTTTTTTTAT	TTATGCAGAG	GCCGAGGCCG
3851	CCTCTGCTC	TGAGCTATTC	CAGAAGTAGT	GAGGAGGCTT	TTTTGGAGGC	CTAGGCTTTT	GCAAAAAGCT
3921	CCCCCCCCGG	GAGGTCCACA	ATGGTTGAAC	AAGATGGATT	GCACGCAGGT	TCTCCGGCCG	CTTGGGTGGA
3991	GAGGCTATTC	GGCTATGACT	GGGCACAACA	GACAATCGGC	TGCTCTGATG	CCGCCGTGTT	CCGGCTGTCA
4061	GCGCAGGGGC	GCCCCGTTCT	TTTTGTCAAG	ACCGACTGTG	CCGGTGCCCT	GAATGAACTC	CAGGACGAGG
4131	CAGCGGGCT	ATCGTGGCTG	GCCACGACGG	GCGTTCCTTG	CGCAGCTGTG	CTCGACGTTG	TCACTGAAGC
4201	GGGAAGGGAC	TGGCTGCTAT	TGGGCGAAGT	GCCGGGGCAG	GATCTCCTGT	CATCTCACCT	TGCTCTGCC
4271	GAGAAAGTAT	CCATCATGGC	TGATGCAATG	CGGCGGTGC	ATACGCTTGA	TCCGGCTACC	TGCCATTTCG
4341	ACCACCAAGC	GAAACATCGC	ATCGAGCGAG	CACGTAICTG	GATGGAAGCC	GGCTTTGTCG	ATCAGGATGA
4411	TCTGGACGAA	GAGCATCAGG	GGCTCGCGCC	AGCCGAACTG	TTCGCCAGGC	TCAAGCGCG	TATGCCCGAC
4481	GGCGAGGATC	TCGTCTGAC	TCATGGCGAT	GCCTGCTTGC	CGAATATCAT	GGTGGAAAAT	GGCCGCTTTT
4551	CTGATTTCAT	CGACTGTGGC	CGGCTGGGTG	TGGCGGACCG	CTATCAGGAC	ATAGCGTTGG	CTACCCGTGA
4621	TATTGTGAA	GAGCTTGGCG	GCGAATGGGC	TGACCGCTTC	CTCGTGCTTT	ACGGTATCGC	CGCTCCCGAT
4691	TCGCAGCGCA	TCGCCTTCTA	TCGCCTTCTT	GACGAGTCT	TCTGAGCGGG	ACTCTGGGGT	TCGAAATGAC
4761	CGACCAAGCG	ACGCCCAACC	TGCCATCACG	AGATTTCGAT	TCCACCGCCG	CCTTCTATGA	AAGGTTGGGC
4831	TTGGAATCG	TTTTCCGGGA	CGCCGCTGG	ATGATCTCC	AGCGCGGGGA	TCTCATGCTG	GAGTCTTCG
4901	CCCACCCCAA	CTTGTTTATT	GCAGTTATA	ATGGTTACAA	ATAAAGCAAT	AGCATCACAA	ATTTACAAA
4971	TAAAGCATT	TTTTCACTGC	ATTCTAGTTG	TGGTTTGTCC	AAACTCATCA	ATGTATCTTA	TCATGTCTGT
5041	ATACCGTCGA	TCTTCCGCT	TCCTCGCTCA	CTGACTCGCT	GCGCTCGGTC	GTTCCGCTGC	GGCGAGCGGT
5111	ATCAGCTCAC	TCAAAGGCGG	TAATACGTT	ATCCACAGAA	TCAGGGGATA	ACGCAGGAAA	GAACATGTGA
5181	GCAAAAGGCC	AGCAAAAGGC	CAGGAACCGT	AAAAAGGCCG	CGTTGCTGGC	GTTTTCCAT	AGGCTCCGCC
5251	CCCCTGACGA	GCATCACAAA	AATCGACGCT	CAAGTCAGAG	GTGGCGAAAC	CCGACAGGAC	TATAAAGATA
5321	CCAGGGCTTT	CCCCCTGGAA	GCTCCCTCGT	GCGCTCTCCT	GTTCCGACCC	TGCGCTTAC	CGGATACCTG
5391	TCCGCCTTTC	TCCCTTCGGG	AAGCGTGGCG	CTTCTCATA	GCTCACGCTG	TAGGTATCTC	AGTTCGGTGT
5461	AGGTGCTTGC	CTCCAAGCTG	GGCTGTATGC	ACGAACCCCC	CGTTCAGCCC	GACCGCTGCG	CCTTATCCGG
5531	TAACTATCGT	CTTGAGTCCA	ACCCGTAAG	ACACGACTTA	TCGCCACTGG	CAGCAGCCAC	TGGTAACAGG
5601	ATTAGCAGAG	CGAGGTATGT	AGGCGGTGCT	ACAGAGTCT	TGAAGTGGTG	GCCTAACTAC	GGCTACACTA
5671	GAAGAACAGT	ATTTGTGATC	TGCGCTCTGC	TGAAGCCAGT	TACCTTCGGA	AAAAGAGTTG	GTAGTCTTGG
5741	ATCCGGCAAA	CAAACACCG	CTGGTAGCGG	TGGTTTTTTT	GTTTGCAAGC	AGCAGATTAC	GCGCAGAAAA
5811	AAAGGATCTC	AAGAAGATCC	TTTGATCTTT	TCTACGGGGT	CTGACGCTCA	GTGGAAAGAA	AACTCACGTT
5881	AAGGGATTTT	GGTCATGAGA	TTATCAAAAA	GGATCTTAC	CTAGATCCTT	TTAAATTAAT	AATGAAGTTT
5951	TAAATCAATC	TAAAGTATAT	ATGAGTAAAC	TTGGTCTGAC	AGTTACCAAT	GCTTAATCAG	TGAGGCACCT
6021	ATCTCAGCGA	TCTGTCTATT	TCGTTTATCC	ATAGTTGCCT	GACTCCCCGT	CGTGTAGATA	ACTACGATAC
6091	GGGAGGGCTT	ACCATCTGGC	CCCAGTGCTG	CAATGATACC	GCGGAGCCCA	CGCTCACCCG	CTCCAGATTT
6161	ATCAGCAATA	AACCAGCCAG	CCGGAAGGGC	CGAGCGCAGA	AGTGGTCTTG	CAACTTTATC	CGCCTCCATC
6231	CAGTCTATTA	ATTGTTGCCG	GGAAGCTAGA	GTAAGTAGTT	CGCCAGTTAA	TAGTTTGCGC	AACGTTGTTG
6301	CCATTGCTAC	AGGCATCGTG	GTGTCACGCT	CGTCGTTTGG	TATGGCTTCA	TTCAGTCCCG	GTTCCCAACG
6371	ATCAAGCGCA	GTTACATGAT	CCCCATGTT	GTGCAAAAA	GCGGTTAGCT	CCTTCGGTCC	TCCGATCGTT
6441	GTCAGAAGTA	AGTTGGCCGC	AGTGTTATCA	CTCATGGTTA	TGGCAGCACT	GCATAATTCT	CTTACTGTCA
6511	TGCCATCCGT	AAGATGCTTT	TCTGTGACTG	GTGAGTACTC	AACCAAGTCA	TTCTGAGAAT	AGTGTATGCG
6581	GCGACCGAGT	TGCTCTTGCC	CGGCGTCAAT	ACGGGATAAT	ACCGCGCCAC	ATAGCAGAAC	TTTAAAAGTG
6651	CTCATCATTG	GAAAACGTTT	TTCGGGGCGA	AAACTCTCAA	GGATCTTACC	GCTGTTGAGA	TCCAGTTCGA
6721	TGTAACCCAC	TCGGGCACCC	AACTGATCTT	CAGCATCTTT	TACTTTCACC	AGCGTTTCTG	GGTGAGCAAA
6791	AACAGGAAGG	CAAAATGCCG	CAAAAAAGGG	AATAAGGGCG	ACACGGAAAT	GTTGAATACT	CATACTCTTC
6861	CTTTTTCAAT	ATTATTGAAG	CATTTATCAG	GGTTATTGTC	TCATGAGCGG	ATACATATTT	GAATGTATTT
6931	AGAAAAATAA	ACAAATAGGG	GTTCCGCGCA	CATTTCCCGG	AAAAGTGCCA	CCTGACGTCA	GATCGACGGA
7001	TCGGGAGATC						

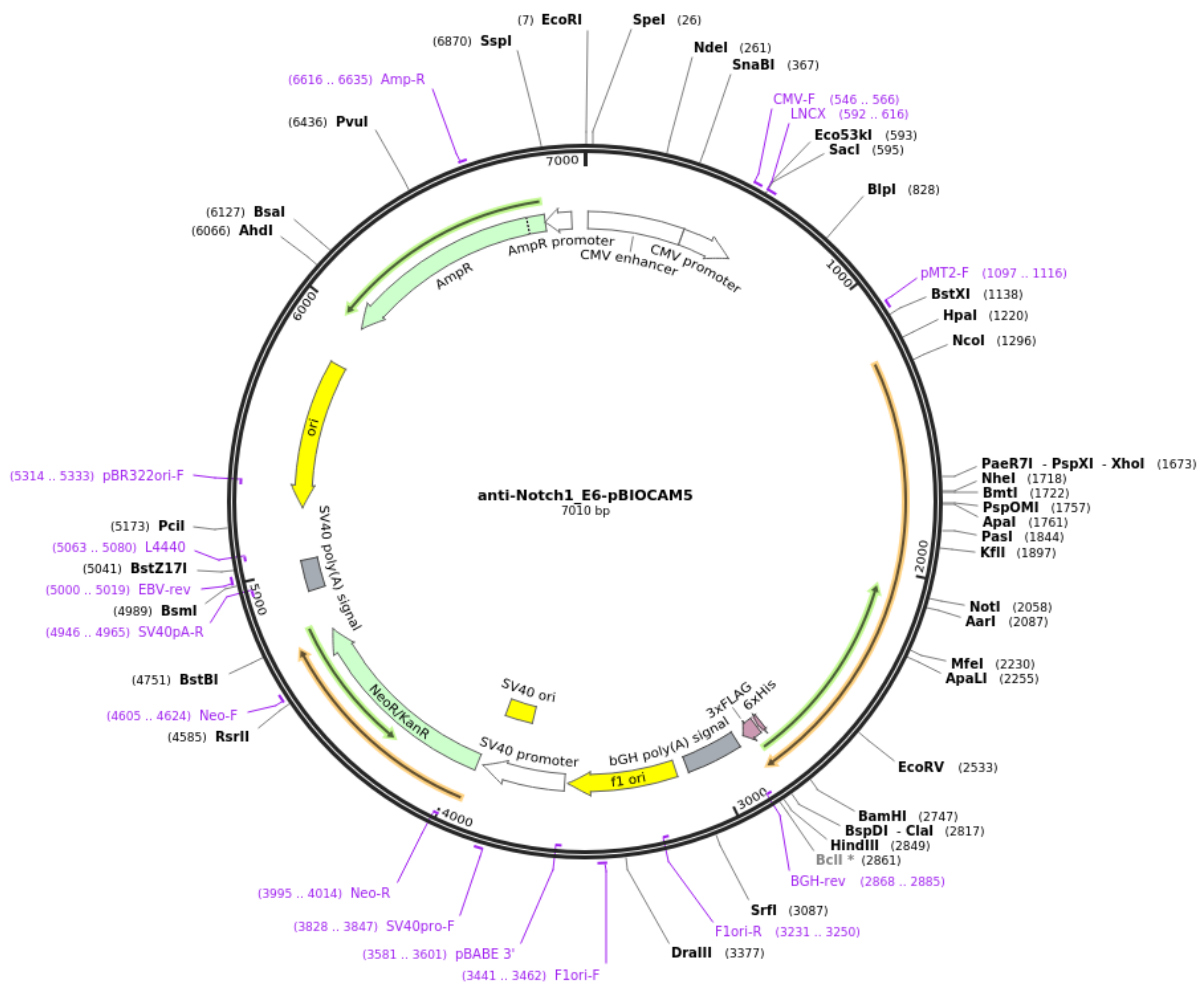
anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 sequence 6995 bps

1	GGTACCGAAT	TCACATTGAT	TATTGACTAG	TTATTAATAG	TAATCAATTA	CGGGGTCATT	AGTTCATAGC
71	CCATATATGG	AGTTCCGCGT	TACATAACTT	ACGGTAAATG	GCCCCCTGG	CTGACCGCC	AACGACCCCC
141	GCCCAATTGAC	GTCAATAATG	ACGTATGTTC	CCATAGTAAC	GCCAATAGGG	ACTTTCCATT	GACGTCATAG
211	GGTGGAGTAT	TTACGGTAAA	CTGCCCACTT	GGCAGTACAT	CAAGTGATC	ATATGCCAAG	TCCGCCCCCT
281	ATTGACGTCA	ATGACGGTAA	ATGGCCCGCC	TGGCATTATG	CCCAGTACAT	GACCTTACGG	GACTTTCTCA
351	CTTGGCAGTA	CATCTACGTA	TTAGTCATCG	CTATTACCAT	AGTGATGCGG	TTTTGGCAGT	ACACCAATGG
421	GCGTGGATAG	CGGTTTGACT	CACGGGGATT	TCCAAGTCTC	CACCCCATTG	ACGTCAATGG	GAGTTTGTTT
491	TGGCACAAA	ATCAACGGGA	CTTTCACAAA	TGTCGTAATA	ACCCCGCCCC	GTTGACGCAA	ATGGGCGGTA
561	GGCGTGTACG	GTGGGAGGTC	TATATAAGCA	GAGCTCGTTT	AGTGAACCGT	CAGATCCTCA	CTCTCTCCG
631	CATCGTGTGTC	TGCGAGGGCC	AGCTGTTGGG	CTCGCGGTTG	AGGACAACT	CTTCGCGGTC	TTTCCAGTAC
701	TCTTGGATCG	GAACCCGTC	GGCCTCCGAA	CGGTACTCCG	CCACCGAGGG	ACCTGAGCGA	GTCCGCATCG
771	ACCGGATCGG	AAAACCTCTC	GTGAAAGGCG	TCTAACCCAGT	CACAGTCGCA	AGGTAGGCTG	AGCACCGTGG
841	CGGGCGCAG	CGGGTGGCGG	TCGGGGTTGT	TTCTGGCGGA	GGTGCTGCTG	ATGATGTAAT	TAAAGTAGGC
911	GGTCTTGAGA	CGGCGGATGG	TCGAGGTGAG	GTGTGGCAGG	CTTGAGATCC	AGCTGTTGGG	GTGAGTACTC
981	CCTCTCAAAA	GCGGGCATT	CTTCTCGCCT	AAGATTGTCA	GTTTCAAAA	ACGAGGAGGA	TTTGATATT
1051	ACCTGGCCCG	ATCTGGCCAT	ACACTTGACT	GACAATGACA	TCCACTTTGC	CTTCTCTCC	ACAGGTGTCC
1121	ACTCCCAGGT	CCAAGTTTGT	GGAAATTAAT	ACGACGTGGC	CACCATGAGT	TGGAGCTGTA	TCATCCTCTT
1191	CTTGGTAGCA	ACAGCTACAG	GTAAGGGGTT	AACAGTAGCA	GGCTTGAGGT	CTGGACATAT	ATATGGGTGA
1261	CAATGACATC	CACCTTGCTC	TTCTCTCCAC	AGGCGCCATG	GCCCAGGTCC	AGCTTGTGCA	GTCTGGGGCT
1331	GAGGTGAAGA	AGCCTGGGGC	CTCAGTGAAG	GTTTCTGCA	AGGCTTCTGG	ATACACCTTC	ACTAGCTATG
1401	CTATGCATTG	GGTGCGCCAG	GCCCCCGGAC	AAAGGCTTGA	GTGGATGGGA	TGGATCAACG	CTGGCAATGG
1471	TAACACAAA	TATTCACAGA	AGTTCCAGGG	CAGAGTCACC	ATTACCAGGG	ACACATCCGC	GAGCACAGCC
1541	TACATGGAGC	TGAGCAGCCT	GAGATCTGAA	GACACGGCTG	TGTATTACTG	TGGGAGAGGG	CCGAGGAGCT
1611	ATGGCGCGGG	CGGTATGGAC	GTCTGGGGCC	AAGGCACCTT	GGTCACCGTC	TCTTCACTCG	AGGGTGGAGG
1681	CGGTTCAAGC	GGAGGTGGCT	CTGGCGGTGG	CGTAGCGGAC	ATCCAGATGA	CCCAGTCTCC	ATCTTCTGTG
1751	TCTGCATCTG	TAGGAGACAG	AGTCACCATC	ACTTGTGCGG	CGAGTCAGGG	TATTAGCAGC	TGTTTAGCCT
1821	GGTATCAGCA	GAACCCAGGG	AAAGCCCTTA	AGTTCCTGAT	CTATGTGCA	TCCAGTTTGC	AAAGTGGGGT
1891	CCCATCAAGG	TTCAGCGGCA	GTGGATCTGG	GACAGATTTT	ACTCTCACTA	TCAGCAGCCT	GCAGCCTGAA
1961	GATTTTGCAA	CTTACTATTG	TCAACAGGCT	AACAGTTTCC	CGTCACTTT	CGGCGGAGGG	ACCAAGGTGG
2031	AAATCAAACG	TGCGGCCGCA	GACAAGACCC	ACACTGCCCC	TCCATGTCTT	GCCCCTGAGC	TGCTGGGGCG
2101	ACCCTCCGTG	TTCCTGTTCC	CTCCTAAGCC	TAAGGACACC	CTGATGATCT	CCCGGACCCC	TGAAGTGACC
2171	TGCGTGGTGG	TGGACGTGTC	CCACGAAGAT	CCTGAAGTGA	AGTTCAATTG	GTACGTGGAC	GGCGTGGAGG
2241	TGCACAACGC	CAAGACCAAG	CCTCGGGAGG	AACAGTACAA	CTCCACCTAC	CGGGTGGTGT	CTGTGCTGAC
2311	CGTGCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAACGGCAA	AGAATACAAG	TGCAAGTGT	CCAACAAGGC	CCTGCCTGCC
2381	CCTATCGAAA	AGACCATCTC	CAAGGCTAAG	GGCCAGCCAC	GGGAACCTCA	GGTCTACACA	CTGCCCTCTA
2451	GCCGGGACGA	GCTGACCAAG	AACCAGGTGT	CCCTGACCTG	TCTGGTGAAG	GGCTTCTACC	CTTCCGATAT
2521	CGCCGTGGAG	TGGGAGTCTA	ACGGCCAGCC	TGAGAACAAC	TACAAGACCA	CCCCTCTGT	GCTGGACTCC
2591	GACGGCTCCT	TCTTCTGTA	CTCCAAGCTG	ACCGTGGACA	AGTCCCAGTG	GCAGCAGGGC	AACGTGTCT
2661	CCTGCTCCGT	GATGCACGAG	GCCCCTGACA	ACCACTACAC	CCAGAAGTCC	CTGTCCCTGT	CTCCTGGCAA
2731	GGGATCCCAT	CATCATCACC	ATCACAAAGCT	GGACTACAAA	GACCATGACG	GTGATTATAA	AGATCATGAC
2801	ATCGATTACA	AGGATGACGA	TGACAAGTAA	TAAAAGCTTA	CGACGTGATC	AGCCTCGACT	GTGCCCTCTA
2871	GTTGCCAGCC	ATCTGTTGTT	TGCCCTCCCC	CCGTGCCCTT	CTTGACCCTG	GAAGGTGCCA	CTCCCACTGT
2941	CCTTCTCTAA	TAAAATGAGG	AAATTGCATC	GCATTGTCTG	AGTAGGTGTC	ATTCTATTCT	GGGGGTGGG
3011	GTGGGGCAGG	ACAGCAAGGG	GGAGGATTGG	GAAGACAATA	GCAGGCATGC	TGGGGATGGC	CGGGGCTCTA
3081	TGGCTTCTGA	GGCGGAAAGA	ACCAGCTGGG	GCTCTAGGGG	GTATCCCCAC	GCCCTCTGTA	GCGGCGCATT
3151	AAGCGGGCGG	GGTGTGGTGG	TTACGCGCAG	CGTGACCCTG	ACACTTGCCA	GCGCCCTAGC	GCCCCCTCCT
3221	TTCGCTTCT	TCCCTTCTT	TCTCGCCACG	TTCCGGGCT	TTCCCGTCA	AGCTCTAAAT	CGGGGGCTCC
3291	CTTTAGGGTT	CCGATTTAGT	GCTTTACGGC	ACCTCTCCCC	CAAAAACTT	GATTAGGGTG	ATGGTTACAG
3361	TAGTGGGCCA	TCGCCCTGAT	AGACGGTTTT	TCGCCCTTTG	ACGTTGGAGT	CCACGTTCTT	TAATAGTGG
3431	CTCTTGTCC	AAACTGGAAC	AACACTCAAC	CCTATCTCGG	TCTATTCTTT	TGATTTATAA	GGGATTTTGC
3501	CGATTTCCGC	CTATTGGTTA	AAAAATGAGC	TGATTTAACA	AAAAATTAAC	GCGAATTAAT	TCTGTGGAAT
3571	GTGTGTCACT	TAGGGTGTGG	AAAGTCCCCA	GGCTCCCCAG	CAGGCAGAAAG	TATGCAAAGC	ATGCATCTCA
3641	ATTAGTCAGC	AACCAGGTGT	GGAAAGTCCC	CAGGCTCCCC	AGCAGGCAGA	AGTATGCAAA	GCATGCATCT
3711	CAATTAGTCA	GCAACCATAG	TCCCGCCCC	AACTCCGCC	ATCCCGCCCC	TAACTCCGCC	CAGTTCGCC
3781	CATTCTCCGC	CCCTAGGCTG	ACTAATTTTT	TTTTATTATG	CAGAGGCCGA	GGCCGCTCT	GCCTCTGAGC

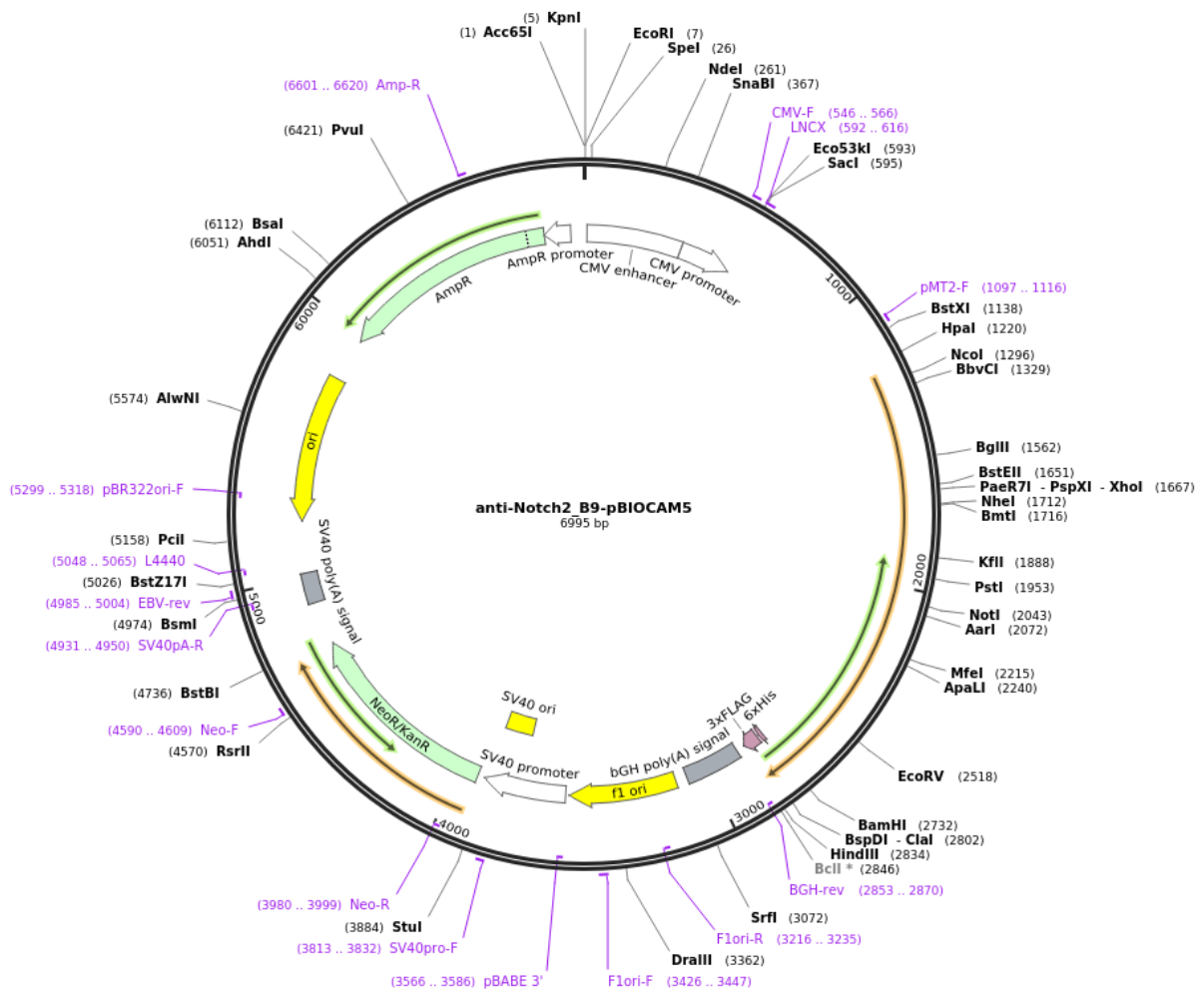
3851	TATTCCAGAA	GTAGTGAGGA	GGCTTTTTTG	GAGGCCTAGG	CTTTTGCAAA	AAGCTCCCC	CCCGGAGGT
3921	CCACAATGGT	TGAACAAGAT	GGATTGCACG	CAGGTTCTCC	GGCCGCTTGG	GTGGAGAGGC	TATTGGCTA
3991	TGACTGGGCA	CAACAGACAA	TCGGCTGCTC	TGATCCGCC	GTGTTCCGGC	TGTCAGCGCA	GGGGCGCCG
4061	GTTCTTTTTG	TCAAGACCGA	CCTGTCGGGT	GCCCTGAATG	AACTCCAGGA	CGAGGCAGCG	CGCTATCGT
4131	GGCTGGCCAC	GACGGGCGTT	CCTTGCGCAG	CTGTGCTCGA	CGTTGCTACT	GAAGCGGGAA	GGGACTGGCT
4201	GCTATTGGGC	GAAGTGCCGG	GGCAGGATCT	CCTGTCTATCT	CACCTTGCTC	CTGCCGAGAA	AGTATCCATC
4271	ATGGCTGATG	CAATGCGGCG	GCTGCATACG	CTTGATCCGG	CTACCTGCC	ATTCGACCAC	CAAGCGAAAC
4341	ATCGCATCGA	GCGAGCACGT	ACTCGATGG	AAGCCGGTCT	TGTCGATCAG	GATGATCTGG	ACGAAGAGCA
4411	TCAGGGGCTC	GCGCAGCCG	AACTGTTCGC	CAGGCTCAAG	GCGCGTATGC	CCGACGGCGA	GGATCTCGTC
4481	GTGACTCATG	GCGATGCTTG	CTTGCCGAAT	ATCATGGTGG	AAAAATGCCG	CTTTTCTGGA	TTCATCGACT
4551	GTGGCCGGCT	GGGTGTGGCG	GACCGTATC	AGGACATAGC	GTGGCTACC	CGTGATATTG	CTGAAGAGCT
4621	TGGCGGCGAA	TGGGCTGACC	GCTTCCTCGT	GCTTTACGGT	ATCGCCGCTC	CCGATTCGCA	GCGCATCGCC
4691	TTCTATCGCC	TTCTTGACGA	GTTCTTCTGA	GCGGGACTCT	GGGGTTCGAA	ATGACCGACC	AAGCGACGCC
4761	CAACCTGCCA	TCACGAGATT	TCGATTCCAC	CGCCGCTTC	TATGAAAGGT	TGGGCTTCGG	AATCGTTTTC
4831	CGGGACGCCG	GCTGGATGAT	CCTCCAGCGC	GGGGATCTCA	TGCTGGAGTT	CTTCGCCAC	CCCAACTGT
4901	TTATTGCAGC	TTATAATGGT	TACAAATAAA	GCAATAGCAT	CACAAATTTT	ACAAATAAAG	CATTTTTTTC
4971	ACTGCATTCT	AGTTGTGGTT	TGTCCAAACT	CATCAATGTA	TCITTATCATG	TCTGTATACC	GTCGATCTTT
5041	CCGCTTCTC	GCTCACTGAC	TCGCTGCGCT	CGGTGTTTCG	GCTGCGCGA	GCGGTATCAG	CTCACTCAA
5111	GGCGTAATA	CGGTATCCA	CAGAATCAGG	GGATAACGCA	GGAAAGAACA	TGTGAGCAAA	AGGCCAGCAA
5181	AAGGCCAGGA	ACCGTAAAAA	GGCCGCGTTG	CTGGCGTTTT	TCCATAGGCT	CCGCCCCCT	GACGAGCATC
5251	ACAAAAATCG	ACGCTCAAGT	CAGAGTGGC	GAAACCCGAC	AGGACTATAA	AGATACCAGG	CGTTTCCCCC
5321	TGGAAGCTCC	CTCGTGCGCT	CTCCTGTCC	GACCTGCGG	CTTACCGGAT	ACCTGTCCGC	CTTCTCCCT
5391	TCGGGAAGCG	TGGCGCTTTC	TCATAGCTCA	CGCTGTAGGT	ATCTCAGTTC	GGTGTAGGTC	GTTGCTCCA
5461	AGCTGGGCTG	TATGCACGAA	CCCCCGTTC	AGCCGACCCG	CTGCGCCTTA	TCCGGTAACT	ATCGTCTTGA
5531	GTCCAACCCG	GTAAGACACG	ACTTATCGCC	ACTGGCAGCA	GCCACTGGTA	ACAGGATTAG	CAGAGCGAGG
5601	TATGTAGGCG	GTGTACAGA	GTTCTTGAAG	TGGTGGCCTA	ACTACGGCTA	CACTAGAAGA	ACAGTATTTG
5671	GTATCTGCGC	TCTGCTGAAG	CCAGTTACCT	TCGGAAAAAG	AGTTGGTAGC	TCTTGTCCG	GCAAAACAAC
5741	CACCGCTGGT	AGCGGTGGTT	TTTTTGTTTG	CAAGCAGCAG	ATTACGCGCA	GAAAAAAGG	ATCTCAAGAA
5811	GATCCTTTGA	TCTTTTCTAC	GGGGTCTGAC	GCTCAGTGGA	ACGAAAACTC	ACGTTAAGGG	ATTTTGGTCA
5881	TGAGATTATC	AAAAAGGATC	TTCACCTAGA	TCCTTTTAAA	TTAAAAATGA	AGTTTTAAAT	CAATCTAAAG
5951	TATATATGAG	TAAACTTGGT	CTGACAGTTA	CCAATGCTTA	ATCAGTGAGG	CACCTATCTC	AGCGATCTGT
6021	CTATTTCTGT	CATCCATAGT	TGCCGTGACTC	CCCGTCGTGT	AGATAACTAC	GATACGGGAG	GGCTTACCAT
6091	CTGGCCCCAG	TGCTGCAATG	ATACCGCGAG	ACCCACGCTC	ACCCGCTCCA	GATTTATCAG	CAATAAACCA
6161	GCCAGCCGGA	AGGGCCGAGC	GCAGAAGTGG	TCCTGCAACT	TTATCCGCCT	CCATCCAGTC	TATTAATTGT
6231	TGCCGGGAAG	CTAGAGTAAG	TAGTTCGCCA	GTTAATAGTT	TGCGCAACGT	TGTTGCCATT	GCTACAGGCA
6301	TCGTGGTGTC	ACGCTCGTCG	TTTGGTATGG	CTTCATTGAG	CTCCGGTTCC	CAACGATCAA	GGCGAGTTAC
6371	ATGATCCCCC	ATGTTGTGCA	AAAAGCGGT	TAGCTCCTTC	GGTCTCCGA	TCGTTGTCAG	AAGTAAGTTG
6441	GCCGCACTGT	TATCACTCAT	GGTTATGGCA	GCACTGCATA	ATTCTCTTAC	TGTCATGCCA	TCCGTAAGAT
6511	GCTTTTCTGT	GACTGGTGAG	TACTCAACCA	AGTCATTCTG	AGAATAGTGT	ATGCGGCGAC	CGAGTTGCTC
6581	TTGCCCGGCG	TCAATACGGG	ATAATACCGC	GCCACATAGC	AGAACTTTAA	AAGTGCTCAT	CATTGAAAAA
6651	CGTTCTTCGG	GGCGAAAACT	CTCAAGGATC	TTACCGCTGT	TGAGATCCAG	TTCGATGTAA	CCCACTCGGG
6721	CACCCAACGT	ATCTTCAGCA	TCTTTTACTT	TCACCAGCGT	TTCTGGGTGA	GCAAAAAACAG	GAAGGCAAAA
6791	TGCCGCAAAA	AAGGGAATAA	GGGCGACACG	GAAATGTTGA	ATACTCATA	TCTTCTTTT	TCAATATTAT
6861	TGAAGCATTT	ATCAGGGTTA	TTGTCTCATG	AGCGGATACA	TATTTGAATG	TATTTAGAAA	AATAAACAAA
6931	TAGGGGTTCC	GCGCACATTT	CCCCGAAAA	TGCCACCTGA	CGTCAGATCG	ACGGATCGGG	AGATC

2. รูปแสดงส่วนประกอบสำคัญต่าง ๆ ในพลาสมิด (plasmid map)

Created with SnapGene®



รูปที่ ค1 รูปแสดง plasmid map ของพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 sequence 7010 bps



รูปที่ ค2 รูปแสดง plasmid map ของพลาสมิด anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 sequence 6995 bps

ภาคผนวก ง

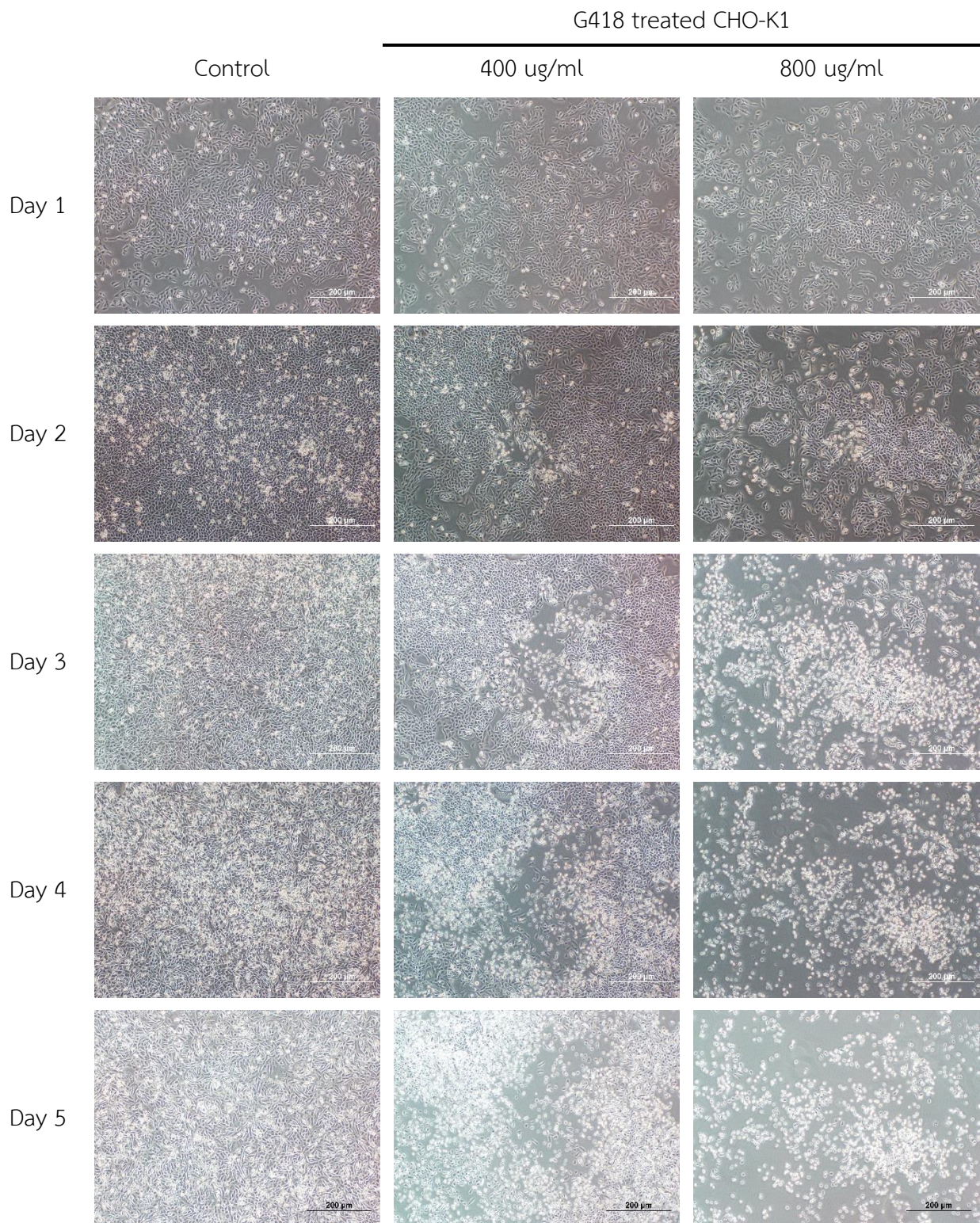
ผลการทดลอง

1. การทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ G418 ในการคัดเลือกเซลล์ไลน์ CHO-K1

การทดลองทำ stable transfection จำเป็นที่จะต้องใช้ยาคัดเลือกเพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิด และเหลือไว้เพียงเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด เพื่อนำเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดไปเลี้ยงต่อเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ แอนติบอดีต่อไป ดังนั้นการหาความเข้มข้นของยาที่จะใช้คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดจึงมีความจำเป็น โดยเซลล์ไลน์ CHO-K1 จะถูกทดสอบการตายเมื่อให้ G418 ที่ความเข้มข้น 400 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่ไม่ได้รับ G418 เป็นชุดควบคุม และวัดผลการตายของเซลล์ไลน์ CHO-K1 จากภาพถ่ายไตกล้องจุลทรรศน์เป็นเวลา 5 วันหลังจากให้ G418 โดยผลการทดลองแสดงตาม **รูปที่ ง1** จะเห็นว่าเซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่ถูกให้ G418 ทั้ง 2 ความเข้มข้น เริ่มมีการตายให้เห็นพร้อมกัน คือวันที่ 2 หลังจากให้ยา แต่เซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่ให้ยา G418 ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตายที่เห็นได้อย่างชัดเจนในวันที่ 3 และตายทั้งหมดในวันที่ 5 ในขณะที่การให้ G418 ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถทำให้เซลล์ไลน์ CHO-K1 ตายได้อย่างสมบูรณ์ทุกเซลล์ในวันที่ 5 ดังนั้น G418 ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงถูกใช้ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด

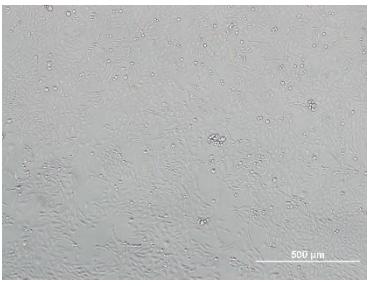
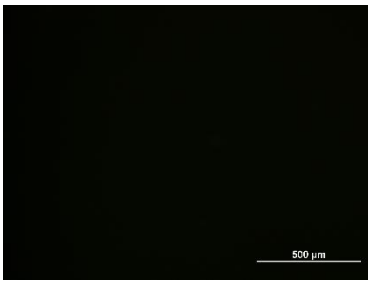

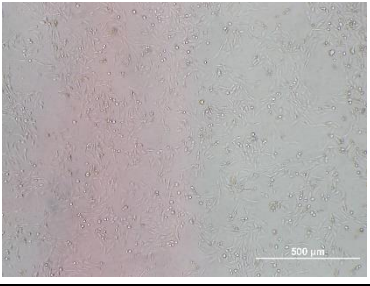
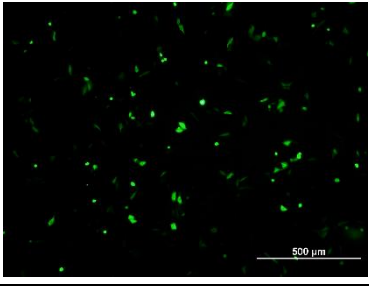
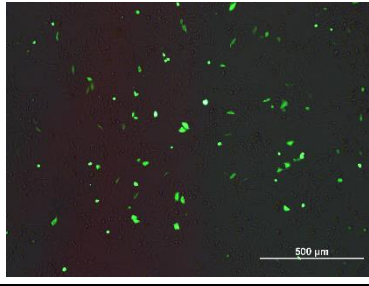

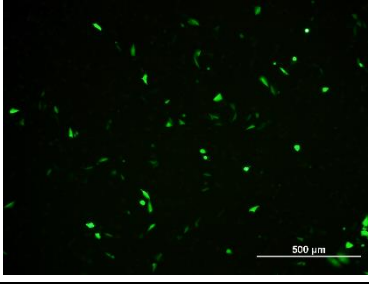
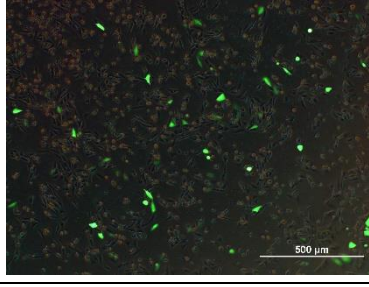
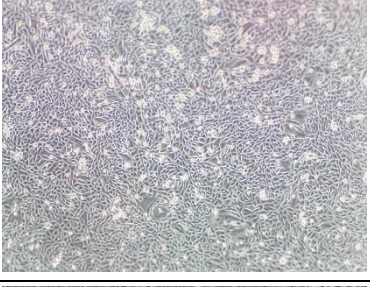

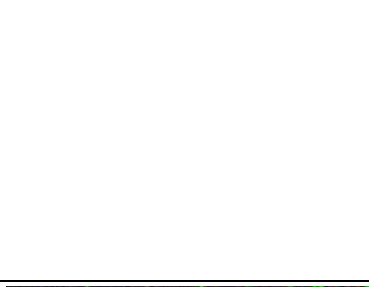
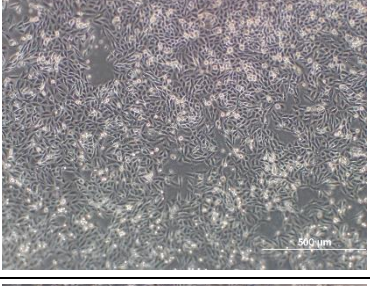
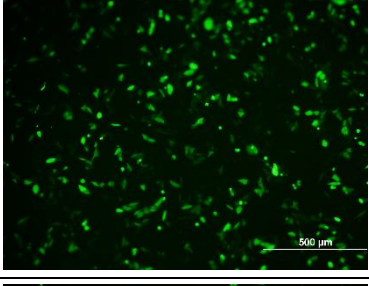
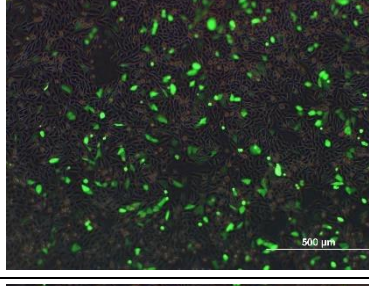

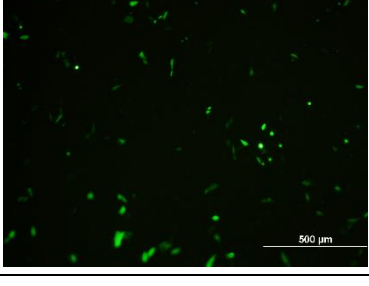
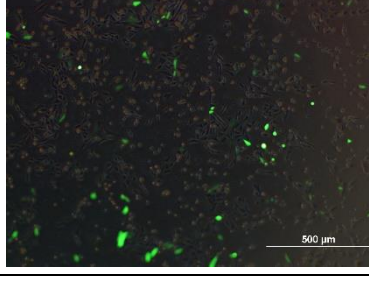
2. การทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมของ DNA ในการทรานสเฟกชันพลาสมิดในเซลล์ไลน์ CHO-K1

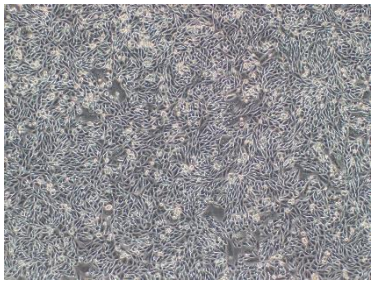


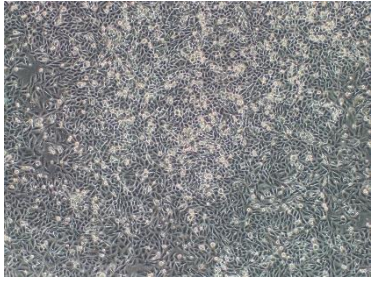
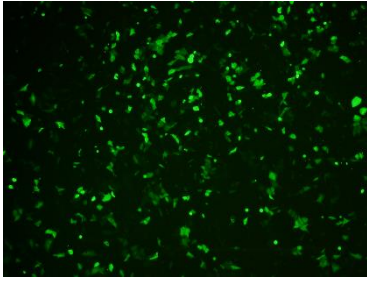
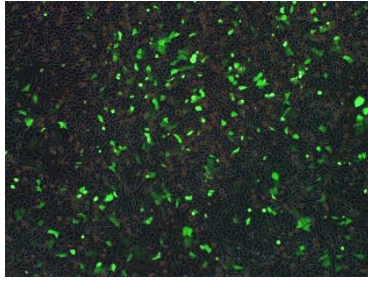
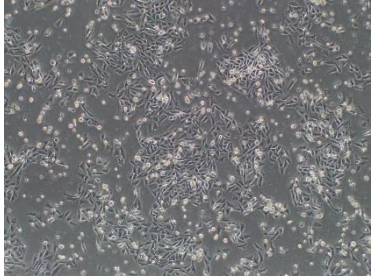
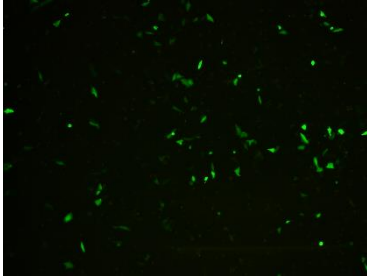
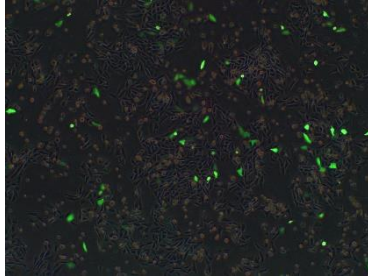
เพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟกชันพลาสมิดในเซลล์ไลน์ CHO-K1 ซึ่งตามวิธีการใช้ของ Fugene แนะนำให้ใช้อัตราส่วนของ DNA ต่อ Fugene เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อ 3 ไมโครลิตร (1:3) ดังนั้นปริมาณ DNA 1 และ 2 ไมโครกรัมจึงถูกทดสอบ โดยเลี้ยงเซลล์ไลน์ CHO-K1 จำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อหลุม ในถาดหลุม 24 หลุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาและเซลล์เกาะบนพื้นหลุมเรียบร้อยแล้วจึงเติม transfection reagent ที่มีพลาสมิด Pmax-GFP ปริมาณ 1 และ 2 ไมโครกรัมลงไปต่อหลุม โดยใช้เซลล์ที่ไม่ได้ใส่ transfection reagent เป็นชุดควบคุม ติดตามการผลิต GFP จากวิธีการ microscopy เป็นเวลา 72 ชั่วโมงหลังจากทรานสเฟกชัน ได้ผลการทดลองดัง **ตารางที่ ง1** พบว่าเริ่มพบความแตกต่างของความสำเร็จในการทรานสเฟกชันตั้งแต่ 48 ชั่วโมงหลังจากการทรานสเฟกชัน ระหว่างชุดทดลองที่ให้พลาสมิดปริมาณ 1 และ 2 ไมโครกรัม โดยหลุมที่ให้พลาสมิด 1 ไมโครกรัมพบเซลล์ที่แสดงออก GFP ปริมาณที่มากกว่าและจำนวนเซลล์ที่รอดเยอะมากกว่าหลุมที่ให้พลาสมิด 2 ไมโครกรัม แต่เมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ในหลุมที่ให้พลาสมิดปริมาณ 1 ไมโครกรัม มีจำนวนเซลล์ที่มากขึ้นไปในขณะที่ปริมาณเซลล์ที่แสดงออก GFP ไม่ต่างจาก 48 ชั่วโมง ดังนั้นในการทรานสเฟกชันเซลล์ไลน์ CHO-K1 จึงใช้พลาสมิดปริมาณ 1 ไมโครกรัม และรอเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อให้การทรานสเฟกชันเสร็จสมบูรณ์



รูปที่ ง1 รูปแสดงการตายของเซลล์ไลน์ CHO-K1 ใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้ยา G418 ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ ๑1 ตารางแสดงผลการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟคชัน

		Bright field	Fluorescent	Merge	
24 h	Control				
	Pmax-GFP	1 ug			
		2 ug			
48 h	Control				
	Pmax-GFP	1 ug			
		2 ug			

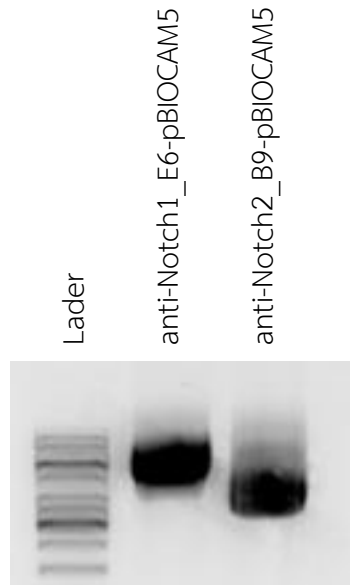
		Bright field	Fluorescent	Merge	
72 h	Control				
	Pmax-GFP	1 ug			
		2 ug			

3. การสกัดพลาสมิดที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี

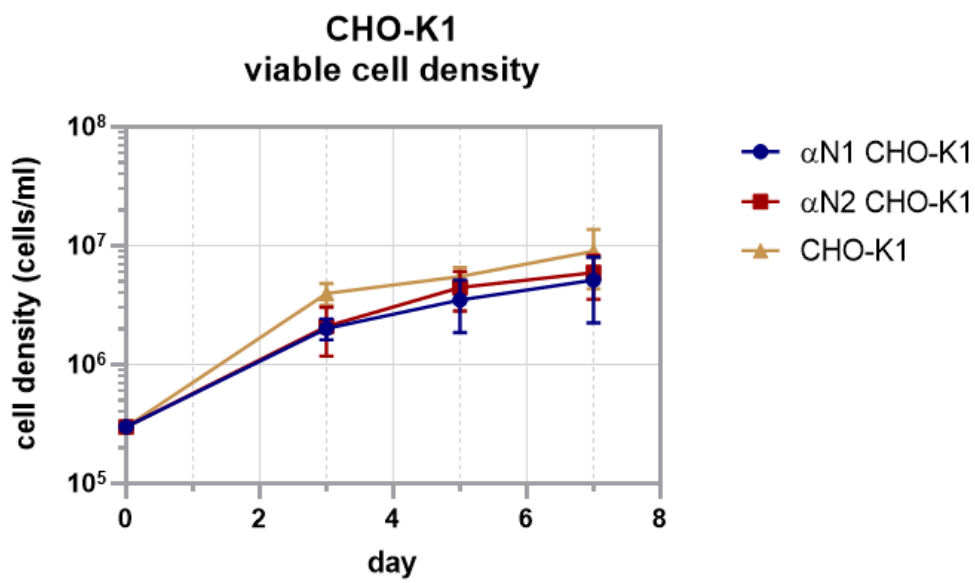
ก่อนที่จะทำทรานสเฟกชันเซลล์ไลน์ CHO-K1 ด้วยพลาสมิด anti-Notch1_E6-pBIOCAM5 และ anti-Notch2_B9-pBIOCAM5 พลาสมิดทั้ง 2 ชนิดนี้จะถูกตรวจสอบว่ามีคุณภาพมากพอจะนำไปใช้ในการทดลองหรือไม่ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis **ดังรูปที่ ง2** จะพบว่าเห็นแถบ DNA ของพลาสมิดทั้ง 2 ชนิด แต่ไม่พบการเสียหายของพลาสมิดดังกล่าว ดังนั้นพลาสมิดทั้ง 2 ชนิดนี้จึงพร้อมสำหรับการนำไปใช้ในการทรานสเฟกชัน

4. การเจริญของเซลล์ไลน์ α N1 scFv-Fc α N2 scFv-Fc และ NC CHO-K1

เพื่อที่จำคำนวณค่า specific productivity จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีมีความจำเป็นต่อการเป็นข้อมูลในการใช้คำนวณ เซลล์ไลน์ในการทดลองจึงถูกเลี้ยงเริ่มต้นที่ 3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย Trypan blue ในวันที่ 3 5 และ 7 พบว่าเซลล์มีการแบ่งตัวอย่างต่อเนื่อง**ดังรูปที่ ง3**

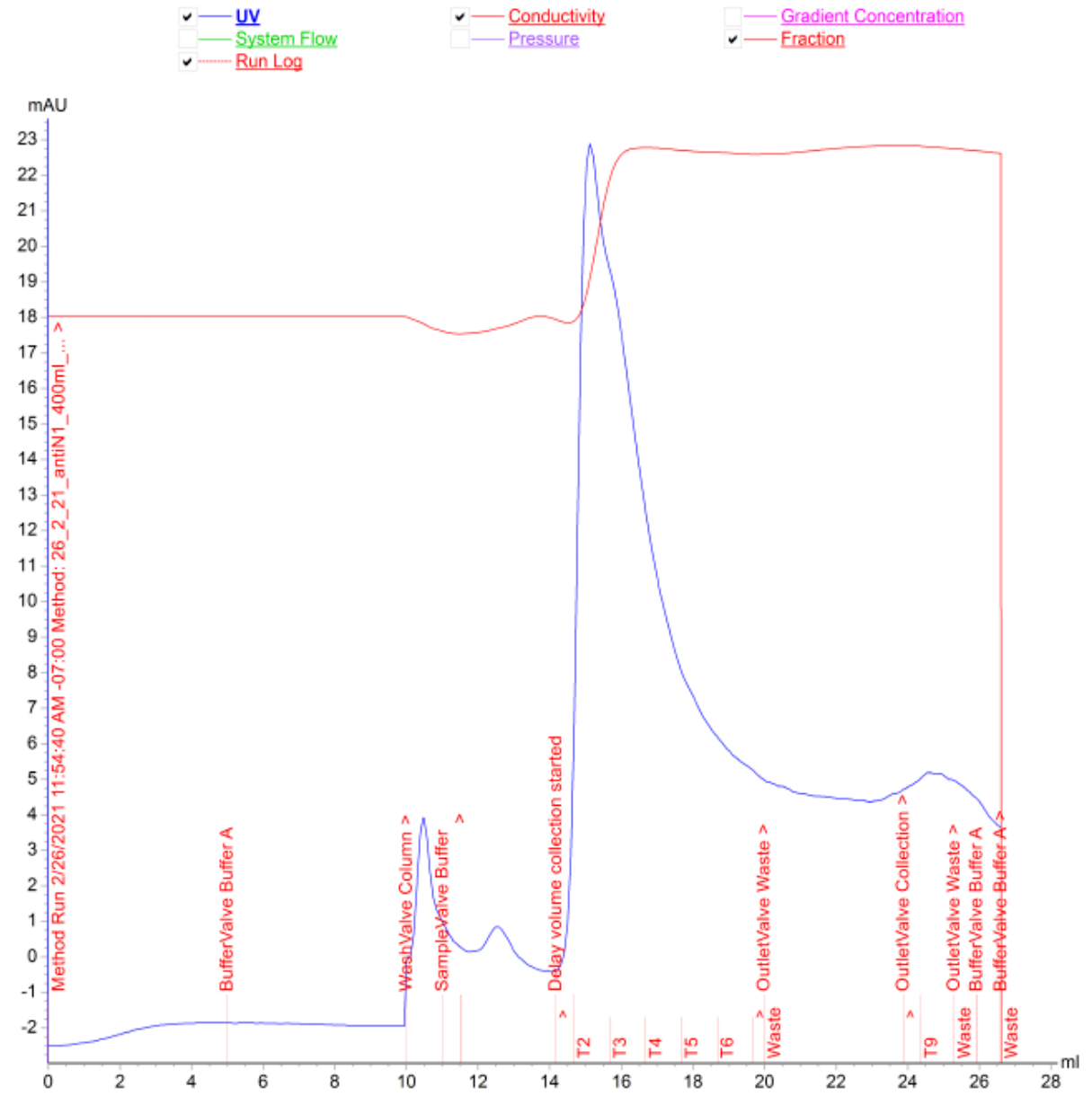


รูปที่ ๓2 รูปแสดงการวิเคราะห์คุณภาพของพลาสมิดหลังการสกัดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

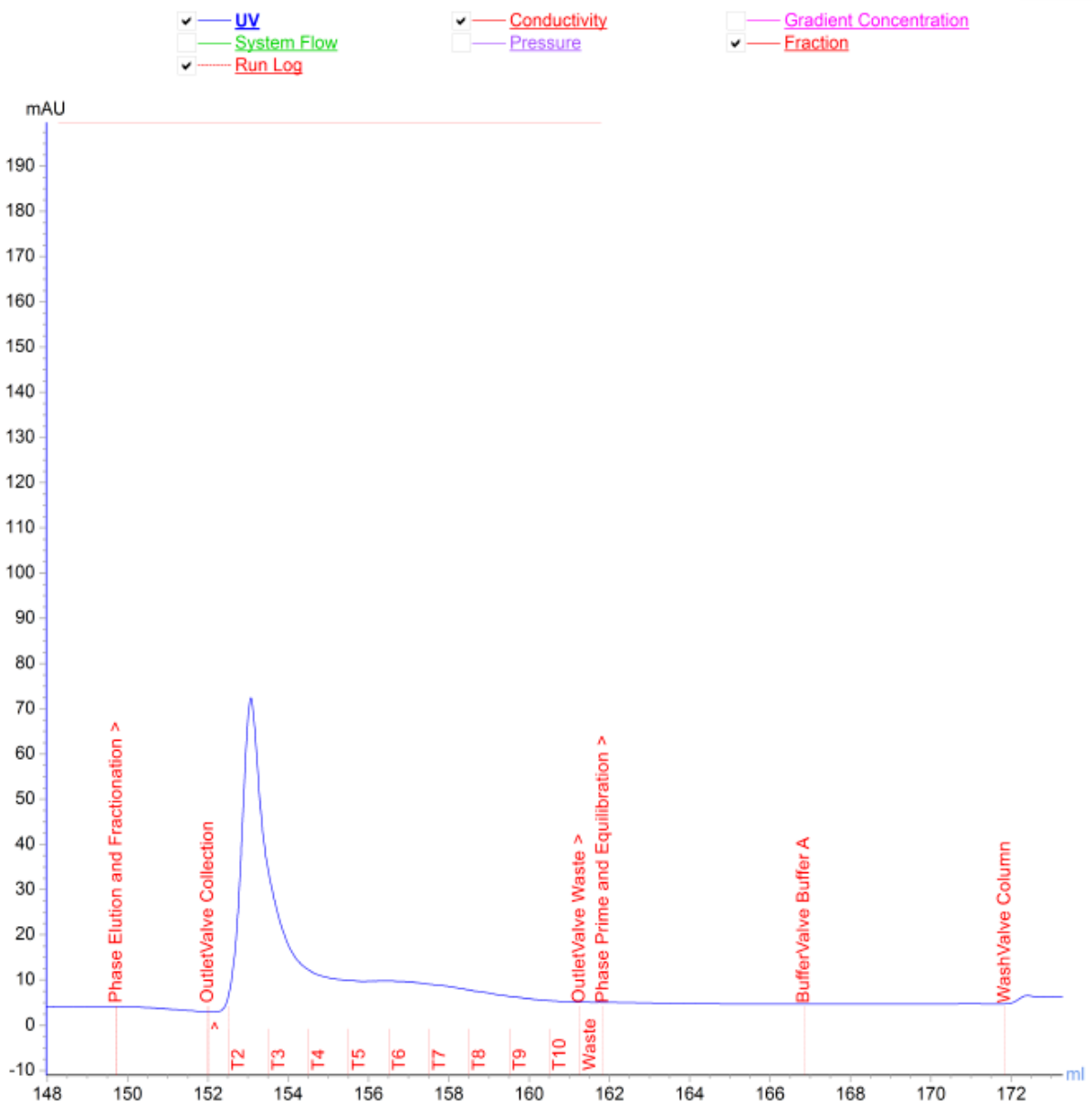


รูปที่ ๓3 แสดงความหนาแน่นของเซลล์ไลน์ CHO-K1 ที่มีชีวิตซึ่งสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีได้

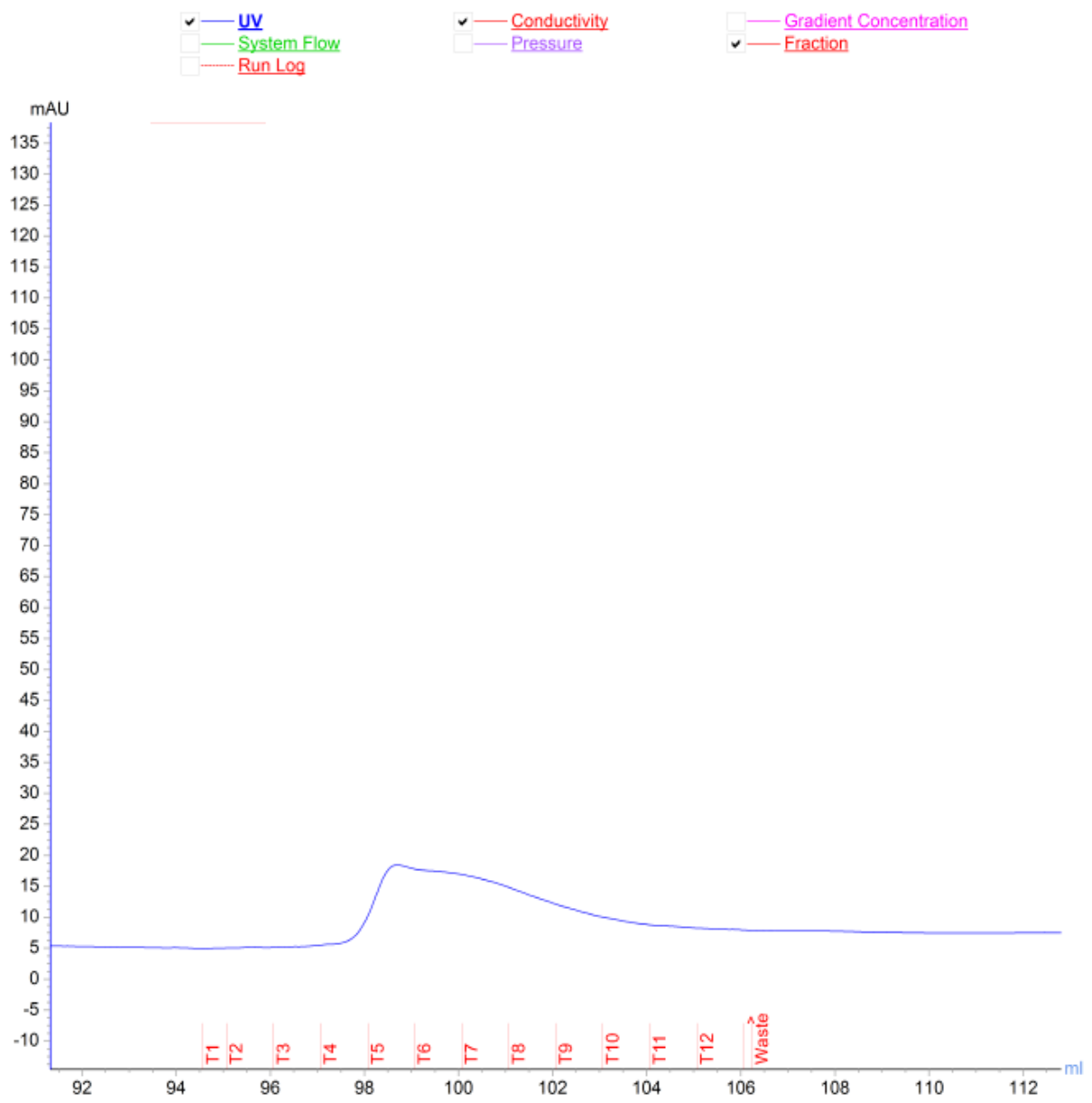
5. การทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีสัมพรรคภาพ



รูปที่ ๔4 รูปแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนต่อการดำเนินไปของการทำให้บริสุทธิ์ของ α N1 scFv-Fc



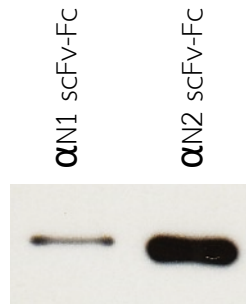
รูปที่ ๓5 รูปแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนต่อการดำเนินไปของการทำให้บริสุทธิ์ของ $\alpha N2$ scFv-Fc



รูปที่ ง6 รูปแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนต่อการดำเนินไปของการทำให้บริสุทธิ์ของ NC

6. การ dialysis และการทำให้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีเข้มข้น

เมื่อรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์เรียบร้อยแล้ว จึงนำผลิตภัณฑ์จากการทำให้บริสุทธิ์มา dialysis และทำให้เข้มข้น แล้วตรวจสอบการมีอยู่ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีด้วย Western Blot ผลพบว่าพบแถบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีดังรูปที่ ๗



รูปที่ ๗ แสดงผล Western Blot ของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ผ่านการ dialysis และทำให้เข้มข้น