

**นิพนธ์ฉบับ**

## การพัฒนาโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อเฮพาเรน ซัลเฟต โปรติโอไกลัยแคนชนิด $F(ab')_2$ ที่ติดฉลากสารเรืองแสง FITC สำหรับใช้วิเคราะห์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดมัยลอยด์โดยตรง

เบญจพร ทวีอภิรัตน์\* จตุพร พรศิลป์พิทย\*\* ปริยานาถ วงศ์จันทร์\*

### บทคัดย่อ

การศึกษาก่อนหน้าพบว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉพาะชนิด AML มีการแสดงออกของโมเลกุลที่เหมือนหรือคล้ายกับ human liver HSPG อย่างความจำเพาะและมีนัยสำคัญ สามารถใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อ human liver HSPG ช่วยแยกวินิจฉัย AML ออกจากมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยเทคนิค indirect immunofluorescence อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นต้อง block Fc-receptor ซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกปลอม และยังต้องใช้แอนติบอดีที่สองซึ่งติดฉลากสารเรืองแสง ซึ่งมีราคาแพง ดังนั้น เพื่อพัฒนาแอนติบอดีดังกล่าวให้มีคุณสมบัติที่ดีมากขึ้นในการใช้งาน ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดดัดแปลงรูปแบบของแอนติบอดีให้อยู่ในรูปของ  $F(ab')_2$  และติดฉลากสารเรืองแสง FITC เพื่อให้สามารถใช้แอนติบอดีดังกล่าวในการตรวจแยกชนิด AML ได้ในขั้นตอนเดียวด้วยเทคนิค direct immunofluorescence โดยตัดย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin จากนั้นติดฉลากด้วย FITC/DMSO และตรวจสอบแอนติบอดีที่ถูกดัดแปลงด้วยการแยกผ่านกระแสไฟฟ้า ตรวจวัดขนาดและความเป็น  $F(ab')_2$  ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ การศึกษาพบว่าควรใช้เอนไซม์ขนาด 1500 units อุณหภูมิที่ 37 °C นาน 8 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 115 kD และมีค่า F:P ratio หลังการติดฉลากเท่ากับ 5.8 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ดีที่สุด การตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยการย้อมเซลล์มะเร็ง พบว่าแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาได้ดี มีอัตราการเรืองแสงที่ดี ตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ ผลที่ได้จากการศึกษาสรุปว่า สามารถดัดแปลงแอนติบอดีและติดฉลากเพื่อให้สามารถตรวจวัดโมเลกุลจำเพาะบนผิวเซลล์ได้อย่างถูกต้องในขั้นตอนเดียว ลดความสับสนในการใช้แอนติบอดีติดฉลากสารเรืองแสงตัวที่สองซึ่งมีราคาแพง สามารถพัฒนาต่อยอดในรูปแบบของผลิตภัณฑ์เพื่อการจำหน่าย วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2552; 42: 85-93.

**คำรหัส:** โมโนโคลนอล แอนติบอดี ตับมุนุษย์ ลิวคีเมีย เปปซิน HSPGs, FITC conjugated antibody,  $F(ab')_2$

\* แขนงวิทยาศาสตร์การธนาคารเลือด ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\* บริษัทแปซิฟิก ไบโอเทค จำกัด กรุงเทพฯ

## **Abstract: Development of FITC-conjugated monoclonal anti-human liver HSPGs, F(ab')<sub>2</sub> for the investigation of acute myeloid leukemia by direct-immunofluorescent technique**

**Benchaporn Taweeapiradeechat\* Jaturaporn Pornsilapathip\*\* Preeyanat Vongchan\***

Human liver HSPGs was first isolated from human liver and monoclonal antibodies were produced. 1E4-1C2, one of many clones obtained was proved to specifically reacted with cell membrane molecules of acute myeloid leukemia (AML) by indirect immunofluorescence. Since the method is time consumed and required FITC-conjugated anti-mouse Igs which is expensive and caused nonspecific reaction. To solve these problems, we aimed to develop 1E4-1C2 to F(ab')<sub>2</sub> format and conjugate with FITC in order to investigate AML by direct immunofluorescence technique. The results showed that incubating at 37 °C for 8 hrs and 1500 units/mg protein was optimal for pepsin digestion. F(ab')<sub>2</sub> obtained has molecular weight of 116 kD. FITC was covalently coupled to primary amines (lysine) of the immunoglobulin. The result showed that F:P ratio of this product was 5.8. Staining of HepG2 cell lines by direct compared to indirect immunofluorescence showed significant positive results. It was concluded that FITC-conjugated anti-human liver HSPGs, F(ab')<sub>2</sub> obtained was effectively reacted with interested cells. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2009; 42: 85-93.

**Keywords:** Monoclonal antibody, HSPGs, human liver, F(ab')<sub>2</sub>, FITC conjugated antibody, leukemia

\* Division of Transfusion Science, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

\*\* Pacific Biotech Company, Bangkok

### **บทนำ**

Proteoglycans จัดเป็น glycosylated proteins ที่มีส่วน carbohydrate เป็น sulfated glycosaminoglycans<sup>1,2</sup> มีบทบาทสำคัญทางชีวภาพมากมาย<sup>3-5</sup> พบได้ใน matrix และบนผิวเซลล์หลายชนิดทั้งเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็ง<sup>4, 6-8</sup> มีน้ำหนักโมเลกุลและประจุลบสูง<sup>9-12</sup>

matrix HSPG ที่สร้างจากเซลล์ของเนื้อเยื่อหลายชนิด มีโครงสร้างที่เหมือนหรือร่วมกันบางส่วนอีกด้วย HSPG มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลบนผิวเซลล์หรือระหว่างโมเลกุลบนผิวเซลล์กับโมเลกุลใน matrix และเป็นพื้นฐานของกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์หรือระหว่างเซลล์ เช่น การควบคุม cell growth และ

cell-cell matrix adhesion เป็นต้น

ผู้วิจัยสกัด HSPGs จากตับมนุษย์และผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ได้เซลล์ลูกผสมจำนวนมาก เบื้องต้นพบว่าเม็ดเลือดขาวชนิด Myeloid leukemia มีการแสดงออกของ HSPH อย่างมีนัยสำคัญ แตกต่างจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิดอื่น และไม่พบบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ<sup>13,14</sup> งานภาคินพนธ์ของนักศึกษาที่ได้รับทุนสนับสนุนจาก IRPUS ต่อเนื่องในปี 2548-2550 พบการแสดงออกของโมเลกุลดังกล่าวบนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ ทั้งชนิดปกติและเซลล์มะเร็ง เป็นจุดเริ่มต้นของการใช้แอนติบอดีในการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้อง การผลิตแอนติบอดีเพื่อจำหน่าย และพัฒนาแอนติบอดีดังกล่าวให้มีความพิเศษมากขึ้น เพื่อให้สามารถนำไปใช้งานด้านภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก และพยาธิวิทยาคลินิก ได้หลากหลายมากขึ้น เช่น การติดตามการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งโดยตรงด้วยเทคนิค direct immunofluorescence อย่างไรก็ตาม เนื่องจากบนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีตัวรับจำเพาะต่อส่วน Fc ของ immunoglobulin จึงต้องมีขั้นตอนการปิดบังบริเวณดังกล่าวด้วยการใช้ซีรัมของคนปกติหมู่เลือด AB เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอมจากการเกาะติดของแอนติบอดีบนผิวเซลล์ผ่าน Fc receptor ดังนั้น เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว และลดขั้นตอนการย้อมเซลล์ ผู้วิจัยจึงพัฒนาและเพิ่มคุณค่าของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นได้นี้ให้เหลือโครงสร้างเฉพาะส่วน F(ab')<sub>2</sub> จากนั้นติดตามการกระจายตัวของ FITC และ ศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นได้นี้ด้วยเทคนิค direct immunofluorescence ทำให้ขั้นตอนทำได้สะดวก รวดเร็ว มีความจำเพาะต่อโมเลกุลที่ต้องการศึกษา ไม่ต้องใช้แอนติบอดีที่สองซึ่งมีราคาแพง ทั้งยังเป็นการเพิ่มคุณค่าให้แก่แอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลสำคัญที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การผลิต monoclonal anti-human liver HSPG และทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเซลล์ลูกผสมโคลน 1E4-1C2 ที่มีความจำเพาะต่อ human liver HSPG และทราบแล้วว่าสามารถทำปฏิกิริยากับ HepG2 cells แล้ว โดยการฟิวชั่นด้วย

เทคนิค indirect immunofluorescence เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่แล้ว ผลิต monoclonal antibody ในปริมาณมากด้วยเทคนิค ascitic fluid induction เมื่อหนูเกิดภาวะ ascites แล้ว เจาะน้ำช่องท้อง เตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Melon Gel™ Purification พิสูจน์ความบริสุทธิ์และหาความเข้มข้นโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Lowry's method ตามลำดับ แบ่งเก็บเป็นส่วนเล็กๆ แช่แข็งไว้ใช้งานต่อไป

### การเตรียม monoclonal anti-human liver HSPG, F(ab')<sub>2</sub>

ก่อนการย่อย ปรับแอนติบอดี ให้อยู่ในตัวกลางที่เป็นกรด pH 4.0 โดยปั่นเพื่อกำจัด บีฟเฟอร์เดิมออกด้วย Microsep 30K ที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4° C นาน 30 นาที เติมน้ำกลั่น 500 uL จากนั้น ปรับ pH เป็น 4.0 ด้วย 0.4 M HCl ปริมาตร 5 uL (ปริมาตรที่ใช้ผ่านการไตเตรทมาก่อน) จากนั้นอุ่นปฏิกิริยาที่ 37° C นาน 30 นาที ก่อนเติม pepsin (Sigma) ความเข้มข้นสุดท้าย 1500-5000 unit/1 mg protein ผสมให้เข้ากัน อุ่นปฏิกิริยาต่อที่ 37°C ที่เวลาต่างๆ หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaCl ให้ได้ pH 6.0 สุดท้ายปรับให้อยู่ใน PBS pH 7.2

พิสูจน์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยว่าเป็น F(ab')<sub>2</sub> ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ย้อม gel ด้วย Coomassie Blue ขนาดของ F(ab')<sub>2</sub> ควรอยู่ในช่วง 90-135 kD ส่วนหนึ่ง blot ลงบน PVDF membrane และ block non-specific binding sites ด้วย 5% skimmed milk-PBS pH 7.2 และทำปฏิกิริยากับ HRP-conjugated swine rabbit anti-mouse IgG, Fc specific (1:2500) หลังจากล้างเพื่อกำจัดแอนติบอดีส่วนเกินแล้ว เติมนิยามเคมีลูมิเนสเซนส์ substrate (PIERCE) และประกบฟิล์มเพื่อติดตามสัญญาณ อีกส่วนหนึ่งทำปฏิกิริยากับ rabbit anti-mouse Igs (1:3000) ก่อน จากนั้นตามด้วย HRP-conjugated swine anti-rabbit Igs (1:20,000) และ chemiluminescent substrate ตามลำดับ ก่อนการประกบฟิล์ม ทุกขั้นตอนมีการล้างเพื่อกำจัดแอนติบอดีส่วนเกินออก

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดย่อย แยกผ่านกระแสน้ำไฟฟ้าใน 10% native gel และย้อมสี Coomassie blue อีกครั้ง ตัดเจลเฉพาะส่วน F(ab')<sub>2</sub> หรือโมเลกุล

รวมที่ยังคงเหลือค้างจากการตัดย่อยออก จากนั้นชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลด้วยวิธี Electroelution (Biorad) สุดท้ายปรับให้อยู่ในบัฟเฟอร์กลาง PBS pH 7.2 และทำให้เข้มข้นสำหรับติดฉลากด้วย FITC ต่อไป

#### การติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC

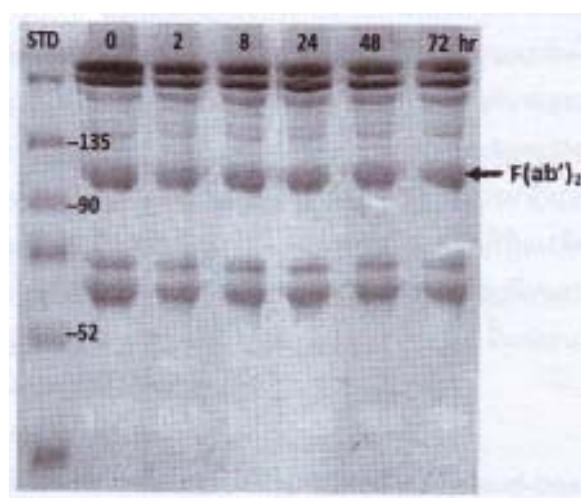
นำ  $F(ab')_2$  หรือโมเลกุลรวมจากข้อ 2.2 ปริมาณ 1 mg ปรับให้อยู่ใน Reaction buffer ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4 mg/ml จากนั้นเตรียม fresh FITC (FITC 0.5 mg / 10 mg/ml DMSO ปริมาตร 50  $\mu$ L) ผสม FITC/ DMSO ปริมาตร 4  $\mu$ L กับแอนติบอดี อุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด นาน 2 ชั่วโมง ครบเวลาหยุดปฏิกิริยากับ PBS pH 7.2 และปั่นล้างเพื่อกำจัด FITC/ DMSO โดยใช้ Microsep 30 KD วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 nm จนกว่าค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ ละลายแอนติบอดีกลับในปริมาตรเท่าเดิมด้วย storage buffer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 495 และ 280 nm และคำนวณ F:P ratio ซึ่งมีค่ายอมรับได้อยู่ในช่วง 3-10 จากนั้นเก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ในตู้เย็น 4° C พิสูจน์คุณสมบัติและ

ความจำเพาะ โดยการย้อมกับเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 ด้วยเทคนิค direct immunofluorescence เปรียบเทียบระหว่างการ block และไม่ block non-specific binding sites ด้วย 10% AB serum ต่อไป

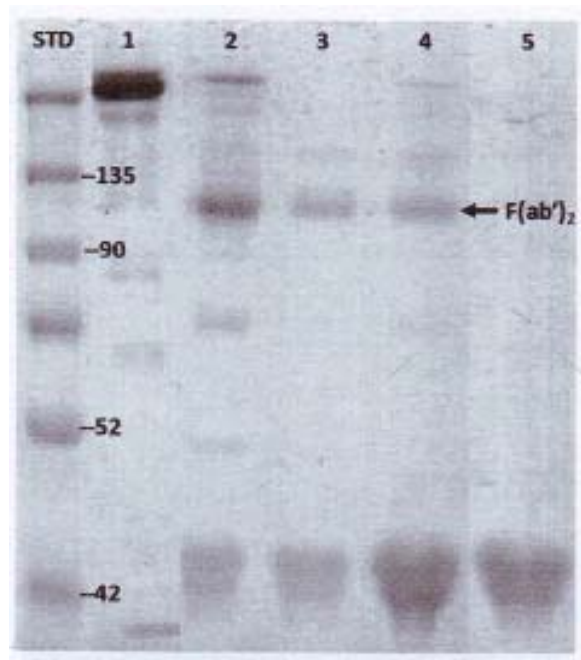
#### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

##### ความเข้มข้นสุดท้ายและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin

จากการทดลองเปรียบเทียบเวลา และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดย่อยโมเลกุลของแอนติบอดีที่สนใจ พบว่าการอุ่นปฏิกิริยาในอ่างน้ำอุ่น 37 °C นาน 8 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุด เพราะแม้จะอุ่นปฏิกิริยานานกว่านี้ไม่ได้ทำให้มีผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด น่าจะเป็นผลจากการเสื่อมค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 37 °C นานๆ (รูปที่ 1) และความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ที่ใช้คือ 3000 unit/ mg protein ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ  $F(ab')_2$  ในปริมาณใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูง แม้ว่าจะมีส่วนของโมเลกุลรวมเหลืออยู่บ้าง ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 เวลาที่เหมาะสมในการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin



รูปที่ 2 ความเข้มข้นของเอนไซม์ pepsin ที่เหมาะสมในการตัดย่อยแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2.

Lane 1: Whole Ig, Lane 2: 1500 units, Lane 3: 3000 units, Lane 4: 5000 units, Lane 5: pepsin with 5000 units

เมื่อนำผลิตภัณฑ์จากการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ แยกผ่านกระแสไฟฟ้า 200V นาน 45 นาที และย้อมดูขนาดของโปรตีนเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 90-135 kD ซึ่งน่าจะเป็น  $F(ab')_2$  ดังแสดงในรูปที่ 3A อย่างไรก็ตาม เพื่อพิสูจน์ว่าแถบโปรตีนดังกล่าวคือ  $F(ab')_2$  จริง จึงพิสูจน์โดยให้ทำปฏิกิริยากับ rabbit anti-mouse IgG, Fc specific ซึ่งไม่พบแถบในบริเวณดังกล่าวบนแผ่นฟิล์ม แต่สามารถพบได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ rabbit anti-mouse Igs และติดตามด้วย HRP-conjugated swine anti-rabbit Igs (รูปที่ 3B) แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin คือ  $F(ab')_2$  จริง

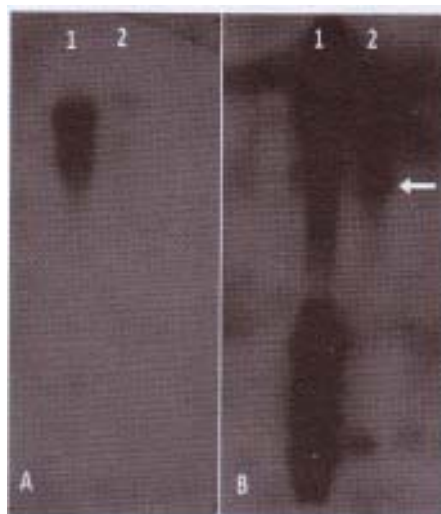
#### ผลการติดฉลากแอนติบอดีด้วย FITC

แอนติบอดีทั้งส่วน whole molecule และ  $F(ab')_2$  ที่ชะออกจากแผ่นเจลด้วยเทคนิค Electroelution (รูปที่ 4 และรูปที่ 5) เมื่อนำมาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC แล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490/280 nm ตามลำดับ คำนวณค่า F:P ratio พบว่าได้ค่า F:P ratio

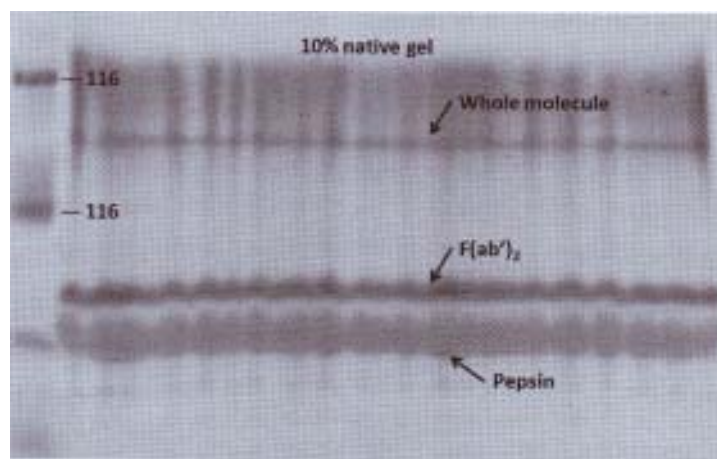
ของ whole molecule และ  $F(ab')_2$  เท่ากับ 5.8 และ 7.0 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (3-10)

#### 3.3 การพิสูจน์คุณสมบัติของแอนติบอดีติดฉลากที่ผลิตขึ้น

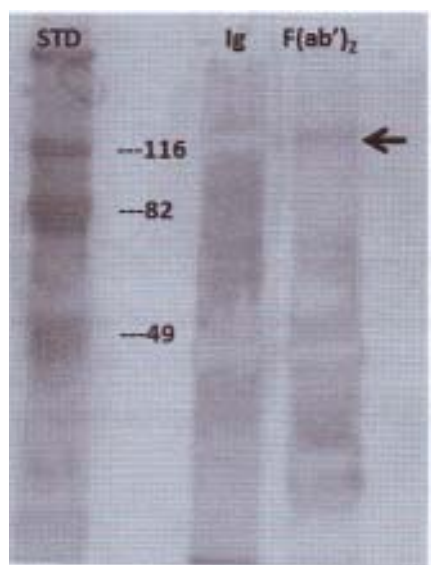
โดยการนำแอนติบอดีติดฉลากทั้งสองรูปแบบคือ FITC-1E4-1C2 whole molecule และ FITC-1E4-1C2  $F(ab')_2$  ทำปฏิกิริยากับ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่มีและไม่มีการ block Fc receptor ด้วย 10% heat inactivated human AB serum พบว่า แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับเซลล์ได้ทั้งสองรูปแบบ (รูปที่ 6-7) โดยความเข้มของการเรืองแสงในสภาวะที่ไม่มีการใช้ AB serum สูงกว่า แสดงให้เห็นว่า FITC conjugated 1E4-1C2  $F(ab')_2$  ที่ผลิตขึ้นสามารถลดการเกิด non specific binding ที่เกิดจากการจับผ่าน Fc receptor และสามารถใช้งานได้โดยไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการ block Fc receptor



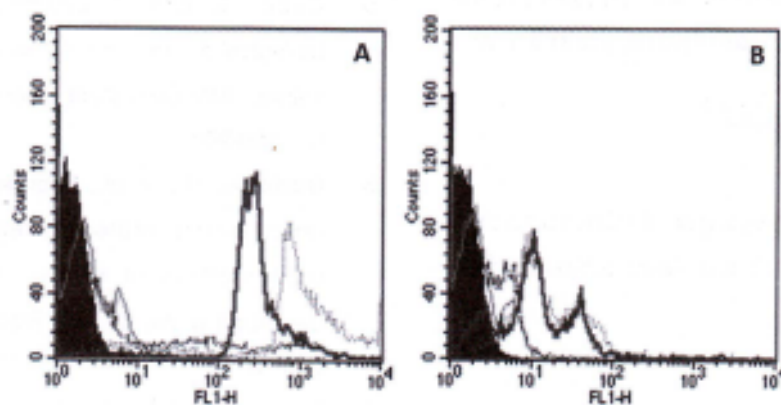
รูปที่ 3 แสดงการพิสูจน์  $F(ab)_2$  ด้วย HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG, Fc specific (A) และ rabbit anti-mouse Igs ตามด้วย HRP-conjugated swine anti-rabbit Igs (B). 1: Pre-enzyme digestion และ 2: Post-enzyme digestion



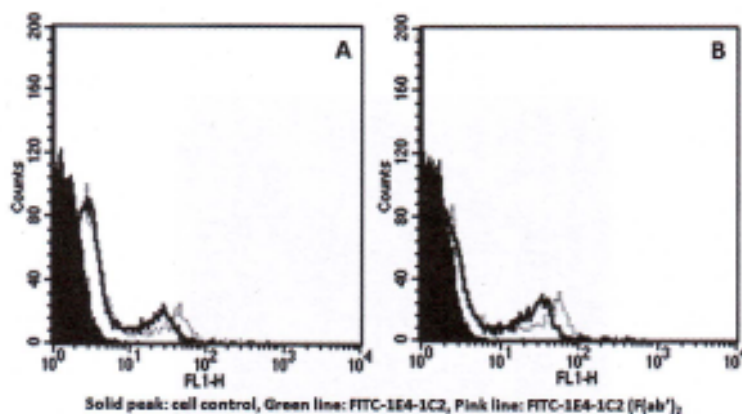
รูปที่ 4 การแยกโมเลกุลของแอนติบอดีในลักษณะต่าง ๆ ออกจากกันด้วยกระแสไฟฟ้าใน Native gel (10%)



รูปที่ 5 การพิสูจน์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ electroelution



รูปที่ 6 ผลการย้อมเซลล์ HepG2 ด้วยวิธี indirect immunofluorescence ในสถานะที่ไม่มี (A) และมีการใช้ AB serum (B)



รูปที่ 7 ผลการย้อมเซลล์ HepG2 ด้วยวิธี direct immunofluorescence ในสถานะที่ไม่มี (A) และมีการใช้ AB serum (B)

### สรุปผล

จากการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยสามารถเตรียม โมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อ human liver HSPG โคลน 1E4-1C2 ให้อยู่ในแบบที่ต้องการคือเป็น  $F(ab')_2$  fragment ที่ติดฉลากด้วย FITC ได้ตามวัตถุประสงค์ โดยมีค่า F:P ratio เท่ากับ 5.8 ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับได้ แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสอบ แอนติเจนจำเพาะบนผิวเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการย้อมชิ้นตอนเดียว

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (IRPUS และ RMU 5080018) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- Bernfield, M., et al., Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 1999. 68: 729-77.
- Bernfield, M., et al., Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*, 1992. 8: 365-93.
- Carey, D.J., Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*, 1997. 327

(Pt 1): 1-16.

- Casar, J.C., et al., Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 1): 73-84.
- Casu, B. and U. Lindahl, Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 2001. 57: 159-206.
- Buchaille, R., et al., Expression of the small leucine-rich proteoglycan osteoadherin/osteomodulin in human dental pulp and developing rat teeth. *Bone*, 2000. 27(2): 265-70.
- Derksen, P.W., et al., Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood*, 2002. 99(4): 1405-10.
- Do, A.T., et al., Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferases in human embryonic kidney 293 cells results in increased N-acetylglucosaminyl 6-O-sulfation. *J Biol Chem*, 2006. 281(9): 5348-56.
- Lee, J.K., et al., Cloning and characterization

- of a mammalian N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase that is highly restricted to intestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 263(2): p. 543-9.
10. Liu, J., et al., Purification of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. *J Biol Chem*, 1996. 271(43): 27072-82.
  11. McFall, A.J. and A.C. Rapraeger, Identification of an adhesion site within the syndecan-4 extracellular protein domain. *J Biol Chem*, 1997. 272(20): 12901-4.
  12. Venkataraman, G., et al., Sequencing complex polysaccharides. *Science*, 1999. 286(5439): 537-42.
  13. Vongchan, P., et al., Structural characterization of human liver heparan sulfate. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2005. 1721(1-3): 1-8.
  14. Vongchan, P. and R.J. Linhardt, Expression of human liver HSPGs on acute myeloid leukemia. *Clinical Immunology*, 2007. 122(2): 194-206.