

นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อเฮปาริน ซัลเฟต โปรติโอไกลัยแคน ที่ติดฉลากด้วย FITC สำหรับงานตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา

จุฑามาศ บุญฟู* จตุพร พรศิลป์พิทย** ปริยานาถ วงศ์จันทร์*

บทคัดย่อ

โมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อ human liver heparan sulfate proteoglycans (MAb-HSPGs, clone 1E4) ได้ถูกผลิตขึ้นเป็นแห่งแรกภายในห้องปฏิบัติการของ ผศ.ดร.ปริยานาถ วงศ์จันทร์ HSPGs บนผิวเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะเซลล์ตับ มีบทบาทเป็นตัวรับร่วมให้กับลิแกนด์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพของเซลล์ และยังเป็นตัวรับร่วม ให้แก่ พาหะก่อโรคสำคัญๆ เช่น มาลาเรีย และ เชื้อ登革เกี การศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของ โมเลกุลนี้จึงมีประโยชน์ เพื่อให้ทราบกลไกการทำงานที่ รวมถึงการประยุกต์ใช้แอนติบอดีจำเพาะในงานตรวจต่างๆ อย่างไรก็ตามการศึกษาจำเป็นต้องใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยสารติดตาม ซึ่งมีราคาแพงและมักเกิดปัญหาจากปฏิกิริยาข้าม เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว การผลิต MAb-HSPGs ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงโดยตรง จึงเป็นสิ่งที่ช่วยได้มาก การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า แอนติบอดี 1E4-1C2 สามารถใช้ช่วยแยกวินิจฉัย acute myeloid leukemia ได้ ดังนั้นหากสามารถติดฉลากแอนติบอดีดังกล่าวด้วย FITC จะสามารถเพิ่มคุณค่าให้แก่แอนติบอดี และใช้ในงานตรวจแบบ Direct immunofluorescent ได้ การศึกษาครั้งนี้เริ่มจากการเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 ในปริมาณมากด้วยการฉีดเข้าท้องหนู เก็บน้ำช่องท้อง ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Melon™ gel purification จากนั้นติดฉลากด้วยสาร FITC พบว่าสัดส่วนของ FITC กับโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เหมาะสมในการติดฉลากคือ 80 μgFITC : มิลลิกรัมของแอนติบอดี การทดสอบคุณภาพของน้ำยาที่เตรียมได้ ทำโดยพิสูจน์คุณสมบัติของแอนติบอดีด้วย การย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ซึ่งมีการแสดงออกของโมเลกุลที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีดังกล่าว โดยเจือจางแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Direct immunofluorescent ตรวจวัดการเรืองแสงด้วยวิธี Flow cytometry ผลพบว่าความเข้มข้นแอนติบอดีน้อยที่สุดที่ให้ผลบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มากกว่า 5% ขึ้นไปคือ 40 $\mu\text{g/ml}$ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สามารถเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSPGs ที่ติดฉลากด้วย FITC ได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย การปฏิบัติงานทางภูมิคุ้มกันวิทยา หรือสามารถ ทำในลักษณะเชิงการค้า เนื่องจากเป็นแหล่งผลิตแห่งแรก ยังไม่มีรายงานและการผลิตจำหน่ายที่ใดมาก่อน วารสารเทคนิค การแพทย์ 2552; 42: 50-56.

คำห้ส: Monoclonal antibody, HSPG, AML, FITC, immunofluorescent technique

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** บริษัทแปซิฟิกไบโอเทคจำกัด เลขที่ 6 ซอยสนธิวัฒนา 3 ลาดพร้าว 110 บางกะปิ กรุงเทพฯ 10310

Abstract: Production of fluorescein isothiocyanate conjugated mouse monoclonal anti-heparan sulfate proteoglycans for immunologic assay

Jutamas Bunfoo*, Jaturaporn Pornsilapathip, Preeyanat Vongchan***

Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) involves significantly in biological activities and acts as the co-receptor of many certain molecules with heparin binding region or some pathogen. Previous study of Assistant Professor Dr. 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 reacts with cell membrane molecules of acute myeloid leukemia (AML) by indirect immunofluorescent technique. Since the method is time consumed and requires FITC-conjugated anti-mouse Igs which is expensive, we therefore aimed to prepare fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated MAbs clone 1E4-1C2 to value add of anti-human liver HSPGs. FITC was covalently coupled to primary amines (lysine) of the immunoglobulin. The result showed that F/P ratio of this product is 4.73. Moreover, antibody concentration showing significantly positive result (5%) with HepG2 cell line by direct immunofluorescent is 40 µg/ml. Finally, we could prepared FITC conjugated anti-human liver HSPGs and use to investigate AML by direct immunologic application. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2009; 42: 50-56.

Keywords: Monoclonal antibody, HSPG, AML, FITC, immunoifluorescent technique

* Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Science, Chiang Mai University

** Pacific Biotech, Bangkok

ที่มาและปัญหาวิจัย

Heparan sulfate proteoglycan (HSPGs) มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการพื้นฐานต่างๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ cell adhesion, migration, differentiation และ cell proliferation ทั้งยังเป็น co-receptor ให้กับหลายโมเลกุลที่มี heparin binding region อยู่ เช่น cytokine, Apo E และ growth factor¹ ซึ่ง ต้องจับกับ HSPGs ร่วมด้วยเพื่อทำงาน หรือส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์

ได้ ที่สำคัญคือ HSPGs เป็น receptor โดยตรง สำหรับพาหะก่อโรคหลายชนิด เช่น มาลาเรีย และไวรัสไข้เลือดออก ทำให้เชื้อโรคเข้าสู่อวัยวะหรือเซลล์ เป้าหมายเพื่อก่อเกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะหรือเซลล์นั้นได้

ตับเป็นอวัยวะที่ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด เซลล์ที่พบจำนวนมากที่สุดคือ hepatocytes ซึ่งพบว่าบนผิวมี heparan sulfate proteoglycan (HSPGs) เป็นองค์ประกอบหลักและยังพบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถสร้าง

และหลัง heparan sulfate ที่ตรวจพบได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์ เซลล์อื่นๆ ที่แม้ว่าจะพบได้น้อย เช่น parenchymal cells ก็พบว่าสร้าง HSPGs เช่นกัน แต่สร้าง Proteoglycan ชนิดอื่นร่วมด้วย ได้แก่ Chondrotin/Dermatan sulfate proteoglycan ด้วยเหตุที่เซลล์ตับมีการสร้าง HSPG ที่จำเพาะ ดังนั้นความเกี่ยวข้องระหว่างโมเลกุลดังกล่าวกับพยาธิสภาพที่เกิดแก่เซลล์ตับจึงเป็นที่สนใจของนักวิจัยจำนวนมากที่จะศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้น ในกลไกการก่อโรค จากไวรัส ปรสิตร หรือโมเลกุลใดๆ

การศึกษาและพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวต้องมีเครื่องมือสำคัญ คือ โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อโมเลกุล และเนื่องจาก ผศ.ดร.ปริยานาถ วงศ์จันทร์ ได้ทำการสกัดโมเลกุล HSPGs จากตับคนปกติและ นำส่วนของ D2 fraction ผลิตเป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดีได้โคลนเป็นจำนวนมาก พบว่าบางโคลนมีความจำเพาะต่อส่วน glycosaminoglycans หรือ GAGs ซึ่งเป็นชีวโมเลกุลสำคัญ และเป็นส่วนประกอบของ HSPGs ซึ่งเป็นที่น่าสนใจและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ได้อย่างดี

การศึกษาของ ผศ.ดร.ปริยานาถ วงศ์จันทร์ เบื้องต้นพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี clone 1E4-1C2 มีความจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยง มะเร็งเม็ดเลือดขาวสาย myeloid¹ โดยพบการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ แตกต่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเม็ดเลือดในสายอื่น เช่น lymphoid lineage และ monocytoid² จากนั้นได้ทำการศึกษาบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติและผู้ป่วยโรคเลือด ได้แก่ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาบนเม็ดเลือดตัวอ่อนในไขกระดูกด้วย พบว่าไม่มีการแสดงออกของ human liver HSPGs บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ หรือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น แต่กลับมีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Acute myeloid leukemia หรือ AML³⁻⁴ งานวิจัยที่ผ่านมา มีการใช้แอนติบอดีดังกล่าวช่วยแยกวินิจฉัยชนิดของลิวคีเมีย อย่างไรก็ดีตาม วิธีการตรวจสอบเป็นแบบ Indirect immunofluorescence จำเป็นต้องใช้แอนติบอดี

จำเพาะต่อ mouse immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วย FITC ซึ่งมีราคาแพง จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ ในการเพิ่มคุณค่าให้แก่แอนติบอดีที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และสามารถนำไปใช้งานตรวจวินิจฉัย AML แบบ Direct immunofluorescence ได้

การผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อ HSPGs ของเซลล์ตับยังไม่มีเคยมีรายงานมาก่อนและไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด การศึกษาประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี และเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนางานเพื่อเพิ่มคุณค่าของแอนติบอดีดังกล่าวให้มีมากขึ้น เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา และงานด้านพยาธิวิทยามากขึ้น ผู้วิจัยได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นดังกล่าวมาใช้ในงานวิจัย และศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้น เพื่อให้ได้ความรู้เพิ่มเติม เกี่ยวกับโมเลกุลที่จำเพาะกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อ HSPGs ของเซลล์ตับ โดยได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดี clone 1E4-1C2 ติดฉลากด้วย FITC เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ นอกจากช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อแอนติบอดีที่สองซึ่งจำเพาะต่อ mouse immunoglobulin ที่ติดฉลาก FITC แม้ว่าจะมีจำหน่ายในหลายบริษัท แต่มีราคาแพง นอกจากนี้ยังเกิดปัญหา ปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติบอดีติดฉลากกับโปรตีนอื่นได้ ดังนั้นหากสามารถติดฉลากสารเรืองแสงกับแอนติบอดีโดยตรงจะช่วยลดปัญหาต่างๆ และลดขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาอีกด้วย ขั้นตอนการติดฉลากไม่ยุ่งยาก และเป็นเทคนิคที่เปิดเผยสามารถสืบค้นวิธีการได้จากวารสารทางวิชาการต่างๆ⁵⁻¹⁰ การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลที่ต้องการศึกษา และติดฉลาก FITC กับแอนติบอดีโดยตรง จึงเป็นแนวทางการศึกษาทดลองที่น่าสนใจ สามารถทำได้เองในห้องปฏิบัติการ และสามารถนำไปใช้ได้จริง

วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีและเพิ่มคุณค่าของโมโนโคลนอล แอนติบอดีด้วยการติดฉลากด้วยเอนไซม์ FITC และนำไปใช้ประโยชน์ในการช่วยแยกวินิจฉัย AML ด้วยวิธี Direct immunofluorescence ได้

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเซลล์ลูกผสมโคลน 1E4-1C2 ที่มีความจำเพาะต่อ human liver HSPGs ให้อยู่ในระยะ Log phase ทดสอบคุณสมบัติความจำเพาะของแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค Indirect immunofluorescence โดยย้อมกับเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 จากนั้นผลิตแอนติบอดีในปริมาณมากโดยวิธี Ascitic fluid induction เมื่อสัตว์ทดลองเกิดภาวะ Ascitis แล้วเจาะเก็บน้ำช่องท้องและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป Melon IgG Purification kit ตามวิธีที่กำหนดโดยบริษัท ผู้ผลิตทดสอบความบริสุทธิ์และหาความเข้มข้นของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE และ Lowry's method ตามลำดับ

2. การติดฉลาก anti-HSPGs clone 1E4-1C2 กับ fluorescein isothiocyanate (FITC)

ปรับโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 ให้มีความเข้มข้น 4 mg/ml ใน reaction buffer pH 9.5 เตรียม fresh FITC โดยละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 10 mg/ml ติดฉลากแอนติบอดีโดยเติม FITC 8 μ l ผสมกับแอนติบอดี 250 μ l (ความเข้มข้น FITC 80 μ g/mg Ab) ลงใน microcentrifuge tube ที่หุ้ม foil ทำปฏิกิริยาบนเครื่อง Rotator นาน 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาและกำจัด free FITC ด้วยการปั่นล้างใน Nanosep 30K omea ด้วย PBS pH 7.2 เก็บ washing buffer จากการปั่น วัดการดูดกลืนแสงที่ O.D. 495 nm หยุดการปั่นล้างเมื่อ washing buffer มีค่าการดูดกลืนแสงได้ค่า 0.000 (หมายถึงไม่มี free FITC เหลืออยู่) นำสารที่ได้ไปวัด O.D. ที่ 495 nm และ 280 nm คำนวณค่า F/P ratio คำนวณหาความเข้มข้นของแอนติบอดีจากค่า O.D. 280 nm โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ O.D. 280 nm เท่ากับ 1.4 มีค่าความเข้มข้นแอนติบอดีชนิด IgG เท่ากับ

1 mg/ml ละลายแอนติบอดีกลับให้มีความเข้มข้น 4 mg/ml เท่าเดิม

3. การทดสอบ activity และคุณสมบัติของ anti-HSPGs conjugated FITC ด้วยปฏิกิริยา direct immunofluorescence

ปั่นล้าง HepG2 cell lines เพื่อกำจัด medium ด้วย PBS pH 7.2 ที่ 4°C 2800 g นาน 5 นาที ทั้งหมด 3 ครั้ง ย้อมเซลล์ด้วย 0.2% Trypan blue และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้ hemacytometer ปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ 1×10^7 cell/ml ด้วย PBS pH 7.2 เติมน้ำยาให้ถึงความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20% ของ cell suspension ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ on ice นาน 30 นาที เพื่อ block Fc receptor บนผิวเซลล์ ปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ 5×10^6 cell/ml ด้วย cold 1% BSA-PBS - NaN_3 เติมน้ำยา และ/หรือ monoclonal antibodies ชนิดต่างๆ และชุดควบคุมลงใน microcentrifuge tube เพื่อทำ reaction ผสมแล้วแช่ on ice นาน 30 นาที ครอบคลุมด้วย cold 1% BSA-PBS- NaN_3 ที่ 3,000 rpm นาน 5 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำ FITC conjugated rabbit anti-mouse Igs ที่ resuspend ใน 10% AB serum 50 μ L (dilute 1:50) ผสมแล้วแช่ on ice ในที่มีเวลานาน 30 นาที ครอบคลุมด้วย cold 1% BSA-PBS- NaN_3 ที่ 3,000 rpm นาน 5 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำ sheath fluid หลอดละ 300 μ L นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง flow cytometer

ผลการทดลอง

ผลการเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วย Melon™ IgG Purification kit (PIERCE) พบว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอพบแถบโปรตีนขนาด 180 kD ใน non-reduced และสองแถบขนาด 63 และ 26 kD ใน reduced gel ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงผลการเตรียม 1E4-1C2 และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย 10%SDS-PAGE

หลังจากการเก็บ washing buffer ไปวัดการดูดกลืนแสงได้ค่า 0.000 ซึ่งหมายถึงการไม่มี free FITC

เหลืออยู่แล้ว นำสารที่ได้ไปวัด O.D. ที่ 495 nm และ 280 nm เพื่อคำนวณค่า F/P ratio ผลพบดังตารางที่ 1

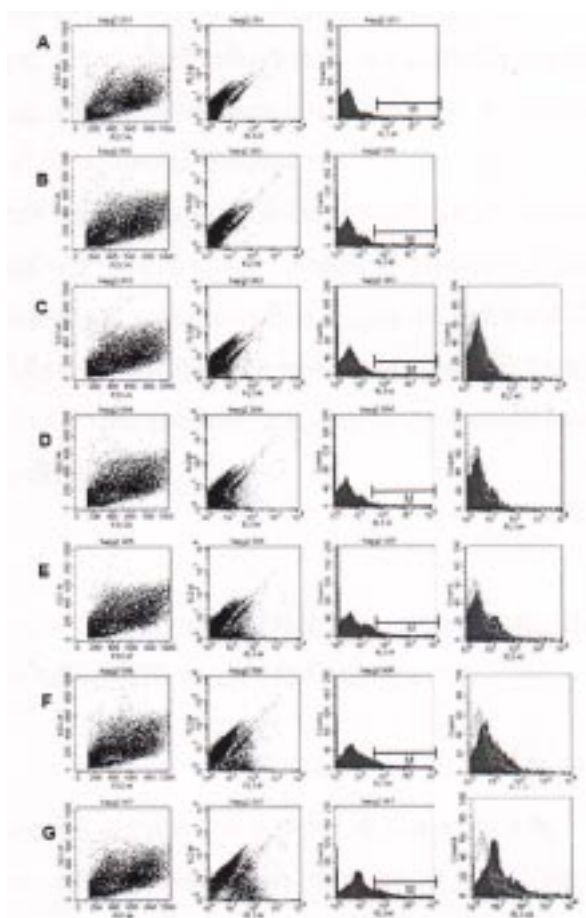
ตารางที่ 1 แสดงผลการคำนวณค่า F/P ratio ของการติดฉลาก 1E4-1C2 กับ FITC

Condition (μg FITC/mg of Ab)	80
A 495 nm	3.612
A 280 nm	3.436
F/P ratio	4.73

การทดสอบ activity และคุณสมบัติของ anti-HSPGs conjugated FITC ด้วยปฏิกิริยา Direct immunofluorescence

จากการพิสูจน์คุณสมบัติของแอนติบอดีด้วยการย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2 ซึ่งมีการแสดงออกของโมเลกุลที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 ที่ผลิตได้ โดยเจือจางแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ

ทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Direct immunofluorescent ตรวจวัดการเรืองแสงด้วยวิธี Flow cytometry ผลพบว่าความเข้มข้นแอนติบอดีน้อยที่สุดที่ให้ผล positive มากกว่า 5 % ขึ้นไปคือ 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ดังภาพ (รูปที่ 2) และเมื่อย้อม 1E4-1C2 ที่ยังไม่ได้ติดฉลากด้วยความเข้มข้น 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เช่นกัน พบผล positive ในร้อยละที่ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 2 ผลการย้อมเซลล์ HepG2 ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 ที่ติดฉลากด้วย FITC
A: Cell control, **B:** Negative control, **C-G:** แอนติบอดีติดฉลากที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 และ 80 µg/ml ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อ human livers HSPGs clone 1E4-1C2 ติดฉลากด้วย FITC ซึ่งผลิตขึ้นที่ห้องปฏิบัติการเป็นแห่งแรก การทดลองครั้งนี้เริ่มจากการทำให้แอนติบอดีมีความบริสุทธิ์โดยใช้ Melon™ Gel Monoclonal IgG purification kit ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี Lowry's method ผลพบว่า แอนติบอดีที่ได้มีปริมาณน้อยมาก และผลจาก SDS-PAGE คาดว่า band ที่เกิดขึ้นจากแอนติบอดีจริงๆ แต่อย่างไรก็ตาม ก็ยังพบ band ที่อื่นๆ ที่นอกเหนือจาก band ที่เกิดจากแอนติบอดี แม้ว่าจะทำให้บริสุทธิ์อีกหลายครั้งแล้วก็ตาม ผลที่เกิดขึ้นนี้ เกิดจากความสามารถในการทำให้บริสุทธิ์ของวิธีที่ใช้

อยู่มีจำกัด ไม่สามารถกำจัด Non-specific protein ออกให้หมดได้ เมื่อนำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่เคยหาไว้แล้วคือ 80 µg FITC/mg Ab และกำจัด unconjugated-FITC ออก ผลพบว่า ค่า F/P ratio ที่ได้คือ 4.73 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ดีที่สุดในการติดฉลากสารเรืองแสงจึงยอมรับได้ จากนั้นทำการทดลองเพื่อพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย FITC ที่ผลิตได้มาย้อมกับเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 cell line ซึ่งมีการแสดงออกของโมเลกุลที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ human livers HSPGs ได้ โดยเจือจางแอนติบอดีที่ติดฉลากแล้วในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบความแรงของปฏิกิริยาโดยทดสอบด้วยเทคนิค Direct

immunofluorescence ตรวจสอบความเข้มข้นของสารเรืองแสง ด้วยวิธี flow cytometry พบว่าที่ความเข้มข้นของ 1E4-1C2 conjugated FITC ที่น้อยที่สุดหรือเท่ากับที่ให้ผล positive ร้อยละ 5 คือ 40 µg/ml (ได้ผล positive ร้อยละ 7.79) เมื่อเทียบกับ activity ของ 1E4-1C2 ก่อนการติดฉลากด้วยเทคนิค Indirect immunofluorescent พบว่าให้ผล positive ร้อยละ 8.06 ซึ่งแทบไม่แตกต่างกันเลย จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าขั้นตอนต่างๆ ในการติดฉลากเป็นที่น่าพอใจ แต่อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของ 1E4-1C2 conjugated FITC 40 µg/ml หากเปรียบเทียบกับ commercial antibody ยี่ห้อ CALTAG™ และยี่ห้อ DAKO™ ซึ่งใช้ความเข้มข้นแอนติบอดีเพียง 20 µg/ml ต่อปฏิกิริยาแต่ให้ผล positive ที่ชัดเจนกว่า ก็ต้องถือว่า 1E4-1C2 conjugate FITC ที่ผลิตขึ้นมี sensitivity ที่น้อยกว่ามาก คาดว่าเกิดจากการที่มี Non-specific protein ปนอยู่จึงทำให้ไม่ทราบความเข้มข้นของ Immunoglobulin ที่แท้จริงได้ เมื่อนำมาทำ Immunofluorescent แอนติบอดีที่มีในปฏิกิริยาจึงน้อยกว่าที่เจอจริงไป ทำให้ความแรงของการเรืองแสงลดลง ปัญหาดังกล่าวนี้อาจเกิดจากความสามารถในการทำให้บริสุทธิ์ของวิธีที่ใช้ อยู่มีจำกัดตั้งข้างต้น ประสิทธิภาพที่น้อยกว่าเช่นนี้ สามารถแก้ไขได้โดยเปลี่ยนวิธีการทำให้บริสุทธิ์เป็นวิธีอื่นๆ เช่น Affinity chromatography เป็นต้น

คำนิยม

ผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการ IRPUS ประจำปีการศึกษา 2550 ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณ ทำให้มีการต่อยอดและเพิ่มคุณค่าให้แก่แอนติบอดีที่สามารถขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ และยังไม่มีรายงานมาก่อน

เอกสารอ้างอิง

1. Zehe C, Engling A, Wegehingel S, Schafer T and Nickel W. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. Proc Natl Acad Sci 2006; 104: 42: 15479-15484
2. พลมัลย์ คชินทร์ไพร. การกระจายตัวของเฮปารัน ซัลเฟต โปรติโอไกลัยแคน ที่แยกได้จากตับของมนุษย์ บนผิวเซลล์ฮีมาโตพอยเอติก. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2547: 1-4
3. Vongchan P, Linhardt R.J. Expression of human liver HSPGs on acute myeloid leukemia. Clinical Immunology 2007; 122: 194-206
4. พัลลภา เตจาร์รังสี. การตรวจแยกมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดมัยลอยด์ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีใหม่ ที่จำเพาะต่อเฮปารัน ซัลเฟต โปรติโอไกลัยแคน ที่แยกได้จากตับของมนุษย์. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2548: 1-11
5. T.H. The and T. E. W. Feltkamp. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibody. Immunology 1970; 18: 865-873
6. T.H. The and T. E. W. Feltkamp. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibody II. Immunology 1970; 18: 875-881
7. Beutner E. H., Holborow E. J. and Johnson G. D. 'Quantitative studies on immune fluorescent staining. I. Analyses of mixed immunofluorescence. Immunology 1967; 12: 327.
8. Zehe C, Engling A, Wegehingel S, Schafer T and Nickel W. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. Proc Natl Acad Sci 2006; 104: 42: 15479-15484
9. โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์. โพลีไซโตเมทรี. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 2539
10. วันทนา คงเนียม. การพัฒนาชุดน้ำยาในการตรวจนับ CD4 positive cells โดยการติดฉลาก anti CD4 monoclonal antibody ด้วย Fluorescein isothiocyanate. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2541: 1-25