นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อเฮพาแรน ซัลเฟต โปรติโอ กลัยแคน ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์สราดิช เปอร์ออกซิเดส สำหรับงานตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา

นิตยา จันชิว* จตุรพร พรศิลปะทิพย์ปีรียานาถ วงศ์จันทร์*

บทคัดย่อ

Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) มีความสำคัญเกี่ยวกับกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ และเป็นตัวรับจำเพาะร่วมให้กับโมเลกุลหลายชนิดที่มี heparin binding region อยู่ HSPGs พบได้บนผิวเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะบนผิวเซลล์ hepatocyte ของเซลล์ตับมี HSPGs เป็นองค์ประกอบหลัก เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และบทบาทของ HSPGs บนผิวเซลล์ตับได้มีการแยก HSPGs จากผิวเซลล์ตับของมนุษย์มาทำให้บริสุทธิ์และนำมาผลิตเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ HSPGs จากผิวเซลล์ตับของมนุษย์ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาลักษณะ หน้าที่ของโมเลกุลดังกล่าว จากการศึกษาก่อนหน้านี้เบื้องต้นพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี โคลน 1E4-1C2 มีความจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Acute myeloid leukemia (AML) อย่างมีนัยสำคัญ การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะกับ HSPGs จากผิวเซลล์ตับของมนุษย์ยังไม่มีรายงานและไม่มีจำหน่ายในท้องตลาดมาก่อน ดังนั้นเพื่อเพิ่มคุณค่าของโมโนโคลนอล แอนติบอดีดังกล่าวให้มากขึ้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดี โคลน 1E4-1C2 มาติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) เพื่อใช้ภายในห้องปฏิบัติการเอง นอกจากนี้ยังลดค่าใช้จ่ายในการซื้อแอนติบอดีที่สองที่จำเพาะต่อ mouse immunoglobulins ติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งมีราคาแพง และมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติบอดีที่ติดฉลากกับกับโปรตีนอื่นๆ การติดฉลากโมโนโคลนอล แอนติบอดี โคลน 1E4-1C2 ด้วยเอนไซม์ HRP ใช้วิธี 2-Step glutaraldehyde โดยอาศัย glutaraldehyde ช่วยส่งเสริมให้ HRP สร้าง aldehyde group และจับกับ primary amine ของโมโนโคลนอล แอนติบอดี จากการตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP โดยใช้ SDS-PAGE ซึ่งพบแถบที่มีขนาด 194 kDa สำหรับการตรวจสอบคุณสมบัติความจำเพาะใช้วิธี direct ELISA พบว่าแอนติบอดียังคงความจำเพาะต่อแอนติเจนและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ HRP อยู่ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสามารถติดฉลากโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ HRP เพื่อใช้ประโยชน์ในงานภูมิคุ้มกันวิทยาและงานพยาธิวิทยาต่อไป **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2551; 41:167-174.**

คำหัส: monoclonal antibody, HSPG, liver, AML, conjugated antibody

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

Abstract : Production of horseradish peroxidase conjugated monoclonal anti-heparan sulfate proteoglycans antibody for immunologic assay

Nittaya Chansiw* Jaturaporn Pornsilapathip Preeyanat Vongchan***

Abstract

Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) significantly involves in fundamental cell activities and acts as the co-receptor of many certain molecules with heparin binding region. HSPGs express on membrane of many cell types. Moreover, HSPGs are main composition on hepatocyte membrane of liver. In effort to study about relationship and role of HSPGs, human liver HSPGs was isolated and purified and specific monoclonal antibody (mAbs) was produced to use as a tool to educate the characteristics and function of liver HSPGs. Previous study showed that mAbs clone 1E4-1C2 made specific with cell membrane molecules of acute myeloid leukemia (AML). Since, anti-human liver HSPGs has not been reported and avialable, our study was aimed to prepare horseradish peroxidase (HRP) conjugated mAbs clone 1E4-1C2. This product can be used in immunologic assay with no need of secondary antibody, that is expensive and may cause cross reaction with other protein in serum. Two-step glutaraldehyde technique was used to conjugate mAbs clone 1E4-1C2 with HRP. Glutaraldehyde enhanced HRP to produce aldehyde group which can be caught primary amine of mAbs. After that molecular weight of mAbs conjugated with HRP was investigated by SDS-PAGE. The results showed 195 kDa of mAbs conjugated with HRP. Monoclonal antibody clone 1E4-1C2 specificity was investigated by direct ELISA. The results showed that HRP conjugated anti liver HSPG has its own activity both in antigen specific and peroxidase pattern. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2008; 41: 167-174.**

Keywords: monoclonal antibody, HSPG, liver, AML, conjugated antibody

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

** Pacific Biotech Company, Bangkok

ที่มาและปัญหาวิจัย

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า 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 factor ซึ่งต้องจับกับ HSPGs ร่วมด้วยเพื่อทำงาน หรือส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ได้[1-2] ที่สำคัญคือ HSPGs เป็น receptor โดยตรงสำหรับพาหะก่อโรคหลายชนิด เช่น เชื้อมาลาเรีย และเชื้อไวรัสไข้เลือดออก ทำให้เชื้อโรคเข้าสู่อวัยวะหรือเซลล์เป้าหมายเพื่อก่อเกิดพยาธิสภาพต่อ

อวัยวะหรือเซลล์นั้นได้

ตับเป็นอวัยวะที่ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด เซลล์ที่พบจำนวนมากที่สุดคือ hepatocytes ซึ่งพบว่าบนผิวมี heparan sulfate proteoglycan (HSPGs) เป็นองค์ประกอบหลัก และยังพบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถสร้างและหลั่ง heparan sulfate ที่ตรวจพบได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์ เซลล์อื่นๆ ที่แม้ว่าจะพบได้น้อย เช่น parenchymal cells ก็พบว่าสร้าง HSPGs เช่นกัน แต่สร้าง Proteoglycan ชนิดอื่นร่วมด้วย ได้แก่ Chondroitin/Dermatan sulfate proteoglycan[3,4] ด้วยเหตุที่เซลล์ตับมีการสร้าง HSPG ที่จำเพาะ ดังนั้นความเกี่ยวข้องระหว่างโมเลกุลดังกล่าวกับพยาธิสภาพที่เกิดแก่เซลล์ตับจึงเป็นที่สนใจของนักวิจัยจำนวนมากที่จะศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นในกลไกการก่อโรค จากไวรัส ปรสิต หรือโมเลกุลใดๆ

การที่จะสามารถศึกษาและพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวได้ จะต้องมีเครื่องมือสำคัญ คือ โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อโมเลกุล และเนื่องจาก ผศ.ดร.ปรียานาถ วงศ์จันทร์ ได้ทำการสกัดโมเลกุล HSPGs จากตับคนปกติ[5] และนำส่วนของ D2 fraction มาผลิตเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้โคลนเป็นจำนวนมาก[6] พบว่าบางโคลนมีความจำเพาะต่อส่วน glycosaminoglycans หรือ GAGs ซึ่งเป็นชีวโมเลกุลสำคัญ และเป็นส่วนประกอบของ HSPGs ซึ่งเป็นที่น่าสนใจและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ได้อย่างดี

การศึกษาของ ผศ.ดร.ปรียานาถ วงศ์จันทร์ เบื้องต้นพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี clone 1E4-1C2 มีความจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเม็ดเลือดขาวสาย myeloid โดยพบการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ แตกต่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเม็ดเลือดในสายอื่น เช่น lymphoid linage และ monocytoid[7] จากนั้นได้ทำการศึกษาบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติและผู้ป่วยโรคเลือด ได้แก่ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาบนเม็ดเลือดตัวอ่อนในไขกระดูกด้วย ผลปรากฏว่าการแสดงออกของ human liver HSPGs บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ หรือแม้กระทั่งบนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นแต่กลับมีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Acute myeloid leukemia[8] จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาการหลุดลอกของโมเลกุลดังกล่าวจากผิวเซลล์ที่เกิดพยาธิสภาพ และสามารถใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ ในการพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจในซีรัม เพื่อใช้ช่วยวินิจฉัยและการติดตามผลการรักษา

การผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อ HSPGs ของเซลล์ตับยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนและไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด การศึกษาประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี และเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนางานเพื่อเพิ่มคุณค่าของแอนติบอดีดังกล่าวให้มีมากขึ้น เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในงานทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา และงานด้านพยาธิวิทยามากขึ้น ผู้วิจัยได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นดังกล่าวมาใช้ในงานวิจัย และศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้น เพื่อให้ได้ความรู้เพิ่มเติม เกี่ยวกับโมเลกุลที่จำเพาะกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อ HSPGs ของเซลล์ตับ โดยได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดี clone 1E4-1C2 มาทำการติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการเอง นอกจากทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการซื้อ แอนติบอดีตัวที่สองซึ่งจำเพาะต่อ mouse immunoglobulin ที่ติดฉลากเอนไซม์ แม้ว่าจะมีจำหน่ายในหลายบริษัท แต่มีราคาแพง นอกจากนี้ยังเกิดปัญหา ปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติบอดีติดฉลากกับโปรตีนในซีรัม ดังนั้นหากสามารถติดฉลากเอนไซม์กับแอนติบอดีโดยตรงจะช่วยลดปัญหาต่างๆ ดังกล่าวได้เป็นอย่างดี และลดขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาอีกด้วย ขั้นตอนการติดฉลากเอนไซม์ไม่ยุ่งยาก และเป็นเทคนิคที่เปิดเผยสามารถสืบค้นวิธีการได้จากวารสารทางวิชาการต่างๆ การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลที่ต้องการศึกษา และติดฉลากเอนไซม์กับแอนติบอดีโดยตรง จึงเป็นแนวทางการศึกษาทดลองที่น่าสนใจ สามารถทำได้เองในห้องปฏิบัติการ และสามารถนำไปใช้ได้จริง

การติดฉลากโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase โดยวิธี Two–steps glutaraldehyde[9] เป็นวิธีที่ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพจึงวิธีที่นิยมใช้กันโดยอาศัย glutaraldehyde ช่วยส่งเสริมให้เอนไซม์ Horseradish

peroxidase สร้าง aldehyde group แล้วกลายเป็น activate peroxidase จึงสามารถจับกับ primary amine ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีได้

วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีและเพิ่มคุณค่าของโมโนโคลนอล แอนติบอดีด้วยการติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) และนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาโมเลกุลของมี Heparan sulfate proteoglycan (HSPGs) ในงานทางภูมิคุ้มกันวิทยา

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้บริสุทธิ์[10]

เลี้ยงเซลล์ลูกผสมโคลน 1E4-1C2 ที่มีความจำเพาะต่อ human liver HSPGs ให้อยู่ในระยะ Log phase จากนั้นทดสอบคุณสมบัติความจำเพาะของแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค Indirect immunofluorescence โดยย้อมกับเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 จากนั้นผลิตแอนติบอดีในปริมาณมากโดยวิธี Ascitic fluid induction เมื่อสัตว์ทดลองเกิดภาวะ Ascitis แล้ว เจาะเก็บน้ำช่องท้อง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป Melon IgG Purification kit ตามวิธีที่กำหนดโดยบริษัทผู้ผลิต ทดสอบความบริสุทธิ์และหาความเข้มข้นของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE และ Lowry's method ตามลำดับ

2. การติดฉลากโมโนโคลนอล แอนติบอดีด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP)[9]

ผสม 1.25% glutaraldehyde 200 µl กับ HRP 2 mg/200 µl ใน phosphate buffer pH 6.8 incubate 4 °C เขย่าตลอดเวลา นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นกำจัด glutaraldehyde ส่วนเกินด้วย Nanosep 10K OMEGA (PALL) โดยปั่นที่ 10,000 rpm จนแห้งและละลายกลับด้วย 0.1M sodium carbonate/bicarbonate buffer pH 9.5 /30% sucrose 200 µl เก็บใน microcentrifuge tube ปั่นล้าง Micro Bio-spin ™ Chromatography Column ด้วย 0.15M NaCl 500 µl 3 ครั้ง โดยปั่นที่ 1,000 g จน gel แห้ง จากนั้นเติม 1E4-1C2 ความเข้มข้น 1 mg/100 µl ลงไปใน Micro Bio-spin ™ Chromatography Column ปั่นจนแห้งเก็บใน microcentrifuge tube ผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (1E4-1C2) 1 mg/100 µl กับ HRP 2 mg/200 µl incubate 4 °C เขย่าตลอดเวลาข้ามคืน ครบเวลาเติม 2M glycine 15 µl (final concentration 0.1M) และกำจัด HRP ส่วนเกินและ buffer อื่นๆ ด้วย Microsep 50K OMEGA (PALL) ปั่นที่ 3,400 rpm จนแห้ง ละลายกลับด้วย PBS pH 7.2 ปริมาตร 100 µl และปรับสภาพให้อยู่ใน PBS pH 7.2 โดยใช้ Micro Bio-spin ™ Chromatography Column ก่อนการนำไปทดสอบต่อไป

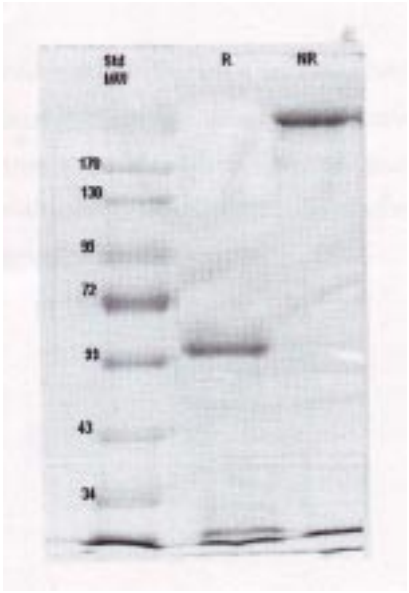
3. การตรวจสอบขนาดน้ำหนักโมเลกุลและคุณสมบัติความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีติดฉลากเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) ที่เตรียมได้

นำแอนติบอดีที่ติดฉลากแล้วด้วย HRP ผ่านกระแสไฟฟ้าในสภาวะ Reduced และ Non-reduced เปรียบเทียบกับ standard molecular weight โดยการใช้กระแสไฟฟ้า 200V นาน 45 นาที ย้อมแผ่นเจลด้วยสี Coomasie Blue จากนั้นผ่านโปรตีนลงบน PVDF membrane และทำปฏิกิริยากับ Avidin-HRP (1:4000) เพื่อพิสูจน์ว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้มี HRP ติดฉลากอยู่จริงและยังคงมีคุณสมบัติของเอนไซม์ดีอยู่ โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนที่บริเวณ 194 kD ใน Non-reduced gel และให้แถบสีเมื่อตรวจวัดปฏิกิริยาของ Avidin-HRP ด้วย DAB/H_2O_2 substrate

ทดสอบผลผลิตที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค Direct ELISA โดยเคลือบหลุมทดสอบด้วยแอนติเจน B3 fraction ที่ทราบว่าให้ผลบวกต่อแอนติบอดี 1E4-1C2 ข้ามคืน หลังจากล้างแอนติเจนส่วนเกินออก block non-specific binding sites ด้วย 5%BSA-PBST เปรียบเทียบกับ 5% Gelatin-PBS ปริมาตร 200 uL/well นาน 1 ชั่วโมงที่ 37 °C ครบเวลาล้างออก และเติม HRP conjugated 1E4-1C2 ที่เตรียมได้ในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 uL/well ครบเวลาล้างออก และเติม Avidin-HRP (1:10,000)

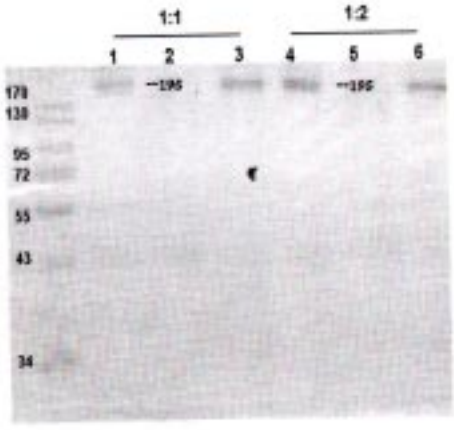
ผลการทดลอง

ผลการเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วย Melon IgG Purification kit พบว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอ พบแถบโปรตีนขนาด 180 kD ใน non-reduced และสองแถบขนาด 63 และ 26 kD ใน reduced gel ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1

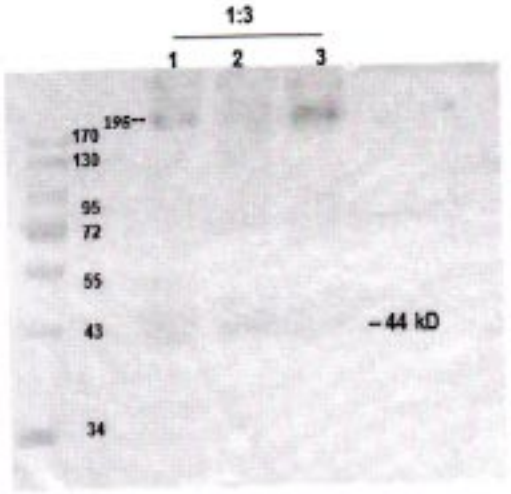


รูปที่ 1 แสดงผลการเตรียม 1E4-1C2 และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย 10%SDS-PAGE
R : Reduced condition, NR : Non-reduced condition

ผลการติดฉลากโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) จากการติดฉลาก 1E4-1C2 ด้วย HRP และทดสอบตัวอย่างด้วยการแยกผ่านกระแสไฟฟ้าใน SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาด 195 kD เมื่อแยกผ่านกระแสไฟฟ้า โดยคำนวณจากขนาดมวลรวมของ immunoglobulin (150 kD) และ HRP (44 kD) และพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการติดฉลากเอนไซม์คือ Ig: HRP = 1:2 เนื่องจากได้ผลผลิตที่มี HRP ติดฉลากอยู่ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากการใช้อัตราส่วน 1:1 หรือ 1:3 (รูปที่ 2) นอกจากนี้ยังลดปัญหาการกำจัด HRP ส่วนเกินที่ไม่ถูกติดฉลากออก ซึ่งพบได้มากเมื่อใช้อัตราส่วน 1:3 ดังแสดงในรูปที่ 3

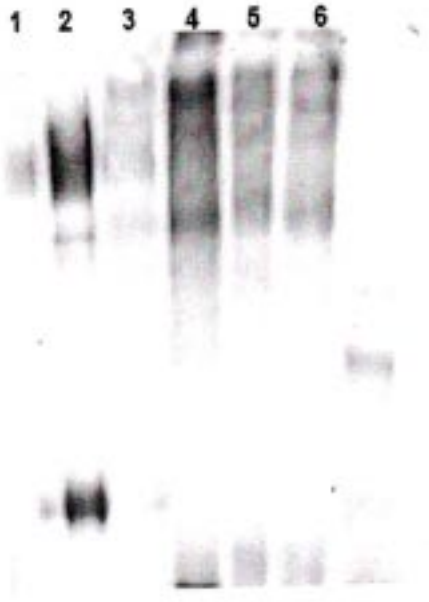


รูปที่ 2 เปรียบเทียบผลการติดฉลาก HRP ในอัตราส่วนระหว่าง Ig:HRP ในอัตราส่วน 1:1, 1:2.
Lane 1, 4: Non-reduced gel, Lane 2, 5: Reduced gel, Lane 3, 6: ตัวอย่างก่อนการกำจัด HRP ส่วนเกิน



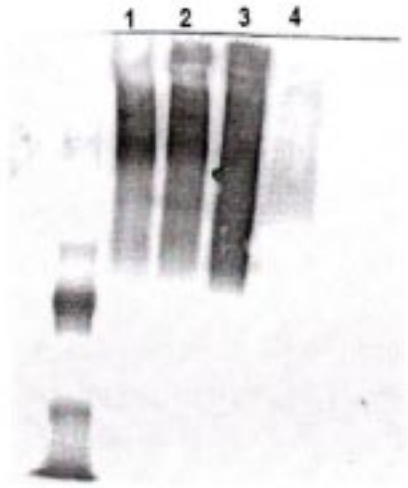
รูปที่ 3 การติดฉลาก HRP ในอัตราส่วนระหว่าง Ig:HRP ขนาด 1:3 พบการปนเปื้อนของ HRP ส่วนเกิน (44 kD) จำนวนมาก. Lane 1: Non-reduced gel, Lane 2: Reduced gel, Lane 3: ตัวอย่างก่อนการกำจัด HRP

การตรวจสอบขนาดน้ำหนักโมเลกุลและคุณสมบัติความจำเพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีติดฉลากเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) ที่เตรียมได้เพื่อทดสอบแถบโปรตีนว่าเป็น Ig และมีการติดฉลากจริง ผู้วิจัยนำตัวอย่างที่ติดฉลากแล้วแยกผ่านกระแสไฟฟ้า ใน Native gel 7.5% นำเจลส่วนหนึ่งย้อมด้วย Coomasie blue และอีกส่วนหนึ่งโอนผ่านไปบน PVDF membrane เพื่อทดสอบคุณสมบัติของ HRP พบว่าแถบโปรตีนที่พบเป็น Ig จริงเมื่อเทียบกับ standard Ig (รูปที่ 4)



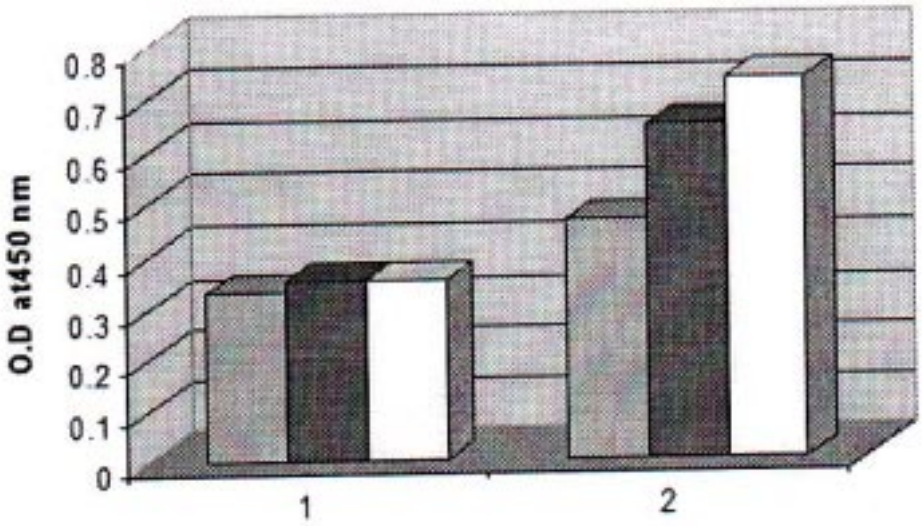
รูปที่ 4 การทดสอบยืนยันว่าแถบโปรตีนในตัวอย่างเป็น Immunoglobulin หลังการติดฉลากด้วย HRP. Lane 1: Purified IgG1, Lane 2: 1E4-1C2, Lane 3: HRP, Lane 4: Reaction ratio of 1:3, Lane 5: Reaction ratio of 1:2, Lane 6: Reaction ratio of 1:1

นอกจากนี้ยังพิสูจน์ได้ว่าแอนติบอดี 1E4-1C2 มี HRP ติดฉลากอยู่ โดยดูจากขนาดน้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบกับ IgG มาตรฐาน และยังคงมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อทดสอบด้วยซับสเตรท H_2O_2-DAB (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลการทดสอบคุณสมบัติของ HRP ที่ติดฉลากกับแอนติบอดีด้วย H_2O_2-DAB substrate. Lane 1: อัตราส่วน 1:1, Lane 2: อัตราส่วน 1:2, Lane 3: อัตราส่วน 1:3, Lane 4: Purified IgG1,

การศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีติดฉลากด้วย HRP ที่เตรียมได้ โดยวิธี Direct ELISA พบว่ามี non specific reaction สูงเมื่อ block non-specific binding sites ด้วย 5%BSA-PBST ซึ่งพิสูจน์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าในการใช้ผลผลิตที่อัตราส่วน Ig:HRP ที่ 1:3 อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาไม่จำเพาะนี้จะหายไปเมื่อเปลี่ยนใช้ 5% gelatin-PBS แทน ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ผลเปรียบเทียบการใช้ 5%BSA-PBST และ 5% Gelatin-PBS ในการ block non-specific binding sites. กลุ่มที่ 1: 5% Gelatin-PBST, กลุ่มที่ 2: 5% BSA-PBST, แท่งสีเทาอ่อน: Ig:HRP 1:1, แท่งสีเทาเข้ม : Ig:HRP 1:2, แท่งสีขาว Ig:HRP 1:1

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีด้วยชุดสำเร็จที่มีจำหน่ายคือ Melon IgG Purification kit ซึ่งมีความจำเพาะในการทำบริสุทธิ์แอนติบอดีชนิด IgG เท่านั้น สามารถทำได้ในระดับหนึ่ง โดยยังคงมีโปรตีนอื่นปะปนบ้าง ทั้งนี้หากต้องการความบริสุทธิ์มากๆ ควรใช้เพียงครั้งเดียว หากนำเจลกลับมาใช้ใหม่ ความสามารถในการทำให้บริสุทธิ์จะลดลง วิธีที่ดีคือการทำบริสุทธิ์ด้วยการใช้ Protein G column แต่เนื่องจากมีราคาแพงมากเมื่อเทียบกับปริมาณที่ต้องการใช้

การติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ HRP พบว่าที่อัตราส่วนของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ 1:2 เป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุด โดยให้ความเข้มของแอนติบอดีติดฉลากเท่ากับอัตราส่วน 1:1 แม้ว่าการใช้อัตราส่วน 1:3 จะให้ผลที่ดีกว่าแต่มีข้อเสียคือปริมาณ HRP อิสระ ถูกกำจัดออกได้ยากด้วยการใช้ gel filtration ทั้งนี้เป็นผลจาก HRP อิสระสามารถทำจับตัวกันเองและมีขนาดใหญ่เกินกว่าค่า molecular cut-off ของ gel filtration ที่เลือกใช้สำหรับการกำจัดโมเลกุลขนาดต่ำกว่า หรือ 50 kD

ผลจากการศึกษายืนยันได้ว่าสามารถติดฉลากแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 ด้วย HRP ได้และยังมีคุณสมบัติ สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจำเพาะได้ สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาแอนติเจนด้วยเทคนิค Direct และ Sandwich ELISA ได้ อย่างไรก็ตาม หากสามารถกำจัด HRP อิสระได้หมด จะไม่มีปัญหาเกี่ยวกับปฏิกิริยาข้ามได้ ทั้งนี้อาจใช้วิธี Gel filtration โดยเปลี่ยนขนาดของ Molecular weight cut-off หรืออาจใช้ Affinity column ในการกำจัด HRP อิสระ

คำนิยม

ผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการ IRPUS ประจำปีการศึกษา 2550 ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณ ทำให้มีการต่อยอดและเพิ่มคุณค่าให้แก่แอนติบอดีที่สามารถขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ และยังไม่มีรายงานมาก่อน

เอกสารอ้างอิง

1. Iozzo, R. V. and Murdoch, A. D.: Clues from the gene and protein side offer novel prespective in molecular diversity and function. Proteoglycans of the extracellular environment 1996; 10: 598-614.
2. Buorden M A. Extracellular Matrix Gene 1990: 157-74.
3. Ishihara, M. Biosynthesis, structure and biological activity of Proteoglycans. Trends in Glycosci. Glycotech 1993; 5:343-5 .
4. Lindahl U. and Roden L. Glycoprotein 1972: 491-517.
5. Vongchan P, et al. Structural Characterization of Human Liver Heparan Sulfate. Biochim Biophys Acta 2005; (1721): 1-8.
6. สิริชัย พุกกะพันธ์. การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเฮพาแรน ซัลเฟต โปรติโอกลัยแคนที่แยกได้จากตับมนุษย์. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2546:1-4
7. พจมาลย์ คชินทร์ไพร. การกระจายตัวของเฮพาแรน ซัลเฟต โปรติโอกลัยแคน ที่แยกได้จากตับมนุษย์บนผิวเซลล์ฮีมาโตพอยเอติค. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2547:1-5
8. Vongchan P. and Linhardt R J. Expression of human liver HSPGs on Acute myeloid leukemia. Clinical Immunol 2007; 122: 194-206.
9. Harlow E., and Lane D. Labeling antibodies with enzymes. Antibodies A laboratory manual 1988: 342-51.
10. Roe S. Protein purification techniques 2001; 2.