

## นิพนธ์ฉบับ

# การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะ ต่อโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด

ยุภานันท์ วุฒิอิน\* จตุพร พรศิลป์\*\* และปริยานาถ วงศ์จันทร์\*

## บทคัดย่อ

เกล็ดเลือดเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์ในกระแสเลือดที่มีบทบาทสำคัญต่อการห้ามเลือดและการแข็งตัวของเลือด บนผิวเมมเบรนของเกล็ดเลือดประกอบด้วยโมเลกุลหลากหลายชนิด บางโมเลกุลพบเฉพาะบนผิวเกล็ดเลือดเท่านั้น และบางชนิดสามารถพบได้บนผิวเซลล์ชนิดอื่นเช่น HLA หรือแอนติเจนหมู่เลือด การศึกษาคุณลักษณะของโมเลกุลต่างๆ จำเป็นต้องใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่มีความจำเพาะ ผู้วิจัยได้ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด ได้แอนติบอดีจำนวนมาก เพื่อให้ได้ประโยชน์ต่อเนื่อง งานวิจัยนี้จึงนำโคลนที่ผลิตได้มาศึกษาคุณลักษณะในด้านต่างๆ ได้แก่การกระจายตัวของโมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดีดังกล่าว ความเกี่ยวข้องต่อหน้าที่และการทำงานของเกล็ดเลือด และการศึกษานาฬิกาของโมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดีโคลนที่นำมาศึกษา โดยเลือกโคลน PSS 4/2I ศึกษาความจำเพาะกับแอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี Immunofluorescent technique และ วิธี Flow cytometry พบว่ามีความจำเพาะกับโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวกลุ่ม granulocytes จากนั้นนำไปศึกษาหาหน้าหลักโมเลกุลของแอนติเจนที่อยู่บนผิวของเกล็ดเลือดด้วยวิธี SDS-PAGE, Western blotting, และ Immunoprecipitation พบแถบโปรตีน 2 แถบใน non-reducing condition ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 254 และ 183 kD ตามลำดับและพบแถบโปรตีน 3 แถบใน reducing condition โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 173,160 และ 86 kD ตามลำดับ การทดสอบ Platelet Aggregation พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน PSS4/2I สามารถรบกวนการเกิด platelet aggregation ที่ถูกกระตุ้นด้วย epinephrine ได้ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2550; 40: 214-221.

คำรหัส: โมโนโคลนอล แอนติบอดี, เกล็ดเลือด, HLA, SDS-PAGE, platelet aggregation

\* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\* บริษัทแปซิฟิกไบโอเทค เลขที่ 6 ซอยสนธิวัฒนา 3 ลาดพร้าว 110 บางกะปิ กรุงเทพฯ 10310

## Abstract: Production and characterization of monoclonal antibody specific to platelet membrane molecules

Yupanan Wutti-In Y\*, Jaturaporn Pornsinlapatip\*\* and Preeyanat Vongchan\*

A selected monoclonal antibody (mAb) raised against human platelets, PSS4/2I was characterized in 3 aspects. Firstly, the expression on leukocytes was investigated in order to prove whether the specific antigen was common by indirect following with direct immunofluorescent technique, respectively. The results showed that PSS4/2I could react with both molecules on platelets and granulocytes. Moreover, PSS4/2I was also found to be strongly reacted on epinephrine-activated platelet compared to the resting phase. The molecular weight of this certain antigen was performed by immunoprecipitation technique in platelet lysate. It was found that there were 2 bands in non-reducing gel at 254 and 183 kD, and 3 bands in reducing condition at 173, 160, and 86 kD respectively. The mAb was then tested for its involve in epinephrine-induced platelet activation by platelet aggregation assay. It was shown that PSS4/2I interfered with epinephrine-induced platelet aggregation in dose-dependent manner. All results suggested that PSS4/2I was specific to common antigens found on both platelets and granulocytes. This antigen was expressed stronger when platelet was activated with epinephrine. The result from immunoprecipitation suggested that the biochemical structure should be heterodimer. The certain antigen might involve in epinephrine-induced platelet aggregation since specific monoclonal antibody, PSS4/2I, could delay the aggregation of platelets in dose dependent manner. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2007; 40: 214-221.

**Keyword:** Monoclonal antibody, HLA, immunoprecipitation, immunofluorescent technique, platelet aggregation, SDS-PAGE

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

\*\* Pacific Biotech Co., Ltd. 6 Sonthiwattana 3, Ladprao 110, Bangkok, Bangkok 10310

### ที่มาและปัญหาวิจัย

โมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดมีหลายชนิด มีโครงสร้างแตกต่างกันได้แก่ โปรตีน ไกลโคโปรตีน ไกลโคลิปิด ฯลฯ หลายโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดและเซลล์ชนิดอื่น เช่น HLA บางชนิดพบเฉพาะบนเกล็ดเลือดเช่น Human platelet specific antigen หรือ HPA หลายโมเลกุลมีความ

สำคัญต่อการแสดงออกของแอนติเจนเกล็ดเลือด และหน้าที่ของเกล็ดเลือดทั้งด้านการเกาะติดและการเกาะกลุ่มเพื่อหยุดบาดแผลที่หลอดเลือด<sup>1-6</sup> การศึกษาคุณลักษณะของโมเลกุลต่างๆ เหล่านี้จึงมีประโยชน์ นอกจากได้ความรู้พื้นฐานแล้วยังสามารถประยุกต์ใช้งานด้านคลินิกต่อไป<sup>7-11</sup> การศึกษาโมเลกุลต่างๆ ได้อย่างดีนั้น จำเป็น

ต้องใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อโมเลกุลใดๆ เพียงชนิดเดียว จึงจะได้ผลที่ถูกต้องในการศึกษาคุณลักษณะด้านต่างๆ ของโมเลกุลใดๆ ผู้วิจัยเคยได้รับทุนสนับสนุนจาก สวทช. ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี จำเพาะต่อโมเลกุลชนิดต่างๆ บนผิวเกล็ดเลือด ผลจากการทำวิจัยได้โคลนที่จำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดจำนวนมาก หลายโคลนยังไม่ได้ได้รับการศึกษาต่อในรายละเอียดเกี่ยวกับคุณลักษณะและความจำเพาะ ดังนั้นด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความคิดที่จะนำโคลนต่างๆ มาศึกษาคุณลักษณะ โดยวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี จำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดจำหน่าย สำหรับนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MAIPA หรือเพื่อการวิจัยในลักษณะอื่นๆ ต่อไป นอกจากนี้ยังนำมาใช้เพื่อประโยชน์ในงานทั้งด้านการเรียนการสอน การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเกล็ดเลือด ตลอดจนคาดหวังว่าจะเป็นแหล่งผลิตเพื่อจำหน่ายให้แก่หน่วยงานที่ต้องการทั้งภาครัฐและเอกชน หากสามารถผลิตน้ำยาขึ้นใช้เองแทนการสั่งซื้อซึ่งสิ้นเปลืองงบประมาณและค่าใช้จ่าย จะทำให้สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้มาก และหากมีการพัฒนาคุณภาพผลผลิตอย่างเป็นระบบอุตสาหกรรมและได้รับการรับรองจากสถาบันภายนอกด้วยแล้ว จะสามารถผลิตจำหน่ายให้หน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชน ทำให้ไม่ต้องสั่งซื้อน้ำยาราคาแพง เป็นการลดการนำเข้า การวิจัยเพื่อการผลิตนี้สามารถทำได้เองในหน่วยงานเนื่องจากมีเทคโนโลยี ตลอดจนอุปกรณ์พร้อมและเพียงพอ ประโยชน์ที่ได้รับอีกประการหนึ่งคือการเรียนการสอน การฝึกนักศึกษาภาคินพนธ์ให้เรียนรู้การทำงานและการแก้ปัญหาในงานวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีและการทำวิจัยที่มีคุณภาพและมีผลผลิตอีกด้วย

### วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาคุณลักษณะของในด้านต่างๆ ได้แก่ การแสดงออกบนผิวเกล็ดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ น้ำหนักโมเลกุล และบทบาทต่อการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือด ของโมเลกุลที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี โคลน PSS4/2I ซึ่งผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ

### วิธีการศึกษา

การแสดงออกของโมเลกุลจำเพาะต่อ PSS4/2I บนผิวเซลล์เกล็ดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาว

เจาะเลือดคนปกติ ( $n=3$ ) โดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง บั่นเบาตามด้วยปั่นหนักเพื่อเก็บ platelet concentrate บั่นล้างเกล็ดเลือด 3 ครั้งด้วย EDTA-PBS pH 7.2 และปรับความเข้มข้นเป็น  $1 \times 10^8$  platelet/ml ด้วย 1% paraformaldehyde pH 7.2 เพื่อเตรียม PFA-fixed platelet จากนั้นทำปฏิกิริยากับ PSS4/2I (20  $\mu\text{g/ml}$ ) ด้วยเทคนิค indirect immunofluorescent โดยใช้ FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG เพื่อติดตามปฏิกิริยา จากนั้นย้อมด้วยเทคนิค direct PE-conjugated rabbit anti-human CD42b เพื่อกำหนดกลุ่มของเกล็ดเลือดสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer ในการศึกษานี้มีการทำ isotype control (MT14/2, IgG2b), conjugate control และ negative control (EDTA-PBS pH 7.2) ร่วมด้วย สำหรับการศึกษาการแสดงออกบนผิวเกล็ดเลือดในสภาวะที่ถูกกระตุ้น เตรียมเกล็ดเลือดด้วยเทคนิคเดียวกัน แต่มีการเติมสารกระตุ้นชนิดต่างๆ ได้แก่ Collagen, Thrombin, ADP และ Epinephrine ก่อนการตรึงเกล็ดเลือดด้วย PFA จากนั้นย้อมด้วยแอนติบอดีชนิดต่างๆ ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

สำหรับการแสดงออกบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำโดยการเจาะเก็บเลือดคนปกติ ( $n=3$ ) โดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งเช่นกัน บั่นแยกเก็บ buffy coat บั่นล้างและเตรียมความเข้มข้นเป็น  $1 \times 10^7$  cells/ml ด้วย 1% BSA-PBS azide ทำปฏิกิริยากับ PSS4/2I (20  $\mu\text{g/ml}$ ) ด้วยเทคนิค indirect immunofluorescent หลังการ block Fc receptor บนผิวเซลล์ด้วย 10% AB serum (final concentration) โดยใช้ FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG เพื่อติดตามปฏิกิริยา วิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer และมีการทำ isotype, conjugate และ negative control ด้วยทุกการทดสอบ

การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน PSS4/2I

เจาะเก็บเลือดและเตรียม platelet concentrate ด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น จากนั้นติดฉลากด้วย Biotin-NHS-

LC 10 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 1:100) ตามด้วยการสลายเกล็ดเลือดใน extraction buffer ที่มี protease inhibitor cocktail จากนั้นแยกแอนติเจนจำเพาะออกโดยให้ platelet lysate ทำปฏิกิริยากับ PSS4/2I immobilized Protein G beads ก่อนการแยกผ่านด้วยกระแสไฟฟ้า (200V 45 นาที) ผ่านโปรตีนลงบน PVDF membrane หลังจาก block non specific binding site บนเมมเบรนด้วย 5% skimmed milk TBS pH 6.5 แล้ว ทำปฏิกิริยากับ HRP-avidin (1:40,000) และประกบฟิล์มเพื่อสังเกตสัญญาณ วัดและคำนวณขนาดของน้ำหนักโมเลกุล เปรียบเทียบกับ biotinylated standard molecular weight

#### การศึกษาบทบาทของโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน PSS4/2I ต่อการเกาะกลุ่มของ เกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย epinephrine

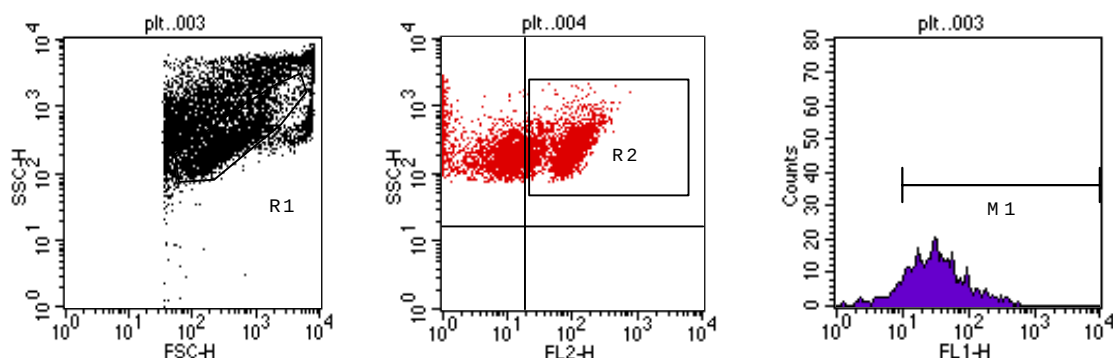
เตรียม platelet rich plasma ตามวิธีการข้างต้น จากนั้นเติม PSS4/2I ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10-200 g/ml โดยมีชุดควบคุมคือไม่มี (PBS) และ isotype control (MT14/2, IgG2b) ทั้งให้ทำปฏิกิริยานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม epinephrine (1 mg/ml, 25  $\mu$ L) และเริ่มจับเวลาเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งแปรผกผันกับการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด รายงานผลเป็นร้อยละของการเกาะกลุ่ม ด้วยเครื่อง aggregometer

#### ผลการทดลอง

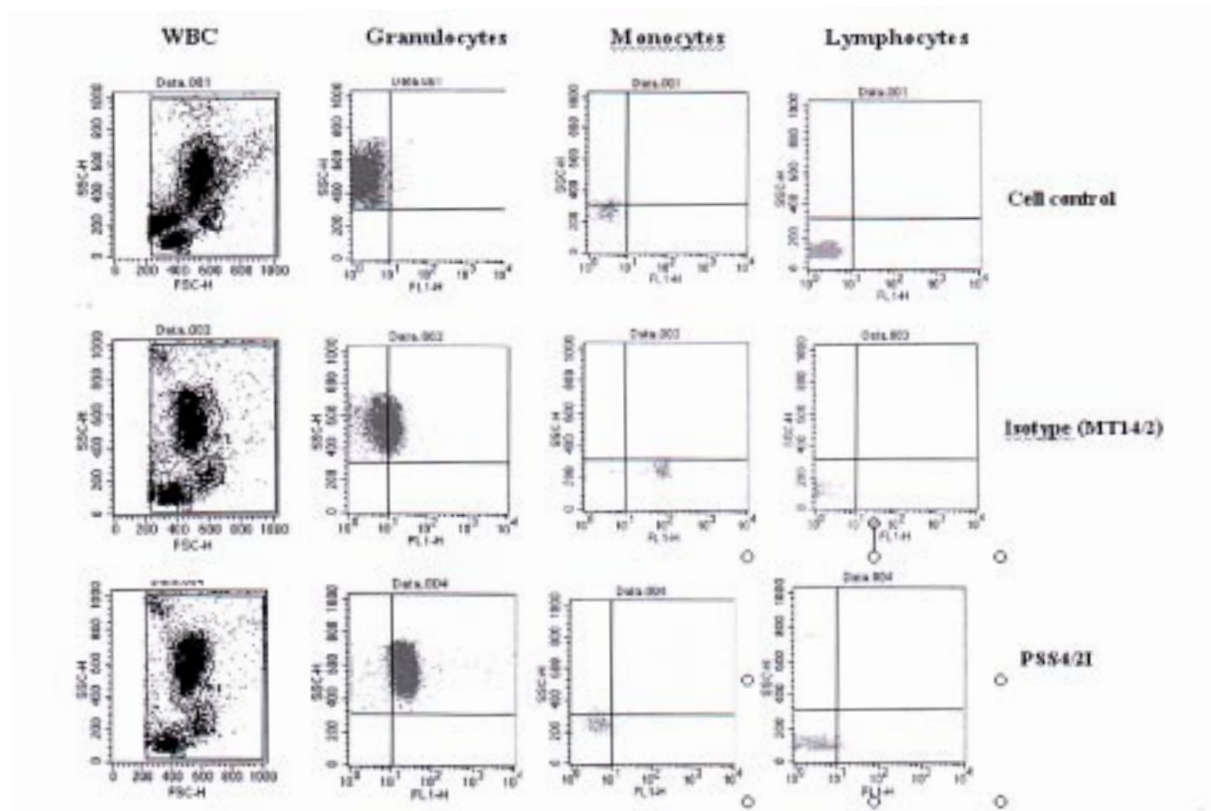
จากการศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะ

ต่อแอนติบอดีโคลน PSS4/2I ซึ่งเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี ผลิตภัณฑ์ในห่องปฏิบัติการ โดยใช้เกล็ดเลือดของมนุษย์ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง ด้วย Hybridoma technique และเป็นชนิด IgG2b พบว่าแอนติบอดีดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด และเม็ดเลือดขาวชนิดกรานูโลไซต์ ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกมากขึ้นบนผิวเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย epinephrine เท่านั้น โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของแอนติเจนดังกล่าวบนผิวเกล็ดเลือดเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย agonist ชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบ (collagen, ADP และ thrombin) ดังแสดงในรูปที่ 3

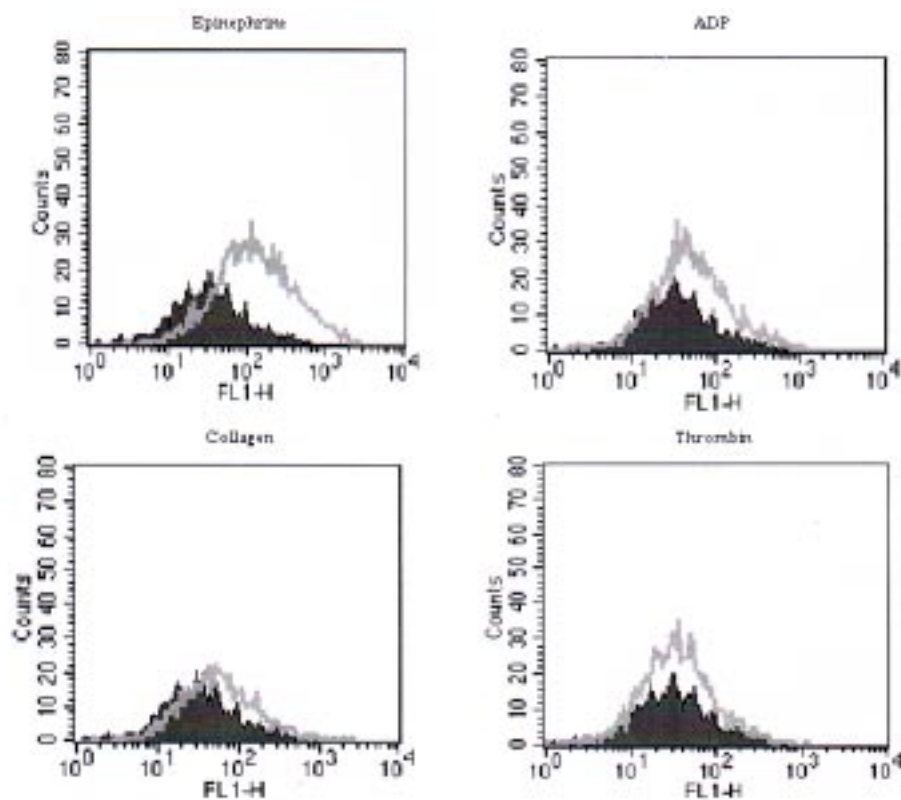
การเมื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนดังกล่าว โดยใช้เกล็ดเลือดเป็นแหล่งด้วยเทคนิค immunoprecipitation พบว่าได้แถบโปรตีนสองแถบใน non-reduced และสามแถบใน reduced gel มีขนาด 254, 183 kD, และ 173, 160, 86 kD ตามลำดับ (รูปที่ 4) การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของแอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย epinephrine (1 mg/ml, 25  $\mu$ L) โมเลกุลดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในสภาวะดังกล่าว จากการศึกษารายละเอียดของแอนติบอดีที่มีต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด พบว่าในสภาวะที่มีแอนติบอดี มีการชะลอการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มได้ช้าลงเมื่อมีปริมาณแอนติบอดีมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5



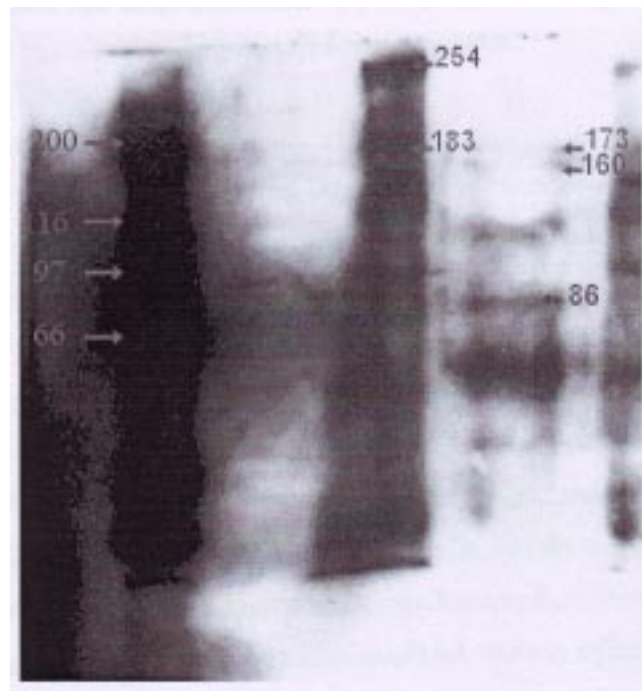
รูปที่ 1 การแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อ PSS4/2I บนผิวเกล็ดเลือดสภาวะปกติ



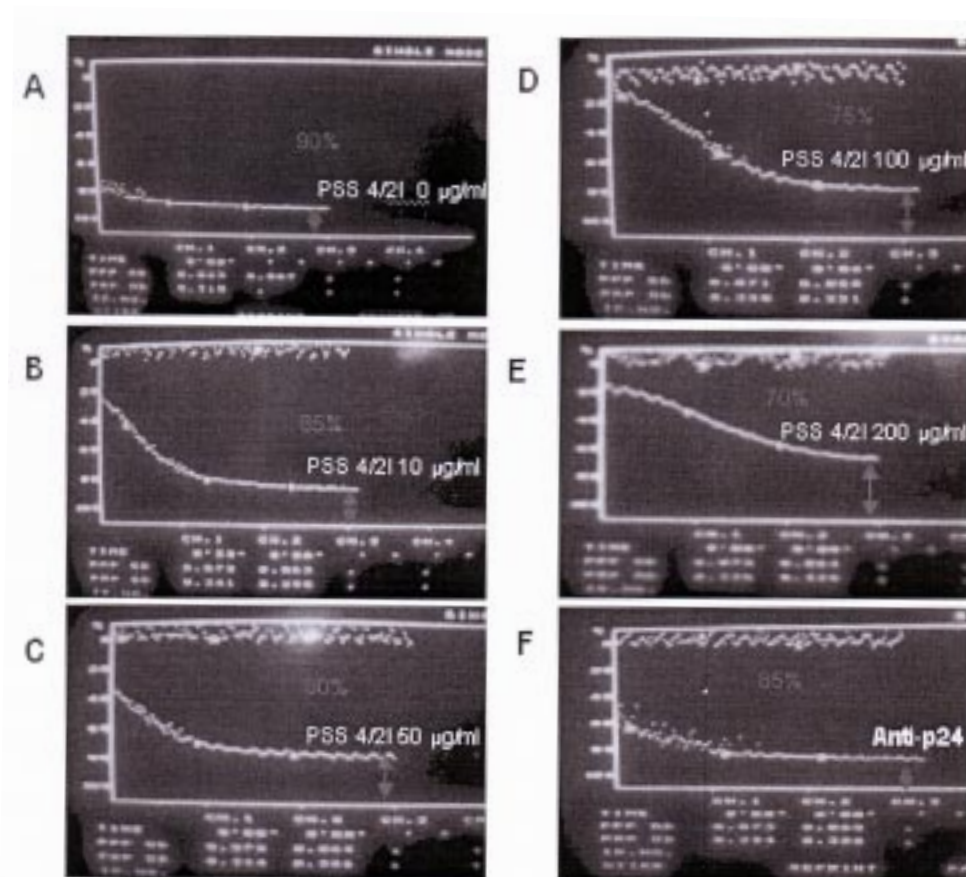
รูปที่ 2 การแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อ PSS4/2I บนผิวเซลล์ granulocyte



รูปที่ 3 การแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อ PSS4/2I มากขึ้นเมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นด้วย epinephrine



รูปที่ 4 การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนจำเพาะต่อโคลน PSS4/21



รูปที่ 5 โมโนโคลนอล แอนติบอดี โคลน PSS4/21 จะลดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด เมื่อถูกกระตุ้นด้วย epinephrine

## วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

โมโนโคลนอล แอนติบอดี จำเพาะต่อเกล็ดเลือดมนุษย์ ได้ถูกผลิตขึ้นด้วย Hybridoma technology ในห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลต่างๆ บนผิวเกล็ดเลือด และคัดสรรแอนติบอดีที่มีประโยชน์เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย ตลอดจนการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำ หรือมีปัญหาเลือดออกผิดปกติ แอนติบอดีหลายโคลนที่ได้ยังไม่มีการศึกษาคุณสมบัติจำเพาะ PSS4/2I เป็นหนึ่งในจำนวนหลายโคลนที่ถูกนำมาศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า PSS4/2I เป็นชนิด IgG2b, kappa สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติเจนที่พบร่วมกันบนผิวเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวชนิดกรานูโลไซต์ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าแอนติเจนดังกล่าวไม่ใช่ platelet specific antigen แอนติเจนนี้แสดงออกบนผิวเกล็ดเลือดมากขึ้น เมื่อเกล็ดเลือดได้รับการกระตุ้นด้วย agonist เฉพาะชนิด กล่าวคือ epinephrine เท่านั้น จะเห็นได้ว่าแอนติเจนดังกล่าวมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นเกล็ดเลือดผ่านเส้นทางของ epinephrine การกระตุ้นเกล็ดเลือดให้เกาะกลุ่มด้วย agonist ดังกล่าว ถูกชะลอลงเมื่อมีแอนติบอดี PSS4/2I อยู่ในระบบ และการชะลอการเกาะกลุ่มนี้แปรผันตามปริมาณของแอนติบอดีที่ใช้ จากการศึกษาหน้าหลักโมเลกุล พบว่าแอนติเจนจำเพาะต่อ PSS4/2I น่าจะมีโครงสร้างเป็น heterodimer ที่สายเปปไทด์ยึดเกาะกันด้วยพันธะ covalent และ non-covalent

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการ IRPUS (I24901003) ประจำปีการศึกษา 2549 ที่สนับสนุนการทำภาคินิพนธ์นี้

## เอกสารอ้างอิง

- Bernet, J.S., Shattil, S.J. (1990) Platelet function. in W.J. Williams, E. Beutler, A.J. Erslev and M.A. Lichman (Eds.). Hematology 4<sup>th</sup> Edition (pp. 1233-5), New York, McGraw-Hill Publishing Company.
- Ruggeri, Z.M., De Marco L., Gatti L., Bader, R., Montgomery, R.R. (1983) Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.*, 72, 1-12.
- Fitzgerald, L.A., Phillips, D.R. (1989) Biochemistry Structure and function of platelet membrane glycoprotein. in Kunicki, T.J., George, J.N. (Eds.) Platelet immunobiology: Molecular and clinical aspects (pp.9-30), Philadelphia, J.B. Lippincott.
- Shulman, N.R., Jordan, J.V. (1987) Platelet immunology. in R.W. Colman, J. Hirsh, V.J. Marder, E.W. Salzman (Eds.). Hemostasis and Thrombosis (pp 274), Philadelphia, JB Lippincott.
- Dunstan, R.A., Simpson, M.B. Rosse, W.F. (1985) Le<sup>a</sup> blood group antigen on human platelets. *Am. J. Clin. Pathol.*, 82, 90-4.
- Muller-Eckhardt, C., Keifel, V., Santoso, S. (1990) Review and update of platelet alloantigen systems. *Trans. Med. Rev.*, 4, 98-109.
- Kunicki, T.J. (1989) Biochemistry of platelet-associated isoantigens and alloantigens. in T.J. Kunicki, J.N. George (Eds.). Platelet Immunology (pp. 99-120), Philadelphia, J.B. Lippincott.
- Kunicki, T.J., Nurden, A.T., Pidard Russel, N.R., Canen, J.P. (1981) Characterization of human platelet glycoprotein antigens giving rise to individual immunoprecipitation in crossed immunoelectrophoresis. *Blood*, 58, 1190-7.
- Kunicki, T.J., George, J.N. (Eds.) Platelet immunobiology: Molecular and clinical aspects (pp.132-147), Philadelphia, J.B. Lippincott.
- Keifel, V., santoso, S., Weisheit, M., Mueller-Eckhardt, C. (1987) Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*, 70, 1722-6.
- Mueller-Eckhardt, C., Kiefel, V. Laboratory methods for the detection of platelet antibodies

and identification of antigens. in Kunicki, T.J.,  
George, J.N. (Eds.) Platelet immunobiology:

Molecular and clinical aspects (pp.436-53),  
Philadelphia, J.B. Lippincott.