

การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีน CD2 และศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CD2 บนเซลล์ชนิดต่างๆ

อำภา ยาสุมาร*, สุพรรณ ปาตะ*, สาวิตรี เจียมพานิชกุล**, วัชร กสิณฤกษ์*

บทคัดย่อ

CD2 เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน CD58 การจับกันระหว่าง CD2 และ CD58 ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ T cells และ NK cells และพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 สามารถยับยั้งปฏิกิริยาระหว่าง CD2 และ CD58 และนำไปสู่การกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ แอนติบอดีต่อ CD2 จึงจะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันต้านตนเองและการปลูกถ่ายอวัยวะได้ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาถึงการควบคุมการทำงานของ เซลล์ลิมโฟไซต์ ผู้วิจัยได้ฉีด peripheral blood mononuclear cells เข้าไปในหนู Balb/c แล้วนำเซลล์ม้ามของหนูมาเชื่อมกับ myeloma cells ตามวิธีมาตรฐานไฮบริโดมา และทำการตรวจหาเซลล์ลูกผสมที่สร้างโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 โดยวิธี lysed whole blood-indirect immunofluorescence และ ELISA โดยใช้ recombinant CD2 protein เป็นแอนติเจน จากการศึกษาดังกล่าว ผู้วิจัยสามารถผลิตเซลล์ลูกผสมที่สร้างโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 ได้จำนวน 1 โคลน เมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CD2 ในเซลล์ชนิดต่างๆ พบว่า โมเลกุล CD2 แสดงออกบน Jurkat และ Duadi cell lines แต่ในปริมาณต่ำ และพบบน T cells และ NK cells แต่ไม่พบบนโมโนไซต์ แกรนูโลไซต์ และเม็ดเลือดแดง วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 25-37.

คำสำคัญ: โปรตีน CD2 โมโนโคลนอล แอนติบอดี โปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว โพลีไซโตรเมตรี

* แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

** แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

Abstract : Production of monoclonal antibody against CD2 protein and cellular expression of CD2 on various cell types

Umpa Yasamut*, Supansa Pata*, Sawitree Chiampanichayakul, Watchara Kasinrerker***

CD2 is a leukocyte surface molecule which specific interact with CD58 molecule. The interaction between CD2 and CD58 induces T cell and NK cell activation. Monoclonal antibody against CD2 could inhibit CD2-CD58 interaction and therefore suppress immune responses. Monoclonal antibody to CD2 was proposed to be an immunotherapeutic agent for autoimmune diseases and transplantation. The aim of this study is to produce monoclonal antibody to CD2 protein for use as a tool for studying lymphocyte regulation. In this study, Balb/c mouse was immunized with peripheral blood mononuclear cells. Spleen cells of the immunized mouse were fused with myeloma cells using standard hybridoma technique. The hybrids were screen for secreting of CD2 monoclonal antibody by lysed whole blood-indirect immunofluorescent assay and ELISA using recombinant CD2 protein as antigen. One hybridoma clone producing CD2 monoclonal antibody was obtained. CD2 expression on various cell types was studied using the generated monoclonal antibody. Jurkat and Daudi cell lines were demonstrated to weakly expressed CD2. In peripheral blood, CD2 was expressed on T cells and NK cells, but not on monocytes, granulocytes and red blood cells. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 25-37.*

Key words: CD2, monoclonal antibody, leukocyte surface molecule, flow cytometry

* Division of Clinical Immunology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

** Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

บทนำ

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบหนึ่งที่มีความสำคัญมากของร่างกาย มีหน้าที่ในการทำลายเชื้อโรคต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย และยังมีบทบาทในการทำลายเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นในร่างกายอีกด้วย ระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วย เซลล์และอวัยวะหลายชนิดทำงานร่วมกัน โดยพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญมากในการทำงาน

ของระบบภูมิคุ้มกัน ในการทำงานร่วมกันของเซลล์ชนิดต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันนั้น เซลล์ต่างๆ จะต้องมีการติดต่อสื่อสารและทำงานประสานกัน นักวิทยาศาสตร์พบว่า การติดต่อสื่อสารกันของเซลล์เหล่านี้อาศัยกลไกใหญ่ๆ 2 กลไก คือ 1) กลไก cell-cell interaction เป็นกลไกที่เซลล์สองเซลล์มาเกาะติดกัน ซึ่งจะนำไปสู่กระบวนการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (signal transduction) และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในที่สุด 2) กลไก ligand-

receptor interaction เป็นกลไกที่เซลล์หนึ่งปล่อยสาร (cytokine หรือ ligand) ออกไปกระตุ้นให้เซลล์อื่นที่มีที่รับจำเพาะ (receptor) ให้ทำงานโดยพบว่ากลไกทั้งสองนี้จะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยโปรตีนหรือโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เรียกว่า leukocyte surface molecules⁽¹⁻³⁾

เซลล์ทุกชนิดในระบบภูมิคุ้มกันจะมีโปรตีนมากมายหลายชนิดอยู่บนผิวเซลล์ เนื่องจากโปรตีนบนผิวเซลล์เหล่านี้มีหน้าที่ในการทำให้เกิดการติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์ จึงมีนักวิจัยจำนวนมากสนใจที่จะศึกษาถึงหน้าที่และโครงสร้างของโมเลกุลบนผิวเซลล์เหล่านี้ ซึ่งในการศึกษาดังกล่าวนี้จำเป็นต้องอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะมาใช้ในการศึกษา นักวิจัยส่วนใหญ่เอาวิธีไฮบริโดมา มาผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนบนผิวเซลล์ แล้วนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ศึกษาถึงโครงสร้างและหน้าที่ของ leukocyte surface molecules เนื่องจากมีห้องปฏิบัติการมากมายทั่วโลกสามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ ขึ้นมา แล้วนำแอนติบอดีเหล่านั้นไปศึกษาโมเลกุลจำเพาะ โดยนักวิจัยในแต่ละห้องปฏิบัติการจะตั้งชื่อ leukocyte surface molecules ที่จำเพาะกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ตัวเองผลิตได้ขึ้นมาตามใจชอบ จึงทำให้เกิดความสับสนเกี่ยวกับชื่อของ leukocyte surface molecules และเกิดความซ้ำซ้อนถ้าหากหลายๆ ห้องปฏิบัติการศึกษาแอนติเจนตัวเดียวกันแต่เรียกชื่อแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวนักวิทยาศาสตร์ทางภูมิคุ้มกันวิทยาทั่วโลกจึงได้จัดให้มีการประชุมเชิงปฏิบัติการขึ้นทุกๆ 2-3 ปี เพื่อกำหนดชื่อ leukocyte surface molecules ที่ค้นพบให้เป็นระบบเดียวกัน และเรียกชื่อการประชุมเชิงปฏิบัติการนี้ว่า “International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA workshop)”⁽¹⁻⁵⁾ โดยให้แต่ละห้องปฏิบัติการทั่วโลกส่งโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ leukocyte surface molecules มายังคณะกรรมการจัดการประชุม จากนั้นคณะกรรมการจะส่งแอนติบอดีที่ได้ไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆ ทั่วโลกเพื่อศึกษาและวิเคราะห์โมโนโคลนอล แอนติบอดีเหล่านั้น โดย HLDA workshop จะทำการศึกษาโมโนโคลนอล แอนติบอดีใน 4

คุณสมบัติคือ 1) ศึกษา cellular distribution คือ ศึกษาว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีเหล่านั้นทำปฏิกิริยากับโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิดใดบ้าง ส่วนใหญ่มักใช้โฟลไซโทเมทรีในการศึกษา 2) ศึกษาทาง immunohistochemistry โดยศึกษาปฏิกิริยาของโมโนโคลนอล แอนติบอดีกับ tissue section ชนิดต่างๆ 3) ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแอนติเจนจำเพาะ โดยวิธี immunoprecipitation และ western blotting 4) ศึกษาหน้าที่ของ leukocyte surface molecules ที่จำเพาะกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีนั้นๆ นอกจากนี้ยังมีการนำข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนมาร่วมในการวิเคราะห์ข้อมูล โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเหมือนกันจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันและตั้งชื่อใหม่ในระบบ cluster of differentiation (CD) คือ เรียกชื่อนี้ว่า CD แล้วตามด้วยตัวเลข เช่น CD1, CD2 หรือ CD3 เป็นต้น จนถึงปัจจุบันได้มีการประชุม HLDA Workshop มาแล้ว 8 ครั้ง โดยครั้งล่าสุดจัดขึ้นในเดือนธันวาคม 2004 ที่เมือง Adelaide ประเทศ Australia จากการประชุมครั้งที่ 1 จนถึงครั้งที่ 8 ได้มีการกำหนดชื่อ leukocyte surface antigens มาแล้วตั้งแต่ คือ CD1 – CD339⁽⁴⁻⁵⁾

โปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD2 เป็นกลัยโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 50 kDa พบได้บนเซลล์ thymocytes, T lymphocytes และ NK cells โมเลกุล CD2 นี้จัดเป็นสมาชิกหนึ่งของ immunoglobulin superfamily ที่ประกอบด้วย 351 กรดอะมิโน โดยจะฝังตัวบนผิวเซลล์แบบ single chain type I integral membrane protein ส่วนของโมเลกุลที่ยื่นออกนอกเซลล์ประกอบด้วย 2 immunoglobulin-like domains โดย domain ทางปลาย N-terminal เป็น V domain และ domain ด้านติดผนังเซลล์เป็นชนิด C2 domain และมีบริเวณที่เป็นที่เกิด N-linked glycosylation อยู่ 3 บริเวณ โดยมีส่วนที่ยื่นเข้าไปในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic region) มีความยาว 116 กรดอะมิโน⁽⁶⁻⁹⁾ จากการศึกษาหน้าที่ของ CD2 พบว่าโปรตีน CD2 จัดเป็น intercellular adhesion molecule ชนิดหนึ่งที่สามารถจับแบบจำเพาะได้กับโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD58 (หรือ leukocyte function-associated antigen-3; LFA-3) CD58 เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มีขนาด 55-70 kDa ที่พบได้บน

antigen presenting cells การจับกันระหว่าง CD2 บน T cells และ CD58 บน antigen presenting cells จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่ T cells และเกิดการกระตุ้นการทำงานของ T cells ในที่สุด⁽⁶⁻⁹⁾ พบว่าการกระตุ้นโมเลกุล CD2 ของ T cells นี้ทำให้เกิดกระบวนการ tyrosine phosphorylation ของ PLC-g, p56-lck, p59-fyn, CD3ζ และ CD3ε ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CD2 เป็นโมเลกุลที่สำคัญในการกระตุ้น T cells นอกจากนี้ ยังมีรายงานเกี่ยวกับหน้าที่อื่นๆ ของโปรตีน CD2 ได้แก่ กระตุ้น T cells ให้สร้าง cytokines, การกระตุ้นการทำงานของ NK cells, กระตุ้นการเกิด apoptosis ของ activated T cells และควบคุม T cell anergy⁽⁶⁻⁹⁾ เนื่องจาก CD2 เกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นการทำงานของ T cells จึงมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 ไปควบคุม T cell activation ในร่างกาย และพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 สามารถกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งนำไปสู่แนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันต้านตนเอง (autoimmune disease) และการปลูกถ่ายอวัยวะได้

ในรายงานนี้ ผู้วิจัยนำเสนอวิธีการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีน CD2 และศึกษาการแสดงออกของ CD2 บน hemopoietic cell lines และ peripheral blood cells ชนิดต่างๆ ซึ่งแอนติบอดีต่อ CD2 นี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาวิจัยในอนาคต

วัสดุและวิธีการทดลอง

เซลล์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

Hemopoietic cell lines ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ Jurkat, Molt4, U937 และ Daudi ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ใน 5%CO₂ incubator ที่ 37°C อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) ที่มี fetal calf serum (FCS, Gibco) อยู่ 10% และมี gentamicin 40 μg/ml และ amphotericin B 2.5 μg/ml เป็นสารป้องกันจุลชีพ สำหรับ myeloma cells (P3-X63-Ag8) และ COS cells เพาะเลี้ยงใน 5%CO₂ incubator ที่ 37°C ในอาหารเลี้ยงเซลล์ IMDM (Gibco) หรือ MEM (Gibco) ที่มี 10% FCS อยู่ตามลำดับ

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ที่ใช้ในการศึกษานี้เตรียมโดยวิธี Ficoll Hypaque gradient centrifugation (Sigma, St. Louis, MO, USA).

เทคนิคไฮบริโดมาเพื่อผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี

ทำการฉีดหนู Balb/C ด้วย PBMCs ทางช่องท้อง ทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง และทางเส้นเลือดดำจำนวน 1 ครั้ง จากนั้น 5 วันนำ spleen cells ของหนูมาเชื่อมกับ myeloma cells โดยใช้ spleen cells ต่อ myeloma cells โดยใช้ 50% PEG (Sigma) ในอัตราส่วน 2:1 นำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงใน HAT selective medium (Gibco) ใน 96 well-plate ตรวจดูเซลล์ลูกประสม (hybridoma) ด้วยกล้อง inverted microscope เก็บ culture supernatant จากหลุมที่มี hybrid cells แล้วนำมาตรวจกรองการสร้างแอนติบอดีต่อ leukocyte surface molecule โดยวิธี indirect immunofluorescent และตรวจวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตรมิเตอร์ จากหลุมที่ให้ผลบวกจากตรวจกรอง นำ hybrid cells มาทำ single cell cloning โดยวิธี Limiting dilution จากนั้นเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหาร IMDM ที่มี 10% FCS อยู่และเก็บ culture supernatant เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

การตรวจกรอง hybrid cells โดยวิธี indirect immunofluorescent staining

เจาะเลือดจากคนปกติจำนวน 20 ml โดยใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง จากนั้นเตรียม PBMCs โดยวิธี Ficoll Hypaque gradient centrifugation แล้วปรับความเข้มข้นเซลล์เป็น 1x 10⁷ cells/ml ใน 1% BSA PBS Azide และเติมซีรัมคนหมู่มาก AB ลงไปให้ถึงความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที การตรวจกรองแอนติบอดีทำได้โดยการเติม PBMCs ลงใน microtube 50 μl/tube แล้วเติม culture supernatant ที่ต้องการทดสอบลงไป 50 μl /tube ผสมให้ดี แล้ว incubate ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นล้างด้วย 1% BSA- PBS azide 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายใช้ autopipette ดูด supernatant ออกจนหมด แล้ว resuspend pellet ด้วย 1% BSA PBS azide 20 μl /tube เติม anti- mouse Immunoglobulin

antibody-FITC ลงไป 25 μ l /tube ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ครบเวลาย่นล้าง 3 ครั้งด้วย 1% BSA PBS azide เติม 1% paraformaldehyde 350 μ l/tube ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (FACSCalibur, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA).

การย้อมพิสูจน์แอนติบอดีโดยวิธี lysed whole blood-indirect immunofluorescent staining

เก็บเลือดครบส่วน (whole blood) โดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง เติมเลือด 50 μ l ลงใน microtube แล้วเติมแอนติบอดีที่ผลิตได้ลงไป 50 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate on-ice เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาย่นล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) ที่มี 1% bovine serum albumin และ 0.02% sodium azide (1% BSA- PBS azide) 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายใช้ autopipette ดูด supernatant ออกจนหมด แล้ว resuspend pellet ด้วย 1% BSA PBS azide 40 μ l จากนั้นเติม anti- mouse Immunoglobulin antibody-FITC (Chemicon International, Melbourne, Australia) ลงไป 50 μ l/tube ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate on-ice เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม FACS lysing buffer (Becton Dickinson) 1 ml แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 1% BSA PBS azide เติม 1% paraformaldehyde 350 μ l/tube ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (FACSCalibur, Becton Dickinson).

การย้อมพิสูจน์แอนติบอดีโดยวิธี lysed whole blood-two colors indirect immunofluorescent staining

เก็บเลือดครบส่วน (whole blood) โดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง เติมเลือด 50 μ l ลงใน microtube แล้วเติม anti-CD4 monoclonal antibody (MT4; isotype IgM), anti-CD8 monoclonal antibody (MT8; isotype IgM), anti-CD22 monoclonal antibody (WK9; isotype IgM) และ anti-CD57 monoclonal antibody (HNK; isotype IgM) ลงไปหลอดละ 25 μ l แล้วเติมแอนติบอดี

ที่ผลิตได้ลงไป 25 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate on-ice เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาย่นล้างด้วย 1% BSA- PBS azide 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายใช้ autopipette ดูด supernatant ออกจนหมด แล้ว resuspend pellet ด้วย 1% BSA PBS azide 40 μ l จากนั้นเติม anti- mouse IgG-FITC และ anti-mouse IgM-PE ลงไป 50 μ l/tube ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate on-ice เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม FACS lysing buffer (Becton Dickinson) 1 ml แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 1% BSA PBS azide เติม 1% paraformaldehyde 350 μ l/tube ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

การเตรียม recombinant CD2 protein โดย COS cell expression system

นำ culture flask ที่เลี้ยง COS cells ดูด mediaทิ้งไป แล้วเติม PBS ที่มี 0.5 mM EDTA ลงไป 3 ml ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที ใช้ sterile pasture pipette ดูด cell suspension ใส่ใน 15 ml centrifuge tube ที่มี MEM 7 ml นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,700 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างเซลล์ ทำการปั่นล้างอีก 2 ครั้งด้วย MEM ดูด media ทิ้ง แล้วเติม 10% FSC-MEM ลงไป 3 ml ผสมให้เข้ากันโดยใช้ pasture pipette นำไปนับหาจำนวนเซลล์ด้วยน้ำยา Turk's solution โดยใช้ counting chamber ปรับเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^6 cells/4 ml ใน 10% FSC-MEM เติม COS cells suspension 4 ml ที่เตรียมได้ลงใน culture dish ขนาด 60 mm แล้วนำไป incubate ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator ข้ามคืน

ครบเวลาทำการเตรียม transfection solution (ที่ประกอบด้วย MEM 2 ml, DEAE dextran (stock solution 10 mg/ml) 50 μ l, Chloroquine solution (stock solution 10 mM) 80 μ l และ CD2-cDNA หรือ CD147-cDNA ใน eukaryotic expression vector (stock 2 μ g/ μ l) 10 μ l) จากนั้นนำ COS cells ที่เตรียมไว้มาดูด media ทิ้งแล้วเติม transfection solution ลงไป นำเซลล์ไป incubate ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูด transfection solution ออก

ให้หมด หลังจากนั้นทำการ shock cells ด้วย PBS ที่มี 10% DMSO นำเซลล์ไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาทีพอดี เมื่อครบเวลาดูด solution ที่แล้วเติม MEM ลงไป 3 ml แล้วดูด media ที่ จากนั้นเติม 10% FSC-MEM ลงไป 4 ml/dish และ incubate ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเก็บ culture supernatant ซึ่งจะได้ recombinant CD2 หรือ recombinant CD147 protein เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

Indirect ELISA เพื่อพิสูจน์โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD2

นำ recombinant CD2 protein หรือ recombinant CD147 protein มาเจือจาง 1: 4 ด้วย coating buffer แล้วเติมลงใน ELISA plate (NUNC, Roskilde, Denmark) หลุมละ 50 µl ในหลุม เก็บเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืนในกล่องชื้น ทำการล้างเพลท 4 ครั้งด้วย PBS ที่มี 0.05 % Tween (0.05 % Tween-PBS) แล้วบล็อกเพลทด้วย 2% BSA-PBS 70 µl ต่อหลุม incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในกล่องชื้น ครบเวลาล้างเพลท 1 ครั้งด้วย 0.05 % Tween-PBS แล้วเติมแอนติบอดี หลุมละ 50 µl นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในกล่องชื้น ครบเวลาล้างเพลท 4 ครั้งด้วย 0.05 % Tween-PBS แล้วเติม HRP-rabbit anti-mouse immunoglobulin antibody (DAKO, Hamburg, Germany) ลงในทุกหลุมหลุมละ 50 µl นำเพลทไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในกล่องชื้น ครบเวลาล้างเพลท 4 ครั้ง แล้วเติม OPD-H₂O₂ substrate 50 µl เก็บเพลทไว้ในที่มืด ประมาณ 15 นาที เติม 4N H₂SO₄ 50 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำเพลทไปอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 490 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader

การย้อม hematopoietic cell lines ด้วยวิธี indirect immunofluorescent

นำ hemopoietic cell lines มาปั่นล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) 3 ครั้ง จากนั้น resuspend ด้วย 1% BSA PBS azide โดยปรับเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 x 10⁷ cells/ml และเติมซีรัมคณหนู AB ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% แล้วนำไปแช่ใน

น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการย้อมเซลล์โดยเติมเซลล์ที่ได้จำนวน 50µl ลงใน microcentrifuge tube แล้วเติมโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ต้องการทดสอบลงไป 50µl ผสมให้ดี แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นล้างด้วย 1% BSA- PBS azide 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายใช้ autopipette ดูด supernatant ออกจนหมด แล้ว resuspend pellet ด้วย 1% BSA PBS azide 20 µl/tube เติม sheep anti- mouse Immunoglobulins FITC conjugated ลงไป 25 µl/tube ผสมให้เข้ากัน แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ครบเวลานำมาปั่นล้างด้วย 1% BSA- PBS azide 3 ครั้ง เติม 1% paraformaldehyde 350 µl/tube ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตรมิเตอร์

การย้อมเม็ดเลือดแดงของคนปกติด้วยวิธี indirect immunofluorescent

เก็บเลือดคนปกติโดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงมาเตรียมเป็น 0.3 % ใน PBS ในการย้อมเซลล์ เติมแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบใน microtube 50 µl แล้วเติม 0.3 % เม็ดเลือดแดงลงไป 50 µl ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นล้างด้วย 1% BSA- PBS azide 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายใช้ autopipette ดูด supernatant ออกจนหมด แล้ว resuspend pellet ด้วย 1% BSA PBS azide 20 µl เติม sheep antimouse Immunoglobulins-FITC 25 µl ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 1% BSA PBS azide เติม 1% paraformaldehyde 350 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตรมิเตอร์

ผลการศึกษา

การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีน CD2

เพื่อผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD2 ผู้วิจัยได้นำวิธีไฮบริโดมามาใช้ โดยทำการฉีดหนู Balb/c ด้วย PBMCs จำนวน 3 ครั้งทางช่องท้องทุก 2 สัปดาห์และทางเส้นเลือดดำจำนวน 1 ครั้ง แล้วนำเซลล์ม้ามของหนูดังกล่าวมาเชื่อมกับ

myeloma cells จากนั้นทำการตรวจหาเซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีต่อ leukocyte surface molecules โดยวิธี indirect immunofluorescence และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตรมิเตอร์โดยใช้ PBMCs เป็นแอนติเจน ผลการศึกษา ผู้วิจัยสามารถตรวจพบ hybridomas จำนวนมากที่ให้ผลบวกกับ PBMCs จึงได้คัดเลือกเซลล์ลูกผสมจำนวน 13 โคลนมาทำ single cell cloning โดยวิธี limiting dilution และทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ลูกผสมที่ได้พร้อมกับเก็บ culture supernatant เพื่อนำไปศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไป

เพื่อศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ได้ ผู้วิจัยได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้ง 13 โคลนมาຍံกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ โดยวิธี lysed whole blood staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตรมิเตอร์โดยทำการศึกษาในเลือดคนปกติจำนวน 3 ราย พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีแต่ละตัวให้ผลการຍံกับเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ในรูปแบบแตกต่างกัน และมีแอนติบอดี 2 โคลนคือ PB5S และ PB6S ให้ผลการຍံที่แยกлимโฟไซต์ออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับทั้งโมโนไซต์และแกรนูโลไซต์ (รูปที่ 1) เนื่องจาก CD2 เป็นโปรตีนที่พบได้บนบางกลุ่มของลิมโฟไซต์ คือ T cells และ NK cells ดังนั้นโมโนโคลนอล แอนติบอดี ทั้งสองโคลนจึงถูกนำมาศึกษาต่อว่าเป็นแอนติบอดีต่อ CD2 หรือไม่

เพื่อพิสูจน์ว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี PB 5S และ PB6S ทำปฏิกิริยากับ lymphocyte sub-population ไດ จึงนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้ง 2 โคลนมาຍံกับเซลล์แบบ lysed whole blood staining ด้วยวิธี two colors indirect immunofluorescent และ วิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตรมิเตอร์โดยศึกษาในเลือดคนปกติจำนวน 2 คน ผลการศึกษาพบว่า PB 5S ให้ผลบวกกับ CD8

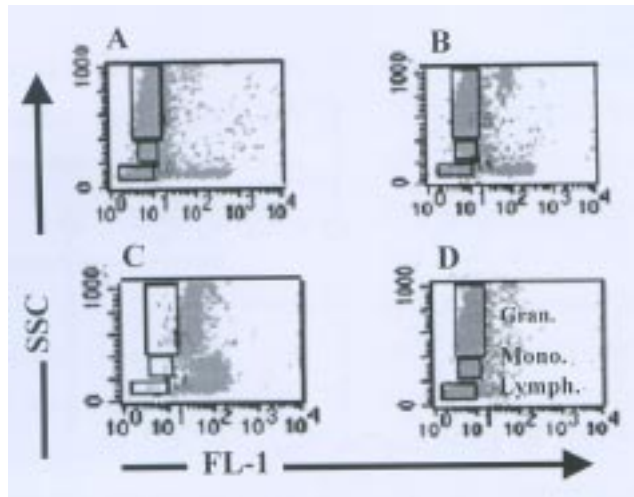
positive lymphocytes ดังแสดงในรูปที่ 2 ในขณะที่โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน PB 6S ให้ผลบวกกับทั้ง CD4 และ CD8 positive lymphocytes และ NK cells ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยโคลน PB6S ให้รูปแบบการຍံที่คล้ายกับการຍံเซลล์ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2

ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาต่อโดยทำการสังเคราะห์ recombinant CD2 fusion protein (rCD2) และ recombinant CD147 fusion protein (rCD147) ในระบบ COS cell expression system จากนั้นนำ rCD2 และ rCD147 protein ไปเคลือบเพลท และทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอล แอนติบอดี PB5S และ PB6S โดยวิธี indirect ELISA ผลการทดลองพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี PB6S ให้ผลบวกกับ rCD2 protein แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ rCD147 protein ขณะที่ PB5S ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนแอนติเจนใดๆ เลย (ตารางที่ 1)

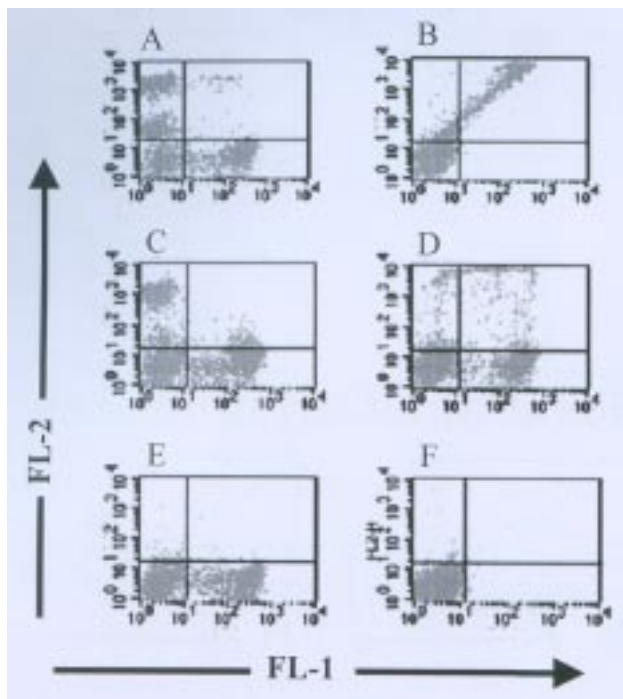
ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน PB 6S เป็น โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีน CD2

ปฏิกิริยาระหว่างโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน PB 6S กับ hemopoietic cell lines และ peripheral blood cells ชนิดต่างๆ

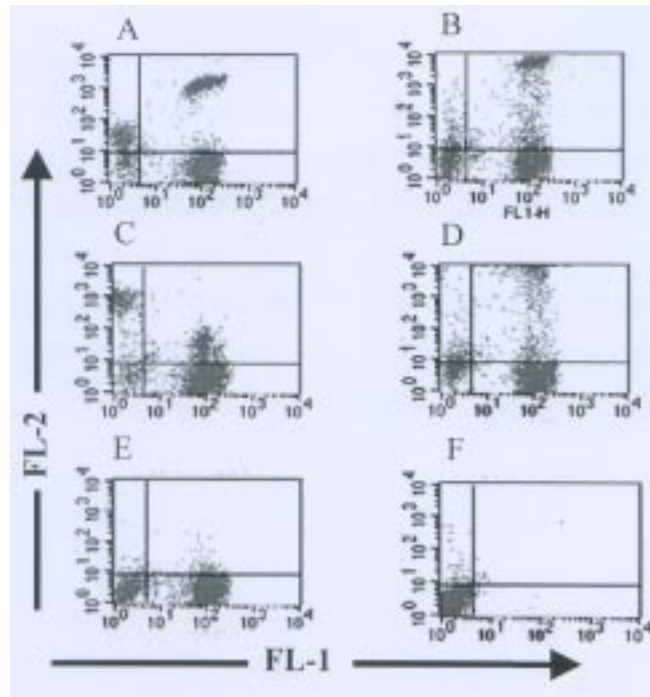
จากการนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน PB6S ไปຍံกับ hemopoietic cell lines ชนิดต่างๆ ได้แก่ Jurkat, Molt4, U937, และ Daudi cells พบว่า PB6S ให้ผลบวกกับ Jurkat และผลบวกอ่อน (weakly positive) กับ Daudi และให้ผลลบ กับ Molt4 และ U937 (รูปที่ 4) และเมื่อนำ แอนติบอดี PB6S ไปຍံกับเซลล์เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง พบว่า ให้ผลบวกกับบางกลุ่มของลิมโฟไซต์ แต่ให้ผลลบกับเม็ดเลือดแดง (รูปที่ 5)



รูปที่ 1 แสดงปฏิกิริยาระหว่างโมโนโคลนอล แอนติบอดี PB5S และ PB6S กับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ โดยการย้อมแบบ lysed whole blood-indirect immunofluorescence. นำเลือดของคนปกติมาย้อมด้วย PB5S (A), PB6S (B), positive control monoclonal antibody (C) และ negative control monoclonal antibody (D) แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งการเรืองแสงของ conjugate control เซลล์ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และแกรนูโลไซต์ที่แยก granularity ดังแสดงไว้ในรูป D ผลการทดลองนี้แสดงผลของตัวอย่างเลือดจำนวน 1 รายจากทั้งหมด 3 ราย



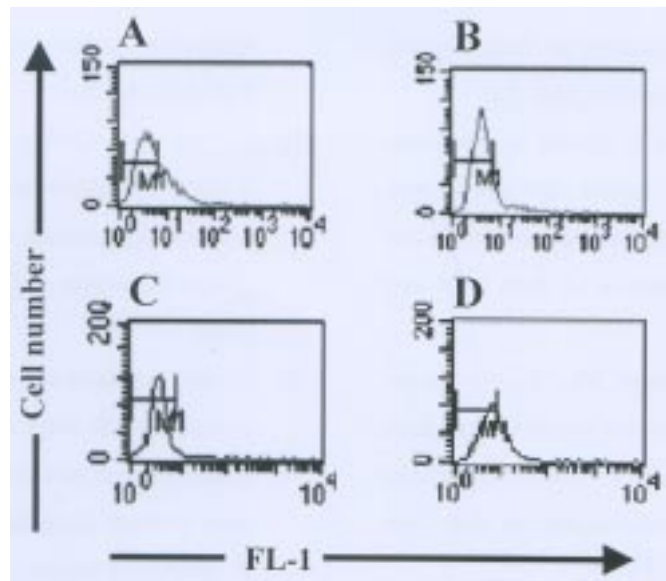
รูปที่ 2 แสดงปฏิกิริยาของโมโนโคลนอล แอนติบอดี PB5S กับเซลล์ลิมโฟไซต์ โดยการย้อมแบบ lysed whole blood-two color indirect immunofluorescence. นำเลือดของคนปกติมาย้อมด้วย PB5S (FITC)+CD4 MT4 (PE) (A), PB5S (FITC)+CD8 MT8 (PE) (B), PB5S (FITC)+CD22 WK9 (PE) (C), PB5S (FITC)+CD57 HNK (PE) (D), PB5S (FITC) อย่างเดียว (E) และ negative control (F) แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลการทดลองนี้แสดงผลของตัวอย่างเลือดจำนวน 1 รายจากทั้งหมด 2 ราย



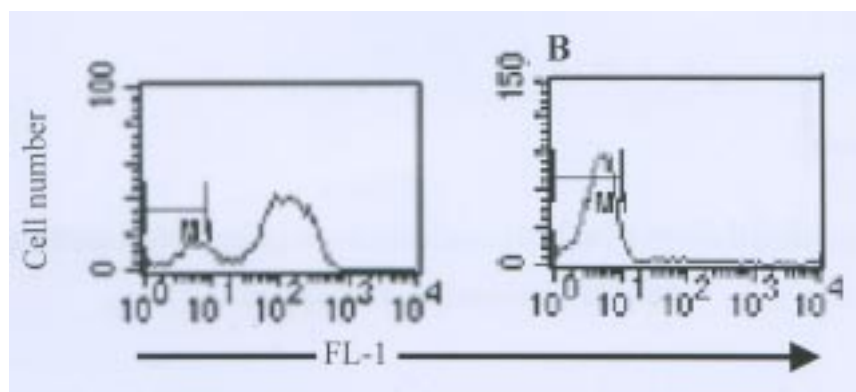
รูปที่ 3 แสดงปฏิกิริยาของโมโนโคลนอล แอนติบอดี PB6S กับเซลล์ลิมโฟไซต์ โดยการย้อมแบบ lysed whole blood-two color indirect immunofluorescence. นำเลือดของคนปกติมาย้อมด้วย PB6S (FITC)+CD4 MT4 (PE) (A), PB6S (FITC)+CD8 MT8 (PE) (B), PB6S (FITC)+CD22 WK9 (PE) (C), PB6S (FITC)+CD57 HNK (PE) (D), PB6S (FITC) อย่างเดียว (E) และ negative control (F) แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลการทดลองนี้แสดงผลของตัวอย่างเลือดจำนวน 1 รายจากทั้งหมด 2 ราย

ตารางที่ 1 แสดงค่า absorbent ที่ได้จากการทำ indirect ELISA ระหว่างปฏิกิริยาระหว่างโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน PB5S และ PB6S กับ recombinant CD2 protein และ recombinant CD147 protein

Conditions	OD at 490
Recombinant CD2 + PB5S	0.038
Recombinant CD147 + PB5S	0.016
Recombinant CD2 + PB6S	1.807
Recombinant CD147 + PB6S	0.019
Recombinant CD2 + CD147 mAb M6-1D4	0.000
Recombinant CD147 + CD147 mAb M6-1D4	1.571



รูปที่ 4 แสดงปฏิกิริยาของโมโนโคลนอล แอนติบอดี PB6S กับ hemopoietic cell lines ชนิดต่างๆ. นำ hemopoietic cell lines ได้แก่ Jurkat (A), Molt4 (B), U937 (C) และ Daudi (D) มาย้อมด้วย PB6S แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์ เส้นขวาง M1 แสดงขอบเขตการเรืองแสงของ conjugate control ผลการทดลองนี้แสดงผลการย้อม 1 ครั้งจากการย้อมทั้งหมด 3 ครั้ง



รูปที่ 5 แสดงปฏิกิริยาของโมโนโคลนอล แอนติบอดี PB6S กับเซลล์ลิมโฟไซต์และเม็ดเลือดแดง. นำ PBMCs และเม็ดเลือดแดง มาย้อมด้วย PB6S แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์ ทำการ gate เซลล์ลิมโฟไซต์ (A) และเม็ดเลือดแดง (B) ตามขนาดและ granularity เส้นขวาง M1 แสดงขอบเขตการเรืองแสงของ conjugate control ผลการทดลองนี้แสดงผลการย้อม 1 ครั้งจากการย้อมทั้งหมด 3 ครั้ง

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

หลังจากที่ Kohler และ Milstein ได้พัฒนาเทคนิค hybridoma ขึ้นมาในปี 1975 ⁽¹⁰⁾ นักวิทยาศาสตร์ในสาขาต่างๆ ได้นำเทคนิคนี้ไปผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนแอนติเจนชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในงานต่างๆ ทั้งเพื่อใช้แอนติบอดีในการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีนจำเพาะ ใช้แอนติบอดีเพื่อการเตรียมโปรตีนบริสุทธิ์ ตลอดจนการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคต่างๆ เช่นเดียวกัน นักวิทยาศาสตร์ในสาขาภูมิคุ้มกันวิทยาได้นำเทคนิค hybridoma มาผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนบนผิวเม็ดเลือด และนำแอนติบอดีที่ผลิตมาใช้ในการค้นหาโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิดใหม่ ใช้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโปรตีนจำเพาะ ตลอดจนใช้แอนติบอดีในโคลนนิ่งที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจ จากการศึกษาดังกล่าว ทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบ leukocyte surface molecules จำนวนมากมาย ทราบถึงหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ องค์ความรู้เหล่านี้สุดท้ายนำไปสู่การเข้าใจถึงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น และนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อการป้องกันและรักษาโรคในที่สุด

CD2 เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิดอื่นที่มีชื่อเรียกอื่นๆ ได้แก่ Leukocyte Function-associated-Antigen-2 (LFA-2) หรือ sheep red blood cell (SRBC) receptor ⁽⁷⁾ โปรตีน CD2 เป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 kDa ที่พบได้บน T cells และ NK cells ⁽⁶⁻⁹⁾ โดย CD2 จัดเป็น intercellular adhesion molecule ชนิดหนึ่งที่จับได้กับ CD58 (หรือ LFA-3) การจับกันระหว่าง CD2 และ CD58 ทำให้เกิดกระบวนการ cell-cell interaction ระหว่าง T cells และ antigen presenting cells ซึ่งการจับกันระหว่างทั้งสองโมเลกุลนี้ทำให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ และมีความสำคัญมากในการกระตุ้นการทำงานของ helper T cells (CD4+ T cells) และ cytotoxic T cells (CD8+ T cells) นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสำคัญต่อพัฒนาการของ thymocyte ในต่อม thymus พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 สามารถยับยั้งกระบวนการ cell-cell adhesion ได้ ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ antigen-stimulated helper T cells และ cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity ได้

นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี อาจสามารถนำมาใช้ควบคุมการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่มากเกินไปในร่างกายได้ ⁽⁶⁻⁹⁾

ในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย มีความสนใจที่จะศึกษาถึงการทำงานของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ T cells เพื่อนำไปสู่การเข้าใจการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น และจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อการป้องกันและรักษาโรค โปรตีน CD2 เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิดหนึ่งที่อยู่ในความสนใจของผู้วิจัย เพื่อศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของ CD2 ผู้วิจัยจำเป็นต้องมีโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD2 ในการศึกษา ผู้วิจัยได้นำเอาวิธีมาตรฐานไฮบริโดมามาใช้ โดยใช้ PBMCs เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นหนู และเนื่องจากใน PBMCs ประกอบด้วยทั้งเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์หลากหลายชนิด ดังนั้นในขั้นตอนการตรวจกรองเซลล์ลูกผสมที่ได้ จะต้องมีการคัดเซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีที่ไม่ต้องการออก และจะต้องมีระบบการพิสูจน์โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สนใจว่าเป็นแอนติบอดีต่อ CD2 จริง

ในการศึกษาครั้งนี้ จากการศึกษาเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูและ myeloma cells ผู้วิจัยได้เซลล์ลูกผสมจำนวนมาก และได้คัดเลือกเซลล์ลูกผสมจำนวน 13 โคลนที่ทำปฏิกิริยากับ PBMCs มาทำ limiting dilution แล้วเก็บ culture supernatant มาตรวจกรองหาโคลนที่สร้างแอนติบอดีต่อ CD2 โดยในการศึกษานี้ได้นำวิธี lysed whole blood staining และโฟลไซโตรเมตรีมาประยุกต์ใช้ โดยทำการย้อมเลือดครบส่วน (whole blood) ด้วยแอนติบอดีทั้ง 13 โคลน จากนั้นเติม anti-mouse immunoglobulins-FITC conjugate แล้วแตกเม็ดเลือดแดงทิ้ง นำเม็ดเลือดขาวที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตมิเตอร์ ในการตรวจวิเคราะห์ในลักษณะนี้โดยอาศัยคุณลักษณะของ granularity และการเรืองแสงของ FITC จะทำให้สามารถวิเคราะห์การเรืองแสงของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และแกรนูโลไซต์ไปพร้อมๆ กันได้ ในการศึกษาพบว่าแอนติบอดีทั้ง 13 โคลนที่นำมาศึกษามี 2 โคลนที่ให้ผลบวกกับบางกลุ่มของลิมโฟไซต์ และให้ผลลบกับโมโนไซต์และแกรนูโลไซต์ ซึ่งรูปแบบ

ของปฏิกิริยานี้เป็นรูปแบบของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 ทั้งนี้เพราะโปรตีน CD2 พบได้เฉพาะบน T cells และ NK cells เท่านั้น ไม่พบบน B cells หรือ phagocytes อื่นๆ⁽⁶⁻⁹⁾ ดังนั้นแอนติบอดีทั้ง 2 โคลนจึงถูกนำมาศึกษาต่อเพื่อยืนยันว่าเป็นแอนติบอดีต่อโปรตีน CD2

ในการพิสูจน์ยืนยันแอนติบอดีทั้ง 2 โคลน ผู้วิจัยได้นำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD2 โปรตีนซึ่งเชื่อมอยู่ใน eukaryotic expression vector มาสร้าง recombinant CD2 protein ในระบบ COS cell expression ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้เลือกใช้ระบบ COS cell expression ซึ่งเป็น mammalian expression system แทนการสร้าง recombinant protein ใน *E. coli* (prokaryotic expression system) ทั้งนี้เพราะ recombinant protein ที่สร้างโดยระบบ mammalian expression system จะให้โปรตีนที่มีรูปทรงและโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากกว่าการสร้างโดย *E. coli* ดังนั้น recombinant protein ที่ได้จะนำมาใช้ตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะได้ดีกว่า ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้เหนี่ยวนำ CD2-cDNA เข้าไปใน COS cells โดย DEAE-Dextran transfection⁽¹¹⁾ ซึ่งวิธีนี้ COS cells จะรับ CD2-cDNA เข้าไปในเซลล์ และสร้างโปรตีน CD2 และหลั่งออกนอกเซลล์ในปริมาณมาก น้ำเลี้ยง COS cells สามารถเก็บมาเพื่อใช้เป็น CD2 antigen เพื่อตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะโดยวิธี ELISA โดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์หรือทำให้เข้มข้นขึ้น จากการศึกษา ผู้วิจัยพบว่า 1 ใน 2 โคลนที่นำมาศึกษาให้ผลบวกกับ recombinant CD2 แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ recombinant CD147 ที่ใช้เป็นตัวควบคุม ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโคลนดังกล่าวนี้เป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีน CD2

โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 ที่ผลิตได้ได้นำมาใช้ตรวจหาการแสดงออกของโมเลกุล CD2 ที่สร้างบนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ ทั้ง hemopoietic cell lines และ peripheral blood cells ผลการศึกษาพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD2 ที่ผลิตได้ให้ผลบวกกับ hemopoietic cell lines ชนิด Jurkat และ Duadi แต่การแสดงออกของ CD2 มีไม่มากนัก สำหรับ peripheral blood cells พบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีนี้ให้ผลบวกกับกลุ่มหนึ่งของลิมโฟไซต์ ซึ่งเป็น T cells และ NK cells ในขณะที่ให้ผลลบกับโมโนไซต์ แกรนูโลไซต์ และ

เม็ดเลือดแดง ซึ่งเหมือนกับที่มีรายงานมาก่อน⁽⁶⁻⁹⁾

ในรายงานนี้เป็นการนำเสนอการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD2 และรายงานการแสดงออกของ CD2 บน hemopoietic cell lines และ peripheral blood cells ซึ่งแอนติบอดีนี้จะได้นำไปศึกษากลไกการควบคุมการกระตุ้นการทำงานของ T cells ในลำดับต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Horejsi V. Surface antigen of human leukocytes. Adv Immunol 1991; 49: 75-82.
2. Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA. The Leukocyte Antigen: Facts Book. London: Academic Press, 1997.
3. Mason D, Andre P, Bensussan A, Buckley C, et. al. Leukocyte Typing VII: White Cell Differentiation Antigens. New York: Oxford University Press, 2002.
4. Zola H, Swart B. The human leucocyte differentiation antigens (HLDA) workshops: the evolving role of antibodies in research, diagnosis and therapy. Cell Res 2005; 15: 691-4.
5. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. Blood 2005; 106: 3123-6.
6. Davis SJ, Ikemizu S, Wild MK, van der Merwe PA. CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition. Immunol Rev. 1998; 163: 217-36.
7. Schraven B. CD2. J Biol Regul Homeost Agents. 2000; 14(3): 223-5.
8. Yang JJ, Ye Y, Carroll A, Yang W, Lee HW. Structural basis of cell-cell interactions in the immune system. Curr Opin Struct Biol. 2000; 10(6): 656-61.
9. McNerney ME, Kumar V. The CD2 family of natural killer cell receptors. Curr Top Microbiol

Immunol. 2006; 298: 91-120.

10. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 495: 256-62.
11. Kasinrerk W, Fiebing E, Stefanova I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H. Human

leukocyte activation antigen M6, a member of the immunoglobulin superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin and chicken HT7 molecule. *J Immunol.* 1992; 149: 847-854.