

นิพนธ์ต้นฉบับ

การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนสองชนิดในเวลาเดียวกันโดยวิธี DNA immunization

กรุง ผิวนพรรณ*, สุพรรณ ปาณะ*, ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา*, วัชร กสิณฤกษ์*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ DNA immunization เป็นเทคนิคใหม่ที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงการนำเอาวิธี DNA immunization มากระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนสองชนิดในเวลาเดียวกัน

วัสดุและวิธีการ นำ plasmid CD147-Rg ที่กำหนดการสร้าง CD147-human IgG fusion protein มาเหนี่ยวนำเข้าสู่ *E.coli* และทำการเตรียม plasmid CD147-Rg ให้ได้ปริมาณมากโดย QIAGEN chromatographic column เพื่อศึกษาการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี นำ plasmid CD147-Rg ไปฉีดหนู Balb/c จำนวน 2 ตัว ทางกล้ามเนื้อขาทั้งสองข้าง ทำการเจาะเก็บเลือดหนูก่อนและหลังการฉีด plasmid DNA เป็นเวลา 6 เดือน แล้วตรวจหาแอนติบอดีต่อ CD147 และ human IgG โปรตีน โดยวิธี ELISA

ผลการศึกษา หนูทั้งสองตัวสร้าง anti-human IgG และ anti-CD147 antibodies หลังจากการฉีด plasmid DNA เพียง 1 ครั้ง และยังสามารถตรวจพบแอนติบอดีทั้งสองได้นานถึง 4 เดือน โดย anti-CD147 antibody ที่สร้างขึ้นสามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับ recombinant CD147 โปรตีนที่แสดงออกบน CD147 phage และ transfected BW cells และ native CD147 protein ที่แสดงออกบน U937 cells และ peripheral blood mononuclear cells

สรุป การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าวิธี DNA immunization สามารถนำมาสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนสองชนิดในเวลาเดียวกันได้ โดยระดับแอนติบอดียังคงอยู่ได้เป็นเวลานาน วิธี DNA immunization นี้อาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีการให้วัคซีนแบบใหม่ได้ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2546; 36: 2-12.

คำรหัส: วัคซีนดีเอ็นเอ อีไลซ่า การฉีดหนู

*ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract: Induction of Antibodies to Two Different Proteins Simultaneously by DNA Immunization

Phiwpan K*, Pata S*, Tayapiwatana C*, Kasinrerker W*.

Objective : DNA immunization is a new technique for induction of immune responses. The aim of this study is to study the possibility of using DNA immunization to simultaneously produce antibodies specific for two different antigens.

Materials and Methods : Plasmid CD147-Rg was transformed into *E.coli*. Then, the large-scale of plasmid CD147-Rg was prepared by QIAGEN chromatographic column. To study the induction of antibody response, the isolated plasmid DNA was intramuscularly immunized into 2 Balb/c mice. Blood samples were collected before and after each injection up to 6 months. The antibodies in the collected sera were determined by ELISA.

Results : The anti-human IgG and anti-CD147 antibodies were detected in both immunized mice after the first DNA inoculation. The induced antibodies could be detected in mice up to 4 months. The generated anti CD147 antibodies reacted to either recombinant CD147 expressed on CD147 phage and CD147 expressing BW cells, and native CD147 protein expressed on U937 cells and peripheral blood mononuclear cells.

Conclusions : This study demonstrated the possibility of utilizing DNA immunization to produce antibodies specific for two different proteins at the same time. The produced antibodies were existed for a long times. DNA immunization might be applied as an alternative vaccination method.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2003; 36: 2-12.

Key word : DNA immunization, ELISA, mouse immunization

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

บทนำ

DNA immunization หรือ DNA vaccine หรือ วัคซีนดีเอ็นเอ เป็นวิธีการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบใหม่ ที่อาศัยหลักการคือ เมื่อนำยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนใดๆ ที่สนใจ ไปเชื่อมต่อใน eukaryotic expression vector

และเมื่อฉีด plasmid vector นี้เข้าไปในร่างกาย ยีน ที่เชื่อมต่อไปใน plasmid vector นี้จะสร้างเป็น โปรตีนออกมาในร่างกาย โปรตีนที่สร้างออกมานี้ จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และทำให้ ร่างกายเกิดภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อโปรตีนนั้นๆ ขึ้น โดยพบว่าระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นโดย

วิธีนี้มีทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral mediated immunity) และแบบเซลล์ (Cell-mediated immunity)¹⁻³ โดยหลักการดังกล่าว นักวิจัยหลายกลุ่มได้นำเอาวิธีวัคซีนดีเอ็นเอไปศึกษา การกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อการป้องกันโรคและพบว่า วิธีนี้สามารถใช้ได้ผลดีกับเชื้อโรคหลากหลาย ชนิด^{2,3} นอกจากการป้องกันโรค วัคซีนดีเอ็นเอ ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อผลิตแอนติบอดีทั้งชนิด โพลีโคลนอล และโมโนโคลนอล แอนติบอดี⁴⁻¹⁴

ในการเตรียม plasmid DNA เพื่อใช้ในงาน วัคซีนดีเอ็นเอนั้นทำได้โดยการนำ cDNA ที่กำหนด การสร้างโปรตีนที่สนใจสอดใส่เข้าไปใน eukaryotic expression vector วิธีดังกล่าวนี้ ปัจจุบันสามารถ ทำได้ง่าย Plasmid DNA ที่เตรียมได้สามารถนำ มาเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย และสามารถนำ แบคทีเรียดังกล่าวมาเตรียม plasmid DNA เพื่อ ใช้งานในปริมาณมากภายในเวลาอันสั้น ในปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์สามารถนำ cDNA ที่กำหนดการ สร้างโปรตีนต่างชนิดกันมาเชื่อมต่อใน plasmid vector อันเดียวกัน ทำให้ได้ plasmid DNA ที่สามารถสร้างโปรตีน 2 ชนิดได้¹⁵⁻¹⁶ เมื่อเร็วนี้ คณะผู้วิจัยด้วยความช่วยเหลือของ Prof. Dr. Hannes Stockinger จากมหาวิทยาลัยเวียนนา ประเทศออสเตรีย ได้สร้าง plasmid DNA ขึ้นมา ชนิดหนึ่ง เรียกชื่อว่า plasmid CD147-Rg ซึ่ง plasmid นี้ประกอบด้วยยีน 2 ชนิดคือ ยีนที่กำหนด การสร้างส่วน extracellular domain ของ CD147 โปรตีน และ ยีนที่กำหนดการสร้างส่วน Fc ของ IgG ของคน เชื่อมต่ออยู่ใน eukaryotic expression vector pCDM8 ดังนั้นเมื่อนำ plasmid CD147-Rg เหนียวนำเข้าไปใน eukaryotic cells จะทำให้เกิดการแสดงออกของยีน ได้เป็น CD147 โปรตีนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน IgG ที่เรียกว่า CD147-

IgG fusion protein

จากการที่ผู้วิจัยมี plasmid DNA ที่สามารถ กำหนดการสร้างโปรตีน 2 ชนิด จึงเกิดความสนใจ ที่จะศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการกระตุ้นการสร้าง แอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน 2 ชนิดในเวลา เดียวกัน โดยการฉีด plasmid DNA ดังกล่าว ผลการศึกษานี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการพัฒนา วัคซีนดีเอ็นเอ ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคหลายชนิด ในเวลาเดียว

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียม plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147-IgG fusion protein

ในการศึกษานี้ได้รับ plasmid CD147-Rg ซึ่งกำหนดการสร้าง CD147-IgG fusion protein จาก Prof. Hannes Stockinger, Institute of Immunology, มหาวิทยาลัยเวียนนา, ประเทศ- ออสเตรีย นำ plasmid CD147-Rg เหนียวนำ เข้าไป competent *E.coli* strain MC1061/P3 นำ transformed bacteria ไปเลี้ยงใน LB broth ที่มี tetracyclin 10 µg/ml และ Ampicillin 15 µg/ml ทำการแยก plasmid DNA ให้ได้ปริมาณมากโดย QIAGEN chromatographic column (QIAGEN mega kit; Qiagen, Hilden, Germany) ละลาย plasmid DNA ที่ได้ใน phosphate buffered saline (PBS) ตรวจวัดความเข้มข้นและความ บริสุทธิ์ของ plasmid DNA ที่ได้โดยการวัดค่า ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm เก็บ plasmid DNA ที่ได้ ที่ -20°C Plasmid DNA ส่วนหนึ่งนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำ electrophoresis ใน 1% agarose และตรวจสอบชิ้น DNA ด้วย UV transilluminator

การพิสูจน์ความสามารถของ plasmid CD147-Rg ในการสร้าง CD147-IgG fusion protein โดยวิธี COS cells expression system

ทำการเหนี่ยวนำ plasmid CD147-Rg เข้าสู่ COS cells โดยวิธี DEAE-dextran transfection จากนั้น 72 ชั่วโมง เก็บ culture supernatant มาตรวจหา CD147-IgG fusion protein โดยวิธี ELISA ซึ่งทำการทดลองโดยเคลือบเพลทด้วย rabbit anti-human IgG ที่ 4°C ข้ามคืน จากนั้นทำการ block plate ด้วย 2% bovine serum albumin ใน PBS (2% BSA-PBS) ล้างเพลทด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 (0.05% Tween-PBS) เติมน้ำ culture supernatant แล้ว incubate ที่ 37°C 1 ชั่วโมง ล้างเพลท จากนั้นเติม anti-CD147 monoclonal antibody และ incubate ที่ 37°C อีก 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างเพลท แล้วเติม peroxidase labeled rabbit anti-mouse immunoglobulins นำไป incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างเพลท แล้วเติม OPD substrate แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 4N H₂SO₄ นำเพลทไปอ่านค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 490 nm

การฉีดกระตุ้นหนู Balb/c ด้วย plasmid DNA

ทำการฉีด plasmid CD147-Rg เข้าหนู Balb/c อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว โดยฉีด plasmid DNA เข้าไปทางกล้ามเนื้อขาหลังทั้งสองข้าง ซ้าย ขว้างละ 50 µg ในปริมาตร 50 µl ทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 5 ครั้ง ทำการเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณหางหนูทุก 2 สัปดาห์ต่อเนื่องเป็นเวลา 4 เดือน นำเลือดมาปั่นแยกซีรัม แล้วเก็บซีรัมไว้ที่ -20°C

การตรวจหา anti-human IgG antibody ในซีรัมหนูที่ได้รับ plasmid CD147-Rg โดยวิธี

ELISA

ทำการเคลือบเพลทด้วย human IgG ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml หลุมละ 50 µl จากนั้น incubate ที่ 4°C ข้ามคืน ครบเวลาล้างเพลท 4 ครั้ง ด้วย 0.05% Tween-PBS ทำการ block เพลทด้วย 2% BSA-PBS แล้วเติมซีรัมหนูที่ dilution ต่างๆ นำเพลทไป incubate ไว้ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างเพลท แล้วเติม peroxidase labeled rabbit anti-mouse immunoglobulins นำไป incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลท แล้วเติม OPD substrate แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 4N H₂SO₄ นำเพลทไปอ่านค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 490 nm

การตรวจหา anti-CD147 antibody ในซีรัมหนูที่ได้รับ plasmid CD147-Rg โดยวิธี ELISA

ทำการเคลือบเพลทด้วย phage ที่ express CD147 molecule (CD147 phage)¹⁷ ความเข้มข้น 10 x 10¹⁰ PFU/ml หลุมละ 50 µl จากนั้น incubate ไว้ที่ 4°C ข้ามคืน ครบเวลาล้างเพลทด้วย 0.05% Tween-PBS ทำการ block เพลทด้วย 2% BSA-PBS เติมน้ำซีรัมหนู แล้ว incubate ไว้ที่ 37°C 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้าง แล้วเติม peroxidase labeled rabbit anti-mouse immunoglobulins และ incubate ที่ 37°C 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างเพลท แล้วเติม OPD substrate แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 4N H₂SO₄ นำเพลทไปอ่านค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 490 nm

การทดสอบปฏิกิริยาระหว่าง anti-CD147 antibody กับ recombinant และ native CD147 โปรตีนโดยวิธี indirect immunofluorescence และวิเคราะห์ด้วย Flow cytometer

นำ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) และ cell lines ที่ express CD147 molecule มาปั่นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ปรับ cells เป็น

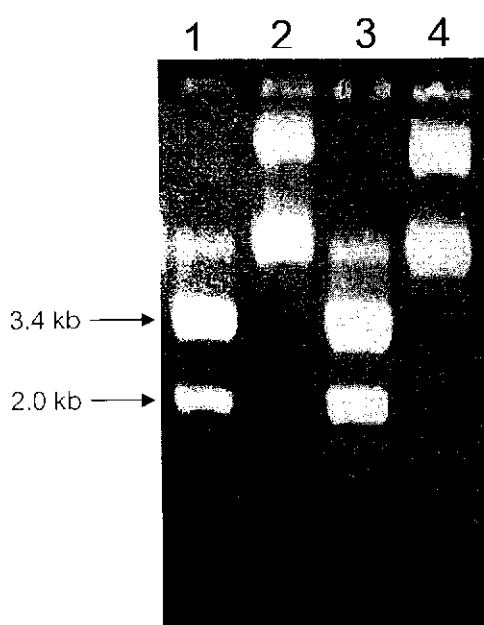
1×10^7 cells/ml ใน 1% BSA-PBS NaN_3 แล้วทำการ block Fc receptor ด้วยการเติม 10% AB serum ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นเติม 50 μl ของซีรัมที่เจือจาง 1:50 ลงใน 50 μl ของ cells suspension แล้ว incubate ในน้ำแข็งนาน 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย 1% BSA-PBS NaN_3 แล้วเติม FITC conjugated anti-mouse immunoglobulins ผสมให้เข้ากัน incubate ในน้ำแข็งนาน 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 1% BSA-PBS NaN_3 แล้วเติม 1% paraformaldehyde solution 350 μl ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์โดยวัดเครื่อง Flow cytometer

ผลการทดลอง

1. การเตรียม plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147-IgG fusion protein

เพื่อศึกษาการนำเอาวิธี DNA immunization มากระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน 2

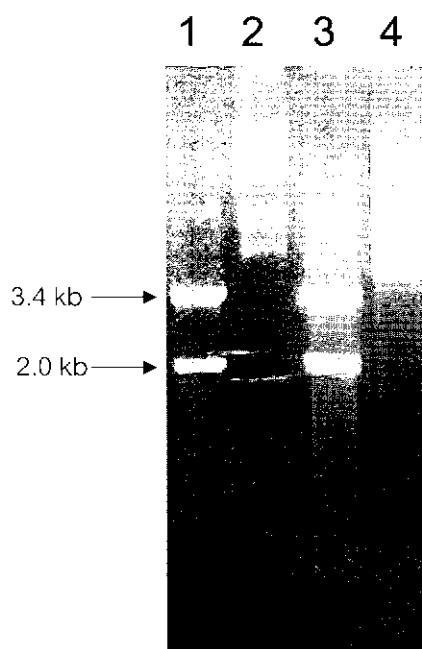
ชนิดในเวลาเดียวกัน ผู้วิจัยได้นำ plasmid CD147-Rg ซึ่งกำหนดการสร้างโปรตีน CD147 ที่เชื่อมต่อกับ human IgG (CD147-IgG fusion protein) มาใช้ศึกษา โดยการศึกษาครั้งนี้เริ่มต้นด้วยการนำ plasmid CD147-Rg มาเหนี่ยวนำเข้าไปใน competent *E.coli* แล้วนำไป spread ลงบน LB agar plate ที่มี antibiotic อยู่ด้วย จากนั้นเลือกเอาแบคทีเรีย 2 โคโลนี มาแยก plasmid DNA แบบ plasmid miniprep นำ plasmid DNA ที่แยกได้มาตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I แล้วทำการวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ผลการทดลองดังแสดงรูปที่ 1 โดยพบว่า plasmid DNA ที่แยกได้จากแบคทีเรียทั้งสองโคโลนี เมื่อตัดด้วย เอนไซม์ *Xba*I แล้วได้เป็น 2 bands คือ ส่วนของ plasmid vector ขนาด 3.5 kb และส่วนของ insert CD147-Rg DNA ขนาด 2.0 kb ซึ่งมีรูปแบบตามที่มีรายงานมาก่อน (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์ Stockinger H, University of Vienna, Austria)



รูปที่ แสดง restriction fragment analysis ของ plasmid CD147-Rg ที่เตรียมได้โดยวิธี plasmid miniprep เลนที่ 1 และ 2 เป็น plasmid DNA จากแบคทีเรียโคโลนีที่ 1 ที่ถูกและไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ตามลำดับ เลนที่ 3 และ 4 เป็น plasmid DNA จากแบคทีเรียโคโลนีที่ 2 ที่ถูกและไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ตามลำดับ

จากนั้นทำการเตรียม plasmid CD147-Rg ให้ได้ปริมาณมาก โดยเลี้ยงเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในปริมาณมากแล้วแยก plasmid DNA โดยใช้ QIAGEN chromatographic columns นำ plasmid DNA ที่เตรียมได้มาพิสูจน์ยืนยันโดยการตัดด้วย เอนไซม์ *Xba*I ผลการทดลองดังรูปที่ 2 พบว่า plasmid DNA ที่เตรียมได้ถูกตัดออกเป็น

2 bands คือส่วนของ plasmid vector ขนาด 3.5 kb และ insert CD147-Rg ขนาด 2.0 kb ซึ่งเหมือนกับ plasmid CD147-Rg มาตรฐานที่ทำควบคุมไปด้วย โดย plasmid DNA ที่เตรียมได้มีสัดส่วนของ OD 260/OD280 nm เท่ากับ 1.73 และมีความเข้มข้น เท่ากับ 1.35 mg/ml



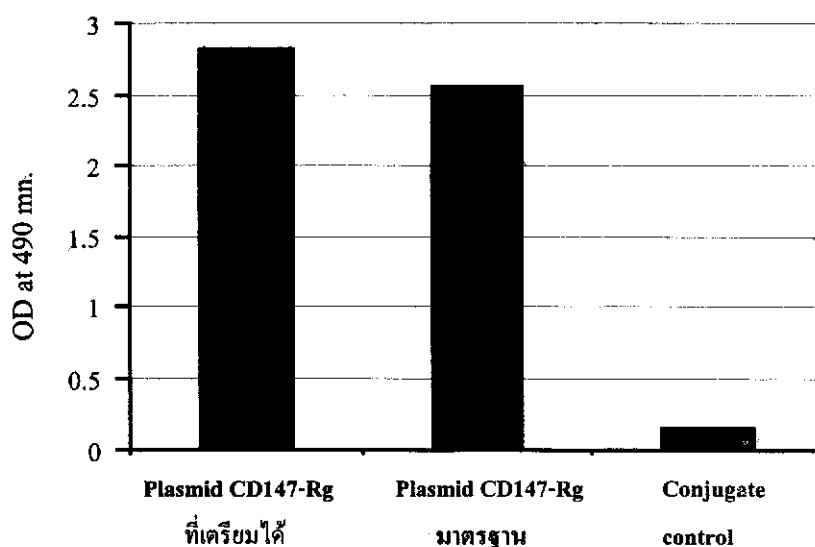
รูปที่ 2 แสดง restriction fragment analysis ของ plasmid CD147-Rg ที่เตรียมได้โดยวิธี QIAGEN mega kit เปรียบเทียบกับ plasmid CD147-Rg มาตรฐาน

เลนที่ 1 และ 2 เป็น plasmid DNA ที่เตรียมได้ ที่ถูกและไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ตามลำดับ

เลนที่ 3 และ 4 เป็น plasmid CD147-Rg มาตรฐาน ที่ถูกและไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ตามลำดับ

เพื่อนำ plasmid CD147-Rg ไปใช้ในงาน DNA immunization จึงทำการพิสูจน์ว่า plasmid CD147-Rg สามารถกำหนดการสร้าง CD147-IgG fusion protein ใน eukaryotic cells ได้ โดยนำ plasmid CD147-Rg ไปเหนี่ยวนำเข้าไปใน COS cells โดยวิธี DEAE-dextran transfection

จากนั้นนำ culture supernatant มาทดสอบหา CD147-IgG fusion protein โดยวิธี ELISA ผลการทดลองพบว่า COS cells สามารถสร้าง CD147-IgG fusion protein ที่หลั่งออกมาออกเซลล์ได้ (รูปที่ 3)

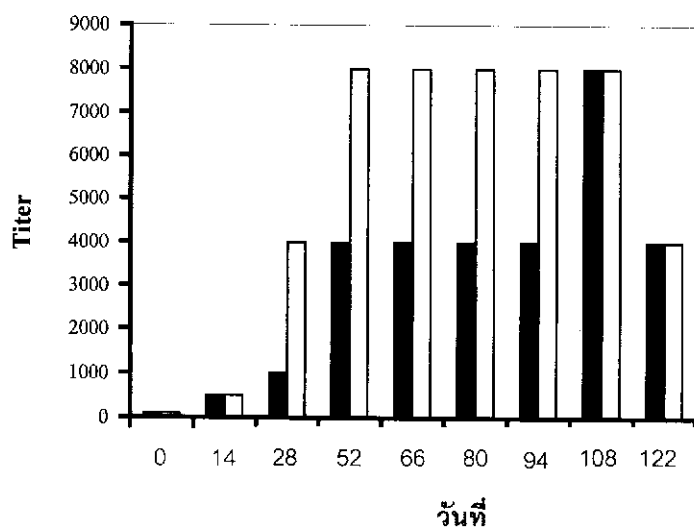


รูปที่ 3 แสดงการตรวจหา CD147-IgG fusion protein จาก COS cells ที่ถูก transfect ด้วย plasmid CD147-Rg ที่เตรียมได้ และ plasmid CD147-Rg มาตรฐานโดยวิธี ELISA

2. การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ human IgG และ CD147 โปรตีน ในหนูหลังการฉีด plasmid CD147-Rg

เพื่อศึกษาถึงการนำเอาวิธี DNA immunization มาใช้ในการสร้าง antibody ต่อโปรตีนสองชนิดในหนู จึงนำเอา plasmid CD147-Rg ฉีดหนู 2 ตัว ทางกล้ามเนื้อขาหลัง 5 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ และเก็บซีรัมก่อนฉีดและหลังการฉีดแต่ละครั้ง แล้วนำซีรัมทั้งหมดมาตรวจหา anti-human IgG และ anti-CD147 antibody โดยวิธี ELISA

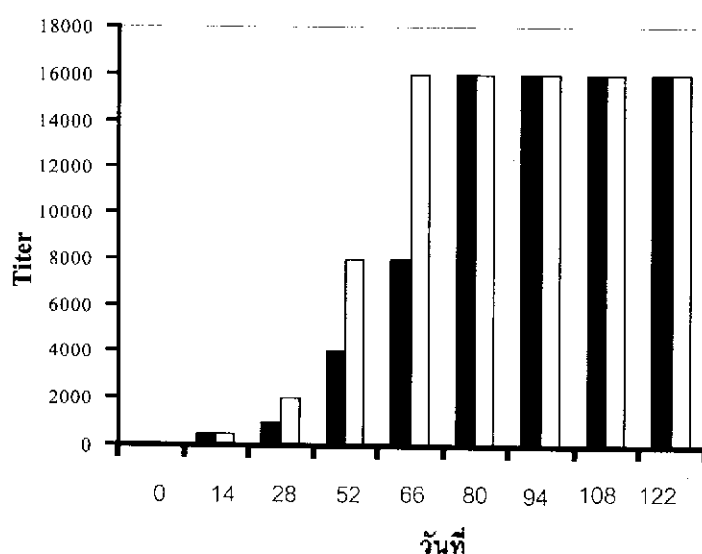
ในการตรวจหาระดับ anti-human IgG antibody ทำการทดลองโดยใช้ purified human IgG เป็นแอนติเจน ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบ anti-human IgG antibody ได้ในหนูทั้งสองตัว โดยสามารถพบแอนติบอดีได้หลังจากการฉีดกระตุ้นด้วย plasmid DNA เพียง 1 ครั้ง และระดับแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และจะคงที่หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 โดยยังคงสามารถตรวจพบแอนติบอดีหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 2 เดือน (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงระดับ anti-human IgG antibody โดยวิธี ELISA ในหนูทั้งสองตัว แถบดำ แสดงผลการศึกษาในหนูตัวที่ 1 และแถบขาวแสดงผลการศึกษาในหนูตัวที่ 2 โดยหนูได้รับ plasmid CD147-Rg ในวันที่ 0, 14, 28, 52 และ 66

ในตรวจหาระดับ anti-CD147 antibody ทำการทดลองโดยใช้ phage ที่มีการแสดงออกของ CD147 protein เป็นแอนติเจน¹⁷ ผลการทดลองพบสามารถตรวจพบ anti-CD147 antibody ได้ในหนูทดลองทั้งสองตัวโดยพบแอนติบอดีได้หลังจากการฉีดกระตุ้นด้วย plasmid DNA เพียง 1 ครั้งเช่นกัน

และระดับแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และจะคงที่หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 ในหนูทั้งสองตัว และยังสามารถตรวจพบแอนติบอดีหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 2 เดือน ผลแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงระดับ anti-CD147 antibody โดยวิธี ELISA ในหนูทั้งสองตัว แถบดำ แสดงผลการศึกษาในหนูตัวที่ 1 และแถบขาวแสดงผลการศึกษาในหนูตัวที่ 2 โดยหนูได้รับ plasmid CD147-Rg ในวันที่ 0, 14, 28, 52 และ 66

3. ผลการทดสอบปฏิกิริยาระหว่าง anti-CD147 antibody กับ recombinant และ native CD147 โปรตีน

เพื่อพิสูจน์ว่า anti-CD147 antibody ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นด้วย plasmid CD147-Rg สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง CD147 ชนิด recombinant และ native form จึงนำซีรัมจากหนูที่ฉีดด้วย plasmid CD147-Rg ไปทำปฏิกิริยากับ recombi-

nant CD147 protein ที่แสดงออกบน BW cells และ native CD147 protein ที่แสดงออกบน U937 และ PBMC ผลการทดลองพบ anti-CD147 antibody ที่ได้โดยการฉีดด้วย plasmid CD147-Rg สามารถทำปฏิกิริยาได้กับทั้ง recombinant CD147 โปรตีน ที่แสดงออกบน BW cells และ native CD147 โปรตีน ที่แสดงออกบน U937 และ PBMC ได้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงปฏิกิริยาระหว่าง anti-CD147 antibody ที่ได้โดยวิธี DNA immunization กับ recombinant และ native CD147 protein

Date	CD147 -BW cells		Lymphocytes		Monocytes		U937	
	หนู 1	หนู 2	หนู 1	หนู 2	หนู 1	หนู 2	หนู 1	หนู 2
Day 0	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 14	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 70	+	+	+	+	+	+	+	+
Conjugate control	-	-	-	-	-	-	-	-

นำ CD147 expressing BW cells, lymphocytes, monocytes และ U937 cells มาย้อมด้วยซีรัมจากหนูตัวที่ 1 และ 2 ที่เก็บในวันที่ 0, 14 และ 70 โดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์ด้วย flow cytometry Conjugate control คือปฏิกิริยาระหว่างเซลล์กับ FITC-anti-mouse immunoglobulins โดยไม่มีซีรัมหนู + = ปฏิกิริยาบวก, - = ปฏิกิริยาลบ

วิจารณ์

DNA immunization หรือ วัคซีนดีเอ็นเอเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้ง humoral และ cellular immunity¹⁻² ในการศึกษานี้ได้ศึกษาถึงการนำเอาวิธีวัคซีนดีเอ็นเอมาใช้ในการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน 2 ชนิดในเวลาเดียวกัน

การศึกษานี้เริ่มด้วยการนำเอา plasmid CD147-Rg ซึ่งกำหนดการสร้าง CD147 โปรตีนที่ต่อกับส่วน Fc ของ IgG ไปเหนี่ยวนำเข้าไปใน *E.coli* แล้วนำมา spread บน LB agar plate

จากนั้นคัดเลือกเอา *E.coli* ที่มี plasmid CD147-Rg อยู่ภายในเซลล์ มาเพิ่มจำนวนและเตรียม plasmid DNA ให้ได้ปริมาณมาก และพิสูจน์ว่า plasmid CD147-Rg ที่เตรียมได้ประกอบด้วย CD147-Rg DNA และสามารถสร้าง CD147-IgG fusion protein ได้ใน eukaryotic cells ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่า plasmid DNA นี้สามารถนำมาใช้ในงานวัคซีนดีเอ็นเอได้²⁻³

เมื่อทำการฉีดกระตุ้นหนู Balb/c 2 ตัวด้วย plasmid CD147-Rg 5 ครั้ง แล้วตรวจวัดหาระดับ

anti-human IgG antibody และ anti-CD147 antibody โดยวิธี ELISA ผลการทดลองพบว่า หนูทั้งสองตัวสามารถสร้าง anti-human IgG antibody ได้หลังจากการฉีดกระตุ้นด้วย plasmid DNA เพียง 1 ครั้ง และแอนติบอดียังสามารถคงอยู่ได้นานอย่างน้อย 4 เดือน ทำนองเดียวกันก็สามารถตรวจพบ anti-CD147 antibody ในหนูทั้งสองตัวโดยสามารถตรวจพบได้หลังการฉีดกระตุ้นด้วย plasmid DNA เพียง 1 ครั้ง และแอนติบอดียังสามารถอยู่ได้นานอย่างน้อย 4 เดือนเช่นกัน โดยระดับแอนติบอดีในหนูตัวที่สองสูงกว่าหนูตัวที่หนึ่งเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่หนูมี immune response ไม่เท่ากัน จากการศึกษาความจำเพาะของ anti-CD147 antibody ที่เกิดขึ้นโดยวิธีการฉีด plasmid DNA นี้ พบว่า แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับ native CD147 protein ซึ่งมีบนผิวของ U937 cells และ PBMC และ recombinant CD147 protein ที่แสดงออกบน BW cells ที่ถูก stable transfect ด้วย CD147 DNA และ บน CD147 phage¹⁷ ผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าโดยการฉีด plasmid CD147-Rg เข้าไปในหนูทางกล้ามเนื้อ DNA ที่ให้เข้าไปจะเข้าสู่เซลล์ของหนู และโดยอาศัยขบวนการ transcription และ translation ของหนู จะทำให้ได้เป็น CD147-IgG fusion protein ซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติเจนกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันขึ้น¹⁻² เนื่องจากโปรตีนแอนติเจนถูกสร้างโดย eukaryotic cells จึงมีโครงสร้างที่คล้ายกับโปรตีน CD147 และ IgG ตามธรรมชาติ ดังนั้นแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นจึงเหมือนกับการกระตุ้นด้วยโปรตีนธรรมชาติ และสามารถทำปฏิกิริยา จำเพาะต่อแอนติเจนในธรรมชาติได้

จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าวิธีวัคซีนดีเอ็นเอ

สามารถนำมาใช้ในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนสองชนิดในเวลาเดียวกันได้ และความรู้นี้อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการให้วัคซีนสองชนิดในเวลาเดียวกัน วิธี DNA immunization นี้อาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีการให้วัคซีนแบบใหม่ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

1. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465-8.
2. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 617-48.
3. Lewis PJ, Babiuk LA. DNA vaccines: a review. *Adv Virus Res* 1999; 54: 129-88.
4. Williams RS, Johnston SA, Riedy M, Devit MJ, McElligott SG, Sanford JC. Introduction of foreign genes into tissue of living mice DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2726-30.
5. Tang DC, Devit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356: 152-4.
6. Barry MA, Barry ME, Johnston SA.

- Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *Biotechniques* 1994; 16: 616-20.
7. Robinson WH, Prohaska SS, Santoro JC, Robinson HL, Parnes JR. Identification of a mouse protein homologous to the human CD6 T cell surface protein and sequence of the corresponding cDNA. *J Immunol* 1995; 155: 4739-48.
 8. Kasinrerk W, Tokrasinwit N, Piluk Y. Production of mouse anti-CD4 antibodies by DNA-based immunization. *Asian Pacific J Allerg Immunol* 1996; 14: 99-105.
 9. Kasinrerk W, Tokrasinwit N, Changtunrourng K: Production of anti-CD4 antibodies in rabbits by DNA Immunization. *Asia Pacific J Mol Biol Biotech* 1997; 5: 123-9.
 10. Kasinrerk W, Tokrasinwit N: Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. *Immunol letters* 1999; 67: 237-42.
 11. Velikovsky CA, Cassataro J, Sanchez M, Fossati CA, Fainboim L, Spitz M. Single-short plasmid DNA intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies: Persistent expression of DNA. *J Immunol methods* 2000; 244: 1-7.
 12. Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrerk W: Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. *Immunol letters* 2001; 76: 25-31.
 13. Kasinrerk W, Moonsom S, Chawansuntati K. Production of Antibodies by Single DNA immunization: Comparison of Various Immunization Routes. *Hybridoma and Hybridomics* 2002; 21, 287-93.
 14. Puttikhunt C, Kasinrerk W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moonsom S, Sittisombut N, Malasit P. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods*. 2003; 109: 55-61.
 15. Prager E, Sunder-Plassmann R, Hansmann C, Koch C, Holter W, Knapp W, Stockinger H. Interaction of CD31 with a heterophilic counterreceptor involved in downregulation of human T cell responses. *J Exp Med* 1996; 184, 41-50.
 16. Prager E, Staffler G, Majdic , Saemann MD, Godar S, Zlabinger G, Stockinger H. Induction of Hyporesponsiveness and Impaired T Lymphocyte Activation by the CD31 Receptor:Ligand Pathway in T Cells. *J Immunol* 2001; 166, 2364-71.
 17. Tayapiwatana C, Arooncharus P, Kasinrerk W. Displaying and epitope mapping of CD147 on VCSM13 phages: influence of *Escherichia coli* strains. *J Immunol Methods* (submitted and revision).

เชิญเยี่ยมชม Homepage ของภาควิชาเคมีคลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่ <http://www.ams.cmu.ac.th/depts/clinchem/>

Department of Clinical Chemistry

*Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai
University*



News

Information

Courses

Staff

Teaching materials

Research

QC

Events

Enquiries

Welcome

The department of Clinical Chemistry provides courses in clinical chemistry including principles, uses of instruments, precautions, method and procedures generally used in clinical chemistry laboratories, evaluation of techniques, and quality control. Medical technology students will be trained in routine tests such as liver and kidney function tests, and also special techniques which require utilization of sophisticated instruments and technology, e.g., analysis of hormones and their metabolites, enzymes. Students will be assigned to practice in a hospital clinical chemistry laboratory to gain experience under supervision of teaching staff.

ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Tel. (0066) 053-945082, Fax. (0066) 053-946042