รหัสโครงการ SUT1-102-55-12-41

รายงานการวิจัย

การศึกษาคุณสมบัติหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C4 และ WK-C5

(Characterization and Functional Analysis of Leukocyte Surface Molecule Recognizing by Monoclonal Antibody WK-C4 and WK-C5)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-102-55-12-41

รายงานการวิจัย

การศึกษาคุณสมบัติหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C4 และ WK-C5

(Characterization and Functional Analysis of Leukocyte Surface Molecule Recognizing by Monoclonal Antibody WK-C4 and WK-C5)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิดา ขันแก้วหล้า

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวศิริวรรณ วรรณศุกร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2556

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ และ อาจารย์ ดร. สุพรรษา ปาต๊ะ คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในฐานะผู้ร่วมผลิตแอนติบอดีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งเป็นผู้ให้คำปรึกษา แนะนำ เพื่อให้การดำเนินการวิจัยดำเนินไปด้วยดี ขอบคุณ นางสาวศิริวรรณ วันศุกร์ นักศึกษาระดับดุษฎีบัณฑิตสาขาชีวเคมี ที่ร่วมทุ่มเทกำลังกายและความคิดในการทำงานวิจัยนี้ ขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเหลือดำเนินความสะดวกในด้านต่างๆ ทั้งการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และ การจัดทำเอกสาร โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555

พนิดา ขันแก้วหล้า

กันยายน 2556

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การทำหน้าที่ของเซลล์ให้สมบูรณ์นั้น ในธรรมชาติได้สร้างให้เซลล์เหล่านี้มีการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดบนผิวของเซลล์เหล่านี้เรียกว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อให้เซลล์สามารถใช้ในการสื่อสารระหว่างเซลล์และเอื้อให้เซลล์เหล่านี้สามารถจัดการสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในร่างกายได้อย่างเป็นระบบ บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดต่างๆ มากมาย โมเลกุลบางชนิดถูกค้นพบและทราบหน้าที่ที่แน่ชัด แต่มีอีกหลายโมเลกุลที่ถูกค้นพบแต่ยังไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แท้จริง โดยยังคงมีการศึกษากันอยู่อย่างต่อเนื่อง จากการใช้เทคนิคไฮบริโดรมาเราสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวได้หลายโคลน โดยโคลนที่เราสนใจคือ WK-C5 จากการย้อมโปรตีนบนผิวเซลล์ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟไซโตมิเตอร์ พบว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดีชนิดนี้มีการแสดงออกบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ leukemia cell lines ชนิดT cell lines B cell lines และ monocytic cell lines แต่ไม่แสดงออกบนผิวเซลล์ กรานูโลไซต์และเม็ดเลือดแดง จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าโมเลกุลชนิดนี้เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักประมาณ 45 kDa และพบว่าโมเลกุล WK-C5 ไม่มีบทบาทในการกินแบคทีเรียของเซลล์กรานูไซต์แบบฟาโกไซโทซิส ผลการวิจัยที่ได้จึงเป็นข้อมูลสำคัญที่บ่งบอกถึงคุณสมบัติและหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ แอนติบอดี WK-C5 ต่อการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอย่างไรก็ตามการยืนยันว่าโมเลกุลนี้คืออะไร โดยวิธีการหาลำดับกรดอะมิโนยังต้องทำการพิสูจน์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Leukocytes are known as the cells which play a major role in the immune system. To execute their functions, nature design there surface to express abundant of proteins that the cells can use for cell-cell communication. Some of these molecules have been identified and characterized. Nevertheless, many of them still wait for discovering. Using hybridoma technique, several monoclonal antibodies (mAbs) to leukocytes surface molecules were generated. One among those mAbs named WK-C5 was of interest. Cell surface staining and flow cytometry analysis showed that WK-C5 recognizing molecule express on surface of lymphocytes, monocytes, human T and B cell lines and monocytic cell line. However, this molecule can not find on surface of granulocytes and red blood cells (RBCs). Biochemical characterization using immunoprecipitation technique found a protein with molecular weight of about 45 kDa was precipitated with mAb WK-C5. Phagocytosis analysis indicated that WK-C5 recognizing molecule does not play a role in engulfment of bacteria by phagocytosis. These results are important information that explain the biochemical properties of this molecule and its biological function, especially role on innate immune response. Nonetheless, identification of the molecule and functional role of this molecule in adaptive immune response are futher needed.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ..... **ก**

บทคัดย่อภาษาไทย ..... **ข**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... **ค**

สารบัญ ..... **ง**

สารบัญภาพ ..... **ฉ**

บทที่1 บทนำ **1**

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 ข้อตกลงเบื้องต้น 4

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย 4

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 4

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย **5**

2.1 การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก 5

2.2 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี AFFINITY CHROMATOGRAPHY 5

2.3 การตรวจดูความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้โดยวิธี SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) 5

2.4 ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ 6

2.5 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี WK-C5 7

2.6 การเตรียมแบคทีเรียเรืองแสง 8

2.7 การศึกษา PHAGOCYTOSIS โดยวิธีโฟลไซโตเมทรี 8

บทที่ 3 ผลการวิจัย **10**

3.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 ให้ได้ปริมาณมาก 10

3.2 การแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ 11

3.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุล WK-C5 13

3.4 การศึกษาผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 ต่อการกินแบคทีเรียของเซลล์ GRANULOCYTES แบบ PHAGOCYTOSIS 15

บทที่4 บทสรุป 19

บรรณานุกรม 20

ภาคผนวก 22

ประวัติผู้วิจัย 23

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 10
รูปที่ 2 การแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวของ human hematopoietic cell lines 12
รูปที่ 3 การแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวของ peripheral blood cells 13
รูปที่ 4 แสดงขนาดของโมเลกุล WK-C5 14
รูปที่ 5 กราฟแสดงการเรืองแสงของแบคทีเรีย 16
รูปที่ 6 ผลของแอนติบอดีWK-C5 ต่อกระบวนการ phagocytosis 18

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบที่มีความสำคัญระบบหนึ่งของร่างกายในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอม เซลล์มะเร็ง หรือเชื้อโรคเพื่อไม่ให้ทำอันตรายต่อร่างกาย การทำงานในระบบภูมิคุ้มกันเกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์หลายชนิด เซลล์ที่ทำหน้าที่หลักในระบบภูมิคุ้มกันคือเซลล์เม็ดเลือดขาว กลไกที่เอื้อให้เซลล์เหล่านี้สามารถจัดการสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในร่างกายได้อย่างเป็นระบบนั้นคือการสื่อสารและส่งสัญญาณอย่างมีประสิทธิภาพระหว่าง (Huston 1997; Abbas AK, Lichtman AH et al. 2000; Janeway CA, Pual T et al. 2001; Parkin and Cohen 2001; Abbas AK and AH 2006) ธรรมชาติจึงได้กำหนดให้บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดต่างๆมากมาย โดยเรียกโมเลกุลเหล่านี้ว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว (A. Neil Barclay, Marion H. Brown et al. 1997) เพื่อที่เซลล์จะได้ใช้โมเลกุลเหล่านี้เป็นเครื่องมือในการสื่อสารและรับส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ กลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสื่อสารระหว่างเซลล์โดยโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลไกหลักคือ cell-cell interaction และ ligand-receptor interaction โดยพบว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น Adhesion molecules และโมเลกุลจำนวนหนึ่งทำหน้าที่เป็น receptors สำหรับ cytokine หรือ chemokine การเข้าจับกันระหว่าง ligand-receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว จะก่อให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ จากนั้นจะส่งผลให้มีการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ differentiation, maturation, proliferation, migration ตลอดจนการตายของเซลล์แบบ apoptosis และสุดท้ายจะก่อให้เกิดการตอบสนองแบบต่างๆในระบบภูมิคุ้มกัน (A. Neil Barclay, Marion H. Brown et al. 1997; Huston 1997; Abbas AK, Lichtman AH et al. 2000; Janeway CA, Pual T et al. 2001; Parkin and Cohen 2001; Abbas AK and AH 2006; Smith 2008) ดังนั้นการที่เราทราบถึงคุณสมบัติและบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการอธิบายกลไกควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน จากอดีตสู่ปัจจุบันมีโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมากได้ถูกค้นพบขึ้น และถูกจัดเข้าสู่ระบบ Cluster of differentiation (CD) antigen (Zola, Swart et al. 2005) (A. Neil Barclay, Marion H. Brown et al. 1997; HLDA_Workshop 2013) การตั้งชื่อโดยระบบ CD นี้เกิดขึ้นจากการดำเนินการของ The Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) workshops ซึ่งจัดทำขึ้นโดยนักภูมิคุ้มกันวิทยาทั่วโลก โดยการที่จะตั้งชื่อโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวให้อยู่ในระบบ cluster of differentiation (CD) นั้นจะมีการส่งแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากห้องปฏิบัติการต่างๆทั่วโลกมาที่ HLDA workshop committee จากนั้นแอนติบอดีทั้งหลายนี้จะได้มีการวิเคราะห์ศึกษา โดยขั้นตอนการศึกษาของ The

international HLDA workshop นั้นจะศึกษาดูการแสดงออกของโมเลกุลในเซลล์ชนิดต่างๆ (cellular reaction patterns) น้ำหนักโมเลกุล และหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb ชนิดนั้นๆ โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดใดที่มีความจำเพาะเช่นเดียวกันจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันและให้ชื่อเป็น CD number โดยชื่อ CD number นี้เป็นตัวบ่งบอกโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่นำไปจัดกลุ่ม จากการประชุม HLDA workshop ครั้งที่ 9 ที่เมือง Bacelona ประเทศสเปน เมื่อเดือนมีนาคมปี พ.ศ. 2553 พบว่ามีโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 350 ชนิดที่ถูกจัดอยู่ในระบบ CD คือ CD1-CD363 (HLDA_Workshop 2013) โมเลกุลบางชนิดที่ได้ถูกค้นพบและทราบหน้าที่ที่แน่ชัดแล้ว อีกหลายโมเลกุลถูกค้นพบแล้วแต่ยังไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แท้จริง โดยยังคงมีการศึกษากันอยู่อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่ายังมีโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์อีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ถูกค้นพบ การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดใหม่ รวมถึงการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโมเลกุลบนเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ทำให้เราเข้าใจบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลดังกล่าวต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยจะมีผลเชื่อมโยงทำให้เราเข้าใจการกระบวนการทำงานต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น โดยองค์ความรู้ที่ได้นั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและวินิจฉัยการดำเนินไปของโรคต่างๆ และยังรวมไปถึงการหาวิธีรักษาโรค ต่อไปในอนาคตได้

ในการศึกษาคุณสมบัติ หรือหน้าที่ของโมเลกุลใดๆ บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยทั่วไปนั้นส่วนใหญ่สามารถทำได้โดยการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะ และนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุลชนิดนั้นๆ มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษา ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าว สามารถผลิตขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Hybridroma technique ซึ่งได้ถูกพัฒนามาใช้โดย Kohler และ Milstein ในปี 1975 (Kohler and Milstein 1975; Janeway CA, Pual T et al. 2001; Abbas AK and AH 2006) โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นสามารถนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลนั้นๆ บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ (cellular distribution) การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคนอล แอนติบอดีชนิดนั้น เช่น การศึกษาหาขนาดของโมเลกุล (molecular weight) การศึกษาหาปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (glycosylation) หรือ อาจใช้ตรวจสอบการจับกับโมเลกุลอื่นๆบนผิวเซลล์เดียวกัน (protein interaction) เป็นต้น นอกจากนี้เรายังสามารถนำแอนติบอดีที่ได้มาทำการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะ โดยการนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้เข้ามาจับและสังเกตการตอบสนองต่างๆ ของเซลล์ที่เกิดขึ้น เช่น การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ การกระตุ้นหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) เป็นต้น และท้ายที่สุดเรายังสามารถนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เราผลิตได้นั้นมาโคลนยีน และหาลำดับของ nucleotide เพื่อที่จะบอกได้ว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนั้นๆ คือโมเลกุลใดได้ (Chiampanichayakul, Szekeres et al. 2002)

เพื่อศึกษาหาหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว ในช่วงระยะเวลากว่าสิบปีที่ผ่าน ในการร่วมวิจัยกับ ศาสตราจารย์ ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ เราได้ทำการผลิต polyclonal antibodies (pAbs) และ monoclonal antibodies (mAbs) ที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวขึ้นมาเป็นจำนวนมาก และได้นำแอนติบอดีดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโมกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งชนิดที่ถูกค้นพบแล้วและที่ยังไม่มีการค้นพบ (Kasinrerk, Tokrasinwit et al. 2000; Khunkeawla, Moonsom et al. 2001; Chiampanichayakul, Szekeres et al. 2002; Chiampanichayakul, Khunkaewla et al. 2006; Chiampanichayakul, Peng-in et al. 2006; Intasai, Mai et al. 2006; Khunkaewla, Chiampanichayakul et al. 2007; Intasai, Tragoolpua et al. 2009; Biegler and Kasinrerk 2012)

จากความสำคัญในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวดังได้กล่าวมาข้างต้นนี้แล้ว ทำให้ผู้วิจัยจำนวนมากทั่วโลกมีความตั้งใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาบทบาทและหน้าที่ของโมเลกุลชนิดใหม่อย่างลึกซึ้งเพื่อให้เกิดองค์ความรู้และอาจจะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้งานได้จริงในอนาคตข้างหน้าได้ และจากการศึกษาที่ผ่านมา และในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C4 และ WK-C5 (โมเลกุล WK-C5) โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้ดังกล่าวมาเป็นเครื่องมือในการศึกษาทั้งในแง่ของการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะ ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นโดยการย้อมผิวเซลล์แบบ indirect immunofluorescence สามารถพบโมเลกุลที่จำเพาะต่อ โมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งสองชนิด มีการแสดงออกบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes และ monocyte แต่ไม่พบบนผิวเซลล์ granulocyte และ เม็ดเลือดแดง ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการศึกษา โดยการพิสูจน์ว่าแอนติบอดีทั้งสองจับอยู่กับโมเลกุลชนิดใด โดยการทำ immunoprecipitation เพื่อนำไปแยกหาลำดับกรดอะมิโน รวมทั้งศึกษาบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลทั้ง 2 ชนิดนี้ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน องค์ความรู้ที่ได้นั้นจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่จะทำให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากระหว่างการทดลอง hybridoma cell ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C4 ได้หยุดผลิตแอนติบอดีทำให้การทดลองเกี่ยวกับแอนติบอดี WK-C4 ไม่สามารถทำได้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเฉพาะในกรณีของการใช้ แอนติบอดี WK-C5 เท่านั้นและในรายงานวิจัยนี้จะเรียกโมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดี WK-C5 ว่าโมเลกุล WK-C5

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหน้าที่ทางชีวเคมีและ ทางภูมิคุ้มกันวิทยาของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C4 และ WK-C5

2. เพื่อทำการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี WKC4 และ WK-C5

1.3 **ข้อตกลงเบื้องต้น**

การตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor อย่างน้อย 1 เรื่อง หรือ การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ 1 ครั้ง

1.4 **ขอบเขตของโครงการวิจัย**

งานวิจัยมีขอบเขตเริ่มต้นด้วยการผลิตแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมากจากนั้นทำ immunoprecipitation เพื่อแยกโมเลกุลที่จำเพาะไปหาลำดับของกรดอะมิโน และเนื่องจากโมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดีทั้งสองอยู่บนผิวเซลล์โมโนไซต์และ ลิมโฟไซต์ จึงจะทำการทดลองเพื่อดูผลของแอนติบอดี WK-C4 และ WK-C5 ต่อการแบ่งตัวของเซลล์โดยการกระตุ้นด้วยผ่าน CD3 T cell receptor และผลต่อการเกิดกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

1.5 **ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย**

การตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor อย่างน้อย 1 เรื่อง หรือ การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ 1 ครั้ง โดยหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้คือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี หรือสถาบันวิจัยทางการแพทย์ทั้งในและต่างประเทศ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก

ทำการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก โดยการเลี้ยงเซลล์ลูกผสม (hybridoma) ที่ผลิตแอนติบอดี WK-5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ serum free medium เพื่อให้เซลล์ผลิตแอนติบอดีมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดสอบ activity ของแอนติบอดีที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการย้อมแบบ indirect immunofluorescence และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ก่อนที่จะนำไปเตรียมเป็นแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ต่อไป

เนื่องจากระหว่างการศึกษา hybridoma cell ทั้งหมดที่ผลิต WK-C4 ได้หยุดผลิตแอนติบอดี ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเฉพาะคุณสมบัติต่างๆ ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 เท่านั้น

2.2 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี WK-C5 ที่มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography โดยเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm 4°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ออกไป ดูดเฉพาะส่วนของเหลวมาผ่านใน Protein A sepharose column เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์เป็นชนิด IgG1 ซึ่งสามารถถูกยึดจับกับเม็ด sepharose โดย Protein G ส่วนแอนติบอดีที่ไม่ถูกจับกับเม็ด sepharose ใน column จะถูกล้างออกโดย phosphate buffer ก่อนเติม eluting buffer (0.1M citric acid buffer pH 3.0) เพื่อแยกแอนติบอดีที่ถูกจับออกจาก column ทำการปรับ pH ของสารที่แยกได้ให้เป็น 7.2 โดยการเติม neutralizing buffer (2M Tris-HCl pH 8.0) นำแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ไป dialyze ด้วย PBS และวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ก่อนเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3 การตรวจดูความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำแอนติบอดีบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 2 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE ทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่แยกได้มาผสมกับ non-reducing buffer หรือ reducing buffer และต้มที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ทำการวิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE ที่มี 12.5% resolving gel จากนั้นทำการย้อม

แผ่นเจลที่แยกแอนติบอดีที่สนใจด้วยสี Coomassie Brilliant blue ล้างสีส่วนเกินออกโดย destaining solution จนพื้นเจลส่วนที่ไม่มีแถบโปรตีนใสสะอาด โดยขนาดของแถบโปรตีนที่แยกได้จะเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ทำควบคู่กันในแผ่นเจลเดียวกัน

2.4 ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ

เซลล์ชนิดต่างจะทำการเลี้ยงใน RPMI-1640 ที่มี 10% fetal calf serum (FCS) และสาร antibiotics ใน 5% CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37^{o}C.

2.4.1 ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ โมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 บนผิวของ cell lines ชนิดต่างๆ โดยวิธี indirect immunofluorescence staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

นำเซลล์มา pre-incubation กับ 10% human AB serum ที่ 4^{o}C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการย้อมเพื่อป้องกันการจับกันแบบไม่จำเพาะ ระหว่างโมโนโคลนอล แอนติบอดี กับ Fc receptor บนผิวเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ดังกล่าวปริมาตร 50 µl (1x10^{7}cell/ml) มาย้อมด้วย แอนติบอดี WK-C5 หรือ control mAbs ที่ 4^{o}C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 1% BSA-PBS-NaN_3 ก่อนการเติม FITC-conjugated sheep $F(ab')_2$ anti-mouse immunoglobulins antibodies ทำปฏิกิริยาที่ 4^{o}C เป็นเวลา 30 นาที ล้างเซลล์ด้วย 1% BSA-PBS-NaN_3ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

2.4.2 ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี WK-C5 บนผิวของ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

ทำการแยก PBMCs จาก heparinized whole blood จาก healthy donor โดยวิธี Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation จากนั้น PBMCs ที่แยกได้จะถูกนำมาย้อมด้วยแอนติบอดี WK-C4 หรือ WK-C5 หรือ control mAbs กรณีที่มีการแยกชนิดเซลล์เป็น B lymphocyte T lymphocyte และ NK cell จะใช้วิธีการแยกกลุ่มเซลล์โดยการย้อมเซลล์แบบ direct immunofluorescent staining ร่วมกับโดยวิธี indirect immunofluorescence staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

2.4.3 ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี WK-C5 บนผิวของ red blood cells (RBCs)

นำเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 0.3% ในสารละลาย 1% BSA-PBS-0.02% NaN_3 ปริมาตร 50 µl นำมาย้อมด้วยแอนติบอดี WK-C5 หรือ control mAbs โดยวิธี indirect immunofluorescence staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

2.5 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี WK-C5

- **Western blot**

นำเซลล์ที่ใช้ในการศึกษา (PBMCs, lymphocytes หรือ cell lines) มาทำการแตกเซลล์ด้วย lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.2, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.02% NaN_3) ที่มี 1% Triton X-100 เป็น detergent และมีส่วนผสมของ protease inhibitors (phenylmethyl-sulphonylfluoride (PMSF), iodoacetamide, aprotinin) โดยทำที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการแยกเก็บ cell lysates โดยวิธี centrifugation จากนั้นนำ cell lysate ที่เตรียมได้มาผสมรวมกับ non-reducing buffer หรือ reducing buffer และนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ก่อนแยกโดยวิธี SDS-PAGE จากนั้นถ่ายโปรตีนที่แยกได้ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยวิธี semi-dry electroblotting ทำการ block nitrocellulose membrane ด้วย 5% skimmed milk ใน PBS นำ membrane ที่ผ่านการ block แล้วมาย้อมด้วย mAb COS3A หรือ control mAbs จากนั้นล้างแอนติบอดีที่จับแบบไม่จำเพาะออกด้วยสารละลาย 0.1% Tween 20 ใน PBS ก่อนที่จะย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ Horse Radish Peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody ล้าง membrane ก่อนทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system เปรียบเทียบแถบของปฏิกิริยาบนฟิล์มกับ standard molecular weight marker ที่ทำควบคู่ไปด้วย การศึกษานี้จะทำให้ทราบว่าโมเลกุลที่จำเพาะกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี WK-C5 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร

- **Immunoprecipitation**

ติดฉลากโปรตีนบนผิวเซลล์ PBMCs หรือ cell lines ที่นำมาศึกษาด้วยสาร Biotin Sulfo-NHS-LC-Biotin ที่ความเข้มข้น 5 mM เป็นเวลา 1 hr ที่ 4°C จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการติดฉลากด้วยสารละลาย 1mM Gycine ใน PBS และล้าง 2 ครั้งด้วย PBS ที่เย็น จากนั้นทำการแตกเซลล์ที่ติดฉลากแล้ว ด้วย lysis buffer ปริมาตร 1ml ที่มีส่วนผสมของ Tris buffered saline ที่ประกอบด้วย 1% Triton X-100 และ protease inhibitors (iodoacetamide, PMSF, pepstatin A, aprotinin) โดยการแช่ในน้ำแข็งและเก็บ cell lysate มาศึกษาต่อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น

แยกส่วนที่เป็นของเหลว เรียกว่า cell lysate ที่ได้มาผสมกับ protein G sepharose beads ที่ติดด้วย mAb WK-C5 หรือ control mAb บ่มและหมุนด้วย rotator ไว้เป็นเวลาข้ามคืนที่ 4°C ดูดเอาส่วนของ cell lysate ออกก่อนล้างเม็ด beads 10 ครั้งด้วย lysis buffer แยกโปรตีนที่จับกับแอนติบอดีบน protein G Sepharose beads โดยการเติม 1x nonreducing sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% Sodium dodecyl sulfate, 10% Glycerol and 0.01% Bromophenolblue) ต้มเป็นเวลา 5 นาที โปรตีนที่แยกออกมาได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อโดย วิธี SDS-PAGE ก่อนที่จะถูกถ่ายลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ทำการแช่แผ่น nitrocellulose membrane ที่มีโปรตีนที่สนใจใน blocking buffer (PBS containing 5% BSA) ก่อนย้อมแผ่น membrane ด้วย HRP-conjugated streptavidin เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแอนติบอดีที่เกินมาด้วย PBS จากนั้นวิเคราะห์ดูแถบโปรตีนที่สนใจโดยการตรวจวัดด้วย chemiluminescence detection system เปรียบเทียบแถบของปฏิกิริยาบนฟิล์มกับ standard molecular weight marker ที่ทำควบคู่ไปด้วย การศึกษานี้จะทำให้ทราบว่าโมเลกุล ที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี WK-C5 มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร และมีโมเลกุลชนิดใดบ้างที่จับอยู่กับโมเลกุลนี้ซึ่งจะถูก co-precipitate ออกมาด้วย

2.6 การเตรียมแบคทีเรียเรืองแสง

เตรียมแบคที่เรียที่มีการผลิตโปรตีนเรืองแสง GFP โดยการตัดต่อยีนกำหนดการสร้างโปรตีน GFP จาก pEGFP-N1 vector โดยใช้การตัดด้วยเอนไซม์ NotI และ BamHI นำเข้าสู่ expression vector ชื่อ pQE-Tri vector โดยเอนไซม์ Quick ligase จาก New England Biolabs (NEB) จากนั้นทำหาร transform pQE-Tri vector ที่มียีนกำหนดการสร้างโปรตีน GFP เข้าสู่ *E. coli* DH-5α competent cells เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มีการเติมสาร penicillin เข้มข้น 0.01 μM เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C ก่อนนำแบคทีเรียมาใช้งานทำการฆ่าแบคทีเรีย โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เวลา 30 นาที วิเคราะห์การเรืองฟลูออเรสเซ็นต์แสงของแบคทีเรียที่เตรียมได้ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ โดยใช้แบคทีเรียดั้งเดิมเป็น negative control

2.7 การศึกษา Phagocytosis โดยวิธีโฟลไซโตเมทรี

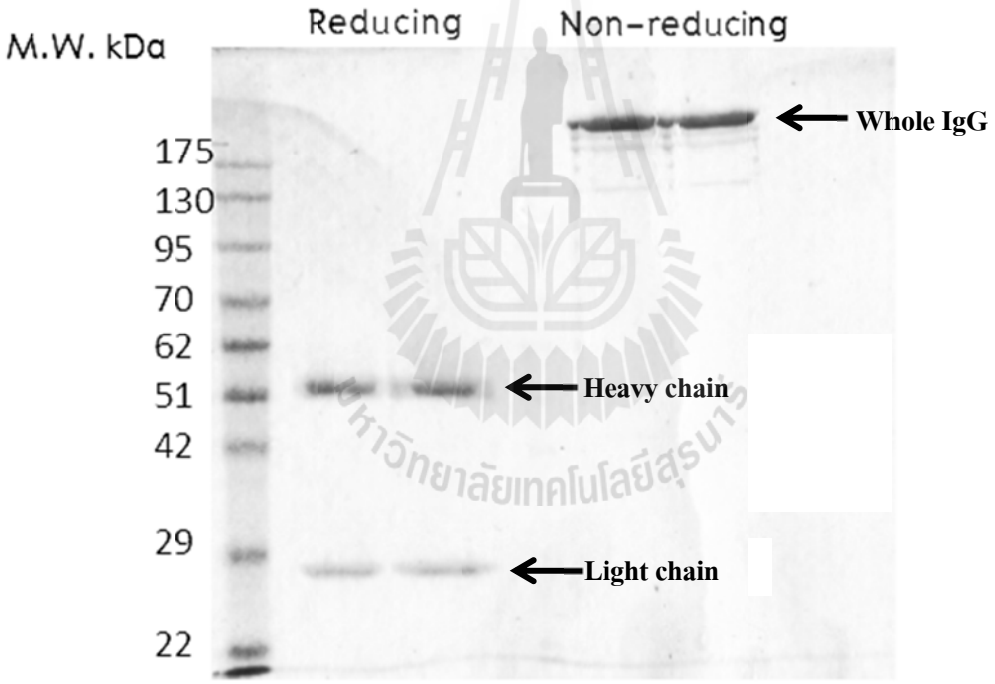
ผสมเลือดที่มี EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาตร 100 μl กับแบคทีเรียเรืองแสงที่เตรียมใน 2.6 ปริมาตร 100 μl (ผ่านการเจือจาง 1:300 จากแบคทีเรียที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm =0.5) ในภาวะที่ไม่มีหรือมีแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 μg/ml นำหลอดทดลองไปบ่มที่ 0°C และ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแตกเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยการเติม RBC lysing solution (สารละลาย PBS pH7.2 ที่มี 4.5% formaldehyde และ 10% diethylene glycol) ปริมาตร 50 μl และบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาทีก่อนเติมน้ำปริมาตร 100 μl

ปั่นแยกเก็บเม็ดเลือดขาวที่ความเร็ว 14,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างเซลล์ที่ได้ 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย PBS pH 7.2 เติมสารละลาย PBS ที่มี 1% paraformaldehyde เป็นส่วนประกอบ วิเคราะห์การเกิด phagocytosis โดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 ให้ได้ปริมาณมาก

ผู้วิจัยได้ทำการผลิตแอนติบอดี WK-C5 ให้ได้ปริมาณมากโดยการเลี้ยง WK-C5 hybridoma cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่ม (serum free medium) จากนั้นปั่นแยนำเอาส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี WK-C5 อยู่มาแยกบริสุทธิ์โดยวิธี Protein G sepharose beads affinity chromatography ซึ่งสามารถเตรียมแอนติบอดี WK-C5 ที่บริสุทธิ์ได้ทั้งหมดประมาณ 6 มิลลิกรัม ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่ผลิตได้ตรวจสอบโดยการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ในสภาวะ reduce และ non reduce และตรวจหาแถบโปรตีนโดยการย้อด้วยสีย้อม Coommassie Brillant Blue



รูปที่ 1 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 หลังการแยกบริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography โดยการแยกด้วย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reducing และภาวะ non reducing และทำการย้อมสีโปรตีนด้วย Coommassie Brillant blue

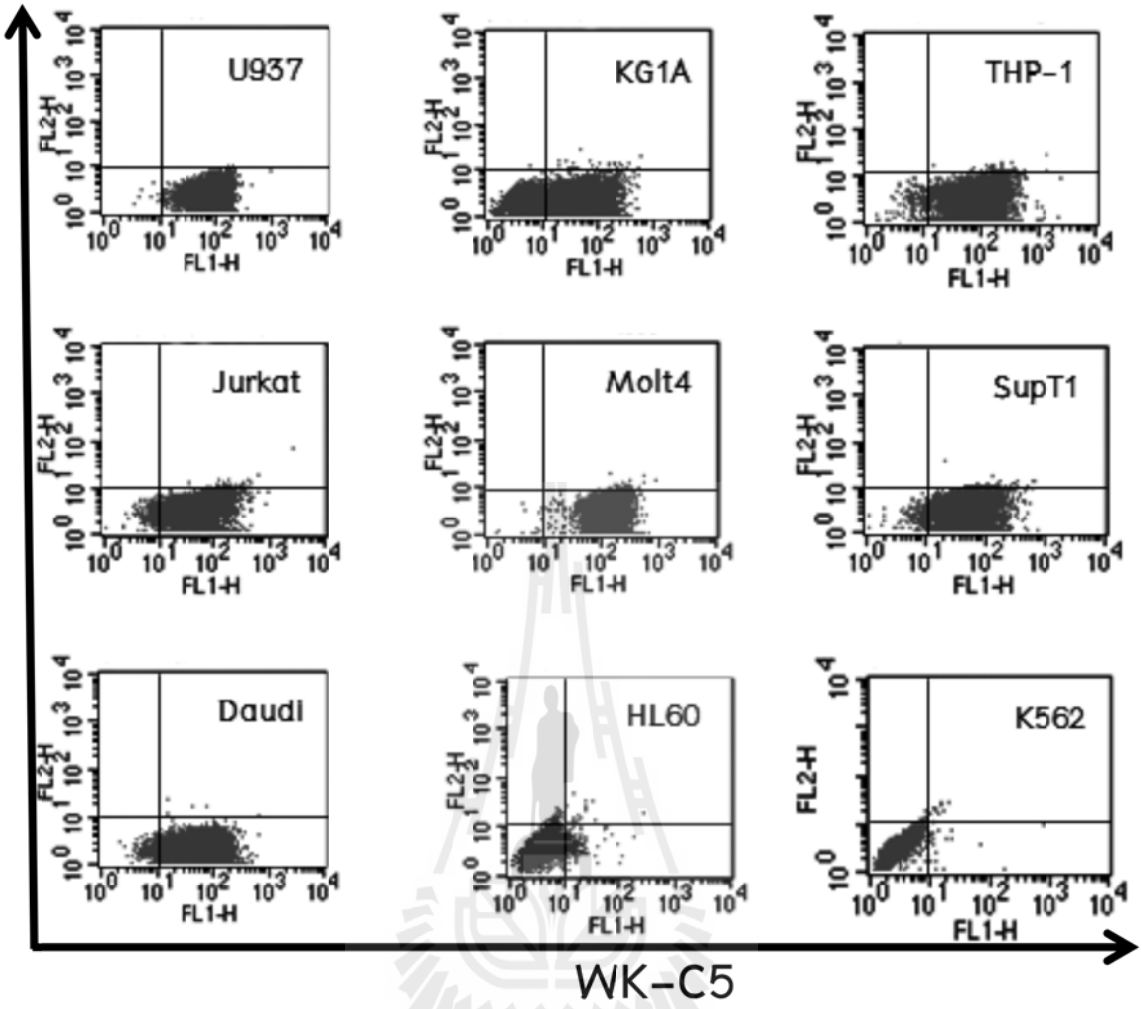
จากผลการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 1 พบว่า ในสภาวะ reducing จะพบแถบโปรตีน 2 แถบที่ขนาดประมาณ 25 kDa และ 55 kDa ซึ่งเป็นสายของ light chain และ heavy chain ของแอนติบอดีตามลำดับ ในสภาวะ non reducing พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่ด้านบนของแผ่นเจลซึ่งเป็นแอนติบอดีทั้งโมเลกุล ผลดังกล่าวแสดงว่า แอนติบอดี WK-C5 ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาหาการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ศึกษาหน้าที่และคุณลักษณะของโมเลกุลที่ดังกล่าวต่อไป

3.2 การแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ

จากการทดลองโดยการย้อมโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วยแอนติบอดี WK-C5 ที่เตรียมได้ ด้วยวิธี indirect immunoflurescence staining ผู้วิจัยนำ human cell lines 9 ชนิด คือ Jurkat, Sup-T, Molt4 จัดเป็น human T cell line ส่วน U937, THP-1, KG1a เป็น monocytic cell line และ Daudi เป็น B cell line เซลล์ K562 เป็น erythroid cell line และ HL60 ซึ่งเป็น human promyeloid cell line มาศึกษา พบว่ามีการแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวเซลล์ของเซลล์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ยกเว้น HL60 และ K562 ดังแสดงในรูปที่ 2

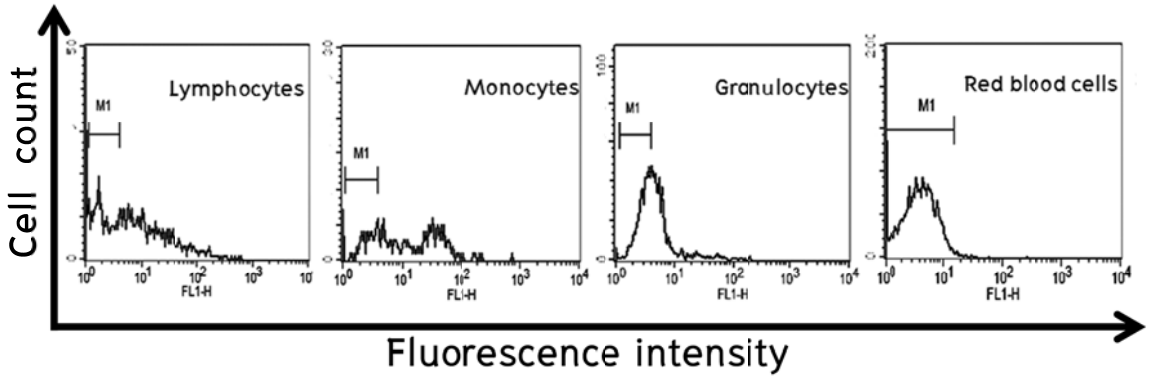
นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลชนิดนี้บนกลุ่มของ peripheral blood cells ได้แก่ lymphocytes, monocytes, granulocytes และ red blood cells ผลการทดลองพบว่า มีการแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวของเม็ดเลือดขาวบางกลุ่มของ lymphocytes และ monocytes แต่ไม่พบบนผิวของ granulocytes และเม็ดเลือดแดง ดังแสดงในรูปที่ 3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 2 การแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวของ human hematopoietic cell lines

FACS profiles การแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวของ human monocytic cell line (U937, THP-1, KG1a) T cell lines (Jurkat, Molt4 และ SupT1) B cell line (Daudi) promyeloid cell line (HL60) และ erythroid cell line (K562) โดยการติดตามด้วย FITC-conjugated sheep $F(ab')_2$ anti-mouse immunoglobulin antibodies และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยแกน X แสดงค่า fluorescence intensity ของเซลล์ที่มีการย้อมติดด้วยแอนติบอดี WK-C5 สวนแกน Y แสดงค่า fluorescence intensity ของสีแดงใช้สำหรับปรับค่า compensation ของการวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตมิเตอร์ ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=3)



รูปที่ 3 การแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวของ peripheral blood cells

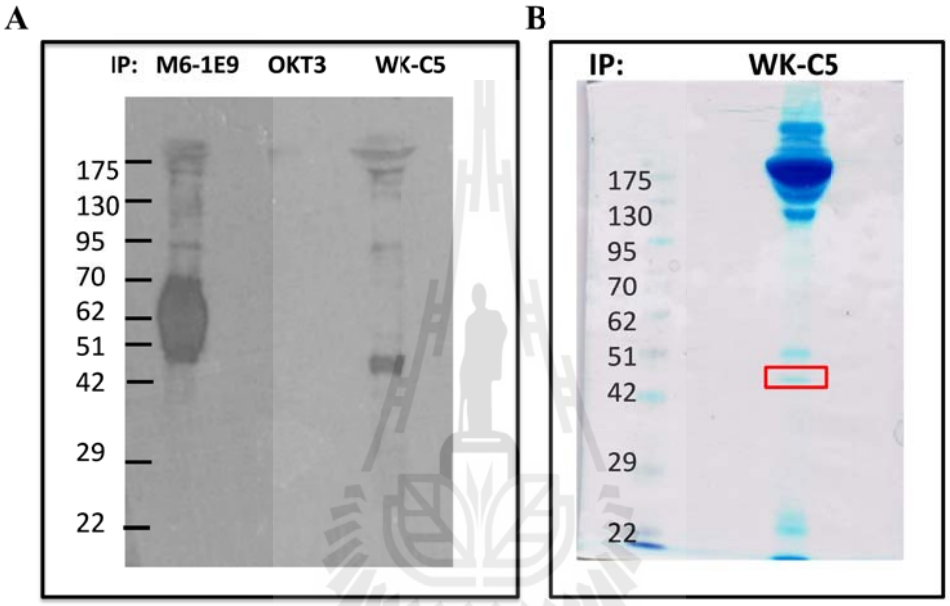
FACS profiles การแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวของ peripheral blood cells โดย M1 แสดงตำแหน่งของ isotype matched control monoclonal antibody เส้นหนาแสดงการแสดงออกของโมเลกุล WK-C5 บนผิวของเซลล์แต่ละชนิดโดยการติดตามด้วย FITC-conjugated sheep $F(ab')_2$ anti-mouse immunoglobulin antibodies และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer แกน X แสดงค่า fluorescence intensity ของเซลล์ที่มีการย้อมติดด้วยแอนติบอดี WK-C5 ส่วนแกน Y แสดงจำนวนเซลล์ และ M1 เป็น ช่วงของ negative control ที่เซลล์ไม่มีการย้อมติดสี Fluorscence ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=3)

3.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุล WK-C5

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลนี้ เริ่มจากการทำ Western blotting โดยการเตรียม cell lysates จากเซลล์ U937 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกโมเลกุลที่จำเพาะกับแอนติบอดี WK-C5 บนผิวเซลล์ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าแอนติบอดี WK-C5 ไม่สามารถจับได้กับโปรตีนบนแผ่น membrane ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าแอนติบอดีชนิดนี้อาจจับกับโปรตีนจำเพาะที่บริเวณ conformational epitope จึงไม่สามารถตรวจวัดแถบโปรตีนได้โดยวิธี Western blot ซึ่งเป็นวิธีที่แอนติบอดีจะต้องจับกับโปรตีนที่อยู่ในรูปของ linear epitope ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์หาขนาดของโมเลกุล WK-C5 โดยใช้วิธีการติดฉลากโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วย biotin ก่อนการเตรียม cell lysates และตามด้วยการแยกโปรตีนที่จำเพาะต่อแอนติบอดี WK-C5 ด้วยวิธี immunoprecipitation แยกโปรตีนที่ได้ด้วย SDS-PAGE ในภาวะ non reducing ถ่ายโปรตีนลงบนแผ่น PVDF membrane และวิเคราะห์หาแถบโปรตีนด้วย HRP conjugated-streptavidin และ chemiluminescence detection system

จากการทดลองทำให้ทราบว่าโมเลกุลที่ถูกจับได้โดยแอนติบอดี WK-C5 มีขนาดประมาณ 45 kDa ดังแสดงในรูปที่ 4 (A) ซึ่งมีขนาดเท่ากับในกรณีของการแยกโปรตีนในสภาวะ reducing (ไม่ได้แสดงผล) โดย มี CD147 mAb (M6-1E9) ซึ่งจำเพาะกับโปรตีน CD147 ที่มีขนาด ประมาณ 45-55

kDa เป็น positive control และ CD3 mAb (OKT3) ซึ่งมี isotype เป็น IgG1 เช่นเดียวกับ WK-C5 เป็น isotype control และเพื่อที่จะหาคุณลักษณะของโมเลกุลดังกล่าวว่าเป็นโมเลกุลอะไร ผู้วิจัยได้ทำ immunoprecipitation โดยใช้ cell lysates ของ U937 ที่ไม่ได้ติดฉลากโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วยสารไบโอติน แยกวิเคราะห์โปรตีนที่ได้ด้วย 10% SDS-PAGE ในภาวะ non reducing ย้อมด้วย Coomassie Brilliant blue พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 45 kDa ดังแสดงในรูปที่ 4 (B) ที่มีขนาดสอดคล้องกับผลกาทดลองจาก รูปที่ 4 (A) ถูกตัดส่งไปวิเคราะห์หาลำดับของกรดอะมิโนโดยวิธี LC/MS เพื่อตรวจสอบว่าเป็นโมเลกุลอะไร และอยู่ระหว่างรอผลการวิเคราะห์ตัวอย่างนี้



รูปที่ 4 แสดงขนาดของโมเลกุล WK-C5

Immunoprecipitation แสดงขนาดของโปรตีนที่ถูกจับได้โดยแอนติบอดี WK-C5 โดยการแยกด้วย 10% SDS-PAGE ในภาวะ non reducing (A) โมเลกุล WK-C5 ที่แยกได้จาก cell surface biotinylated human monocytic cell (U937) โดยวิธี immunoprecipitation และวิเคราะห์แถบโปรตีนโดย Western blotting โดยใช้ HRP conjugated streptavidin (B) SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนของโมเลกุล WK-C5 จาก cell lysates ของเซลล์ U937 ในภาวะ non reducing ที่ไม่ผ่านการติดฉลากด้วยสารไบโอติน ผลการทดลองนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน **(n=3)**

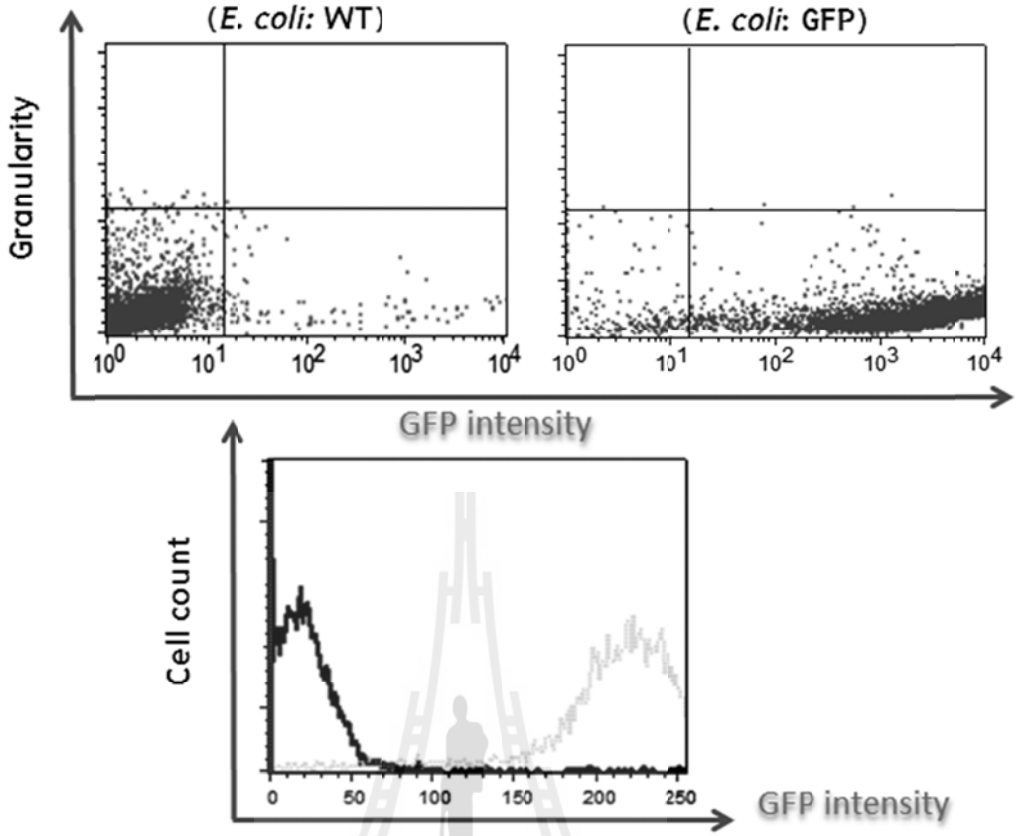
นอกจากนี้ผู้วิจัยได้พยายามทำการแยกยีนส์ที่กำหนดการสร้างโมเลกุล WK-C5 โดยวิธี retroviral expression system เพื่อดูว่าโมเลกุล WK-C5 นั้นจริงๆ คือโมเลกุลอะไร และมีองค์ประกอบที่เป็นกรดอะมิโนกี่ตัว แต่เนื่องจากผู้วิจัยพบปัญหาคือหลังจากทำการ infect host cell ด้วยไวรัสที่คาดว่าจะมียีนส์ที่กำหนดการสร้างโมเลกุล WK-C5 อยู่ด้วยนั้นอยู่หลายครั้ง ผู้วิจัยไม่สามารถแยกหรือพบ

เซลล์ที่มีการแสดงออกของ โมเลกุล WK-C5 เลย ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก ประการแรก cDNA library ที่ได้มาไม่มียีนส์ที่กำหนดการสร้างโมเลกุล WK-C5 เนื่องจากหายไปช่วงที่มีการเตรียม หรือประการที่สอง packaging cells ไม่ผลิตไวรัสหรือ ประการสุดท้ายเซลล์ผลิตไวรัสแต่ไม่มากพอหรือไม่เหมาะสมที่จะ infect host cell ได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลอง โดยพยายามแยกโมเลกุล WK-C5 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี immunoprecipitation และนำโปรตีนดังกล่าวไปทำการจำแนกชนิดของโปรตีนโดยวิธี LC-MS ซึ่งผลจากการวิเคราะห์จาก LC-MS คาดว่าจะสามารถทราบแน่ชัดว่าเป็นโมเลกุลอะไร ซึ่งจะทำให้ง่ายต่อการศึกษาหน้าที่และบทบาทของโมเลกุลนี้ต่อการทำงานของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดนี้ และน่าจะได้ผลเพียงพอที่จะนำเสนอผลงานในรูปแบบตีพิมพ์ได้

3.4 การศึกษาผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 ต่อการกินแบคทีเรียของเซลล์ granulocytes แบบ phagocytosis

Phagocytosis ถือเป็นกระบวนการสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันโดยถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ innate immunity เมื่อมีแบคทีเรียหรือแอนติเจนแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย phagocytic cells ซึ่งได้แก่เซลล์ในกลุ่มของ granulocytes และ macrophages จะเข้ามาทำหน้าที่จับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้ เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี WK-C5 มีความจำเพาะกับโมเลกุลบนผิวเซลล์ monocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงตังเองไปเป็น macrophage เมื่อถูกกระตุ้น และทำหน้าที่จับกินและทำลายแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาว่า หากนำแอนติบอดีชนิดนี้ผสมลงไปกับเซลล์เม็ดเลือด และตรวจดูผลของการเกิด phagocytosis ว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร โดยใช้แบคทีเรียเรืองแสงเป็นเป็นตัวติดตามการเกิด phagocytosis และวิเคราะห์โดยวิธีโฟลไซโตเมทรี (Singboottra, Pata et al. 2010)

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้เตรียมแบคทีเรีย *E.* coli (DH5α) ที่มีการใส่ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน GFP เข้าไปทำให้แบคทีเรียมีลักษณะเรืองแสงโดยสามารถตรวจสอบได้ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 5 เป็น FACS profile ที่แสดงค่าการเรืองแสงของแบคทีเรียที่มีการแสดงออกของโปรตีน GFP เทียบกับแบคทีเรียดั้งเดิมที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน GFP ผลการทดลองพบว่าผู้วิจัยสามารถเตรียมแบคทีเรียเรืองแสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่สามารถใช้ติดตามการเกิด phagocytosis ได้



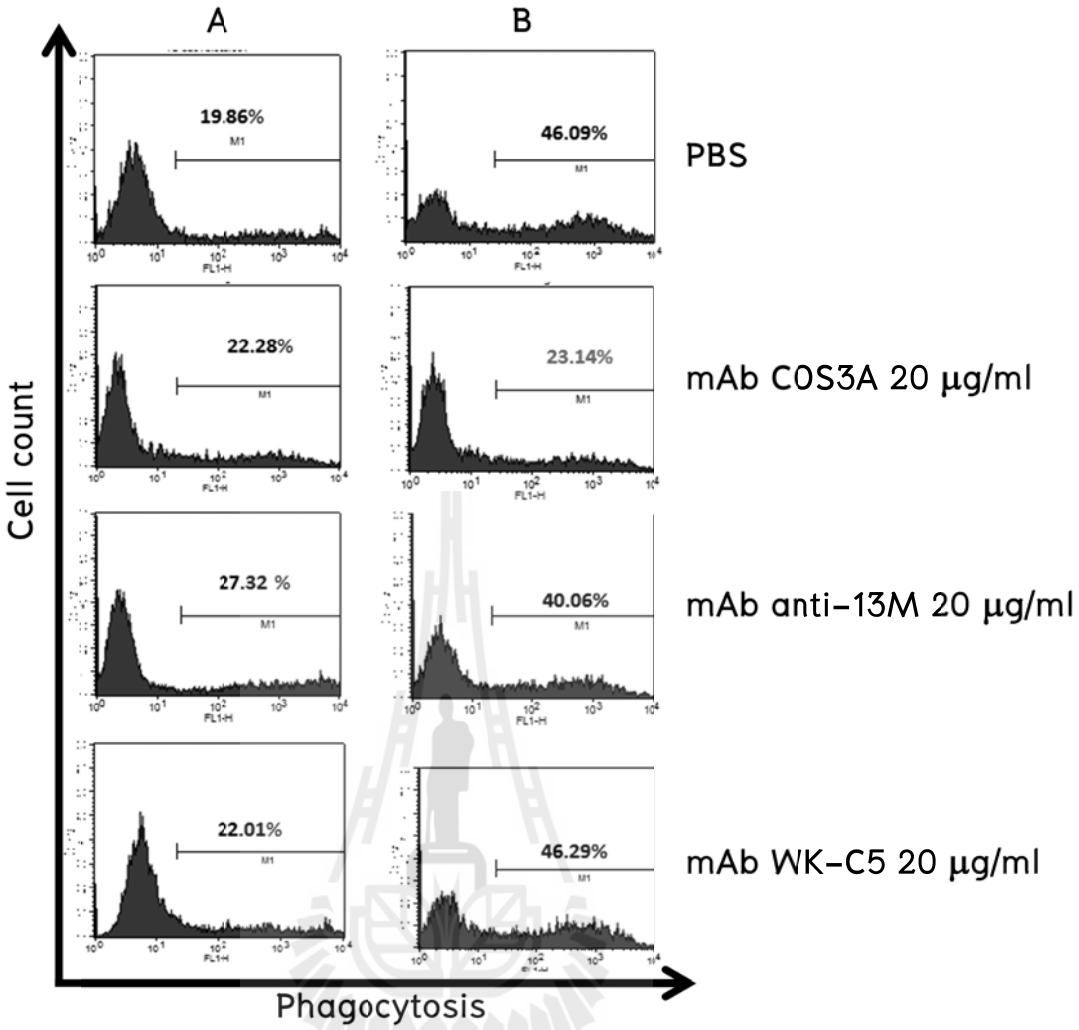
รูปที่ 5 กราฟแสดงการเรืองแสงของแบคทีเรีย

FACS profile แสดงค่าการเรืองแสงของแบคทีเรีย *E.* Coli DH5α ที่ผลิตโปรตีนGFP (*E.* Coli: GFP) เทียบกับเซลล์ดั้งเดิม (*E.* Coli: WT) โดยแกน X แสดงค่า fluorescence intensity แกน Y แสดงจำนวนเซลล์

ในการศึกษาผลของแอนติบอดี WK-C5 ต่อการกินแบคทีเรียแบบ phagocytosis นั้น จะทำการฆ่าเซลล์แบคทีเรียที่มีการสร้างโปรตีน GFP ด้วยความร้อน 60°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการทดลองดังกล่าวในหัวข้อ 2.7 เมื่อเซลล์มีการกินแบคทีเรียเข้าไปเซลล์นั้นก็จะเรืองแสงและสามารถติดตามได้โดยวัดค่าการเรืองแสงของเซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ โดยการทดลองจะวิเคราะห์ที่ 2 อุณหภูมิ คือ ที่ 0°C และ 37°C โดยที่ 0°C จะใช้เป็นค่าเปรียบเทียบในภาวะที่กระบวนการต่างๆ ของเซลล์เกิดได้น้อยเนื่องจากอุณหภูมิไม่เหมาะสม และที่ 37°C เป็นภาวะปกติของเซลล์ที่เกิด phagocytosis ทำให้เซลล์มีการกินแบคทีเรียเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาวิเคราะห์ ในการศึกษาผลของ WK-C5 ต่อการเกิด phagocytosis ของเซลล์ monocytes จะมีการเติมเติมแอนติบอดีชนิดต่างๆ เข้าไปเพื่อให้แอนติบอดีเหล่านี้ไปจับกับโมเลกุลที่จำเพาะบนเซลล์ชนิดต่างๆ ในเลือดและสังเกตการเปลี่ยนแปลงในการกินเซลล์แบคทีเรียของ monocytes

ผลการทดลองในรูปที่ 6 ทำการผสมแบคทีเรียเรืองแสงร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดและนำเซลล์ในกลุ่มของ granulocytes มาวิเคราะห์ดูค่าการเรืองแสงของเซลล์ในภาวะที่ไม่มีการเติมแอนติบอดีใดๆ (รูปที่ 6 A) พบว่าที่ 37°C พบกลุ่มเซลล์เรืองแสงซึ่งหมายถึงเซลล์ที่กินแบคทีเรียเข้าไปประมาณ 46% ในขณะที่ทำการทดลองที่ 0°C พบเซลล์เรืองแสงประมาณ 20% ซึ่งคาดว่าเนื่องจากเป็นค่าการเรืองแสงที่เกิดจากการที่แบคทีเรียที่เกาะอยู่บนผิวเซลล์ ไม่ได้เกิดจากการกินจริง ทั้งนี้พบในปริมาณที่เท่าๆ กัน เมื่อมีการเติมแอนติบอดีชนิดต่างๆ ลงไป ดังนั้นแอนติบอดี WK-C5 ไม่มีผลต่อการกินเซลล์แบคทีเรียแบบ phagocytosis (รูปที่ 6 D) เมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่มีการเติมแอนติบอดี และ แอนติบอดีควบคุม anti-13M (รูปที่ 6 C) คือมีค่าการกินอยู่ที่ประมาณ 40% เท่าๆ กัน ในขณะที่แอนติบอดี COS3A ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จับกับโมเลกุลบนผิวเซลล์ monocytes มีผลลดการกินเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะเห็นได้จากปริมาณของเซลล์ที่มีการเรืองแสงที่ค่าประมาณ 23 % และมีค่าเท่าๆ กับที่การทดลองที่ 0°C คือ 22% จากการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่าแอนติบอดี WK-C5 ไม่มีผลต่อการกินแบคทีเรียของ monoocyte โดยวิธี phagocytosis ดังนั้นโมเลกุลที่ถูกจดจำด้วยแอนติบอดีนี้ไม่น่าจะมีบทบาทในการกินเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 6 ผลของแอนติบอดีWK-C5 ต่อกระบวนการ phagocytosis

FACS profile แสดงการเกิด Phagocytosis granulocytes ที่อุณหภูมิ 0°C และ 37°C ของเซลล์ ในภาวะที่ A)ไม่มีแอนติบอดี B) มีแอนติบอดี COS3A 20 µg/ml C) แอนติบอดี anti-13M 20 µg/ml และ D) แอนติบอดี WK-C5 20 µg/ml

บทที่4
บทสรุป

จากผลการวิจัยทั้งหมดเกี่ยวกับการศึกษาคุณลักษณะและหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะกับแอนติบอดี WK-C5 ซึ่งผู้วิจัยเรียกว่าโมเลกุล WK-C5 สามารถสรุปได้ดังนี้

1. โมเลกุล WK-C5 มีการแสดงออกบนผิวของ human T cell lines (SupT1, Molt4tic และ Jurkat) human B cell line(Daudi) human monocytic cell line (U937, KG1a และTHP-1) แต่ไม่พบบนผิวเซลล์ของ K562 (human erythroid cell line) และ HL60 (human promyeloid cell line)
2. โมเลกุล WK-C5 มีการแสดงออกบนผิวของ lymphocytes monocytes แต่ไม่พบบนผิวของเซลล์ granulocytes และเม็ดเลือดแดง
3. จากการทดลองโดยการทำ immunoprecipitation พบว่าโมเลกุล WK-C5 เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 45 kDa ภายใต้ภาวะ non-reducing และ reducing ซึ่งแอนติบอดี WK-C5 สามารถจับได้กับ conformational epitope ของโมเลกุลนี้
4. ผลการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุล WK-C5 ต่อการกินแบคทีเรียของเซลล์ granulocytes แบบ phagocytosis พบว่า WK-C5 ไม่มีบทบาทต่อการกินแบคทีเรียของเซลล์

จากการทดลองนี้เป็นการทดลองที่ยังไม่สามารถทราบข้อมูลทั้งหมดของโมเลกุล WK-C5 เนื่องจากการทำงานเกี่ยวกับเซลล์มีความซับซ้อน และค่อนข้างยุ่งยาก และด้วยข้อจำกัดของระยะเวลาในการศึกษาวิจัยภายใน 1 ปีทำให้ไม่สามารถศึกษาการทำงานของโมเลกุล WK-C5 ได้ครบถ้วนและเพียงพอสำหรับการตีพิมพ์ในวารสารที่มีค่าดัชนี แต่กลุ่มผู้วิจัยได้นำข้อมูลบางส่วน ร่วมกับการศึกษาโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นเข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมระดับนานาชาติแบบโปสเตอร์ 2 ครั้งดังนี้

1. 5th Congress of the Federal of immunological Societies of Asia Oceania (FIMSA), March 14-17th, 2012. New Dheli, India.
2. 13th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, November 25-29th, 2012. Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Bangkok, Thailand

สำเนาบทคัดย่อแสดงในภาคผนวก

บรรณานุกรม

A. Neil Barclay, Marion H. Brown, et al. (1997). The Leukocyte Antigen: Facts book. New York, Academic Press

Abbas AK and L. AH (2006). Basic Immunology: Functions and Disorders of immune system. Philadelphia, Saunders.

Abbas AK, Lichtman AH, et al. (2000). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, Saunders.

Biegler, B. and W. Kasinrerk (2012). "Reduction of CD147 surface expression on primary T cells leads to enhanced cell proliferation." Asian Pac J Allergy Immunol 30(4): 259-267.

Chiampanichayakul, S., P. Khunkaewla, et al. (2006). "Na, K ATPase beta3 subunit (CD298): association with alpha subunit and expression on peripheral blood cells." Tissue Antigens 68(6): 509-517.

Chiampanichayakul, S., P. Peng-in, et al. (2006). "CD147 contains different bioactive epitopes involving the regulation of cell adhesion and lymphocyte activation." Immunobiology 211(3): 167-178.

Chiampanichayakul, S., A. Szekeres, et al. (2002). "Engagement of Na,K-ATPase beta3 subunit by a specific mAb suppresses T and B lymphocyte activation." Int Immunol 14(12): 1407-1414.

HLDA_Workshop. (2013). 2013, from http://www.hcdm.org/.

Huston, D. P. (1997). "The biology of the immune system." JAMA 278(22): 1804-1814.

Intasai, N., S. Mai, et al. (2006). "Binding of multivalent CD147 phage induces apoptosis of U937 cells." Int Immunol 18(7): 1159-1169.

Intasai, N., K. Tragoolpua, et al. (2009). "Potent inhibition of OKT3-induced T cell proliferation and suppression of CD147 cell surface expression in HeLa cells by scFv-M6-1B9." Immunobiology.

Janeway CA, Pual T, et al. (2001). Immunobiology. New York, Garland Publishing.

Kasinrerk, W., N. Tokrasinwit, et al. (2000). "CD99 monoclonal antibody induce homotypic adhesion of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathway." Immunol Lett 71(1): 33-41.

Khunkaewla, P., S. Chiampanichayakul, et al. (2007). "Production, characterization, and functional analysis of newly established CD99 monoclonal antibodies MT99/1 and MT99/2." Hybridoma (Larchmt) 26(4): 241-250.

Khunkeawla, P., S. Moonsom, et al. (2001). "Engagement of CD147 molecule-induced cell aggregation through the activation of protein kinases and reorganization of the cytoskeleton." Immunobiology 203(4): 659-669.

Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature 256(5517): 495-497.

Parkin, J. and B. Cohen (2001). "An overview of the immune system." Lancet 357(9270): 1777-1789.

Singboottra, P., S. Pata, et al. (2010). "Method for analysis of surface molecule alteration upon phagocytosis by flow cytometry." Asian Pac J Allergy Immunol 28(2-3): 170-176.

Smith, C. W. (2008). "Adhesion molecules and receptors." J Allergy Clin Immunol 121(2 Suppl): S375-379; quiz S414.

Zola, H., B. Swart, et al. (2005). "CD molecules 2005: human cell differentiation molecules." Blood 106(9): 3123-3126.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

P-149

Cellular Expression and Biochemical Identification of Leukocyte Surface Molecule Recognized by Newly Generated Monoclonal Antibody COS3A

Abs-400

Siriwan Wansook *, Supansa Pata *, Kodchakorn Mahasongkram **, Watchara Kasinrerk **, ***, Panida Khunkaewla***

* Institute of Science, Suranaree University of Technology, Thailand
**Division of Clinical Immunology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Thailand.
***Biomedical Technology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency at the Faculty of Associated Medical Sciences, Thailand.

Leukocytes are cells, which play a major role in the immune system. It has been long time demonstrated that leukocytes surface molecules take responsible for cell-cell interaction and communication. Present study, the hybridoma technique was performed and several monoclonal antibodies to leukocytes surface molecules were generated. Among those generated clones, a monoclonal antibody (mAb) named COS3A was of interested. Indirect immunofluorescent staining and flow cytometry analysis showed that the mAb recognizes a molecule expressed on surface of tested hematopoietic cell lines, B cells, monocytes, natural killer cells (NK), and some of T cells but not red blood cells. Remarkably, high expression of this molecule was induced upon T cell activation. Biochemical characterization of this molecule was determined by Western blotting. The results indicated that the mAb COS3A recognizes protein bands with molecular weight of about 35-70 kDa while using cells lysates of myeloid cell line (U937). In addition, N-glycosidase F treatment reduced the size of this molecule to 20 kDa, suggesting that it is a high N-glycosylated glycoprotein. Proliferation assay revealed that the mAb can suppress CD3-mediated T cell proliferation while using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as target cells. Interestingly, the inhibitory effect was diminished while monocytes and NK cells were depleted. No suppression effect had been observed while only T cells were used. These preliminary results spot out an important role of the COS3A recognizing molecule on cell-mediated immune responses. Further investigations of its functional role, molecular cloning, and biochemical identification of this antigen are underway.

P-150

Study of Humoral Response Generated in BALB/c MICE of Different Variants of *Caf1* Gene of *Yersinia Pestis* Based Plasmid DNA Vaccine

Abs-401

Gautam Vandana, Kumar Subodh

Defence Research and Development Establishment, Gwalior (M.P.) INDIA
vandanagautam@gmail.com

Plague, caused by *Yersinia pestis* is one of the most feared diseases, mankind has ever encountered. Despite lots of global efforts, no plague is available for use. In the present work, objective was to study the humoral response of various vaccine constructs based on capsular F1 gene of *Y. pestis*. Various pDNA vaccine constructs were prepared by PCR using specific primers. These constructs were categorized in two types, one with natural gene sequence denoted as *SN4* and another with mammalian codon optimized sequence as *SN1*. Three variants of each category *SN4/SN1* were generated with difference in their signal peptide and named as *SN4/SN1, SN4/SN1op* and *SN4/SN1wop* i.e., gene with tpa leader sequence, with natural leader peptide and without leader peptide respectively. These sequences were cloned in pDNA vaccine vector and immunized to animals. IgG titers were measured in sera collected at different time points of immunized mice. IgG subtyping was also carried out with highest responding sera sample. Results were showing that *SN1wop*, codon optimized vaccine construct without leader peptide was showing highest IgG titer. Results of present study show that codon optimization of sequences may be useful for generating better humoral response to plague pDNA vaccines.

regulates the expression of cardiac ion channels. Indeed, Id2 also significantly decreased the expression and activity of cardiac L- and T-type voltage-gated calcium channels. On the other hand, when Id2 expression was reduced by siRNA, we observed an increased expression and activity of cardiac calcium channels. We next examined the role of Id2 upon addition of steroids known to induce cardiac hypertrophy and arrhythmia, aldosterone and corticosterone. Interestingly, Id2 expression prevented the steroid-dependent increase of cardiac calcium channels expression and activity. Concomitantly, Id2 expression prevented the steroid-dependent increase of the action potential frequency in cardiomyocytes. In conclusion, our results show that Id2 regulates the expression cardiac calcium channels and prevents the pathological increase in cardiac calcium channel expression. Thus Id2 could function as a protective factor for the heart and might participate in the prevention of cardiac diseases.

P-C-08 COS3A, A HIGH N-GLYCOSYLATED LEUKOCYTE SURFACE MOLECULE PLAYS A ROLE ON T CELL ACTIVATION

Wansook S [1], Pata S[2], Mahasongkram K[2], Kasinrerk W[2], Khunkaewla P[1]

[1]Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand
[2]Division of Clinical Immunology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Email address: wsiriwan244@gmail.com

Leukocytes are cells that play a major role in the immune system. These surface molecules were used for cell-cell interaction and communication. Some of them have been identified; still some of them are waiting to be identified. This study, a newly generated monoclonal antibody (mAb) named COS3A was selected for biochemical and functional identification of its recognizing molecule (COS3A molecule). Expression study showed that this molecule is expressed on surface of B cells, monocytes, natural killer cells, and some of T cells but not red blood cells. Remarkably, high expression of this molecule was induced upon T cell activation. Suppression of CD3-mediated T cell proliferation has been observed in the present of the mAb COS3A. The suppression effect was corresponding to inhibition of IL-2, IL-4 production and enhancement of IL-10 production. Immunoprecipitation and Western blotting of this molecule from myeloid (U937) cell lysates indicated that COS3A molecule has molecular weight of about 30-70 kDa. Furthermore, N-glycosidase F treatment reduced its size to 20 kDa, demonstrating as a high N-glycosylated glycoprotein. Similar results were endorsed by pretreatment of the cells with tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation, before cell lysates preparation. In conclusion, COS3A molecule is a high N-glycosylated glycoprotein, which might play an important role in T cells responses. Further investigations on its immunological function are underway.

Keywords: monoclonal antibody, COS3A molecule, leukocyte surface molecule, T cell activation, *N*-glycosylation

P-C-09 EYESTALK ABLATION AFFECTED LEVELS OF METHYL FARNESOATE IN GIANT FRESHWATER PRAWN

Phromchaloem C[1], Tobe SS[2], Pewnim T[3]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Muban Chombueng Rajabhat University, Ratchaburi, Thailand
[2]Department of Cell and Systems Biology, University of Toronto, Toronto, Canada
[3]Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand

Email address: chanya.phromchaloem@gmail.com

The effect of X-organ sinus gland removal by eyestalk ablation on ovarian maturation as well as methyl farnesoate (MF) production were investigated in female giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. MF in the hemolymph was extracted and quantified by HPLC and its identity confirmed by mass spectrometry showing predominant peaks at m/z of 207, 121, 114 and 69. The eyestalk-ablated prawns showed significantly increased levels of MF, determined at 7 days post-ablation, as compared to intact control prawns. The MF levels were 13.40 ± 2.14 and 6.06 ± 1.67 *nmol/mL* (*mean ± SEM*), respectively ($p < 0.01$). Ovarian development was

C

ประวัติผู้วิจัย

ดร. พนิดา ขันแก้วหล้า เกิดเมื่อวันที่ 15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2518 จบการศึกษาระดับปริญญาวิทยศาสตรบัณฑิต (วท. บ.) สาขาชีวเคมี และชีวเคมีเทคโนโลยี ในปี 2540 จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท. ม.) สาขาชีวเคมี ในปี 2543 จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และระดับปริญญาวิทยศาสตรดุษฎีบัณฑิต (Dr. Scient. Med.) สาขาภูมิคุ้มกันวิทยาในปี 2548 จาก Medical University of Vienna ประเทศสาธารณรัฐออสเตรีย โดยมีความสนใจและเชี่ยวชาญเกี่ยวกับการศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีและหน้าที่ทางภูมิคุ้มกันวิทยาของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือด การผลิตแอนติบอดี และการนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ ปัจจุบันดำรงตำแหน่งเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 044-223968 โทรสาร 044-224648 อีเมล์ kpanida@sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี