



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนยีน การศึกษาคุณสมบัติชีวเคมีและหน้าที่ของ
leukocyte surface molecules ชนิดใหม่

วัชร กสิณฤกษ์

ธันวาคม 2546



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนยีน การศึกษาคุณสมบัติชีวเคมีและหน้าที่ของ
leukocyte surface molecules ชนิดใหม่

วัชระ กสิณฤกษ์

ธันวาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนยีน การศึกษาคุณสมบัติชีวเคมีและหน้าที่ของ
leukocyte surface molecules ชนิดใหม่

วัชระ กสิณฤกษ์

ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานพัฒนา ปี 2544 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณาจารย์และบุคลากร ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BRG44-8-0002

ชื่อโครงการ: การโคลนยีน การศึกษาคุณสมบัติชีวเคมีและหน้าที่ของ leukocyte surface molecules ชนิดใหม่

ชื่อนักวิจัย: รศ. ดร. วัชรระ กลินธุฤทธิ์

ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail address: watchara@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 มกราคม 2544 - 1 มกราคม 2547

เพื่อศึกษาหาโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดใหม่ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ T cells ใน การศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ทำการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนบนผิว Molt4 T cell line แล้วนำ แอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนจำเพาะ โดยใน โครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโปรตีนที่จำเพาะกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี 2 ชนิดคือ P-3E10 และ CA-1H4 molecule ได้ผลการศึกษาดังนี้

โมเลกุล P-3E10

โมเลกุล P-3E10 เป็น cell surface molecule ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 45-50 กิโลดาลตัน และ ประกอบด้วย intradisulfide bond. P-3E10 molecule พบได้บน hematopoietic และ non-hematopoietic cell lines ทุกชนิดที่นำมาศึกษา และยังสามารถพบได้บนเซลล์ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และ แกรนูโลไซต์ การกระตุ้นลิมโฟไซต์ ด้วย mitogen ไม่มีผลต่อการแสดงออกของโมเลกุล P-3E10 จาก การศึกษาน้ำหนักของโมเลกุล P-3E10 พบว่า P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี สามารถยับยั้งการแบ่งตัว ของ T และ B cells ที่ถูกกระตุ้นผ่าน antigen receptor และ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี ยัง สามารถยับยั้งการหลั่ง interferon- γ , IL-2, IL-4 และ IL-10 อีกด้วย แต่ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของ spontaneous hematopoietic cell lines และไม่มีผลต่อการ กระตุ้นการเกาะกลุ่มของเซลล์หรือการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis อีกทั้งยังไม่มีผลต่อกระบวนการ phagocytosis ของ phagocytes ผู้วิจัยได้นำ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี มาโคลน cDNA ที่ กำหนดการสร้างโมเลกุล P-3E10 และพบว่า โมเลกุล P-3E10 คือ Na⁺, K⁺-ATPase β 3 subunit จาก ผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่า P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโมเลกุลบนผิว เซลล์ชื่อ Na⁺, K⁺-ATPase β 3 subunit ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ เซลล์ลิมโฟไซต์ การศึกษานี้ทำให้เข้าใจถึงการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นและอาจ นำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางคลินิกได้

โมเลกุล CA-1H4

โมเลกุล CA-1H4 เป็น cell surface molecule ที่พบได้บน human T และ B cell lines แต่ไม่พบบน myeloid cell lines บน peripheral blood cells พบโมเลกุล CA-1H4 ได้เฉพาะบนบาง sub-population ของ lymphocytes โดยการแสดงของโมเลกุล CA-1H4 บนผิวเซลล์มีลักษณะเป็นแบบ heterogeneous pattern การกระตุ้น lymphocytes ด้วย PHA ทำให้การ express ของโมเลกุล CA-1H4 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันแรก และลดลงในวันต่อๆ ไป เมื่อศึกษาหน้าที่ของโมเลกุล CA-1H4 พบว่าไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ แต่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis จากข้อมูลที่ได้ ผู้วิจัยเชื่อว่าโมเลกุล CA-1H4 น่าจะเป็น leukocyte surface molecule ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน และนำทำการโคลนยีนที่กำหนดการสร้าง CA-1H4 molecule เพื่อทราบลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างที่แน่นอนต่อไป

คำหลัก: โปรตีนบนผิวเซลล์, โมโนโคลนอล แอนติบอดี, การควบคุมการทำงานของลิพิด, โพลีไซโตรเมตริ, Na^+, K^+ -ATPase $\beta 3$ subunit

Abstract

Project Code: BRG44-8-0002

Project Title: Molecular Cloning, Biochemical Characterization and Functional Analysis of
Novel Leukocyte Surface Molecules

Investigator: Associate Professor Dr. Watchara Kasinrerk

E-mail Address: watchara@chiangmai.ac.th

Project Period: 1 January 2001- 1 January 2003

In order to identify new leukocyte surface molecule involving the regulation of T cell responses. In this study, several monoclonal antibodies against surface molecules of Molt4 T cell line were generated. The generated monoclonal antibodies were then used as a tool to characterization and functional analysis the recognized molecules. In the present report, molecules recognized by 2 monoclonal antibodies, P-3E10 and CA-1H4 were studied. The results are as follows:

P-3E10 molecule

P-3E10 molecule is a cell surface molecule of 45-50 kDa which contains intradisulfide bond. It expresses on all hematopoietic and non-hematopoietic cell lines and also expresses on lymphocytes, monocytes and granulocytes. Activation of lymphocytes with PHA has no effect on the expression of P-3E10 molecule. Functional studies indicate that P-3E10 monoclonal antibody inhibited proliferation of T and B cells after antigen receptor activation. P-3E10 monoclonal antibody also inhibited interferon- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 production. However, the antibody had no effect on spontaneous hematopoietic cell line proliferation. It also has no effect on the induction of homotypic cell aggregation and apoptosis. The antibody has no effect on phagocytosis of phagocytes as well. By using P-3E10 monoclonal antibody to clone the cDNA encoding P-3E10 molecule, it was revealed that P-3E10 molecule is Na⁺, K⁺-ATPase β 3 subunit. Taken together our findings demonstrated that P-3E10 monoclonal antibody recognized a cell surface molecule, Na⁺, K⁺-ATPase β 3 subunit. This molecule involves in the regulation of lymphocyte responses. These findings lead to a better understanding of immune regulation, which may provide new avenues for clinical intervention.

CA-1H4 molecule

CA-1H4 molecule is a cell surface molecule expresses on human T and B cell lines, but not express on myeloid cell lines. On peripheral blood cells, it expresses on sub-populations of lymphocytes. The expression of CA-1H4 molecule on cell surface is as heterogeneous pattern. Activation of lymphocytes by PHA, the CA-1H4 molecule was up-regulated on day 1 and decreased in the later days. Functional studies indicated that CA-1H4

molecule did not involve in cell proliferation. However, CA-1H4 monoclonal antibody induced apoptosis. From our result, we believe that CA-1H4 is a new cell surface molecule. Molecular cloning of this molecule is needed to be carried out for obtaining of the amino acid sequences and the structure of CA-1H4 molecule.

Key Words: Cell surface molecule, Monoclonal antibody, Lymphocyte regulation, Flow cytometry, Na^+ , K^+ -ATPase $\beta 3$ subunit.

บทนำ

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบที่สำคัญมากในระบบหนึ่งของร่างกาย มีหน้าที่ต่อต้านและทำลายสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคต่างๆที่เข้าสู่ร่างกาย และยังมีบทบาทในการทำลายเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นในร่างกายอีกด้วย ระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วยเซลล์หลากหลายชนิดมาทำงานร่วมกัน จากการศึกษาวิจัยพบว่าเซลล์หลากหลายชนิดเหล่านี้ทำงานประสานกันได้อย่างมีประสิทธิภาพก็โดยอาศัยโมเลกุลบนผิวเซลล์¹⁻³ โมเลกุลบนผิวเซลล์เหล่านี้บางชนิดทำหน้าที่เป็น adhesion molecules ซึ่งทำให้เซลล์ต่างๆ มาติดต่อกันสื่อสารกันได้ด้วยขบวนการ cell-cell interaction¹⁻³ โมเลกุลบนผิวเซลล์บางชนิดทำหน้าที่เป็น receptor สำหรับ cytokines ชนิดต่างๆ¹⁻³ กลไก cell-cell interaction และ ligand-receptor interaction นี้ นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของเซลล์ (cell activation) การส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (signal transduction) และทำให้เกิดการทำงานประสานกันของเซลล์ชนิดต่างๆ (cell communication)¹⁻³

เซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญมากต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวประกอบด้วยโมเลกุลชนิดต่างๆ มากมายที่เรียกว่า leukocyte surface molecules^{1,4,5} ซึ่งโมเลกุลบนผิวเซลล์เหล่านี้มีความสำคัญมากต่อการทำงานที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว โมเลกุลเหล่านี้บางชนิดทำหน้าที่เป็นที่รับแอนติเจน บางชนิดทำหน้าที่เป็นที่รับ cytokines บางชนิดจับกับโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิดอื่นๆ อย่างจำเพาะ การทำงานของ leukocyte surface molecules เหล่านี้ควบคุมกระบวนการ differentiation และ maturation ของเซลล์ ควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ ทำให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ สุดท้ายก่อให้เกิดการทำงานและควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบ⁶⁻¹³ ในปัจจุบัน leukocyte surface molecules จำนวนหนึ่งได้ถูกค้นพบ และจากที่ประชุม Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) Workshop ได้มีการกำหนดชื่อ human leukocyte surface molecules ในระบบ cluster of differentiation (CD) แล้วจำนวน 247 ชนิด (CD1-CD247)^{1,4,5} โดยที่ Leukocyte surface molecules เหล่านี้ส่วนหนึ่งได้ถูกศึกษามาแล้วอย่างละเอียดทั้งคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ ตลอดจนลำดับของกรดอะมิโน^{1,4,5} อย่างไรก็ตาม นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่ายังมีโมเลกุลบนผิวเซลล์อีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่มีการค้นพบ ยังไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แท้จริง การศึกษาถึง leukocyte surface molecules ชนิดใหม่ และศึกษาถึงคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโมเลกุลบนเม็ดเลือดขาวชนิดใหม่ๆ จะทำให้เข้าใจกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น และทำให้เข้าใจกระบวนการกระตุ้นและควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งความรู้เหล่านี้จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การวินิจฉัยโรค การรักษา และการป้องกันโรคได้

ในการศึกษา leukocyte surface molecules ชนิดใหม่ๆ สามารถทำได้โดยการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุลนั้นๆ แล้วนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษา โมโนโคลนอล แอนติบอดีสามารถนำมาใช้ศึกษา cellular distribution ของ leukocyte

surface molecules จำเพาะ นำมาใช้ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมี โครงสร้าง และหน้าที่ของโมเลกุลที่สนใจ ตลอดจนสามารถนำมาโคลนยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุลนั้นๆ ซึ่งจะทำให้ทราบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของโมเลกุลที่สนใจในที่สุด¹⁴⁻¹⁹

ที่ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้วิจัยได้จัดตั้ง Monoclonal antibody production unit ขึ้น และได้พัฒนา hybridoma technique ขึ้นมา จนสามารถผลิต โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในช่วง 4-5 ปีที่ผ่านมา ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ human leukocyte surface molecules ได้หลายชนิด จึงนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้เป็นเครื่องมือในการค้นหาโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดใหม่ และศึกษาคุณลักษณะและหน้าที่ของโปรตีนจำเพาะ ผลการศึกษาทำให้เข้าใจกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดี

เพื่อผลิต monoclonal antibodies ต่อ leukocyte surface molecules ผู้วิจัยได้นำ hybridoma technique มาใช้ โดยทำการฉีดหนู Balb/c ด้วย Molt 4 human T cell lines จำนวน 3 ครั้งทาง intraperitoneal ทุก 2 สัปดาห์ และทาง intravenous จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นนำ spleen cells มา fuse กับ myeloma cells ทำการ screen หา hybridomas ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ leukocyte surface molecules โดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์ด้วย flow cytometry จากนั้นทำ single cell cloning โดยวิธี limiting dilution 2 รอบ โดยวิธีนี้ผู้วิจัยสามารถผลิต hybridoma ที่สร้างแอนติบอดีต่อ leukocyte surface molecule ได้ทั้งหมด 32 โคลน นำ hybridoma ที่ผลิตได้เก็บแช่แข็งใน liquid nitrogen

2. การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมากและบริสุทธิ์

เพื่อผลิตแอนติบอดีให้ได้จำนวนมาก ทำการฉีด hybridomas เข้าไปในช่องท้องของหนู Balb/c ที่ pre-treat ด้วย Pristane จากนั้น ประมาณ 2 สัปดาห์ เจาะเก็บ ascites จากนั้นนำ ascitic fluid มาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Protein A หรือ anti-mouse immunoglobulin coated sepharose column ทำการพิสูจน์ activity ของ purified mAb ที่ได้โดยนำไปย้อมกับเซลล์ชนิดต่างๆ โดยวิธี indirect immunofluorescent และตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยเครื่อง flow cytometer

3. การศึกษา cellular distribution ของโปรตีนที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สนใจ

การศึกษา cellular expression ของโปรตีนที่สนใจบน hematopoietic cell lines ทำได้โดยเลี้ยง hematopoietic cell lines ชนิดต่างๆ ใน 5% CO₂ incubator จากนั้นนำ hematopoietic cell lines มาย้อมด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีโดยวิธี indirect immunofluorescent โดยใช้ F(ab)'₂ anti-mouse immunoglobulins – FITC เป็น conjugate ตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยเครื่อง flow cytometer

การศึกษา cellular expression ของโปรตีนที่สนใจบน peripheral blood cells ทำได้โดย ทำการแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMC) โดยวิธี Ficoll Hypaque gradient centrifugation แยก polymorphonuclear cells (PMN) โดยวิธี 6% Dextran sedimentation นำเซลล์ที่แยกได้มาย้อมด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีโดยวิธี indirect immunofluorescent และตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยเครื่อง flow cytometer โดยแยกวิเคราะห์ lymphocyte population, monocyte population และ PMN โดยอาศัยขนาดและ granularity ที่แตกต่างกันด้วย FSC และ SSC detector

4. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สนใจบน activated lymphocytes

แยก peripheral blood mononuclear cells (PBMC) โดยวิธี Ficoll Hypaque gradient centrifugation จากนั้นนำ PBMC มากระตุ้นด้วย สาร phytohemagglutinin (PHA) 2.5 µg/ml หรือ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 60 ng/ml ที่เวลาต่างๆ นำ activated cells มาย้อมด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สนใจโดยวิธี indirect immunofluorescent และตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยเครื่อง flow cytometer เปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่าง activated cells และ un-stimulated cells

5. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของ leukocyte surface molecules ที่สนใจ

นำเซลล์ที่ทราบแล้วว่าสร้างโปรตีนที่สนใจ มาติดฉลากโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วย biotin จากนั้นแตกเซลล์ด้วย lysing solution ปั่นเก็บ biotinylated cell lysate นำ cell lysate ที่ได้ไปเติมลงใน specific monoclonal antibody coated sepharose incubate ที่ 4°C ซ้ำมคืน ล้าง sepharose beads 10 ครั้ง แล้ว elute เอา precipitated protein จาก sepharose ด้วย reducing buffer หรือ non-reducing buffer นำ sample ที่ได้ไปทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis แล้ว transfer โปรตีนจาก gel ไปบน nitrocellulose membrane ทำการ block nitrocellulose membrane ด้วย 5% skimmed milk solution แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ peroxidase labeled avidin ล้าง membrane แล้วนำไปตรวจทดสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยวิธี chemiluminescent detection system เปรียบเทียบแถบของปฏิกิริยาบนฟิล์มกับ standard molecular weight markers ที่ทำควบคู่ไปด้วย

6. การศึกษาหน้าที่ของ leukocyte surface molecule ที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สนใจในการควบคุมหรือทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์

6.1 การศึกษาใน hematopoietic cell lines

นำ hemopoietic cell lines มาเลี้ยงใน 96 well plate ที่มีหรือไม่มีโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ และมี ³H-thymidine อยู่ด้วย นำเซลล์ไปเลี้ยงใน 5%CO₂ incubator ที่เวลาต่างๆ จากนั้นเก็บเซลล์จากหลุมไปวัด radioactive incorporation ด้วยเครื่อง liquid scintillation counter เปรียบเทียบค่า count per minute ที่ได้ระหว่างหลุมที่ไม่เติมและหลุมที่เติมแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ จะทำให้ทราบถึงหน้าที่ของโมเลกุลนั้นๆ ในด้านที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์

6.2 การศึกษาใน T lymphocytes

นำ PBMC มากระตุ้นด้วย immobilized anti-CD3 antibody (OKT3) ใน 96 well plate ที่มีหรือไม่มีโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ นำเซลล์ไปเลี้ยงใน 5%CO₂ incubator 72 ชั่วโมง

เติม ^3H -thymidine ลงไป 18 ชั่วโมงต่อมา เก็บเซลล์จากหลุมไปวัด radioactive incorporation ด้วยเครื่อง liquid scintillation counter เปรียบเทียบค่า count per minute ที่ได้ระหว่างหลุมที่ไม่เติมและหลุมที่เติมแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ

6.3 การศึกษาใน B lymphocytes

นำ PBMC มากระตุ้นด้วย soluble anti-IgM antibody ใน 96 well plate ที่มีหรือไม่มีโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ นำเซลล์ไปเลี้ยงใน 5%CO₂ incubator 72 ชั่วโมง เติม ^3H -thymidine ลงไป 18 ชั่วโมงต่อมา เก็บเซลล์จากหลุมไปวัด radioactive incorporation ด้วยเครื่อง liquid scintillation counter เปรียบเทียบค่า count per minute ที่ได้ระหว่างหลุมที่ไม่เติมและหลุมที่เติมแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ

7. การศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อการสร้าง cytokines

นำ PBMC มากระตุ้นด้วย immobilized anti-CD3 antibody (OKT3) ใน 96 well plate ที่มีหรือไม่มี โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ นำเซลล์ไปเลี้ยงใน 5%CO₂ incubator 24 ชั่วโมง เก็บ culture supernatant ตรวจหาระดับ interferon- γ , IL-2, IL-4 และ IL-10 โดยวิธี Sandwich ELISA เปรียบเทียบค่าที่ได้ระหว่างหลุมที่ไม่เติมและหลุมที่เติมแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ

8. ศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อการกระตุ้น homotypic aggregation

เติม cell lines ชนิดต่างๆ ลงใน 96 well plate ที่มีหรือไม่มีโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ Incubate ใน 5%CO₂ incubator ที่เวลาต่างๆ ทำการตรวจนับ cell aggregation ด้วยกล้อง inverted microscope เปรียบเทียบการเกิด cell aggregation ที่มีและไม่มีแอนติบอดี

9. ศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis

เติม cell lines ชนิดต่างๆ ลงใน 96 well plate ที่มีหรือไม่มีโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ Incubate ใน 5%CO₂ incubator ที่เวลาต่างๆ ทำการตรวจการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis โดย Annexin-V-FITC apoptosis kit และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry

10. การศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อกระบวนการ phagocytosis

นำเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็ง heparin จำนวน 100 μl ผสมกับ E. coli ที่มีหรือไม่มีโมโนโคลนอล แอนติบอดี นำไป incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำเลือดมา smear บนสไลด์แก้ว และย้อมด้วยสี wright's และตรวจนับ % phagocytosis ด้วยกล้องจุลทรรศน์

11. การแยก cDNA ที่กำหนดการสร้าง leukocyte surface molecule ที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สนใจโดย Retroviral expression cloning system

นำ KG1a cell lines มาแยก mRNA แล้วใช้เป็น template ในการเตรียม cDNA นำ cDNA ที่เตรียมได้ insert เข้าไปใน pBabeMN-lacZ retroviral vector ได้เป็น cDNA libraries นำ cDNA libraries transfect เข้าไปใน ecotropic retroviral Phoenix packaging cells โดยวิธี DEAE-Dextran transfection ปั่นเก็บ supernatant ได้ retroviruses นำ retroviruses ที่ได้ไป infect BW mouse thymoma cells จากนั้น screen และ isolate BW cells ที่ express โปรตีนที่สนใจโดยการย้อมด้วย โมโนโคลนอล แอนติบอดี แล้วแยก antibody-binding cells โดย MACS sorting system นำเซลล์ที่แยกได้มาทำ limiting dilution ได้ นำ positive clone ทำการแยก cDNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจจาก positive cells โดย RT-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ vector บริเวณ multiple cloning site นำ PCR product ไป subclone เข้าไปใน pBadeMN-lacZ vector อีกครั้ง แล้วทำการ sequence ลำดับ nucleotide ของ cDNA ที่แยกได้

ผลการทดลองและวิจารณ์

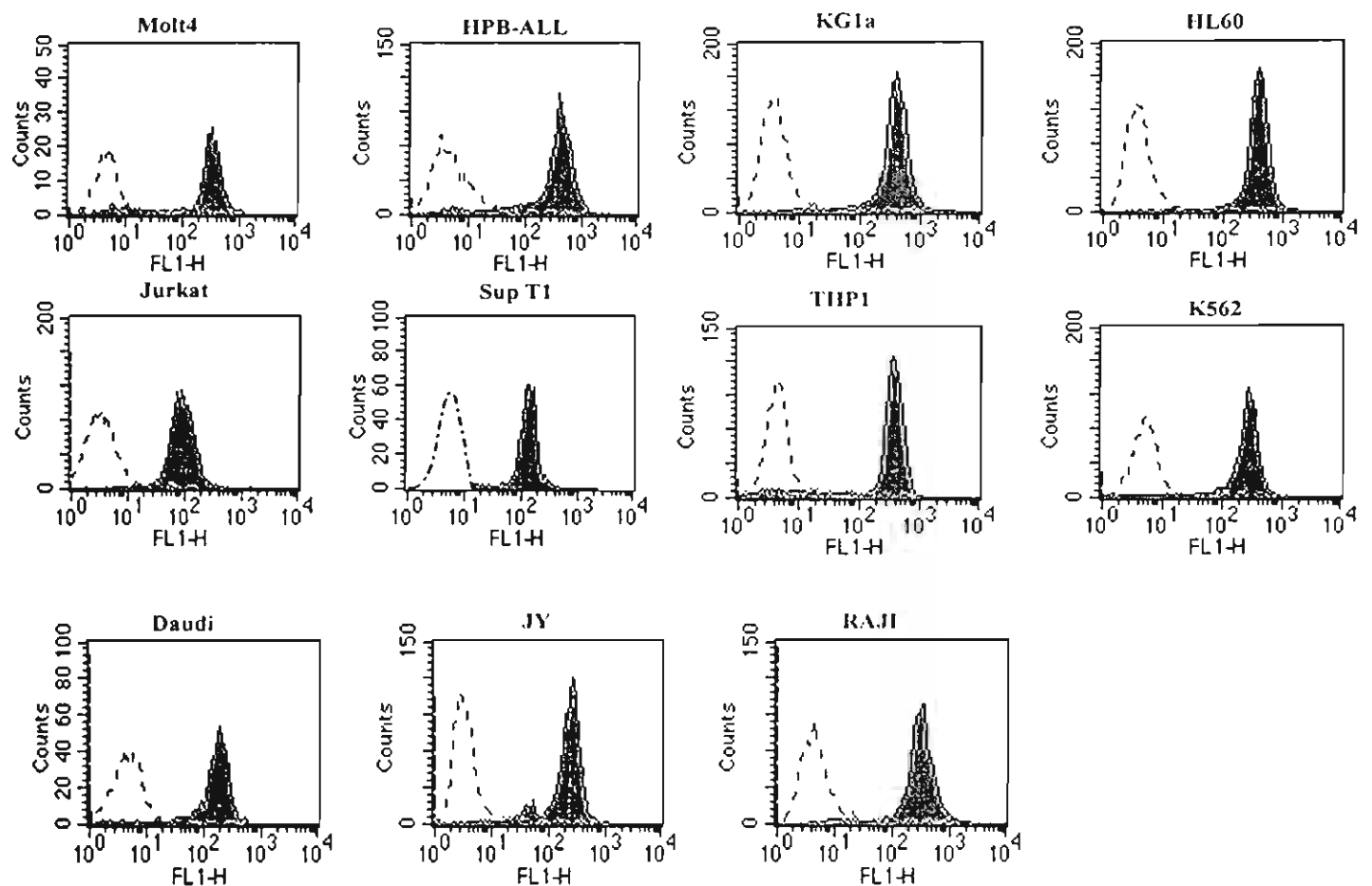
ในการศึกษาวิจัยนี้ เป็นการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของ leukocyte surface molecule ชนิดใหม่ โดยผู้วิจัยได้ทำการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนบนผิว human T cell line ชนิด Molt4 และนำโมโนโคลนอล แอนติบอดี 2 ชนิด คือ P-3E10 และ CA-1H4 mAb มาศึกษา โดยมีรายละเอียด ดังนี้

P-3E10 molecule

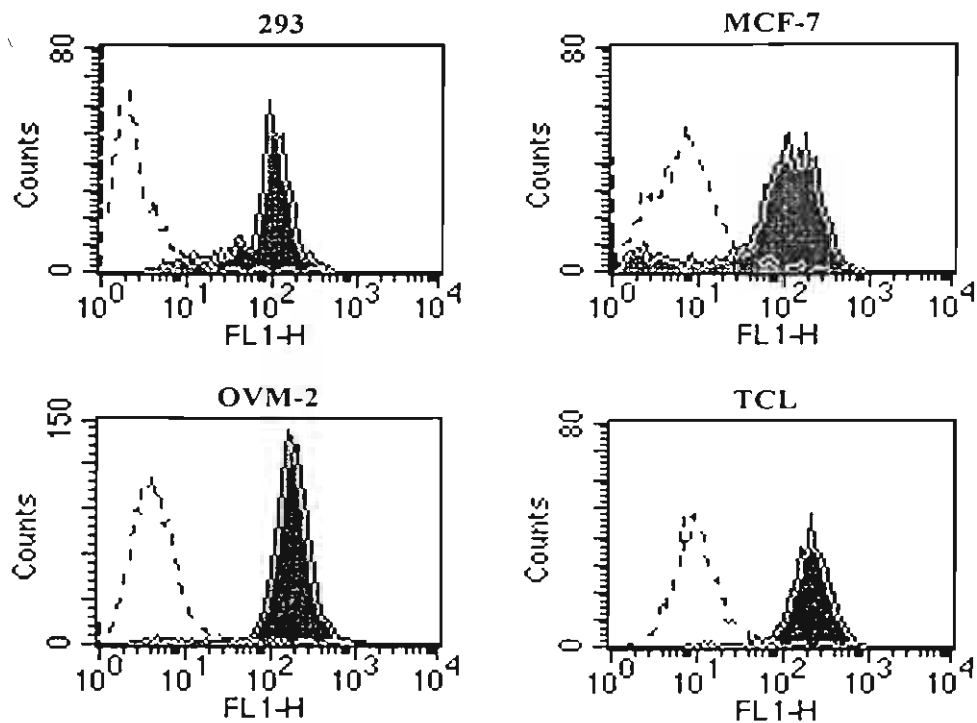
เพื่อศึกษาหาโมเลกุลชนิดใหม่ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ T lymphocytes ผู้วิจัยได้ทำการฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ Balb/c ทางช่องท้องด้วย human T cell line ชนิด Molt4 และโดยวิธี hybridoma technique ผู้วิจัยสามารถผลิต monoclonal antibody (mAb) ต่อโปรตีนบนผิวเซลล์ Molt4 ได้เป็นจำนวนมาก และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า mAb ชนิดหนึ่งชื่อ P-3E10 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ T cells เมื่อถูกกระตุ้นด้วย CD3 mAb ได้ ผลการศึกษานี้แสดงว่า P-3E10 mAb น่าจะทำปฏิกิริยาได้กับโมเลกุลบนผิวเซลล์ (P-3E10 molecule) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการ T cell activation ดังนั้น P-3E10 mAb จึงถูกเลือกมาเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาถึงคุณสมบัติและหน้าที่ของโมเลกุลจำเพาะต่อไป

เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ P-3E10 mAb (เรียกว่า P-3E10 molecule) บนเซลล์ชนิดต่างๆ (cellular distribution) ผู้วิจัยได้ทำการย้อมเซลล์ชนิดต่างๆ ด้วย P-3E10 mAb โดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์โดยวิธีโฟลไซโตเมตรี ผลการศึกษาพบว่า P-3E10 molecule สามารถพบได้บน cell lines ทั้งที่เป็น hematopoietic cell lines และ non-hematopoietic cell lines ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 1 A และ B) และยังสามารถพบโมเลกุล P-3E10 บนเซลล์ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และ แกรนูโลไซต์ ได้ด้วย (รูปที่ 2)

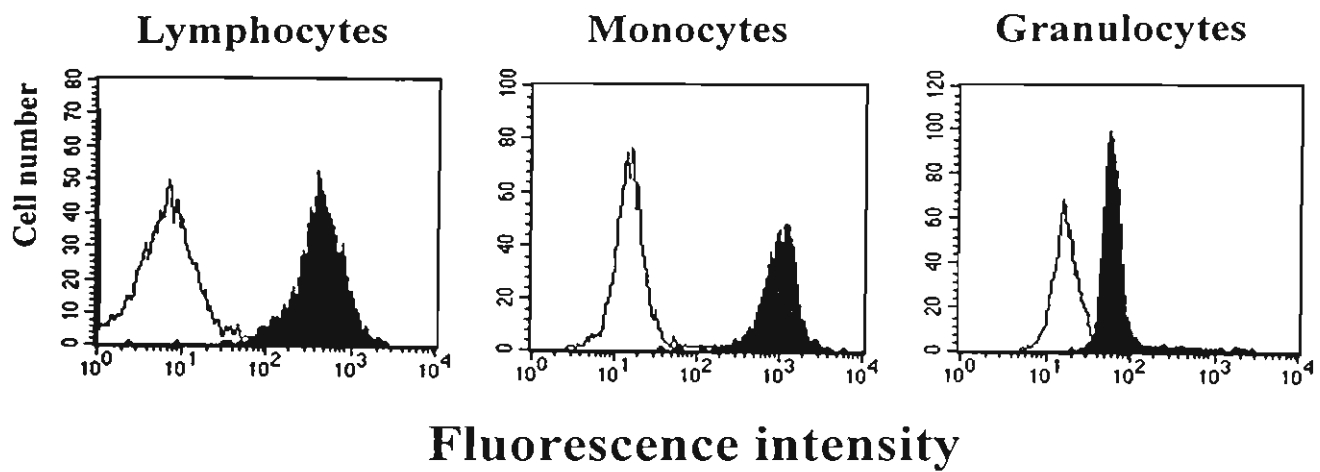
เมื่อศึกษาการแสดงออกของ P-3E10 molecule บน activated lymphocytes ผู้วิจัยได้นำ peripheral blood mononuclear cells มากระตุ้นด้วย mitogen 2 ชนิดคือ PHA และ PMA ที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ผลการทดลองพบว่า การแสดงออกของโมเลกุล P-3E10 บน activated lymphocytes ไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 3 และ 4) ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า P-3E10 molecule ไม่ได้เป็น lymphocyte activation associated molecule ดังเช่นที่มีรายงานมาสำหรับ CD25 (Interleukin 2 receptor) หรือ CD71 (transferrin receptor)



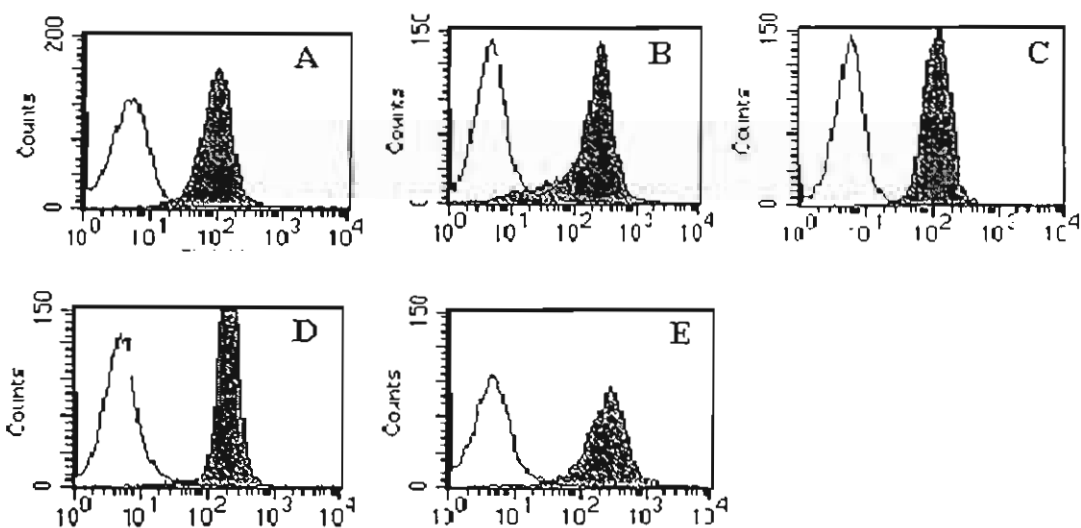
รูปที่ 1A. Expression of P-3E10 molecule on various hematopoietic cell lines. Various hematopoietic cell lines, including T cell lines (Molt4, HPB ALL, Jurkat, Sup T1), B cell lines (Daudi, JY, RAJI), and Monocytic cell lines (KG1a, HL60, THP1, K562), were stained with mAb P-3E10 (filled) and AFP-01 control antibody (open) by indirect immunofluorescence and analyzed by flow cytometry. Data are representative of three independent experiments.



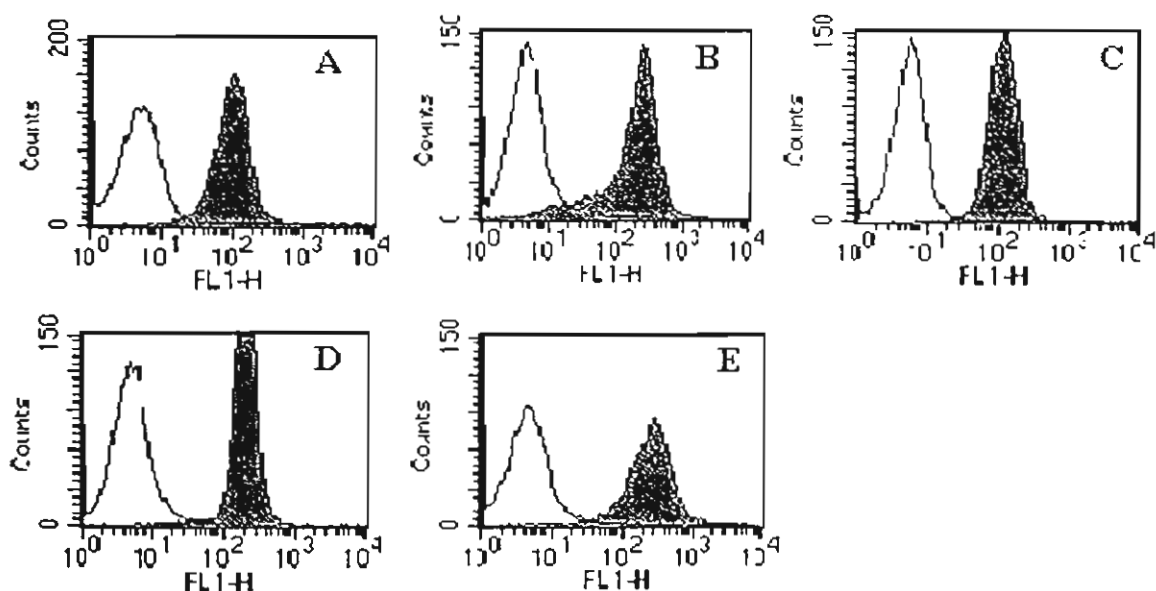
รูปที่ 1B. Expression of P-3E10 molecule on various non-hematopoietic cell lines. Non-hematopoietic cell lines including 293 human fibroblast, MCF-7 breast cancer, OVM-Z ovarian cancer or TCL kidney cancer cell lines were stained with P-3E10 mAb (filled) and AFP-01 control antibody (open) by indirect immunofluorescence using goat anti-mouse immunoglobulins-FITC conjugate. Data are representative of three independent experiments.



รูปที่ 2 Distribution of the P-3E10 molecule on the peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes. The peripheral blood cells were stained with P-3E10 mAb (filled) or AFP-01 control mAb (open) by indirect immunofluorescence. Data are representative of three independent experiments.



รูปที่ 3 Surface expression of P-3E10 molecule on PHA activated PBMCs. PBMCs were stimulated with 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of PHA. Expression of P-3E10 molecule on unstimulated PBMCs (A), PHA activated PBMCs after 1 day (B), 3 days (C), 5 days (D) and 7 days (E) of treatment was examined by indirect immunofluorescence and flow cytometry.



รูปที่ 4 Surface expression of P-3E10 molecule on PMA-activated PBMCs. PBMCs were stimulated with 60 ng/ml of PMA. Expression of P-3E10 molecule on unstimulated (A), PMA activated PBMCs on 1 day (B), 3 days (C), 5 days (D) and 7 days (E) of treatment was examined by indirect immunofluorescence and flow cytometry.

เพื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ P-3E10 molecule ผู้วิจัยได้นำเอาวิธี immunoprecipitation มาศึกษา และพบว่า P-3E10 mAb สามารถ precipitate โปรตีนขนาดประมาณ 45-50 kDa ในภาวะ non-reducing และขนาดประมาณ 50-55 kDa ในภาวะ reducing condition (รูปที่ 5) จาก Biotin labeled Sup T1 T cell line ในการทดลองนี้ ได้นำ CD99 mAb (MT99/3) ทำควบคู่ไปด้วยเพื่อเป็น control ซึ่งพบว่าทั้งใน reducing และ non-reducing conditions MT99/3 mAb precipitates โปรตีนขนาดประมาณ 32 kDa (รูปที่ 5)¹⁸ ซึ่งเป็นดังที่มีรายงานมาก่อน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า P-3E10 molecule เป็น cell surface molecule ที่มีขนาดประมาณ 45-50 kDa และโมเลกุลนี้ประกอบด้วย intra-disulfide bond

เพื่อศึกษาน้ำหนักของ P-3E10 molecule ผู้วิจัยได้นำ P-3E10 mAb ไปศึกษาวิจัยและได้ผลการศึกษาดังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การศึกษาน้ำหนักของ P-3E10 molecule ที่เกี่ยวข้องกับ T cell activation

ผู้วิจัยทำการศึกษาโดยกระตุ้น peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของคนปกติ (n=16) ด้วย immobilized anti-CD3 mAb (OKT3) ในสภาวะที่มีและไม่มี P-3E10 mAb จากนั้นตรวจวัดการแบ่งตัวของ T lymphocytes โดยวิธี ³H-thymidine incorporation assay ผลการศึกษาพบว่า P-3E10 mAb สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ T cells ที่ถูกกระตุ้นโดย OKT3 mAb ได้ (รูปที่ 6)

จากนั้น ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาถึงผลของ P-3E10 mAb ต่อการสร้าง cytokines ชนิด interferon- γ และ IL-2 ซึ่งเป็น Th1 cytokines และ IL-4 และ IL-10 ซึ่งเป็น Th2 cytokines โดยทำการกระตุ้น PBMC ด้วย OKT3 mAb ในสภาวะที่มีและไม่มี P-3E10 mAb แล้วตรวจวัดระดับ cytokines ใน culture supernatants โดยวิธี ELISA ผลการศึกษาพบว่า P-3E10 mAb สามารถยับยั้งการสร้าง cytokines ทุกชนิดที่ศึกษา (รูปที่ 7)

ผลการศึกษานี้แสดงว่า P-3E10 molecule เป็น leukocyte surface molecule ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ T cell activation โดยสามารถกีดการแบ่งตัวของ T lymphocyte เมื่อกระตุ้นผ่าน TCR/CD3 complex นอกจากนี้ P-3E10 mAb ยังสามารถกีดการสร้าง cytokines ทั้ง Th1 และ Th2 cytokines

2. การศึกษาน้ำหนักของ P-3E10 molecule ที่เกี่ยวข้องกับ B cell activation

ผู้วิจัยทำการศึกษาต่อถึงหน้าที่ของ P-3E10 molecule ใน B cell activation โดยทำการกระตุ้น PBMC ด้วย soluble anti-IgM antibody (BCR) ในสภาวะที่มีและไม่มี P-3E10 mAb ในคนปกติ จำนวน 3 คน ตรวจวัดการแบ่งตัวของ B cells โดยวิธี ³H-thymidine incorporation assay ผล

การศึกษาพบว่า P-3E10 mAb สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ B cells ได้ (รูปที่ 8) ผลการศึกษานี้แสดงว่าโมเลกุล P-3E10 เกี่ยวข้องในกระบวนการ B cell activation ด้วยเช่นกันกับที่พบใน T lymphocytes

3. การศึกษาผลของ P-3E10 mAb ต่อ spontaneous proliferation ของ hematopoietic cell lines

เนื่องจากผู้วิจัยพบว่า hematopoietic cell lines มีการ express P-3E10 molecule จึงตั้งคำถามว่า P-3E10 molecule บน hematopoietic cell lines เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งตัวของ cell lines เหล่านี้หรือไม่ จึงทำการศึกษาโดยนำ hematopoietic cell lines ชนิดต่างๆ มาเลี้ยงในภาวะที่มีหรือไม่มี P-3E10 mAb แล้วตรวจวัดการแบ่งตัวของเซลล์ โดยวิธี ^3H -thymidine incorporation assay ผลการศึกษาพบว่า P-3E10 mAb ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของ hematopoietic cell lines ที่นำมาศึกษา (SupT-1, Jurkat, Molt4 และ U937) เลย (รูปที่ 9) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โมเลกุล P-3E10 เกี่ยวข้องกับการควบคุม lymphocyte activation แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการ proliferation ของ spontaneous proliferation cell lines

4. การศึกษาผลของ P-3E10 mAb ต่อการกระตุ้น homotypic cell aggregation

เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิด cell aggregation โดย P-3E10 molecule ผู้วิจัยได้นำ P-3E10 mAb มากระตุ้น cell lines ชนิดต่าง ๆ แล้วตรวจสอบการกระตุ้นให้เกิด homotypic aggregation ผลการทดลองพบว่า P-3E10 mAb ไม่สามารถกระตุ้น cell aggregation ได้เลย (ตารางที่ 1) และในรูปที่ 10 แสดงผลการกระตุ้น U937 cell aggregation ของ P-3E10 mAb เปรียบเทียบกับ control mAb คือ CD147 mAb (M6-1D4)^{17,19}

5. การศึกษาหน้าที่ของ P-3E10 molecule ต่อการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis

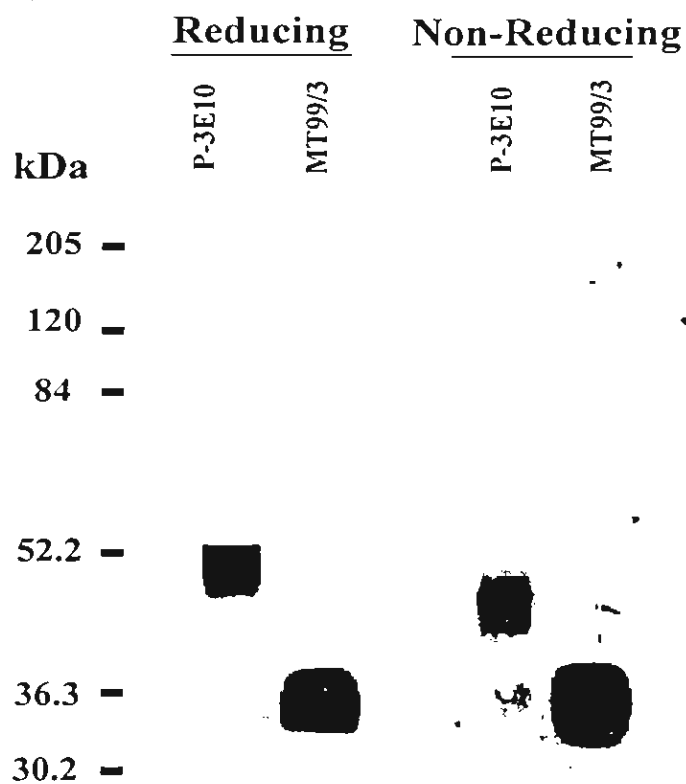
โปรตีนบนผิวเซลล์หลายชนิดทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณจากภายนอก (extracellular signaling) แล้วส่งสัญญาณเข้าไปภายในเซลล์ (intracellular signaling) โดยสัญญาณดังกล่าวบางชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เพื่อศึกษาว่า P-3E10 molecule ทำหน้าที่ดังกล่าว ผู้วิจัยได้นำ hematopoietic cell lines มากระตุ้นด้วย P-3E10 mAb แล้วศึกษาการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยใช้ Annexin-V-FITC apoptosis detection kit และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry ผลการศึกษาพบว่า P-3E10 mAb ไม่สามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ทุกชนิดที่นำมาศึกษา (รูปที่ 11) โดยการทดลองนี้ใช้ CD99 mAb (MT99/3) เป็น positive control ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า P-3E10 molecule ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis

6. การศึกษาผลของ P-3E10 molecule ต่อกระบวนการ phagocytosis

P-3E10 molecule สามารถพบได้บนผิว phagocytes เพื่อศึกษาหน้าที่ของ P-3E10 molecule ในการควบคุมกระบวนการ phagocytosis ผู้วิจัยได้นำเม็ดเลือดขาวจากคนปกติมาศึกษาการกิน (phagocytosis) *E. coli* ในภาวะที่มีหรือไม่มี P-3E10 mAb ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 12 โดยพบว่า P-3E10 mAb ไม่มีผลต่อกระบวนการ phagocytosis ของทั้ง neutrophils และ monocytes ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า P-3E10 molecule เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ lymphocytes แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของ phagocytes

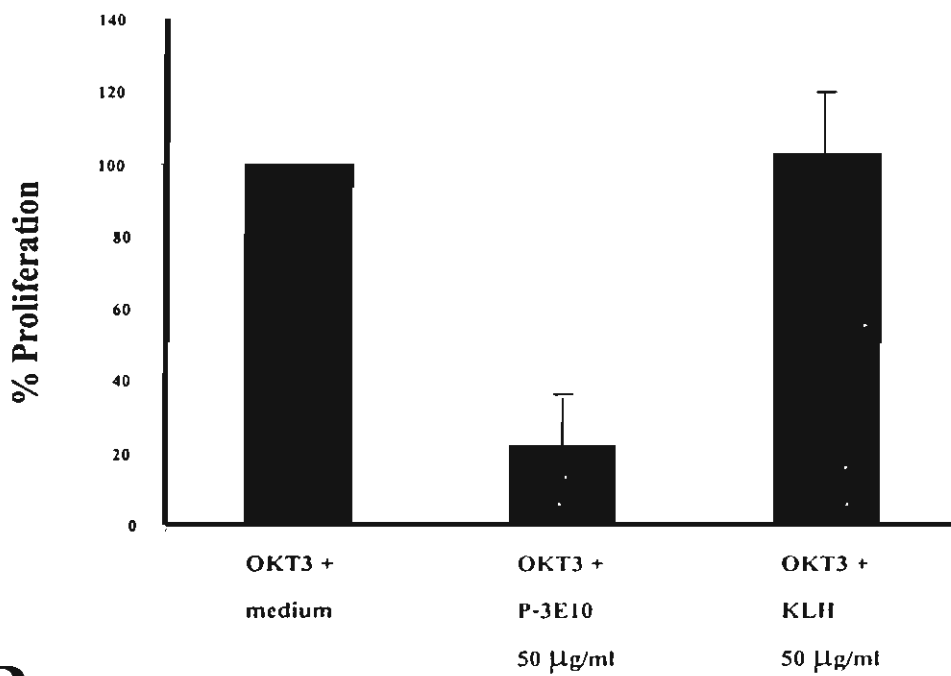
ตารางที่ 1 แสดงการกระตุ้น homotypic cell aggregation โดย P-3E10 mAb

Cell lines	Degree of aggregation		
	P-3E10 mAb	M6-1D4 mAb	Medium control
U937	-	2+	-
K562	-	-	-
Jurkat	1+	4+	1+
Molt4	1+	1+	1+
SupT1	1+	1+	1+
Daudi	-	-	-

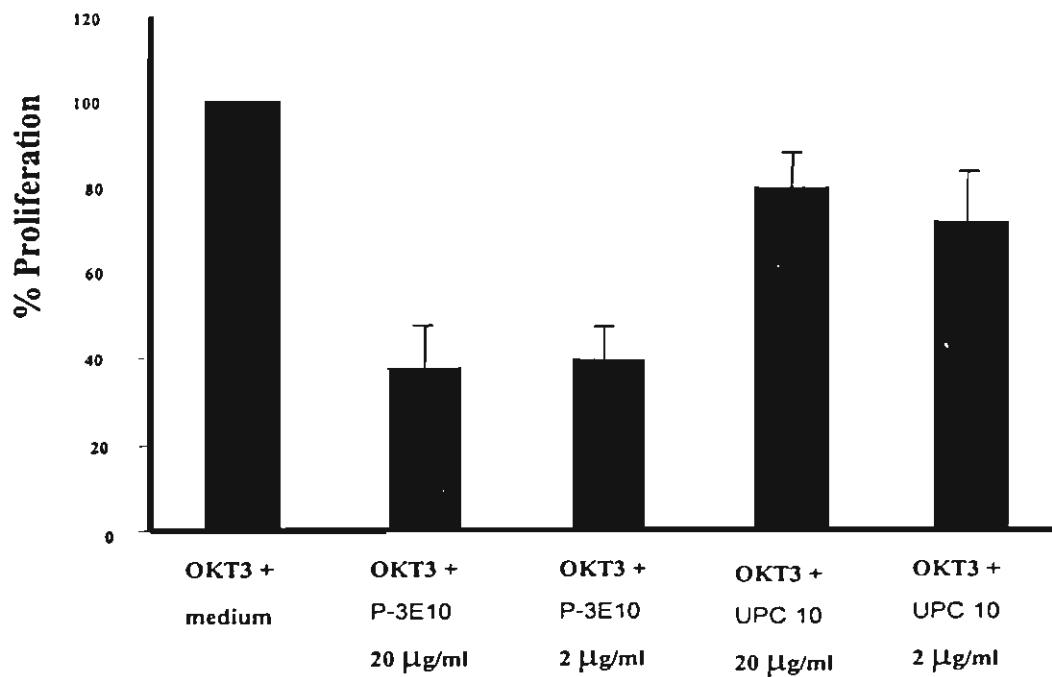


รูปที่ 5 Biochemical characterization of the cell surface molecule recognized by P-3E10 mAb. SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates obtained with either P-3E10 mAb or MT99/3 (CD99 mAb) from lysates of surface biotin-labeled Sup T1 cells. Electrophoresis was performed under reducing and non-reducing conditions. Molecular markers are shown on the left in kDa.

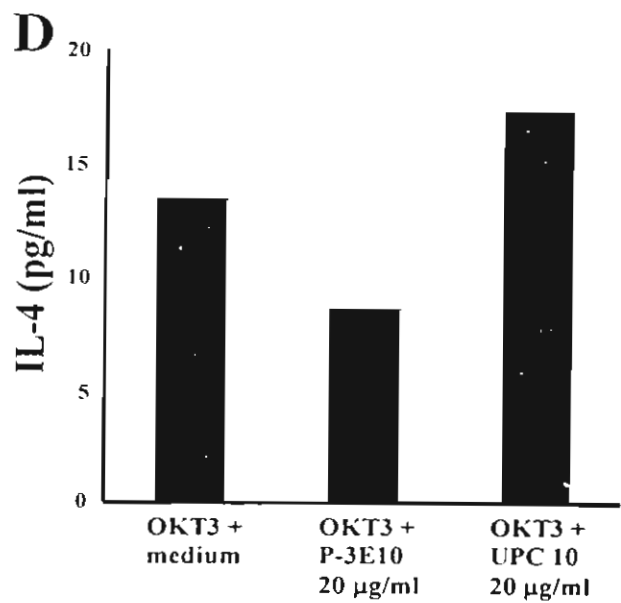
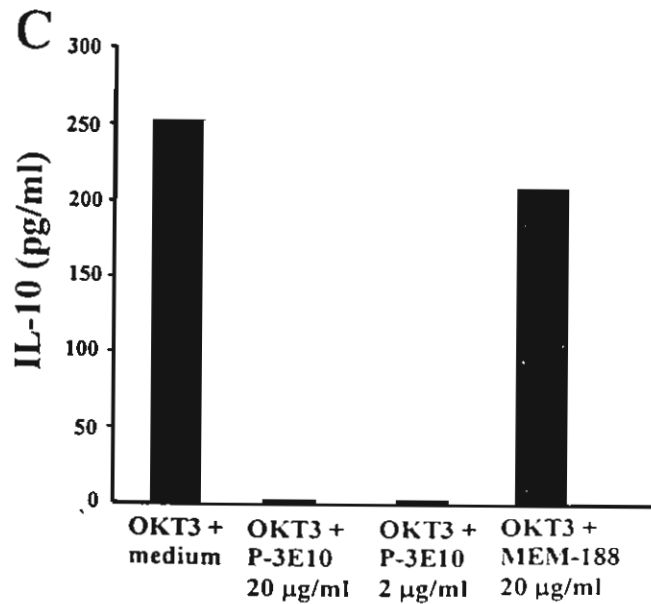
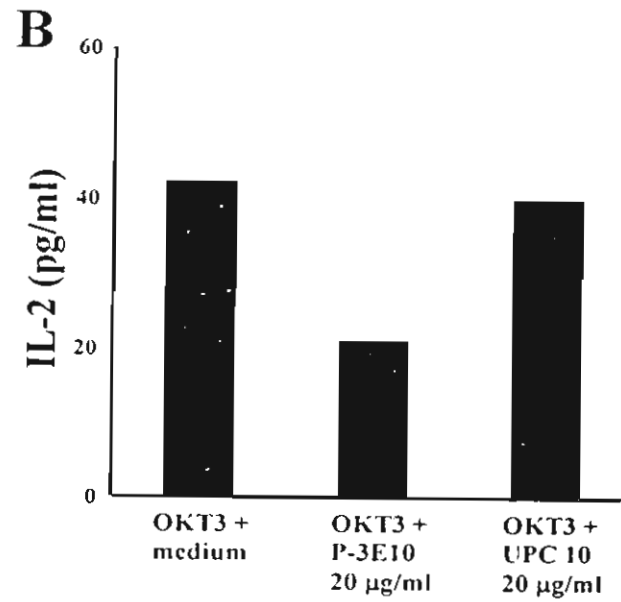
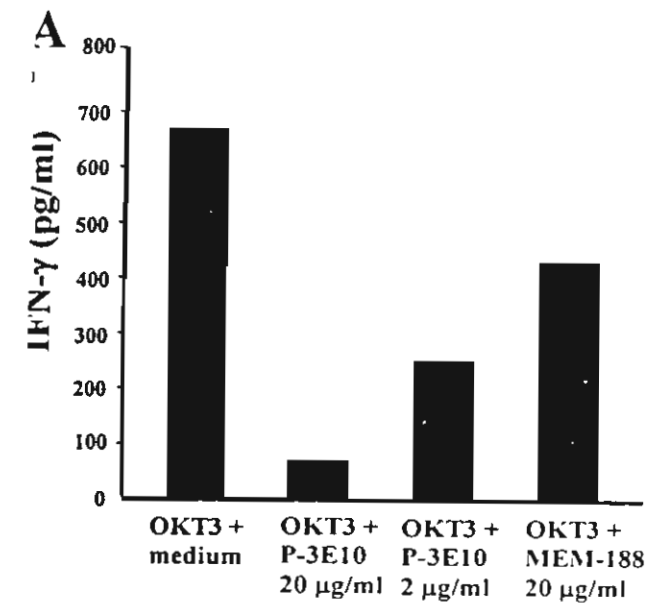
A



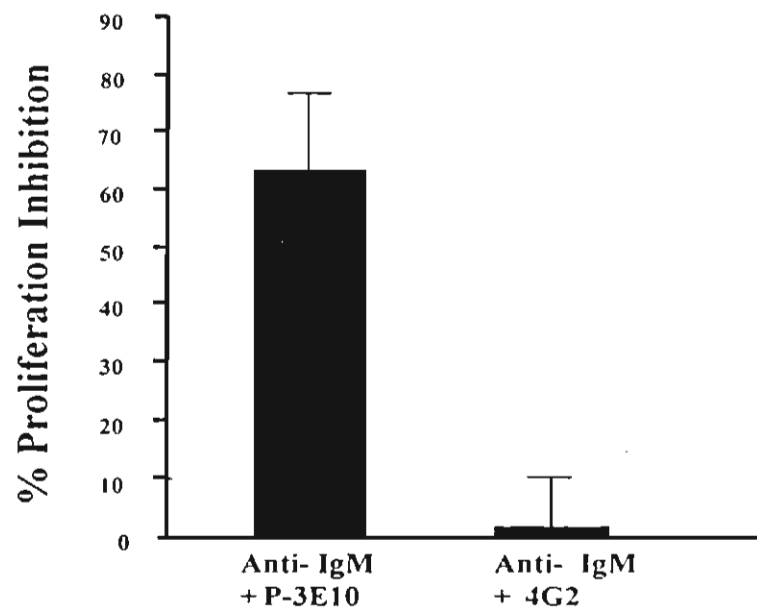
B



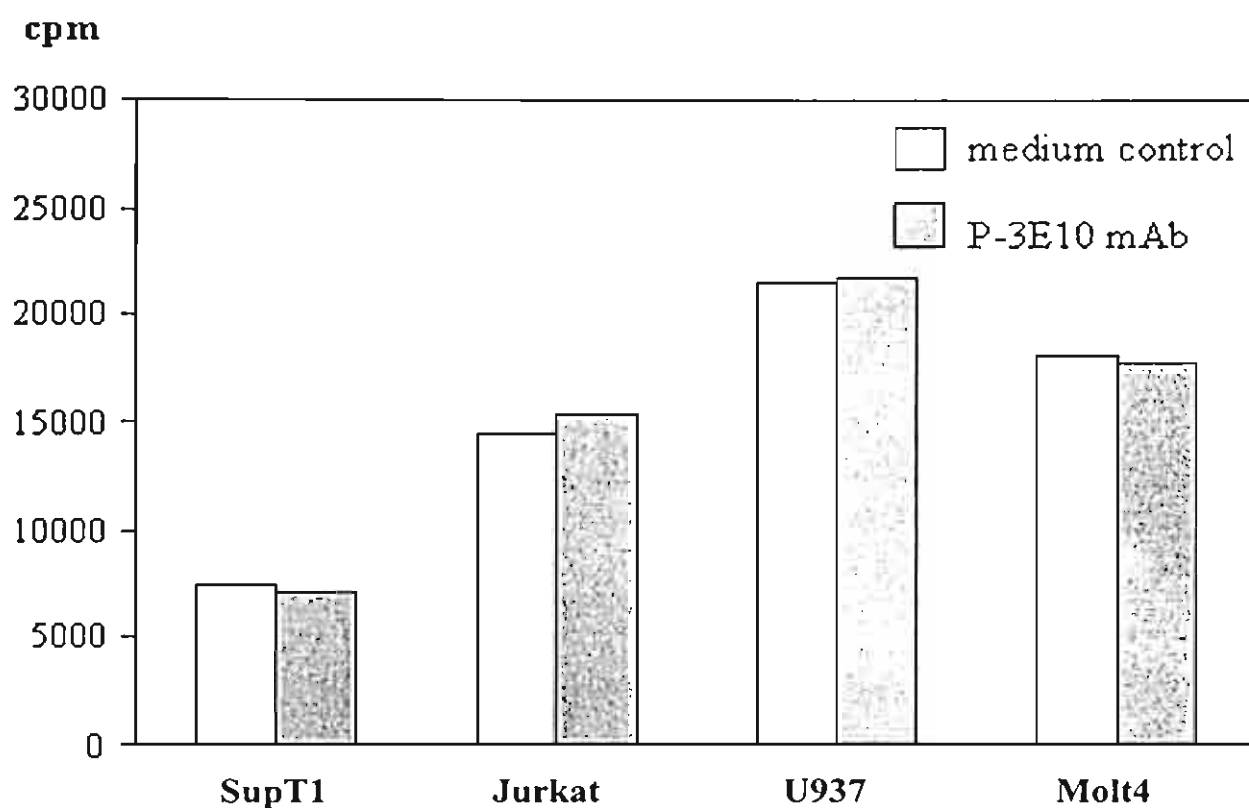
รูปที่ 6 P-3E10 mAb inhibits CD3-induced T cell proliferation. PBMCs were activated with immobilized OKT3 mAb 20 ng/ml (A) or 1 µg/ml (B) in the presence of indicated concentrations of P-3E10 mAb, isotype matched control mAbs (KLH and UPC 10) or medium. The bars represent mean $\pm$ SD of 10 and 6 healthy donors for A and B, respectively.



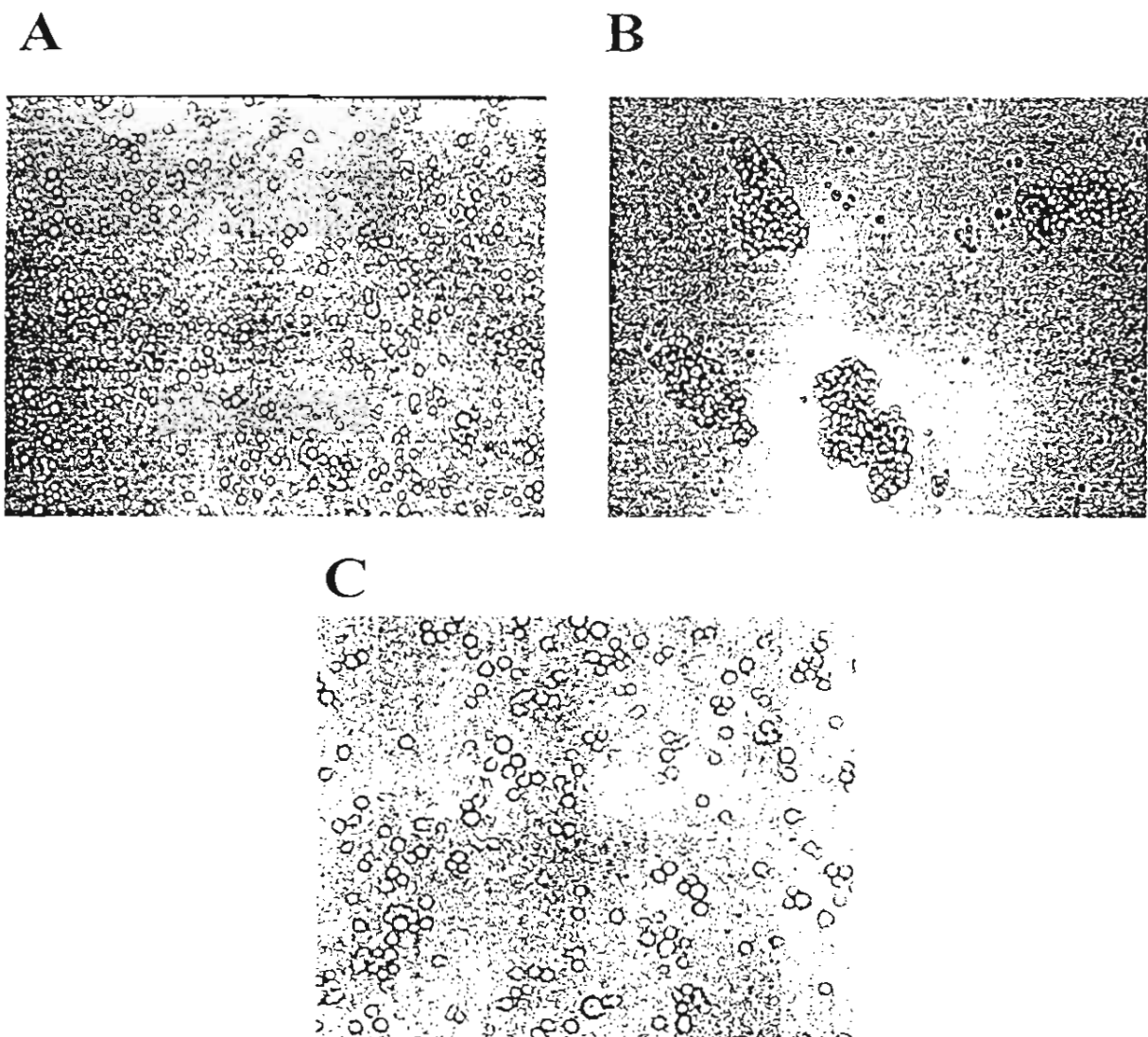
รูปที่ 7 P-3E10 mAb inhibits cytokine production. PBMCs were activated with immobilized CD3 mAb OKT3 in the presence of indicated concentrations of soluble P-3E10 mAb, isotype matched control mAbs or medium alone. The culture supernatants were harvested and IFN- γ , IL-2, IL-10 and IL-4 were measured by ELISA.



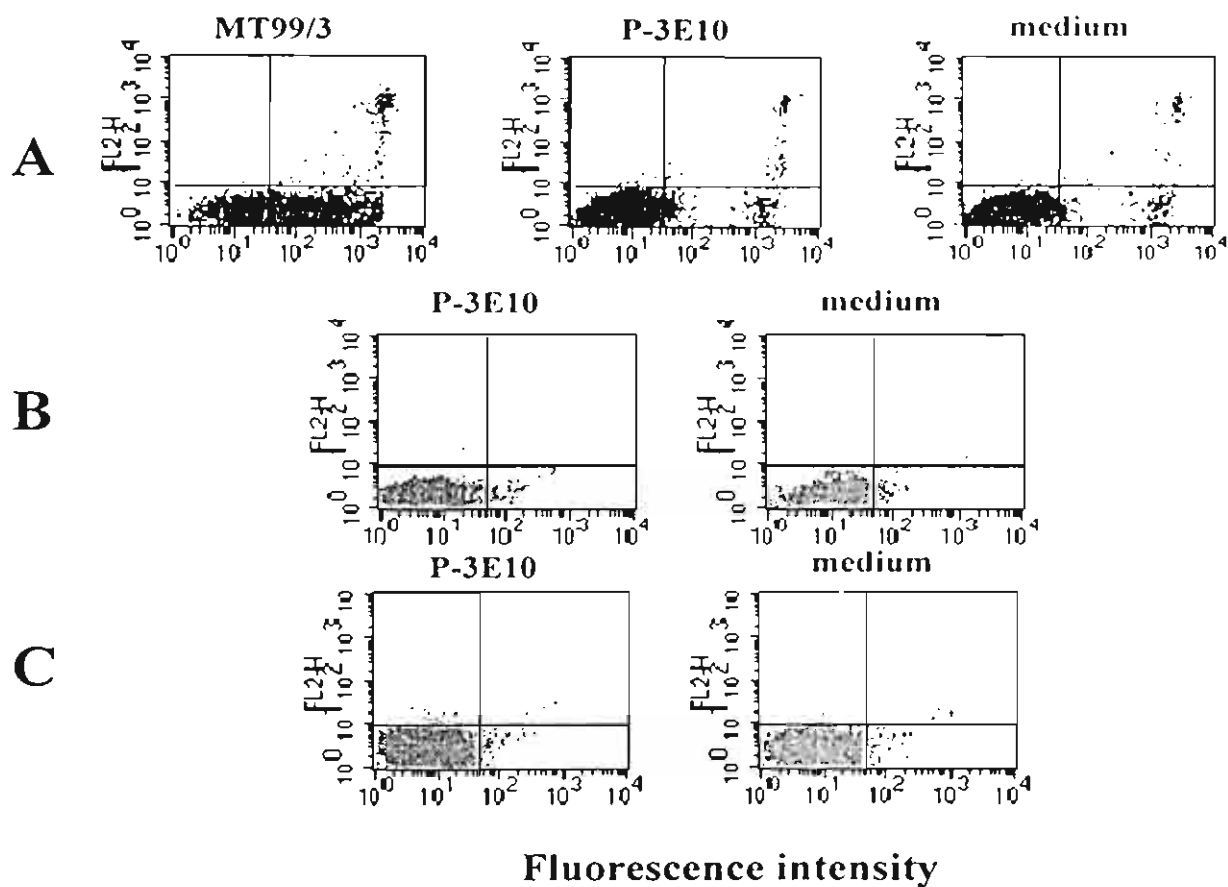
รูปที่ 8 P-3E10 mAb inhibits anti-IgM-induced B cell proliferation. PBMCs were activated with 10 μ g/ml of soluble anti-IgM antibody in the presence of 10 μ g/ml P-3E10 mAb, isotype matched control mAb (4G2) or medium alone. The bars represent mean $\pm$ SD of % proliferation inhibition of 3 healthy donors.



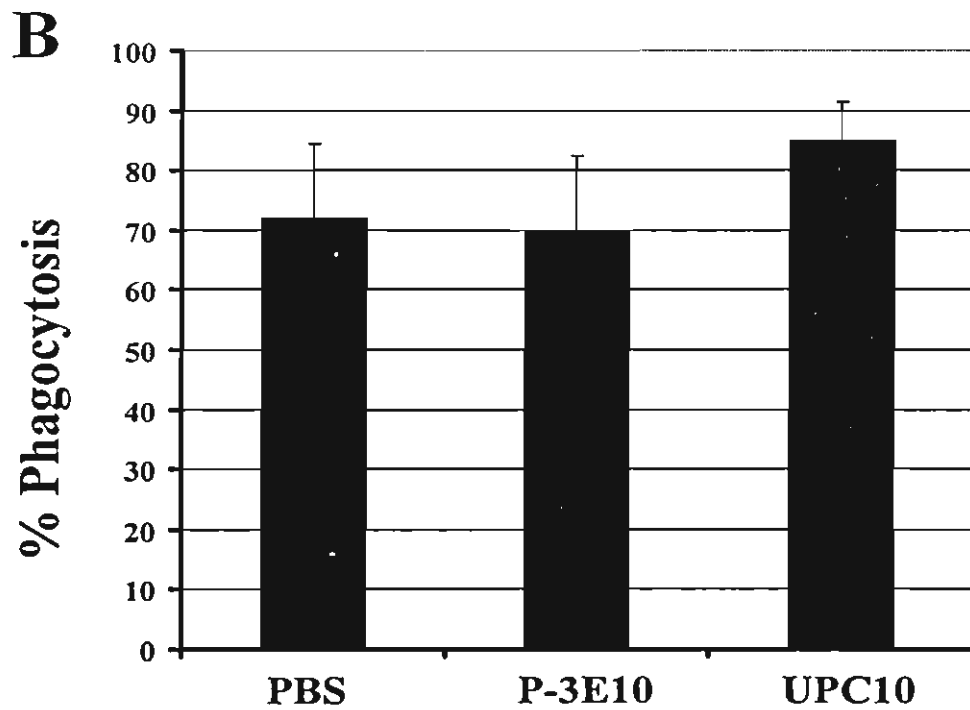
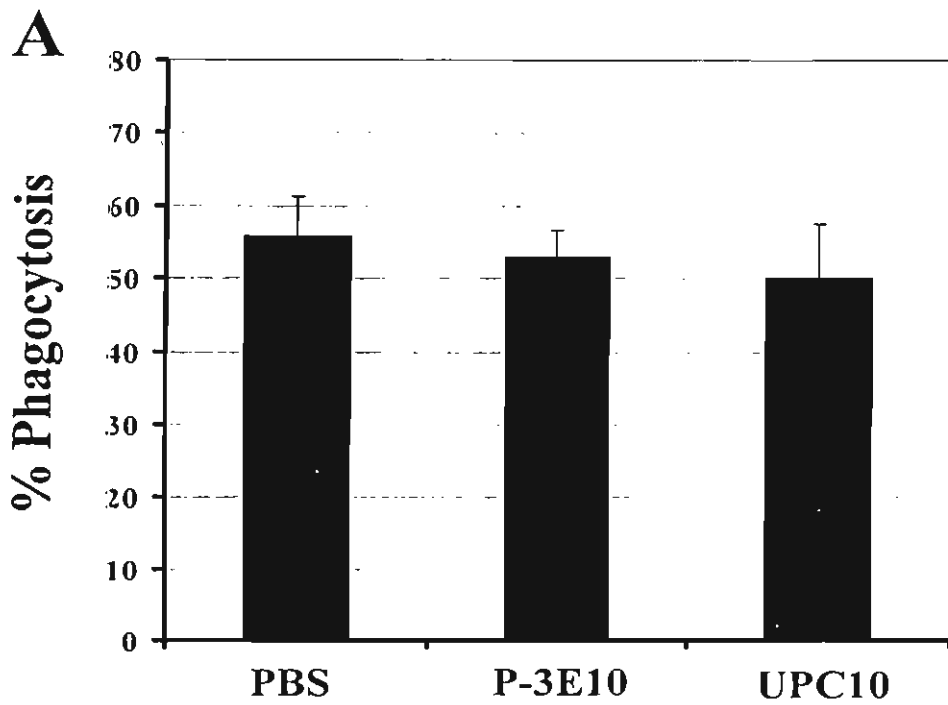
รูปที่ 9 Effect of P-3E10 mAb on spontaneous proliferation of hematopoietic cell lines. Various cell lines including SupT1, Jurkat, U937 or Molt4 were cultured with P-3E10 mAb (20 μ g/ml) or medium for 5 hours. Cell proliferation was measured by [3 H]-thymidine incorporation assay.



รูปที่ 10 Effect of P-3E10 mAb on induction of Jurkat homotypic cell aggregation. Jurkat cells were incubated for 4 hours with (A) 20 $\mu\text{g/ml}$ P-3E10 mAb or (B) 20 $\mu\text{g/ml}$ M6-1D4 (CD147) mAb or (C) medium alone and the homotypic cell aggregation was observed under an inverted microscope.



รูปที่ 11 Effect of P-3E10 mAb on induction of apoptosis. Jurkat (A), SupT1 (B) or (C) Molt4 T cell lines were incubated with 20 μ g/ml of indicated mAb or medium alone for 4 hours. Treated cells were then analyzed for apoptotic cells by staining with Annexin V-FITC and PI.



รูปที่ 12 Effect of P-3E10 mAb on phagocytic activity of granulocytes (A) and monocytes (B). Phagocytes were incubated for 1 hours with *E. coli* in the presence or absence of 20 $\mu\text{g/ml}$ P-3E10 mAb or control mAb (UPC10) or PBS. Phagocytosis was observed under a light microscope.

จากผลการศึกษา cellular distribution, คุณสมบัติชีวเคมี และหน้าที่ของ P-3E10 molecule ดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อน ผู้วิจัยพบว่า P-3E10 molecule ไม่เหมือนกับโมเลกุลบนผิวเซลล์อื่นที่มีรายงานมาก่อนเลย ผู้วิจัยจึงคิดว่าโมเลกุล P-3E10 น่าจะเป็นโมเลกุลใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน เพื่อพิสูจน์ว่าโมเลกุลนี้เป็นโมเลกุลชนิดใหม่ ผู้วิจัยจึงทำการโคลน cDNA ที่กำหนดการสร้างโมเลกุล P-3E10

เพื่อโคลน cDNA ที่กำหนดสร้าง P-3E10 molecule ผู้วิจัยได้นำวิธีการโคลนยีนโดยระบบรีโทรไวรัส (retroviral expression cloning system)¹⁴ มาใช้ศึกษา โดยทำการเตรียม cDNA จากเซลล์ KG1a cell line แล้วนำ cDNA ที่ได้ใส่เข้าไปใน retroviral vector ชนิด pBMN-Z¹⁴ ได้เป็น KG1a cDNA library จากนั้นนำ KG1a cDNA library เหนี่ยวนำเข้าไปใน Phoenix packaging cells เพื่อผลิต ecotropic retroviruses แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีรีโทรไวรัสไป transduce เข้าไปในเซลล์หนู BW5147 จากนั้นทำการแยกเซลล์ BW5147 ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล P-3E10 ออกจากเซลล์ชนิดอื่น โดยการย้อม transduced BW cells ด้วย P-3E10 mAb โดยวิธีนี้เซลล์ที่ express P-3E10 molecule จะทำปฏิกิริยากับ P-3E10 mAb จะถูกคัดเลือกโดย magnetic bead sorting system จากนั้นนำเซลล์ที่คัดเลือกได้มาทำ single cell cloning โดยวิธี limiting dilution แล้วเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ได้ พร้อมกับพิสูจน์ว่าเซลล์ที่แยกได้มีการ express P-3E10 molecule หรือไม่วิธี indirect immunofluorescent assay ผลการศึกษาพบว่า BW5147 cells ที่เตรียมได้ให้ผลบวกกับ P-3E10 mAb ซึ่งแสดงให้เห็นว่า BW5147 cells เหล่านั้นมี cDNA ที่กำหนดการสร้าง P-3E10 molecule อยู่ใน genome

จากนั้นทำการสกัด RNA จาก BW5147 ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล P-3E10 และทำ RT-PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อตำแหน่งการสอดใส่ของยีนบน retroviral vector จากการทำการทดลองในลักษณะนี้ PCR product ที่ได้จะเป็นยีนที่กำหนดการสร้าง P-3E10 molecule อย่างไรก็ดีตามเพื่อพิสูจน์ว่า cDNA ที่ได้กำหนดการสร้าง P-3E10 molecule ผู้วิจัยได้นำ cDNA ที่ได้ไป re-ligate กลับเข้าไป retroviral vector แล้วนำไป express ใน BW5147 cells ตามขั้นตอนเดิมอีกครั้ง และพบว่า BW5147 cells ที่ได้มีการ express P-3E10 molecule บนผิวเซลล์ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า cDNA ที่แยกได้กำหนดการสร้าง P-3E10 molecule จริง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผู้วิจัยสามารถโคลน cDNA ที่กำหนดการสร้าง P-3E10 molecule ได้

เพื่อศึกษาว่า P-3E10 molecule มีลำดับ nucleotide และลำดับ amino acid เป็นอย่างไร จึงนำ cDNA ที่ได้ไปทำ DNA sequencing แล้วนำ nucleotide sequence และลำดับ amino acids ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (BLAST program at the NCBI) ผลการวิเคราะห์พบว่า โมเลกุล P-3E10 นั้นเหมือนกับ Na⁺,K⁺-ATPase β 3 subunit ทุกประการ (รูปที่ 13) ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า P-3E10 molecule คือ Na⁺,K⁺-ATPase β 3 subunit

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า P-3E10 mAb ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโมเลกุลบนผิวเซลล์ชื่อ Na^+, K^+ -ATPase $\beta 3$ และจากการศึกษาหน้าที่ของ P-3E10 molecule โดยใช้ P-3E10 mAb พบว่า P-3E10 molecule สามารถกวดการตอบสนองของ lymphocyte activation ได้ การค้นพบนี้นับเป็นครั้งแรกที่แสดงว่า Na^+, K^+ -ATPase $\beta 3$ subunit มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม lymphocyte activation ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า P-3E10 molecule (Na^+, K^+ -ATPase $\beta 3$ subunit) น่าจะเป็น cell surface molecule ที่ทำหน้าที่เป็น receptor โดยอาจเป็น receptor ต่อ soluble ligand หรือต่อโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิดอื่น ปฏิกริยาระหว่าง P-3E10 molecule ผ่าน specific ligand อาจกระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณใน 2 ลักษณะ คือ (1) สัญญาณชนิด negative signal ซึ่งทำให้เกิดการ down-regulation ของ lymphocyte activation และ (2) สัญญาณชนิด positive signal ที่นำไปสู่การ up-regulation ของ lymphocyte activation ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า P-3E10 mAb กวดการตอบสนองของ lymphocytes จึงเป็นไปได้ว่า P-3E10 mAb เมื่อจับกับ P-3E10 molecule อาจกระตุ้น negative regulatory signal หรือไป inhibit positive regulatory signal สุดท้ายนำไปสู่การกด lymphocyte activation

อย่างไรก็ตามกลไกการกด lymphocyte activation ยังไม่ทราบแน่ชัด จึงน่าสนใจอย่างมากที่จะมีการศึกษาต่อถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง lymphocyte activation นี้ ซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงกลไกการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น และอาจนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางคลินิกได้

P-3E10 molecule (หรือ Na^+, K^+ -ATPase $\beta 3$) ถึงแม้จะเป็นโมเลกุลที่มีรายงานมาก่อน แต่เท่าที่ทราบยังไม่มีรายงานถึงการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุลนี้มาก่อน และโมเลกุลนี้ยังไม่ถูกกำหนดชื่อในระบบของ CD ผู้วิจัยได้ส่ง P-3E10 mAb เข้าใน the 8th HLDA workshop เพื่อกำหนดชื่อในระบบ CD แล้ว โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ P-3E10 และผลในการควบคุมการทำงานของ lymphocyte นี้ ผู้วิจัยได้ยื่นขอจดสิทธิบัตรแล้ว


```

1
9 GAGGAGGTGTTCTCGGCCGTCCACCCCTTCACTGCCGTCTCCGGGCTGCGCCGCCGAGCCGGGACG CCCGTAAC
76 CGCCTCCGCAGCCCTCGCCGCTCCATCCCCGCGGCCGAGCTCCTCTCGCCGTCCGCGCGCACACC
Met Thr Lys Asn Glu Lys Lys Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ala Glu Trp Lys 17
143 ATG ACG AAG AAC GAG AAG AAG TCC CTC AAC CAG AGC CTG GCC GAG TGG AAG
Leu Phe Ile Tyr Asn Pro Thr Thr Gly Glu Phe Leu Gly Arg Thr Ala Lys 34
194 CTC TTC ATC TAC AAC CCG ACC ACC GGA GAA TTC CTG GGG CGC ACC GCC AAG
Ser Trp Gly Leu Ile Leu Leu Phe Tyr Leu Val Phe Tyr Gly Phe Leu Ala 51
245 AGC TGG GGT TTG ATC TTG CTC TTC TAC CTA GTT TTT TAT GGG TTC CTG GCT
Ala Leu Phe Ser Phe Thr Met Trp Val Met Leu Gln Thr Leu Asn Asp Glu 68
296 GCA CTC TTC TCA TTC ACG ATG TGG GTT ATG CTT CAG ACT CTC AAC GAT GAG
Val Pro Lys Tyr Arg Asp Gln Ile Pro Ser Pro Gly Leu Met Val Phe Pro 85
347 GTT CCA AAA TAC CGT GAC CAG ATT CCT AGC CCA GGA CTC ATG GTT TTT CCA
Lys Pro Val Thr Ala Leu Glu Tyr Thr Phe Ser Arg Ser Asp Pro Thr Ser 102
398 AAA CCA GTG ACC GCA TTG GAA TAT ACA TTC AGT AGG TCT GAT CCA ACT TCG
Tyr Ala Gly Tyr Ile Glu Asp Leu Lys Lys Phe Leu Lys Pro Tyr Thr Leu 119
449 TAT GCA GGG TAC ATT GAA GAC CTT AAG AAG TTT CTA AAA CCA TAT ACT TTA
Glu Glu Gln Lys Asn Leu Thr Val Cys Pro Asp Gly Ala Leu Phe Glu Gln 136
500 GAA GAA CAG AAG AAC CTC ACA GTC TGT CCT GAT GGA GCA CTT TTT GAA CAG
Lys Gly Pro Val Tyr Val Ala Cys Gln Phe Pro Ile Ser Leu Leu Gln Ala 153
551 AAG GGT CCA GTT TAT GTT GCA TGT CAG TTT CCT ATT TCA TTA CTT CAA GCA
Cys Ser Gly Met Asn Asp Pro Asp Phe Gly Tyr Ser Gln Gly Asn Pro Cys 170
602 TGC AGT GGT ATG AAT GAT CCT GAT TTT GGC TAT TCT CAA GGA AAC CCT TGT
Ile Leu Val Lys Met Asn Arg Ile Ile Gly Leu Lys Pro Glu Gly Val Pro 187
653 ATT CTT GTG AAA ATG AAC AGA ATA ATT GGA TTA AAG CCT GAA GGA GTG CCA
Arg Ile Asp Cys Val Ser Lys Asn Glu Asp Ile Pro Asn Val Ala Val Tyr 204
704 AGG ATA GAT TGT GTT TCA AAG AAT GAA GAT ATA CCA AAT GTA GCA GTT TAT
Pro His Asn Gly Met Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Pro Tyr Tyr Gly Lys Lys 221
755 CCT CAT AAT GGA ATG ATA GAC TTA AAA TAT TTC CCA TAT TAT GGG AAA AAA
Leu His Val Gly Tyr Leu Gln Pro Leu Val Ala Val Gln Val Ser Phe Ala 238
806 CTG CAT GTT GGG TAT CTA CAG CCA TTG GTT GCT GAT CAG GTC AGC TTT GCT
Pro Asn Asn Thr Gly Lys Glu Val Thr Val Glu Cys Lys Ile Asp Gly Ser 255
857 CCT AAC AAC ACT GGG AAA GAA GTA ACA GTT GAG TGC AAG ATT GAT GGA TCA
Ala Asn Leu Lys Ser Gln Asp Asp Arg Asp Lys Phe Leu Gly Arg Val Met 272
908 GCC AAC CTA AAA AGT CAG GAT GAT CGT GAC AAG TTT TTG GGA CGA GTT ATG
Phe Lys Ile Thr Ala Arg Ala Stop 279
959 TTC AAA ATC ACA GCA CGT GCA TAG TATGAGTAGGATATCTCCACAGAGTAAATGTTGTG
1018 TTGTCTGTCTTCATTTTGTAAACAGCTGGACCTTCCATTCTAGAAATTATGAGACCACCTTGGAGAAAG
1085 GTGTGTGGTACATGACATTGGGTTACATCATAACGTGCTTCCAGATCATAGTGTTCAGTGTCTCTG
1152 AAGTAACTGCCTGTTGCCTCTGCTGCCCTTTGAACCAAGTGTACAGTCGCCAGATAGGGACCGGTGAA
1219 CACCTGATTCCAAACATGTAGGATGGGGGTCTGTCTCTTTTTATGTGGTTTAATTGCCAAGTGTC
1286 TAAAGCTTAATATGCCGTGCTATGTAAATATTTTATGGATATAACAAGTGTGATATTTTGATGTCAA
1353 CAGAGTTTTAGGGATAAAATGGTACCCGCCAACATCAAGTGACTTTATAGCTGCAAGAAATGTGGT
1420 ATGTGGAGAAGTTCTGTATGTGAGGAAGGAAA

```

รูปที่ 13 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the cDNA encoding the P-3E10 molecule. Nucleotide positions are indicated on the left and amino acid positions on the right. The putative transmembrane-spanning domain is underlined. The six cysteines are boxed.

CA-1H4 Molecule

CA-1H4 mAb เป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดีอีกชนิดที่ได้มาจากหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย human T cell line Molt4 และถูกนำมาศึกษาถึงคุณสมบัติต่างๆ ในโครงการวิจัยนี้

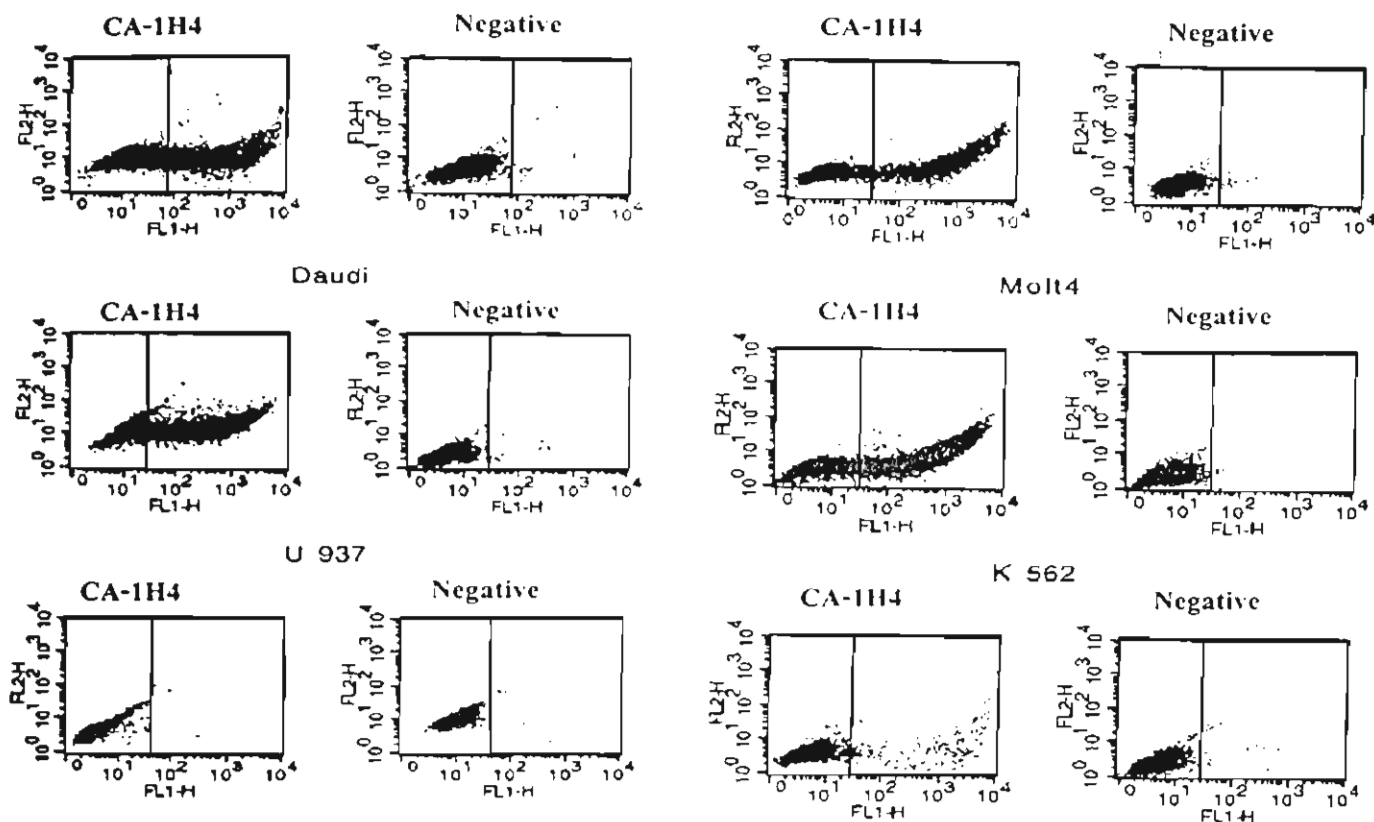
เพื่อศึกษา cellular distribution ของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ CA-1H4 mAb ผู้วิจัยได้ นำ purified CA-1H4 mAb มาย้อม hematopoietic cell lines ชนิดต่างๆ โดยวิธี indirect immunofluorescent และตรวจวิเคราะห์ด้วย flow cytometer ผลการทดลองพบว่า CA-1H4 mAb ทำปฏิกิริยาได้กับ human T cell lines คือ Jurkat, Molt4 และ Sup T1 และทำปฏิกิริยากับ B cell lines คือ Daudi แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ U937, HL60 และ K562 ซึ่งเป็น myeloid cell lines (รูปที่ 14) จากการศึกษาใน non-hematopoietic cell lines พบว่า Hela (human epithelial cervical carcinoma), 293 (human embryonic renal epithelial), MCF-7 (human breast cancer), OVM-Z (human ovarian cancer) และ TCL (human kidney cancer) ไม่ทำปฏิกิริยากับ CA-1H4 mAb ผลการศึกษานี้แสดงว่า CA-1H4 mAb เป็น lymphoid lineage specific monoclonal antibody และที่น่าสนใจคือ เซลล์ที่ให้ผลบวก มี pattern การย้อมเซลล์เป็นแบบ heterogeneous pattern (รูปที่ 14) คือ มีทั้งเซลล์ที่ negative และ positive ปะปนกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโมเลกุล P-3E10 น่าจะ express เฉพาะในบางระยะของเซลล์

เมื่อนำ CA-1H4 mAb มาทำปฏิกิริยากับ peripheral blood cells พบว่า CA-1H4 mAb ทำปฏิกิริยากับบาง sub-population ของ lymphocytes (รูปที่ 15) แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ monocytes, granulocytes และ red blood cells (รูปที่ 15)

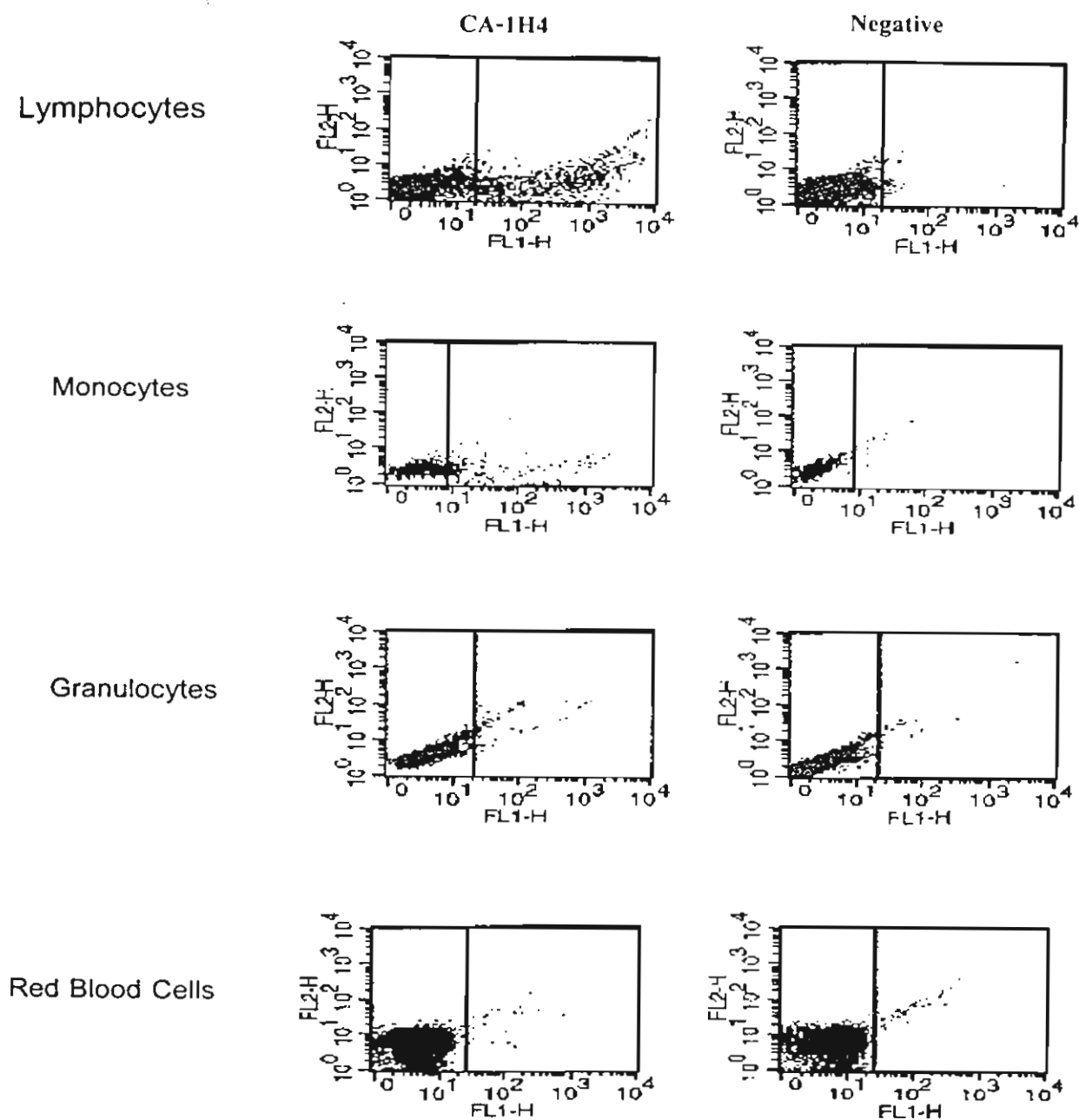
เมื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล CA-1H4 บน PHA และ PMA activated lymphocytes ที่เวลาต่างๆ พบว่าการกระตุ้น lymphocyte ด้วย PHA ทำให้การแสดงออกของโมเลกุล CA-1H4 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 1 หลังการกระตุ้น และจะลดลงในวันที่ 3, 5 และ 7 หลังการกระตุ้น (รูปที่ 16) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าโมเลกุล CA-1H4 น่าจะเป็น activation associated molecule ชนิดหนึ่ง

Jurkat

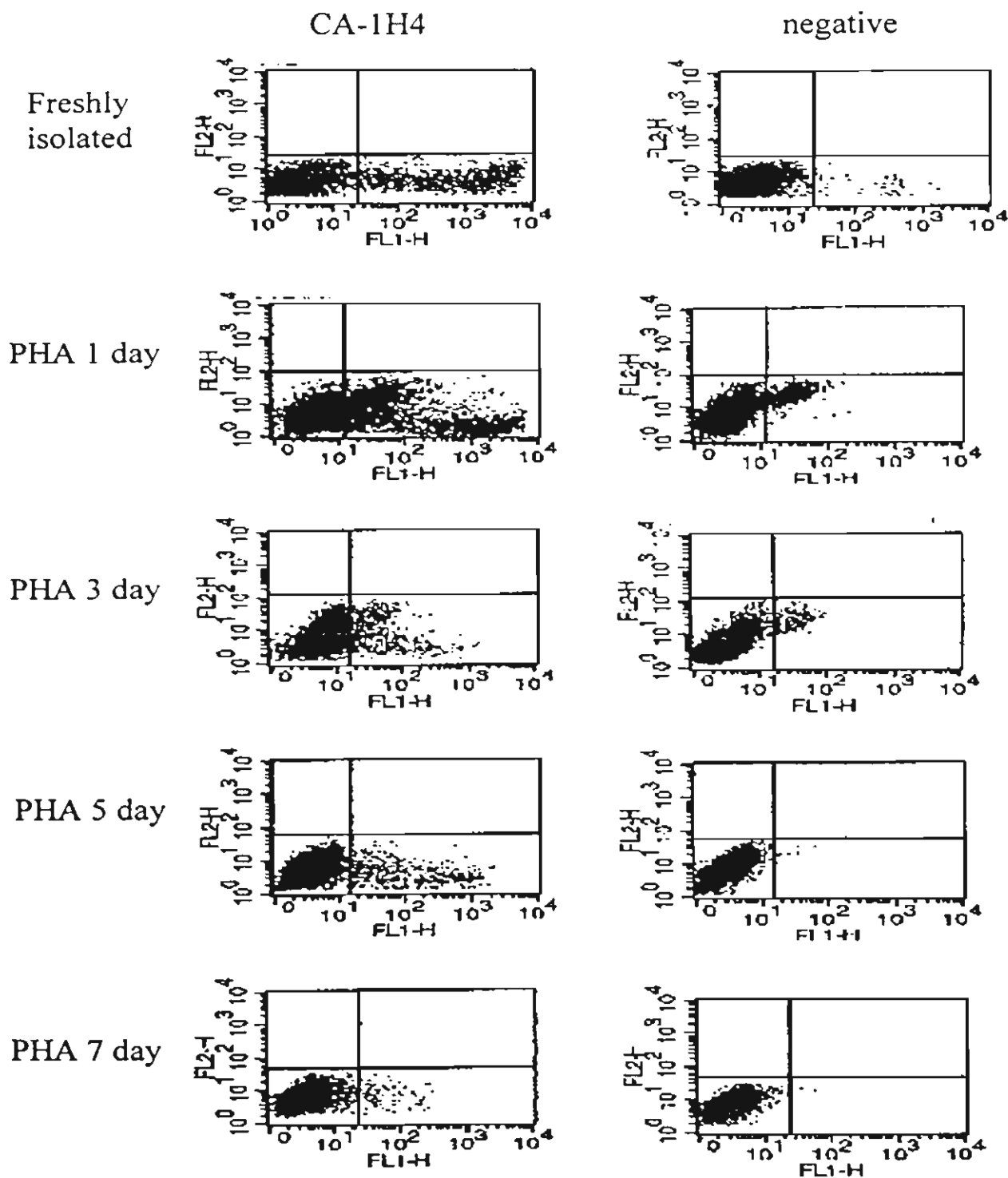
Sup T1



รูปที่ 14. Expression of CA-1H4 on various hematopoietic cell lines. The indicated cell lines were stained with CA-1H4 mAb by indirect immunofluorescence and analyzed by Flow cytometry. Left panels represent cells stained with mAb CA-1H4 and the right panel represent cells stained with negative control mAb.



รูปที่ 15. Expression of CA-1H4 on peripheral blood cells. The indicated cell lines were stained with CA-1H4 mAb by indirect immunofluorescence and analyzed by Flow cytometry. Left panels represent cells stained with mAb CA-1H4 and the right panel represent cells stained with negative control mAb.



รูปที่ 16. Expression of CA-1H4 on PHA activated lymphocytes. Lymphocytes were activated with PHA for 1, 3, 5 and 7 days. Activated cells were stained with mAb CA-1H4 by indirect immunofluorescent technique and analyzed by flow cytometry. Left panels represent cells stained with mAb CA-1H4 and the right panel represent cells stained with negative control mAb.

เนื่องจาก CA-1H4 mAb ทำปฏิกิริยากับบาง sub-populations ของ lymphocytes (รูปที่ 15) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาว่า lymphocyte sub-population ใดที่ express โปรตีน CA-1H4 จึงนำ purified CA-1H4 mAb มาติดฉลากกับสาร FITC แล้วนำมาศึกษา lymphocytes sub-population ที่ express CA-1H4 molecule โดยนำ mAb CA-1H4-FITC มาย้อมเซลล์ร่วมกับ anti-CD3 antibody ที่ติดฉลากด้วย phycoerythrin (CD3-PE), CD4-PE, CD8-PE, CD19-PE และ CD56-PE ผลการศึกษาในเลือดคนปกติทั้งหมด 8 คน พบว่า CA-1H4 molecule สามารถพบได้บน CD3+ cells (T lymphocytes), CD8+ cells (cytotoxic T cells), CD56+ cells (NK cells) แต่ไม่พบบน CD4+ cells (Helper T cells) และ CD19+ cells (B lymphocytes) (รูปที่ 17) ผลการศึกษาชี้ให้เห็น CA-1H4 molecule express บน sub-population ของ T cells และ NK cells แต่ไม่พบบน B cells

เพื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุล CA-1H4 ผู้วิจัยได้นำเอาวิธี Western blot มาศึกษา และพบว่า CA-1H4 mAb สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนขนาดประมาณ 55 kDa ในภาวะ reducing condition (รูปที่ 18)

เพื่อศึกษาน้ำหนักของโมเลกุล CA-1H4 ผู้วิจัยได้นำ CA-1H4 mAb มาใช้ในการศึกษาวิจัยและได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1. การศึกษาน้ำหนักของ CA-1H4 molecule ที่เกี่ยวข้องกับ T cell activation

ทำการศึกษาโดยกระตุ้น PBMC ด้วย immobilized anti-CD3 mAb (OKT3) ในสภาวะที่มีและไม่มี CA-1H4 mAb ผลการศึกษาพบว่า CA-1H4 mAb ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของ T lymphocytes ที่ถูกกระตุ้นผ่าน TCR/CD3 complex (รูปที่ 19) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า CA-1H4 molecule ไม่มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับ T cell activation

2. การศึกษาผลของ CA-1H4 mAb ต่อ spontaneous proliferation ของ hematopoietic cell lines

จากการศึกษาผลของ CA-1H4 mAb ต่อการแบ่งตัวของ hematopoietic cell lines ชนิดต่างๆ ผู้วิจัยได้นำเอา hematopoietic cell lines ชนิดต่างๆ มา culture ร่วมกับ CA-1H4 mAb แล้วดูผลของ CA-1H4 mAb ต่อ cell proliferation โดยวิธี ³H-thymidine incorporation assay ผลการทดลองพบว่า CA-1H4 mAb ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของ hematopoietic cell lines ชนิดใดเลย ที่นำมาศึกษา (รูปที่ 20)

3. การศึกษาผลของ CA-1H4 mAb ต่อการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis

ผู้วิจัยได้นำ CA-1H4 mAb มากระตุ้นการตายแบบ apoptosis ใน cell lines ชนิดต่างๆ และตรวจการเกิด apoptotic cells โดย Annexin V-FITC apoptosis detection kit ผลการทดลองพบว่า

CA-1H4 mAb สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ (รูปที่ 21) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า โมเลกุล CA-1H4 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าโมเลกุล CA-1H4 อาจเป็น receptor บนผิวเซลล์ที่รับสัญญาณจากภายนอก เมื่อมีการกระตุ้นโมเลกุล CA-1H4 จะมีการส่งสัญญาณ (signal transduction) เข้าสู่เซลล์ แล้วทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis

จากผลการศึกษาทั้งหมดเกี่ยวกับ CA-1H4 molecule ชี้ให้เห็นว่าโมเลกุลนี้เป็นโมเลกุลที่น่าสนใจมาก โดยเมื่อเปรียบเทียบ cellular distribution pattern คุณสมบัติทางชีวเคมี และหน้าที่ของ CA-1H4 กับ molecule อื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อน พบว่าไม่เหมือนกับ molecule ใดๆ เลย ผู้วิจัยเชื่อว่า CA-1H4 molecule น่าจะเป็น leukocyte surface molecule ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตาม เพื่อสรุปว่า CA-1H4 เป็นโมเลกุลที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ผู้วิจัยได้นำวิธี retroviral expression cloning system มาโคลน cDNA ที่กำหนดการสร้าง CA-1H4 protein

ในการโคลนยีนดังกล่าว ผู้วิจัยได้เตรียม cDNA จากเซลล์ KG1a แล้วนำ cDNA ที่ได้ใส่เข้าไปในรีโทรไวรัสเวกเตอร์ชนิด pBMN-Z ได้เป็น KG1a cDNA library จากนั้นนำ KG1a cDNA library เหนียวนาเข้าไปใน Phoenix packaging cells เพื่อผลิต ecotropic retroviruses แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีรีโทรไวรัสไป transduce เข้าไปในเซลล์หนู BW5147 จากนั้นทำการแยกเซลล์ BW5147 ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CA-1H4 ออกจากเซลล์ชนิดอื่น โดยการย้อม transduced BW cells ด้วย CA-1H4 mAb แยก positive cells โดย magnetic bead sorting system ผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถแยก positive cells ได้เลย ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหลายครั้งก็ไม่สามารถแยก BW5147 ที่ express CA-1H4 molecule ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ใช้ระบบการโคลน cDNA โดย retroviral expression cloning system เป็นระบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ไม่สามารถโคลน cDNA ที่กำหนดการสร้าง CA-1H4 ได้ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากใน KG1a cells มีการ express CA-1H4 molecule ในระดับต่ำ จึงทำให้ใน KG1a cDNA library มี CA-1H4 cDNA ในระดับต่ำไปด้วย จึงลดโอกาสในการแยกและโคลน cDNA ที่กำหนดการสร้าง CA-1H4

เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาศึกษาหาลำดับ amino acid sequence ของ CA-1H4 molecule โดยวิธี Protein sequencing แทน โดยทำการศึกษาดังนี้คือ นำ CA-1H4 mAb มาแยก CA-1H4 molecule โดยวิธี immunoprecipitation จากนั้นนำไปทำ SDS-PAGE ตัด gel แล้วนำไปทำ lyophilization แล้วส่งไปทำ amino acid sequencing ที่ Alta Bioscience ประเทศอังกฤษ และได้รับรายงานว่าไม่สามารถหาลำดับ amino acid sequence ได้

จากผลการศึกษาทั้งหมดที่เกี่ยวกับ CA-1H4 molecule แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลนี้น่าสนใจมาก กล่าวคือเมื่อเปรียบเทียบ cellular distribution pattern คุณสมบัติทางชีวเคมี และหน้าที่ของ CA-1H4 กับ molecule อื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อน พบว่าไม่เหมือนกับ molecule ใดๆ เลย ผู้วิจัยเชื่อว่า CA-1H4 molecule น่าจะเป็น leukocyte surface molecule ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าเสียดายอย่างยิ่งที่ hybridoma ที่สร้าง CA-1H4 mAb ที่ผลิตได้เป็น un-stable hybridoma clone และได้หยุดการสร้างแอนติบอดี ทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของ CA-1H4 ต่อไปได้

เนื่องจากโมเลกุลนี้เป็นโมเลกุลที่น่าสนใจมาก ผู้วิจัยจึงมีโครงการที่จะทำการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CA-1H4 molecule ขึ้นมาใหม่ แล้วนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของ CA-1H4 ต่อไป ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีนั้น ผู้วิจัยมีกลยุทธ์ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี คือ นำ CA-1H4 mAb ที่มีอยู่มาแยก Molt4 T cells ที่ express CA-1H4 ออกจาก CA-1H4 negative cells โดยวิธี Magnetic bead cell sorting system จากนั้นนำ Molt4 ที่ express CA-1H4 molecule (Molt4-CA-1H4 positive) แล้วนำมาเลี้ยงให้เพิ่มจำนวนและมาใช้เป็น immunogen ในการฉีดหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CA-1H4 molecule โดยวิธีนี้จะทำให้ผู้วิจัยสามารถผลิต CA-1H4 mAb ได้และน่าจะได้ hybridoma หลายโคลน จากนั้นจึงนำ hybridoma cells เหล่านั้นมาผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติ หน้าที่ และโคลน cDNA ที่กำหนดการสร้าง CA-1H4 molecule ต่อไป