



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย
วิธี DNA immunization

วัชร กสิณฤกษ์

ธันวาคม 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย
วิธี DNA immunization

วัชระ กสิณฤกษ์

ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA40-8-0016

ชื่อโครงการ: การศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

ชื่อนักวิจัย: รศ. ดร. วาเชระ กลิ่นฤกษ์

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

ระยะเวลาโครงการ: 1 ธันวาคม 2540-1 ธันวาคม 2543

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี โดยวิธี DNA immunization จากการศึกษาวิจัยตามระยะเวลาโครงการ ได้ผลการศึกษาโดยมีรายละเอียดและผลการทดลองดังนี้

การศึกษานี้เริ่มต้นด้วยการศึกษาวิธีการแยก plasmid DNA ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในวิธี DNA immunization และพบว่าวิธีการแยก plasmid DNA โดยวิธี Qiagen plasmid mega kit กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีจำเพาะได้ดีกว่าวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิด membrane protein และ secreted protein ในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ผู้วิจัยพบว่า plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง protein ชนิด membrane และ secreted protein กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีจำเพาะได้ไม่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาถึงการนำวิธี DNA immunization มาผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีนชนิดต่างๆ ผู้วิจัยได้นำ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง leukocyte surface proteins ชนิดต่างๆ รวมทั้ง plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง HBs antigen ฉีดหนูทางกล้ามเนื้อ พบว่าหนูสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อ encoded protein ได้เกือบทุกชนิด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี DNA immunization สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีจำเป็นต้องฉีด plasmid DNA 3-5 ครั้ง โดยพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี DNA immunization นี้เป็นชนิด IgG ไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM เลย เนื่องจากวิธี DNA immunization จำเป็นต้อง insert DNA เข้าไปใน eukaryotic expression vector ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาถึง eukaryotic expression vector ที่สามารถใช้ในงาน DNA immunization ได้จากการศึกษานี้พบว่า eukaryotic expression vectors หลายชนิดสามารถนำมาใช้ได้ เพื่อศึกษาถึงสารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ผู้วิจัยได้นำสาร DEAE Dextran, chloroquine และ PHA มาศึกษา และพบว่าการฉีด plasmid DNA ร่วมกับ DEAE Dextran, chloroquine และ PHA ไม่ได้ช่วยให้การสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ DEAE Dextran และ chloroquine กลับกดการสร้างแอนติบอดี

เนื่องจากการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยการฉีด plasmid DNA ทางกล้ามเนื้อนั้นต้องมีการฉีด plasmid DNA 3-5 ครั้งจึงกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ ผู้วิจัยจึงได้นำวิธี intrasplenic immunization (คือฉีด plasmid DNA เข้าไปในม้ามโดยตรง) มาใช้ และผลการทดลองพบว่าวิธี

intrasplenic immunization สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ด้วยการฉีด plasmid DNA เพียงครั้งเดียว

นอกจากในหนู ผู้วิจัยยังพบว่าวิธี DNA immunization สามารถนำมาผลิตแอนติบอดีได้ในกระต่าย ผู้วิจัยได้ทำการฉีด cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD4 protein เข้าไปในกระต่าย 3 ตัวทางกล้ามเนื้อ และพบว่ากระต่ายทุกตัวสามารถสร้าง polyclonal antibodies ที่จำเพาะต่อ CD4 protein ในระดับที่สูง เมื่อนำ anti-CD4 antibodies ที่ผลิตได้มาศึกษาหน้าที่ของ CD4 protein พบว่าแอนติบอดีนี้สามารถยับยั้ง PHA induced cell proliferation ได้

จากนั้นผู้วิจัยได้นำวิธี DNA immunization มาประยุกต์ใช้ในการผลิต monoclonal antibody โดยนำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD54 และ insert อยู่ใน pCDM8 vector ฉีดหนูทาง intrasplenic จากนั้นนำ spleen cells ของหนูมา fuse กับ myeloma cells และผลิต monoclonal antibody โดย hybridoma technique ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิต anti-CD54 monoclonal antibody ได้ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าวิธี DNA immunization สามารถนำมาผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีได้ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการนำวิธีนี้ไปผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจโดยที่ไม่จำเป็นต้องมี protein antigen

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังศึกษาถึงการผลิต monoclonal antibody โดยใช้ COS cell expression system มาใช้ในการเตรียม immunizing antigen ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยนำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD14 และ CD99 ที่ insert ใน eukaryotic expression vector ไป transfect เข้าไปใน COS cells จากนั้นนำ transfected COS cells ฉีดหนู นำ spleen cells ของหนูมา fuse กับ myeloma cells และผลิต monoclonal antibody ตามวิธี hybridoma technique ผลการทดลองพบว่า โดยวิธีนี้ผู้วิจัยสามารถผลิต anti-CD14 monoclonal antibodies ได้ทั้งหมด 5 clones และ anti-CD99 monoclonal antibodies ได้ทั้งหมด 3 clones แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ศึกษา cellular distribution, คุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโปรตีนจำเพาะได้

ผลงานที่ได้จากการศึกษาตามโครงการวิจัยนี้ ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติแล้ว จำนวน 4 เรื่อง

คำหลัก : DNA immunization, eukaryotic expression vector, polyclonal antibody, monoclonal antibodies, leukocyte surface molecule

Abstract

Project Code: RSA40-8-0016

Project Title: Study of factors affecting the enhancement of antibody production by DNA immunization

Investigator: Associate Professor Dr. Watchara Kasinrerk

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

Project Period: 1 December 1997- 1 December 2000

The objectives of this study are to study factors that involved in antibody production by using DNA immunization strategy. The outputs of this study are summarized as follows:

In our study, the plasmid DNA isolation methods were firstly evaluated. We found that plasmid DNA isolated by Qiagen plasmid mega kit induced antibody responses better than those isolated by cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation method. For induction of antibody responses, plasmid DNA encoding membrane protein and secreted protein were compared. Both type of plasmid DNA could induced antibody response in the same level. In order to study the use of DNA immunization for production of polyclonal antibody to various proteins, mice were intramuscular immunized with DNA encoding various leukocyte surface molecules and HBs antigen. We found that by this strategy, specific antibodies could be induced in mice sera. These results indicate that DNA immunization can be used to produce polyclonal antibodies against several type of proteins. However, to induce antibody responses, 3-5 plasmid DNA inoculations were required and the antibodies induced by DNA immunization were IgG isotype. As eukaryotic expression vector is always needed in DNA immunization technique, we therefore evaluated several eukaryotic expression vectors for induction of antibody production. It was found that several eukaryotic expression vectors can be used for this purpose. In order to enhance antibody production, several reagents including DEAE Dextran, chloroquine and phytohemagglutinin (PHA) were mix with plasmid DNA before mouse immunization. All reagents used, however, have no enhancing effect on antibody production. In contrast, DEAE Dextran and chloroquine suppressed antibody production.

As we found that 3-5 plasmid DNA intramuscular immunizations were needed for induction of antibody response, intrasplenic immunization was then studies for using as inoculation route. In contrast to intramuscular immunization, only a single DNA intrasplenic injection resulted in the production of serum antibodies.

In addition to the production of antibody in mice, we also found that DNA immunization could be used to produce antibody in rabbits. cDNA encoding CD4 protein were immunized into 3 rabbits and high titer of anti-CD4 antibodies were generated in all immunized rabbits. The generated CD4 antibodies could be used for functional characterization of CD4 protein, i.e., it strongly suppressed PHA induced cell proliferation.

The DNA immunization was then applied for monoclonal antibody production. In our studies, CD54-DNA in pCDM8 vector were intrasplenic immunized into Balb/c mouse. The spleen cells of the immunized mouse were fused with myeloma cells using conventional hybridoma technique. A hybridoma producing anti-CD54 monoclonal antibody was generated. This study indicates that DNA immunization technique can be applied for the production of monoclonal antibody. This finding is very useful for production of antibodies to molecules where the protein antigen is not available or difficult to prepare, but cDNA encoding the corresponding protein is available.

Furthermore, we study the production of monoclonal antibody by using COS cell expression system to produce immunizing antigen. In this study, cDNA encoding CD14 and CD99 inserted in eukaryotic expression vector were transfected into COS cells. The transfected COS cells were then immunized into mice and the spleen cells were fused with myeloma cells using conventional hybridoma technique. By this technique, 5 clones of anti-CD14 monoclonal antibodies and 3 clones of anti-CD99 monoclonal antibodies were produced. The generated antibodies could be used for cellular distribution analysis, biochemical characterization and functional study of the corresponding proteins.

Taken together, from this research project, 4 papers were published.

Keywords: DNA immunization, eukaryotic expression vector, polyclonal antibody, monoclonal antibody, leukocyte surface molecule

บทนำ

ในช่วง 5-6 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยหลายกลุ่มได้ศึกษาถึงการนำเอา DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนของเชื้อโรคชนิดต่างๆฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลองเพื่อให้สัตว์ทดลองเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ encoded protein ขึ้น โดยหวังว่าจะสามารถนำเอาวิธี DNA immunization นี้ไปพัฒนาเป็นวิธีการให้วัคซีนป้องกันโรคแทนวิธีการให้วัคซีนที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จากการศึกษาดังกล่าวนักวิจัยเหล่านั้นพบว่า การฉีด plasmid DNA ที่มียีนที่กำหนดการสร้าง antigenic protein และ insert อยู่ใน expression vector ที่เหมาะสม สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral immunity และ cellular immunity ต่อ encoded protein ขึ้นได้¹⁻⁴

กลไกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยวิธี DNA immunization นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าน่าจะเกิดจากการที่ยีนที่เชื่อมต่อกับ plasmid vector นั้นเกิดการแสดงออกโดยสร้าง encoded protein ออกมาในร่างกายของผู้รับ plasmid DNA นั้น และถ้า encoded protein นั้นๆ มีคุณสมบัติเป็น antigenic protein ก็จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและทำให้ร่างกายเกิดภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อโปรตีนนั้นๆได้^{1,4-6} จากหลักการดังกล่าวนี้ นักวิจัยหลายกลุ่มสามารถนำเอาวิธี DNA immunization มาประยุกต์ใช้เพื่อการป้องกันรักษาโรคและประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้งานได้^{7,8} อย่างไรก็ตามก็ยังมีนักวิจัยอีกจำนวนไม่น้อยที่ไม่ประสบผลสำเร็จจากการนำเอาวิธีนี้มาใช้ จากประสบการณ์ของผู้วิจัยเองและจากการแลกเปลี่ยนความรู้และผลงานวิจัยกับนักวิจัยทั้งในและต่างประเทศพบว่าวิธีนี้สามารถใช้ได้ผลดีมากกับบาง DNA ขณะที่ใช้ไม่ได้ผลกับบาง DNA นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนบางชนิดโดยตัวของมันเองไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ แต่เมื่อเชื่อมกับ DNA อื่น กลับสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ เช่น cDNA ที่กำหนดการสร้าง hepatitis C virus nucleocapsid ซึ่งโดยตัวของมันเองไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด anti-HCV antibody ได้ แต่เมื่อนำ cDNA ดังกล่าวมาเชื่อมต่อกับ cDNA ที่กำหนดการสร้าง hepatitis B surface antigen แล้วพบว่า chimeric vector สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ hepatitis C virus nucleocapsid ได้⁹ หรือการ co-immunization ระหว่าง DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจกับ DNA ที่กำหนดการสร้าง cytokine บางชนิด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนที่สนใจได้ดียิ่งขึ้น^{10,11}

เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาดังกล่าวเหล่านี้เข้าด้วยกัน ทำให้เชื่อว่าน่าจะมีปัจจัยต่างๆ หลายอย่างที่ทำให้วิธี DNA immunization ประสบผลสำเร็จหรือล้มเหลว เช่น อาจขึ้นกับ plasmid vector ที่ใช้ขึ้นกับ nucleotide sequences ของยีนที่สนใจ ขึ้นกับคุณสมบัติหรือลักษณะของ encoded proteins เช่นการเป็น membrane protien หรือการเป็น secreted protein หรือขึ้นกับโครงสร้างของ encoded protein ตลอดถึงขึ้นกับ route และ dose ของ DNA ที่ให้ นอกจากนี้ยังอาจขึ้นกับวิธีการหรือสารที่จะมาเพิ่มประสิทธิภาพในการนำ (uptake) DNA เข้าสู่เซลล์ของผู้รับ และสารยับยั้งการทำลาย DNA ภายหลังการเข้าเซลล์

ปัจจุบันในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยมี cDNA ที่กำหนดการสร้าง human leukocyte surface antigens หลายชนิด ได้แก่ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD1a, CD4, CD8, CD14, CD45, CD54, CD99, และ CD147 โปรตีน โดย cDNA เหล่านี้ insert อยู่ใน eukaryotic expression vector ชนิด pTH3M หรือ pCDM8 และยังมี cDNA ที่กำหนดการสร้าง hepatitis B surface antigen (small หรือ S protein) ที่ insert อยู่ใน pRc/CMV vector นอกจากนี้ยังมี cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 ที่ได้ตัดส่วน transmembrane ออกและต่อเข้ากับ DNA ที่กำหนดการสร้าง constant domain ของ human IgG1 ทำให้ได้เป็น fusion DNA ที่สร้าง secreted CD147 protein (โดยที่ native form ของ CD147 protein เป็น membrane protein) เมื่อพิจารณาถึง cDNA ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยเหล่านี้ จะเห็นว่าประกอบด้วย cDNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่มีลักษณะต่างๆ ทั้งที่เป็น membrane proteins และเป็น secreted proteins บางชนิดกำหนดการสร้างโปรตีนที่จัดเป็น immunoglobulin superfamily บางชนิดกำหนดการสร้างโปรตีนที่เป็น adhesion protein นอกจากนี้ยังมี cDNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดเดียวกันทั้งที่เป็น membrane และ secreted form จากความหลากหลายของ DNA ที่มีอยู่ ทำให้นำจะมีประโยชน์อย่างมากในการที่จะนำเอามาศึกษาถึง conditions และ factors ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องหรือมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของวิธี DNA immunization ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงหลักการของวิธี DNA immunization ผู้วิจัยเชื่อว่าวิธี DNA immunization นี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อโปรตีนที่สนใจได้ โดยเฉพาะในกรณีที่โปรตีนที่สนใจนั้นเตรียมยาก หรือไม่มี

ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ จึงมีความคิดที่จะศึกษาถึง conditions และ factors ต่างๆ ที่เหมาะสมเพื่อนำเอาวิธี DNA immunization มาใช้ในการผลิตแอนติบอดี และการนำวิธี DNA immunization ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจ โดยจะทำการศึกษาในข้อหัวต่างๆ ดังนี้คือ

- 1) ศึกษาถึงคุณสมบัติหรือลักษณะของ encoded protein ที่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีสำหรับวิธี DNA immunization
- 2) ศึกษาถึง plasmid vector ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในงาน DNA immunization โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง eukaryotic expression vector ชนิดต่างๆ
- 3) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization
- 4) ศึกษาเปรียบเทียบ routes และ doses ของการให้ plasmid DNA
- 5) ศึกษาถึงการนำเอาวิธี DNA immunization มาประยุกต์เพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี

ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้รู้และเข้าใจถึงกลไกการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ได้ดียิ่งขึ้น ความรู้พื้นฐานที่ได้จากการศึกษานี้น่าจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการที่จะนำเอาวิธีนี้มาใช้ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดต่างๆ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียม plasmid DNA

1.1 การเตรียม competent bacteria

1. Streak เชื้อ *E. coli* strain ที่เหมาะสม ลงบน LB agar plate เลี้ยงที่ 37°C ข้ามคืน
2. เลือก single colony จาก plate ในข้อ 1 แล้ว inoculate ลงใน LB broth 5 ml (ซึ่งอยู่ในหลอดทดลองขนาด 50 ml) นำไป incubate ใน shaking incubator ที่ 37°C โดย shake ไปด้วยที่ 250 rpm จนความขุ่นของแบคทีเรีย มีค่า OD. ที่ 600 nm เท่ากับ 0.3
3. Inoculate เชื้อที่ได้ในข้อ 2 จำนวน 2 ml ลงใน pre-warmed LB broth 50 ml ซึ่งอยู่ใน flask ขนาด 500 ml นำไปเลี้ยงที่ 37°C shake 275 rpm จนความขุ่นของแบคทีเรีย มีค่า OD. ที่ 600 nm เท่ากับ 0.2 จากนั้นนำ flask ที่เลี้ยงแบคทีเรียไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง
4. ถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml แช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 3000 rpm 15 นาที ที่ 4°C แล้วเทส่วนใส (supernatant) ออกจนหมด
5. กระจายเซลล์ที่ได้ใน Tfb I solution 20 ml แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นอีกที่ 3000 rpm 15 นาที ที่ 4°C แล้วเทส่วนใส (supernatant) ออกจนหมด
6. กระจายเซลล์ที่ได้ใน Tfb II solution 2 ml แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นแบ่งแบคทีเรียใส่ใน pre-chilled vial ละ 500 μ l เก็บที่ -70°C

1.2 การ transform plasmid DNA เข้าไปใน competent bacteria

1. นำ stock competent bacteria จาก -70°C มาละลายในน้ำแข็ง
2. คูด 100 μ l competent bacteria ใส่ลงใน pre-chilled tube
3. เติม plasmid vector ที่มี DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจลงไปเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน
4. แช่ในอ่างน้ำแข็ง 40 นาที
5. นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 42°C นาน 45 วินาที
6. แช่ในอ่างน้ำแข็งอีก 2 นาที
7. เติม SOC medium 1 ml แล้วนำไปเลี้ยงใน shaking incubator (37°C shake 250 rpm) นาน 1 ชั่วโมง
8. คูด 100 μ l ของ transformed bacteria แล้ว spread บน LB agar plate ที่มี antibiotic อยู่ นำ plate ไป incubate ที่ 37°C ข้ามคืน

1.3 การเตรียม plasmid DNA จาก transformed bacteria

1. Inoculate transformed *E. coli* ที่มี DNA ที่ต้องการ ลงใน 5 ml ของ TB-antibiotic broth แล้วนำไปเลี้ยงใน shaker ที่ 37°C ประมาณ 3-5 ชั่วโมง
2. ถ่ายแบคทีเรียที่ได้ไปใน TB-antibiotic broth หรือ LB antibiotic broth 250 ml ซึ่งอยู่ใน flask ขนาด 500 ml จำนวน 4 flasks นำไปเลี้ยงใน shaker ที่ 37°C ประมาณ 15-18 ชั่วโมง
3. ถ่ายแบคทีเรียที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml แล้วนำไปปั่นที่ 3200 rpm 30 นาที เท supernatantทิ้งให้หมด
4. แยก bacteria โดยใช้ lysozyme solution, 0.2 M NaOH-1%SDS และ potassium acetate solution
5. นำไปปั่นเก็บ supernatant แล้วนำไปเทผ่านผ้า gauze หลายๆ ชั้น
6. นำ supernatant ไปแยก plasmid DNA โดยใช้วิธี 2 วิธีคือ วิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี commercial Qiagen plasmid mega kit
7. นำ DNA pellet ไปทำให้แห้ง โดยการอบที่ 37°C นาน 30 นาที
8. ละลายตะกอนที่ได้ด้วย PBS แล้วนำไปวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ plasmid DNA โดยการวัด OD ที่ 260 และ 280 nm

2. การพิสูจน์ plasmid DNA ที่เตรียมได้

2.1 การตัดด้วย restriction enzyme และการศึกษาขนาดของ DNA fragment ด้วย agarose gel electrophoresis

1. นำ plasmid DNA ที่แยกได้ มาตัดด้วย restriction enzyme ใน buffer ที่เหมาะสม ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
2. จากนั้นนำ plasmid DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme แล้วนี้ ไปทำ agarose gel electrophoresis นำแผ่น agarose ไปย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide solution ดัง Ethidium bromide ออกจาก gel โดยแช่น้ำ 15 นาที
3. นำแผ่น agarose ไปส่องดู DNA ด้วย UV transilluminator แล้วถ่ายภาพเก็บไว้

2.2 การศึกษาการ express protein ที่ ถูกกำหนดการสร้างโดย plasmid DNA ที่แยกได้โดย COS cell expression system

2.2.1. การทำ COS cell transfection โดยวิธี DEAE-Dextran transfection

1. เพาะเลี้ยง COS cells ความเข้มข้น 1×10^6 cells/4 ml (ใน 10%FCS-MEM) ใน tissue culture dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 cm ที่ 37°C ใน 5%CO₂ incubator ข้ามคืน
2. เตรียม transfection solution ดังนี้
 - MEM medium 2 ml
 - DEAE-Dextran solution (stock conc. 10 mg/ml) 50 μl
 - Chloroquine solution (stock conc. 10 mM) 80 μl
 - Plasmid DNA (100 $\mu\text{g/ml}$) 10 μlผสมให้เข้ากันอย่างดี
3. ดูด medium ออกจาก COS cells dish ในข้อ 1 แล้วเติม transfection solution (ในข้อ 2) ลงไป แล้วนำไป incubate ที่ 37°C ใน 5%CO₂ incubator 3 ชั่วโมง
4. ครบเวลา ดูด transfection solution ที่เติม 2 ml ของ 10%DMSO ใน PBS ลงไป ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วดูด 10%DMSO solution ที่ทิ้ง dish 1 ครั้งด้วย MEM medium แล้วเลี้ยง COS cells ใน 10%FCS-MEM นาน 72 ชั่วโมง

2.2.2. การทดสอบการสร้างโปรตีนบนผิวเซลล์โดยวิธี indirect immunofluorescent

1. นำ transfected COS cells ความเข้มข้น 1×10^7 cells/ml มา 50 μl ผสมกับ monoclonal antibody ที่จำเพาะกับแอนติเจนที่สนใจ (ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$) incubate ที่ 4°C 30 นาที
2. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 1%BSA-PBS 0.02% azide แล้วเติม rabbit anti-mouse immunoglobulin-FITC incubate ที่ 4°C อีก 30 นาที
3. ล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย 1%BSA-PBS 0.02% azide แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้อง fluorescent หรือตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

3. การฉีด plasmid DNA เข้าไปในหนู Balb/C และกระต่าย

1. ฉีด plasmid DNA 100 μg เข้าบริเวณกล้ามเนื้อขาหลังของหนูทั้ง 2 ข้างโดยฉีดทุกๆ 2 สัปดาห์ สำหรับกระต่าย ฉีด plasmid DNA 500 μg ต่อ dose เข้าทางกล้ามเนื้อขาหลัง ทุก 2 สัปดาห์
2. เจาะเก็บเลือดทุกครั้งก่อนฉีด แยกซีรัม เก็บที่ -20°C

4. ศึกษาถึงคุณสมบัติหรือลักษณะของ encoded protein ที่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีสำหรับวิธี DNA immunization

1. นี๊ด plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ insert อยู่ใน eukaryotic expression vector pCDM8 ตามวิธีในข้อ 3
2. เจาะเลือดจากสัตว์ทดลองก่อนฉีดทุกครั้ง
3. ตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัมของสัตว์ทดลองโดยวิธี indirect immunofluorescent หรือโดยวิธี ELISA เปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีของ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง encoded protein ที่มีคุณสมบัติหรือลักษณะต่างๆ

5. การศึกษาสารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

1. นำ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนต่างๆ ผสมกับสาร DEAE Dextran, chloroquine หรือ phytohemagglutinin (PHA) จากนั้นนำไปฉีดหนูตามวิธีข้อ 3
2. ศึกษาเปรียบเทียบการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเมื่อมีและไม่มีสาร DEAE Dextran, chloroquine หรือ phytohemagglutinin (PHA) โดยวิธี immunofluorescence

6. การผลิต monoclonal antibody โดยใช้ transfected COS cells เป็น immunizing antigen

1. นำ plasmid DNA 2 μ g transfect เข้าไปใน COS cells โดยวิธี DEAE-Dextran transfection
2. หลังจากนั้น 3 วันตรวจสอบการสร้าง encoded protein บนผิว COS cells โดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยกล้อง fluorescent microscope
3. นำ transfected COS cells ฉีดหนูทาง intraperitoneal ทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง และฉีด intravenous
4. จากนั้น 3 วัน นำ spleen cells มา fuse กับ myeloma cells ตามวิธี hybridoma มาตรฐาน ตรวจสอบ hybridoma ที่สร้างแอนติบอดีที่สนใจโดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยเครื่อง flow cytometer
5. นำ hybridoma ที่สร้างแอนติบอดีที่สนใจมาทำ limiting dilution 2 รอบ แล้วนำไปผลิตแอนติบอดีทั้งในรูป culture supernatant และ ascites

7. การศึกษา cellular distribution, biochemical characterization และหน้าที่ของ CD4, CD14 และ CD99 molecule

1. นำแอนติบอดีต่อ CD4, CD14 และ CD99 มาศึกษา cellular distribution บนเซลล์ชนิดต่างๆ โดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

2. ศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลของโปรตีนจำเพาะ โดยวิธี immunoprecipitation ร่วมกับ chemiluminescence detection system
3. ศึกษาหน้าที่ของ CD4 protein โดยดูการยับยั้ง PHA induced cell proliferation ศึกษาหน้าที่ของ CD14 โดยดูการยับยั้ง LPS binding ศึกษาหน้าที่ของ CD99 โดยศึกษาการกระตุ้น Jurkat cell aggregation และศึกษา signal transduction ผ่าน CD99 molecule โดยใช้ protein tyrosine kinase และ protein kinase C inhibitors คุรยละเอียดใน reprints ที่แนบมาด้วยในภาคผนวก

ผลการทดลองและวิจารณ์

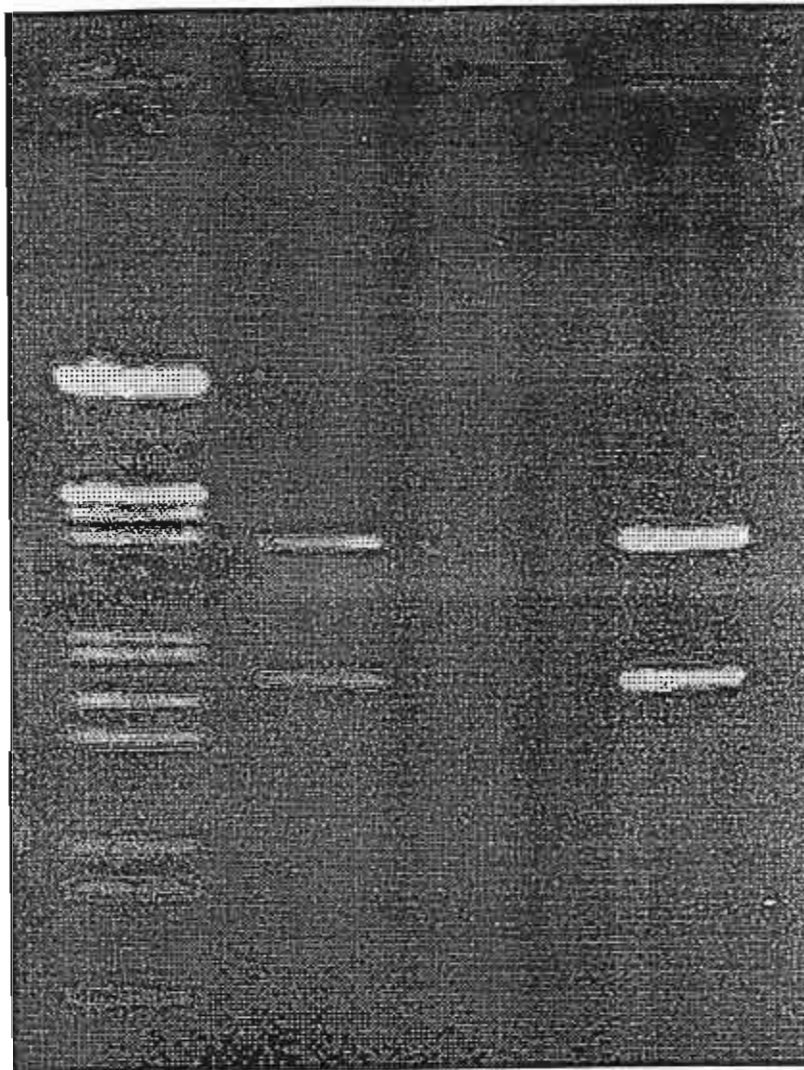
1. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีเตรียม plasmid DNA เพื่อใช้ในวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษาวิธีที่ดีที่สุดเพื่อใช้ในการเตรียม plasmid DNA เพื่อใช้ในวิธี DNA immunization จึงทำการแยก plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 membrane protein โดยวิธี 2 วิธี คือ วิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี commercial Qiagen plasmid mega kit ที่ใช้หลักการ anion exchange chromatography แล้วนำ plasmid DNA ที่เตรียมได้มาศึกษาการกระตุ้นการสร้าง anti-CD147 antibodies ในหนู

ผลการทดลองพบว่าทั้งวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี commercial Qiagen plasmid mega kit สามารถใช้เตรียม CD147-DNA ได้ดี คือเมื่อนำ plasmid DNA ที่เตรียมได้มาทำ restriction enzyme fragment analysis พบว่า plasmid DNA ที่เตรียมได้โดยวิธีทั้งสองให้ผลเหมือนกันคือเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ XbaI จะทำให้ plasmid DNA แยกออกเป็นส่วนของ vector และส่วนของ insert (รูปที่ 1) และโดยวิธี COS cell expression system พบว่า plasmid DNA ที่เตรียมได้จากวิธีทั้ง 2 สามารถ express เป็น CD147 protein ใน eukaryotic COS cells ในหลอดทดลองได้ (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า plasmid CD147-DNA ที่เตรียมได้จากทั้ง 2 วิธีสามารถสร้าง encoded protein ใน eukaryotic cells ได้

แต่เมื่อนำ plasmid CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธีทั้งสองไปฉีดหนูกทาง intramuscular immunization พบว่า plasmid CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Qiagen kit ให้ผลในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่า กล่าวคือ จากการฉีดหนูทั้งหมด 5 ตัวด้วย CD147-DNA ที่เตรียมได้โดย Qiagen plasmid mega kit พบว่าหนูทุกตัวสร้าง anti-CD147 antibody (คิดเป็น 100%) ขณะที่หนูที่ฉีดด้วย CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation นั้นมีหนู 3 ใน 5 ที่สร้างแอนติบอดี คิดเป็น 60% ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า plasmid DNA ที่เตรียมได้โดยใช้ Qiagen kit นี้มีความเหมาะสมกับงาน DNA immunization มากกว่าการเตรียม plasmid DNA โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation ซึ่งในการทดลองต่อไป ผู้วิจัยได้ใช้ Qiagen mega kit มาใช้ในการเตรียม plasmid DNA

STD
marker **1** **2**



รูปที่ 1 แสดงผลการตัด plasmid CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี Qiagen plasmid Mega kit ด้วย XbaI enzyme

เลนที่ 1 เป็น CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation

เลนที่ 2 เป็น CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Qiagen plasmid Mega kit

ตารางที่ 1 แสดงผลการย้อม COS cells ที่ transfect ด้วย CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี Qiagen plasmid Mega kit ด้วย anti-CD147 monoclonal antibody และ myeloma negative control antibody

Plasmid DNA isolation method	Monoclonal antibody	
	CD147 mAb	Myeloma control
Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation	+	-
Qiagen plasmid mega kit	+	-

นำ COS cells มา transfect ด้วย CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี Qiagen plasmid Mega kit โดยวิธี DEAE-Dextran transfection แล้วนำ transfected COS cells มาย้อมด้วย anti-CD147 monoclonal antibody และ myeloma negative control antibody โดยวิธี indirect immunofluorescent ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย Fluorescent microscope

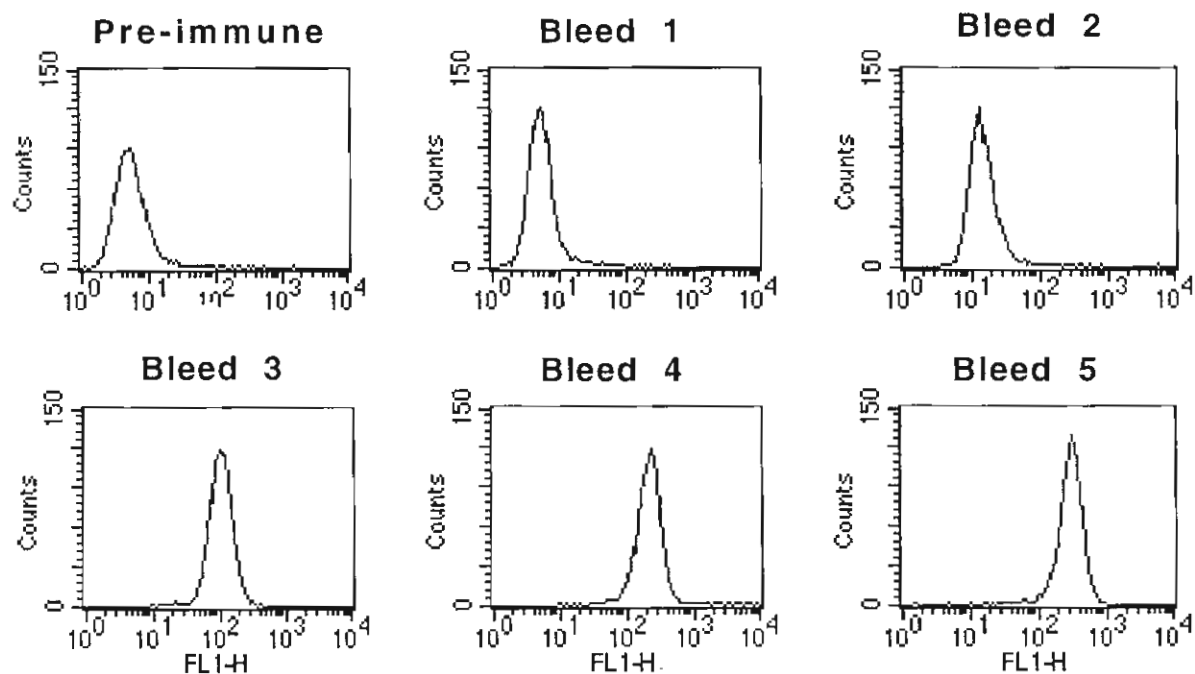
2. การเปรียบเทียบ encoded protein ชนิด membrane protein และ secreted protein ในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ encoded protein ที่เป็น membrane protein และ secreted protein โดยวิธี DNA immunization ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 เป็น model โดยความร่วมมือของ Prof. Dr. Hannes Stockinger จาก Institute of Immunology, University of Vienna ประเทศออสเตรีย ซึ่งนำ CD147-DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 protein ชนิด membrane form (clone H34 ซึ่งผู้วิจัยเป็นผู้โคลน) มาตัดส่วนที่กำหนดการสร้าง transmembrane region ออก แล้วต่อเชื่อมกับ constant Fc region ของ human IgG แล้ว insert กลับเข้าไปใน eukaryotic expression vector ทำให้ได้ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 ชนิด secreted form จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการเตรียม plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 membrane form และ secreted form ให้ได้ปริมาณมากโดยวิธี Qiagen kit ซึ่ง plasmid DNA ทั้ง 2 ชนิดที่เตรียมได้เมื่อนำมาศึกษาก่อนนำไปฉีดหนู พบว่ามีส่วนของ CD147 DNA insert อยู่ และ plasmid DNA ทั้ง 2 ชนิด สามารถ express เป็น CD147 protein ใน COS cells ในหลอดทดลองได้

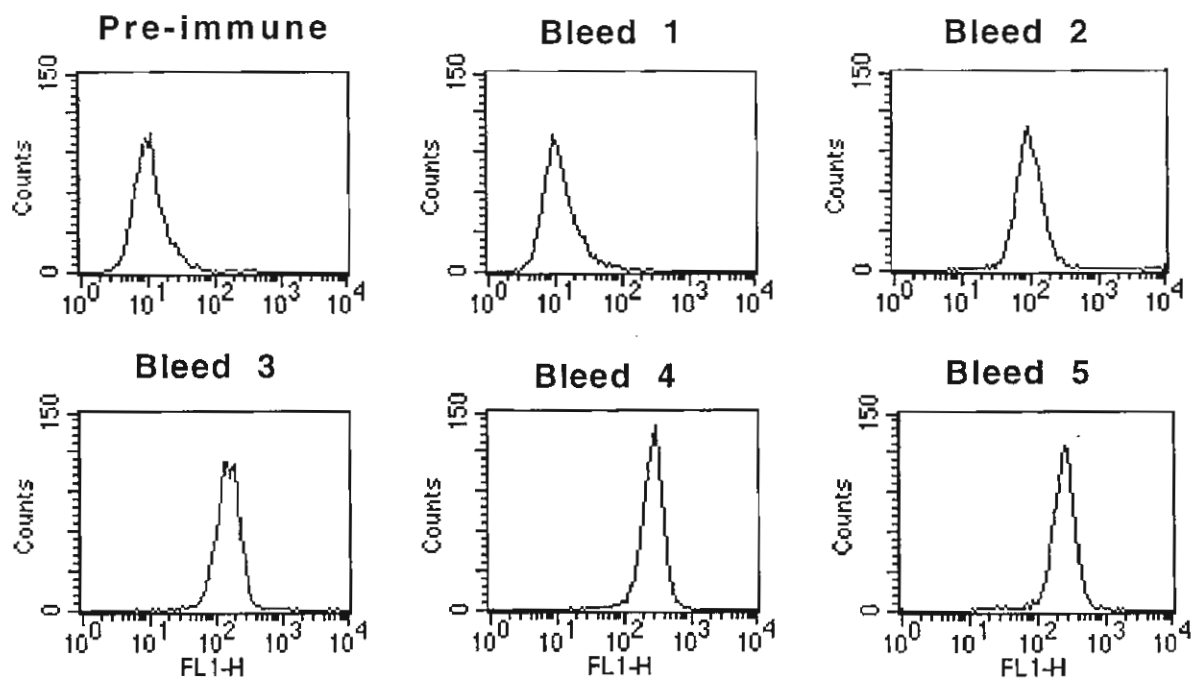
เพื่อศึกษาการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนู จึงนำ CD147-DNA (membrane form) และ CD147-DNA (secreted form) ฉีดเข้าไปในหนูอย่างละ 5 ตัว จำนวน 5 ครั้ง ทาง intramuscular immunization เก็บเลือดตรวจหาระดับ anti-CD147 antibody โดยวิธี indirect immunofluorescent โดยใช้ CD147 expressing cell line U937 เป็นแอนติเจนและตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer ผลการทดลองพบว่า CD147-DNA ทั้ง 2 forms สามารถกระตุ้นการสร้าง anti-CD147 antibody ได้ (ดูรูปที่ 2) โดยสามารถตรวจพบแอนติบอดีหลังการฉีด DNA ตั้งแต่ 1-4 ครั้ง (ดูตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี (โดยเปรียบเทียบค่า mean fluorescence intensity ที่ได้จากเครื่อง flow cytometer) พบว่า CD147-DNA ทั้ง 2 forms กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ได้ไม่แตกต่างกัน

ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าวิธี DNA immunization สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีพอๆ กัน ไม่ว่า encoded protein จะเป็น secreted protein หรือ membrane bound protein

CD147 membrane form



CD147 secreted form



รูปที่ 2 แสดง FACS profile ของ anti-CD147 antibody หลังการฉีดด้วย CD147-DNA membrane form และ CD147-DNA secreted form รูปที่แสดงเป็นผลการทดลองของหนู 1 ตัวจากทั้งหมด 5 ตัว

ตารางที่ 2 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย CD147-DNA membrane form และ CD147-DNA secreted form ในหนู 5 ตัว

Dose	CD147-DNA membrane form***					CD147-DNA secreted form***				
	Mouse number					Mouse number				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Pre-immune*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dose 1**	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dose 2	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Dose 3	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
Dose 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dose 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Pre immune = ซ้ำก่อนฉีด CD147-DNA

** Dose 1-5 = ซ้ำหลังฉีด CD147-DNA ครั้งที่ 1-5 ตามลำดับ

*** CD147-DNA membrane form, CD147-DNA secreted form = cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 โปรตีน แบบ membrane bound form และ แบบ secreted form ตามลำดับ

3. การศึกษาการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ encoded protein ชนิดต่างๆ โดยวิธี DNA

immunization

เพื่อศึกษาการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ต่อ encoded protein ที่มีคุณสมบัติและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน จึงทำการศึกษาโดยเตรียม plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง human leukocyte surface protein ชนิดต่างๆ ได้แก่ CD1a, CD4, CD14, CD45, CD54 และ CD147 โปรตีน ด้วย Qiagen plasmid kit เมื่อนำ plasmid DNA ที่เตรียมได้มาทำ restriction enzyme fragment analysis พบว่า plasmid DNA ที่เตรียมได้ทั้งหมดประกอบด้วยส่วนของ vector และ insert และโดยวิธี COS cell expression system พบว่า plasmid DNA ทุกชนิด สามารถ express เป็น encoded protein ใน COS cells ในหลอดทดลองได้

เมื่อนำ plasmid DNA ที่เตรียมได้ฉีดหนูทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 5 ครั้ง ทาง intramuscular immunization นำซีรัมของหนูตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะโดยวิธี indirect immunofluorescent พบว่า หนูที่ฉีดด้วย CD4-DNA, CD14-DNA, CD45-DNA, CD54-DNA และ CD147-DNA มีแอนติบอดีจำเพาะเกิดขึ้นภายหลังการฉีด 1-4 ครั้ง ขณะที่หนูที่ฉีดด้วย CD1a-DNA ไม่มีแอนติบอดีจำเพาะเกิดขึ้น (ดูตารางที่ 3) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิธี DNA immunization เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติบอดีต่อ membrane protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันกันได้ ยกเว้น CD1a การที่ไม่สามารถผลิต CD1a antibody ได้ ผู้วิจัยคิดว่าน่าจะเป็นไปได้ที่ CD1a protein ของคนและของหนูอาจมีส่วนที่คล้ายคลึงกัน ทำให้ human CD1a protein ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูภายหลังฉีด CD1a-DNA กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูได้ไม่ดี

นอกจากสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ leukocyte membrane protein ได้แล้ว ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงการนำเอาวิธี DNA immunization มากระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ virus protein โดยทำการฉีด plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง hepatitis B surface (HBs) antigen เข้าไปในหนู 2 ตัวทาง intramuscular immunization และพบว่าหนูทั้ง 2 สามารถสร้าง anti-HBs antibody ได้ในซีรัมในระดับสูง (ตารางที่ 4)

ผลการศึกษาี้แสดงว่าวิธี DNA immunization เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนหลากหลายชนิดได้ และเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ผลิต polyclonal antibody โดยไม่ต้องฉีดโปรตีนแอนติเจน

ตารางที่ 3 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิด
ต่างๆ โดยวิธี DNA immunization

DNA	Dose of immunization**					
	Pre-immune	1	2	3	4	5
CD4-DNA						
#1*	-	-	-	+	+	+
#2	-	-	+	+	+	+
#3	-	-	+/-	+	+	+
#4	-	-	+	+	+	+
CD14-DNA						
#1	-	-	+	+	+	+
#2	-	-	-	-	-	+
CD45-DNA						
#1	-	-	+/-	+	+	+
#2	-	-	+	+	+	+
CD54-DNA						
#1	-	+	+	+	+	+
#2	-	+	+	+	+	+
#3	-	-	+/-	+	+	+
#4	-	-	+	+	+	+
CD147-DNA						
#1	-	+/-	+	+	+	+
#2	-	-	-	+	+	+
#3	-	-	-	-	+	+
#4	-	-	-	-	+	+
#5	-	-	+	+	+	+
CD1a-DNA						
#1	-	-	-	-	-	-
#2	-	-	-	-	-	-
#3	-	-	-	-	-	-

* # แสดงจำนวนหนูที่ใช้ศึกษา

** Pre immune = รับประทาน plasmid DNA

**Dose 1-5 = รับประทาน plasmid DNA ครั้งที่ 1-5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงการกระตุ้นการสร้าง anti-HBs antibody โดยวิธี DNA immunization

Dose	Anti-HBs antibody (mIU/ml)*	
	Mouse no. 1	Mouse no. 2
Pre immune**	0	0
Dose 1***	0	0
Dose 2	100	0
Dose 3	608	0
Dose 4	1562	238
Dose 5	3312	370

* ตรวจวัดระดับ anti-HBs antibody ด้วยเครื่อง Imx analyzer (Abbott)

**Pre immune = ซ้ำก่อนฉีด plasmid DNA

***Dose 1-5 = ซ้ำหลังฉีด plasmid DNA ครั้งที่ 1-5 ตามลำดับ

4. การศึกษาการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดด้วย plasmid DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 1 ครั้ง (single immunization) และจำนวน 5 ครั้ง (multiple immunization)

จากการศึกษาที่ผ่านมาผู้วิจัยพบว่าการฉีด plasmid DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 3-5 ครั้งสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ ผู้วิจัยจึงศึกษาถึงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยการฉีด plasmid DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 1 ครั้ง

ผู้วิจัยทำการฉีด CD54-DNA และ CD147-DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 5 ครั้ง (multiple immunization) เปรียบเทียบกับการฉีด 1 ครั้ง (single immunization) ผลการทดลองพบว่าการฉีด plasmid DNA 1 ครั้งไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้เลย (ตารางที่ 5 และ 6) ซึ่งแสดงให้เห็นการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization จำเป็นต้องมีการกระตุ้นซ้ำเช่นเดียวกับการฉีดโปรตีนแอนติเจน

5. การศึกษา isotype ของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษา isotype ของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี DNA immunization ผู้วิจัยได้นำเอาซีรัมที่ให้ผลบวกกับแอนติเจนชนิดต่างๆ โดยวิธี DNA immunization มาหา isotype ของแอนติบอดีจำเพาะเหล่านั้นโดยวิธี indirect immunofluorescent โดยใช้ anti-mouse IgG-FITC และ anti-mouse IgM-FITC เป็น conjugate ผลการศึกษาพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยการฉีดด้วย plasmid DNA ทุกชนิดเป็นชนิด IgG โดยไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM เลย ดังแสดงในรูปที่ 3 เป็นตัวอย่างของการตรวจหาระดับ anti-CD4 antibody ชนิด IgG และ IgM ในซีรัมของหนูที่ฉีดด้วย CD4-DNA

ตารางที่ 5 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดด้วย CD54-DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 5 ครั้ง และจำนวน 1 ครั้ง

ฉีด plasmid DNA จำนวน 5 ครั้ง

Days	Anti-CD54 antibodies		
	M1*	M2	M3
0	-	-	-
14	-	-	-
28	+	-	+
42	+	-	+
56	+	+	+
70	+	+	+
100	+	+	+
130	+	+	+
160	+	+	+

*M1-M3 = หนูที่ฉีดด้วย CD54-DNA แบบ multiple immunization

ฉีด plasmid DNA จำนวน 1 ครั้ง

Days	Anti-CD54 antibodies	
	S1*	S2
0	-	-
14	-	-
28	-	-
42	-	-
56	-	-
70	+/-	-
100	-	-
130	-	-
160	-	-

*S1-S3 = หนูที่ฉีดด้วย plasmid DNA แบบ single immunization

ตารางที่ 6 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดด้วย CD147-DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 5 ครั้ง และจำนวน 1 ครั้ง

ฉีด plasmid DNA จำนวน 5 ครั้ง

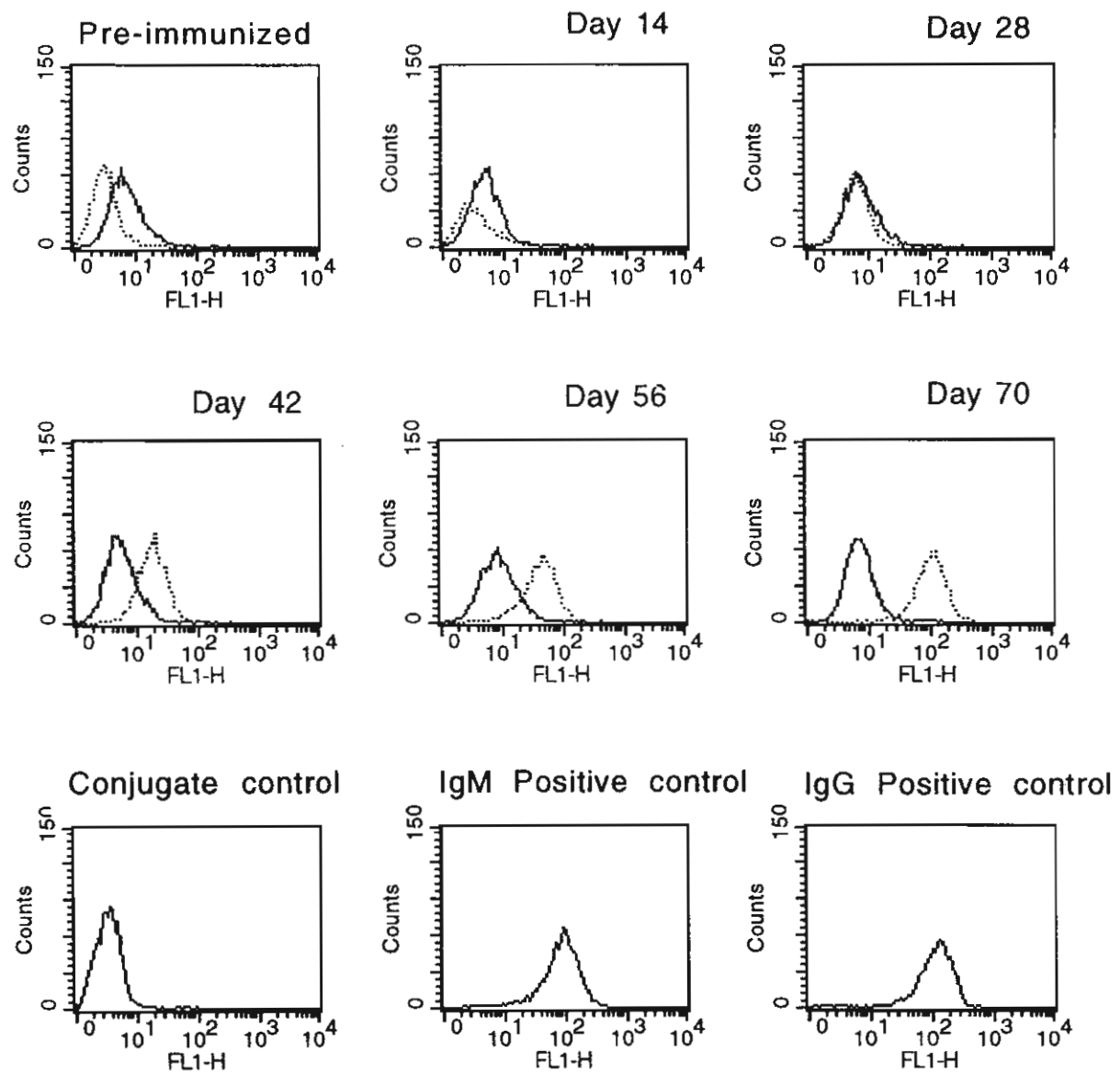
Days	Anti-CD147 antibodies					
	M1*	M2	M3	M4	M5	M6
0	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
28	+	-	-	+/-	+	+
42	+	-	+/-	+	+	+
56	+	+	+	+	+	+
70	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+
130	+	+	+	+	ND	+
160	+	+	+	+	ND	+

*M1-M6=หนูที่ฉีดด้วย CD147-DNA แบบ multiple immunization

ฉีด plasmid DNA จำนวน 1 ครั้ง

Days	Anti-CD147 antibodies		
	S1*	S2	S3
0	-	-	-
14	-	-	-
28	-	-	-
42	-	-	-
56	-	-	-
70	-	-	-
100	-	-	-
130	-	-	-
160	-	-	-

*S1-S3=หนูที่ฉีดด้วย CD147-DNA แบบ single immunization



รูปที่ 3 แสดง isotype ของ anti-CD4 antibody ในซีรัมของหนูที่ฉีดด้วย CD4-DNA

เส้นทึบ แสดงแอนติบอดีชนิด IgM และ เส้นประ แสดงแอนติบอดีชนิด IgG

6. การผลิต polyclonal anti-CD4 antibodies ในกระต่าย

นอกจากจะศึกษาการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ในหนูแล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาถึงการนำวิธี DNA immunization มาใช้ผลิตแอนติบอดีในกระต่าย ซึ่งจะทำได้แอนติบอดีเพื่อใช้งานในปริมาณที่มากกว่า ผู้วิจัยทำการทดลองโดยฉีด cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD4 protein และ insert ใน eukaryotic expression vector (เรียกว่า CD4-DNA) เข้าไปในกระต่าย 3 ตัว ทาง intramuscular immunization ผลการทดลองพบว่ากระต่ายทั้ง 3 สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ CD4 protein ในระดับสูงในซีรัม (ตารางที่ 7) โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถยับยั้ง (inhibit) standard CD4 monoclonal antibody (คือ Leu3a และ 13B8.2) ในการจับกับ CD4 molecule บน CD4 positive cells ได้ แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อ CD4 protein. Polyclonal anti-CD4 antibody ที่ผลิตได้นี้ทำปฏิกิริยาได้กับทั้ง recombinant และ native CD4 protein และมี titer ถึง 1:800 ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์แล้วใน Kasinrerk W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. Immunol letters 1999; 67: 237-242 รายละเอียดวิธีการวิจัยและผลการวิจัยดังแสดงใน reprint ซึ่งได้แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก

7. การศึกษาหน้าที่ของ CD4 protein โดย polyclonal anti-CD4 antibody ที่ผลิตได้โดยวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษาหน้าที่ของ CD4 molecule ผู้วิจัยได้นำ rabbit polyclonal anti-CD4 antibody มาศึกษาหน้าที่ของ CD4 protein โดยนำ anti-CD4 antibodies มา inhibit การกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวโดย Phytohemagglutinin (PHA) ผลการทดลองพบว่า polyclonal anti-CD4 antibody สามารถยับยั้ง PHA induced cell proliferation ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CD4 protein จำเป็นในกระบวนการกระตุ้นเซลล์ให้แบ่งตัวโดย PHA การยับยั้ง PHA induced cell proliferation นี้ อาจเกิดจากการที่ polyclonal anti-CD4 antibody ไปรบกวน CD4-TCR/CD3 association หรือรบกวนการจับของ IL-16 กับ CD4 molecule (ดูรายละเอียดผลการศึกษาเหล่านี้ได้ใน Kasinrerk W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. Immunol. Letters 1999;67: 237-242; reprint ได้แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก)

ตารางที่ 7 แสดงการกระตุ้นการสร้าง anti-CD4 antibody ในกระต่ายโดยวิธี DNA immunization

Rabbit No.	Serum	Immunofluorescent reactivity*	
		CD4-COS	CD8-COS
1	Pre-immune	-	-
	Dose 1	-	-
	Dose 2	-	-
	Dose 3	-	-
	Dose 4	1+	-
	Dose 5	3+	-
	Dose 6	3+	-
2	Pre-immune	-	-
	Dose 1	1+	-
	Dose 2	2+	-
	Dose 3	3+	-
	Dose 4	4+	-
	Dose 5	4+	-
	Dose 6	4+	-
3	Pre-immune	-	-
	Dose 1	-	-
	Dose 2	1+	-
	Dose 3	3+	-
	Dose 4	4+	-
	Dose 5	4+	-
	Dose 6	4+	-

* ตรวจหาระดับ anti-CD4 antibody โดยวิธี indirect immunofluorescent โดยใช้ CD4-DNA transfected COS และ CD8-DNA transfected COS cells เป็น antigen

8. การศึกษา eukaryotic expression vector ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในงาน DNA immunization

เพื่อศึกษา plasmid vector ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการงาน DNA immunization ผู้วิจัยได้นำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD45, CD54, CD147 และ Hepatitis B surface (HBs) antigen ซึ่ง insert อยู่ใน eukaryotic expression vectors pTH3M, pCDM8, pSP65 และ pRc/CMV ตามลำดับ โดยแต่ละ plasmid vector มี eukaryotic promoter ดังนี้คือ pTH3M, pCDM8 และ pRc/CMV มี CMV promoter ส่วน pSP65 มี SR α promoter นำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง human leukocyte surface molecules หรือ hepatitis B surface antigen ที่ insert อยู่ใน eukaryotic vector ชนิดต่างๆ ดังกล่าวฉีดเข้าไปในหนู พบว่า หนูที่ฉีดด้วย plasmid DNA ทุกชนิดสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ encoded protein ในซีรัมได้ (ตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่า eukaryotic expression vector และ eukaryotic promoter หลายชนิดสามารถนำมาใช้ในการงาน DNA immunization ได้

ตารางที่ 8 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ ซึ่ง insert ใน eukaryotic expression vector ชนิดต่างๆ โดยวิธี DNA immunization

DNA	Dose of immunization					
	Pre-immune	1	2	3	4	5
CD45-DNA						
#1*	-	-	+/-	+	+	+
#2	-	-	+	+	+	+
CD54-DNA						
#1	-	+	+	+	+	+
#2	-	+	+	+	+	+
#3	-	-	+/-	+	+	+
#4	-	-	+	+	+	+
CD147-DNA						
#1	-	+/-	+	+	+	+
#2	-	-	-	+	+	+
#3	-	-	-	-	+	+
#4	-	-	-	-	+	+
#5	-	-	+	+	+	+
HBs-DNA						
#1	-	-	+	+	+	+
#2	-	-	-	-	+	+

* = จำนวนหนูที่ใช้ศึกษา

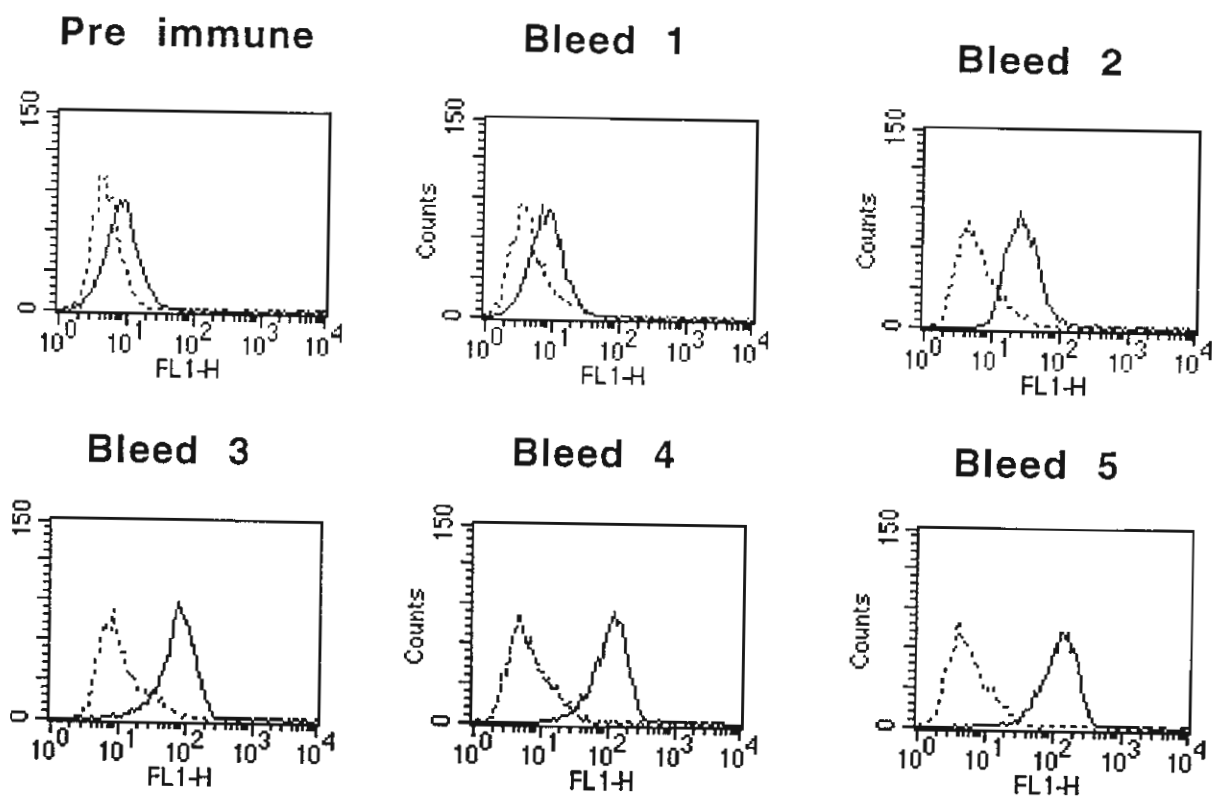
9. การศึกษาถึงสารที่ช่วยเพิ่มการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

9.1 การศึกษาผลของ DEAE Dextran ต่อการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

วิธี DNA immunization เป็นการฉีด DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจ เข้าไปในกล้ามเนื้อของหนู จากนั้น DNA จะถูก uptake เข้าไป และสร้างเป็น encoded protein โดยเซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่ง encoded protein ที่สร้างออกมาจะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อพิจารณาถึงตรงนี้ การเพิ่มการ uptake DNA เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อจะทำให้การสร้าง encoded protein มากขึ้น และจะทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ดังนั้นผู้วิจัย จึงนำสาร DEAE Dextran ซึ่งเป็นสารที่ช่วยเพิ่มการนำ DNA เข้าสู่ eukaryotic cells ในหลอดทดลอง มาใช้เพิ่มการนำ DNA เข้าเซลล์กล้ามเนื้อในหนู โดยนำสาร DEAE Dextran มาให้ร่วมกับ CD4-DNA จากนั้นตรวจหาระดับ CD4 antibodies ในหนูที่ให้ CD4-DNA และ CD4-DNA ร่วมกับสาร DEAE Dextran ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4 โดยพบว่าจากการศึกษาในหนู จำนวน 4 ตัว สาร DEAE Dextran นอกจากจะไม่ช่วยเพิ่มการสร้างแอนติบอดีแล้ว ยังกีดการสร้างแอนติบอดีอีกด้วย ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเป็นเพราะว่าสาร DEAE Dextran เมื่อผสมกับ DNA จะได้เป็น DEAE dextran-DNA complex ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งทำให้ muscle cells ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้หรือนำเข้าสู่เซลล์ได้น้อย เมื่อเทียบกับ DNA ที่ไม่จับกับ DEAE Dextran

9.2 การศึกษาผลของ chloroquine ต่อการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

Chloroquine เป็นสารที่สามารถลดการทำงานของ lysosomal enzymes ภายในเซลล์ ผู้วิจัยจึงนำสาร chloroquine มาผสมกับ DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 protein แล้วนำไปฉีดหนู เพื่อหวังว่าสาร chloroquine จะสามารถลดการทำลาย DNA ภายในเซลล์ได้ ซึ่งน่าจะช่วยเพิ่มการสร้าง encoded protein และเพิ่มการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในที่สุด จากการศึกษานี้ในหนูทั้งหมดจำนวน 10 ตัว ผลการทดลองพบว่าสาร chloroquine ไม่ได้ช่วยเพิ่มการสร้างแอนติบอดีได้เลย แต่กลับกีดการสร้างแอนติบอดี (ตารางที่ 9)



รูปที่ 4 แสดงระดับ anti-CD4 antibodies ในหนูหลังการฉีดด้วย CD4-DNA และ CD4-DNA ร่วมกับ DEAE Dextran

FACS profile นี้แสดงผลการทดลองจากหนู 2 ตัวจากการทดลองในหนูทั้งหมด 4 ตัว

เส้นทึบแสดงระดับแอนติบอดีในหนูที่ให้ CD4-DNA อย่างเดียว

เส้นประแสดงระดับแอนติบอดีในหนูที่ให้ CD4-DNA ร่วมกับ DEAE Dextran

ตารางที่ 9 การศึกษาผลของสาร chloroquine ต่อการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดกระตุ้นหนูด้วย plasmid

DNA

Experiment 1

Condition	Serum (days)									
	Pre-immune	14	28	42	56	70	100	130	160	190
CD147-DNA + Chloq. 400 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + Chloq. 200 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + Chloq. 100 μ M	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD147-DNA + Chloq. 50 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + Chloq. 0 μ M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Experiment 2

Condition	Serum									
	Pre-immune	14	28	42	56	70	100	130	160	190
CD147-DNA + Chloq. 100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
CD147-DNA + Chloq. 50 μ M	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CD147-DNA + Chloq. 50 μ M	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CD147-DNA + Chloq. 25 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + Chloq. 12.5 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ฉีดหนูด้วย CD147-DNA หรือ CD147-DNA ร่วมกับ chloroquine ที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ครั้ง ห่างกันทุก 2 สัปดาห์

9.3 การศึกษาผลของ Phytohemagglutination (PHA) ต่อการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

สาร PHA เป็น mitogen ที่สามารถกระตุ้นให้ lymphocytes แบ่งตัวและสร้าง lymphokines ชนิดต่างๆ ในการศึกษาที่ผู้วิจัยมีแนวคิดว่าจะผสม PHA กับ DNA แล้วนำไปฉีดหนู PHA ที่ให้เข้าไปจะไป activate lymphocytes ขณะที่ DNA จะสร้าง encoded protein ออกมา ซึ่งผลลัพธ์สุดท้ายน่าจะทำให้การสร้างแอนติบอดีต่อ encoded protein เพิ่มขึ้น จากแนวคิดนี้ ผู้วิจัยได้นำ PHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับ plasmid DNA ฉีดหนู จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบการสร้างแอนติบอดีกับหนูที่ฉีด plasmid DNA เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่า PHA ไม่กระตุ้นหรือลดการสร้างแอนติบอดี เมื่อฉีดหนู 5 ครั้ง และการให้ DNA พร้อมกับ PHA แล้วฉีดหนู 1 ครั้งไม่สามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีได้ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 การศึกษาผลของสาร Phytohemagglutinin ต่อการสร้างแอนติบอดีเมื่อนัดกระตุ้นหนูด้วย plasmid DNA จำนวน 5 ครั้ง

Condition	Serum (Days)									
	Pre-immune	14	28	42	56	70	100	130	160	190
CD54-DNA + PHA. 24 µg	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CD54-DNA + PHA 24 µg	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-
CD54-DNA + PHA 12 µg	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CD54-DNA + PHA 6 µg	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
CD54-DNA + PHA 0 µg	-	-	+	+	+	+	+	+	+	ND

ฉีดหนูด้วย CD54-DNA หรือ CD54-DNA ร่วมกับ PHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ครั้ง ห่างกันทุก 2 สัปดาห์

ตารางที่ 11 การศึกษาผลของสาร Phytohemagglutinin ต่อการสร้างแอนติบอดีเมื่อนัดกระตุ้นหนูด้วย plasmid DNA จำนวน 1 ครั้ง

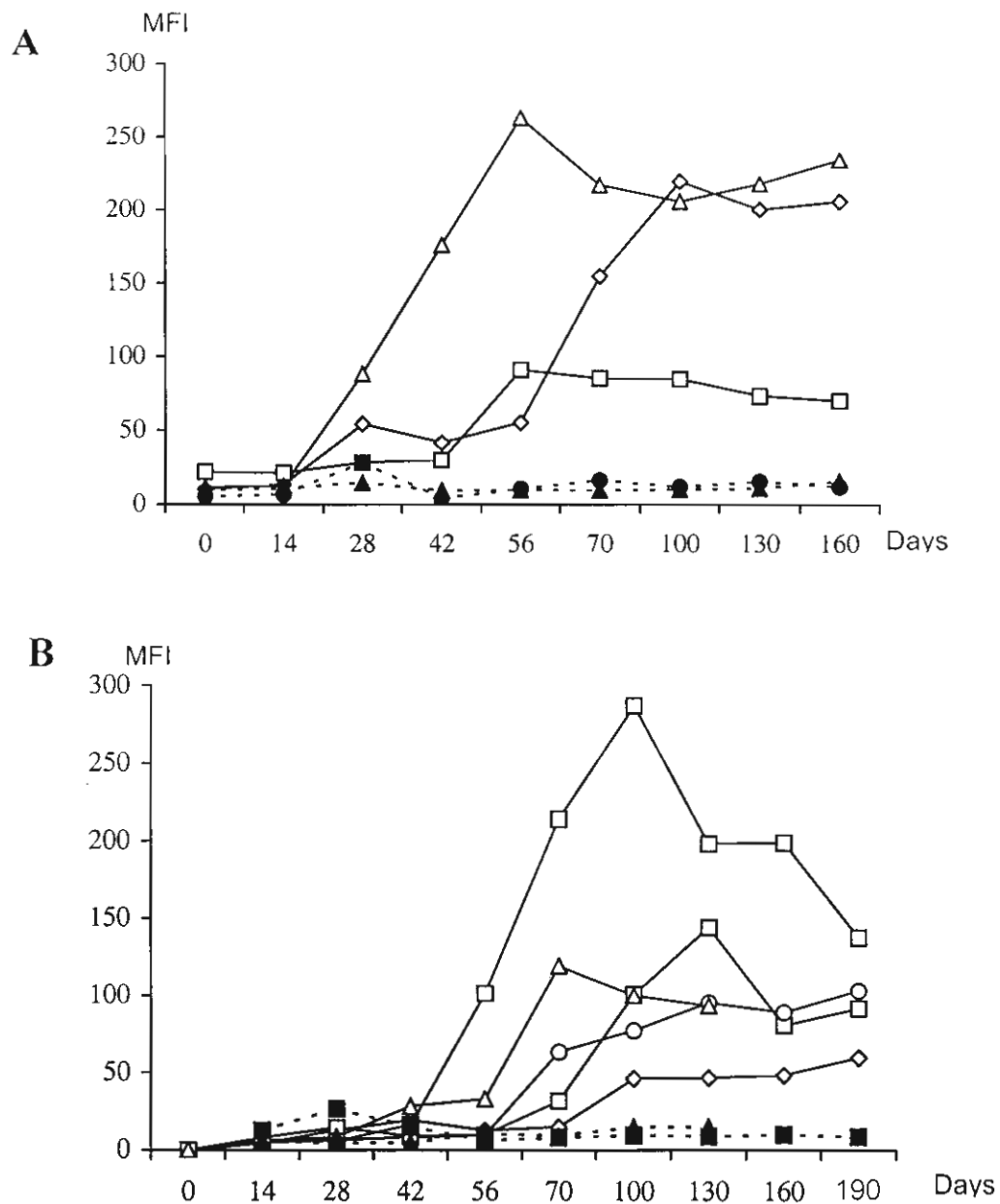
Condition	Serum (Days)									
	Pre-immune	14	28	42	56	70	100	130	160	190
CD1a-DNA + PHA 2 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD1a-DNA + PHA 0 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + PHA 4 µg	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-
CD147-DNA + PHA 0 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ฉีดหนูด้วย CD1a-DNA หรือ CD147-DNA ร่วมกับ PHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 ครั้ง

10. การเปรียบเทียบการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization โดยการฉีด plasmid DNA ทาง intramuscular immunization และทาง intrasplenic immunization

จากศึกษาที่ผ่านมา ผู้วิจัยพบว่าการฉีด plasmid DNA ทาง intramuscular immunization สามารถกระตุ้นการสร้าง polyclonal antibodies ต่อแอนติเจนที่สนใจได้ แต่ต้องมีการฉีดกระตุ้น 3-5 ครั้ง การฉีด plasmid DNA เพียง 1 ครั้ง (single immunization) ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาถึงการนำเอาวิธี intrasplenic immunization คือ ฉีด plasmid DNA โดยตรงเข้าไปในม้ามของหนู มาใช้ในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี

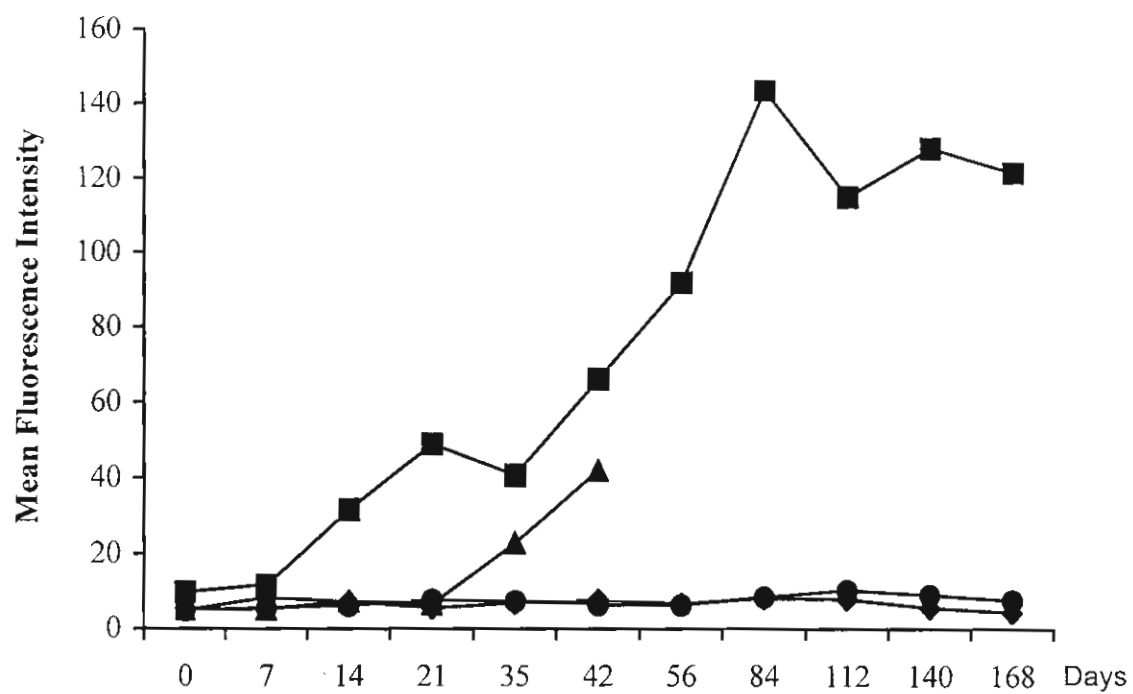
ผลการทดลองพบว่า เมื่อฉีดหนูทั้งหมด 3 และ 5 ตัวด้วย CD54-DNA และ CD147-DNA ตามลำดับ จำนวน 5 ครั้งทุก 2 สัปดาห์ พบว่าหนูทุกตัวมีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะขึ้นในซีรัม (รูปที่ 5) ขณะที่หนูที่ฉีด plasmid DNA 1 ครั้งไม่มีการสร้างแอนติบอดีเลย (รูปที่ 5) ในขณะที่การฉีด CD54-DNA ทาง intrasplenic immunization เพียง 1 ครั้ง สามารถกระตุ้นให้หนู 2 ใน 4 ตัวสร้างแอนติบอดีได้ (รูปที่ 6) โดยแอนติบอดีที่เกิดขึ้นยังคงสามารถตรวจพบได้อย่างน้อย 6 เดือนหลังการฉีด plasmid DNA (รูปที่ 7)



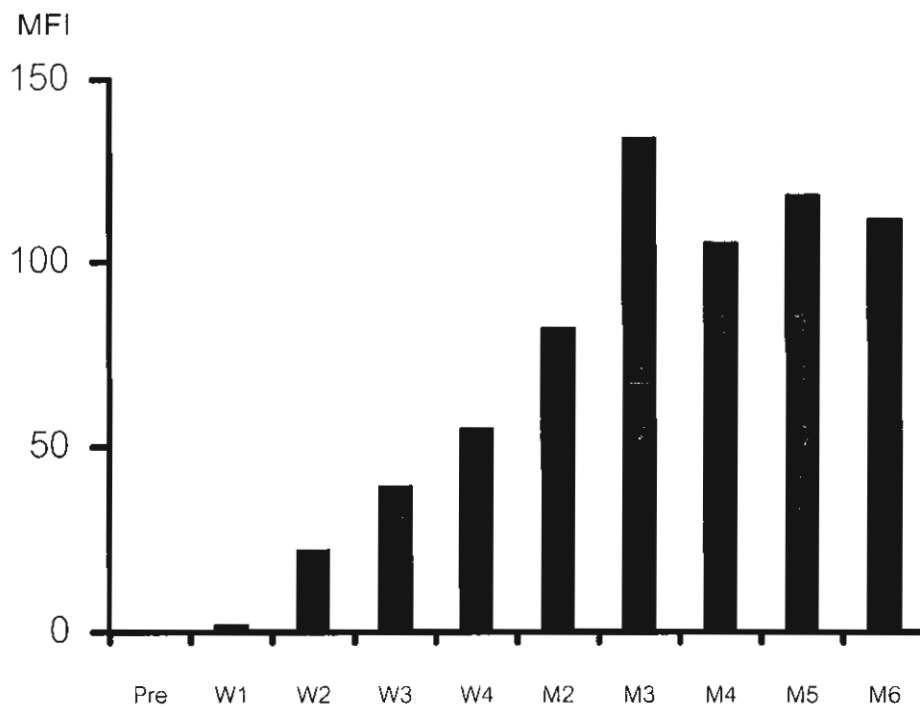
รูปที่ 5 แสดงการสร้างแอนติบอดีในซีรัมหนูหลังการฉีด CD54-DNA (รูป A) และ CD147-DNA (รูป B) ทาง intramuscular immunization

เส้นทึบ แสดงผลจากการฉีด plasmid DNA 5 ครั้ง

เส้นประ แสดงผลจากการฉีด plasmid DNA 1 ครั้ง



รูปที่ 6 แสดงการสร้างแอนติบอดีในซีรัมหนูหลังการฉีด CD54-DNA ทาง intrasplenic immunization จำนวน 1 ครั้ง



รูปที่ 7 แสดงการสร้าง anti-CD54 antibody ในซีรัมหนูหลังการฉีด CD54-DNA ทาง intrasplenic immunization

Pre = pre-immune serum; W1 - W4 = serum หลังฉีด plasmid DNA 1 - 4 สัปดาห์; M2 - M6 = serum หลังฉีด plasmid DNA 2 - 6 เดือน

11. การผลิต monoclonal antibody โดยวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษาถึงวิธีการนำวิธี DNA immunization มาผลิต monoclonal antibody ผู้วิจัยได้ทำการฉีดหนู CD54-DNA ทาง intrasplenic immunization จากนั้นจึงนำ spleen cells ของหนูมา fuse กับ myeloma cells โดย hybridoma technique ตรวจหา hybridoma ที่สร้าง anti-CD54 monoclonal antibody โดยวิธี indirect immunofluorescent ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิต hybridoma ที่สร้าง anti-CD54 monoclonal antibody ได้ จำนวน 1 clone แอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง native และ recombinant CD54 protein ผลงานวิจัยนี้ได้รับการตอบรับเพื่อตีพิมพ์แล้วใน Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrer W. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. Immunol letters 2000 (in press) รายละเอียดวิธีการวิจัยและผลการวิจัยดังแสดงใน manuscript ซึ่งได้แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก

12. การผลิต monoclonal antibody โดยอาศัย COS cell expression system มาใช้ในการเตรียม immunizing antigen

เพื่อศึกษาถึงวิธีการผลิต monoclonal antibody ต่อโปรตีนที่สนใจ เมื่อผู้วิจัยมี DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนนั้นๆ แต่ไม่มีโปรตีนที่สนใจอยู่ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้นำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD14 และ CD99 ซึ่ง insert ใน eukaryotic expression vector pCDM8 ไป transfect เข้าไปใน COS cells เพื่อ generate COS cells ที่ express โปรตีนที่สนใจบนผิวเซลล์ จากนั้นนำ transfected COS cells ไปใช้เป็น immunizing antigen ในการฉีดหนู นำ spleen cells ของหนูมาเชื่อมกับ myeloma cells ตามวิธี hybridoma technique มาตรฐาน ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยสามารถผลิต anti-CD14 monoclonal antibodies ได้ทั้งหมด 5 clones และ anti-CD99 monoclonal antibodies ได้ทั้งหมด 3 clones ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า COS cell expression system สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติเจนที่ดีมากสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Anti-CD14 monoclonal antibodies ที่ผลิตได้สามารถใช้ศึกษา cellular distribution ของ CD14 molecule บนเซลล์ชนิดต่าง และสามารถนำมาใช้ตรวจนับจำนวน monocytes ใน peripheral blood ได้นอกจากนี้ anti-CD14 monoclonal antibody ที่ผลิตได้ สามารถยับยั้งการจับของ lipopolysaccharide (LPS) กับ CD14 molecule ได้ ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์แล้วใน Moonsom S, Kasinrer W. Production of anti-CD14 monoclonal antibodies by using CD14 expressing COS cells as immunizing antigen. Asian Pac J Allergy Immunol 2000; 18: 53-61 รายละเอียดวิธีการวิจัยและผลการวิจัยดังแสดงใน reprint ซึ่งได้แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก

สำหรับ Anti-CD99 monoclonal antibodies ที่ผลิตได้ สามารถนำมาใช้ศึกษา cellular distribution ของ CD99 molecule บน hemopoietic cell lines และ peripheral blood cells ชนิดต่างๆ, นำมาใช้ศึกษา น้ำหนักโมเลกุลของ CD99 protein และศึกษาหน้าที่ของ CD99 molecules นอกจากนี้ยังใช้ศึกษา signal transduction pathways ผ่าน CD99 protein ผลการวิจัยนี้ได้รับตีพิมพ์เผยแพร่แล้วใน Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. CD99 monoclonal antibody induces homotypic cell aggregation of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathways. Immunol Letters 2000; 71:33-41. รายละเอียดของวิธีการทดลองและผลการทดลอง ดูได้ใน reprint ที่แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก

เอกสารอ้างอิง

1. Davis, H.L. and R.G. Whalen. 1995. DNA-based immunization. In, *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*. (Ed. G. Dickson), Chapman and Hall, London.
2. Ertl, H.C.J. and Z. Xiang. 1996. Novel Vaccine Approaches. *J. Immunol.* 156:3579-3582.
3. Fynan, E.F., R.G. Webster, D.H. Fuller, J.R. Haynes, J.C. Santoro and H.L. Robinson. 1995. DNA vaccines: a novel approach to immunization. *Int. J. Immunopharmacol.* 17:79-83.
4. McDonnell W.M. and F.K. Askari. 1996. DNA Vaccines. *New Eng. J. Med.* 334:42-45.
5. Corr, M., D.J. Lee, D.A. Carso and H. Tighe. 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.* 184:1555-1560.
6. Neefjes, J.J. and H.L. Ploegh. 1992. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol. Today.* 13:179-184.
7. Kasinrerk, W, Tokrasinwit, N. and Y Piluk. 1996. Production of Mouse anti-CD4 antibodies by DNA-Based Immunization. *Asian Pacific J. Allerg. Immun.* 14:99-105.
8. Kasinrerk, W, Tokrasinwit N and K. Changtumrourng. 1997. Production of anti-CD4 antibodies in rabbits by DNA Immunization. *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 5:123-129.
9. Major, M., L. Vitvitski, M.A. Mink, M. Schleef, R.G. Whalen, C. Trepo and G. Inchauspe. 1995. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of immune responses against the Hepatitis C virus nucleocapsid. *J. Virol.* 69: 5798-5805.
10. Geisser, M., A. Gesien, K. Tokushige and J.R. Wands. 1997. Enhancement of cellular and humoral immune responses to Hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J. Immunol.* 158: 1231-1237.
11. Kim, J.J., V. Ayyavoo, M.L. Bagarazzi, M.A. Chattergoon, K. Dang, B. Wang, J.D. Boyer and D.B. Weiner. 1997. In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J. Immunol.* 158: 816-826.

Output ที่ได้จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 4 เรื่อง

- (1) Kasinrerker W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. Immunol Letters 1999; 67:237-242
- (2) Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. CD99 monoclonal antibody induces homotypic cell aggregation of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathways. Immunol letters 2000; 71: 33-41.
- (3) Moonsom S, Kasinrerker W. Production of anti-CD14 monoclonal antibodies by using CD14 expressing COS cells as immunizing antigen. Asian Pac J All Immunol 2000; 18: 53-61.
- (4) Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrerker W. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. 2000 (in press).

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

(1) ในเชิงพาณิชย์

ไม่มี

(2) ในเชิงนโยบาย

ไม่มี

(3) ในเชิงสาธารณะ

ผู้วิจัยได้รับเชิญไปเป็นวิทยากรเพื่อเผยแพร่ความรู้ที่ได้จากโครงการนี้หลายครั้ง ได้แก่

1. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Preparation of antigens for immunization and cell line selection ในการประชุมวิชาการเรื่อง Monoclonal antibody workshop: Production and application วันที่ 22-24 มิถุนายน 2541 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ
2. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Large scale production of monoclonal antibody ในการประชุมวิชาการเรื่อง Monoclonal antibody workshop: Production and application วันที่ 22-24 มิถุนายน 2541 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ
3. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Characterization and functional analysis of leukocyte surface molecule ในการประชุมวิชาการเรื่อง Monoclonal antibody workshop: Production and application วันที่ 22-24 มิถุนายน 2541 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ