บทคัดย่อภาษาไทย

T 132957

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ platelet gpIIb/IIIa โดยฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c อายุ 6 สัปดาห์ด้วยเกร็ดเลือดคนปกติหมู่โลหิตโอ ขนาด $1X10^8$ cell/dose 100 uL ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 2 เดือน ระหว่างการฉีดกระตุ้น เตรียม purified gpIIb/IIIa จากเกร็ดเลือดสลาย โดยการแยกผ่าน CD41 MAb affinity column แอนติเจนที่แยกได้ นำไปใช้สำหรับการตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect sandwich ELISA เมื่อสัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีแล้ว นำเซลล์ม้ามหนูผสมกับ myeloma สายพันธุ์ X63Ag8.653 ด้วยวิธีมาตรฐาน ตรวจกรองแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ คัดเลือกเฉพาะเซลล์ลูกผสมที่ให้ผลบวกได้จำนวน 10 โคลน แยกให้ได้โคลนเดี่ยวด้วยวิธี Limiting dilution สองครั้ง ศึกษาความจำเพาะต่อ gpIIb/IIIa บนผิวเกร็ดเลือดและต่อ gpIIb/IIIa related antigen บนผิวเซลล์ K562 และ U937 ด้วยวิธี platelet suspension immunofluorescent technique (PSIFT) และ Indirect immunofluorescent technique ตามลำดับ พบว่ามีเพียง 2 โคลนที่ให้ผลบวกกับทุกชนิดเซลล์ เลือก PY-13 เพียงหนึ่งโคลนศึกษาต่อเพื่อให้ทราบขนาดของแอนติเจนที่มีความจำเพาะ ด้วยวิธี immunoprecipitation พบว่า PY-13 สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนผิวเกร็ดเลือดที่ขนาด 100, 140 และ 240 kD และเมื่อใช้ PY-13 ตรึงบน proteinG IgG bead และทำการผ่านแยกเกร็ดเลือดสลาย จากนั้นศึกษาโมเลกุลที่ถูกแยกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western Blotting เมื่อทำปฏิกิริยากับ PY-13 พบแถบโปรตีนขนาด 240 kD ใน non-reduced gel และขนาด 100 และ 120 kD ใน reduced gel ตรวจหาชนิดพบเป็น IgG_1 kappa จากผลทั้งหมดสามารถบอกได้ว่า PY-13 ที่ผลิตได้เป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่จำเพาะต่อ platelet gp IIb/IIIa

Abstract

TE 132957

A monoclonal antibody against platelet glycoprotein IIb/IIIa was obtained from 8-weeked BALB/c mice immunized with platelet derived from normal human blood group O, by hybridoma technology. The immune spleen cells were fused with X63Ag8.653 myeloma cells at a ratio of 5:1. Indirect sandwich ELISA method was performed to screen hybrid cells secreted antibodies against homemade purified gpIIb/IIIa. Ten hybrids were found to secrete antibodies against purified gpIIb/IIIa. Hybrids were cloned by 2 rounds of limiting dilution. Platelets, K562 and U937 cell lines were used to detect antibody specific to gpIIb/IIIa and its related antigen by Platelet suspension immunofluorescent technique (PSIFT) and Indirect immunofluorescent technique, respectively. It was found that only two gave positive to all cell tested. PY-13, one of them was studied to determine the epitope on platelet membrane by immunoprecipitation and it showed 2 bands at 97 and 240 kD. For further characterization, PY-13 was immobilized onto proteinG IgG and used to isolate the platelet gpIIb/IIIa from platelet extract. The result indicated that PY-13 could pull down gpIIb/IIIa molecule by expressing the 140 kD in non-reduced gel and two bands at 110 and 120 kD in reduced gel. The isotype was also performed and the result was IgG_1kappa. In conclusion, by mean of all results, it can be indicated that PY-13 is the monoclonal specific to platelet gpIIb/IIIa.