สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์พลาสมิดที่สร้าง IFNγของสุกร (pIFNγ)
2. เพื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ pIFNγ ต่อการเข้าสู่เซลล์ (transfection) โมโนซัยต์
3. เพื่อศึกษาความสามารถของ pIFNγ ในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IFNγ ในโมโนซัยต์ที่บ่มกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)
4. เพื่อศึกษาผลของ pIFNγ ต่อการสร้างไซโตไคน์ TNFα, IL-1, IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ TGFβ ในโมโนซัยต์ที่บ่มกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วยสาร LPS

วิธีทดลอง

การสังเคราะห์ pIFNγ

กระตุ้น peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ของสุกรด้วย phorbol 12-myristate 13-acetate (Calbiochem) และ ionomycin (Calbiochem) เพื่อกระตุ้นการสร้าง IFNγ mRNA (Charerntantanakul et al., 2006) ใช้ IFNγ mRNA เป็นต้นแบบ (template) สำหรับการสังเคราะห์ IFNγ double-stranded DNA (dsDNA) โดยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ทำการโคลน (clone) IFNγ dsDNA ที่ได้จาก RT-PCR ในพลาสมิด pcDNA™ 3.1 Directional TOPO® (Invitrogen) ตรวจสอบความถูกต้องของ pIFNγ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Pst I (Fermentas) และทำ DNA sequencing (รูปที่ 1)

การเตรียมโมโนซัยต์

เจาะเก็บ PBMC จากสุกรจำนวน 8 ตัวที่ไม่มีแอนติบอดี้ต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเมื่อตรวจโดยวิธี ELISA (IDEXX) ทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงโมโนซัยต์ด้วยวิธี plate adherence assay และตรวจยืนยันชนิดของเซลล์ด้วยวิธี direct immunofluorescent assay โดยใช้ primary monoclonal antibody (mAb) clone SWC3 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.สพ.ญ.ดร.สันนิภา สุรทัตต์, คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และ secondary mAb ที่ conjugate ด้วย FITC (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.วัชระ กสินฤกษ์, คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ pIFNγ ต่อการเข้าสู่เซลล์โมโนซัยต์