

บทนำ

PERB11 หรือ MIC เป็นชื่อของกลุ่มยีน (multicopy gene family) ใน Major Histocompatibility Complex (MHC) ซึ่งได้รับการค้นพบเมื่อปี 1994 (1) และได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มโมเลกุล HLA Class I, Neonatal IgG Fc receptor (FcRn) และ Zn-alpha 2-glycoprotein ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญในระดับพื้นฐานในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดย PERB11 มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มโมเลกุลดังกล่าวประมาณ 30%

หน้าที่ของกลุ่มยีน PERB11 ยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่จากการศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน พบว่า PERB11 แยกออกจากโมเลกุลต้นแบบ ซึ่งให้กำเนิดโมเลกุลของกลุ่ม HLA-Class I และ FcRn กับกลุ่มโมเลกุล Fc receptor ทั่วไป แสดงว่า PERB11 อาจมีหน้าที่ซึ่งคล้ายคลึงกับโมเลกุลทั้งสองประเภท โดยสามารถจับกับ Ig ได้กว้างขวางกว่าโดยไม่เฉพาะเจาะจง subclass หรือโปรตีนอื่น ๆ อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้อย่างมากที่หน้าที่ของ PERB11 จะมีส่วนเกี่ยวข้องในระดับพื้นฐานซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ PERB11 ยังมีความคล้ายคลึงมากทั้งระดับดีเอ็นเอและลำดับกรดอะมิโนกับยีน HLA-HC ซึ่งมีรายงานความเกี่ยวข้องกับโรค hemochromatosis (2)

กลุ่มโมเลกุล HLA-Class I แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ประเภทแรกเป็นโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์ที่มีนิวเคลียสทุกเซลล์ ทำหน้าที่ในการเสนอสายเปปไทด์ที่มาจากภายในเซลล์ (Intracellular peptide antigens) ให้กับ T-cells (3) เพื่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ทั้งยังมีส่วนเกี่ยวข้องในการเป็นเป้าหมายสำหรับการทำให้เซลล์แตก โดย NK cell (NK target) (4-5)

ส่วนประเภทที่ 2 เป็นโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์เฉพาะซึ่งค่อนข้างจำกัดในบางอวัยวะ (restricted expression) หน้าที่ของโมเลกุลพวกหลังยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

สำหรับ FcRn พบครั้งแรกในปี 1989 ในหนู rat (6) ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งถ่าย IgG จากแม่ไปสู่หนูแรกเกิด (Suckling rat) โดยผ่านทางนมซึ่งดูดซึมในกระเพาะอาหาร FcRn มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก Fc receptor ทั่วไป แต่คล้ายคลึงกับกลุ่มโมเลกุล HLA class I เป็นที่น่าสนใจว่า ถึงแม้ว่าโครงสร้างของโมเลกุลของ FcRn และ class I จะคล้ายกัน โมเลกุลของทั้งสองกลุ่มกลับใช้ส่วนของโมเลกุลซึ่งแตกต่างกันในการจับกับ ligand (7,8) สำหรับ Zn-2 glycoprotein ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของโมเลกุลนี้ได้รับการตีพิมพ์ในปี 1988 โดย Araki และคณะ (9) แต่หน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัด พบเพียงว่าโมเลกุลดังกล่าวสามารถทำหน้าที่เป็นตัวยึดติด (adhesion molecule) ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดต่อระหว่างเซลล์ (cell to cell interaction) (10)

ความสำคัญของ PERB11

ถึงแม้ว่าหน้าที่ของ PERB11 จะยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ก็มีหลักฐานสนับสนุนซึ่งชี้บ่งว่าผลผลิตที่ได้จากยีน PERB11 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดโรคมุ้มน้ำตาลในตนเองบางชนิด เช่น insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) และ Myasthenia gravis (11-12) (MG) และความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วของการเกิดอาการโรคเอดส์ภายหลังการติดเชื้อ HIV (13) หลักฐานซึ่งสนับสนุนสมมุติฐานดังกล่าว คือ

1. ตำแหน่งของยีน PERB11 อยู่ในย่านของชิ้นส่วนทางพันธุกรรม (genomic region) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค IDDM และ MG (11-12) และความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วของการเกิดอาการโรคเอดส์ภายหลังการติดเชื้อ HIV (13) จากการศึกษาโดยวิธี recombinant mapping พบว่าในคนไข้โรคดัง

กล่าวถึงความเหมือนกันของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอใน MHC ซึ่งมีความยาวประมาณ 250-300 กิโลเบส ซึ่งครอบคลุมกลุ่มยีน PERB11 ดังนั้น PERB11 จึงนับว่าเป็นยีนหนึ่ง (candidate) ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดและพัฒนาโรค (disease development) ดังกล่าว

2. โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ของยีน จากที่กล่าวมาแล้วว่า ลำดับกรดอะมิโนของ PERB11 มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มโมเลกุลซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องใกล้ชิดกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งชี้แนะว่า PERB11 น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และการเกิดและพัฒนาโรคทางภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเช่น FcR มีส่วนสัมพันธ์ใกล้ชิดในการปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัส

3. ความแตกต่างของยีนในแต่ละบุคคล PERB11 มีความแตกต่างระหว่างบุคคลทั้งในระดับดีเอ็นเอ, โปรตีน และอาจรวมทั้งปริมาณการสร้างโปรตีน เนื่องจากความแตกต่างของจำนวนยีนในกลุ่มยีน PERB11 ในแต่ละบุคคล (1,2) หลักฐานดังกล่าวมีความสำคัญอย่างยิ่งในการตั้งสมมุติฐานว่า PERB11 มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดโรคเนื่องจาก PERB11 จะมีส่วนเกี่ยวข้องในพัฒนาของโรคได้ก็ต่อเมื่อ PERB11 มีความแตกต่างกันในด้านปริมาณและ/หรือคุณภาพในกลุ่มคนไขและคนปกติ

ในการศึกษาให้ทราบถึงหน้าที่ของ PERB11 นั้น นอกจากการผลิตโปรตีนโดยอาศัยหลักการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลแล้ว การผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ทั้งในด้านการศึกษาหน้าที่ การตรวจวินิจฉัย และมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการรักษาได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเพอร์บี 11 เปปไทด์
2. ศึกษาคุณลักษณะและการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเพอร์บี 11 เปปไทด์
3. ศึกษาคุณลักษณะและการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ

วัสดุและวิธีการศึกษา

แอนติเจน

ได้แก่ เปปไทด์จำนวน 2 ชนิดซึ่งทำมาจากลำดับยีน PERB11 ในส่วน alpha1-domain และ โปรตีน 1 ชนิดซึ่งสร้างจากลำดับยีน PERB11.2 รายละเอียดดังนี้

1. PERB11-5D peptide (5D) ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 12 ตัว
ได้แก่ KTWDRRETRDLTC

2. PERB11-2M peptide (2M) ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 9 ตัว
ได้แก่ KDQKEGLHC

3. Recombinant PERB11.2-Fc protein (PB11-Fc) (Immunex Research and Development Corporation, Seattle USA.) ประกอบด้วย recombinant PERB 11.2 protein(alpha-1,alpha-2,and alpha-3 domains) ซึ่งรวมอยู่กับ Fc portion of IgG protein

BALB/C mice

ได้รับความอนุเคราะห์จาก Centre for Molecular Immunology and Instrumentation, Perth , Australia เป็นเพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ฉีดแอนติเจนแต่ละชนิด (5D,2M,PB11-Fc) กลุ่มละ 3 ตัว

Immunization protocol

กลุ่มที่ฉีดเปปไทด์ได้รับแอนติเจนปริมาณตัวละ 150 ไมโครกรัม แต่สำหรับกลุ่มที่ฉีดโปรตีนได้รับแอนติเจนปริมาณตัวละ 20 ไมโครกรัม โดยผสมแอนติเจนแต่ละชนิดเข้ากับ Titermax adjuvant ในอัตราส่วนเท่ากัน ฉีดเข้าใต้

ผิวหนัง (subcutaneously) หนูทดลองแต่ละตัว ทดสอบแอนติบอดีครั้งแรกภายหลังได้รับแอนติเจน 3-5 สัปดาห์เปรียบเทียบกับก่อนการฉีดแอนติเจน และฉีดครั้งสุดท้ายเข้าเส้นเลือดดำโดยใช้ปริมาณแอนติเจนลดลงครึ่งหนึ่งเป็นเวลาหนึ่งวันก่อนทำการเก็บม้ามและต่อมน้ำเหลืองเพื่อทำ fusion สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Mouse myeloma cell line

p3x63 Ag8.653 mouse myeloma cell line ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.พญ.สุทธิพันธุ์ สารสมบัติ, ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงเซลล์ในสภาวะปลอดเชื้อในตู้บอ 37 °ซ, 5% CO₂, 80% humidity

การทดสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

1. avidin- biotin 5D ELISA

ใช้น้ำยาแต่ละชั้นตอนหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยเริ่มจากนำ streptavidin (Sigma Cat.No.S-4762) เจือจางในน้ำกลั่นปริมาณ 5 ug/ml เคลือบ ELISA plate (Nunc, Immunomaxisorp F96) อบทิ้งไว้ข้ามคืนในระเหยแห้งโดยไม่ปิดฝาที่ 37 องศาเซลเซียส ล้างส่วนที่เกินด้วย 0.1% tween 20-phosphate buffered saline (T-PBS) 3-5 ครั้ง และ blocking step โดยใช้ 2% bovine serum albumin/PBS อบที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง, ล้างส่วนเกินด้วยวิธีเดิม แล้วเติม biotinylated 5D-peptide ปริมาณ 10 ug/ml อบที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง, ล้างส่วนเกิน แล้วเติมตัวอย่างซีรัมหนูเจือจางด้วย 2% BSA-PBS หรือใช้ตัวอย่างทดสอบ culture supernatant โดยไม่เจือจาง อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที, ล้างส่วนเกิน แล้วเติม alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse Ig G เจือจาง 1:1000 ด้วย 2% BSA-PBS อบที่ 37 องศาเซลเซียส

เวลา 1 ชั่วโมง, ล้างส่วนเกิน เติม p-nitrophenyl phosphate substrate อบที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที อ่านปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Titertek Multiskan MCC (Flow, Australia) ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

2. 2M-indirect ELISA

ใช้น้ำยาแต่ละขั้นตอนหุ้มละ 100 ไมโครลิตร โดยเริ่มจากน้ำ

2M-peptide ปริมาณ 10ug/ml เคลือบ ELISA plate (Nunc, Immunomaxisorp F96) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง, ล้างส่วนเกินด้วย 0.1% tween20-PBS 3-5 ครั้ง แล้วทำ blocking step โดยใช้ 2% BSA-PBS อบที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที, ล้างส่วนเกิน แล้วเติมตัวอย่างซีรัมหนูหรือ culture supernatant และขั้นตอนอื่นๆต่อไปเหมือนการทดสอบ avidin-biotin 5D ELISA ยกเว้นเวลาในการอบตัวอย่างใช้ 2 ชั่วโมงและการอบ conjugate ใช้ 90 นาที

การทดสอบแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistofluorescence

Rodent tissue composite block

เป็นเนื้อเยื่อที่จัดเตรียมด้วยวิธี fresh frozen tissue section และเก็บสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C. ประกอบด้วย rat liver, guinea pig skeletal muscle, mouse stomach, rat stomach, rat heart และ rat kidney

Human liver section

เป็นเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วยทำ liver biopsy และเตรียมด้วยวิธี fresh frozen tissue section เก็บสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C.

Bovine tissue section

เป็นเนื้อเยื่อที่ได้จากวัวชำแหละสดได้แก่ liver, kidney และ small intestine เตรียม fresh frozen section เก็บสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C.

Antibodies

ตัวอย่างซีรัมหนูเจื่อง 1:10 ด้วย PBS หรือ culture supernatant ไม่เจื่อง สำหรับทดสอบหาแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ

ขั้นตอนการทดสอบวิธี Immunohistofluorescence

นำสไลด์เนื้อเยื่อต่างๆออกมาวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนไอน้ำหายไป ทำเครื่องหมายวงกลมไว้รอบเนื้อเยื่อ เติมแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ หรือ negative control ประกอบด้วย conjugate control และ preimmune serum หรือ myeloma culture supernatant เติมภายในแต่ละวงกลมตัวอย่างละประมาณ 15 μ l วางสไลด์อบไว้ในกล่องเก็บความชื้นที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที, ล้างส่วนเกินด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เติม FITC conjugated anti-mouse Igs 1:20 แล้ววางสไลด์อบไว้ในกล่องเก็บความชื้นที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที, ล้างส่วนเกินด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทิ้งไว้พอหมาด เติม mounting medium และปิดสไลด์ด้วย cover slip แล้วนำไปดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescent microscope

Myeloma-immunized mouse spleen/lymp node fusion

เก็บม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองด้วยวิธีปราศจากเชื้อจากหนูที่ทดสอบพบแอนติบอดี ทำให้เซลล์กระจายเป็นเนื้อเดียวกัน นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดและนำ myeloma cells มาผสมทำ fusion อัตราส่วน 2:1 สำหรับเซลล์จากม้ามและ 1:1 สำหรับเซลล์จากต่อมน้ำเหลือง เลี้ยงไว้ในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C., 5%CO₂, 80%humidity ประมาณ 3 สัปดาห์ ทดสอบแอนติบอดีได้และทำcloning เพื่อแยกเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว (monoclones) แล้วทดสอบลักษณะโมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่ละชนิด

ผลการศึกษา

การสร้างแอนติบอดีตอบสนองในหนูทดลอง

หนูแต่ละกลุ่มมีการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไปในระดับสูงเมื่อทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยเฉพาะกลุ่มที่ฉีดเปปไทด์ทั้งชนิด 5D และ 2M ส่วนกลุ่มที่ฉีด PERB11.2-Fc protein จากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA พบการสร้างแอนติบอดีต่อ PERB11.2-Fc ในระดับที่สูงกว่า IgG มาก (รูปที่1)

ลักษณะแอนติบอดีในซีรัมหนูที่มีปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อ

ในการทดสอบ immunohistofluorescence ในซีรัมหนูภายหลังการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มที่ฉีด 2M-peptide และ PB11-Fc protein ให้ลักษณะปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อโดยเฉพาะเนื้อเยื่อ human liver ในขณะที่กลุ่มที่ฉีด 5D-peptide ยังให้ผลลบ(ตารางที่1) ลักษณะปฏิกิริยาที่น่าสนใจใน human liver tissue ของ mouse anti-PB11-Fc และ mouse anti-2M (หนูบางตัว) ได้แก่ ลักษณะการเรืองแสงรอบ sinusoid ซึ่งอาจเป็น kupffer cells และ การเรืองแสงลักษณะที่เป็นบริเวณ bile canaliculi ส่วนหนูกลุ่ม 5D-peptide ภายหลังจากที่ฉีดกระตุ้นด้วย 5D-peptide ซ้ำอีก2ครั้งก็พบว่าหนูกลุ่มนี้ให้ลักษณะปฏิกิริยาแบบbile canaliculi ในเนื้อเยื่อ bovine liver tissue ด้วย (ไม่ได้ทดสอบกับ human liver tissue เนื่องจากมีเนื้อเยื่อไม่เพียงพอ)

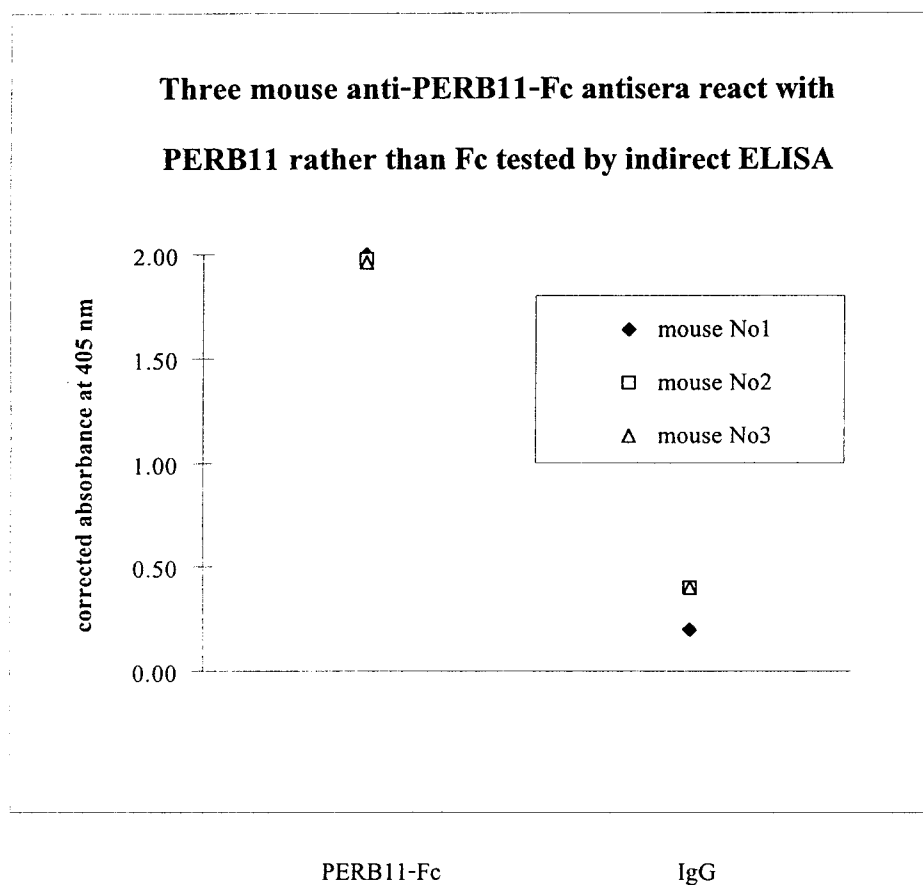
เป็นที่น่าเสียดายที่หนูกลุ่ม PB11-Fc ตายทั้งหมดระหว่างการขนส่งจากประเทศออสเตรเลีย จึงไม่สามารถนำมาเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ คงเหลือเฉพาะหนูกลุ่มที่ฉีด 5Dและ 2M-peptides ที่นำมาทำ fusion กับ myeloma cell line เพื่อเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้

การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก 5D-peptide immunized mouse

ภายหลังการทำ fusion พบว่ามี hybrid colony เกิดขึ้นทุก culture wells จำนวนรวม 288 หลุม แต่เมื่อทดสอบหาแอนติบอดีต่อ 5D-peptide ด้วยวิธี avidin-biotin 5D ELISA พบผลบวกเพียง 3 หลุม (1%) เท่านั้น และจากการทำ cloning ทั้ง 3 หลุมได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 12 clones ที่ยังให้ผลบวกต่อ 5D-peptide และให้ปฏิกิริยา immunohistofluorescence (ตารางที่ 2) แบ่งได้ 3 แบบคือกลุ่มที่ 1 ผลลบทั้งหมด, กลุ่มที่ 2 บวกเฉพาะบริเวณ lamina propia ใน bovine small intestine tissue (รูปที่ 2) และกลุ่มที่ 3 บวกเพิ่มลักษณะ bile canaliculi และ secreted substance ใน bovine liver tissue (รูปที่ 3) และเพิ่ม glomeruli ใน bovine kidney tissue

การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก 2M-peptide immunized mouse

พบ hybrid colony จำนวน 90% รวม 152 หลุม ซึ่งทดสอบพบแอนติบอดีต่อ 2M-peptide ด้วยวิธี 2M-indirect ELISA จำนวน 26 หลุม (17.1%) และได้ทำ cloning จำนวน 10 หลุม ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 4 clones ที่ยังให้ผลบวกกับ 2M-peptide และให้ปฏิกิริยา immunohistofluorescence เป็นลบ 1 clone กับลักษณะ secreted substance กระจายทุกเนื้อเยื่อจำนวน 3 clones ซึ่งเป็นลักษณะกระจายทั่วเนื้อเยื่อแบบที่พบใน 5D mAb กลุ่มที่ 3 ด้วย (ตารางที่ 3)



รูปที่ 1. ปฏิกริยาการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีต่อ PERB11-Fc recombinant protein ในซีรัมหนูทดลองทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

ตารางที่ 1. รูปแบบการทดสอบปฏิกิริยา immunohistofluorescence ต่อ
เนื้อเยื่อชนิดต่างๆในซีรัมหนูที่ฉีด 5D-peptide, 2M-peptide และ PERB11-
Fc protein ภายหลังการฉีดแอนติเจน 5 สัปดาห์

Ag	mouse	human liver	rat liver	GP SM	M stomach	R stomach	R heart	R kidney
5D	1	ND	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	ND	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	ND	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2M	1	granular around sinusoid (?Kupffer cell) bile canaliculi	cell surface(wk)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	fine filament between cells(+/-)	hepatocyte membrane(+)	(-)	apical staining of gastric gland (+) cell surface filament	(-)	(-)	(-)
	3	fine filament between cells (wk)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PB11 -Fc	1	speckled sinusoid(++) bile canaliculi(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	speckled sinusoid and between liver cells(++)	cell surface(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	speckled sinusoid	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-) no immunofluorescent
activity

ND not determine

GP guinea pig

SM smooth

muscle

M mouse

R rat

ตารางที่ 2. รูปแบบการทดสอบปฏิกิริยา immunohistofluorescence ต่อเนื้อเยื่อของโมโคลแอนติบอดี 5D peptide จัดแบ่งได้จำนวน 3 กลุ่ม

5D mAb group	number of clone	liver	kidney	s-intestine
I	4	(-)	(-)	(-)
II	2	(-)	(-)	LP
III	6	BC+SP	G+V	LP+M

BC bile canaliculi

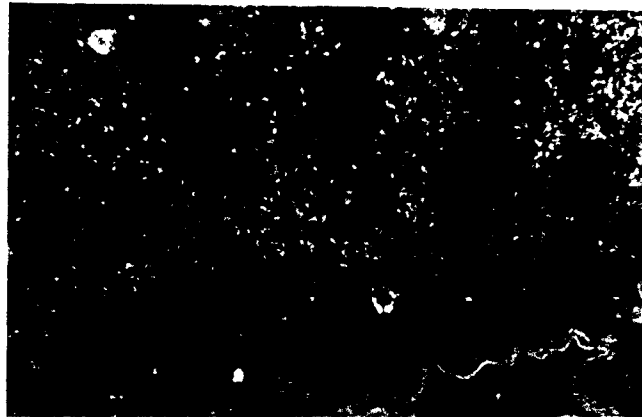
V blood vessel

SP secreted protein

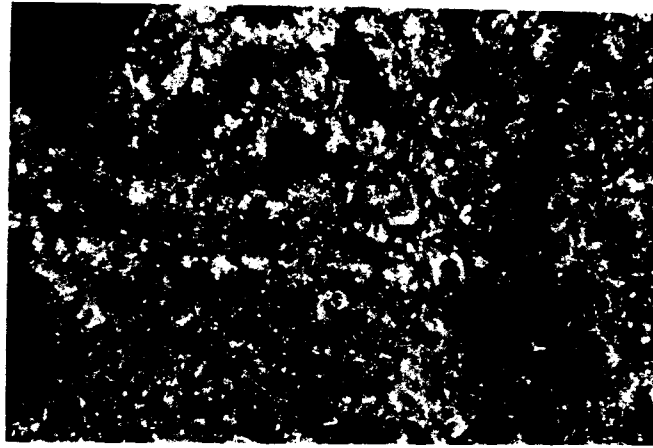
LP lamina propia

G glomeruli

M muscularis



รูปที่ 2. ปฏิกริยา immunohistofluorescence ในเนื้อเยื่อลำไส้เล็กวัว พบ
ลักษณะการเรืองแสงบริเวณ lamina propia (กำลังขยายรูป x150)



รูปที่ 3. ปฏิกริยา immunohistofluorescence ในเนื้อเยื่อตับวัว พบ
ลักษณะการเรืองแสงแบบ bile canaliculi และ secreted protein (กำลัง
ขยายรูปx150)

ตารางที่ 3. รูปแบบการทดสอบปฏิกิริยา immunohistofluorescence ต่อเนื้อเยื่อของโมโคลแอนติบอดี 2M peptide จัดแบ่งได้จำนวน 2 กลุ่ม

2M mAb group	number of clone	liver	kidney	s-intestine
I	1	(-)	(-)	(-)
II	3	SP	SP	SP

SP secreted
protein

วิจารณ์ผลการศึกษา

การสร้างแอนติบอดีต่อเปปไทด์เป็นการอาศัยความคาดหวังว่าเปปไทด์ได้มาจากส่วนที่มี immunogenicity สูงและมาจากส่วนของโปรตีนที่ไม่ใช่ส่วน conformational structure เพื่อให้แอนติบอดีต่อเปปไทด์เข้าทำปฏิกิริยาต่อ native protein ได้ด้วย จึงจะสามารถนำแอนติบอดีที่เตรียมได้ไปใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีนซึ่งเป็นผลผลิตของยีนได้ โดยการออกแบบเปปไทด์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นชนิดเดียวกับที่ได้เคยใช้ในการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีได้ผลดีในกระต่ายมาแล้ว (14)

สำหรับการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีในครั้งนี้เริ่มจากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อเปปไทด์แอนติเจนหรือ recombinant protein ซึ่งพบว่าการตอบสนองในระดับสูง แต่เมื่อนำเซลล์จากม้ามและต่อมน้ำเหลืองหนูที่ฉีดเปปไทด์มาทำ fusion แล้วทดสอบหาแอนติบอดีกลับพบจำนวน hybrid clone ที่สร้างแอนติบอดีในระดับต่ำ ถึงแม้จะพบ hybrid clone ทั่วไปเป็นจำนวนมาก จึงเป็นข้อจำกัดในการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีในครั้งนี้ ทั้งนี้หากใช้เทคโนโลยีการผลิตแอนติบอดีใหม่ๆ เช่น phage library และ DNA immunization ก็จะช่วยเพิ่มโอกาสที่จะได้แอนติบอดีที่มีคุณภาพตามต้องการ (15)

ข้อจำกัดอีกประการหนึ่งของการศึกษานี้คือการที่มี PERB11 - Fc protein จำนวนเพียงเล็กน้อยทำให้ไม่สามารถทดสอบได้ว่าแอนติบอดีต่อเปปไทด์ทำปฏิกิริยากับ native protein ซึ่งควรจะได้มีการศึกษาด้วยจึงจะยืนยันได้แน่นอนเพื่อจะนำไปศึกษาการทำงานของผลผลิตยีน PERB11 ได้ต่อไป

ลักษณะปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อที่สำคัญและเหมือนกับที่พบในโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่ายและได้เคยมีการรายงานไว้แล้วได้แก่ลักษณะ bile canaliculi ในเนื้อเยื่อดับ เนื่องจากยีน PERB11 มีความคล้ายคลึง

กับยีน HLA-HC ทั้งลำดับดีเอ็นเอและกรดอะมิโน และมีรายงานพบความเกี่ยวข้องของยีน HLA-HC กับโรค hemochromatosis ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติในระดับที่มีจำนวน iron มาก (2) จึงอาจเป็นไปได้ที่จะพบแอนติบอดีสร้างจากยีน PERB11 มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับผลผลิตของยีน HLA-HC และแอนติบอดีนั้นอาจมีประโยชน์ในการศึกษา hemochromatosis ต่อไป

ส่วนลักษณะปฏิกิริยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วน lamina propia มีความแตกต่างจากที่พบในโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่ายที่พบเป็นลักษณะ apical cytoplasm staining ของ mucosal cells (14) จึงอาจบ่งชี้ถึงโปรตีนที่มีการส่งเข้าออกผ่านเซลล์

อย่างไรก็ตามการศึกษาปฏิกิริยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistofluorescence ยังมีข้อปัญหาเกี่ยวกับความสดของเนื้อเยื่อที่ได้และการบ่งบอกลักษณะภายในเนื้อเยื่อที่ชัดเจน จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่งจากผู้เชี่ยวชาญทางด้านนี้ก่อนที่จะมีการศึกษาอื่นๆต่อไป