การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Retinal Glutamate-sensitive Protein ในไก่

Production of Antibodies Specific to Chick Retinal Glutamate-sensitive Protein

*ศักดา ดาดวง (Sakda Daduang)**
*นิสันต์ สัตยาศัย (Nison Sattayasai)***
*จินตนา สัตยาศัย (Jintana Sattayasai)****
*สมพร เกษแก้ว (Somporn Katekaew)*****
*ทิพยรัตน์ ชาหอมชื่น (Tippayarat Chahomchuen)******
*รัศมี แดงมาก (Rassamee Dangmark)******

บทคัดย่อ

กรดกลูตามิคจัดเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญในเรตินา พบว่าการฉีดกรดกลูตามิคปริมาณตั้งแต่ 10 μmole ขึ้นไปต่อตา 1 ข้าง มีผลทำให้ลูกตาเจริญเติบโตผิดปกติและโปรตีนหลายชนิดในเรตินาหายไป เมื่อนำมาวิเคราะห์แถบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE p42 เป็นโปรตีนชนิดแรกที่เริ่มหายไป ทำให้คาดว่า p42 น่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญของลูกตา ดังนั้นจึงสนใจทำการศึกษาบทบาทของ p42 โดยวิธีทางด้านวิทยาอิมมูน โดยเริ่มจากการผลิตแอนติบอดีต่อ p42 โดยนำโปรตีนสกัดจากเรตินามาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นตัดแถบโปรตีน p42 ไปกระตุ้นในหนูถีบจักรให้ผลิตแอนติบอดี แล้วตรวจสอบไตเตอร์ของซีรัมหนูด้วยวิธี ELISA พบว่าได้ซีรัมที่มีไตเตอร์เท่ากับ 1:1,000 จากนั้นนำซีรัมที่ได้มาตรวจสอบความจำเพาะด้วยวิธี Western blotting พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้จับกับโปรตีน p42 อย่างจำเพาะเจาะจง และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี immunoprecipitation พบว่าแอนติบอดีสามารถตกตะกอนโปรตีน p42 ได้ แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับได้กับ p42 ทั้งในสภาพธรรมชาติและในสภาพเสียสภาพธรรมชาติ

Abstract

Glutamate is one of the important retinal neurotransmitters. Treatment with glutamate resulted in abnormal eye growth. Using SDS-PAGE analysis of the retinal protein, p42 kDa protein was the first protein which disappeared at week three after 10 μmole/eye glutamate treatment. It is suggested that p42 kDa protein is the glutamate-sensitive protein and might be involved in the controlling of eye growth. In this study, specific antibodies against p42 kDa retinal protein were raised. Protein band from SDS-PAGE, identified as p42 kDa, was used as an antigen. Mice were injected with 3 μg antigen for 4 times at two weeks interval. Three days after the fourth injection, serum titers were determined by ELISA technique. The highest serum titer was found to be 1:1,000 dilution, approximately. Western blotting analysis showed that the antibodies, raised in this study, could specifically bind to p42 kDa protein. Using immunoprecipitation method, the antibodies were also found to react with native forms of p42 kDa protein.

คำสำคัญ กลูตาเมต; โปรตีนที่ไวต่อกลูตาเมต; แอนติบอดี
Glutamate; Glutamate-sensitive protein; Antibody

* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
** รองศาสตราจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
*** รองศาสตราจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
**** อาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
***** นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1. บทนำ

ตา ทำหน้าที่ในการรับสัญญาณภาพ และส่งสัญญาณประสาทเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง *(central nervous system)* เพื่อการรับรู้และตอบสนองต่อสัญญาณที่ได้รับอย่างเหมาะสม กระบวนการรับรู้สัญญาณภาพจะเริ่มจากแสงที่สะท้อนจากวัตถุผ่านแก้วตาและกระทบเลนส์ตาซึ่งจะทำหน้าที่รวมแสงและปรับความคมชัดให้ภาพไปตกที่เรตินา เรตินาเป็นเนื้อเยื่อประสาทที่ประกอบด้วยเซลล์ประสาทหลายชนิด โดยมี photoreceptor เป็นตัวรับพลังงานแสง เพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานไฟฟ้าและหลั่งสารสื่อประสาท *(neurotransmitters)* เพื่อส่งสัญญาณไปสู่เซลล์ชนิดอื่นต่อไป ซึ่งกระบวนการถ่ายทอดกระแสประสาทไปสู่สมองจะผ่านเส้นประสาทตา *(optic nerve) (Borwein, 1981)*

กรดกลูตามิคเป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งในเรตินา มีรายงานการฉีดกลูตามิคปริมาณต่าง ๆ เข้าไปในลูกตาไก่ จะมีผลต่อขนาดของลูกตา *(Sattayasai, et al, 1996A)* และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาแถบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าการฉีดกรดกลูตามิคปริมาณตั้งแต่ 10 μmole /ลูกตา ขึ้นไปจะทำให้โปรตีนหลายชนิดในเรตินามีปริมาณลดลง โปรตีนชนิดแรกที่เริ่มสูญหายไปคือโปรตีนขนาดโมเลกุลประมาณ 42 kDa *(p42)* ทำให้คาดว่าโปรตีนนี้น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและขนาดของลูกตา *(Sattayasai, et al,1996B)* ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเกิดอาการผิดปกติเกี่ยวกับสายตา เช่น สายตาสั้น สายตายาว สายตาเอียง เป็นต้น

ในรายงานฉบับนี้แสดงการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน p42 เพื่อใช้แอนติบอดีเป็นตัวติดตามบทบาทและหน้าที่ของโปรตีน p42 ต่อไป

2. วิธีการวิจัย

2.1 การสกัดโปรตีนจากเรตินาของไก่

สกัดโปรตีนจากเรตินาของไก่ด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0 ซึ่งมี 0.02 M EDTA ในอัตราส่วนเรตินา 0.05-0.1 กรัมต่อ buffer 500 μl โดยบดด้วย hand homogenizer ที่ 4°C แล้วปั่นที่ 10,000g ที่ 4°C ดูดเก็บชั้นสารละลาย หาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธีของ Bradford *(1976)* สารละลายที่ได้เป็น "crude extract จากเรตินา"

2.2 การผลิตแอนติบอดี

นำ crude extract จากเรตินามาเติม 2 xsolubilizing buffer *(20 mM Tris pH 6.8, 40% glycerol, 2% sodium dodecyl sulphate, 10% β-mercaptoethanol และ 0.004% bromophenol blue)* จากนั้นแยกด้วย 9% separating sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE) ด้วยความต่างศักย์คงที่ที่ 150 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที (Laemmli, 1970) แล้วย้อมด้วย 0.1% coomassie brillient blue R-250 ใน 40% methanol และ 10% acetic acid ประมาณ 30 นาที ตัดเจลตรงตำแหน่งโปรตีน p42 ทำให้แห้ง แล้วบดด้วยโกร่ง จากนั้นนำมาพองตัวใน phosphate buffered saline, pH 7.4 *(PBS, ประกอบด้วย 135 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 2.5 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4)* แล้วนำมา emulsify กับ complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 นำไปฉีดเข้าที่ใต้ผิวหนังของ หนูถีบจักรให้ได้โปรตีนประมาณ 3 μg ต่อตัว กระตุ้นภูมิคุ้มกันทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน (Harlow, 1988)

2.3 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ดัดแปลงจากวิธีของ Crowther *(1995)* กล่าวโดยย่อ ดังนี้ Coat 96-well polystyrene plate ด้วย crude extract จากเรตินาจำนวน 1 μg ต่อหลุมที่อุณหภูมิ 4°C ค้างคืน แล้วบ่ม *(incubate)* ด้วย blocking solution ประกอบด้วย 5% skim milk ใน TBST buffer *(10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl)* ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยซีรัมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากที่บ่มด้วย conjugated anti-mouse Ig alkaline phosphatase ที่เจือจาง 1:1,000 ใน TBST

buffer ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติม 1 mg/ml di-sodium 4-nitrophenylphosphate hexahydrate ใน substrate buffer *(100 mM Tris pH 9.5, 50 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl)* นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

2.4 Western blotting

ดัดแปลงจากวิธีของ Vaessen, *et.al. (1981)* กล่าวโดยย่อดังนี้ นำ crude extract จากเรตินามาเติม 2xsolubilizing buffer ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนที่แยกได้ลงบนแผ่น nitrocellulose ด้วยกระแสไฟฟ้า แล้วแช่แผ่น nitrocellulose ใน blocking solution *(5% skim milk ใน TBST buffer)* ค้างคืน แล้วบ่มด้วยซีรัมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ใน alkaline phosphatase conjugated anti-mouse Ig *(1:1,000 ใน TBST buffer)* ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้เกิดสีด้วย Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit® (Bio-Rad Laboratories, USA)

2.5 Immunoprecipitation

ดัดแปลงจากวิธีของ Daduang, *et.al. (1995)* กล่าวโดยย่อ คือ นำ crude extract จากเรตินามาบ่มกับซีรัมหนูที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน Triton-X buffer *(10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton-X100)* จากนั้นนำไปเติม protein A linked agarose bead ที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำ bead ไปล้างด้วย Triton-X buffer 6 ครั้ง นำ bead ที่ได้ไปตรวจสอบหา p42 ด้วยวิธี Western blotting

3. ผลการวิจัย

3.1 การตรวจสอบไตเตอร์และความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัม

หลังจากฉีดโปรตีน p42 เข้าไปในหนูถีบจักรจำนวน 2 ตัว ทุก 2 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดหลังฉีดครั้งที่สี่ได้ 3 วัน นำซีรัมมาตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA พบว่าเมื่อเจือจางซีรัมของหนูในระดับความเจือจาง 1:10 ซีรัมของหนูตัวที่ 1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่างจาก preimmunized serum มากที่สุด (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) ดังนั้นจึงนำซีรัมของหนูตัวที่ 1 มาตรวจหาค่าระดับไตเตอร์ พบว่าค่าไตเตอร์มีค่าประมาณ 1:1,000 (ตารางที่ 1)

จากนั้นนำซีรัมมาตรวจสอบความจำเพาะและตรวจหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Western blotting โดยใช้ serum เจือจางต่าง ๆ กัน พบว่าซีรัมของหนูตัวที่ 1 ที่ค่าการเจือจาง 1:1,000 และ 1:10,000 ปรากฏให้เห็นเฉพาะแถบโปรตีน p42 เกือบไม่ปรากฏแถบโปรตีนอื่นเลย (รูปที่ 1 ซีรัมหนูตัวที่ 1 lane 1:1,000 และ 1:10,000) ดังนั้น แอนติบอดีในซีรัมของหนูตัวที่ 1 มีความจำเพาะต่อ p42 และค่าไตเตอร์มีค่าประมาณ 1:10,000

3.2 การตรวจสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ p42 ในสภาพธรรมชาติ *(native p42)* ด้วยวิธี immunoprecipitation

นำแอนติบอดีของหนูตัวที่ 1 ที่ให้ค่าไตเตอร์สูงสุดกับ Western blotting มาตรวจสอบความสามารถในการจับกับ p42 ในสภาพธรรมชาติด้วยวิธี immunoprecipitation พบว่า แอนติบอดีสามารถตกตะกอน p42 ในสภาพธรรมชาติได้ (รูปที่ 2 lane ที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับ lane ควบคุม (รูปที่ 2 lane ที่ 1 และ 2)

4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน p42 โดยการตัดเจลที่ได้จากการนำ p42 ที่ถูกแยกด้วยวิธี SDS-PAGE ไปฉีดหนูถีบจักรจำนวน 2 ตัว เมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค ELISA พบว่าให้ค่าไตเตอร์ 1:1,000 จำนวน 1 ตัว และเมื่อนำมาตรวจสอบความจำเพาะโดยวิธี Western blotting พบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับโปรตีน p42 ในโปรตีนสกัดจากเรตินาโดยแทบไม่พบแถบโปรตีนอื่น ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้มีความจำเพาะต่อโปรตีน p42 นอกจากนี้ค่าไตเตอร์ที่ได้จากวิธี Western blotting มีค่าสูงกว่าค่าไตเตอร์ที่ได้จากวิธี ELISA แสดงว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับกับ p42 ที่เสียสภาพธรรมชาติได้ดีกว่า p42 ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากการตรวจสอบโดยวิธี Western blotting นั้น โปรตีนจะเสียสภาพ ธรรมชาติมากกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ดังนั้น เพื่อตรวจสอบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับกับ p42 ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติในสารละลาย จึงนำมาตรวจสอบความสามารถในการจับกับ p42 ด้วยวิธี immunoprecipitation พบว่า แอนติบอดีสามารถตกตะกอน p42 โดยวิธีนี้ได้ จึงคาดว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้มีความจำเพาะเจาะจงและสามารถจับได้กับp42 ทั้งในสภาพธรรมชาติและเสียสภาพธรรมชาติ ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบบทบาทของ p42 ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2542

6. เอกสารอ้างอิง

Borwein, B. 1981. **The retinal receptor : a description in vertebrate photoreceptor optics.** Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72 : 248-254.

Crowther, J.R. 1995. **ELISA : theory and practice.** New Jersey: Humana Press.

Daduang, S.; Nagata, S.; Matsuda, M.; Yamori, T.; Onodera, K. and Fukui, Y. 1995. Production of monoclonal antibodies specific to the carboxyl terminal region of the 85 kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase: Use of the antibodies in recognition of mutant p85. **Immunol Cell Biol.** 73 : 134-139.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. **Antibodies: A Laboratory Manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Laemmli, E.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227 : 680-685.

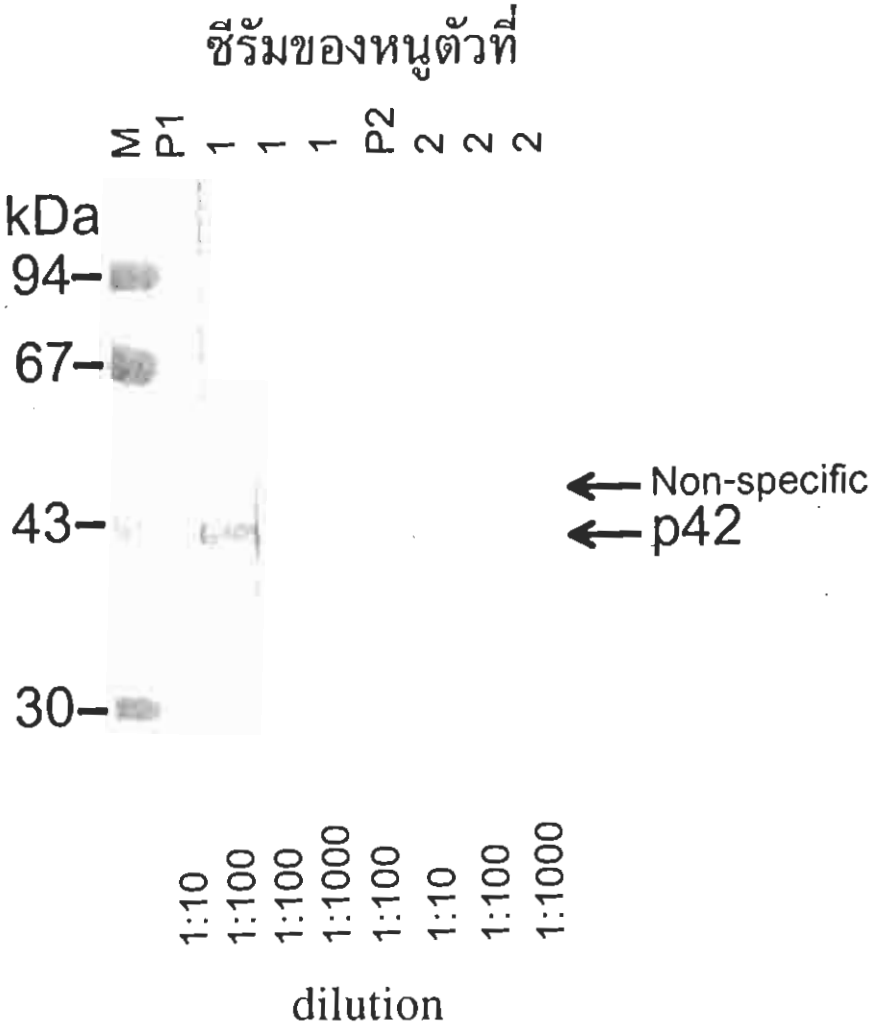
Sattayasai, J.; Pucchongkavarin, H. and Sattayasai, N. 1996A. **Abnormal growth in glutamate treated chick eyes.** Proc. 14th International Australian Winter Conference on Brain Research, Queenstown, New Zealand.

Sattayasai, N.; Pucchongkavarin, H. and Sattayasai, J. 1996B. **Glutamate-sensitive protein in chick retina.** Proc. 14th International Australian Winter Conference on Brain Research, Queenstown, New Zealand.

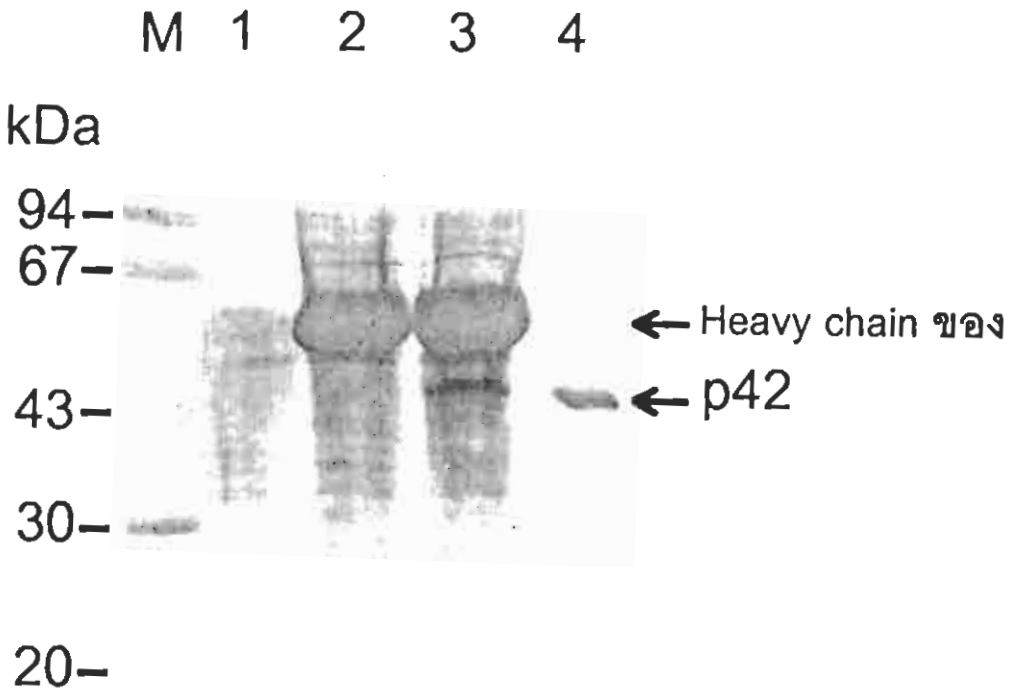
Vaessen, R.T.M.J.; Kreike, J. and Groot, G.S.P. 1981. Protein transfer to nitrocellulose filters: a simple method for quantitation of single proteins in complex mixture. **FEBS lett.** 124 : 193-196.

ตารางที่ 1 การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของซีรัมของหนูตัวที่ 1 ด้วยวิธี ELISA นำซีรัมของหนูตัวที่ 1 มาตรวจค่าไตเตอร์ด้วยวิธี ELISA โดยเจือจางซีรัมตามตาราง

ค่าความเจือจาง	ความเข้มของสี
1:10	+++
1:100	++
1:1,000	+
1:10,000	+



รูปที่ 1 ผลการตรวจจำเพาะและไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อ p42 ในซีรัมของหนูด้วยวิธี Western blotting นำ crude extract จากเรตินามาแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE หลังจากย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose แล้ว ตัดแผ่น nitrocellulose ออกเป็นเส้น นำแต่ละเส้นไปบ่มกับซีรัมของหนูแต่ละตัวด้วยค่าการเจือจางต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบกับ Pre-immunized serum ของแต่ละตัว *(lane P1 และ P2)* ส่วน lane M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน มีหน่วยของน้ำหนักโมเลกุลเป็น kilodalton



รูปที่ 2 ผลการทำ immunoprecipitation ของแอนติบอดีต่อ p42 น้ำ crude extract จากเรดินาตกตะกอนโปรตีน p42 ด้วยซีรัมของหนูตัวที่ 1 *(lane ที่ 1, 2 และ 3)* ตามที่เขียนไว้ใน "วิธีการวิจัย" lane ที่ 1 ไม่ใส่ซีรัมของหนู lane ที่ 2 ไม่ใส่โปรตีนสกัดจากเรดินา lane ที่ 3 ใส่ทั้งซีรัมและโปรตีนจากเรดินา ส่วน lane ที่ 4 โปรตีนสกัดจากเรดินานำมาทำ Western blotting โดยไม่ผ่านการทำ immunoprecipitation lane M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน มีหน่วยของน้ำหนักโมเลกุลเป็น kilodalton