

Thesis Title Determination of Lymphocyte Transformation by
 ELISA Method

Author Mr. Sekbud Buaduang
M.Sc. Microbiology

Examining Committee:

Assoc. Prof. Dr. Sanit Makonkawkeyoon	Chairman
Assist. Prof. Dr. Vicharn Vithayasai	Member
Assist. Prof. Dr. Prakong Vithayasai	Member
Assist. Prof. Dr. Niwat Maneekarn	Member

ABSTRACT

Transformation test is a method for determining response of leukocytes such as lymphocyte to specific antigens and non-specific mitogens. Although the transformation test by measuring radioisotope-labelled thymidine incorporation for deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis is a widely use for *in vitro* assay of cell-mediated immunity (CMI) response. This radioactive method is restricted to the quantitation of newly synthesized DNA and it provides good sensitivity. However, it requires expensive instruments and radioisotope which is hazardous for health. In this study, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed and used for the determination of lymphocyte transformation *in vitro* using polyclonal antilymphoblast (ALB) serum. Treatment of peripheral blood mononuclear leukocytes (PBML) mitogenic lectins induce marked changes in the cell's morphology, physiology and the composition of the cell surface. Antilymphoblast serum was produced in rabbits using lymphoblast cultured in complete RPMI-1640 medium supplemented with 20% concanavalin A-stimulated culture supernate. PBMLs were stimulated with phytohemagglutinin P and transformation assayed by ELISA principle using rabbit antilymphoblast and guinea pig anti-

rabbit IgG-globulin conjugate. Results were compared with those of radioactive method. In healthy normal subjects, there is an increase of optical density (OD) in stimulated group of cell cultures which is significantly higher than unstimulated cell culture. When the results were tested for correlation among the values of OD, count per minute (cpm) and % blast cells of the two methods. The correlation coefficient (r -value) of 3 variable pairs; OD vs cpm, cpm vs % blast and OD vs % blast; were 0.990, 0.898 and 0.876, respectively, for stimulated group while the r -value for unstimulated group were 0.658, 0.417 and 0.190, respectively.

In conclusion, cell ELISA method described here is one of suitable alternative method for the determination of transformation, at least for screening purposes of CMI response in normals and immunodeficiency patients.

จัดทำโดย คณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบการเปลี่ยนรูปของลิมฟocyte โดยวิธีอิเล็กทรอนิกส์

ชื่อผู้เขียน นายศุภบุญย์ บัวดวง

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลทรรศน์วิทยา

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์:

รองศาสตราจารย์ ดร. สินิท มากกันเกียรติ	ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิชาญ วิทยาดัย	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ประคง วิทยาดัย	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิวัติ์ มณีกาญจน์	กรรมการ

บหคดย่อ

การตรวจสอบการเปลี่ยนรูปเป็นวิธีการหนึ่ง ที่ใช้ในการวัดหาการตอบสนองของเม็ดเลือดขาว เช่น ลิมโฟไซท์ ต่อสิ่งกระตุ้นที่มีความจำเพาะ (specific antigens) และไม่จำเพาะ (non-specific mitogens) ต่อลิมโฟไซท์ ถึงแม้ว่าการตรวจสอบการเปลี่ยนรูปนี้โดยวัดหาปริมาณของไทมิดินที่ติด粘膜ด้วยสารรังสี (radiolabelled thymidine) ที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์เพื่อการสังเคราะห์สารพัฒนาวรรณ ซีมิดดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic Acid; DNA) จะเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและใช้กันทั่วไปใน การตรวจหาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (Cell-Mediated Immunity : CMI)

ในหลอดทดลอง การวัดปริมาณรังสีนี้เป็นวิธีการที่บ่งบอกถึงปริมาณของดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่และวิธีนี้ก็มีความไว (sensitivity) สูง อよ่างไรก็ตามเครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับ การตรวจสอบนี้ค่อนข้างจะมีราคาแพง อิกทั้งสารรังสีเองก็เป็นอันตรายต่อร่างกาย ในการศึกษาที่ได้นำเอา วิธี อิเล็กทรอนิกส์ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; ELISA) มาใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนรูปของ ลิมโฟไซท์ในหลอดทดลองโดยใช้เชรุ่มที่มีแอนติบอดีตต่อลิมโฟบลาสท์ลาย ซึ่งตัวรวมกัน (polyclonal antibody lymphoblast serum) การกระตุ้น peripheral blood mononuclear leukocytes (PBML) ด้วยสารกระตุ้นชนิดlectin (mitogenic lectin) จะชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากทั้งในด้านรูป ร่างและการทำงานของเซลล์ รวมถึงองค์ประกอบของผิวเซลล์ Antilymphoblast serum ถูกสร้างขึ้น ในกระต่ายโดยใช้ลิมโฟบลาสท์ของคนที่แพ้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสม 20 เบอร์เซนต์ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการแพ้เลี้ยงเซลล์ PBML ร่วมกับ concanavalin A PBML ที่จะทำ การตรวจสอบจะกระตุ้นด้วยlectinชนิด phytohemagglutinin P (PHA-P) แล้วนำมาตรวจสอบการเปลี่ยนรูปโดยวิธีอิเล็กทรอนิกส์ โดยวัดปริมาณความเข้มของสีที่เกิดขึ้น เมื่อทำการเจริญเติบโตของเซลล์

ระหว่างวิธีที่ใช้สารรังสีกับวิธีอื่นๆ ที่มีผลทางชั้นในเซลล์ของกลุ่มคนปกติพบว่า เซลล์กลุ่มนี้ถูกกระตุ้นด้วย PHA-P มีการเพิ่มขึ้นของความเข้มของสีบรามาณ 2 เท่า และมีการสร้างตัวอินเอ็นเอเพิ่มขึ้นประมาณ 18 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น เมื่อทำการหาความสัมพันธ์ของวิธีทั้งสอง โดยใช้ค่าความเข้มของสี ปริมาณสารที่ติดฉลากด้วยสารรังสีที่นำเข้าเซลล์ และเบอร์เซนต์ของเซลล์บลาสท์ พบว่าในกลุ่มของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นนั้นมีความสัมพันธ์กันอย่างดี โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient : r-value) ระหว่าง ความเข้มของสีกับปริมาณรังสี ปริมาณรังสีกับเบอร์เซนต์เซลล์บลาสท์ และความเข้มของสีกับเบอร์เซนต์เซลล์บลาสท์ เท่ากับ 0.990, 0.898 และ 0.876 ในกลุ่มของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นตามลำดับ ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกลุ่มเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นเท่ากับ 0.658, 0.417 และ 0.190 ตามลำดับ ก่อให้โดยสรุปจากวิธีการ cell ELISA ที่มีผลทางชั้นในการติดเชื้อนี้ เป็นวิธีการที่เหมาะสมนิยมใช้ที่ส่วนมากนำมาใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนรูปของเซลล์ อย่างห้อยก็เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (CMI response) ในคนปกติและผู้ป่วยที่มีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved