

หัวข้อวิทยานิพนธ์ วิธีการโพลีไซโตเมตริกเพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน FLT3
บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ผู้เขียน นางสาวศิมน จูฑะภักดี

ปริญญา เกษตรศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เกษตรกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษา ผศ. ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเสวต อาจารย์ที่ปรึกษาลึก
 ผศ. ดร. ทรงยศ อนุษปรีดา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โปรตีน FLT3 สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนของมะเร็งเม็ดเลือดขาว ทำให้มีความพยายามนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับประเมินการดำเนินของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดมัยอีลอยด์ (AML) จึงได้ทำการศึกษาและพัฒนาการตรวจหาปริมาณระดับโปรตีน FLT3 บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาสถานะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโฟลไซโตเมทรี เพื่อการตรวจวัดระดับโปรตีน FLT3 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด EoL1 เป็นเซลล์ต้นแบบ ปัจจัยที่ได้ทำการประเมินเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมก่อนการวิเคราะห์คือความเข้มข้นของแอนติบอดี ความเข้มข้นของเซลล์ และเวลาในการทำปฏิกิริยาเพื่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี การลดความเข้มข้นของแอนติบอดี ความเข้มข้นของเซลล์ และเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาทำให้สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ลดจำนวนตัวอย่างที่ใช้ และเกิดความรวดเร็วในการวิเคราะห์ โดยสถานะในการเตรียมตัวอย่างเซลล์ที่เหมาะสม ใช้เซลล์ 5×10^5 เซลล์ ต่อ 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ FLT3 ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ต่อ 100 ไมโครลิตร และบ่มไว้เป็นระยะเวลา 45 นาที จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโฟลไซโตเมทรีที่พัฒนาขึ้นในหัวข้อช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้น ตลอดจนความแม่นยำ ความถูกต้อง ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (LLOQ) และความคงตัวภายหลังการเตรียมตัวอย่างจากการสร้างกราฟมาตรฐานของเซลล์ที่หาคความเข้มข้น และช่วงการควบคุมคุณภาพ (QC levels) ที่สามารถวัดความเข้มข้นได้แก่ 25% 50% และ 75% ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน FLT3

(EoL1) พบว่าได้กราฟที่เป็นเส้นตรง ($r^2 > 0.995$) ในการตรวจสอบความแม่นยำแสดงจากการหาเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ของความแปรผัน (%CV) พบว่ามีค่าน้อยกว่า 20% ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน การตรวจสอบความถูกต้องหาได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของการวิเคราะห์ (%recovery) ภายในวันเดียวกัน และระหว่างวันของเซลล์ EoL1 ที่ช่วงความเข้มข้นของการควบคุมคุณภาพ มีค่าระหว่าง 90-110% นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ค่าคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RE) มีค่าน้อยกว่า 15% ในทุกตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบ LLOQ พบว่ามีค่าเท่ากับความเข้มข้น 10% ของเซลล์ EoL1 โดยมีค่าความแม่นยำ และค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อยู่ภายในเกณฑ์การยอมรับ จากการศึกษาความคงสภาพของเซลล์หลังการเชื่อมด้วยแอนติบอดี พบว่า %CV ของเซลล์ EoL1 ที่ช่วงความเข้มข้นของการควบคุมคุณภาพในวันที่ 0, 1, 2, 7 และ 14 ภายใต้อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส มีค่าไม่เกิน 10% ฉะนั้นตัวอย่างที่แช่เย็นหลังจากการเชื่อมด้วยแอนติบอดีสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ภายในสองสัปดาห์ หลังจากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโพลีไซโตเมทรีที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อการวัดโปรตีน FLT3 ได้ผ่านตามเกณฑ์ซึ่งเป็นที่ยอมรับจากแนวทางการศึกษาจากบทความทางวิทยาศาสตร์ วิธีโพลีไซโตเมทรีที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาระดับโปรตีน FLT3 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกของผู้ป่วย พบว่าระดับการแสดงออกของ FLT3 ในตัวอย่างไขกระดูกแสดงผลในทิศทางเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Western blotting และ RT-PCR โดยสรุปวิธีโพลีไซโตเมทรีในการศึกษานี้แสดงถึงเทคนิคการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ น่าเชื่อถือ รวดเร็วและประหยัดสำหรับการตรวจวัดหาระดับการแสดงออกของโปรตีน FLT3 วิธีการนี้สามารถนำไปใช้เป็นรูปแบบเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์และพัฒนาสำหรับการศึกษาค้นคว้าวิจัยทางด้านชีวภาพที่สนใจต่อไปโดยวิธีโพลีไซโตเมทรี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Flow Cytometric Method for Detecting the Expression of FLT3 Protein Levels on Leukemic Cell Surface	
Author	Miss Wasimon Jutapakdee	
Degree	Master of Science (Pharmaceutical Sciences)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda	Co-advisor

ABSTRACT

FLT3 protein can promote cell proliferation in leukemic blast cells. Attempts to use FLT3 as a biomarker for prognosis evaluation of acute myeloid leukemia (AML), the quantification of FLT3 protein levels on leukemic cell surface by flow cytometry was studied and developed. The aim of the study is to optimize and validate the flow cytometric method for FLT3 protein level detection in leukemic cells by using EoL1 as a leukemic cell line model. Antibody concentration, cell concentration, and incubation time were variables examined for appropriate sample treatment conditions. A decrease in antibody concentration, cell concentration and incubation time related to economical analytical cost by means of reduced cell samples and rapid analysis. Optimal conditions for cell sample treatment consisted of 5×10^5 cells/100 μ l reacted with 1 μ g/100 μ l of FLT3 antibody and incubated for 45 min. Then the developed flow cytometric method was validated for linearity and range, precision, accuracy, lower limit of quantification (LLOQ), and stability after sample treatment. The calibration curve with six cell concentrations and three quality control (QC) levels at 25%, 50%, and 75% of positive cell control (EoL1) was performed. The calibration curve demonstrated good linearity ($r^2 > 0.995$) of the assay. The percentage coefficient of variation (%CV) was examined for precision and was less than 20% in both intra-day and inter-day precision evaluation. For accuracy assay, the percentage recoveries of intra-day and inter-day QC levels were between 90-110%. In addition, the percentage relative error (%RE) was

also reported, and expressed less than 15% in all cases. LLOQ was found to be 10% of positive cell concentration with acceptable precision and accuracy. After antibody labeling, the stability of this system was presented by variation monitoring %CV of QC samples on day 0, 1, 2, 7, and 14 under a temperature of 2-8°C in the assay matrix. The %CVs were less than 10% in all cases. Therefore, the refrigerated samples could be analyzed within two weeks. Validation of the developed flow cytometric method for FLT3 protein determination was accomplished with acceptable criteria according to guidance documents from scientific literature. The developed flow cytometric method was applied for FLT3 protein level determination on leukemic cells obtained from patients' bone marrow samples. The levels of FLT3 expression on bone marrow samples demonstrated the same tendency by comparing to Western blotting and RT-PCR. In summary, the flow cytometric method in this study demonstrated the effective, reliable, rapid, and economical analytical technique for FLT3 protein level detection. Application of this method will provide a model for analytical method development for biomarker determination by flow cytometry.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved