การตรวจการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์ด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ (Detection of Cytokine Genes Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cell of Human by RT-PCR Technique)

ปิยะ วงศ์ญาณิน*

*สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคสำหรับตรวจวัดการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-2, IL-4, IL-10 และ IFN-γ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวของมนุษย์ โดยนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวที่แยกจากเลือดของมนุษย์กระตุ้นเซลล์ด้วยสารไฟโตฮีแมกกลูตินิน (phytohaemagglutinin, PHA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ (reverse transcription and polymerase chain reaction, RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน IL-2, IL-4, IL-10 และ IFN-γ ซึ่งผลการทดลองพบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดถูกต้องตามที่ได้คำนวณไว้ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อยีนไซโตไคน์ที่ต้องการศึกษา และสามารถใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ได้ นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวสามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการสร้างไซโตไคน์ในตัวอย่างที่ไม่ต้องการการยืนยันการสร้างไซโตไคน์ที่ระดับโปรตีน

คำสำคัญ: อาร์ทีพีซีอาร์/ ไซโตไคน์/ เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว

Abstract

In this study, development of a PCR-based technique for detection of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN-γ gene expression had been performed. In brief, peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was isolated from the heparinized human blood by gradient centrifugation and then stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) for 24 hours. Subsequently, cytokine gene expression was detected by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) from RNA sample using specific primers.

The result showed that PCR product had the correct size. In conclusion, the primers matched the target gene and be useful for cytokine gene study. Moreover, RT-PCR technique can reduce the cost of cytokine detection in sample that does not require detection at the protein level.

Keywords: RT-PCR/ Cytokine/ Peripheral blood mononuclear cell

บทนำ

ไซโตไคน์เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตด้วยรูปแบบที่เหมาะสมตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นประเภทที่แตกต่างกัน (จงกลนี, 2551) ด้วยเหตุนี้การตรวจรูปแบบการหลั่งไซโตไคน์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันและการประเมินสุขภาพของมนุษย์ การศึกษารูปแบบการสร้างไซโตไคน์นิยมทำในระบบที่สามารถควบคุมได้สะดวกและสามารถแสดงรูปแบบการสร้างไซโตไคน์ที่จำเพาะกับสิ่งกระตุ้นได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้โมเดลของโมโนนิวเคลียสเซลล์หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกได้จากกระแสโลหิตซึ่งประกอบด้วยประชากรเซลล์สำคัญ ได้แก่ เซลล์ลิมโฟไซต์และเซลล์โมโนไซต์กลายเป็นโมเดลพื้นฐานที่ได้รับความนิยมในการศึกษาการสร้างไซโตไคน์ในมนุษย์

ไซโตไคน์พื้นฐานที่นิยมใช้ในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในมนุษย์ ได้แก่เช่น IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ เป็นต้น (Abbas & Lichtman, 2005; Abbas & Lichtman, 2006) โดยสามารถตรวจวัดไซโตไคน์โดยตรงด้วยเทคนิคที่หลากหลาย เช่น เอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอบเบนท์-แอสเซย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) เป็นการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นสารน้ำ โฟลไซโทเมทรี (Flow cytometry) และ เอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนสปอต-แอสเซย์ (enzyme-linked immunospot, ELISPOT) เป็นการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ได้ (สันนิภา, 2549) และอิมมูโนฮีสโตเคมี (Immunohistochemistry) ซึ่งใช้ตรวจหาไซโตไคน์ในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่อยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ อย่างไรก็ตามเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นจำเป็นต้องใช้แอนติบอดีต่อไซโคไคน์ที่ต้องการศึกษาและต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะทำให้มีค่าใช้จ่ายและบางเทคนิคต้องการผู้ที่มีความเชี่ยวชาญจำเพาะในการวิเคราะห์และแปลผลซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญประการหนึ่งในการวิเคราะห์การสร้างไซโตไคน์ในระบบการทดลองแบบต่อเนื่อง ด้วยเหตุนี้การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ทางอ้อมโดยการตรวจการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในกรณีดังกล่าว เนื่องจากเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ไม่ต้องการแอนติบอดีและเครื่องมือจำเพาะในการปฏิบัติ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ เพื่อใช้ในการตรวจวัดวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ต่างๆ ได้แก่ IL-2, IL-4, IL-10 และ IFN-γ ซึ่งเป็นไซโตไคน์พื้นฐานสำหรับจำแนกรูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการทำงานลิมโฟไซต์ต่อแอนติเจนชนิดต่างๆได้

วิธีการทดลอง

การออกแบบไพรเมอร์ (primer) และการตรวจสอบความเข้ากันได้ของไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซโตไคน์ IL-2, IL-4, IL-10, และ IFN-γ ของคนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank มาวิเคราะห์หาส่วนที่เหมาะสมจะใช้เป็นไพรเมอร์โดยโปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ Light Cycler Probe and Primer Design Software จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้ากันได้ของไพรเมอร์แต่ละเส้นโดยอาศัยโปรแกรม Oligos ซึ่งเป็นการตรวจสอบในเบื้องต้นว่าไพรเมอร์แต่ละเส้นจะไม่จับกันเอง

การเก็บตัวอย่างและแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว

เก็บตัวอย่างเลือดในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว heparin sodium จากนั้นทำการแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวด้วยเทคนิค density gradient centrifugation โดยปล่อยเลือดปริมาตร 10 ml ซ้อนทับบนสารละลาย Isoprep® separation medium (Robbins Scientific Cooperation, USA) ปริมาตร 5 ml ในหลอดโพลีโพรพิลีนขนาด 15 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บชั้นสารส่วนที่มีเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว ใส่หลอดโพลีโพรพิลีนขนาด 15 ml และล้างเม็ดเลือดขาวที่เก็บได้ด้วยสารละลาย PBS โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 5 นาที ทำลายเม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนด้วยวิธีไฮโดรไลซิสโดยเติมน้ำกลั่น (dd H_2O) ปริมาตร 2 ml และตามด้วย PBS ความเข้มข้น 2 เท่า (2x PBS) ทันที ล้างเม็ดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวที่ได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 5 นาที และทำการปั่นเหวี่ยงล้างเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวด้วย PBS อีกครั้ง นับปริมาณเม็ดเลือดขาว เจือจางเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ในน้ำยา RPMI 1640 (GIBCO/BRL, USA) ที่มี 10% fetal bovine serum (GIBCO/BRL), L-glutamine 2 mM (GIBCO/BRL), β-mercatoethanol 50 μl (Sigma Chemical Co., USA) และ 100 unit/ml ของ penicillin G, 100 μl/ml ของ Streptomycin และ 0.25 μl/ml ของ amphotericin B (GIBCO/ BRL)

การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภทนิวเคลียสเดียว

เพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในเพลทพลาสติกชนิด 24 หลุม โดยใช้เซลล์ปริมาณ 5×10^6 cells/ml/well (Wongyanin *et. al.*, 2010) โดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไฟโตฮีแมกกลูตินินความเข้มข้น 5 μg/ml เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ใส่หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 ml และปั่นเหวี่ยงล้างเซลล์ด้วย PBS ที่ความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเม็ดเลือดขาวไปสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวมาสกัดอาร์เอ็นเอ และกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ สำเร็จรูป PrefectPure RNA Cultured cell Kit (5 Prime, Germany) ตาม

เอกสารคำแนะนำของบริษัท ละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ใน RNase-free water 50 μl/ ตัวอย่าง เก็บอาร์เอ็นเอ ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวมาสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน (reverse transcription) ด้วยชุดน้ำยา RealMasterScript™ SuperMix Kit (5 Prime, Germany) ตามที่ระบุในเอกสารคำแนะนำของบริษัท เก็บคอมพลีเมนทารี-ดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction - PCR)

นำคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ ที่สังเคราะห์ได้ ตรวจหาการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ต้องการศึกษาด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับยีน GAPDH, IFN-γ, IL-10, IL-2 และ IL-4 โดยในปฏิกิริยา ปริมาตร 50 μl ประกอบด้วย คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ 2 μl, ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด 1 μl, ไพรเมอร์รีเวิร์ส 1 μl และ 5 prime Hotmaster Mix 20 μl (5 Prime, Germany) โดยเตรียมปฏิกิริยาหลอดไมโครทิวป์ขนาด 0.2 ml โดยมีรายละเอียดของปฏิกิริยาดังนี้

1. ขั้นตอนดีเนเทอเรชัน (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที
2. ขั้นตอนแอนนิลลิง (annealing) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 45 วินาที และ
3. ขั้นตอนเอ็กเทนชัน (extension) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1 นาที
4. วนรอบเป็นจำนวน 35 รอบ โดยในรอบสุดท้ายเป็นขั้นตอนเอ็กเทนชัน เพิ่มระยะเวลาเป็น 5 นาที
5. เก็บผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่สร้างได้จากการเพิ่มจำนวนมาแยกตามขนาดของดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกขนาดดีเอ็นเอ ในอะกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ซึ่งละลายในตัวทำละลายทีบีอี (1x TBE buffer) โดยเติมเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จนได้ความเข้มข้น 0.5 μg/ml ตรวจดูผลผลิตพีซีอาร์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA marker, ladder) ขนาด 100 bp วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้โปรแกรม Scion Image Analysis เพื่อหาร้อยละการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ทำการตรวจสอบ โดยเทียบกับค่าระดับการแสดงออกของ housekeeping gene GAPDH ตามสูตร (Suradhat *et. al.*, 2003)

ร้อยละการแสดงออก = (การแสดงออกของยีนไซโตไคน์/ การแสดงออกของยีน GAPDH) x100 แสดงค่า ร้อยละการแสดงออกของแต่ละกลุ่มทดลอง โดยใช้ค่า mean ± SD และแสดงผลเป็นกราฟโดยโปรแกรม GRAPHPAD PRISM, version 5 (GraphPad Software)

ผลการวิจัย

การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน GAPDH, IL-2, IL-4, IL-10 และ IFN-γ โดยอ้างอิงจากลำดับเบสของยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ Genbank โดยใช้โปรแกรม Light Cycler Probe Design เวอร์ชัน 2 โดยลำดับเบสของไพรเมอร์ และขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการคำนวณแสดงไว้ในตารางที่ 1

การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยไฟโตฮีแมกกลูตินิน

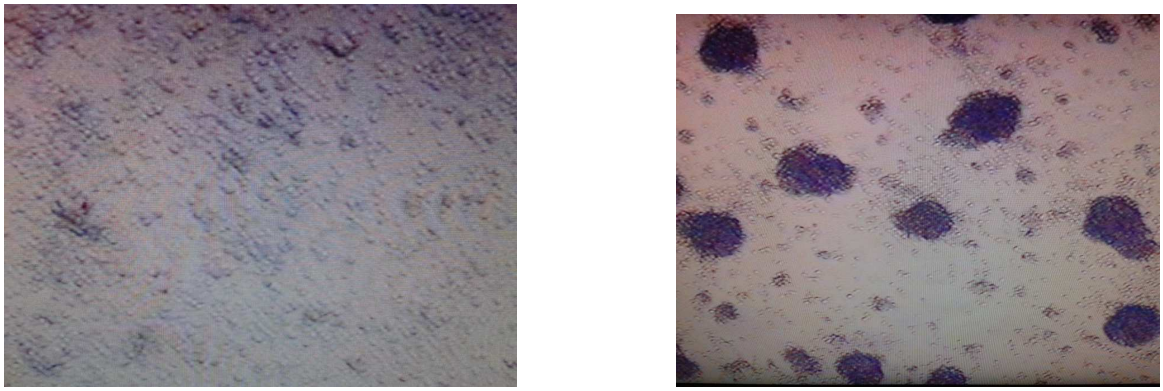
เซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 1ก) และกลุ่มที่ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไฟโตฮีแมกกลูตินินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 1ข) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไฟโตฮีแมกกลูตินินมีการเพิ่มจำนวน (proliferation) โดยพบกลุ่มของเซลล์ที่เกิดจากการแบ่งตัวต่างจากกลุ่มควบคุม

การตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนไซโตไคน์

จากการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของยีนไซโตไคน์ IL-2 IL-4 IL-10 และ IFN-γ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไฟโตฮีแมกลูตินิน พบว่าขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ปรากฏบนอะกาโรสตรงกับที่ได้คำนวณ (ภาพที่ 2 และตารางที่ 1) โดยค่าร้อยละการแสดงออกของยีนไซโตไคน์เทียบกับ housekeeping gene GAPDH แสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3

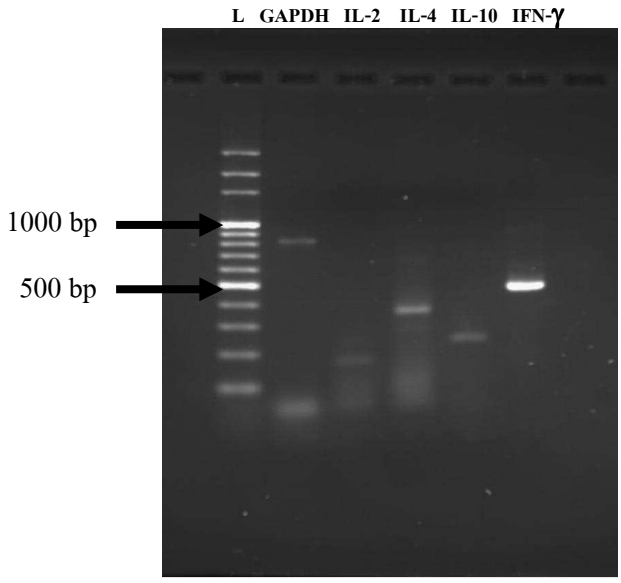
ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์และขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้

Genbank accession number	Primer	Sequence (5'-----3')	PCR product size
NM_001256799.1	GAPDH-F	CTA-GAT-TAT-TCT-CTG-ATT-TGG-TCG-TA	829
	GAPDH-R	CAC-CTG-GTG-CTC-AGT-GTA	
NM_000586.3	IL-2-F	TCA-CTT-AAG-ACC-CAG-GGA-C	164
	IL-2-R	TCA-GTG-TTG-AGA-TGA-TGC-TTT-G	
NM_000589.3	IL-4-F	GTT-CTT-CCT-GCT-AGC-ATG-T	336
	IL-4-R	CAG-GAA-TTC-AAG-CCC-GC	
NM_000572.2	IL-10-F	TCC-TTG-CTG-GAG-GAC-TT	227
	IL-10-R	TTC-TTC-ACC-TGC-TCC-ACG	
NM_000619.2	IFN-γ-F	TTA-CTG-CCA-GGA-CCC-ATA	452
	IFN-γ-R	GGC-AGG-ACA-ACC-ATT-ACT	



ก ข

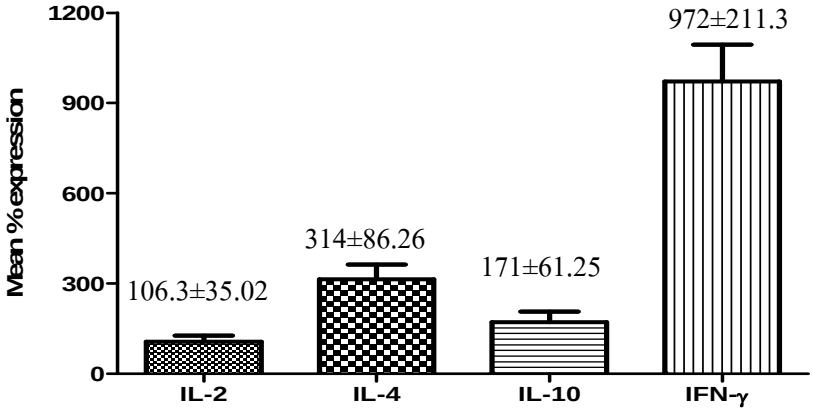
ภาพที่ 1 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวที่ไม่ได้กระตุ้น (ก) และที่กระตุ้นด้วยไฟโตฮีแมกกลูตินิน (ข) เลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{o}C และมี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 แสดงขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ของยีน GAPDH, IL-2, IL-4, IL-10 และ IFN-γ โดยใช้ agarose gel electrophoresis เทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน 100 bp ladder (L)

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว

ตัวอย่างที่	ร้อยละการแสดงออกของยีนไซโตไคน์			
	IL-2	IL-4	IL-10	IFN-γ
1	105	373	182	1190
2	142	354	226	768
3	72	215	105	959
Mean±SD	106.3±35.02	314±86.26	171±61.25	972±211.3



ภาพที่ 3 ค่าเฉลี่ยของร้อยละการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว

สรุปและอภิปรายผล

การวิจัยครั้งนี้ ได้พัฒนาเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ สำหรับตรวจวัดการแสดงออกของยีน IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ และ GAPDH ในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวที่แยกจากกระแสโลหิตของคน ซึ่งเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์สามารถตรวจระดับการแสดงออกของยีนไซโตไคน์จากเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภทนิวเคลียสเดียวของคน ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และรวดเร็ว เนื่องจากกระบวนการตั้งแต่สกัดอาร์เอ็นเอ การทำอาร์ที-พีซีอาร์ และการวิเคราะห์ผลอะกาโรส จะใช้เวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง นอกจากนี้ผลการตรวจการแสดงของของยีนไซโตไคน์จะสอดคล้องกับการตรวจหาไซโตไคน์ในระดับโปรตีน (Sorensen, *et al*., 2011) แต่จะมีค่าใช้จ่ายต่ำการตรวจวัดไซโตไคน์ในระดับโปรตีนมาก เนื่องจากที่ไม่ต้องการแอนติบอดีและเครื่องมือจำเพาะในการปฏิบัติ อย่างไรก็ตามการตรวจแสดงของของยีนไซโตไคน์เป็นการวัดปริมาณไซโตไคน์ทางอ้อม ไม่สามารถใช้ในการนับจำนวนเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ หรือหาตำแหน่งของเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ได้ ดังนั้นเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ จึงเหมาะกับการตรวจสอบ

การเปลี่ยนแปลงการสร้างไซโตไคน์ในตัวอย่างปริมาณมากที่ไม่ต้องการการยืนยันการสร้างไซโตไคน์ที่ระดับโปรตีน

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น ในการพัฒนาระบบสำหรับตรวจวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ โดยผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์ของยีนไซโตไคน์แต่ละชนิดให้มีอุณหภูมิของช่วงการแอนนิลลิง ใกล้เคียงกันและได้ทำการตรวจสอบความเข้ากันได้ของไพรเมอร์แต่ละเส้นโดยอาศัยโปรแกรม Oligos ซึ่งเป็นการตรวจสอบในเบื้องต้นว่าไพรเมอร์แต่ละเส้นจะไม่จับกันเอง และจากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนไซโตไคน์ได้ และผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดถูกต้องตามที่ได้คำนวณไว้ ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปจะทำการพัฒนาระบบมัลติเพล็กพีซีอาร์สำหรับตรวจวัดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ ซึ่งเป็นเทคนิคสำหรับตรวจการแสดงออกของยีนไซโตไคน์หลายยีนพร้อมกัน ในหลอดทดลองเพียงหลอดเดียว ทำให้สามารถการศึกษาการสร้างไซโตไคน์ในมนุษย์ได้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวสุวรรณา มงคลเปี่ยม และ นางสาวอาอีเซาะ หะยีอูมา นิสิตสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือด และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จงกลนี วงศ์ปิยะบวร. (2551). ไซโตไคน์, น. 131-140. ใน อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์บรรณาธิการ. **วิทยาภูมิคุ้มกัน พื้นฐานและคลินิก.** กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดภาพพิมพ์.

สันนิภา สุรทัตต์. (2549). **วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์ภาคปฏิบัติ**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ตีรณสาร.

Abbas, A.K., & Lichtman, A.H. (2005). **Cellular and Molecular Immunology**. 5th ed. Elsevier Saunders. (USA)

Abbas, A.K., & Lichtman, A.H. (2006). **Basic Immunology Function and Disorders of Immune System.** 2nd ed. Elsevier Saunders. (USA)

Sorensen, N.S., Skovgaard, K. & Heegaard, P. M.H. (2011). Porcine blood mononuclear cell cytokine responses to PAMP molecules: comparison of mRNA and protein production. **Vet. Immunol. Immunopatho.** 139, 296-302

Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., & Poovorawan, Y. (2003). Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **J. Gen. Virol.** 84, 453-459.

Wongyanin, P., Buranapraditkun, S., Chokeshai-Usaha, K., Thanawonguwech, R. & Suradhat, S. (2010). Induction of inducible $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ regulatory T lymphocyte by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). **Vet. Immunol. Immunopathol,** 133, 170-182.