

Thesis Title Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Hemoglobins in Hemoglobin Bart's Hydrops Fetalis Syndrome

Author Mr. Sakdinan Khamrin

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee:

Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerak Chairman

Asst. Prof. Dr. Thanusak Tatu Member

Lect. Dr. Sawitree Chiampanichayakul Member

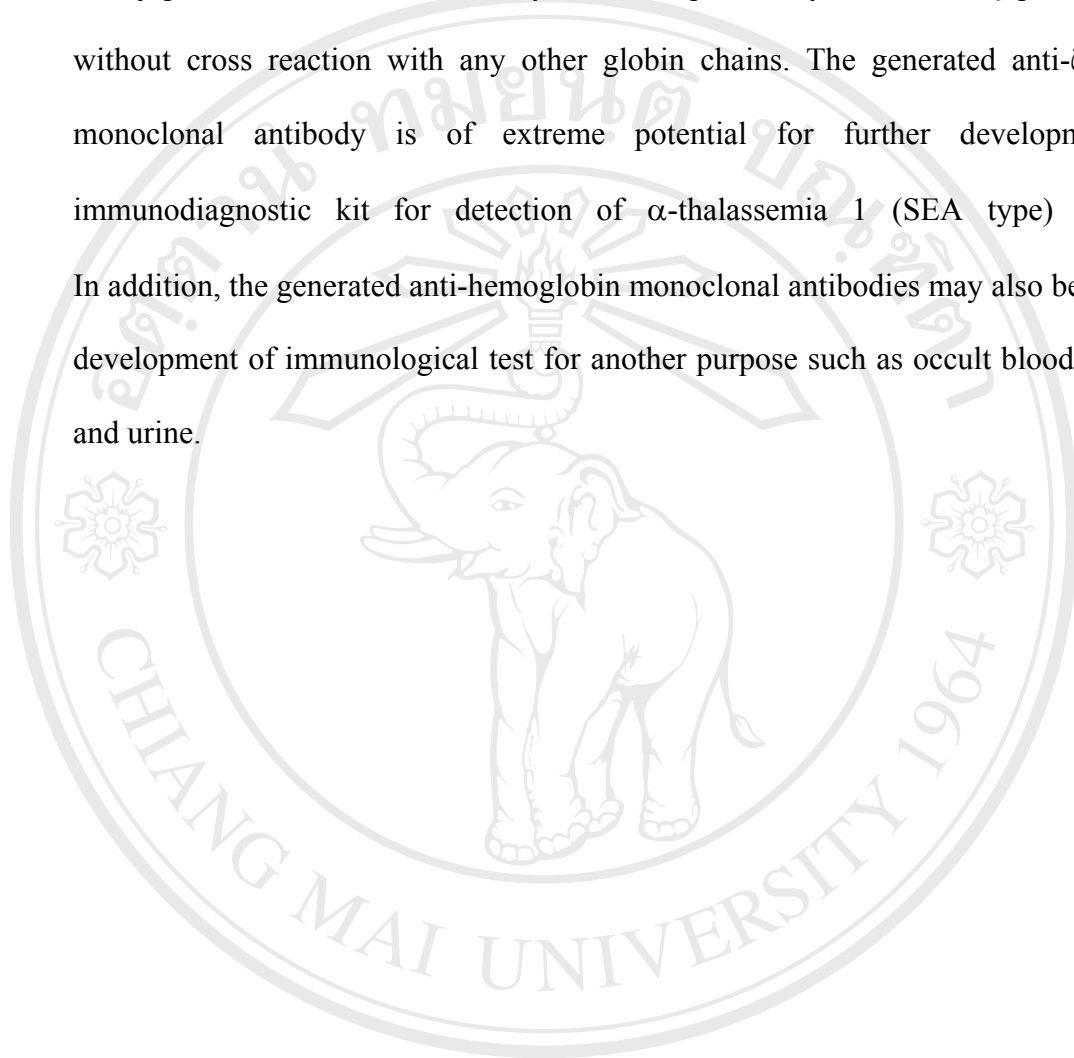
ABSTRACT

Hemoglobin (Hb) Bart's hydrops fetalis syndrome is the most severe type of α -thalassemia caused by the deletion of all four α -globin genes. The total absence of α -chain synthesis causes the accumulation of free γ globin chains and forms Hb Bart's (γ_4) which contains about 80-90% of total hemoglobin. Another hemoglobin presented in Hb Bart's hydrops fetalis's red blood cells is Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$). All fetuses with this genotype die just before birth or a few hours after birth. Moreover, mothers of these hydrops usually suffer from several obstetric complications and half of them are dead under un-proper medical care. Couples with

α -thalassemia 1 heterozygote have one-fourth opportunity in producing Hb Bart's hydrops fetalis babies. To reduce Hb Bart's hydrops fetalis cases, the α -thalassemia 1 heterozygotes need to be identified and counseled. Currently, several methods for identifying of α -thalassemia 1 have been developed. According to their complexity and high cost, the available methods are not suitable for screening of α -thalassemia 1 carriers in the general populations. Simple and rapid method, such as the immunological test, can overcome these problems. In this study, we aimed to produce monoclonal antibodies against hemoglobins presented in the Hb Bart's hydrops fetalis. The generated monoclonal antibodies will be applied for development of simple immunodiagnostic kit which will be used to screen α -thalassemia 1 carriers in the future.

To generate monoclonal antibodies against abnormal hemoglobins presented in the Hb Bart's hydrops fetalis hemolysate, BALB/c mice were immunized by using hemolysate of Hb Bart's hydrops fetalis and purified hemoglobin Portland. With the appearance of the specific antibodies, splenocytes of the immunized mice were harvested and fused with myeloma cells to generate hybridoma cells. The produced monoclonal antibodies were characterized for their specificities by ELISA and Western blotting using different types of hemolysates, purified hemoglobins A, A₂, E and F and various globin chains including ζ , $A\gamma$, $G\gamma$, α , β and δ . In this study, we generated four monoclonal antibodies which arbitrarily named HB1, HB2, HB3, and HB4. These monoclonal antibodies recognized all types of hemoglobins originating from both human and animals. And Thal-PL1, on the other hand, was shown to be

anti- ζ globins monoclonal antibody since it specifically reacted to ζ -globin chain without cross reaction with any other globin chains. The generated anti- ζ globin monoclonal antibody is of extreme potential for further development of immunodiagnostic kit for detection of α -thalassemia 1 (SEA type) carriers. In addition, the generated anti-hemoglobin monoclonal antibodies may also be used in development of immunological test for another purpose such as occult blood in stool and urine.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ
ฮีโมโกลบินในกลุ่มอาการฮีโมโกลบินบาร์ตไฮดรอปัสฟีตอลลิส

ผู้เขียน นายศักคินันท์ คำรินทร์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วัชระ กลินธุภักษ์	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ธนุศักดิ์ ตาตุ	กรรมการ
อ. ดร. สาวิตรี เจียมพานิชกุล	กรรมการ

บทคัดย่อ

ฮีโมโกลบินบาร์ตไฮดรอปัสฟีตอลลิสเป็นกลุ่มอาการชนิดที่รุนแรงที่สุดของโรค
แอลฟาธาลัสซีเมียที่เกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาทั้ง 4 ยีน การหายไปของยีนนี้ทำให้ไม่มี
การสังเคราะห์สายแอลฟาโกลบินและเกิดการสะสมของสายแกมมาโกลบินซึ่งรวมกันเป็น
ฮีโมโกลบินบาร์ต (γ_4) ซึ่งมีอยู่ประมาณ 80 – 90% ของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด ฮีโมโกลบิน
อีกชนิดหนึ่งที่พบในฮีโมโกลบินบาร์ตไฮดรอปัสฟีตอลลิสคือฮีโมโกลบินพอร์ดแลนด์ ($\gamma_2\zeta_2$)
ทารกทุกรายที่มีลักษณะจีโนทัยป์ดังกล่าวจะเสียชีวิตก่อนคลอดเล็กน้อยหรือภายหลังคลอด
เพียงไม่กี่ชั่วโมง ยิ่งไปกว่านั้นมารดาของทารกเหล่านี้มักจะได้รับผลกระทบจากภาวะแทรกซ้อน
อื่นๆ โดยครึ่งหนึ่งของมารดาเหล่านี้อาจเสียชีวิตหากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม คู่แต่งงาน
ของพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 มีโอกาสหนึ่งในสี่ที่จะมีบุตรเป็นฮีโมโกลบินบาร์ตไฮดรอปัสฟีตอล
ลิส เพื่อลดอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินบาร์ตไฮดรอปัสฟีตอลลิส จึงมีความจำเป็นจะต้องค้นหา
ผู้ที่เป็พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และให้คำแนะนำอย่างถูกต้อง ในปัจจุบันวิธีการตรวจหาพาหะ
แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 มีอยู่หลายวิธี แต่เนื่องจากวิธีการเหล่านี้มีความยุ่งยากซับซ้อนและต้นทุนสูง
จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจคัดกรองในประชากรจำนวนมาก ดังนั้นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว

เช่น วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา น่าจะสามารถนำมาใช้แก้ปัญหานี้ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินที่พบได้ในฮีโมโกลบินบาร์ตไฮดรอปส์ฟีตอลลิส โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาชุดตรวจภูมิคุ้มกันวินิจฉัยสำหรับตรวจคัดกรองพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในอนาคต

เพื่อที่จะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินผิดปกติในฮีโมโกลบินบาร์ตไฮดรอปส์ฟีตอลลิส ฮีโมโกลบินของฮีโมโกลบินบาร์ตไฮดรอปส์ฟีตอลลิสและฮีโมโกลบินพอร์ดแลนด์บริสุทธีได้ถูกนำมาใช้เป็นแอนติเจนและฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c เมื่อหนูสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะแล้ว นำม้ามของหนุมารวมกับเซลล์ไมอีโลมาเพื่อสร้างเป็นเซลล์ลูกผสม โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ลูกผสมได้ถูกนำมาศึกษาความจำเพาะโดยวิธี ELISA และ Western blotting โดยใช้ฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ, ฮีโมโกลบินบริสุทธีชนิด A, A₂, E และ F รวมทั้งศึกษาความจำเพาะกับสายโกลบินชนิดต่างๆ ได้แก่ ζ , A γ , G γ , α , β และ δ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินได้ 4 โคลน โดยให้ชื่อว่า HB1, HB2, HB3 และ HB4 ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับได้กับฮีโมโกลบินทุกชนิดทั้งจากคนและสัตว์ และยังสามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสายซิด้าโกลบินได้ 1 โคลน โดยให้ชื่อว่า Thal-PL1 ซึ่งจับได้อย่างจำเพาะกับสายซิด้าโกลบินโดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับโกลบินชนิดอื่นๆ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซิด้าโกลบินที่สร้างได้จะเป็นประโยชน์อย่างมาก ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสำหรับพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA ต่อไป ในอนาคต นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบิน ที่สร้างได้อาจนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจภูมิคุ้มกันวินิจฉัยเพื่อการตรวจ occult blood ในอุจจาระและปัสสาวะได้