Thesis Title Three Different Methods of Immunogen Preparations for Production of Monoclonal Antibodies to CD4 Protein

Author Miss. Supansa Pata

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee:

Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana	Member
Dr. Chunya Puttikhunt	Member

ABSTRACT

Monoclonal antibodies are widely used in biomedical research, diagnosis and treatment of diseases. Methods for production of monoclonal antibody have been developed, however, to obtain a desired antibody is not always been straightforward or easy. Preparation of immunogen is one of a critical step involving in the production of monoclonal antibodies. In this study, we studied three different methods for immunogen preparation. CD4 antigen was used as a model for this study. The three studied methods were immunoprecipitation technique, recombinant protein production in bacterial expression and COS cell expression system.

For immunoprecipitation technique, CD4 mAb immobilized to magnetic beads were used to precipitate CD4 proteins from peripheral blood mononuclear cell lysates.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The CD4 immunoprecipitated beads were then used as immunogen to immunize two BALB/c mice.

For recombinant protein production in bacterial expression system, nucleotide sequence encoding CD4 protein was genetically linked to biotin carboxyl carrier protein (BCCP) coding sequence which serves as a target for *in vivo* biotinylation. The biotinyated CD4-BCCP fusion proteins were expressed in cytoplasm of *Escherichi coli*. The biotinylated CD4-BCCP fusion proteins were subsequently separated from other proteins by using streptavidin-coated magnetic particles. The obtained CD4-BCCP beads were then used as immunogen for mouse immunization.

By COS cells expression system, eukaryotic expression vector containing cDNA encoding CD4 protein were transfected into COS cells. The CD4 expressing COS cells were sorted by immunomagnetic cell sorting and subsequently used to immunize two BALB/c mice.

Anti-CD4 antibodies could be detected in all of immunized mice after immunizations. To produce hybridomas, spleen cells of the immunized mice were fused with myeloma cells using the standard hybridoma technique. Hybrids which produce CD4 antibody were screened by indirect ELISA and indirect immunofluorescence staining. By this screenings, one CD4 monoclonal antibody, named MT4/4, and two CD4 monoclonal antibodies, named MT4/2 and MT4/3, were obtained by CD4 immunopreciptated-beads immunization and CD4-COS cells immunization, respectively. By CD4-BCCP beads immunization, however, the generated monoclonal antibodies reacted only to recombinant CD4-BCCP fusion proteins, but did not react to native CD4 proteins expressed on CD4+ lymphocytes. The CD4 monoclonal antibodies generated from both immunoprecipitated-beads and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

CD4-COS cell immunizations, were further characterized by Western blotting. It was found that, by Western blotting, all produced CD4 monoclonal antibodies did not react to any protein under both reducing and non-reducing conditions. By immunoprecipitation technique, monoclonal antibodies MT4/2, MT4/3 and MT4/4 precipitated a protein band at the molecular weight of approximately 55 kDa which is corresponding to the CD4 protein. These CD4 monoclonal antibodies were then applied to enumerate CD4+ T cells in peripheral blood lymphocytes by immunofluorescence and flow cytometry. The percentages of CD4+ T cells obtained by using the generated CD4 monoclonal antibodies were similar to those obtained using the standard reagent.

In conclusion, in this study, three methods were studied in order to preparation of CD4 protein for hybridoma productions. It was demonstrated that the studied methods can be used to produce CD4 monoclonal antibodies. The developed methods are precious and can be applied for production of antibodies to other interested protein antigens where it is not available or difficult to prepare, but either the encoding cDNA or specific mAb is available.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเตรียมอิมมูโนเจนโดยวิธีการสามวิธีที่ต่างกันเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD4

ผู้เขียน นางสาวสุพรรษา ปาต๊ะ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	กรรมการ
ดร. ชัญญา พุทธิขันธ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้มีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมายทั้งในด้านการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยและการรักษาโรค วิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ถูกพัฒนามาอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธภาพสูง อย่างไรก็ตาม การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดียังคงมีกระบวนการที่ซับซ้อนและไม่ได้ผลลัพธ์ตามที่ต้องการเสมอไป การเตรียมอิมมูโนเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองนับเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากขั้นตอนหนึ่งในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงวิธีการเตรียมอิมมูโนเจนสามวิธีเพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการศึกษานี้ใช้โปรตีน CD4 เป็นต้นแบบในการศึกษา วิธีการที่นำมาใช้ผลิตอิมมูโนเจนในการศึกษานี้คือ วิธี immunoprecipitation และการสร้าง recombinant protein ใน bacterial expression system และ COS cell expression system

โดยวิธี immunoprecipitation ผู้วิจัยได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีน CD4 ซึ่งเคลือบบนเม็ดแม่เหล็ก มาแยกตกตะกอนโปรตีน CD4 ออกจากโปรตีนชนิดอื่นใน peripheral blood mononuclear cell lysate จากนั้นนำ CD4 immunopreipitated-beads ที่เตรียมได้ไปฉีดกระตุ้นหนูทดลองจำนวน 2 ตัว

โดยการสร้าง recombinant protein ใน bacterial expression syste ผู้วิจัยนำยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน CD4 เชื่อมต่อกับยีนที่กำหนดการสร้าง biotin carboxyl carrier protein (BCCP) ซึ่งโปรตีน BCCP สามารถถูกติดฉลากด้วยสารไบโอตินโดยอาศัยกลไกทางธรรมชาติของแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้น CD4-BCCP ที่ถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียจะถูกติดฉลากด้วยไบโอติน จากนั้นทำการแยก CD4-BCCP ออกจากโปรตีนชนิดอื่นของแบคทีเรียโดยการใช้ streptavidin ที่เคลือบอยู่บน magnetic beads ไปจับ CD4-BCCP จากนั้นนำ CD4-BCCP beads ที่ได้ไปฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

โดยวิธี COS expression system วิธีการนี้ ทำการเหนี่ยวนำ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีน CD4 เข้าสู่ COS cells โดยวิธี DEAE-dextran transfection method หลังจากที่มีการแสดงออกของโปรตีน CD4 บนผิวเซลล์แล้ว ทำการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน CD4 โดยวิธี immunomagnetic cell sorting แล้วนำไปฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

หลังจากการตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีน CD4 แล้วจึงทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธีมาตรฐาน hybridoma จากนั้นตรวจหา hybrid ที่สร้างแอนติบอดีต่อ CD4 โปรตีนโดยวิธี indirect immunofluorescence และ indirect ELISA โดยวิธีดังกล่าว ผู้วิจัยสามารถผลิต hybrid ที่สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน CD4 จำนวน 1 clone จากการฉีดกระตุ้นด้วย CD4 immunprecipitated-beads ตั้งชื่อว่า MT4/4 และสามารถผลิต hybrid จำนวน 2 clones จากการฉีดกระตุ้นด้วย COS cells โดยตั้งชื่อว่า MT4/2 และMT4/3 สำหรับการผลิต hybridoma โดยการฉีดกระตุ้นด้วย CD4-BCCP beads สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน CD4-BCCP ได้ แต่แอนติบอดีเหล่านั้นไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน CD4 บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte รวมทั้งโปรตีน CD4 ที่แสดงออกบนผิวของ COS cells เลย เมื่อศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD4 ที่ผลิตได้โดยวิธี Western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD4 ที่ผลิตได้ทั้งหมดไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนใด ๆ ในภาวะ reducing และ non-reducing เมื่อทำการศึกษาโดยวิธี immunoprecipitation พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD4 ที่ผลิตได้สามารถตกตะกอนโปรตีนขนาด 55 kDa ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของโปรตีน CD4 จากนั้นได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD4 ที่ผลิตได้ไปใช้ในการตรวจนับจำนวน CD4+ T cells ในเลือดเปรียบเทียบกับค่าที่ตรวจนับได้โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจมาตรฐาน พบว่าจำนวน CD4+ T cells ที่ตรวจนับได้จากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ตรวจนับได้จากน้ำยาตรวจมาตรฐาน

จากการศึกษาวิธีการสามวิธีเพื่อผลิตโปรตีน CD4 สำหรับใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการศึกษานี้พบว่าวิธีการทั้งสามสามารถนำมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD4 ได้ วิธีเตรียมอิมมูโนโจนที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีคุณค่าและสามารถนำนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจอื่นๆ ที่อาจมีอยู่น้อยตามธรรมชาติหรือเตรียมได้ยาก ทว่ามียีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนนั้นหรือมีโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนนั้นอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved