Thesis Title Purification of β^E-Globin Chain and Production of Specific Monoclonal Antibody to β^E-Globin Chain

Author Miss Benchawan Sophar

M.S. Biochemistry

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Luksana Makonkawkeyoon	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Member
Prof. (Emeritus) Dr. Sanit Makonkawkeyoon	Member
Dr. Somdet Srichairatanakool	Member

ABSTRACT

Hemoglobin E (HbE) is the most common hemoglobin variant found in Southeast Asian populations. In Thailand, the frequency of HbE is average at 13%, with the maximum of 50-70% in northeastern region. HbE is caused by a mutation at codon 26 (GAG to AAG) of the beta-globin gene. This mutation induces alternative splicing, leading to the mixed products of regular beta globin and aberrantly spliced beta globin. Both HbE heterozygotes and HbE homozygotes are clinically normal. However, compound HbE heterozygote with beta-thalassemia causes severe beta-thalassemic disease. This HbE/beta-thalassemia disease can be prevented by

screening for HbE and beta-thalassemia carrier in couples prior to pregnancy. There are many current methods for screening of HbE, including ion-exchange chromatography, isoelectric focusing electrophoresis (IEF), high performance liquid chromatography (HPLC), or by detecting the mutant gene using polymerase chain reaction (PCR). However, these methods are not suitable for screening large population due to the complexity of the methods and cost. To overcome this problem, we develop ELISA technique to detect beta-E globin specifically. To generate monoclonal antibody against beta-E globin to use for developing this ELISA procedure, we first partially purified HbE globin from hemolysate of beta-E carrier by DEAE-sephadex anion-exhange column. This procedure cannot separate HbE from HbA_2, therefore further separation and purification of beta-E globin by CM-cellulose cation-exchange column was performed. The purified beta-E globin was injected into Balb/c mice to stimulate antibody against beta-E globin. The B-lymphocytes in splenocytes were fused with myeloma cells to generate hybridoma cells. The monoclonal antibodies from these hybridoma cells were tested for specificity against beta-E, beta-A, gamma, delta, and alpha-globin chains. The mAb against beta-E globin chain, designated as CM1, was selected because of its high specificity. We have found that this monoclonal antibody is IgM which has two heavy mu (μ)-chains and two light kappa (κ)-chains.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทำสายเบต้าอีโกลบินให้บริสุทธิ์และการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อสายเบต้าอีโกลบิน

ชื่อผู้เขียน นางสาว เบญจวรรณ โสภา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ลักษณา มกรแก้วเกยูร	ประธานกรรมการ
รศ.ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล	กรรมการ
ศ. (เกียรติคุณ) ดร. สนิท มกรแก้วเกยูร	กรรมการ
ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล	กรรมการ

บทคัดย่อ

ฮีโมโกลบินอี (HbE) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบมากในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินอีโดยเฉลี่ย 13 % และพบมากถึง 50 –70 % ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ฮีโมโกลบินอีเกิดจากการมิวเตชั่นของเบสในรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 26 (GAG เปลี่ยนเป็น AAG) ของสายเบต้าโกลบินซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้เกิดจุดตัดตำแหน่งใหม่เกิดขึ้น ซึ่งส่งผลให้เกิดการสร้างโกลบินทั้งแบบปกติและแบบที่ผิดปกติ ผู้ที่มียีนของฮีโมโกลบินอีทั้งแบบ heterozygotes และ homozygotes จะไม่แสดงอาการทางคลินิค แต่ถ้ายีนของฮีโมโกลบินอีรวมกับยีนของเบต้าธาลัสซีเมียจะเกิดเป็นโรคฮีโมโกลบินอี/เบต้าธาลัสซีเมีย ซึ่งมีอาการทางคลินิครุนแรงคล้ายกับโรคเบต้าธาลัสซีเมีย การป้องกันการเกิดยีนผสมนี้สามารถทำได้โดยการตรวจหาพาหะของยีนเบต้าอีและเบต้าธาลัสซีเมียในบุคคลที่ต้องการแต่งงานและมีบุตร ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจหายีนเบต้าอีหลายวิธีเช่น การตรวจฮีโมโกลบินผิดปกติโดยใช้ ion-exchange

chromatography, isoelectric focusing electrophoresis (IEF) วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) หรือ โดยเทคนิคการขยายจีน (polymerase chain reaction method or PCR) ซึ่งวิธีเหล่านี้มีขั้นตอนในการทดสอบที่ยุ่งยาก ซับซ้อน อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการค่อนข้างสูง จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ทดสอบในประชากรจำนวนมาก เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค ELISA และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงมาเป็นตัวทดสอบ ในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสายเบต้าอีโกลบิน ขั้นแรกจะแยกฮีโมโกลบินอีจากฮีโมไลเสทของพาหะฮีโมโกลบินอีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี่ โดยการใช้เรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบคือ DEAE-sephadex resin แต่วิธีดังกล่าวไม่สามารถแยกฮีโมโกลบินอีออกจากฮีโมโกลบินเอสอง ดังนั้นจึงนำฮีโมโกลบินอีไปแยกและทำบริสุทธิ์สายเบต้าอีโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุด้วยเรซิน CM-cellulose ซึ่งเป็นเรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก หลังจากนั้นสายเบต้าอีโกลบินที่บริสุทธิ์จะนำไปฉีดกระตุ้นหนู Balb/c เพื่อให้สร้างแอนติบอดีต่อสายเบต้าอีโกลบิน หลังจากนั้นเซลล์ B-lymphocytes ของหนูที่สร้างแอนติบอดีต่อสายเบต้าอีโกลบินจะถูกนำมารวมกับเซลล์มะเร็งหนูเพื่อสร้างเป็นเซลล์ลูกผสม แล้วคัดเลือกหาเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อสายเบต้าอีโกลบินโดยการทดสอบเปรียบเทียบกับแอนติเจนชนิดเบต้าอี, เบต้าเอ, แกมม่า, เดลต้าและอัลฟ่าโกลบิน ซึ่งพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีชื่อ CM1 มีความจำเพาะกับสายเบต้าอีโกลบิน จากการทดสอบชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ พบว่าเป็นอิมมูโนโกลบูลินเอ็ม (IgM) ที่มีสายหนัก (heavy chain) เป็นชนิดมิว และมีสายเบา (light chain) เป็นชนิดแคปปา