Thesis Title *In vivo* Biotinylated CD147 Immobilized on Streptavidin Magnetic Bead: A Novel Strategy for Immunogen Preparation

Author Mr. Phawin Charoensook

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee

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

ABSTRACT

The most important step in antibody production is the preparation of the immunogen. To obtain the high quality and specific antibodies, high purity of immunogen is crucial. However, the processes to obtain purified immunogen are usually cumbersome. In this study, we described an alternative strategy to circumvent this problem. Nucleotide sequence encoding CD147 external domain (CD147Ex) was genetically linked to the biotin acceptor domain of biotin carboxyl carrier protein (BCCP) coding sequence. The BCCP domain is a natural substrate for *E. coli* biotin ligase that catalyse the conjugation of the biotin moiety to a specific lysine residue in the BCCP, which serves as a target for *in vivo* biotinylation of the fusion molecule.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

The CD147Ex-BCCP fusion protein was expressed and concomitantly *in vivo* biotinylated in the cytoplasm of *E. coli* strain Origami B where the high oxidizing condition promote disulfide bond formation and protein folding. The biotinylated heterologous protein was subsequently immobilized on streptavidin-coated magnetic particles and separated from other proteins by magnetic field sorting. The magnetic beads carrying fusion molecules were employed as immunogen for polyclonal antibody production in BALB/c mice. The immunized mice sera showed high titer of anti-CD147 antibodies and the antibody level was maintained for at least 5 months after the last immunization. The obtained antibodies were demonstrated to be able to strongly react with both native membrane-bound and denatured forms of CD147. The established technique circumvents the cumbersome acquisition of purified immunogen in which the complicated purification processes are substituted with a single capturing step. The fusion protein coated beads serve as a particulate antigen which is preferably strong immunogenic for induction of immune responses. This newly developed method will be very useful for applying to other target proteins where gene coding sequence is known.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	เม็ดแม่เหล็กที่เคลือบด้วยสเตรปต้าไวดินที่จับกับซีดี 147 ที่ถูกติดฉลากด้วยไบโอตินแล้วภายในเซลล์: รูปแบบใหม่ของการเตรียมอิมมูโนเจน
ผู้เขียน	นายภาวินทร์ เจริญสุข
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา ประธานกรรมการ รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

การเตรียมอิมมูโนเจนเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการผลิตแอนติบอดี การได้มาซึ่งแอนติบอดีที่มีคุณภาพดีนั้นจำเป็นต้องใช้อิมมูโนเจนที่มีความบริสุทธิ์ แต่ด้วยขั้นตอนและกระบวนการเตรียมอิมมูโนเจนให้มีความบริสุทธิ์นั้นค่อนข้างยุ่งยาก จึงเป็นอุปสรรคสำคัญในกระบวนการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจ เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้จึงได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่ในการผลิตและเตรียมอิมมูโนเจนให้บริสุทธิ์โดยใช้ CD147 เป็นโมเลกุลศึกษา โดยยีนที่กำหนดการสร้าง CD147 ส่วน external domain (CD147Ex) ถูกโคลนเชื่อมต่อกับยีนที่กำหนดการสร้างส่วน C-terminal ของ biotin carboxyl carrier protein (BCCP) ซึ่งโดยธรรมชาติเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเติมไบโอตินเข้ากับโมเลกุลของ BCCP ในตำแหน่งที่จำเพาะ ดังนั้น BCCP จึงสามารถนำมาใช้ในการติดฉลาก CD147Ex-BCCP ฟิวชั่นโปรตีนด้วยไบโอตินภายในเซลล์แบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

CD147Ex-BCCP ฟิวชั่นโปรตีนจะถูกแสดงออกและติดฉลากด้วยไบโอตินภายในไซโตพลาสซึมของ *E. coli* สายพันธุ์ Origami B ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มี oxidizing condition ภายในไซโตพลาสซึมค่อนข้างสูงจึงช่วยในการเชื่อมต่อไดซัลไฟด์บอนด์และเกิดการพับทบโมเลกุลของโปรตีนได้ดียิ่งขึ้น จากนั้น CD147Ex-BCCP ฟิวชั่นโปรตีนจะถูกตรึงอยู่บนผงแม่เหล็กที่ถูกเคลือบไว้ด้วยสเตรปต้าไวดิน ด้วยวิธีการนี้ CD147Ex-BCCP ฟิวชั่นโปรตีนจะถูกแยกออกจากโปรตีนชนิดอื่นโดยการใช้สนามแม่เหล็ก ผงแม่เหล็กที่มี CD147Ex-BCCP ฟิวชั่นโปรตีนติดอยู่ถูกนำมาใช้เป็นอิมมูโนเจนในการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c เพื่อทดสอบการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี จากผลการศึกษาพบว่าหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นมีการสร้างแอนติบอดีต่อ CD147 ในระดับสูง และระดับของแอนติบอดียังคงอยู่ในระดับสูงเป็นระยะเวลานานอย่างน้อย 5 เดือน แอนติบอดีที่ได้สามารถนำไปย้อมเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD147 บนผิว ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ CD147 ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ และยังสามารถทำปฏิกิริยากับ CD147 ในโปรตีนสกัดจากเซลล์ดังกล่าวโดยเทคนิค Western immunoblotting ได้อีกด้วย

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเตรียมอิมมูโนเจนที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ช่วยลดความยุ่งยากในกระบวนการผลิตและเตรียมอิมมูโนเจนให้บริสุทธิ์ซึ่งจากเดิมต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน แต่วิธีนี้เป็นการใช้ผงแม่เหล็กจับกับโปรตีนเป้าหมายเพื่อแยกจากโปรตีนอื่นๆเพียงขั้นตอนเดียวเท่านั้น อีกทั้งด้วยคุณสมบัติการเป็นอนุภาคของผงแม่เหล็กทำให้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทคนิคดังกล่าวจึงเป็นประโยชน์และสามารถนำไปใช้ผลิตอิมมูโนเจนของโปรตีนชนิดอื่นต่อไปได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved