Thesis Title Production of Conditioned Media for Generation of Hybridomas for Monoclonal Antibody Production

Author Miss Napaporn Apiratmateekul

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor

Associate Professor Dr. Watchara Kasinrerk

ABSTRACT

Hybridoma technique is the standard method for production of monoclonal antibody. By this technique, antibody secreting cell lines are generated by fusing together antibody secreting cells from lymphoid tissue of an immunized mouse with myeloma cells. The immortalized antibody-producing cell lines or hybridomas can continuously grow and secrete monoclonal antibodies of interest. As newly fused hybridomas and cells at low density often grow poorly or die, in hybridoma technique, growth supplement for hybridomas are essential. In this study, we aimed to study and establish the method for preparations of conditioned medium for promoting growth of the hybridomas after cell fusion and during single cell cloning.

In this study, two cell lines including mouse myeloma and BW5147 mouse thymoma cell lines were used for generation of culture supernatants for applying as conditioned medium for hybridoma production. Myeloma and BW5147 cell lines were

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cultured with or without PMA for 18 and 40 hours. The produced culture supernatants were then verified for promoting hybridoma growth. It was found that BW5147 cells cultured for 40 hours without PMA activation was the appropriated condition for production of conditioned medium. The produced conditioned medium could support hybridoma growth in single cell cloning similar to those using commercial conditioned media BM condimed H1 and 20% BW5147 conditioned medium was the optimal concentration. Moreover, the generated BW5147 conditioned medium could be routinely used to generate hybridomas secreting various monoclonal antibodies.

Proteins containing in the produced conditioned medium was analyzed by SDS-PAGE and compared with BM condimed H1. It was found that different conditioned media contained different proteins. A 17 kDa protein was presented in BM condimed H1 but not in BW5147 conditioned medium. In addition, a protein band of 26 kDa was observed in higher amount in BM condimed H1 than in BW5147 conditioned medium. This 26 kDa protein is probably IL-6 and was added in BM condimed H1 during commercially preparation.

The cost for 100 ml of BW5147 conditioned medium was approximately 1,600 baht. In contrast, 100 ml BM condimed H1 purchased from Roche was 21,000 baht. The method for production of BW5147 conditioned medium is simple and need no special technology and sophisticated equipments. The BW5147 conditioned medium was, therefore, recommended for replacement of very expensive commercial conditioned medium for hybridoma technology in resource-limited countries including Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตอาหารเลี้ยงเซลล์แบบคุมสภาพสำหรับการสร้างไฮบริโดมาเพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ผู้เขียน นางสาวนภาพร อภิรัฐเมธีกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์

บทคัดย่อ

Hybridoma technique เป็นวิธีมาตรฐานเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยเทคนิคนี้ antibody-secreting cell lines จะถูกสร้างขึ้นจากการนำเอา antibody-secreting cells จาก lymphoid tissue ของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนมาเชื่อมรวมกับ myeloma cells ทำให้ได้ immortalized antibody-producing cell lines หรือ เซลล์ลูกผสม hybridoma ซึ่งมีคุณสมบัติผลิตแอนติบอดีได้และแบ่งตัวเจริญเติบโตในหลอดทดลองได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด อย่างไรก็ตามในระยะแรกๆ ของการเลี้ยง hybridomas ที่เพิ่งผ่านการ fusion และ hybridomas ที่อยู่ในสภาวะที่มีความหนาแน่นเซลล์ต่ำมากนั้น hybridomas จะมีสภาพที่ไม่แข็งแรง ไม่สามารถแบ่งตัวได้ดี และอาจตายได้ ดังนั้นในระหว่างการทำ hybridoma technique จึงจำเป็นต้องมีการให้สารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ hybridomas ลงไป ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงวิธีการเตรียม conditioned medium เพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ hybridomas ภายหลังการ fusion และ ระหว่างการทำ single cell cloning

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้นำเซลล์ mouse myeloma และ BW5147 mouse thymoma มาใช้ในการผลิต culture supernatant เพื่อนำมาใช้เป็น conditioned media สำหรับการผลิต hybridoma โดยนำเซลล์ myeloma หรือ BW 5147 thymoma มาเลี้ยงในภาวะที่มีหรือไม่มีสาร PMA เป็นเวลา 18 และ 40 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture supernatant ที่ผลิตได้มาทำการทดสอบความสามารถในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ hybridoma ซึ่งพบว่า supernatant ที่ได้จากเซลล์ BW5147 mouse thymoma ที่เลี้ยงในภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA เป็นเวลา 40 ชั่วโมง เหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้เป็น conditioned medium และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ hybridoma ในการทำ single cell

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cloning ได้ไม่แตกต่างจากการใช้ BM condimed H1 ซึ่งเป็น conditioned medium มาตรฐาน และพบว่า 20% BW5147 conditioned medium เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้งาน นอกจากนี้ conditioned medium ที่ผลิตขึ้นยังสามารถใช้ในงานประจำวันสำหรับการผลิต hybridomas เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายชนิด

จากการศึกษาโปรตีนที่มีอยู่ใน BW5147 conditioned medium โดยวิธี SDS-PAGE โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีอยู่ใน BM condimed H1 พบว่า conditioned media ทั้งสองมีโปรตีนแตกต่างกัน โดยพบว่าโปรตีนที่มีขนาด 17 กิโลดาลตัน สามารถพบได้ใน BM condimed H1 แต่ไม่พบใน BW5147 conditioned medium และโปรตีนที่มีขนาด 26 กิโลดาลตัน สามารถพบได้ใน BM condimed H1 ในปริมาณสูงกว่าใน BW5147 conditioned medium ซึ่งโปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน นี้คาดว่าเป็น IL-6 ซึ่งได้มีการเติม IL-6 ลงไป BM condimed H1 ในระหว่างการเตรียม

จากการศึกษาเปรียบเทียบราคาต้นทุนที่ใช้ในการผลิต BW5147 conditioned medium กับ BM condimed H1 พบว่า BW5147 conditioned medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีราคา 1,600 บาท ในขณะที่ BM condimed H1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งซื้อมาจากบริษัท Roche มีราคา 21,000 บาท นอกจากนั้นการผลิต BW5147 conditioned medium สามารถทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีพิเศษ และใช้เครื่องมือทั่วไปที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ดังนั้น BW5147 conditioned medium น่าจะนำมาใช้ทดแทน conditioned medium ที่นำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาแพง โดยเฉพาะประเทศที่มีทรัพยากรจำกัด เช่น ประเทศไทย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved