Thesis Title Production of Polyclonal Antibody in Mice Using DNA Based and Phage-Display Immunizations

Author Miss Saibua Boonmuen

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Prasartporn Smitamana Member

Asst. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Member

ABSTRACT

DNA immunization, is a recently established technique, involves the administration of genetic material encoding the antigen. The antigen is, therefore, produced within the cells of the immunized individual and induces the immune responses. More recently, phage display technology was developed and has proven to be a very powerful technique for producing proteins of interest *in vitro*. Immunization of phage-displayed protein has substantiated to elicit strong immune responses.

CD147 is a leukocyte surface glycoprotein which has been shown to be an essential molecule in the immune system. The antibodies recognized CD147 molecule is an important tool for functional characterization. In this study, recently developed DNA immunization and phage immunization was employed for raising the anti-CD147 polyclonal antibodies in the experimental mouse.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In order to study the alternative methods for production of anti-CD147 polyclonal antibody, plasmid DNA encoding CD147 (pCDM8-CD147) and phage-displayed CD147 molecule were used. The pCDM8-CD147 and phage expressing CD147 protein were generated by standard procedure. This generated pCDM8-CD147 was proved for expressing the corresponding CD147 protein in eukaryotic cell by the COS cells expression system. In addition, the generated CD147 expressing phages strongly reacted with a CD147 mAb, M6-1D4, confirming the presence of CD147 carrying phages. Mice were either intramuscular or intraperitoneal immunized three times with pCDM8-CD147 or phage-displayed CD147 at two-week intervals, respectively. The specific antibody responses were determined by ELISA and indirect immunofluorescent using flow cytometry. By these procedures, anti-CD147 antibodies were detected in the immunized sera after second phage display or DNA inoculation and increased significantly after the third immunization. However, the antibody response induced by phage-displayed CD147 was much higher and essentially maintained at the high level than those of using pCDM8-CD147. Moreover, both sets of mouse polyclonal CD147 antibodies recognized recombinant CD147 protein expressed on CD147 expressing BW cell line using flow cytometry analysis. A strong correlation between the indirect ELISA and fluorescent assay was observed. However, the kinetic of immune response induced by phage-displayed CD147 was found to be better than using pCDM8-CD147.

Overall, it can be concluded that the generated phage-displayed CD147 induced stronger and maintained at the high level polyclonal anti-CD147 antibodies than that induced by pCDM8-CD147. The result demonstrated the possibility of utilizing phage display technology for production of hyperimmune serum. This

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

discovering will be useful for the development of new immunization strategy for vaccination and hyperimmune serum preparation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีในหนูโดยการสร้างภูมิคุ้มกันจากดีเอ็นเอและฟาจดิสเพลย์

ผู้เขียน นางสาว สายบัว บุญหมื่น

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ ประธานกรรมการ

รศ. ดร. ประสาทพร สมิตะมาน กรรมการ

ผศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา กรรมการ

บทคัดย่อ

เทคนิค DNA immunization เป็นเทคนิคใหม่ที่ทำได้โดยการฉีดสารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนเข้าไปในร่างกาย โดยวิธีนี้แอนติเจนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในผู้รับและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เทคนิค phage display ได้ถูกพัฒนาขึ้นเมื่อไม่นานมานี้ และพบว่าสามารถนำมาใช้ผลิตโปรตีนที่สนใจได้อย่างมีประสิทธิภาพในหลอดทดลอง การฉีดฟาจที่แสดงโปรตีนที่สนใจสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างดี

CD147 เป็นกลัยโคโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน CD147 สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาหน้าที่ของ CD147 ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้ศึกษาได้นำเทคนิค DNA immunization และ phage immunization มาใช้ในการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน CD147 โดยทำการศึกษาในหนู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อศึกษาถึงการนำเทคนิค DNA และ phage immunization มาผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าว plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีน CD147 (pCDM8-CD147) และ phage expressing CD147 ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษา โดยได้ทำการเตรียม pCDM8-CD147 และ phage-displayed CD147 molecule ตามวิธีมาตรฐาน จากนั้นทำการพิสูจน์ว่า pCDM8-CD147 ที่เตรียมได้ว่าสามารถกำหนดการสร้าง CD147 protein ใน eukaryotic cells ได้โดยวิธี COS cell expression system ทำนองเดียวกันได้พิสูจน์ว่า CD147 expressing phages สามารถจับกับ CD147 mAb ชนิด M6-1D4 ได้โดยวิธี ELISA จากนั้นนำ pCDM8-CD147 และ phage-displayed CD147 ที่เตรียมได้ไปฉีดหนู BALB/c โดยฉีด pCDM8-CD147 ทางกล้ามเนื้อขาทั้งสองข้างและฉีด phage-displayed CD147 ทางช่องท้องของหนู จำนวนฉีด 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ แล้วตรวจหาการสร้างแอนติบอดีต่อ CD147 ในซีรั่มหนูโดยวิธี ELISA และ indirect immunofluorescent technique โดยตรวจวัดด้วยเครื่อง flow cytometer ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบการสร้าง anti-CD147 antibodies ในซีรัมของหนูหลังจากการฉีด pCDM8-CD147 และ phage-displayed CD147 ครั้งที่ 2 และหนูสร้าง anti-CD147 antibodies เพิ่มขึ้นหลังการฉีดครั้งที่ 3 โดยพบว่าหนูที่ฉีดด้วย phage-displayed CD147 สร้าง anti-CD147 antibodies ได้สูงและแอนติบอดีคงอยู่ได้นานกว่าเมื่อเทียบกับการฉีดด้วย pCDM8-CD147 แอนติบอดีต่อโปรตีน CD147 ที่สร้างขึ้นนี้สามารถทำปฏิกิริยากับ recombinant CD147 โปรตีนที่แสดงออกบน CD147 expressing BW cell line เมื่อตรวจวัดโดยเทคนิค flow cytometry และพบว่าระดับ anti-CD147 antibodies โดยวิธี ELISA ให้ผลการทดลองที่สัมพันธ์กับการตรวจโดยวิธี indirect immunofluorescent technique และจากการศึกษา kinetic response ของการสร้างแอนติบอดีพบว่าในหนูที่ฉีดด้วย phage-displayed CD147 ให้ผลดีกว่าหนูที่ฉีดด้วย pCDM8-CD147

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า หนูที่ฉีดด้วย phage-displayed CD147 สามารถสร้าง anti-CD147 antibodies ได้สูงกว่าและแอนติบอดีอยู่ได้นานกว่าหนูที่ฉีดด้วย pCDM8-CD147 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเทคนิค phage display immunization สามารถนำมาผลิต hyperimmune serum ได้ วิธีนี้อาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีการให้วัคซีนและสร้าง hyperimmune serum ต่อไปได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved