Thesis Title Production and Fluorescein Isothiocyanate Conjugation of Antibodies Against Mouse Immunoglobulins from Chicken Egg Yolk and Its Application in Immunofluorescence Assay

Author Miss Siriporn Kritratanasak

M.S. Medical Technology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk	Chairman
Asst. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana	Member
Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Member
Dr. Chunya Puttikhunt	Member

ABSTRACT

IgY are antibodies of egg yolk that transfer from maternal circulation to confer passive immunity to embryos and neonate before the generation of their own humoral immunity. IgY possesses several biochemical advantages that suitable for immunodiagnostic and immunotherapeutic applications. Antibody production from egg yolk or IgY technology offers several advantages over conventional serum-based

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

antibody production. It needs low amount of antigen for induction of antibody responses. Egg collection is easy, no blood bleeding is required, and the amount of immunoglobulins yielded from one egg is very high.

In an attempt to produce fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-mouse immunoglobulins antibody for using in indirect immunofluorescence technique that can be replaced commercial conjugate which is expensive, the IgY technology was applied. In this study, mouse immunoglobulins antigen was firstly purified by affinity chromatography using Protein G Sepharose column. From one ml of pooled normal mouse serum, 2.6 mg of purified immunoglobulins was obtained. By sandwich ELISA, the isolated mouse immunoglobulins were demonstrated to contain all immunoglobulin isotypes including IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgM. The isolated immunoglobulins, therefore, used as the immunizing antigen. Two hens were immunized with the isolated immunoglobulins *via* two different routes, pectoralis and calf intramuscular immunization, for 3 times. Blood and eggs were collected every two and one week, respectively, after immunizations. IgY from egg yolk was isolated by water dilution and sodium sulfate precipitation method. By using this isolation method, 37 mg of IgY could be extracted from a single egg and the purity of isolated IgY was rather high. ELISA for determination antibody responses in serum and egg yolk was developed. For this ELISA, 0.625 μg/ml of mouse immunoglobulins for coating plate and 1:6000 of horseradish peroxidase conjugated anti-chicken IgG antibodies were found to be the optimal concentrations. Detection of antibodies by the developed ELISA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

revealed that antibodies in serum could be detected two weeks after antigen immunization in both chickens, reached the maximum level at week 10, however, three months after the last immunization the antibody levels were decreased. Immunization at pectoralis muscle induced higher antibody responses than calf muscle immunization. While the specific antibodies appeared in egg yolk 2 weeks after immunization, reached a plateau after 10 weeks and maintained high titer at least 20 weeks.

For an application in indirect immunofluorescence assay, IgY was isolated from egg yolk. The isolated IgY was labeled with FITC. The molar incubation ratio of dye and antibody (R ratio) was optimized. R ratio of 10 was demonstrated to be the optimal condition. The prepared IgY-FITC conjugate at concentration of 500 μg/ml was found to be the optimal concentration for using in immunofluorescence assay as it gave a high positive signal and low background with all isotypes of primary antibodies.

The produced conjugate was then used to determine leukocyte sub-populations in blood samples. It was found that the produced conjugate showed slightly lower fluorescence intensity compared to commercial conjugate. However, the percentages of T and B lymphocytes in the lymphocyte population obtained from both conjugates were very similar. The produced conjugate was then applied to determine the expression of interesting protein in COS transfection system. It was found that the produced conjugate gave positive reactivity with all isotypes of specific primary antibodies, but showed negative reactivity with control antibodies. These results demonstrated that the produced

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

FITC conjugated chicken anti-mouse immunoglobulins antibody could be used in indirect immunofluorescence assay in both human and monkey system.

In this study, IgY technology was developed in our department. This technique is simple and can be used to produce large amount of specific antibodies. The IgY technology was applied to produce anti-mouse immunoglobulins antibody and FITC conjugate. The produced conjugate can be used as secondary antibody in indirect immunofluorescence assay for determination of human lymphocyte sub-populations and protein expression in COS cells transfection system.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและการติดฉลากสารฟลูออเรสซีนไอโซไทโอไซยาเนต กับแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบุลินของหนูที่ได้จากไข่ไก่และการประยุกต์ใช้ในงานอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

ชื่อผู้เขียน นางสาว สิริพร กฤชรัตนศักดิ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

บทคัดย่อ

IgY เป็นแอนติบอดีที่พบในไข่แดงซึ่งถูกส่งผ่านมาจากซีรัมของแม่ไก่ กลไกนี้จัดเป็นระบบภูมิคุ้มกันชนิดส่งผ่าน จากแม่ไปสู่ลูกเพื่อเป็นการสร้างภูมิคุ้มกันให้กับลูกก่อนที่จะมีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นเอง IgY มีคุณสมบัติหลายอย่างที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ทั้งในงานตรวจวินิจฉัยและการป้องกันรักษาโรค การผลิตแอนติบอดีในไข่ไก่ หรือ เทคโนโลยี IgY นั้นมีข้อดีกว่าการผลิตแอนติบอดีใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซีรัมหลายประการ กล่าวคือ โดยวิธีนี้ การฉีดกระตุ้นด้วยปริมาณแอนติเจนเพียงเล็กน้อยก็สามารถกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะได้ การเก็บไข่เพื่อเตรียมแอนติบอดีทำได้ง่าย ไม่ต้องมีการเจาะเลือด และปริมาณอิมมูโนโกลบุลินที่ได้จากไข่หนึ่งฟองมีปริมาณสูงมาก

เพื่อผลิตแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบุลินของหนูที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC) เพื่อใช้ในงาน indirect immunofluorescence แทนผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศที่มีจำหน่ายในราคาแพง ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำ เทคโนโลยี IgY มาประยุกต์ใช้ โดยการศึกษาครั้งนี้เริ่มจากการเตรียมอิมมูโนโกลบุลินของหนู ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Protein G Sepharose column พบว่าจากซีรัมหนูเริ่มต้น 1 มล. สามารถเตรียมปริมาณอิมมูโนโกลบุลินได้ 2.6 มก. เมื่อนำไปตรวจหาไอโซทัยป์ด้วยวิธีอีไลซ่า พบว่าอิมมูโนโกลบุลินที่เตรียมได้ประกอบด้วยทุกไอโซทัยป์ คือ IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 และ IgM ดังนั้น อิมมูโนโกลบุลินของหนู ที่เตรียมได้จึงถูกนำไปใช้เป็นแอนติเจนเพื่อฉีดกระตุ้นไก่ให้สร้างแอนติบอดี ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำอิมมูโนโกลบุลินที่เตรียมได้ไปฉีดไก่จำนวน 2 ตัวทางกล้ามเนื้อหน้าอก และกล้ามเนื้อน่อง โดยฉีดกระตุ้นไก่ 3 ครั้ง ทำการเจาะเลือดทุก 2 สัปดาห์ และเก็บไข่ทุกสัปดาห์หลังฉีดกระตุ้น จากนั้นนำไข่มาสกัด IgY โดยวิธี water dilution และตกตะกอนโปรตีนด้วยโซเดียม ซัลเฟต โดยเทคนิคดังกล่าวจากไข่ 1 ฟอง สามารถสกัดอิมมูโนโกลบุลินได้ 37 มก. โดยมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง เพื่อทำการตรวจหาการสร้างแอนติบอดีในซีรัมและในไข่ไก่ ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีอีไลซ่า เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีขึ้น และพบว่าปริมาณอิมมูโนโกลบุลินของหนูที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท คือ 0.625 มก/มล. และปริมาณที่เหมาะสมของแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบุลินของไก่ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1:6000 จากการตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธีอีไลซ่า ในไก่ทั้ง 2 ตัวพบว่าสามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมไก่หลังการฉีดแอนติเจน 2 สัปดาห์ ระดับแอนติบอดีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 และ 3 เดือนหลังการฉีดแอนติเจนครั้งสุดท้ายพบว่าระดับแอนติบอดีลดลง การฉีดแอนติเจนทางกล้ามเนื้อหน้าอกสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่าทางกล้ามเนื้อน่อง สำหรับในไข่ สามารถตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะได้หลังจากฉีดแอนติเจนแล้ว 2 สัปดาห์ และแอนติบอดีมีระดับสูงสุดหลังจากฉีดแอนติเจนแล้ว 10 สัปดาห์ ระดับแอนติบอดีจะยังคงมีระดับสูงอย่างน้อย 20 สัปดาห์

เพื่อเตรียมคอนจูเกต ใช้ในงาน indirect immunofluorescence ผู้วิจัยได้แยก IgY จากไข่แดง จากนั้นศึกษาถึงการนำ IgY ที่ได้ไปติดฉลากกับสารเรืองแสง FITC ผลการศึกษาพบว่า molar incubation ratio ระหว่างสีและแอนติบอดี (R ratio) ที่เหมาะสม เท่ากับ 10 และความเข้มข้นของ IgY-FITC ที่ 500 มก./มล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ให้ผลบวกแรง และมี background ต่ำเมื่อทำปฏิกิริยากับ primary antibody ทุกไอโซไทป์

เมื่อนำคอนจูเกตที่ผลิตได้ไปใช้ในงานตรวจนับประชากรกลุ่มย่อยของเม็ดเลือดขาวในเลือด พบว่าคอนจูเกตที่ผลิตเองนี้ให้ผลความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ต่ำกว่าคอนจูเกตจากต่างประเทศเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์ ที และ บี ลิมโฟซัยต์ ในกลุ่มประชากรลิมโฟซัยต์ พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ ที และ บี ลิมโฟซัยต์ ที่ได้โดยการใช้คอนจูเกตทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกัน และเมื่อนำคอนจูเกต ที่ผลิตได้ไปตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ COS พบว่าให้ผลบวกกับ primary antibodies ที่จำเพาะทุกไอโซไทป์ และให้ผลลบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองดังกล่าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบุลินของหนูที่ติดฉลากด้วยสาร FITC ที่ผลิตได้ สามารถนำไปใช้ในงาน indirect immunofluorescence ทั้งในระบบของมนุษย์และลิงได้

จากการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคโนโลยี IgY ขึ้นในภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เทคนิคนี้ทำได้ง่ายและสามารถนำไปผลิตแอนติบอดีที่สนใจได้ในปริมาณมาก เทคโนโลยี IgY นี้ได้นำไปใช้ผลิตแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบุลินของหนู และนำไปติดฉลากกับสารเรืองแสง FITC เพื่อใช้เป็นคอนจูเกตได้ โดยคอนจูเกตที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้เป็น secondary antibody ในงาน indirect immunofluorescence เพื่อตรวจนับประชากรกลุ่มย่อยของลิมโฟซัยต์ และใช้ตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ COS ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved