การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี ต่อแอลฟาฟีโตโปรตีน เพื่อการวินิจฉัยสารบ่งบอกโรคมะเร็ง

นางสาวธีรกุล อาภรณ์สุวรรณ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-421-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18282428

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY TO ALPHA-FETOPROTEIN FOR TUMOR MARKER DIAGNOSIS

Miss Teerakul Arpornsuwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-421-1

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

Thesis Title PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY TO ALPHA-FETOPROTEIN FOR TUMOR MARKER DIAGNOSIS

By Miss Teerakul Arpornsuwan

Program Biotechnology

Thesis Advisor Assistant Professor Amorn Petsom, Ph.D.

Co-Advisor Miss Wiyada Charoensiriwatana

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of the Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committees :

..... Chairman

(Associate Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

Wiyada C.
..... Co-Advisor

(Miss Wiyada Charoensiriwatana)

..... Member

(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Suthep Thaniyavarn, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ธีรกุล อาภรณ์สุวรรณ : การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อสารแอลฟาฟิโตโปรตีน เพื่อการวินิฉัยสารบ่งบอกโรคมะเร็ง (PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY TO ALPHA-FETOPROTEIN FOR TUMOR MARKER DIAGNOSIS) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. อมร เพชรสม , อ.ที่ปรึกษาร่วม : นางสาววิยะดา เจริญศิริวัฒน์ ,116 หน้า. ISBN 974-583-421-1

การตรวจหาปริมาณแอลฟาฟิโตโปรตีนทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา มีความสำคัญมาก ในการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาของโรค ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความไว ราคาไม่แพง เพื่อสามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมากๆได้ ได้มีการพัฒนาวิธีทูไซด์อิมมูโนเรดิโอเมตริกเอสเสย์ (two-site immuno-radiometric assay) และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ในการศึกษานี้ ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแอลฟาฟิโตโปรตีน (AFP) ในน้ำเหลือง โดยวิธี อิมมูโนเรดิโอเมตริก เอสเสย์ (IRMA) วิธีการตรวจวิเคราะห์ใช้โมโนโคนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ AFP ที่มีความ แตกต่างกัน 2 ชนิด ตัวที่หนึ่งทำการติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี ด้วยวิธี เอ็น-โบรโมซัคซินิไมด์ (N-Bromosuccinimide) ส่วนอิมมูโนโกลบูลินของโมโคลนัลแอนติบอดีอีกตัวหนึ่ง เคลือบอยู่บน ผงเซลลูโลส

ในการศึกษานี้ พบว่าวิธีการตรวจมีช่วงค่ามาตรฐานกว้าง 0-1000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และความไวต่ำสุดที่สามารถวัดได้ คือ 0.63 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจวิธีวิเคราะห์ จากตัวอย่างน้ำเหลือง จำนวน 94 ตัวอย่าง กับชุดน้ำยาจากต่างประเทศ (Amerlex-M AFP RIA Kit) มีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรง (r^2 = 0.999) วิธีอิมมูโนเรดิโอเมตริกเอสเสย์ มีความไวสูง ความแม่นยำ และ ความจำเพาะสูง เหมาะสำหรับใช้ในการวินิจฉัย และติดตามการรักษาโรคมะเร็งโดยเฉพาะ มะเร็งตับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

##C426583 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: : MONOCLONAL ANTIBODY/ALPHAFETOPROTEIN/TUMOR MARKER/DIAGNOSIS/IMMUNORADIOMETRIC ASSAY
TEERAKUL ARPORNSUWAN : PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY TO ALPHA-FETOPROTEIN FOR TUMOR MARKER DIAGNOSIS THESIS ADVISOR : ASST. PROF. AMORN PETSOM, PH.D., THESIS CO-ADVISOR : MISS WIYADA CHAROENSIRIWATANA, 116 PP. ISBN 974-583-421-1

The determination of the amount of alpha-fetoprotein by immunology is of considerable importance in diagnosis and monitoring the patient's symptoms as well as the treatment. Thus, sensitive and inexpensive laboratory techniques must be developed in order to perform the tests for large amount of samples. A two site immunoradiometric assay (IRMA) has been developed recently and holds great promise in a wide variety of applications. In this study, the IRMA was developed for detecting AFP in serum. The assay utilized the use of monoclonal antibodies directed to two distinct antigenic determinants of AFP ,a radio-iodinated mouse monoclonal antibody produced by N-Bromosuccinimide and the immunoglobulin fraction of another mouse monoclonal antibody covalently linked to activated cellulose.

In this study ,the assay had a broad working range of 0-1000 ng/ml and the sensitivity of 0.63 ng/ml. Studies with 94 human serum samples by comparison the assayed values using developed method to a commercial kit one (Amerlex-M AFP RIA kit), the results showed a linear correlation with a correlation coefficient of 0.999. The IRMA has high sensitivity, precision and specificity. Therefore, it was suitable as an aid for the diagnosis and monitoring of tumors especially for hepatoma.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต ธีรกุล อาภรณ์สุวรรณ์

สาขาวิชา - ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Acknowledgement

I would like to express my grateful acknowledgement to my advisor, Assistant Professor Dr. Amorn Petsom and Miss Wiyada Charoensiriwatana, my co-advisor; for their valuable advices, guidances and encouragement throughout the course of this study.

I also wish to thank Dr. Yaen Tantiniron, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and the staffs of Pathology Division, National Institute of Cancer, Ministry of Public Health for his help in specimen collections.

My sincere thanks are extended to all the staffs of Animal center, Division of Health Science Research, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, for the provision and loan of the facilities for animal experiments in this study.

Thanks are also given to the staff members of Thai Red Cross, Chulalongkorn Hospital for their helps in blood doner collection.

Finally, I would like to express my deep gratitude to my family and many thanks to all my friends for their love, encouragement, moral support and assistance during the study.

Contents

Page

Thai Abstract..... IV

English Abstract..... V

Acknowledgement..... VI

List of Tables..... VIII

List of Figures..... IX

List of Abbreviations..... XII

Chapter

I Introduction..... 1

II Literature Review..... 4

III Materials and Methods..... 33

Materials..... 33

Methods..... 36

Establishment cell lines..... 36

Characterization of monoclonal antibody from the hybridoma..... 38

Solid phase coated antibody..... 42

Labelling of monoclonal antibody as radioisotope tracer..... 44

Optimization of the assay protocol.... 50

IV Results and Disscussion..... 53

V Conclusions..... 91

References..... 93

Appendices..... 105

Vitae..... 116

List of Tables

Table		Page
1.	Types of tumor markers.....	6
2.	Matching of AFP IRMA system using two monoclonal antibodies.....	61
3.	Percentage incorporation of labelled antibody..	62
4.	The effect of specific activity on label stability.....	63
5.	Effect of amount of labelled antibody on AFP IRMA.....	64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure — Page

1. The amino acid sequence of human AFP arranged as proposed for serum albumin..... 9
2. Representative structures of the glycoid moieties of AFP..... 11
3. Comparison of AFP levels in four types of cancer, two non malignant liver diseases..... 16
4. AFP concentration in fetal serum, amniotic fluid and maternal serum during normal pregnancies..... 18
5. Immunoradiometric assay technique..... 20
6. Two-site immunoradiometric assay..... 21
7. Forward two-step immunometric assay..... 22
8. Reverse two-step immunometric assay..... 23
9. Simultaneous immunometric assay..... 24
10. Polyclonal response to antigenic intruder..... 29
11. Production of monoclonal antibodies..... 30
12. Monoclonal antibodies made by hybridoma cells.. 31
13. Specificity of monoclonal anti AFP with standard AFP human serum albumin (HSA), bovine serum albumin (BSA) and rabbit serum albumin (RSA)..... 65
14. Scatchard plot for solid phase monoclonal anti AFP I $K = 1.55 \times 10^9$ L/mole..... 66
15. Scatchard plot for solid phase monoclonal anti AFP II $K = 1.07 \times 10^9$ L/mole..... 67

List of Figures (con.)

Figure Page

16. The elution pattern of ammonium sulfate purified ascites fluid I from DEAE column..... 68
17. The elution pattern of ammonium sulfate purified ascites fluid II from protein A..... 69
18. SDS PAGE of ascites fluid I and II purified by various methods..... 70
19. Coupling of monoclonal anti AFP I with activated cellulose..... 71
20. The effect of buffer on cellulose coating..... 72
21. Comparison of DEAE and ammonium sulfate precipitate of monoclonal anti AFP I on cellulose coating..... 73
22. Iodination of monoclonal anti AFP II using N-Bromosuccinimide method..... 74
23. The effect of specific radioactivity on label stability..... 75
24. Purification of AFP from amniotic fluid using Sephacryl 300S column chromatography..... 76
25. SDS PAGE and silver staining of AFP and the proteins purified from Sephacryl 300S..... 77
26. Purification of AFP from amniotic fluid using Affi gel Blue column chromatography..... 78
27. Purification of AFP from amniotic fluid using CNBr activated Sepharose 4B..... 79
28. SDS PAGE of AFP purified by various methods.... 80

List of Figures (con.)

Figure		Page
29.	SDS PAGE of various proteins.....	81
30.	Extended standard curve (0-50,000 ng/ml).....	82
31.	The amount of antibody coated cellulose required for IRMA.....	83
32.	The amount of labelled antibody required for AFP standard curve.....	84
33.	Response curves with different incubation times.....	85
34.	Within-assay precision profile of AFP IRMA.....	86
35.	Between-assay precision profile of AFP IRMA....	87
36.	The stability test of AFP IRMA kit.....	88
37.	Correlation between AFP IRMA kit and Amerlex AFP RIA for the determination of AFP in 94 sera....	89
38.	Normal Distribution of AFP concentration of normal subjects.....	90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Abbreviation

AFP	=	Alpha fetoprotein
°c	=	degree celcius
CV	=	coefficient of variance
DEAE	=	diethylaminoethyl
FCS	=	fetal calf serum
HPLC	=	high performance liquid chromatography
HAT	=	hypoxanthine, aminoptherin, thymidine
Ig	=	immunoglobulin
K	=	association constant
L/mole	=	Liter/mole
M	=	mole/liter
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
nm	=	nanometer
ng	=	nanogram
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
rpm	=	revolution per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine
UV	=	ultraviolet
uCi	=	microcurie
ug	=	microgram
ul	=	microliter
V	=	volumn