

Tạo và thu nhận chọn lọc kháng thể IgG kháng protein màng của tế bào T Jurkat

- **Trịnh Minh Thượng**
- **Huỳnh Thị Xuân Mai**
- **Trần Văn Hiếu**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 10 năm 2015, nhận đăng ngày 28 tháng 03 năm 2016)

TÓM TẮT

Hiện nay, vật ghép chống chủ (GvHD) vẫn là rào cản lớn nhất trong ứng dụng ghép tủy dị cá thể để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư máu. Vật ghép chống chủ được gây ra do tế bào T trưởng thành của người cho tấn công mô và cơ quan người nhận. Loại bỏ tế bào T bằng hạt từ miễn dịch là một trong những phương pháp hiệu quả nhất để khắc phục GvHD. Trong nghiên cứu này, kháng thể đa dòng kháng tế bào T Jurkat được tạo ra như nguồn nguyên liệu cho việc tạo hạt từ miễn dịch hỗ trợ loại bỏ tế bào T. Đầu tiên, màng tế bào T Jurkat được thu nhận bằng phương pháp ly trích điểm sương sử dụng Triton X-114. Tiếp theo, phân đoạn màng được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch ở thỏ với lượng 50 μ g ở lần đầu

tiên và 25 μ g ở bốn lần nhắc sau. Huyết thanh thu nhận được ở lần tiêm nhắc cuối được tủa trong dung dịch 50 % ammonium sulfate bão hòa để thu kháng thể. Theo đó, kháng thể được tinh sạch bằng cột sắc kí ái lực protein A và phân tích độ tinh sạch bằng điện di SDS-PAGE. Sau đó, kháng thể tinh sạch được nhuộm miễn dịch huỳnh quang trên tế bào T Jurkat và quan sát kết quả dưới kính hiển vi huỳnh quang nhằm xác định khả năng bắt tế bào T Jurkat. Cuối cùng, kháng thể tiếp tục được chọn lọc âm tính với tế bào TF-1, dòng tế bào gốc tạo máu, nhằm loại bỏ các kháng thể kháng tế bào TF-1. Kết quả cho thấy kháng thể đa dòng thu được có khả năng nhận diện yếu tố bào TF-1 và nhận diện mạnh tế bào T Jurkat.

Từ khoá: chọn lọc âm tính, GvHD, kháng thể kháng tế bào T, ly trích điểm sương, vật ghép chống chủ.

MỞ ĐẦU

Ước tính trong năm 2014, ở Hoa Kỳ, số bệnh nhân mắc ung thư máu lên đến 1,129,813 và cứ mỗi 10 phút sẽ có một người chết. Để điều trị ung thư máu thì liệu pháp được sử dụng hiện nay là hóa trị, xạ trị kết hợp với cấy ghép tủy xương (ghép tủy). Ghép tủy là phương pháp thay thế tủy xương bị hư hỏng hoặc bị phá hủy bằng các tế bào gốc tạo máu khỏe mạnh. Nguồn tế bào gốc khỏe mạnh có thể được thu nhận từ chính bệnh nhân (ghép tự thân) hoặc từ người khác (ghép dị cá thể). Nhìn chung, ghép dị cá thể cho kết quả tốt hơn trong việc kiểm soát bệnh với sự giảm đáng kể tỉ lệ tái phát nên ngày càng được ứng dụng nhiều. Tính riêng ở Hoa Kỳ trong năm 2010 có đến 18,000 ca ghép tủy [1]. Tuy nhiên, ghép dị cá thể mang đến nguy cơ cao mắc bệnh vật ghép chống chủ (Graft-versus-Host Disease – GvHD) cho bệnh nhân

ở giai đoạn hậu ghép tủy. Tính riêng ở Việt Nam, theo thống kê, cứ 19 người ghép tủy sẽ có khoảng 11 người mắc GvHD sau cấy ghép. Người mắc GvHD nếu nhẹ sẽ thường xuyên có triệu chứng như vàng da, ban đỏ, nôn mửa, tiêu chảy,.. và nếu nặng hơn sẽ bị xơ cứng da, tróc vảy, loét ruột, xơ gan và tử vong. Những triệu chứng này khiến các bệnh nhân sau ghép tủy trải qua nhiều đau đớn và khó khăn trong đời sống sinh hoạt dẫn đến chất lượng cuộc sống suy giảm.

Để ngăn ngừa GvHD, người ta hướng đến việc làm giảm hay ức chế hoạt động của các tế bào T của người hiến tủy, là nguyên nhân gây ra GvHD, bằng cách sử dụng các loại thuốc ức chế miễn dịch, các liệu pháp sử dụng các cytokine hay thụ thể cytokine ức chế hoạt động của tế bào T, hay loại bỏ trực tiếp tế

bào T ra khỏi mô ghép trước khi cấy ghép [2]. Tuy nhiên, khi sử dụng thuốc ức chế miễn dịch hay liệu pháp cytokine thì hiệu quả mang lại trong khắc phục GvHD thấp, chi phí rất cao và để lại nhiều hậu quả nghiêm trọng cho bệnh nhân, nhiều bệnh nhân (khoảng 20 %) phải sử dụng những loại thuốc ức chế miễn dịch suốt đời. Trong khi đó, nếu loại bỏ tế bào T trong mô tủy ghép từ người hiến tặng trước khi cấy ghép sẽ làm giảm đáng kể tỷ lệ mắc GvHD từ 53% xuống còn 13 % [3].

Hiện nay, để loại bỏ tế bào T, một số phương pháp được đưa ra như: phân đoạn theo gradient tỉ trọng, kháng thể kết hợp bổ thể hay các chất độc như ricin-A để tiêu diệt tế bào T, hoặc sử dụng các hạt từ gắn kết kháng thể (hạt từ miễn dịch) kháng tế bào T trên bề mặt. Trong đó, phương pháp tạo hạt từ miễn dịch thu hút nhiều sự quan tâm do có khả năng loại bỏ đặc hiệu tế bào T, hiệu quả cao trong phân tách riêng tế bào T khỏi tế bào gốc cần thu nhận (3–4 log sau mỗi chu kỳ so với 1–2 log sau mỗi chu kỳ ở những nhóm phương pháp còn lại), đặc biệt chúng không gây độc hay ảnh hưởng cho tế bào gốc mục tiêu như phương pháp sử dụng kháng thể kết hợp chất độc. Trên tế bào T có nhiều loại dấu ấn chuyên biệt cho chúng bao gồm CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD127, CD69, CD196,... [4] trong đó CD3 với bản chất là một glycoprotein hiện diện thường trực và đặc hiệu trên tế bào T từ những giai đoạn sớm (chưa trưởng thành) [5]. Do đó, hiện nay nhiều bộ kit phân tách tế bào T sử dụng kháng thể kháng CD3 đã được thương mại hóa. Trong ngăn ngừa GvHD, người ta đã sử dụng nhiều loại kháng thể để loại bỏ tế bào T trước khi cấy ghép như CD3 và CD5 [6], CD25 và CD69 [7, 8], CD52 (CAMPATH-1) [9, 10],... hay các kháng thể kháng globulin của tế bào tuyến ức (ATG) [11-14]. Trong đó, liệu pháp sử dụng ATG đã được sử dụng nhiều trong những năm gần đây và mang lại nhiều hiệu quả ngăn ngừa GvHD hiệu quả [11-14]. ATG là kháng thể đa dòng sản xuất ở thỏ hay ngựa

có khả năng kháng lại tế bào tuyến ức của người hoặc dòng tế bào T người mà cụ thể là tế bào T Jurkat [11]. T Jurkat là một loại tế bào lympho T thu nhận từ người bệnh bạch cầu. T Jurkat được xem như một mô hình phổ biến nhất cho nghiên cứu các con đường truyền tín hiệu của tế bào T [15] nên hầu hết các kháng nguyên bề mặt của chúng sẽ như tế bào T bình thường. Dòng tế bào gốc tạo máu TF-1 là một mô hình phổ biến cho nghiên cứu các thụ thể truyền tín hiệu của tế bào gốc tạo máu [16, 17] nên chúng mang hầu hết các đặc điểm bề mặt của các tế bào gốc tạo máu thông thường [17]. Qua đó, nhằm hướng đến ứng dụng ngăn ngừa GvHD để nâng cao chất lượng cuộc sống của các bệnh nhân được chỉ định ghép tủy xương, nghiên cứu này hướng đến việc sản xuất và phát triển hạt từ miễn dịch phục vụ cho phân tách tế bào T mà trước hết là sản xuất kháng thể kháng tế bào T của người ở thỏ. Kháng thể sẽ được tạo thành bằng cách gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ với kháng nguyên là tổ hợp protein màng tế bào T Jurkat và sẽ được chọn lọc âm tính loại bỏ các kháng thể có khả năng bắt tế bào gốc tạo máu thông qua tế bào TF-1.

VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Dòng tế bào T Jurkat, tế bào lympho T thu nhận từ người bệnh bạch cầu, được nuôi cấy huyền phù trong môi trường RPMI-1640, 10% huyết thanh thai bò, ở 37 °C, 5 % CO₂. Dòng tế bào này được sử dụng trong việc thu nhận kháng nguyên màng để đáp ứng miễn dịch ở thỏ. Dòng tế bào TF-1[17], một loại tế bào gốc tạo máu, được nuôi cấy huyền phù trong môi trường RPMI-1640, 10 % huyết thanh thai bò, 2 ng/ml hGM-CSF, ở 37 °C, 5 % CO₂. Dòng tế bào này được sử dụng như là một tác nhân chọn lọc loại bỏ hầu hết các kháng thể có khả năng bắt được tế bào gốc tạo máu trong hỗn hợp kháng thể thu được sau khi gây đáp ứng miễn dịch ở thỏ bằng kháng nguyên màng tế bào Jurkat T.

Phương pháp

Thu nhận phân đoạn màng tế bào Jurkat T có chứa protein CD3

Sự hiện diện của protein CD3 trên màng tế bào T Jurkat được kiểm tra bằng phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang dựa trên tương tác đặc hiệu giữa kháng thể kháng CD3 (Biolegend) và kháng thể thứ cấp mang chất huỳnh quang Alexa488 (Sigma).

Phân đoạn màng tế bào T Jurkat chứa protein CD3 được thu nhận bằng phương pháp ly trích điểm sương dựa trên khả năng hòa tan protein màng và đặc điểm phân pha của Triton X-114 khi nhiệt độ trên 25 °C [18]. Sau đó, protein trong các pha được xử lý bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và tiến hành Western blot với kháng thể kháng CD3 epsilon (Biolegend).

Kiểm tra khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở thỏ

Phân đoạn màng tế bào T Jurkat thu nhận ở trên được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch ở thỏ với lượng 50 µg ở lần đầu tiên và 25 µg ở bốn lần nhắc sau. Sau mỗi lần tiêm nhắc, huyết thanh thỏ được thu nhận và được nhuộm miễn dịch huỳnh quang với tế bào T Jurkat để theo dõi quá trình đáp ứng miễn dịch. Cuối cùng, phần dịch huyết thanh ở lần tiêm nhắc thứ 4 được tủa trong 45-50 % dung dịch muối ammonium sulfate bão hòa nhằm thu nhận kháng thể và loại bỏ các thành phần có trong huyết thanh.

Thu nhận, tinh sạch và chọn lọc kháng thể đa dòng

Kháng thể thu nhận bằng phương pháp tủa muối ammonium sulfate được tinh sạch theo phương pháp tinh sạch thông qua cột tinh chế HiTrap™ Protein A FF 1ml (GE Healthcare). Sau đó, các pha protein

được xử lý và phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE kết hợp nhuộm Coomassie Brilliant Blue.

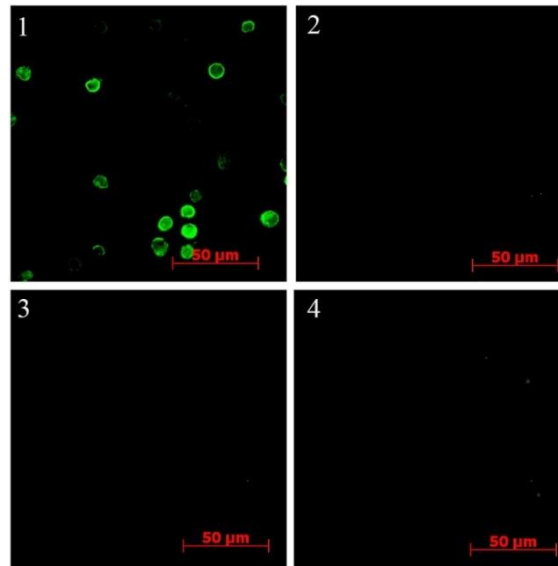
Kháng thể đa dòng sau tinh sạch được xử lý và tiến hành nhuộm miễn dịch huỳnh quang. Ủ tế bào TF-1 với nồng độ 5×10^5 tế bào/ml với kháng thể tinh sạch ở nồng độ cuối 5 µg/ml trong 30 phút ở 4°C. Ly tâm 1500 vòng/phút, trong vòng 5 phút, sau đó tiến hành thu phần dịch nổi. Tiến hành nhuộm miễn dịch huỳnh quang bằng phần dịch nổi thu được trên hai mẫu tế bào Jurkat T và tế bào TF-1.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Thu nhận phân đoạn màng tế bào Jurkat T có chứa protein CD3

Về lý thuyết, protein CD3 là dấu ấn bề mặt chuyên biệt, hiện diện với mật độ lên đến 95 % trên tế bào lympho T [5]. Do đó, protein CD3 được xem như dấu ấn để xác định phân đoạn màng tế bào lympho T. Trong xuyên suốt quá trình tạo kháng thể kháng tế bào T, tế bào T Jurkat được sử dụng như nguồn nguyên liệu thu nhận kháng nguyên màng cũng như là mô hình tế bào T chuẩn cho các thí nghiệm nhuộm miễn dịch huỳnh quang thử nghiệm khả năng bắt tế bào T của kháng thể thu được. Vì thế, việc đảm bảo quy trình nhuộm miễn dịch huỳnh quang thông qua xác nhận sự hiện diện dấu ấn CD3 trên tế bào T Jurkat là cần thiết. Kết quả được trình bày ở Hình 1.

Kích thích với bước sóng 495 nm và thu nhận tín hiệu huỳnh quang ở bước sóng 519 nm, kết quả cho thấy tín hiệu huỳnh quang chỉ xuất hiện ở mẫu 1 (chứng dương) và không xuất hiện ở các mẫu chứng âm còn lại (mẫu 2, 3, 4).



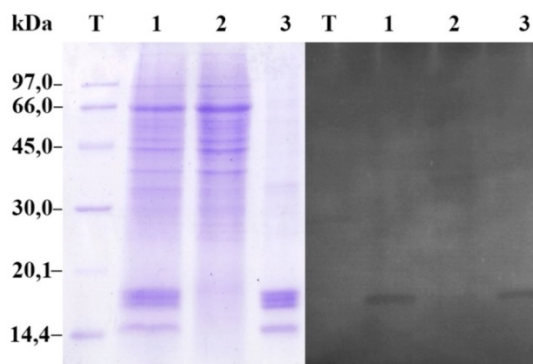
Hình 2. Xác nhận sự hiện diện của protein CD3 trên màng tế bào T Jurkat

1, Tế bào T Jurkat ủ với kháng thể kháng CD3; 2, Chứng âm, mẫu T Jurkat không nhuộm; 3, Chứng âm, mẫu T Jurkat chỉ ủ với kháng thể thứ cấp; 4, Chứng âm, mẫu Jurkat T ủ với kháng thể IgG isotype

Để chuẩn bị nguồn kháng nguyên cho bước kích thích đáp ứng miễn dịch, phân đoạn màng tế bào T Jurkat được thu nhận bằng phương pháp ly trích điểm sương. Kết quả thu được gồm hai phân đoạn giống như mô tả ở công bố của Bordier [18]. Theo đó, những phân đoạn này được điện di SDS-PAGE và Western blot nhằm theo dõi sự phân bố protein màng tế bào T Jurkat. Kết quả được thể hiện trên Hình 2.

Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy: ở phân đoạn trên (giếng 2) và phân đoạn dưới (giếng 3) đều

có sự hiện diện của các vạch protein tương ứng với các vạch của mẫu protein trước khi tiến hành phân pha (giếng 1). Điều này cho phép chúng tôi dự đoán đã có sự phân tách giữa hai pha protein ưa nước (phân đoạn trên) và pha protein kỵ nước (phân đoạn dưới) giống như những cơ sở được đề cập ở công bố trước [18]. Dựa trên đó có thể giả định rằng phân đoạn chứa protein màng tế bào T Jurkat là phân đoạn dưới (giếng 3).



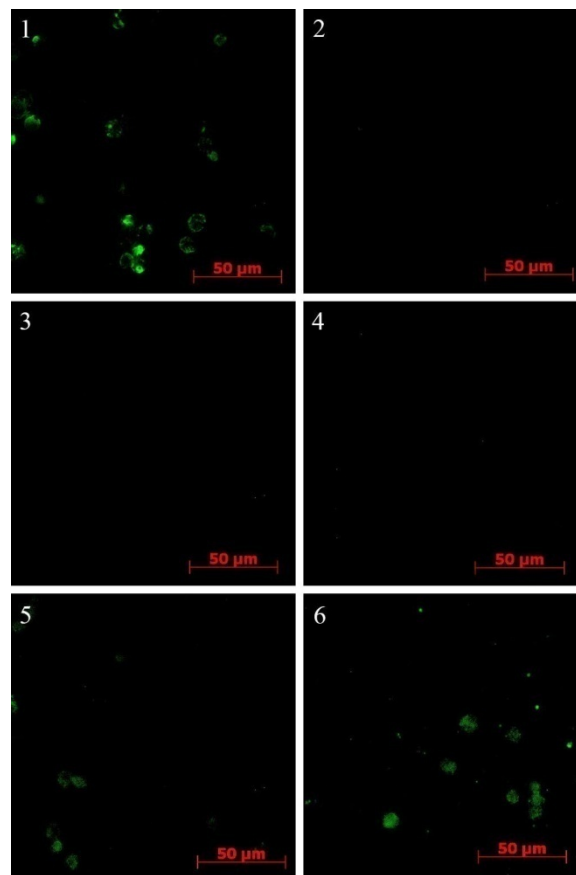
Hình 3. Thu nhận phân đoạn màng tế bào T Jurkat có chứa protein CD3T, Thang protein phân tử lượng thấp;

1, Protein trước phân tách; 2, Protein phân đoạn trên sau phân tách; 3, Protein phân đoạn dưới sau phân tách

Kết quả Western blot khi lai với kháng thể đặc hiệu kháng protein CD3 cho thấy rằng, đúng như dự đoán, ở giếng 1 và 3 có xuất hiện vạch tín hiệu tương ứng với vạch tín hiệu ở trên phim, trong khi ở giếng 2 không có xuất hiện vạch tín hiệu. Điều này chứng tỏ phân đoạn dưới chứa protein CD3 và những protein với bản chất giống như CD3 (các protein màng tế bào và các protein kị nước). Qua đó cho thấy, phân đoạn protein màng tế bào T Jurkat đã được thu nhận, sẵn sàng cho bước tiếp theo.

Kiểm tra khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở thỏ

Nhằm kiểm tra hiệu quả tạo kháng thể kháng tế bào T Jurkat nhờ kích thích đáp ứng miễn dịch bằng phân đoạn màng tế bào T Jurkat thu được, thí nghiệm nhuộm miễn dịch huỳnh quang được tiến hành. Kháng thể đa dòng thu nhận được qua mỗi lần tiêm nhắc được thu nhận bằng phương pháp tủa muối ammonium sulfate. Kết quả được trình bày ở Hình 3.



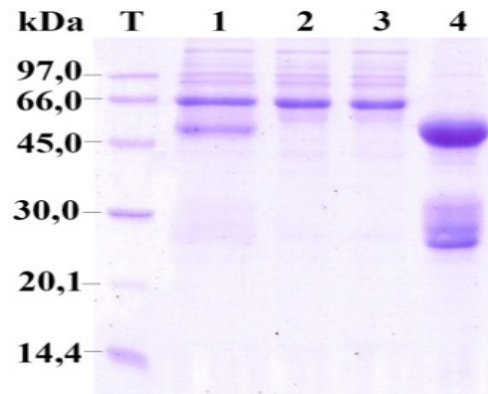
Hình 4. Kết quả kiểm tra kích thích đáp ứng miễn dịch ở thỏ
1, Chứng dương, mẫu T Jurkat ủ với kháng thể kháng CD3; 2, Chứng âm, mẫu T Jurkat ủ với kháng thể trước tiêm; 3, 4, 5, 6, Mẫu T Jurkat ủ lần lượt với huyết thanh của lần tiêm nhắc thứ 1, 2, 3, 4

Kết quả cho thấy có tín hiệu huỳnh quang 519 nm ở chứng dương, mẫu nhắc lần 3 và 4; trong khi đó, không có tín hiệu huỳnh quang ở mẫu trước tiêm, nhắc lần 1 và 2.

Tín hiệu huỳnh quang xuất hiện ở mẫu nhắc lần 3, 4 mà không xuất hiện ở mẫu trước tiêm cho thấy quá trình kích thích đáp ứng miễn dịch có hiệu quả. Việc tiêm phân đoạn màng chứa protein CD3 đã kích thích tạo kháng thể kháng tế bào T Jurkat.

Thu nhận, tinh sạch kháng thể đa dòng

Kháng thể đa dòng sau khi thu nhận bằng phương pháp tủa muối ammonium sulfate vẫn còn lẫn nhiều loại protein tạp trong huyết thanh nên đòi hỏi cần một bước tinh sạch tiếp theo nhằm đạt được độ tinh sạch cao hơn phục vụ cho những thí nghiệm sau đó một cách hiệu quả. Trong nghiên cứu này, kháng thể đa dòng sẽ được tiến hành tinh sạch bằng sắc ký ái lực với protein A. Kết quả được trình bày ở Hình 4.

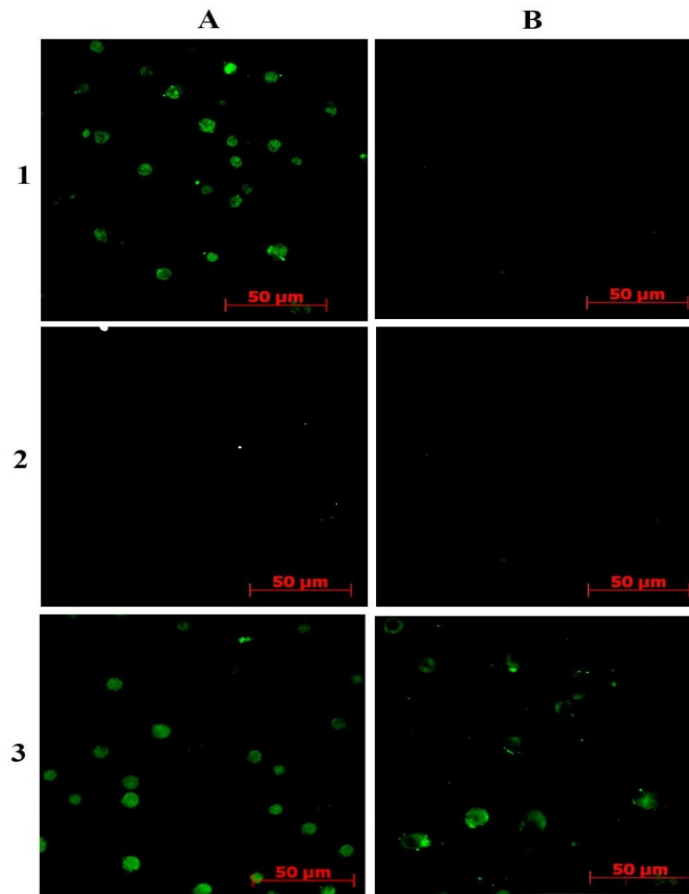


Hình 5. Tinh sạch kháng thể đa dòng bằng sắc ký ái lực protein AT, Thang protein phân tử lượng thấp; 1, Protein trước khi nạp cột; 2, Protein qua cột ở bước nạp mẫu; 3, Protein qua cột ở bước rửa mẫu; 4, Protein qua cột ở bước dung ly.

So sánh giữa giếng 1 và giếng 4, kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy nhiều protein trước tinh sạch đã được loại bỏ ở các giai đoạn nạp mẫu (giếng 2) và rửa cột (giếng 3). Qua đó cho thấy, sau bước tinh sạch bằng sắc ký ái lực cột protein A, hầu hết protein tạp đã được loại bỏ. Hơn thế nữa, ở giếng 4 (protein qua cột bước dung ly) có hai vạch protein ở vị trí 45 – 60 kDa và 20,1 – 30 kDa. Hai vạch protein này có kích thước tương ứng với chuỗi nặng (khoảng 50 kDa) và chuỗi nhẹ (25 – 30 kDa) của kháng thể thỏ. Điều này cho phép kết luận rằng kháng thể đa dòng từ thỏ đã được thu nhận và tinh sạch.

Tiếp theo, để kiểm tra khả năng nhận diện tế bào T Jurkat, kháng thể sau bước tinh sạch được thử nhuộm miễn dịch huỳnh quang. Thực hiện mẫu đối chứng sử dụng một dòng tế bào gốc tạo máu là TF-1 nhằm kiểm tra độ đặc hiệu của kháng thể. Kết quả

được trình bày trong Hình 5. Kết quả nhuộm trên tế bào T Jurkat cho thấy, ở mẫu A-3 (mẫu tế bào T Jurkat nhuộm kháng thể tinh sạch sau khi tiêm) có sự xuất hiện của tín hiệu huỳnh quang 519 nm giống như mẫu A-1 (chứng dương). Trong khi đó, mẫu A-2 (mẫu nhuộm với kháng thể prebleed tinh sạch) không cho tín hiệu huỳnh quang 519 nm. Điều này chứng tỏ, kháng thể thu được có khả năng bắt với tế bào T Jurkat. Ngoài ra, kết quả nhuộm trên tế bào TF-1 cho thấy, ở mẫu B-3 (mẫu tế bào TF-1 nhuộm kháng thể tinh sạch sau khi tiêm) có sự xuất hiện của tín hiệu huỳnh quang 519 nm giống như mẫu A-1. Trong khi mẫu B-2 (tế bào TF-1 nhuộm với prebleed tinh sạch) không có tín hiệu huỳnh quang 519 nm. Điều này chứng tỏ, các kháng thể thu nhận được sau quá trình gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ cũng có khả năng bắt các tế bào TF-1.



Hình 6. Kiểm tra khả năng nhận diện của kháng thể đa dòng

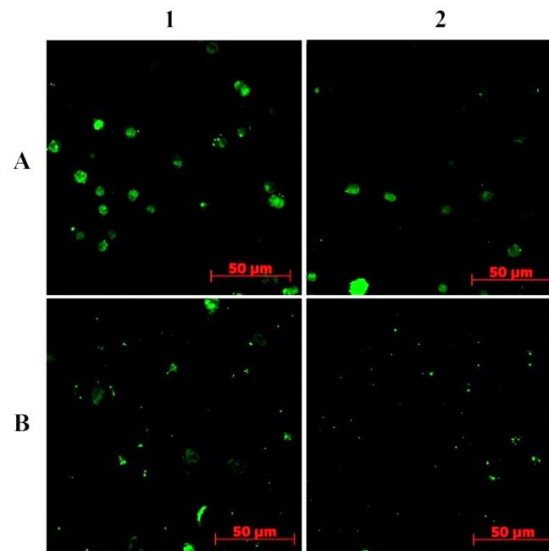
A, Tế bào T Jurkat ; B, Tế bào TF-1; 1, Chứng dương, mẫu ủ với kháng thể kháng CD3; 2, Chứng âm, mẫu ủ với preblood đã tinh sạch; 3, Mẫu ủ với kháng thể đã tinh sạch sau khi tiêm.

Các tế bào TF-1 và các tế bào T Jurkat đều là những tế bào có nguồn gốc từ người. Điều này dẫn đến việc những tế bào này có thể có một số dấu ấn bề mặt giống nhau. Chính vì thế, khi gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ bằng phân đoạn màng tế bào T Jurkat, những dấu ấn bề mặt đó sẽ kích thích các tế bào B của thỏ sản xuất kháng thể kháng lại chúng. Vì thế, một số dòng kháng thể thu được sau khi tiêm sẽ đồng thời bắt được cả tế bào TF-1 và tế bào Jurkat T; do đó

cần phải có bước chọn lọc để loại bỏ những kháng thể bắt tế bào TF 1

Chọn lọc âm tính kháng thể đa dòng trên tế bào TF-1

Nhằm hướng đến việc loại bỏ những kháng thể bắt các tế bào gốc tạo máu TF-1, bước chọn lọc âm tính trên tế bào TF-1 được thực hiện. Kết quả được trình bày trong Hình 6.



Hình 7. Kết quả chọn lọc âm tính kháng thể đa dòng

A, Tế bào T Jurkat; B, Tế bào TF-1; 1, Mẫu nhuộm với kháng thể trước chọn lọc; 2, Mẫu nhuộm với kháng thể sau chọn lọc.

Phân tích kết quả thu được cho thấy rằng, đúng như dự đoán ở mẫu trước chọn lọc A-1 và B-1 đều có tín hiệu huỳnh quang 519 nm. Tuy nhiên, ở những mẫu sau khi chọn lọc, A-2 và B-2 cho thấy rằng tín hiệu huỳnh quang 519 nm có sự sụt giảm về cường độ, đặc biệt là mẫu B-2 (mẫu tế bào TF-1 nhuộm với kháng thể sau khi chọn lọc). Từ đó điều này có thể kết luận rằng phương pháp chọn lọc đang sử dụng có khả năng loại bỏ các kháng thể bắt được tế bào TF-1. Tuy nhiên, những kháng thể thu được sau chọn lọc vẫn còn khả năng bắt được các tế bào TF-1. Điều này có thể do các điều kiện chọn lọc chưa được tối ưu như số lượng tế bào sử dụng để chọn lọc chưa phù hợp, hay nồng độ kháng thể sử dụng quá cao... Vì vậy, việc tối ưu hóa quá trình loại bỏ kháng thể đa dòng kháng tế bào TF-1 là cần thiết. Tóm lại, ở thí nghiệm chọn lọc âm tính, kết quả thu nhận được cho

thấy các kháng thể đa dòng có khả năng nhận diện được các tế bào T Jurkat và nhận diện yếu các tế bào TF-1.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy kháng thể kháng tế bào Jurkat T đã được tạo ra bằng việc gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ bằng phân đoạn màng tế bào T Jurkat. Kháng thể đa dòng kháng tế bào T Jurkat được chọn lọc để có khả năng bắt yếu các tế bào TF-1 mà vẫn còn khả năng nhận diện tế bào T Jurkat.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn đến GS. Toshio Kitamura, Viện Y khoa, Đại học Tokyo đã cung cấp dòng tế bào TF-1. Đề tài được thực hiện bằng kinh phí của đề tài 376/2013 HĐ-SKHCN của Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh.

Generation and selective isolation of IgG antibodies against Jurkat T-cell membrane proteins

- **Trinh Minh Thuong**
- **HuynhThi Xuan Mai**
- **Tran Van Hieu**

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Currently, Graft-versus-Host Disease (GvHD) has been the major barrier to the application of allogeneic bone marrow transplantation for hematopoietic disorders treatment, especially leukemia. GvHD is caused by donor mature T cells' attack on recipient's tissues and organs. Recently, T cell depletion using immunomagnetic nanoparticles is one of the most effective methods to prevent GvHD. In this present study, polyclonal antibodies against Jurkat T cell membrane were generated as a component of immunomagnetic particle. Firstly, Jurkat T cell membrane was fractionated by cloud point extraction using Triton X-114. Subsequently, the fractionated membrane was used to subcutaneously immunize rabbits for polyclonal antibodies production with a dose of 50 μ g for

priming and 25 μ g for the next four boostings. Rabbit serum was collected and partially precipitated in 50 percent of saturated ammonium sulfate solution. Next, precipitated polyclonal antibodies were purified by using protein-A affinity chromatography column and the purity was determined by SDS-PAGE. Afterwards, the purified antibodies were used in immune-fluorescent stainings and the recognition to Jurkat T cells was evaluated via fluorescent microscopic imaging. Finally, the purified antibodies were negatively selected by incubating with TF-1 cell, a hematopoietic stem cell, to eliminate cross-reacting antibodies. The immunocytofluorescent staining results showed that the purified and selected polyclonal antibodies weakly cross-reacted with TF-1 cells and strongly bound to Jurkat T cell

Key words: anti-T cell polyclonal antibodies, cloud point extraction, Graft-versus-Host Disease, negative selection

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. F.R. Appelbaum, Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy, *Nature*, 411 (6835), 385-389 (2001).
- [2]. B. Hertenstein, L. Arseniev, et al., A comparative review of methods for T cell depletion in the prophylaxis of Graft-versus-Host Disease, *BioDrugs*, 9 (2), 105-123. (1998).
- [3]. U.D. Bayraktar, M. de Lima, et al., Ex Vivo T cell-depleted versus unmodified allografts in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 19, 6, 898-903 (2013).
- [4]. B. Biosciences, Human and Mouse CD Marker Handbook, CD Marker Handbook, (2010).
- [5]. R. Chetty and K. Gatter, CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice, *The Journal of Pathology*, 173, 4, 303-307 (1994).
- [6]. J. Okunewick, D. Kociban, et al., Comparison of the effects of CD3 and CD5 donor T cell depletion on graft-versus-leukemia in a murine

- model for MHC-matched unrelated-donor transplantation, *Bone Marrow Transplantation*, 13 (1), 11-17. (1994)
- [7]. J.H. Antin, B.E. Bierer, et al., Selective depletion of bone marrow T lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effective prophylaxis for graft-versus-host disease in patients with hematologic malignancies, *Blood*, 78, 8, 2139-2149 (1991).
- [8]. B. Fehse, M. Goldmann, et al., Depletion of alloreactive donor T cells using immunomagnetic cell selection, *Bone Marrow Transplantation*, 25 S39-42 (2000).
- [9]. H. Waldmann and G. Hale, CAMPATH: from concept to clinic, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1461, 1707-1711 (2005).
- [10]. G. Hale, S. Cobbold, et al., CAMPATH-1 antibodies in stem-cell transplantation, *Cytotherapy*, 3, 3, 145-164 (2001).
- [11]. I.K. Na, F. Wittenbecher, et al., Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin®) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4⁺ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients, *Haematologica*, 98, 1, 23-30. (2013).
- [12]. M. Lopez, M.R. Clarkson, et al., A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells, *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 10, 2844-2853. (2006).
- [13]. J. Finke, W.A. Bethge, et al., Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial, *The lancet oncology*, 10, 9, 855-864 (2009).
- [14]. P. Vo, J. Pantin, et al., Conditioning with rabbit versus horse ATG dramatically alters clinical outcomes in identical twins with severe aplastic anemia transplanted with the same allogeneic donor, *Journal of Hematology & Oncology*, 8, 1, 1-8 (2015).
- [15]. R.T. Abraham and A. Weiss, Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm, *Nature Reviews Immunology*, 4, 4, 301-308 (2004).
- [16]. T. Kitamura, T. Tange, et al., Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin, *Journal of Cellular Physiology*, 140, 2, 323-334 (1989).
- [17]. T. Kitamura, A. Tojo, et al., Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1, *Blood*, 73, 2, 375-380 (1989).
- [18]. C. Bordier, Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution, *Journal of Biological Chemistry*, 256, 4, 1604-1607 (1981).