PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* WITH EMPHASIS ON SEROTYPE IDENTIFICATION

KAESINEE PHUWAO

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7172-2
C0PYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยเน้นการวินิจฉัย serotype (PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* WITH EMPHASIS ON SEROTYPE IDENTIFICATION

เกสินี ภู่วาว 4537216 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: นิตยา ธรรมพาเลิศ M.Sc., ไพศาล สิทธิกรกุล Ph.D., ธารีรัตน์ กะลัมพะเหติ Ph.D., ศิวาพร ลงยันต์ Ph.D., ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร Ph.D., ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ Ph.D.

บทคัดย่อ

ในการทดลองนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* (VPV, VPB, VPC, serovar O5:K33, O5:K33 และ O10:KUT) โดยใช้เซลล์แบคทีเรียทั้งเซลล์ในการปลูกภูมิคุ้มกัน เมื่อใช้เซลล์แบคทีเรียทั้งเซลล์ของ VPV โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* (VPV) แบ่งได้ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 และ 2 แสดงความจำเพาะต่อ VPV เพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นโดยไม่ทำปฏิกิริยากับ 2 สายพันธุ์ คือ *V. parahaemolyticus* (VPB) และ *V. parahaemolyticus* (VPC) แอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้แสดงความจำเพาะต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40 กิโลดาลตันและ 32 กิโลดาลตันตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 ทำปฏิกิริยากับ VPV เพียงสายพันธุ์เดียวและแสดงปฏิกิริยาข้ามต่อ *V. vulnificus, V. fluvialis, V. cholera* และ *V. alginolyticus* โมโนโคลนอลแอนติบอดี กลุ่มที่ 4 ทำปฏิกิริยากับ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์และแสดงปฏิกิริยาข้ามต่อ *Vibrio* spp. อื่นๆ เช่นเดียวกับแอนติบอดีในกลุ่มที่ 3 แอนติบอดีทั้ง 4 กลุ่มนี้สามารถตรวจเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ เมื่อใช้เซลล์แบคทีเรียทั้งเซลล์ของ VPB และ VPC ในการปลูกภูมิคุ้มกันสามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 2 สายพันธุ์นี้ได้ 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 แสดงความจำเพาะต่อ VPB เพียงสายพันธุ์เดียวและแสดงความจำเพาะต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 58 กิโลดาลตัน กลุ่มที่ 2 และ 3 แสดงความจำเพาะต่อ VPC เท่านั้นโดยแสดงความจำเพาะต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 58 กิโลดาลตันและ 10 กิโลดาลตันตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4 สามารถทำปฏิกิริยากับ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์และแสดงความจำเพาะต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 36 กิโลดาลตันและมีปฏิกิริยาข้ามต่อ *V. harveyi* และ *V. alginolyticus* โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1-3 สามารถตรวจการติดเชื้อในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี immunohistochemistry โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการศึกษานี้คาดว่าจะสามารถใช้สำหรับตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ออกจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้

82 หน้า ISBN 974-04-7172-2

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* WITH EMPHASIS ON SEROTYPE IDENTIFICATION

KAESINEE PHUWAO 4537216 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: NITAYA THAMMAPALERD, M.Sc., PAISARN SITHIGORNGUL, Ph.D., THAREERAT KALAMBAHETI, Ph.D., PARIN CHAIVISUTHANGKURA, Ph.D., SIWAPORN LONGYANT, Ph.D., SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (MAbs) against *Vibrio parahaemolyticus* (VPV, VPB, VPC, serovars O5:K33, O5:K33, and O10:KUT) were produced and developed using whole cell lysate for immunization. When whole-cell lysate of VPV was used for immunization, four groups of MAbs against *V. parahaemolyticus* (VPV) were obtained. The first two groups of MAbs demonstrated high specificity only to VPV isolate, did not cross- react with the two isolates of VPB and VPC, or other related bacteria and bound to proteins of molecular mass 40 and 32 kDa, respectively. The third group of MAbs also bound one isolate of VPV, but demonstrated strong cross-reactivity to *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. cholerae*, and *V. alginolyticus*. They bound to a 46 kDa protein. The fourth group of MAb recognized all three isolates of *V. parahaemolyticus* and cross-reacted with other *Vibrio* spp. as with the MAbs in the third group. Eighty-five percent of them were of IgM isotypes and 15% were IgG2a and IgG2b subisotypes. When whole-cell lysates of VPB and VPC were used for immunization, four groups of MAbs were produced. The first group was specific only to VPB. The MAbs in the first group bound to protein of a molecular mass of 58 kDa. MAbs in groups 2 and 3 showed specificity to VPC, and bound to proteins at molecular mass 58 and 10 kDa, respectively. The fourth group of MAb bound to 3 isolates of *V. parahaemolyticus* (VPV, VPB, VPC) and cross-reacted with *V. harveyi* and *V. alginolyticus*, and bound to a protein of 36 kDa. The predominant antibody isotype was IgM. In this study, monoclonal antibodies specific to *V. parahaemolyticus* were successfully produced and will be used as a tool to differentiate *V. parahaemolyticus* from other *Vibrio* spp., and other bacteria.

KEY WORDS: VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS/ DOT BLOT / IMMUNOHISTOCHEMISTRY / MONOCLONAL ANTIBODY / WESTERN BLOT

82 P ISBN 974-04-7172-2