

**MIMOTOPE IDENTIFICATION FROM MONOCLONAL
ANTIBODY AND PATIENT'S SERA SPECIFIC TO
GNATHOSTOMA SPINIGERUM,
USING PHAGE DISPLAYED RANDOM PEPTIDE LIBRARIES**

ISSARIYA IEAMSUWAN

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

**ISBN 974-04-7806-9
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การค้นหามิโมโทปจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีและซีรัมผู้ป่วยที่จำเพาะต่อพยาธิตัวจิ๊ด โดยใช้เทคโนโลยีการ
แสดงเปปไทด์บนผิวฟาจแบบสุ่ม (MIMOTOPE IDENTIFICATION FROM MONOCLONAL
ANTIBODY AND PATIENT'S SERA SPECIFIC TO *GNATHOSTOMA SPINIGERUM*,
USING PHAGE DISPLAYED RANDOM PEPTIDE LIBRARIES)

อิสศรียา เอี่ยมสุวรรณ 4737545 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พงศ์ราม รามสุด, Ph.D., วิชิต โรจน์กิตติคุณ, Ph.D., พารณ ดีคำชัย,
Ph.D., สุวลีย์ วรรณพิเศษ, Ph.D.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้คลังของฟาจเปปไทด์ที่มีเปปไทด์ที่ต่างกันบนผิวฟาจ T7
และ M13 ในการคัดเลือกมิโมโทปจากซีรัมผู้ป่วยจำนวน 5 ตัวอย่าง และโมโนโคลนัลแอนติบอดีจำนวน 1
ตัวอย่างที่จำเพาะต่อพยาธิตัวจิ๊ด โดยสกัด IgG จากซีรัมผู้ป่วยพยาธิตัวจิ๊ดก่อนทำการคัดเลือกและเพิ่มจำนวน
โปรตีนเป้าหมายโดยวิธี bio-panning ฟาจที่ถูกคัดเลือกแล้วจะทำการทดสอบการจับอย่างจำเพาะต่อ
แอนติบอดีของพยาธิตัวจิ๊ดโดยวิธี ELISA และ Immunoblot จากนั้นใช้ PCR เทคนิคในการเพิ่ม
จำนวนปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับเบสจากฟาจที่ให้ผลบวกกับวิธี ELISA และ Immunoblot
นำมิโมโทปที่ได้จาก T7 40 ตัวอย่างและจาก M13 5 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับลำดับโปรตีนของ
Caenorhabditis elegans จากการใช้ BLASTP ซอฟต์แวร์ พบว่าฟาจจำนวน 9 ตัวอย่างที่มีมิโมโทป
TPCDP มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับโปรตีน hypothetical T06E6.10 (22.5%) ฟาจ
จำนวน 3 ตัวอย่างที่มีมิโมโทป **PCRKS** มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับโปรตีน hypothetical
T07D10.2 (7.5%) และ ฟาจจำนวน 2 ตัวอย่างที่มีมิโมโทป **PTXPGNC** และ **CTINGI** (5%)
โดยมิโมโทป **TPCDP** พบทั้งโมโนโคลนัลแอนติบอดีและซีรัมผู้ป่วย มิโมโทป **CRSKKXXSNC** จาก
โมโนโคลนัลแอนติบอดี พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับโปรตีน zinc metalloproteinase
nas-31 precursor ของ *C. elegans* จากการ ใช้ PSORT II ซอฟต์แวร์ พบว่า มิโมโทป
WMKTGT มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับโปรตีน hypothetical K09B11.10 มิโมโทป
DTRKRS มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับโปรตีน tyramine beta hydroxylase family
member (tbh-1) และพบว่าโปรตีนทั้ง 2 ตัวนี้เป็นโปรตีนที่พบในส่วนภายนอกเซลล์ คิดเป็นร้อยละ
77.8 และ 66.7 ตามลำดับ 57.8% ของฟาจมิโมโทป พบว่า มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับโปรตีน
hypothetical ของ *C. elegans* จากผลการวิจัยพบว่าเทคโนโลยีการแสดงเปปไทด์บนผิวฟาจมีความ
สามารถในการค้นหามิโมโทปจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีและซีรัมผู้ป่วยที่จำเพาะต่อพยาธิตัวจิ๊ด

116 หน้า ISBN 974-04-7806-9

MIMOTOPE IDENTIFICATION FROM MONOCLONAL ANTIBODY AND
PATIENT'S SERA SPECIFIC TO *GNATHOSTOMA SPINIGERUM*,
USING PHAGE DISPLAYED RANDOM PEPTIDE LIBRARIES

ISSARIYA IEAMSUWAN 4737545 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: PONGRAMA RAMASOOTA, Ph.D., WICHIT
ROJEKITTIKHUN, Ph.D., PARON DEKUMYOY, Ph.D., SUWALEE
WORAKHUNPISET, Ph.D.

ABSTRACT

Random heptapeptides with cysteine flanking T7 and random 12-mer M13 phage libraries were used to identify mimotopes from five gnathostomiasis patient's sera and MAb specific to *G. spinigerum*, respectively. IgG from gnathostomiasis patient's sera and MAb were purified, coated on to microtiter plate, and then incubated with phage libraries. The bound phages, selected from bio-panning with each antibody, were confirmed using ELISA and Western blot, before being further amplified and checked for phage peptide sequence using PCR and DNA sequencing. Forty T7 and five M13 phages were selected. Using BLASTP software, all phage mimotopes were compared with *Caenorhabditis elegans* protein sequences from the GenBank database. The predominant mimotopes were sequence **TPCDP**, which matched hypothetical protein T06E6.10, found in 9 phages (22.5%), followed by **PCRKS**, which matched hypothetical protein T07D10.2, found in 3 phages (7.5%), and 2 phages (5%) each with mimotopes **PTXPGNC** and **CTINGI**. Interestingly, mimotopes **TPCDP** reacted with both *G. spinigerum* MAb and patient's sera. Moreover, mimotope **CRSKKXXSNC**, from phage T7/MAb GN6/24, matched part of the amino acid sequence from zinc metalloproteinase nas-31 precursor of *C. elegans*. Using PSORT II software, the mimotope matched proteins of *C. elegans* namely hypothetical protein K09B11.10 (matched with mimotope **WMKTGT**) and tyramine beta hydroxylase family member (tbh-1) (matched with mimotope **DTRKRS**) were found to locate at the extracellular region of *C. elegans*, at 77.8 and 66.7%, respectively. 57.8% of phage mimotopes were found to match hypothetical protein *C. elegans*. The results demonstrate that the phage display technique could successfully identify mimotopes that interact with *G. spinigerum* MAb and patient's sera.

KEY WORDS: PHAGE DISPLAY/RANDOM PEPTIDE LIBRARY/MIMOTOPE/
MONOCLONAL ANTIBODY/PATIENT SERUM/
GNATHOSTOMA SPINIGERUM

116 pp. ISBN 974-04-7806-9