สำนักหอสมุด
21 DEC 1992

DEVELOPMENT OF GENUS AND SPECIES SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *SCHISTOSOMA* SP. FROM *SCHISTOSOMA MEKONGI* VOGE *ET AL.*, 1978.

ORAPRAPAI GAJANANDANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL BIOLOGY)

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล
IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
Copyright by Mahidol University
1992

20928

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อจีนัสและสปีชีส์ของพยาธิใบไม้เลือด จาก *Schistosoma mekongi* Voge et al., 1978

ผู้วิจัย อรประไพ คชนันทน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาสภาวะแวดล้อม)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วิฑูรย์ ไวยนันท์

สุชาติ อุปถัมภ์

ประเสริฐ โศภน

มาลียา เครือตราชู

วันที่สำเร็จการศึกษา 29 กันยายน พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

โมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* ได้ถูกผลิตขึ้นโดยใช้เซลล์จากม้ามของหนูที่ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้มารวมตัวเข้าเป็นเซลล์เดียวกับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ P3U1 จากการทดลองครั้งนี้ได้เซลล์ลูกผสมทั้งหมด 388 กลุ่ม ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ปรากฏว่า จากเซลล์ลูกผสม 388 กลุ่ม มีเพียง 53 กลุ่มที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนจากผิวของ *S. mekongi* เซลล์ลูกผสมทั้ง 53 กลุ่มนี้ได้ถูกนำมาแยกเลี้ยงเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และเพาะเลี้ยงต่อไปเพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี

จากนั้นจึงนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมาวิเคราะห์หาแอนติเจนจำเพาะในตัวเต็มวัยของปรสิตโดยวิธี โดยวิธี immunoblotting assay ซึ่งพบว่ามีเซลล์ 13 กลุ่ม ที่ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่จำเพาะต่อแอนติเจนจากผิวของ *S. mekongi*

Copyright by Mahidol University

โมโนโคลนอลแอนติบอดี ส่วนใหญ่ทำปฏิกริยากับแอนติเจนบนผิวของปรสิตที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 125 ถึง 29 กิโลดาลตัน แต่มีโมโนโคลนอล แอนติบอดี สองชนิดซึ่งได้ให้ชื่อว่า 5D4-2-1 และ 6B2-1-19 ที่พบว่ามีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดเดียว ซึ่งน้ำหนักโมเลกุล 38 และ 97 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โมโนโคลนอล แอนติบอดี ทั้งสองผลิตแอนติบอดีชนิด IgM เมื่อศึกษาต่อไปโดยวิธี immunofluorescence และ immunoperoxidase บน frozen section ของพยาธิตัวแก่พบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งสองสามารถทำปฏิกริยากับแอนติเจนที่อยู่บนผิวของพยาธิเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ paraffin section ของพยาธิตัวแก่แทนที่ frozen section ในการทดสอบด้วยวิธี immunoperoxidase ให้ผลการทดลองไม่ดีนัก ซึ่งอาจเนื่องมาจากการสูญเสีย antigenic component ในระหว่างการเตรียม paraffin section

การทดสอบปฏิกริยาข้ามชนิดระหว่าง โพลีโคลนอล แอนติบอดี และโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ *S. mekongi* ต่อ *S. japonicum* (Chinese strain) และ *S. mansoni* โดยวิธี immunoblotting assay พบว่า โพลีโคลนอล แอนติบอดี ทำปฏิกริยากับแอนติเจนบนผิวของพยาธิที่มีโมเลกุลขนาดต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก ทำให้การแปลผลทำได้ยาก ขณะที่โมโนโคลนอล แอนติบอดี ทำปฏิกริยากับแอนติเจนที่ค่อนข้างจำเพาะมากกว่าโดยเฉพาะโมโนโคลนอล แอนติบอดี 5D4-2-1 และ 6B2-1-19 ให้ผลการทดลองที่น่าสนใจ โดย 5D4-2-1 ทำปฏิกริยากับแอนติเจนบนผิวของพยาธิใบไม้เลือดทั้ง 3 ชนิด ที่มีขนาดโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน และ 6B2-1-19 ทำปฏิกริยาจำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวของ *S. mekongi* ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 97 กิโลดาลตัน ดังนั้นจึงจัดว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี 5D4-2-1 มีความจำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวของปรสิตทั้ง 3 สปีชีส์ และโมโนโคลนอล แอนติบอดี 6B2-1-19 มีความจำเพาะต่อแอนติเจนเฉพาะที่มีอยู่บนผิวของ *S. mekongi* ดังนั้นการพบโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อจีนัสและสปีชีส์ของพยาธิใบไม้เลือดนี้ น่าจะมีประโยชน์ในการนำมาพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือดทางอิมมิวโนวิทยาและการผลิตวัคซีนต่อโรคนี้ได้อนาคต

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Development of Genus and Species Specific Monoclonal Antibodies Against *Schistosoma* sp. from *Shistosoma mekongi* Voge et al., 1978.

Name Oraprapai Gajanandana

Degree Master of Science (ENVIRONMENTAL BIOLOGY)

Thesis Supervisory Committee

Vithoon Viyanant, Ph.D.

Suchart Upatham, Ph.D.

Prasert Sobhon, Ph.D.

Maleeya Kruatrachue, Ph.D.

Date of Graduation 29 Sepetmber B.E. 2535 (1992)

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (MoAbs) directed against *Schistosoma mekongi* were produced by the *in vitro* fusion of the spleen cells, obtained from mice infected with *S. mekongi* and P3U1 myeloma cells. A total of 388 hybridoma clones were produced and grown successfully in the culture. These hybridom clones were examined for producing specific antibodies against the tegumental antigens of *S. mekongi* by using ELISA technique. Of the 388 clones, 53 stable clones were selected for recloning by limiting dilution method.

Copyright by Mahidol University

Initial characterization of monoclonal antibodies was tested by using immunoblotting assay against tegumental antigens of *S. mekongi*. The clear reaction bands were observed in 13 MoAb clones. Although most MoAbs have been found to bind to rather heterogeneous epitopes ranging from Mr 125 to 29 kDa, there were two MoAbs, namely 5D4-2-1 and 6B2-1-19 which have been found to recognize single epitope at Mr 38 kDa and 97 kDa, respectively. Both 5D4-2-1 and 6B2-1-19 clones were found to secret IgM antibodies. When these to MoAbs were tested for binding with frozen sections of *S. mekongi* adult male worms by immunofluorescence and immunoperoxidase assays, both of them have been found to recognize the target epitopes on the surface tegument of *S. mekongi* adult worm. Paraffin sections were used with immunoperoxidase assay but the sensitivity of this technique was much reduced. This may be due to the lossening of some antigenic components during the process of paraffin preparation.

In this study, both polyclonal and monoclonal antibodies have been used for characterization of the antigenic epitopes on the teguments of *S. mekongi*, *S. japonicum* and *S. mansoni* adult worms by immunoblotting technique. The polyclonal antibodies did not give any conclusive result. On the other hand, some good results were obtained when 5D4-2-1 and 6B2-1-19 MoAbs were used. The 5D4-2-1 MoAb has been found to react with the Mr 38 kDa epitope of all three species of schistosomes used in

Copyright by Mahidol University

this study. The 6B2-1-19 MoAb reacted specifically with only Mr 97 kDa epitope of *S. mekongi* but not with the other schistosome speicies. The findind of the genus- and species-specific monoclonal antibodies would provide a useful tool in the field of immunodiagnosis as well as vaccine development.

Copyright by Mahidol University