17 SEP 1996

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN

DUANGKAMOL KUNTHALERT

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

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

TH
D812p
1996

36386

Copyright © by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบี

ผู้วิจัย ดวงกมล ขันธเลิศ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, Ph.D.

ชโลบล อยู่สุข, ปร.ด.

วันสำเร็จการศึกษา 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

ได้ทำการสร้างเซลล์ลูกผสมซึ่งสามารถหลั่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบี โดยใช้เซลล์มะเร็งหนูถีบจักร P3-X63-Ag8.653 มาเชื่อมติดกับเซลล์ม้ามของหนูถีบจักรสายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบีมาก่อน แอนติเจนที่ผิวสำหรับใช้ในการกระตุ้นหนูเตรียมมาจากพลาสมาของผู้เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบีโดยวิธีการตกตะกอนด้วยโพลีเอธีลีนไกลคอล 6000 ทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี indirect ELISA การเชื่อมเซลล์ให้ติดกันในครั้งนี้สามารถ สร้างเซลล์ลูกผสมได้ 5 เซลล์ที่สามารถหลั่งแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบีอย่างสม่ำเสมอ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติโดยวิธี ELISA และ immunoblotting จากการทดสอบความจำเพาะต่อแอนติเจนที่พบใน subtype ต่างๆ ของไวรัสตับอักเสบบีโดยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิดมีความจำเพาะต่อ "*a*" determinant ของแอนติเจนที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบี ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิดในกลุ่มนี้ให้ปฏิกิริยาจำเพาะต่อ "*a*" determinant ของแอนติเจนที่ผิวของ ไวรัสตับอักเสบบี subtype *adr* และ *adw* สูงกว่า subtype *ay* โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิดเป็น IgG1/k เมื่อใช้วิธี immunoblot ทดสอบพบ

Copyright by Mahidol University

ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิด ทำปฏิกิริยาอย่างแรงกับโมเลกุลของโปรตีนจากผิวของไวรัสตับอักเสบบีที่ 48 kD ซึ่งเป็นตำแหน่งที่โปรตีนขนาดเล็กของไวรัสตับอักเสบบีจับกลุ่มรวมกันอยู่ ชี้ให้เห็นว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ มีความจำเพาะกับโปรตีนขนาดเล็กที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนั้นจากการทดสอบด้วยวิธี immunoblot แอนติบอดีเหล่านี้ สามารถทำปฏิกิริยากับ reduced HBsAg ได้ชี้ให้เห็นว่า แอนติบอดีเหล่านี้มีความจำเพาะกับ epitope ซึ่งไม่ขึ้นกับการจัดเรียงตัวของ กรดอะมิโนที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้ยังพบว่าการทำปฏิกิริยาโดยวิธี immunoblot ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้เหมือนกับการทำปฏิกิริยาของโพลีโคลนอล แอนติบอดีที่ได้จากน้ำเหลืองคน โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้จึงสามารถใช้เป็นตัวตรวจสอบจำเพาะแทนโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากน้ำเหลืองคนได้

ได้ทดลองนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นได้นี้ไปใช้ตรวจสอบแอนติเจนที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบีในน้ำเหลือง 10 ตัวอย่างจากผู้ที่ตรวจพบ HBsAg และ 10 ตัวอย่างจากคนปกติโดยวิธี dot-immunobinding พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ตรวจสอบ HBsAg ในตัวอย่างดังกล่าวได้

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ผิวของไวรัสตับอักเสบบีในครั้งนี้ สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบและศึกษาไวรัสตับอักเสบบีต่อไป.

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Hepatitis B Surface Antigen

Name Duangkamol Kunthalert

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Somsak Pantuwatana, Ph.D.

Chalobon Yoosook, Ph.D.

Date of Graduation 14 May B.E.2539 (1996)

ABSTRACT

Hybridomas secreting monoclonal anti-HBsAg antibodies were established by fusing murine myeloma cell lines P3-X63-Ag8.653 to spleen cells of BALB/c mice sensitized with HBsAg. The surface antigen used for immunization of mice was prepared from the pooled human plasma obtained from HBV carriers by polyethylene glycol 6000 precipitation. Resulting monoclonal antibodies were determined by indirect ELISA assay against purified HBsAg. Five hybridoma cell lines constantly secreting monoclonal anti-HBsAg antibodies were obtained and maintained for antibody production. The characteristics of these monoclonal antibodies (MAbs) were tested by ELISA and immunoblotting techniques. By the indirect ELISA assay against known HBsAg subtypes *adr*, *adw* and *ay*, all of these MAbs have specificity

Copyright by Mahidol University

against "*a*" determinant of HBsAg. However, two of them demonstrated higher activity against the "*a*" determinant of HBsAg subtype *adr* and *adw* than that of subtype *ay*. All monoclonal antibodies were of IgG1 subclass with the kappa light chain. All antibodies strongly reacted at the 48 kD position of HBsAg at which the small envelope proteins are aggregated, suggesting that these antibodies are specific to the small envelope proteins of HBsAg. In addition, these antibodies also reacted with the reduced HBsAg polypeptides in the immunoblotting reactions. It was suggested that these antibodies were directed against the comformational independent epitopes of HBsAg. Furthermore, the immunoreactivity patterns against HBsAg of these MAbs were resembled to those of human polyclonal anti-HBsAg antibodies, therefore, these MAbs could be used as the specific reagents instead of human polyclonal antibodies.

These MAbs were used to detect HBsAg from 10 samples of HBsAg positive human sera and 10 samples of normal human sera by dot-immunobinding assay. All MAbs showed the potential usefulness in the detection of HBsAg.

Thus, these MAbs can be used as the basis for the development of new methods for the screening and study of HBV.

Copyright by Mahidol University