LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

MONOCLONAL ANTIBODIES TO THIRD STAGE LARVA OF *GNATHOSTOMA SPINIGERUM*: ANTIBODY SPECIFICITIES AND ANTIGEN CHARACTERIZATION

CHATCHAI TAYAPIWATANA

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

Copyright by Mahidol University

ยกนันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย ม. มหิดล.

ชื่อวิทยานิพนธ์ ไมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อตัวอ่อนระยะที่สามของพยาธิตัวจี๊ด *(Gnathostoma spinigerum)*: แอนติบอดีที่ความจำเพาะ และการศึกษาคุณสมบัติของแอนติเจน

ผู้วิจัย ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา

บริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อารยา ชูสัตยานนท์ ปร.ด.

สถิตย์ สิริสิงห D.M.D., Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 24 มกราคม พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

ได้มีการผลิตไมโนโคลนอลแอนติบอดี (McAb) ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด *(Gnathostoma spinigerum)* (L_3G) โดยใช้เซลม้ามของหนูสายพันธุ์ BALB/c ที่ได้ถูกฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนมาก่อน มารวมตัวเข้าเป็นเซลเดียวกันกับเซลมะเร็งสายพันธุ์ X63-Ag8.653 และนำมาทดสอบคุณสมบัติโดยวิธี ELISA, immunoblot, radioimmunoprecipitation (RIP) และ immunofluorescence การรวมเซลในครั้งนี้ สามารถผลิตเซลลูกผสมได้จำนวน 41 กลุ่ม จากเซลแม่ 14 กลุ่ม การทดสอบความสามารถในการผลิตแอนติบอดีของเซลลูกผสมที่ได้จากเซลแม่แต่ละกลุ่มโดยวิธี ELISA ได้แสดงให้เห็นว่าเซลลูกผสมที่ได้จากเซลแม่ 11 กลุ่ม สามารถผลิตแอนติบอดีชนิด IgG1/k ที่มีความจำเพาะต่อทั้งแอนติเจนเนื้อเยื่อ (Som.L_3G) และแอนติเจนสิ่งคัดหลั่ง (ES.L_3G) ของพยาธิตัวจี๊ด โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแอนติเจนของ *Angiostrongylus cantonensis, Brugia pahangi, Opisthorchis viverrini, Clonorchis sinensis, Fasciola gigantica* เซลลูกผสมจากเซลแม่อีก 1 กลุ่มผลิตแอนติบอดีชนิด IgM/k ที่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแอนติเจนของพยาธิเท้าช้างในแมว *(Brugia pahangi)* ส่วนเซลลูกผสมจากเซลแม่อีก 2 กลุ่มผลิตแอนติ

© Copyright by Chulalongkorn University

บอดีชนิด IgM/k ที่ทำปฏิกริยากับ bovine serum albumin จึงคัดเลือกเฉพาะ McAb 21.3 และ 31.4 ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนของ L_3G มาทดสอบคุณสมบัติร่วมกับ McAb 1F2 ซึ่งทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม เมื่อใช้วิธี immunoblot พบว่า McAb 21.3 และ 31.4 ทำปฏิกิริยากับโปรตีนไมเลกุลเดียวกันของ Som.L_3G ที่มีขนาดตั้งแต่ 97 ถึง 34 kD และโปรตีนไมเลกุลเดียวกันของ ES.L_3G ที่มีขนาดตั้งแต่ 53 ถึง 21 kD antigenic epitope บนไมเลกุลของ Som.L_3G ที่ทำปฏิกิริยากับ McAb สองชนิดนี้ไม่ได้เป็นคาร์โบไฮเดรต ทั้งนี้จากการพิสูจน์โดยวิธี periodate oxidation เพื่อทำลายคาร์โบไฮเดรตที่อาจมีอยู่บนไมเลกุลของโปรตีนก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับ McAb แล้วพบว่ายังมีปฏิกิริยา immunoblot เกิดขึ้นเหมือนเดิม ส่วน McAb 1F2 ทำปฏิกิริยาต่อ ES.L_3G เท่านั้นที่โปรตีนขนาดตั้งแต่ 49 ถึง 38 kD

การทดสอบโดยวิธี RIP ได้แสดงให้เห็นว่า McAb 21.3 และ 31.4 ทำปฏิกริยากับไมเลกุล 38 kD ของ Som.L_3G และทำปฏิกิริยากับไมเลกุล 49, 45, 38, 33, 29, 16 และ 14 kD ของ ES.L_3G ส่วน McAb 1F2 ทำปฏิกิริยากับไมเลกุล 49 และ 45 kD ของ ES.L_3G แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ Som.L_3G เลย ได้มีการศึกษาต่อไปโดยวิธี immunofluorescence บน cryosection ของ L_3G เพื่อแสดงแหล่งที่มาของ antigenic epitope ที่ทำปฏิกริยากับ McAb ทั้งสามชนิด ก็สามารถแสดงให้เห็นว่า antigenic epitope ที่ทำปฏิกริยากับ McAb 21.3 อยู่ที่เซลล์ลำไส้ของ L_3G และของ McAb 31.4 อยู่ที่เซลล์ลำไส้ และผนังกล้ามเนื้อของ L_3G ส่วน McAb 1F2 ทำปฏิกิริยากับ basal lamina ของ L_3G เมื่อทดลองให้ McAb ทั้งสามชนิดนี้ทำปฏิกิริยา immunofluorescence กับ L_3G ที่ยังมีชีวิตอยู่ ก็พบว่าไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ผิวนอกของ cuticle เลย

ได้มีการวิเคราะห์และวิจารณ์เกี่ยวกับผลการทดลองทั้งหมด รวมทั้งได้มีการทดลองนำ McAb 31.4 มาใช้ตรวจหา ES.L_3G ในน้ำไขสันหลังผู้ป่วยที่มีอาการทางสมอง 20 ราย โดยวิธี biotin-streptavidin ELISA ซึ่งมีความไว 125 ng/ml การทดลองนี้สามารถตรวจพบแอนติเจนดังกล่าวในน้ำไขสันหลังผู้ป่วยหนึ่งราย ซึ่งเป็นรายที่มีระดับแอนติบอดีอิสระต่ำในตัวอย่างน้ำไขสันหลังเดียวกันนั้น

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Monoclonal Antibodies to Third Stage Larva of *Gnathostoma spinigerum*: Antibody Specificities and Antigen Characterization

Name Chatchai Tayapiwatana

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Araya Chusatayanond Ph.D.

Stitaya Sirisinha D.M.D.,Ph.D.

Date of Graduation 24 January B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (McAbs) to third stage larva of *Gnathostoma spingerum* (L_3G) were produced by fusing BALB/c immune spleen cells with myeloma cells strain x63.Ag8.653. The characteristics of these clones were tested by using ELISA, immunoblot, radioimmunoprecipitation (RIP), and immunofluorescence technique. Forty-one clones of hybrid cells were obtained from 14 mother clones in this fusion. These clones secreted antibodies reacting with somatic antigen of L_3G (Som.L_3G) when tested by ELISA. A sample of one clone developed from each mother clone was tested for its antibody specificity by ELISA against antigen of L_3G, *Angiostrongylus cantonensis*, *Brugia pahangi*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis*

Copyright by Mahidol University

sinensis, Fasciola gigantica. Eleven McAbs gave IgG1/k isotype antibodies specific to both Som.L_3G and excretory/secretory antigens of L_3G (ES.L_3G). There was only one clone that secreted IgM/k antibody cross-reacted with antigen of *B. pahangi*, lymphatic filarial worm of cat, two other clones secreted IgM/k antibodies reacted with bovine serum albumin.

McAbs 21.3 and 31.4, the L_3G specific antibodies were selected for further characterization along with the cross-reactive one, McAb 1F2. By immunoblot technique, McAbs 21.3 and 31.4 were found to react with the same group of protein molecules of Som.L_3G having MW ranging from 97-34 kD and 53-21 kD in ES.L_3G, while McAb 1F2 only reacted with ES.L_3G at MW ranging from 49-38 kD. The antigenic epitopes represented on protein molecules of Som.L_3G recognized by McAbs 21.3 and 31.4 were found to be non-carbohydrate in nature, when tested by periodate oxidation combining with immunoblot technique.

When RIP technique was used, McAbs 21.3 and 31.4 were found to react with antigenic epitopes on 38 kD protein molecule of Som.L_3G and antigenic epitopes on 49, 45, 38, 33, 29, 16, and 14 kD protein molecules of ES.L_3G. The McAb 1F2, on the other hand was found to react with epitopes on 49 and 45 kD protein molecules of ES.L_3G, but did not react with Som.L_3G.

Copyright by Mahidol University

These three McAbs were used to localize the tissue possesed the specific antigenic epitopes on cryosections

of L_3G by immunofluorescence technique. It was demonstrated that McAb 21.3 reacted with epitopes on intestinal cells, while McAb 31.4 reacted with epitopes on both the intestinal cells and muscle walls. McAb 1F2 on the other hand was found to react with basal lamina component. However, when the test was done with living L_3G, it was clearly shown that these McAbs did not react with the cuticular surface of the parasite.

The results of the present study were discussed and tried to apply by using McAb 31.4 to detect for ES.L_3G in cerebrospinal fluid (CSF) of twenty patients suffering from cerebral disturbance using biotin-streptavidin ELISA which has the sensitivity at 125 ng/ml. The ES.L_3G could be detected in only one patient's CSF which had low free form antibody level against ES.L_3G in CSF.

Copyright by Mahidol University