

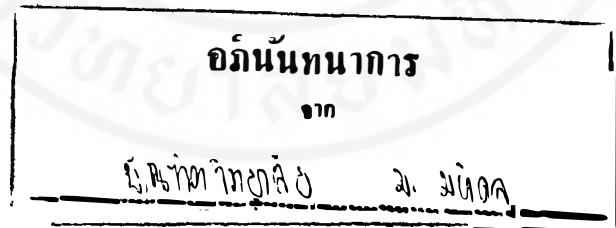


28 MAR 1990

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES
AGAINST POTENTIALLY DIAGNOSTIC ANTIGENS FROM
THE LIVER FLUKE (OPISTHORCHIS VIVERRINI)

NUNTANA UTSAKHIT

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



IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University
1989

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและการศึกษาคุณสมบัติของ Monoclonal
antibodies ต่อ Antigen ที่มีความสำคัญของพยาธิ
ใบไม้ในตับ (Opisthorchis viverrini)

ผู้วิจัย นันทนา อุตสาหกรรมกิจ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ปีเตอร์ บี บิลลิงส์, Ph.D.

สถิตย์ สิริสิงห, D.M.D., Ph.D.

สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, M.D.

วิฑูรย์ ไวยนันท์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 26 พฤษภาคม พ.ศ. 2532

บทคัดย่อ

โมโนคลอนอล แอนติบอดี ถูกผลิตขึ้นโดยมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่เตรียม ได้จากพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchis viverrini) ของคนไข้ หนูถูกฉีดด้วยแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มี crude somatic extract ซึ่งละลายด้วย DMSO เป็นผลให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีขึ้น ถึงแม้จะใช้แอนติเจนปริมาณเพียงเล็กน้อยเซลล์ hybridomas เหล่านี้ถูกเลือกโดยวิธี ELISA เมื่อวิเคราะห์ด้วย immunoprecipitation พบว่า 5 clones ที่ผลิตโมโนคลอนอล แอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อ โปรตีน 89-90 กิโลดาลตันของ somatic antigen extracts ที่ถูกคิดจลาจไว้ด้วยไอโอดีน และอีก 6 clones มีความจำเพาะต่อโปรตีน 16 กิโลดาลตันซึ่งมักจะอยู่คู่กับโปรตีน 17 กิโลดาลตัน

เซลล์ hybridomas อีก 8 clones ได้จากหนูที่ฉีดด้วยแผ่นไนโตรเซลลูโลส ที่มีโปรตีน 80-95 กิโลดาลตันของ total somatic extracts ที่ถูกส่งผ่านมาบนไนโตรเซลลูโลส โดย western blot แอนติบอดีที่สร้างจาก 1 ใน 8 clones นี้ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน 89-90 กิโลดาลตัน โดยวิธี immunoprecipitation อย่างไรก็ตาม อีก 3

clones แสดงปฏิกิริยาบน Western blot บนโปรตีนบริเวณเดียวกัน จากการศึกษาโดยวิธี immunofluorescence พบว่า เซลล์ Hybridoma ที่สร้างแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อโปรตีน 16 กิโลดาลตันนี้ จำแนกแอนติเจนที่อยู่บนผิวนอกของ tegument ส่วนโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะ ต่อ 89-90 kD แสดงปฏิกิริยากับแอนติเจน ส่วนกล้ามเนื้อของพยาธิรวมทั้ง oral sucker, ventral sucker, pharynx และ caeca อีกทั้งย้อมติด organelle บางอย่างที่กระจายอยู่ทั่วไปในตัวพยาธิซึ่งอาจจะเป็นส่วนหนึ่งของกล้ามเนื้อก็ได้ จากการศึกษาทางด้าน immunofluorescence พบว่าโปรตีน 90 กิโลดาลตันของ somatic antigen extracts แตกต่างจาก โปรตีน 89 กิโลดาลตันของ excretory/secretory antigen ที่ปล่อยออกมาจากพยาธิโดยสิ้นเชิง

Epitope ของโปรตีน 16 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ tegument นั้น cross react กับโปรตีนในพยาธิตัวอื่นๆ ด้วย อย่างไรก็ตาม มี clone ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงโดยไม่ได้ cross-react เลย แม้กระทั่งบาราลิตที่ใกล้เคียงกันมากดังเช่น clonorchis

โมโนโคลนอล แอนติบอดี โดยเฉพาะพวกที่จำเพาะต่อส่วน tegument นั้น สามารถนำมาใช้เพื่อหา antigen หรือโปรตีนที่อยู่ในของเหลวเช่น น้ำเหลือง หรือปัสสาวะ ในการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับให้ได้เหมาะสม และดียิ่งขึ้น

Thesis Title Production and Characterization of mono-
clonal antibodies against potentially
diagnostic antigens from the liver fluke
(Opisthorchis viverrini)

Name Nuntana Utsakhit

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee:

Peter B. Billings, Ph.D. Major Advisor

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

Suttipant Sarasombath, M.D.

Vithoon Viyanant, Ph.D.

Date of Graduation: 26 May B.E.2532 (1989)

ABSTRACT

Monoclonal antibodies were produced against soluble antigens of the human liver fluke Opisthorchis viverrini. The mice were immunized with total crude somatic extract spotted onto nitrocellulose and solubilized with DMSO to increase the immunogenicity and conserve antigen. Good responses to low-doses were obtained and a number of monoclonals reactive with somatic antigen(s) were selected by ELISA. Five monoclonals immunoprecipitated an antigen of M_r 89-90 kd from iodinated somatic extracts and another 6 reacted with the lower MW member of the extremely abundant 16/17 kd doublet of tegumental proteins. Mice immunized with nitrocellulose cut from the 80-95 kd region of an SDS-gel Western blot of total somatic antigen, gave an additional 8 monoclonals. Only one immunoprecipitated the same

89-90 kd protein, however, another 3 reacted against it on Western blot. By indirect immunofluorescence on thin sections of frozen worms, all monoclonals reactive with the 16 kd polypeptide identified the membrane surface of the tegument. The 89-90 kd antigen localized to the various muscles of the worm, most strikingly to the circular and longitudinal layer, but also the oral and ventral suckers, pharynx and a thin layer surrounding caeca. They also identified some small, often paired, homogeneously-staining structures widely distributed throughout the body, probably also muscle-associated. This 90 kd somatic antigen is confined exclusively to the somatic extract and appears to be distinct from a specific-species 89 kd exo-antigen identified previously in both somatic extracts and in the metabolic products or excretory-secretory fraction released from living cells. The epitopes recognized on the 16 kd tegumental protein appears to be similar in a number of related flukes, however, one anti-tegument monoclonal antibody exhibited no crossreaction even with a extract from the very close relative Clonoschis. All monoclonals reactive with the muscle-associated 90 kd somatic antigen show moderate to strong reaction with the homologous Clonorchis antigen. These monoclonals, particularly the specific anti-tegumental antibodies can be used to look for the corresponding antigens or their peptides in various possible antigen sources such as serum, urine, in the hope of developing a more practical and suitable diagnostic test for opisthorchiasis.