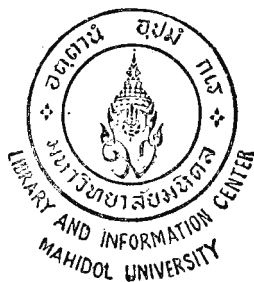


28 JUN 2001



**DEVELOPMENT OF A GREEN FLUORESCENT REDUCTION-
BASED HIV-1 NEUTRALIZATION ASSAY**

VERAPONG PAUNGCHAROEN

อธิปัทนการ

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2001

ISBN 974-665-508-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
VA95d
2001
C.2

Copyright by Mahidol University

4136455 SIMI/M : MAJOR: MICROBIOLOGY; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : HIV-1 NEUTRALIZING ANTIBODY / GREEN
FLUORESCENT PROTEIN / NEUTRALIZATION ASSAY
VERAPONG PAUNGCHAROEN: DEVELOPMENT OF A GREEN
FLUORESCENT REDUCTION-BASED HIV-1 NEUTRALIZATION ASSAY.
THESIS ADVISORS: PRASERT AUEWARAKUL, M.D., Dr. Med, KOVIT
PATTANAPANYASAT, Ph.D., SUDA LOUISIRIROTCHANAKUL, Ph.D.,
PILAIKAN PUTHAVATHANA, Ph. D. 85 P. ISBN 974-665-508-6

Detection of neutralizing antibodies plays a vital role in analysis of immune response to HIV-1. Neutralizing antibodies detection is also used for validation of HIV-1 vaccine. End point dilution assay and infectivity reduction assay (IRA) using p24 as endpoint are being widely used as the standard methods for detection of neutralizing antibodies to HIV-1. However, these methods are time consuming, and laborious. In addition, several washing steps may lead to error due to incomplete removal of input virus and anti-p24 in serum or cell loss during the washing. This study attempted to develop a novel method for detection of neutralizing antibodies. The novel assay was designed to be cheaper, less time consuming and devoid of the multiple washing steps. In this assay, reporter viruses generated from chimeric infectious molecular clones of HIV-1 were used. The infectious HIV-1 clone was constructed by replacing *nef* gene with GFP and swapping an *env* gene from various HIV-1 primary isolates. Infectious clones were transfected into MT-2 cells to produce an infectious reporter virus, which induces infected cells to emit green fluorescent light detectable under a fluorescent microscope or a flow cytometer.

Detection of neutralizing antibodies could be done by adding the incubated serum-virus mixture to the PHA-activated CD8 depleted PBMC. After 3 days post infection, the reduction in number of fluorescent cells was determined by flow cytometry and the number of fluorescent cells was calculated compared to the cell control.

This new assay was evaluated against a standard infectivity reduction assay. Two GFP chimeric viruses were used to compare with 2 parental primary isolates in 20 HIV-1 seropositive samples. Out of 24 virus/serum pairs from 2 GFP chimeric viruses, 21 showed concordant results.

In addition, the feasibility of using the GFP chimeric viruses for testing anti-HIV-1 agents was demonstrated by using azidothymidine (AZT) as a model.

4136455 SIMI/M : สาขาวิชาจุลชีววิทยา ; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

วิระพงษ์ พ่วงเจริญ : การตรวจหา Neutralizing antibodies โดยใช้ green fluorescent protein เป็นตัวบ่งชี้ (DEVELOPMENT OF A GREEN FLUORESCENT REDUCTION-BASED HIV-1 NEUTRALIZATION ASSAY). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประเสริฐ เอื้อวรากุล, M.D., Dr. Med., โกวิท พัฒนาปัญญาสัจย์, Ph. D., สุดา ลุยศิริโรจนกุล, Ph. D., พิไลพันธ์ พุชวิฒนะ, Ph. D. 85 หน้า. ISBN 947-665-508-6

การตรวจหา Neutralizing antibodies เป็นการตรวจที่มีความสำคัญในการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายและยังมีประโยชน์ในการประเมินผลการทดสอบวัคซีนต่อเชื้อ HIV-1 ในปัจจุบันการตรวจหา Neutralizing antibodies ที่เป็นมาตรฐานที่ทำกันอย่างแพร่หลายนั้นใช้การตรวจหา p24 antigen เป็นตัววัด โดยทำใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) และมี 2 วิธีหลัก ได้แก่ วิธี endpoint dilution assay และ วิธี infectivity reduction assay (IRA) แต่เนื่องจากวิธีมาตรฐานทั้งสองวิธีนั้นต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบค่าใช้จ่ายสูง มีขั้นตอนในการทดสอบที่ยุ่งยาก มีขั้นตอนการล้างเซลล์หลายครั้ง ซึ่งอาจก่อให้เกิดความผิดพลาดจากการล้าง input virus หรือ p24 antibody ในซีรัมออกไม่หมด หรือสูญเสียเซลล์ไปจากการล้าง

ในการทดลองนี้จึงได้ทำการพัฒนาการตรวจหา Neutralizing antibodies ขึ้นซึ่งเป็นวิธีที่ไม่มีความยุ่งยาก รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบสั้นกว่าวิธีมาตรฐาน การตรวจหา Neutralizing antibodies ด้วยวิธีใหม่นี้จะใช้ Infectious molecular clone ของเชื้อ HIV-1 ซึ่งส่วนของยีน *nef* ถูกแทนที่ด้วยยีน *gfp* และมียีน *env* จาก primary isolates ต่างๆ ใช้ chimeric molecular clones ดังกล่าวในการสร้างไวรัสที่มี *gfp* gene อยู่ในอนุภาคโดยการ transfection เข้าสู่เซลล์ซึ่งไวรัสที่ถูกสร้างขึ้นมานี้ เมื่อนำไปติดเชื้อในเซลล์จะทำให้เกิดการเรืองแสงสีเขียวขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และสามารถทำการตรวจสอบการเรืองแสงได้ด้วยกล้อง fluorescence microscope และ เครื่อง flow cytometer

วิธีการตรวจหา Neutralizing antibodies วิธีใหม่นี้สามารถทำได้โดย เดิมส่วนผสมระหว่างไวรัสกับซีรัมจากผู้ติดเชื้อ HIV ที่เจือจางแล้วใส่ลงใน PHA-activated CD8 depleted PBMC หลังจากนั้น 3 วันจึงนำเซลล์ที่ติดเชื้อ ไปวัดความสว่างด้วยเครื่อง flow cytometry แล้วนำจำนวนเซลล์ที่สว่างมาเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ใช้ซีรัมคนปกติเพื่อ คำนวณหา %neutralization

การประเมินวิธีการตรวจหา neutralizing antibody ด้วยวิธีใหม่นี้ทำโดยเปรียบเทียบกับวิธี infectivity reduction assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ในการทดลองนี้ได้ ใช้ GFP chimeric virus 2 สายพันธุ์ในซีรัม 20 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับ primary isolates 2 สายพันธุ์ ซึ่งมีส่วน *env* gene ตรงกัน โดยใช้คู่ไวรัส-ซีรัมทั้งสองสายพันธุ์ จำนวน 24 คู่ จากการทดลองพบว่า คู่ไวรัส-ซีรัม จำนวน 21 คู่ ให้ผลตรงกัน

นอกจากนี้ไวรัส ดังกล่าวยังสามารถใช้ในการตรวจกรองสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 โดยในการทดลองนี้ได้ใช้ยา azidothymidine (AZT) เป็นตัวอย่างในการศึกษา