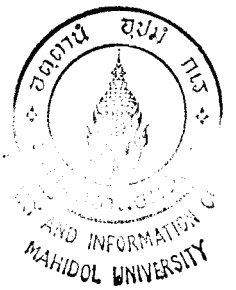
- 5 AUG 2001



PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT FATTY ACID BINDING PROTEIN OF FASCIOLA GIGANTICA

ANUCHITTADA SIRISRIRO

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 974-665-969-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
A 636 p
2001
C. 2

Copyright by Mahidol University

4136996 SCMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc. (MICROBIOLGY)
KEY WORDS : FASCIOLA GIGANTICA / FATTY ACID BINDING PROTEIN / MONOCLONAL ANTIBODY

ANUCHITTADA SIRISRIRO : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT FATTY ACID BINDING PROTEIN OF FASCIOLA GIGANTICA. THESIS ADVISORS : PEERAPAN TANARIYA, Ph.D., VITHOON VIYANANT, Ph.D., PRASERT SOBHON, Ph.D., SUKSIRI VICHASRI GRAMS, Dr.rer.nat. 104 p. ISBN 974-665-969-3

Fatty acid binding proteins (FABP) are transporter proteins that facilitate the uptake of fatty acids by *Fasciola* parasites from their hosts. Attempts have been made to utilize both native and recombinant FABP (rFABP) for immunodiagnosis and vaccine development for fasciolosis. This study was intended to produce and characterize monoclonal antibodies against recombinant fatty acid binding protein of *Fasciola gigantica.*

In the production of monoclonal antibodies, the antibody titer was initially screened against rFABP by indirect ELISA and then tested for their antibody specificity by EITB. The cross reactivities of monoclonal antibodies were studied against antigens, in crude worm extracts from *Schistosoma mansoni*, *Eurytrema* spp. and *Paramphistomum* spp.. Moreover, the distribution of native FABP in adult worm tissue was localized by immunofluorescence and immunoperoxidase technics.

A number of monoclonal antibodies were successfully produced. Five stable clones, namely 3D4-12, 3D8-1, 3D8-8, 5C5-1 and 6F3-2, were selected and characterized further. Four of them, 3D4-12, 3D8-1, 3D8-8, and 5C5-1, were of the isotype IgG_1 while 6F3-2 was IgG_{2a}. All monoclonal antibodies reacted with rFABP which had a molecular weight of 22.5 kD and with the *Fasciola gigantica* native FABP at molecular weight of 14-14.5 kD found in the tegumental and crude worm extracts. All five monoclonal antibodies reacted with a 14.8 kD antigen of *Schistosoma mansoni*, but no cross reactivities were detected with antigens from *Eurytrema* spp. and *Paramphistomum* spp.. Immunolocalization of frozen sections of adult parasites using monoclonal antibodies as probes demonstrated that *Fasciola gigantica* FABP was detected in various tissues. This was mainly found in parenchyma tissue, the tegument and to some extent in other tissues.

Copyright by Mahidol University

4136996 SCMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา ; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

อนุชิตดา ศิริศรีโร : การผลิตและวิเคราะห์คุณสมบัติของแอนติบอดีจำเพาะต่อ RECOMBINANT FATTY ACID BINDING PROTEIN ของพยาธิใบไม้ในตับโค ชนิด FASCIOLA GIGANTICA (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT FATTY ACID BINDING PROTEIN OF FASCIOLA GIGANTICA) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พีรพรรณ ตันอารีย์, Ph.D., วิฑูรย์ ไวยนันท์ , Ph.D., ประเสริฐ โสภณ, Ph.D., สุขศิริ วิชาศรีกรามส์, Dr.rer.nat. 104 หน้า. ISBN 974-665-969-3

Fatty acid binding protein (FABP) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่สำคัญในการขนส่งกรดไขมันจากโฮสต์เข้าสู่ตัวพยาธิใบไม้ในตับ ด้วยความสำคัญนี้เองทำให้มีการคิดค้นนำโปรตีนชนิดนี้ทั้งที่สกัดจากตัวพยาธิและสังเคราะห์จากการฝากถ่ายยีนในแบคทีเรีย (Recombinant fatty acid binding protein, rFABP) ไปใช้ในการวินิจฉัยโรคและการผลิตวัคซีนป้องกันโรค การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตและวิเคราะห์คุณสมบัติโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ rFABP ของ *F. gigantica*

ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้ใช้วิธี indirect ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ทดสอบแอนติบอดีไตเตอร์และวิธี EITB (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot) ทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดี และนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปศึกษาปฏิกิริยาข้ามชนิดกับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิใบไม้ชนิดอื่น ได้แก่ *Schistosoma mansoni*, *Eurytrema* spp. และ *Paramphistomum* spp. และศึกษาตำแหน่งของ FABP ในเนื้อเยื่อพยาธิด้วยวิธี Immunofluorescence และ Immunoperoxidase

จากจำนวนโมโนโคลนอลแอนติบดีที่ผลิตได้จำนวนหนึ่ง ได้นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 5 clones คือ 3D4-12, 3D8-1, 3D8-8, 5C5-1 และ 6F3-2 พบว่า 4 clones คือ 3D4-12, 3D8-1, 3D8-8 และ 5C5-1 เป็น IgG_1 และอีกหนึ่ง clones คือ 6F3-2 เป็น IgG_{2a} โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาศึกษาทำปฏิกิริยากับ rFABP ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 22.5 kD และทำปฏิกิริยากับ FABP ของพยาธิที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 14-14.5 kD ซึ่งพบอยู่ในแอนติเจนที่สกัดจากส่วนผิวและที่สกัดจากพยาธิทั้งตัว จากการศึกษาปฏิกิริยาข้ามชนิด พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 clones ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของ *S. mansoni* ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 14.8 kD แต่ไม่พบปฏิกิริยาเกิดขึ้นกับแอนติเจนที่สกัดจาก *Eurytrema* spp. และ *Paramphistomun* spp. การหาตำแหน่งแอนติเจนในพยาธิตัวเต็มวัยโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดพบว่า *F. gigantica* FABP ปรากฏอยู่ในเนื้อเยื่อหลายชนิด แต่พบมากในเนื้อเยื่อ parenchyma, ส่วนผิวของพยาธิ และพบได้ในเนื้อเยื่อชนิดอื่นอีกด้วย

Copyright by Mahidol University