-5 FEB 2002

ARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT GLUTATHIONE S-TRANSFERASE OF *FASCIOLA GIGANTICA*

NANTAWAN SOONKLANG

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (ANATOMY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2001

ISBN 974-04-1047-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
N191pr
2001
c.2

Copyright by Mahidol University

4237914 SCAN/M : MAJOR : ANATOMY ; M.Sc. (ANATOMY)
KEY WORDS : FASCIOLA GIGANTICA / MONOCLONAL ANTIBODY / rGST / CHARACTERIZATION / LOCALIZATION

NANTAWAN SOONKLANG : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT GLUTATHIONE S-TRANSFERASE OF FASCIOLA GIGANTICA. THESIS ADVISORS: CHAITIP WANICHANON, Ph.D., PRASERT SOBHON, Ph.D., VITHOON VIYANANT, Ph.D., SUKSIRI VICHASRI GRAMS, Dr.rer.nat., HANS RUDI GRAMS, Dr.rer.nat. 95 p. ISBN 974-04-1047-2

The objectives of this study were to produce and characterize monoclonal antibodies (MoAbs) against recombinant glutathione S-transferase (rGST) of *F. gigantica*. Likewise to localize GST in various tissues at adult, juvenile and metacercarial stages of the parasite by using MoAb as probes.

MoAbs against rGST could be produced in BALB/c mice by immunized them with rGST antigen. Reactivity and specificity of this monoclonal antibody was assessed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB). Six stable clones, namely 3A3, 3B2, 3C6, 4A6, 4B1 and 4D6, were selected. All MoAbs reacted with rGST at a molecular weight of 28 kD and found to be IgG_1, κ-light chain isotype. These MoAbs cross-reacted with antigens of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* at molecular weight of 28 and 26 kD respectively, but no cross-reactions were detected with antigens of *Eurytrema* spp. and *Paramphistomum* spp.

The localization of MoAbs against GST at each developmental stage of *F. gigantica* (metacercariae, 35-day-old juvenile and adult) was performed by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques, using MoAbs against rGST of *F. gigantica* as probes. In general, these MoAbs gave similar results. The MoAbs exhibited strong binding properties, which tend to imply the presence of GST, to parenchymal tissue at all stages of the parasite. In addition, the staining in the adult stage is moderate in the basal layer of the tegument, and in cells of the vitelline gland, while light staining was observed in the caecal epithelium of all stages and the cells in the ovary of the adult. In metacercariae stage, the tegument cells were stained relatively more intense with MoAbs than in other stages.

The research results suggest that GST is synthesized and released at all stages of *F. gigantica*. This study also indicates that due to its limited cross-reactions, which are confined to fasciola and schistosomes, GST is a prime candidate for immunodiagnosis and vaccine development.

Copyright by Mahidol University

4237914 SCAN/M : สาขาวิชา : กายวิภาคศาสตร์ ; วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์)

นันทวรรณ ศูนย์กลาง : การผลิตและศึกษาคุณลักษณะการกระจายของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต้านต่อกลูตาไธโอนเอสทรานส์เฟอเรส (rGST) ของพยาธิใบไม้ในตับ FASCIOLA GIGANTICA (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT GLUTATHIONE S-TRANSFERASE OF FASCIOLA GIGANTICA) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชัยทิพย์ วนิชานนท์, Ph.D., ประเสริฐ โศภน, Ph.D., วิฑูรย์ ไวยนันท์, Ph.D., สุขศิริ วิชาศรี กรามส์, Dr.rer.nat., ฮานส์ รูดี้ กรามส์, Dr.rer.nat. 95 หน้า. ISBN 974-04-1047-2

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตและวิเคราะห์คุณสมบัติโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ rGST (MoAb) ของพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* และแสดงการกระจายของ GST ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย ตัวอ่อนและเมตาเซอร์คาเรีย โดยการย้อมด้วย MoAb

ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ rGST โดยฉีด rGST แอนติเจนในหนู BALB/c ทดสอบระดับแอนติบอดีโดยใช้วิธี indirect ELISA และทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีโดยใช้วิธี EITB โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มี 6 clones คือ 3A3, 3B2, 3C6, 4A6, 4B1 และ 4D6 พบว่าทั้งหมดทำปฏิกิริยากับ rGST ที่น้ำหนักโมเลกุล 28 kD และเป็นแอนติบอดีชนิด IgG_1, K-light chain เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปทดสอบปฏิกิริยาข้ามชนิดกับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิใบไม้ชนิดอื่น พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 clones ทำปฏิกิริยาข้ามชนิดกับแอนติเจนของ *S. mansoni*, *S. japonicum* ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 28 และ 26 kD ตามลำดับ แต่ไม่พบปฏิกิริยาข้ามชนิดกับแอนติเจนที่สกัดจาก *Eurytrema* spp. และ *Paramphistomum* spp.

การหาตำแหน่งการกระจายของ GST ในพยาธิระยะต่างๆ (เมตาเซอร์คาเรีย ตัวอ่อนอายุ 35 วัน และตัวเต็มวัย) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีย้อมด้วยวิธี immunofluorescence และ immunoperoxidase ปรากฏว่ามีการกระจายของ GST ในระยะต่างๆ คล้ายกัน กล่าวคือพบการเกาะของแอนติบอดีซึ่งแสดงปริมาณของ GST มากในเนื้อเยื่อ parenchyma ของพยาธิทุกระยะ นอกจากนี้ในระยะตัวเต็มวัยพบว่ามีปริมาณ GST ปานกลางที่บริเวณชั้นฐานของผิวและในเซลล์ของต่อม Vitelline ขณะที่พบว่า GST มีปริมาณเพียงเล็กน้อยบริเวณทางเดินอาหารของทุกระยะและเซลล์ในรังไข่ของระยะตัวเต็มวัย ส่วนระยะเมตาเซอร์คาเรียพบว่าเซลล์ชั้นผิวมีปริมาณ GST มากกว่าในระยะอื่น การพบว่าแอนติเจนชนิดนี้มีทุกระยะของพยาธิและมีปฏิกิริยาข้ามชนิดค่อนข้างจำเพาะกับพยาธิในตระกูล Fasciola และ Schistosoma ทำให้มันเป็นแอนติเจนที่มีศักยภาพที่อาจจะนำไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อแบบ immunodiagnosis.และพัฒนาเป็นวัคซีน

Copyright by Mahidol University