LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

DEFINITION OF PROTECTIVE ANTIGENS OF *VIBRIO CHOLERAE* EL TOR, OGAWA USING RELEVANT MONOCLONAL ANTIBODIES

SIRIPORN KOWABOOT

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PUBLIC HEALTH)
MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003

TH
S619d
2003
c.2

ISBN 974-04-3034-1
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY
Copyright by Mahidol University

DEFINITION OF PROTECTIVE ANTIGENS OF *VIBRIO CHOLERAE* EL TOR, OGAWA USING RELEVANT MONOCLONAL ANTIBODIES

SIRIPORN KOWABOOT 4336242PHPH/M

M.Sc. (PUBLIC HEALTH) MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES

THESIS ADVISORS:CHAKRIT HIRUNPETCHARAT, Ph.D.(TROPICAL HEALTH), ORASA SUTHIENKUL, Ph.D.(MEDICAL SCIENCE).

ABSTRACT

The present study has identified protective target antigens for induction of *V. cholerae*-specific antibodies. For that purpose, hybrid cell lines producing monoclonal antibodies (MAb) against live *V. cholerae* O1, El Tor, Ogawa strain AQ1034 were established, namely 3G2, 3G3, and 3B1. The immunoglobulin (Ig) isotype of MAb secreted from clones 3G2 and 3G3 were of IgG2a, whereas 3B1 clone secreted IgG1 antibody. Antigenic specificity of the MAb produced by the subclones 3B1/1F6 and 3G2/1D5 were determined by Western blot analysis against the whole cell lysates of *V. cholerae*. The 3B1/1F6 MAb reacted to proteins at molecular weights of 70, 55, 41, 36, 31 and 22 kDa while the 3G2/1D5 MAb reacted to a low molecular weight of (12.6 kDa) protein. By *in vitro* complement-mediated bactericidal assay, the 3G2/1D5 MAb showed *V. cholerae* killing activity at 2 to 3 log reduction whereas the 3B1/1F6 MAb could kill the bacteria at one log reduction. The 3G2/1D5 MAb also showed opsonophagocytosis with the highest activity at 1:125 antibody titers.

These antibodies would be useful for further purification of *V. cholerae* target antigens and testing for protection *in vivo* for further vibrio vaccine development.

KEY WORDS : VIBRIO CHOLERAE / MONOCLONAL ANTIBODY
115 P. ISBN 974-04-3034-1

Copyright by Mahidol University

การหาแอนติเจนของเชื้อ *Vibrio cholerae* El Tor, Ogawa โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (DEFINITION OF PROTECTIVE ANTIGENS OF *VIBRIO CHOLERAE* EL TOR, OGAWA USING RELEVANT MONOCLONAL ANTIBODIES)

ศิริพร โควบุตร 4336242 PHPH/M

วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์) สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อ

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จักร์กริช หิรัญเพชรรัตน์ Ph.D. (Tropical Health) , อรษา สุตเธียรกุล Ph.D. (Medical Science)

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการจำแนกแอนติเจนจำเพาะที่ชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *Vibrio cholerae* ไฮบริดโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ *V. cholerae* ไบโอทัยป์ El Tor ซีโรทัยป์ Ogawa สายพันธุ์ AQ1034 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้คือ 3G2, 3G3, และ 3B1 แอนติบอดีของไฮบริดโคลน3G2 และ 3G3 เป็นชนิด IgG2a ขณะที่โคลน 3B1 สร้างแอนติบอดีชนิด IgG1 เมื่อตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากโคลนย่อย 3B1/1F6 และ 3G2/1D5 ด้วยวิธี Western Blot ต่อเชื้อ *V. cholerae* ที่ทำให้เซลล์แตกแล้ว (Whole cell lysates) พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 3B1/1F6 ปฏิกิริยากับโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 70, 55, 41, 36, 31 และ 22 กิโลดอลตัน ขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 3G2/1D5 ปฏิกิริยากับโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำประมาณ 12.6 กิโลดอลตัน เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการทำลายเชื้อโดยอาศัยคอมพลีเมนต์ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 3G2/1D5 สามารถทำลายเชื้อ *V. cholerae* ให้มีปริมาณลงลง 2 ถึง 3 log ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 3B1/1F6 ทำลายเชื้อให้ลงลง 1 log นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 3G2/1D5 ให้ผล opsonophagocytosis สูงสุดที่ระดับของแอนติบอดีไตเตอร์ 1:125

แอนติบอดีเหล่านี้จะนำไปใช้ประโยชน์ในการเตรียมแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ *V. cholerae* และทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติเชื้อในสัตว์ทดลองต่อไปเพื่อการพัฒนาวัคซีนในอนาคต

115 หน้า ISBN 974-04-3034-1

Copyright by Mahidol University