Thesis Title	Production of Monoclonal Antibody to Antigens of Advanced Third-Stage Larva of *Gnathostoma spinigerum* with Emphasis on Surface Proteins
Author	Miss Anchalee Dantrakool
M.Sc.	Parasitology

Examining Committee:

Assistant Prof. Pichart Uparanukraw, M.D., Ph.D.	Chairman
Associate Prof. Nimit Morakote, Ph.D.	Member
Associate Prof. Watchara Kasinrerk, Ph.D.	Member

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Abstract

Fusion experiments to produce monoclonal antibodies (mAbs) to surface proteins of the advanced third-stage larva (aL3) of *Gnathostoma spinigerum* were attempted in this study. It was demonstrated that the sera from Balb/c mice infected with live aL3, but not those immunized with crude larval extracts, immunoprecipitated a 25-kDa surface protein from the extract of ^{125}I-labeled aL3. Hybridomas derived from spleen cells of an infected mouse secreted antibodies that reacted with several tissues of aL3 including the esophagus, intestine, muscle and cuticle by immunofluorescence assay (IFA). Twelve of 17 hybridomas showed fluorescent staining with the cuticle only. None of these cuticle-positive hybridoma

lines produced antibodies that recognized surface-iodinated protein of aL3 by immunoprecipitation. After two rounds of limiting dilution, mAbs derived from one of the hybridoma lines still strongly reacted with the cuticle by IFA. However, these mAbs did not react with any protein in the extract of aL3 metabolically labeled with [^{35}S]methionine. In the Western blot analysis, the mAbs recognized proteins of molecular weights ranging from 55-96 kDa with prominent bands at 75 and 85 kDa. Four more fusion experiments resulted in several hybridomas producing antibodies that reacted with the 25-kDa surface protein by immunoprecipitation. These hybridomas later became unstable and discontinued secreting the specific antibodies.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนโดยเน้นโปรตีนบนผิวของตัวอ่อนระยะที่สามขั้นปลายของพยาธิตัวจี๊ด
ชื่อผู้เขียน	นางสาวอัญชลี ด่านตระกูล
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาปรสิตวิทยา

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์:	ผศ. ดร. นพ. พิชาติ อุปรานุเคราะห์	ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. นิมิตร มรกต	กรรมการ
	รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	กรรมการ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนบนผิวของตัวอ่อนระยะที่สามของพยาธิตัวจี๊ด พบว่าในการทำ immunoprecipitation ซีรั่มของหนู Balb/c ที่ติดเชื้อโดยการป้อนตัวอ่อนของพยาธิที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลขนาด 25 kDa ของโปรตีนบนผิวตัวอ่อนของพยาธิที่ถูกติดฉลากด้วย ^{125}I ส่วนซีรั่มจากหนูที่ได้รับการสร้างภูมิคุ้มกัน (immunization) โดยการฉีด crude larval extracts ไม่พบว่าทำปฏิกิริยา จากการทำ fusion โดยใช้เซลล์ม้ามของหนูที่ติดเชื้อโดยการป้อนตัวอ่อนของพยาธิที่มีชีวิตอยู่ ได้เซลล์ลูกผสมซึ่งผลิตแอนติบอดีต่อส่วนต่าง ๆ ของตัวอ่อนพยาธิ ได้แก่ หลอดอาหาร, ลำไส้, กล้ามเนื้อ และส่วนของ cuticle โดย

วิธี immunofluorescence (IFA) ในจำนวนเซลล์ลูกผสม 17 กลุ่ม มีอยู่ 12 กลุ่มที่สร้างแอนติบอดีต่อ cuticle เท่านั้น แต่ไม่พบว่าแอนติบอดีเหล่านี้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนบนผิวของพยาธิที่ถูกติดฉลากด้วย ^{125}I เมื่อนำเซลล์ลูกผสมกลุ่มหนึ่งมาทำ limiting dilution 2 ครั้งได้โมโนโคลนที่ยังคงผลิตแอนติบอดีต่อ cuticle โดยวิธี IFA อย่างไรก็ตามพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างมาจากโมโนโคลนเหล่านี้ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่สกัดจากตัวอ่อนพยาธิที่ถูกติดฉลากด้วย [^{35}S]methionine โดยวิธี metabolic labeling โดยวิธี Western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับโปรตีนของตัวอ่อนพยาธิตัวจี๊ดที่มีขนาดตั้งแต่ 55-96 kDa และให้แถบเข้มของปฏิกิริยาที่ 75 และ 85 kDa ในการทดลองผลิตเซลล์ลูกผสมอีก 4 ครั้งต่อมา พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ลูกผสมสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ผิวของพยาธิขนาด 25 kDa ซึ่งถูกติดฉลากด้วย ^{125}I โดยวิธี immunoprecipitation แต่เซลล์ลูกผสมเหล่านี้มีการสร้างแอนติบอดีที่ไม่คงที่และหยุดสร้างในเวลาต่อมา