ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของแอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดี ชนิดโพลิโคลนอล ต่อ มาลาเรียเมอโรซอยท์แอนติเจน

ชื่อผู้เขียน นางสาว จิราภรณ์ สุวรรณ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ ประธานกรรมการ
ดร. จักร์กริช หิรัญเพชรรัตน์ กรรมการ
ผศ.ดร.ศิริวรรณ องค์ไชย กรรมการ
ดร.อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ กรรมการ

บทคัดย่อ

โปรตีนแอนติเจนขนาด 19 กิโลดาลตัน บนผิวเชื้อมาลาเรียในระยะเมอร์โรซอยท์ ($MSP1_{19}$) มีลำดับกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่ในระหว่างสายพันธุ์ของมาลาเรีย จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง $MSP1_{19}$ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันและป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในลิงและหนูบางสายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการผลิตวัคซีนได้ ภูมิคุ้มกันที่มีบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อในหนูทดลองต่อ $MSP1_{19}$ นั้น ขึ้นอยู่กับบทบาทของแอนติบอดีต่อ $MSP1_{19}$ เป็นหลัก สำหรับ MAb302 ซึ่งเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ $MSP1_{19}$ ชนิด IgG3 นั้นสามารถป้องกันหนูจากการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ *P. yoelii* ได้ ลำดับกรดอะมิโนบนโมเลกุลแอนติบอดีที่เรียกว่า idiotypes (Id)สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดี (anti-Id) ได้โดย แอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดีส่วนที่มีความจำเพาะกับส่วนที่จับกับแอนติเจนสามารถเป็นตัวแทนของแอนติเจนตั้งต้นได้

เพื่อผลิตแอนติไอดิโอไทปิกต่อ $MSP1_{19}$ ชนิดโพลิโคลนอล (anti-Id) การศึกษานี้ได้นำ MAb302 (Ab1) ในรูปแบบ IgG ฉีดกระตุ้นให้กระต่ายทดลอง และนำซีรั่มไปคัดแยกบริสุทธิ์ให้ได้ IgG ด้วยเทคนิคโครมาโตรกราฟฟีแบบจำเพาะชนิด protein G Sepharose 4B column เพื่อใช้ในการทดลองหาคุณสมบัติต่างๆ ในการทดสอบหาความจำเพาะต่อ ส่วนที่จับกับแอนติเจน ของ MAb302 เปรียบเทียบกับ normal mouse IgG ด้วยวิธี competitive ELISA นั้นพบว่า แอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดี มีความจำเพาะสูงต่อ MAb302 (100% inhibition) แต่ไม่มีความจำเพาะที่สำคัญกับ normal mouse IgG (<50% inhibition) จากนั้นจึงคัดกรองแอนติบอดีส่วนที่มีความจำเพาะต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วน constant region บนโมเลกุล MAb302 เทคนิคโครมาโตรกราฟฟีแบบจำเพาะชนิด anti-mouse IgG agarose

เพื่อศึกษาคุณสมบัติความเหมือนต่อส่วนส่วนที่จับกับแอนติเจนของ แอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดีเทียบกับ $MSP1_{19}$ การทดลองได้นำ แอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดีมายับยั้ง MAb302 ในการจับกับ $MSP1_{19}$ ด้วยเทคนิค competitive ELISA ผลการทดลองพบว่า แอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดี (>50 μg/ml) สามารถยับยั้งการจับของ MAb302 ต่อ $MSP1_{19}$ ได้ (100% inhibition)

เพื่อศึกษาความเหมือนด้านโครงสร้างของในสัตว์ทดลอง แอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดีถูกนำมาย่อยให้ได้ส่วน Fab และ Fc ด้วยเอนไซม์ papain จากนั้นจึงคัดแยก Fc ออกด้วย เทคนิคโครมาโตรกราฟฟีแบบจำเพาะชนิด protein G Sepharose 4B column เมื่อนำไปฉีดกระตุ้นหนูทดลอง พบว่า ทั้ง Fab และ IgG ของ แอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดี สามารถกระตุ้นแอนติบอดี (Ab3) ที่สามารถตอบสนองต่อทั้ง แอนติไอดิโอไทปิกแอนติบอดี และ $MSP1_{19}$ แม้ไม่ได้ฉีดด้วย $MSP1_{19}$ มาก่อน ในขณะที่ Fab และ IgG ของ rabbit IgG ไม่สามารถตอบสนองได้

กล่าวโดยสรุปแล้ว การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สามารถผลิตแอนติไอดิโอไทปิก ต่อ $MSP1_{19}$ ชนิด โพลิโคลนอล ที่จับกับส่วน ส่วนที่จับกับแอนติเจนของ MAb302 และมีส่วนเหมือนกับ $MSP1_{19}$ ในด้านโครงสร้าง โดยคุณสมบัติด้านภูมิคุ้มกันจะเป็นการทดลองต่อไป ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปผลิตเป็นแอนติเจนและพัฒนามาลาเรียวัคซีนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Production and Characterization of Polyclonal Anti-idiotypic Antibody to Malaria Merozoite Antigen
Author	Miss Jiraporn Suwan
M.S.	Biochemistry
Examining committee	Associate Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Chairman Dr. Chakrit Hirunpetcharat Member Assistant Professor Dr. Siriwan Ongchai Member Dr. Udomphan Khansuwan Member

Abstract

The 19-kDa carboxyl terminal fragment of merozoite surface protein 1 ($MSP1_{19}$) is a highly conserved region within malaria species. It has shown to protect some species of mice and monkey against malaria infection by inducing immune system. Thus the protein could be used as a candidate of malarial vaccine. The immunity induced by $MSP1_{19}$ has been shown to correlate with antibody and required high titer of antibody for protection. The monoclonal antibody MAb302 (IgG3) which defines a highly conserved neutralization epitope of $MSP1_{19}$, showes protective activity against *P. yoelii,* a murine malaria. An antibody may also be defined by its idiotype (Id) associated with the unique V_H and V_L regions of a monospecific population of antibody molecules. Numerous studies have demonstrated that anti-Id can effectively mimic the three-dimensional structures and functions of the external antigens and can be used as surrogate antigens for active specific immunity.

In this study, to produce polyclonal anti-Id mimic to $MSP1_{19}$ (Ab2), MAb302 (Ab1) was used as antigen to immunize New Zealand white rabbit. Anti-Id showed high specific activity to the binding site of MAb302 as provened by no reactivity to normal mouse IgG using a competitive ELISA. To investigate the antigen binding site of anti-Id mimic epitope $MSP1_{19,}$ the binding of $MSP1_{19}$ to MAb302 was competed by anti-Id using competitive ELISA, anti-Id (> 50µg/ml) could block

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

binding of $MSP1_{19}$ to MAb302 in a dose-dependent manner with 100% inhibition. To study the structure of anti-Id, IgG was digested to Fab and Fc fragments by papain. The Fc fragment was isolated by affinity chromatography either whole molecule or Fab fragment of anti-Id were able to induce the production of both anti-Id and $MSP1_{19}$ neutralizing antibodies in BALB/c mice. Neither whole molecule nor the Fab fragment of rabbit IgG control could reacted with $MSP1_{19}$. These results suggested that binding of polyclonal anti-idiotype antibodies to antigenic determinant of MAb302 mimiced the three-dimensional structures of $MSP1_{19}$. The protective property against malaria infection should be studied. This study can be applied as strategies for developing malaria vaccine based on $MSP1_{19}$ by using anti-Id as another surrogate antigen for active specific immunity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved