Thesis Title Production of Monoclonal Antibody to Specific Glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis*

Author Mr. Songriddh Phongthong

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Assist. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn Chairperson
Prof. Emeritus Dr. Sanit Makonkawkeyoon Member
Assoc. Prof. Dr. Luksana Makonkawkeyoon Member

Abstract

To control tuberculosis (TB), it is still necessary to find a diagnostic method that is both more rapid to carry out and more sensitive than traditional methods (smear and culture). Additionally, it is simpler and cheaper than the new molecular diagnostic tests that are based on the amplification of nucleic acids. Serological methods seem to be the ideal choice. Presently, the objective of serological diagnosis development is to detect mycobacterial antigens in body fluid rather than to detect antibody because patients with HIV who are co-infected with TB give the sensitivity for antibody detection only 10-40%. Production of monoclonal antibody (MAb) to mycobacterial antigens is the most important for serological diagnosis development. During the last few years, MAbs against *Mycobacterium tuberculosis* have been described, but their use as diagnostic tools have been limited. Problems associated with those MAbs are cross-reactivity with other mycobacterial species.

The objective of this work was production of MAb to purified glycolipid of *M. tuberculosis* H37Rv KK11-20 strain for diagnostic purpose. This purified glycolipid has been described as a highly conserved glycolipid of *M. tuberculosis*. Specific glycolipid was purified from crude glycolipid by Florisil column chromatography with 2.93% yield. When the purified glycolipid was analysed by Thin-Layer Chromatography (TLC), a purple-red color spot with R_F value of 0.757 compatible to glycolipid was observed. In the monoclonal antibody production,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

female Balb/c mice were intraperitoneally immunized with sonicated *M. tuberculosis* H37Rv KK11-20 strain instead of using crude glycolipid because it was low immunogenicity. Antibody titer was assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using crude glycolipid and purified glycolipid as detecting antigen in fusion step and limiting dilution step, respectively. After cell fusion between isolated immunized spleen cell and X63Ag8.653 mouse myeloma, L24 hybridoma cell was obtained. Monoclonal antibody produced from L24 hybridoma was IgM isotype and it reacted strongly with purified glycolipid of *M. tuberculosis* H37Rv KK11-20 strain. For cross reaction test of this MAb by glycolipid ELISA, it reacted strongly with purified glycolipid of *M. tuberculosis* H37Rv and its crude glycolipid but reacted weakly with crude glycolipid of 8 non-tuberculous mycobacteria, thus indicating the specific of the MAb to purified glycolipid of *M. tuberculosis* H37Rv. When cross reaction was performed with sonicated mycobacteria by Sandwich ELISA, MAb L24 showed highly specific to sonicated *M. tuberculosis* H37Rv, but very low reactivity to other 17 sonicated mycobacterial species.

In conclusion, this MAb will be useful for studying of the purified glycolipid structure and its role whether be involved in the pathogenic mechanisms of *M. tuberculosis* H37Rv. In addition, this MAb may also have some benefits in serological diagnosis development and other tuberculosis research in the future.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไกลโคลิปิดที่จำเพาะของเชื้อวัณโรค

ผู้เขียน นายทรงฤทธิ์ ผงทอง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ผศ. ดร. สุมาลี พฤกษากร	ประธานกรรมการ
ศ. เกียรติคุณ ดร. สนิท มกรแก้วเกยูร	กรรมการ
รศ. ดร. ลักษณา มกรแก้วเกยูร	กรรมการ

บทคัดย่อ

การควบคุมวัณโรคยังจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว และไว มากกว่าวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยการย้อมสีเชื้อวัณโรคจากเสมหะ และการบ่มเพาะเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ นอกจากนี้ยังต้องเป็นวิธีที่ง่าย และมีราคาไม่แพงไปกว่าวิธีการตรวจวินิจฉัยทาง ชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นวิธีการที่อาศัยเทคนิคในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรม วิธีการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ในปัจจุบันเป้าหมายของการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองมุ่งเน้นไปที่การตรวจหาแอนติเจน ของเชื้อ *M. tuberculosis* ใน body fluid มากกว่าการตรวจหาแอนติบอดี เนื่องจากในผู้ติดเชื้อเอดส์แล้วติดเชื้อ *M. tuberculosis* ร่วมด้วย พบว่ามีความไวของการตรวจหาแอนติบอดีมีเพียง 10 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนของ *M. tuberculosis* มีความสำคัญมากในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลือง ในระยะเวลาสองสามปีที่ผ่านมาได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *M. tuberculosis* H37Rv ขึ้นมากมาย แต่การใช้ประโยชน์จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านั้นสำหรับพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองกลับมีความจำกัดอยู่หลายประการ สาเหตุประการหนึ่งก็คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *M. tuberculosis* เหล่านั้นยังสามารถจับกับแอนติเจนของเชื้อ mycobacteria สายพันธุ์อื่น ๆ ได้

ในการศึกษานี้มีเป้าหมายที่จะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ purified glycolipid ของ *M. tuberculosis* H37Rv KK11-20 เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค โดย purified glycolipid นี้เคยถูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายงานว่าเป็นแอนติเจนจำเพาะที่พบได้เฉพาะในเชื้อ *M. tuberculosis* เท่านั้น ในขั้นตอนการสกัดแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี่ พบว่า purified glycolipid ที่สกัดได้มีปริมาณ 2.93 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณไกลโคลิปิดทั้งหมด (crude glycolipid) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC) มีลักษณะสีเป็นสีแดงแกมม่วง และมีค่า R_F เท่ากับ 0.757 เท่ากับค่าของไกลโคลิปิด ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการนำ *M. tuberculosis* H37Rv KK11-20 ที่ถูกทำให้เซลล์แตกแล้วไปฉีดกระตุ้นเข้าช่องท้องของหนู Balb/c เพศเมียแทนการฉีดด้วย crude glycolipid เพราะ crude glycolipid มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้ตอบสนองต่ำ การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อ purified glycolipid ด้วยเทคนิค ELISA ใช้ crude glycolipid เป็นแอนติเจนทดสอบในตอนแรก ส่วนการตรวจหาเซลล์ลูกผสมที่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อ purified glycolipid จึงจะใช้ purified glycolipid เป็นแอนติเจน หลังจากสร้างเซลล์ลูกผสมระหว่างเซลล์ม้ามหนูที่สร้างแอนติบอดีต่อ crude glycolipid กับเซลล์มะเร็งหนูชื่อ X63Ag8.653 ได้เซลล์ลูกผสมที่ชื่อ L24 สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด IgM ต่อ purified glycolipid ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv KK11-20 เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวไปทำการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มพบว่า MAb ทำปฏิกิริยากับ purified glycolipid และ crude glycolipid ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv KK11-20 ได้ดี แต่ทำปฏิกิริยาไม่ดีกับ crude glycolipid ของเชื้อ mycobacteria สายพันธุ์อื่นอีก 8 สายพันธุ์ ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มระหว่าง MAb L24 กับเชื้อที่ทำให้เซลล์แตกแล้ว (sonicated cell) ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv KK11-20 และ sonicated cell ของเชื้อ mycobacteria สายพันธุ์อื่นอีก 17 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค Sandwich ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ sonicated cell ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv KK11-20 ได้สูงมากกว่า sonicated cell ของเชื้อ mycobacteria สายพันธุ์อื่น

จากผลสรุป โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้น่าจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลือง และงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวกับวัณโรคในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved