การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของ พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง

นางสาว วรรณี อังคศิริสรรพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-025-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019198

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE ERYTHROCYTIC STAGES OF *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Miss Wannee Angkasirisap

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-581-025-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของ พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง
โดย	นางสาว วรรณี อังคศิริสรรพ
ภาควิชา	ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ วิมล พานิชยการ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. พุฒิพงศ์ วรวุฒิ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ วิมล พานิชยการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง)

.....กรรมการ

(แพทย์หญิง สร้อยสอางค์ พิกุลสด)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วรรณี อังคศิริสรรพ : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE ERYTHROCYTIC STAGES OF PLASMODIUM FALCIPARUM) อ.ที่ปรึกษา : รศ.วิมล พานิชยการ, รศ.สดศรี ไทยทอง, 105 หน้า. ISBN 974-561-025-8

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง โดยทำการเชื่อมเซลล์ NS-1 ซึ่งเป็นเซลล์ myeloma กับเซลล์ม้ามของหนู Balb/c ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จากการเชื่อมเซลล์ 8 ครั้ง ได้เซลล์ลูกผสมทั้งหมดจำนวน 1024 หลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ และมีอยู่ 177 หลุม (17.5%) ที่หลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียและได้คัดเลือกมา 13 หลุมเพื่อทำ single cell cloning ได้ monoclone ทั้งหมด 58 monoclone สามารถจำแนกโมโนโคลนอลแอนติบอดีตามรูปแบบการติดสีสารเรืองแสงได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ คือ กลุ่มที่ 1 ทำปฏิกิริยากับ rhoptry organelle ของเชื้อมาลาเรียระยะ schizont และ merozoite กลุ่มที่ 2 ทำปฏิกิริยาเรืองแสงเข้มที่บริเวณผิวเซลล์ของ schizont และ merozoite ที่อยู่ภายในเซลล์ schizont การติดสีสารเรืองแสงของกลุ่มนี้มีลักษณะคล้ายพวงองุ่น กลุ่มที่ 3 ทำปฏิกิริยาเรืองแสงเป็นจุดเล็ก ๆ บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ กลุ่มที่ 4 ติดสีสารเรืองแสงที่บริเวณไซโตปลาสซึมของเชื้อทุกระยะการเจริญในเม็ดเลือดแดงรวมทั้งระยะ gametocyte กลุ่มที่ 5 ทำปฏิกิริยาเรืองแสงที่เยื่อหุ้ม parasitophorous vacuole ของเชื้อ และกลุ่มที่ 6 นั้นจะทำปฏิกิริยาเรืองแสงบริเวณไซโตปลาสซึมและผิวเซลล์ของเชื้อทุกระยะการเจริญรวมทั้งระยะ gametocyte

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2-6 มาใช้ศึกษาความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม 18 ไอโซเลตที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค สามารถจำแนกไอโซเลตของเชื้อมาลาเรียดังกล่าวออกเป็นไทพ์ต่าง ๆ ได้ 10 ไทพ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C025319 : MAJOR ZOOLOGY
KEY WORD : MONOCLONAL ANTIBODIES/PLASMODIUM FALCIPARUM/ANTIGENIC DIVERSITY
WANNEE ANGKASIRISAP : PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE ERYTHROCYTIC STAGES OF PLASMODIUM FALCIPARUM. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF.VIMOL PHANICHYAKARN, ASSO.PROF.SODSRI THAITHONG, 105 PP.
ISBN 974-581-025-8

Production of monoclonal antibodies (MAbs) against the blood forms of Plasmodium falciparum was made after fusion of NS-1 myeloma cells with the spleen cells from an immunised Balb/c mice. In eight fusion experiments 1024 hybrids were obatined of which 177 (17.5%) secreted malaria specific antibodies. From 13 hybrids 58 monoclonal lines were obtained by single cell cloning. MAbs could be divided into 6 groups based on their immunofluorescent staining patterns. Group 1 MAbs reacted with rhoptry organelle of schizont and merozoite. Group 2 MAbs reacted strongly with the cell surface of schizont and intraschizont merozoites which took the form of a cluster of grapes. Group 3 MAbs reacted to produce a pattern of intensely bright dots around the infected red blood cell membrane. Group 4 MAbs showed bright staining of the cytoplasm of all blood stages including gametocytes. Group 5 MAbs reacted with the parasitophorous vacuole membrane. Group 6 MAbs reacted with the cytoplasm and the cell surface of all blood stages including gametocytes.

MAbs group 2 to 6 were used to demonstrate considerable antigenic diversity in 18 isolates of P.falciparum which were obtained from patients in endemic areas of Thailand. Different isolates were distinguished by their ability to react with certain antibodies and those isolates could be divided into 10 different types.

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ รศ. วิมล พานิชยการ อาจารย์ที่ปรึกษา และ รศ. สดศรี ไทยทอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือสนับสนุน ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการวิจัยนับแต่เริ่มงานจนกระทั่งประสบความสำเร็จอีกทั้งช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ศจ. ดร. ม.ร.ว. พุฒิพงศ์ วรวุฒิ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, แพทย์หญิง สร้อยสอางค์ พิกุลสด หัวหน้าแผนกแอนติซีรั่ม ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย, รศ. แพทย์หญิง ฤทัย สกุลแรมรุ่ง หัวหน้าหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ อาจารย์ วัฒนะ พันธุ์ม่วง ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Dr. J.S. McBride แห่ง Instistute of Cell, Animal and Population Biology, Edinburgh University, Scotland, United Kingdom ที่ได้กรุณาให้ MAb ต่อเชื้อมาลาเรีย สำหรับใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบกับผลการทดลองครั้งนี้, รศ. แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์ หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้ใช้เครื่อง refrigerated centrifuge, คุณ อารีย์ เสือก้อน ศูนย์วิจัยมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาช่วยเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียไอโซเลตต่างๆที่ใช้ในการวิจัยนี้, คุณอัญชลี พันธุ์ภักดีคุณ และคุณอรพินทุ์ ปทุมสุวรรณ ศูนย์วิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยแนะนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย และช่วยเตรียมการทดลองบางส่วน

ขอขอบพระคุณ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ทุนการศึกษาในโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) เป็นเวลา 2 1/2 ปี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก บัณฑิตวิทยาลัย และฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย และจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน จึงขอขอบคุณมา ณ. ที่นี้ด้วย

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ และคุณย่า ที่ให้กำลังใจและการสนับสนุนในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ญ

คำย่อ ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ 1

2 บทสืบสวนเอกสาร 3

3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 26

4 ผลการทดลอง 52

5 วิจารณ์ผลการทดลอง 77

6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 84

เอกสารอ้างอิง 87

ภาคผนวก 94

ภาคผนวก ก 95

ภาคผนวก ข 97

ภาคผนวก ค 101

ประวัติผู้เขียน 105

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลที่เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนในร่างกาย	4
2	คุณสมบัติทางเคมี, ชีวภาพและกายภาพของอิมมูโนโกลบุลินของคน	7
3	Class และ Subclass ของอิมมูโนโกลบุลินที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ	7
4	เปรียบเทียบคุณสมบัติของ Polyclonal antibody และ Monoclonal antibody	12
5	ชนิดของ Myeloma Cell Line ที่ใช้เชื่อมเซลล์เพื่อผลิต MAb	19
6	เชื้อมาลาเรีย P. falciparum ไอโซเลตต่างๆที่แยกจากผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในจังหวัดตากและตราด	27
7	ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์และชนิดของ serum supplement ในอาหารเลี้ยงเซลล์ hybridoma	57
8	แสดงจำนวนเซลล์และอัตราส่วนการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ myeloma และ immune spleen cell ในการเชื่อมเซลล์ 8 ครั้ง	58
9	ผลความแตกต่างของเปอร์เซนต์เซลล์มีชีวิตต่อการเกิด hybridoma ในการเชื่อมเซลล์แต่ละครั้ง	59
10	การเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ของจำนวนหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่พบเซลล์ hybridoma และที่ผลิตแอนติบอดี	60
11	Monoclone ของ hybridoma ที่ได้จากการทำ single cell cloning ซึ่งได้คัดเลือกไว้เป็นเซลล์สายพันธุ์	61
12	การจัดกลุ่ม MAb ที่ผลิตได้ โดยทดสอบด้วยวิธี IFA	65
13	ผลการทดสอบความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ไอโซเลตที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศไทยกับ MAb ที่ผลิตได้	67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ผลการตรวจหา titre ในน้ำเลี้ยงเซลล์	101
15	ผลการตรวจหา titre ใน ascitic fluid	104

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลอิมมูโนโกลบุลิน	5
2	ทฤษฎี Clonal Selection ของ Burnet	8
3	แผนภาพแสดง primary และ secondary immune response	10
4	เปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี Conventional (ก) และวิธี Hybridoma (ข)	11
5	หลักการพื้นฐานของการเชื่อมเซลล์	16
6	วิถีเมตะโบลิซึมของการสร้าง DNA และ RNA ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม	17
7	วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย	21
8	วิธีการเตรียมแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย	38
9	ภาพวาดแสดงรายละเอียดของเชื้อ Plasmodium spp. (ก) ระยะ schizont และ (ข) ระยะ merozoite	68
10	ภาพถ่ายเชื้อ P. falciparum ที่ย้อมด้วยสียิมซ่า	69
11	ระยะต่างๆของเชื้อ P. falciparum ที่เจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงของคน	70
12	รูปแบบการติดสีสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 2 ซึ่งทำปฏิกิริยากับเชื้อ P. falciparum สายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 ในระยะ schizont และ merozoite	71
13	รูปแบบการติดสีสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 3 ทำปฏิกิริยากับเชื้อสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 มีความจำเพาะกับเชื้อที่เจริญในระยะ schizont และ merozoite	72

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ก) และ ข) รูปแบบการติดสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 4 ซึ่งติดสารเรืองแสงทั่วไปที่ไซโตปลาสซึมภายในเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย	73
15	รูปแบบการติดสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 5 ทำปฏิกิริยากับเชื้อสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 มีความจำเพาะต่อเชื้อทุกระยะการเจริญ	74
16	ภาพขยายใหญ่ของรูปที่ 15 แสดงการติดสารเรืองแสงบริเวณเยื่อหุ้ม parasitophorous vacuole ของเชื้อ	74
17	รูปแบบการติดสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 6 ทำปฏิกิริยากับเชื้อสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3	75
18	รูปแบบการติดสารเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 6 ทำปฏิกิริยากับ gametocyte ของเชื้อมาลาเรียไอโซเลต MMS15	75
19	ภาพขยายรูปที่ 17 แสดงการติดสีสารเรืองแสงทั้งที่ผิวเซลล์และไซโตปลาสซึมของเชื้อมาลาเรีย	76
20	รูปแบบการเรืองแสงของ MAb กลุ่มที่ 6	76
21	Haematocytometer และบริเวณที่ใช้นับจำนวนเซลล์ (1-4)	100

คำย่อ

CSP	circumsporozoite precipitation
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HAT	hypoxanthine, aminopterin, thymidine
HEPES	N-2-hydroxyethypiperazine-N'-2ethane sulphonic acid
HGPRT	hypoxanthine guanosine phosphoribosyl transferase
HT	hypoxanthine, thymidine
IFA	indirect immunofluorescent assay
Ig	immunoglobulin
MAb	Monoclonal antibody
MAbs	Monoclonal antibodies
mM	millimoles per litre
PAb	polyclonal antibody
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-bufferd saline
PEG	polyethylene glycol
RP	RPMI 1640 medium
RP20	RPMI 1640 + 20% FCS
SDS	sodium dodecyl sulphate