ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตโปรตีนที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส

ผู้เขียน นายมณฑล วิสุทธิ

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2550

บทคัดย่อ

การติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Burkholderia pseudomallei* ในกระแสเลือดอย่างเฉียบพลันเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะในภาคอีสานของประเทศไทยมีอัตราสูงถึง 20% ของผู้ที่เป็นโรค เนื่องจากลักษณะอาการที่คล้ายกับการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั่วไปในกระแสเลือด ทำให้แพทย์ผู้วินิจฉัยอาการไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าผู้ป่วยติดเชื้อ *B. pseudomallei* ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญ และวิธีที่ดีที่สุดคือการเพาะเชื้อซึ่งต้องใช้เวลานานมากกว่า 48 ชม. แต่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดอาจเสียชีวิตได้ภายใน 24-48 ชม. และสำหรับวิธีการวินิจฉัยที่รวดเร็ว วิธีหนึ่ง คือการตรวจทางอิมมูโน แต่ปัจจุบัน ผลการตรวจด้วยวิธีนี้ยังไม่มีความน่าเชื่อถือเพียงพอ เนื่องจากยังไม่มีการค้นพบแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ ซึ่งมีความจำเป็นต่อการนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย การศึกษาในครั้งนี้สืบเนื่องมาจาก การพบยีนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Bp7* (Genbank No EF413059), *bipD* (Genbank No EF120623), *Bp3SC1* (Genbank No EF413060) และ *Bp3SC2* (Genbank No EF413061) มีการแสดงออกในผู้ที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ดังนั้นจึงคาดว่ายีนทั้ง 4 ชนิด น่าจะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสได้

การศึกษาครั้งนี้ จึงได้โคลนยีนแต่ละชนิดเข้าสู่เวคเตอร์ pGEX 4T-1 เพื่อผลิตโปรตีนจากยีนดังกล่าว สำหรับการศึกษา Immunoblotting โดยทดสอบกับซีรัมรวมแต่ละกลุ่มดังนี้ ซีรัมรวมของผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ซีรัมรวมของผู้ป่วยด้วยโรคติดเชื้ออื่นๆ และซีรัมรวมของคนปกติ พบว่าโปรตีน GST-Bp3SC1 และ GST-Bp3SC2 ไม่มีความจำเพาะต่อซีรัมเมลิออยโดซิส และนำโปรตีนที่มีผลบวกกับซีรัมรวมของผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ได้แก่ โปรตีน GST-Bp7 และ GST-BipD ไปทำบริสุทธิ์ เพื่อมาทดสอบกับซีรัมแต่ละรายด้วยการตรวจหาแอนติบอดีIgG โดยพบว่า ค่าความไว และความจำเพาะของโปรตีน GST-Bp7 เป็น77.8% และ74.4% ตามลำดับแต่ด้วยลักษณะเฉพาะของโปรตีน Bp7 ทำให้ไม่สามารถตัดโปรตีน GST ออกได้ จึงไม่สามารถหาค่าความไว และความจำเพาะของโปรตีนบริสุทธิ์ Bp7 ได้ สำหรับความไว และความจำเพาะของโปรตีน GST-BipD เป็น 77.8 % และ 90.0% ตามลำดับ และเมื่อตัดเอาโปรตีน GST ออกพบว่ามีความไว และความจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 100% และ 91.1% ตามลำดับ จากผลการทดลองทำให้สรุปได้ว่า

โปรตีน BipD น่าจะมีศักยภาพเพียงพอต่อการพัฒนาเป็นเครื่องมือสำหรับการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสต่อไป

Thesis Title	Production of Antigenic Protein for Melioidosis Detection
Author	Mr. Monton Visutthi
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2007

ABSTRACT

Acute septicemia dued to gram negative bacillus; *Burkholderia pseudomallei* may cause to be dead. Especially in northeast Thailand, mortality rate of acute infectious is up to 20% of all patients. To differentiate melioidosis patient from other gram negative bacterial patient, clinicians required some experience because both of the cases have same clinical signs. Thus accurate laboratory and rapid diagnosis are required for melioidosis. Although, cultured bacterial identification is acceptable as the best method however it required 3-4 days to obtain the results. However, acute septicemia patients die within 24-48 h. Therefore, immunological methods have been approached for melioidosis detection. Although, immunological methods conduct less than 12 hr but the result is not reliable because specific antigen for detection has not been found. In this study, *Bp7* (Genbank No EF413059), *bipD* (Genbank No EF120623), *Bp3SC1* (Genbank No EF413060) and *Bp3SC2* (Genbank No EF413061) that were found to express in melioidosis patients. Thus we hypothesized that they can be candidate antigens for melioidosis diagnosis.

Each gene was cloned into expression vector, pGEX 4T-1 to produce the protein and each protein was tested with pooled sera, including pooled melioidosis sera, pooled other infectious sera and pooled normal sera by immunoblotting. The proteins which showed positive signal with the pooled melioidosis sera were GST-Bp7 and GST-BipD. The purified GST-Bp7 and GST-BipD protein were tested with 117 serum samples. The specificity and sensitivity of purified GST-Bp7 and GST-BipD protein were 77.8% and 74.4% respectively. As the GST-Bp7 protein was not able to be cleaved the GST fusion protein with thrombin. Therefore, Bp7 protein was not tested with each patient's serum. The sensitivity and specificity of GST-BipD were 77.8% and 90.0% respectively. After cleaving the GST protein from GST-BipD with thrombin, the BipD protein showed the sensitivity and specificity up to 100% and 91.1%, respectively. In contrast, the GST-Bp3Sc1 and GST-Bp3Sc2 protein were not specific to pooled melioidosis sera. In

conclusion, the BipD should be one candidate to evaluate with endemic area serum for developing melioidosis diagnostic test in the future.