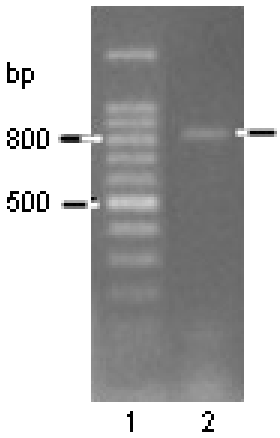
บทที่ 3

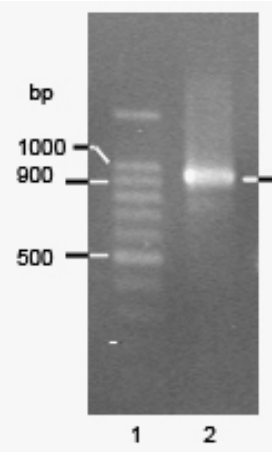
ผลการทดลอง

1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Bp7*, *bipD*, *Bp3SC1* และ *Bp3SC2* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

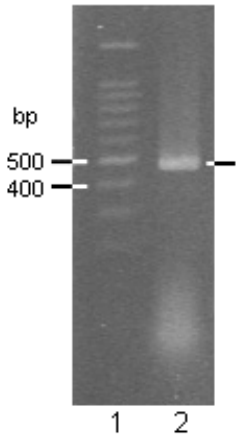
โครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรีย *B. pseudomallei* ถูกนำมาเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี PCR ผลิตผลการทำ PCR ของแต่ละสายจะถูกตรวจสอบเบื้องต้นด้วยการแยกบน เจลอิเล็กโทรโฟลิซิส โดยเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair ladder ดังแสดงในรูปที่ 1A, 1B, 1C และ 1D จากการเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน *Bp7* มีขนาดอยู่ระหว่าง 800-900 bp *bipD* มีขนาดอยู่ระหว่าง 900-1000 bp *Bp3SC1* มีขนาดอยู่ระหว่าง 400-500 bp และ *Bp3SC2* มีขนาดอยู่ระหว่าง 700-800 bp จึงได้ทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป เพื่อยืนยันว่าสายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR เป็นการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอ *Bp7*, *bipD*, *Bp3SC1* และ *Bp3SC2* จริง ด้วยการโดยการหาลำดับดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่ได้



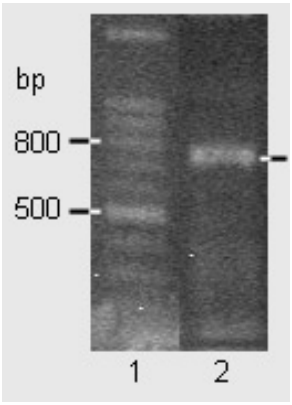
รูปที่ 1A ผลการทำ PCR ของยีน *Bp7* แสดงช่องที่ 2 ขนาดอยู่ระหว่าง 800-900 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 base pair ladder ในช่องที่ 1



รูปที่ 1B ผลการทำ PCR ของยีน *bipD* แสดงช่องที่ 2 มีขนาดอยู่ระหว่าง 900-1000 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 base pair ladder ในช่องที่ 1



รูปที่ 1C ผลการทำ PCR ของยีน *Bp3SC1* แสดงช่องที่ 2 มีขนาดอยู่ระหว่าง 400-500 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 base pair ladder ในช่องที่ 1



รูปที่ 1D ผลการทำ PCR ของยีน *Bp3SC2* แสดงช่องที่ 2 มีขนาดอยู่ระหว่าง 700-800 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 base pair ladder ในช่องที่ 1

2. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bp7*, *bipD*, *Bp3SC1* และ *Bp3SC2*

ผลผลิตของการทำ PCR ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย gel wizard kit (Promega, USA) แล้วจึงนำไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM T-easy จากนั้นนำ ดีเอ็นเอพาหะลูกผสมที่ได้ เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ Top10 และคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่มีดีเอ็นเอพาหะลูกผสม ด้วยการเติม 80 µg/ml ampicilin ลงในอาหารเลี้ยง เซลล์ที่เจริญเติบโตขึ้นมาจะเป็นได้ทั้งมีเพียงดีเอ็นเอพาหะหรือมีดีเอ็นเอพาหะลูกผสม จึงต้องนำมาตรวจสอบด้วยการ นำเซลล์เจ้าบ้านที่คัดเลือกได้ไปเพิ่มปริมาณและสกัดเดีเอ็นเอพาหะมาตรวจสอบด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพาหะที่ไม่มีการแทรกของสายดีเอ็นเอ และการตัดดีเอ็นเอพาหะด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ดีเอ็นเอพาหะลูกผสมจะถูกนำไปหาลำดับเบส ผลการหาลำดับเบสดีเอ็นเอจะถูกนำมาวิเคราะห์ความถูกต้องผลด้วยโปรแกรม Blastn (เปรียบเทียบกับสายดีเอ็นเอที่มีอยู่ในคลังยีน) และBlastx (เปรียบเทียบกับสายกรดอะมิโนที่มีอยู่ในคลังยีน) และหาร้อยละของความเหมือน รวมไปถึงแสดงรูปการเทียบสายดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม ClustalX และ Gendoc

สายดีเอ็นเอ *Bp7* (813 bp) ที่ได้จากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับสายดีเอ็นเอในคลังยีนของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ด้วย Blastn สายดีเอ็นเอ *Bp7* อยู่ใน chromosome ที่ 2 และมีลักษณะคล้ายกับสายดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน homoserine kinase และ/หรือ putative membrane protein ซึ่งมีความเหมือนกันถึง 99% โดยมีเบสที่แตกต่างกันอยู่ 2 ตำแหน่งคือ ในลำดับที่ 220 เปลี่ยนจาก C เป็น T และลำดับที่ 798 เปลี่ยนจาก A เป็น G ดังรูปที่ 2A และเมื่อเปรียบเทียบด้วย Blastx ซึ่งจะเปรียบเทียบโดยการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน สายอะมิโน Bp7 ขนาด 270 aa มีความเหมือนกับสายอะมิโนในคลังยีนของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243

99% โดยมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันอยู่ 2 ตำแหน่งคือ ในลำดับที่ 74 เปลี่ยนจาก A เป็น V และลำดับที่ 263 เปลี่ยนจาก N เป็น S ดังรูปที่ 2B จากการคำนวณมีขนาดโมเลกุล 28,680 ดาลตัน แต่ยังไม่รู้ถึงหน้าที่ของโปรตีน (hypothetical protein: BPSS1780) และ/หรือ คาดว่าน่าจะเป็น putative membrane protein

สายดีเอ็นเอ *bipD* (933 bp) ที่ได้จากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอ นำไปเปรียบเทียบกับสายดีเอ็นเอในคลังยีนด้วย Blastn มีความเหมือนกับสายดีเอ็นเอของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ 1710b ซึ่งอยู่ในchromosome ที่ 2 มีลักษณะคล้ายกับสายดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน type III effector protein IpaD/SipD/SspD (831 bp) ที่ 99% และเมื่อเปรียบเทียบกับสายดีเอ็นเอของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ซึ่งอยู่ใน chromosome ที่ 2 และมีลักษณะคล้ายกับสายดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน putative membrane protein (933) ถึง 99% โดยมีเบสที่แตกต่างกันอยู่ 6 ตำแหน่งคือ ในลำดับที่ 101 เปลี่ยนจาก C เป็น A และลำดับที่ 414 เปลี่ยนจาก C เป็น T ในลำดับที่ 522 เปลี่ยนจาก C เป็น G และลำดับที่ 874 เปลี่ยนจาก G เป็น A ในลำดับที่ 903 เปลี่ยนจาก G เป็น A และลำดับที่ 907 เปลี่ยนจาก A เป็น G แสดงในรูป 2C และเมื่อเปรียบเทียบด้วย Blastx ซึ่งจะเปรียบเทียบโดยสายดีเอ็นเอ *bipD* ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนขนาด 310 aa พบว่ามีความเหมือนกับสายอะมิโน BipD ของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 99% กับโปรตีน membrane antigen โดยมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันอยู่ 3 ตำแหน่งคือ ในลำดับที่ 34 เปลี่ยนจาก A เป็น E และลำดับที่ 292 เปลี่ยนจาก V เป็น M ในลำดับที่ 303 เปลี่ยนจาก T เป็น A ดังรูปที่ 2D จากการคำนวณมีขนาดโมเลกุล 34,033 ดาลตัน

สายดีเอ็นเอ *Bp3SC1* (462 bp) ที่ได้จากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบด้วย Blastn กับสายดีเอ็นเอในคลังยีนของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 อยู่ใน chromosome ที่ 1 และมีลักษณะคล้ายกับสายดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน conserved hypothetical protein ซึ่งมีความเหมือนกันถึง 99% โดยมีเบสที่แตกต่างกันอยู่ 4 ตำแหน่งคือ ในลำดับที่ 134 เปลี่ยนจาก A เป็น G ลำดับที่ 292 เปลี่ยนจาก G เป็น A ลำดับที่ 294 เปลี่ยนจาก A เป็น G และในลำดับที่ 339 เปลี่ยนจาก C เป็น T แสดงในรูปที่ 2E และเมื่อเปรียบเทียบด้วย Blastx ซึ่งจะเปรียบเทียบโดยการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (153 aa) พบว่ามีความเหมือน 98% โดยมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันอยู่ 2 ตำแหน่ง คือ ในลำดับที่ 45 เปลี่ยนจาก Q เป็น R และลำดับที่ 98 เปลี่ยนจาก V เป็น M แสดงในรูปที่ 2F และจากการคำนวณมีขนาดโมเลกุล 17,354 ดาลตัน แต่ยังไม่รู้ถึงหน้าที่ของโปรตีน (hypothetical protein: BPSL0973)

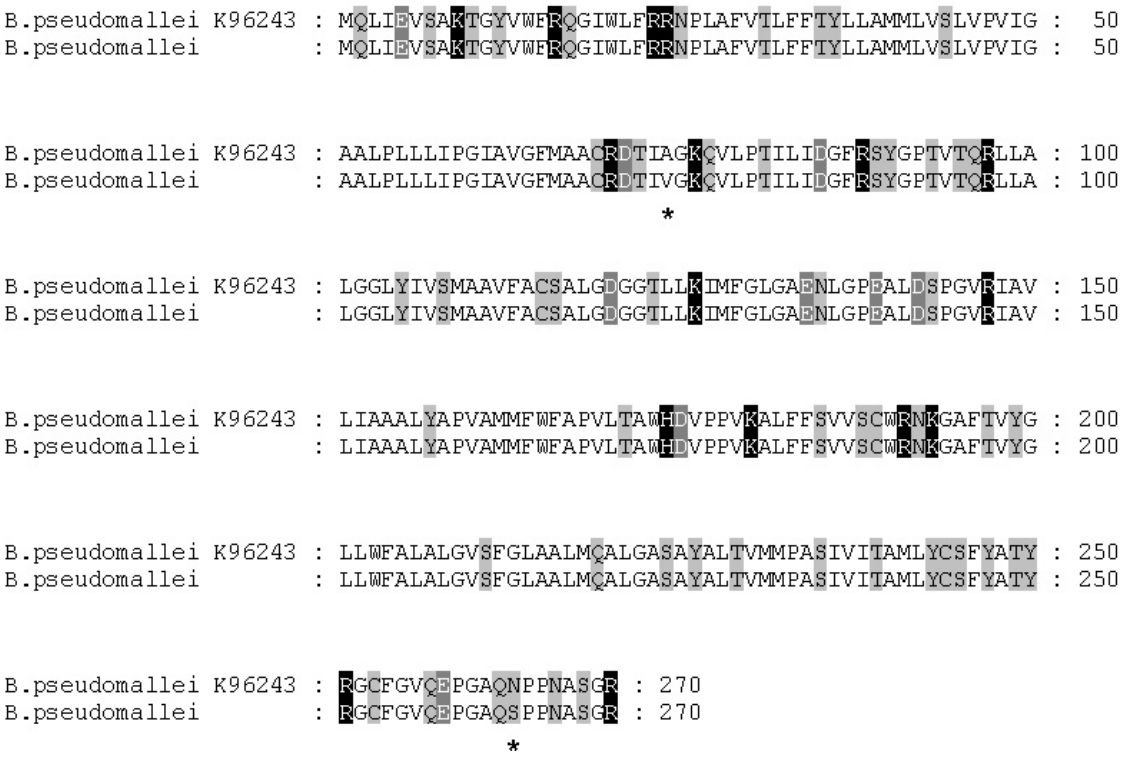
สายดีเอ็นเอ *Bp3SC2* (738 bp) ที่ได้จากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบด้วย Blastn กับสายดีเอ็นเอในคลังยีนของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 อยู่ใน chromosome ที่

1 และมีลักษณะคล้ายกับสายดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน putative exported protein ซึ่งมีความเหมือนกันถึง 99% โดยมีเบสที่แตกต่างกันอยู่ 3 ตำแหน่งคือ ในลำดับที่ 264 เปลี่ยนจาก G เป็น A ลำดับที่ 425 เปลี่ยนจาก C เป็น T และในลำดับที่ 546 เปลี่ยนจาก C เป็น T แสดงในรูป 2G และเมื่อเปรียบเทียบด้วย Blastx ซึ่งจะเปรียบเทียบโดยการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (245 aa) พบว่ามีความเหมือน 99% โดยมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันอยู่ 1 ตำแหน่งคือ ในลำดับที่ 142 เปลี่ยนจาก P เป็น L ดังรูปที่ 2H และจากการคำนวณ สายอะมิโน Bp3SC2 มีขนาดโมเลกุล 25,502 ดาลตัน แต่ยังไม่รู้ถึงหน้าที่ของโปรตีน (hypothetical protein: BPSL0972)

```
B.pseudomallei K96243 : ATGCAACTGATCGAAGTCTCCGCCAAGACCGGCTACGTGTGGTTCCGCCAAGGCATCTGG :  60
B.pseudomallei        : ATGCAACTGATCGAAGTCTCCGCCAAGACCGGCTACGTGTGGTTCCGCCAAGGCATCTGG :  60

B.pseudomallei K96243 : CTGTTCCGGCGCAATCCGCTCGCATTCGTCACACTGTTCTTCACGTACCTGCTCGCGATG : 120
B.pseudomallei        : CTGTTCCGGCGCAATCCGCTCGCATTCGTCACACTGTTCTTCACGTACCTGCTCGCGATG : 120

B.pseudomallei K96243 : ATGCTGGTGTCGCTCGTGCCCGTGATCGGCGCGGCGCTGCCGCTGCTGCTCATTCCCGGA : 180
B.pseudomallei        : ATGCTGGTGTCGCTCGTGCCCGTGATCGGCGCGGCGCTGCCGCTGCTGCTCATTCCCGGA : 180

B.pseudomallei K96243 : ATCGCGGTCGGCTTCATGGCGGCCTGCCGCGACACGATCGCCGGCAAGCAGGTGCTGCCG : 240
B.pseudomallei        : ATCGCGGTCGGCTTCATGGCGGCCTGCCGCGACACGATCGTCGGCAAGCAGGTGCTGCCG : 240

B.pseudomallei K96243 : ACGATCCTGATCGACGGCTTCCGCTCGTACGGCCCGACCGTCACGCAGCGGCTGCTCGCG : 300
B.pseudomallei        : ACGATCCTGATCGACGGCTTCCGCTCGTACGGCCCGACCGTCACGCAGCGGCTGCTCGCG : 300

B.pseudomallei K96243 : CTCGGCGGGCTCTACATCGTTTCGATGGCGGCCGTGTTCGCGTGCTCGGCGCTCGGCGAC : 360
B.pseudomallei        : CTCGGCGGGCTCTACATCGTTTCGATGGCGGCCGTGTTCGCGTGCTCGGCGCTCGGCGAC : 360

B.pseudomallei K96243 : GGCGGCACGCTGCTGAAGATCATGTTCGGTCTCGGCGCCGAGAACCTCGGGCCGGAGGCG : 420
B.pseudomallei        : GGCGGCACGCTGCTGAAGATCATGTTCGGTCTCGGCGCCGAGAACCTCGGGCCGGAGGCG : 420

B.pseudomallei K96243 : CTCGATTCGCCGGGCGTCAGGATCGCGGTACTGATCGCGGCCGCGCTGTACGCGCCGGTC : 480
B.pseudomallei        : CTCGATTCGCCGGGCGTCAGGATCGCGGTACTGATCGCGGCCGCGCTGTACGCGCCGGTC : 480

B.pseudomallei K96243 : GCGATGATGTTCTGGTTCGCGCCGGTGCTGACCGCGTGGCACGACGTGCCGCCCGTGAAA : 540
B.pseudomallei        : GCGATGATGTTCTGGTTCGCGCCGGTGCTGACCGCGTGGCACGACGTGCCGCCCGTGAAA : 540

B.pseudomallei K96243 : GCGCTGTTCTTCAGCGTCGTGAGCTGCTGGCGCAACAAGGGCGCGTTCACCGTCTATGGA : 600
B.pseudomallei        : GCGCTGTTCTTCAGCGTCGTGAGCTGCTGGCGCAACAAGGGCGCGTTCACCGTCTATGGA : 600

B.pseudomallei K96243 : CTGCTGTGGTTCGCGCTAGCGCTCGGCGTGTCGTTCGGGCTCGCCGCGCTGATGCAGGCG : 660
B.pseudomallei        : CTGCTGTGGTTCGCGCTAGCGCTCGGCGTGTCGTTCGGGCTCGCCGCGCTGATGCAGGCG : 660

B.pseudomallei K96243 : CTCGGCGCCAGCGCCTACGCGCTCACGGTGATGATGCCGGCCTCGATCGTCATCACCGCG : 720
B.pseudomallei        : CTCGGCGCCAGCGCCTACGCGCTCACGGTGATGATGCCGGCCTCGATCGTCATCACCGCG : 720

B.pseudomallei K96243 : ATGCTCTACTGCTCCTTCTATGCAACCTATCGCGGCTGCTTCGGCGTGCAGGAGCCGGGG : 780
B.pseudomallei        : ATGCTCTACTGCTCCTTCTATGCAACCTATCGCGGCTGCTTCGGCGTGCAGGAGCCGGGG : 780

B.pseudomallei K96243 : GCGCAGAATCCGCCGAACGCATCCGGCCGTTGA : 813
B.pseudomallei        : GCGCAGAGTCCGCCGAACGCATCCGGCCGTTGA : 813
```

รูปที่ 2A แสดงผลการเปรียบเทียบสายดีเอ็นเอของยีน *Bp7* ที่ได้จากการทำ PCR กับ ยีน *Bp7* ของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่มีอยู่ในคลังยีน พบว่ามีความแตกต่างกันของเบส

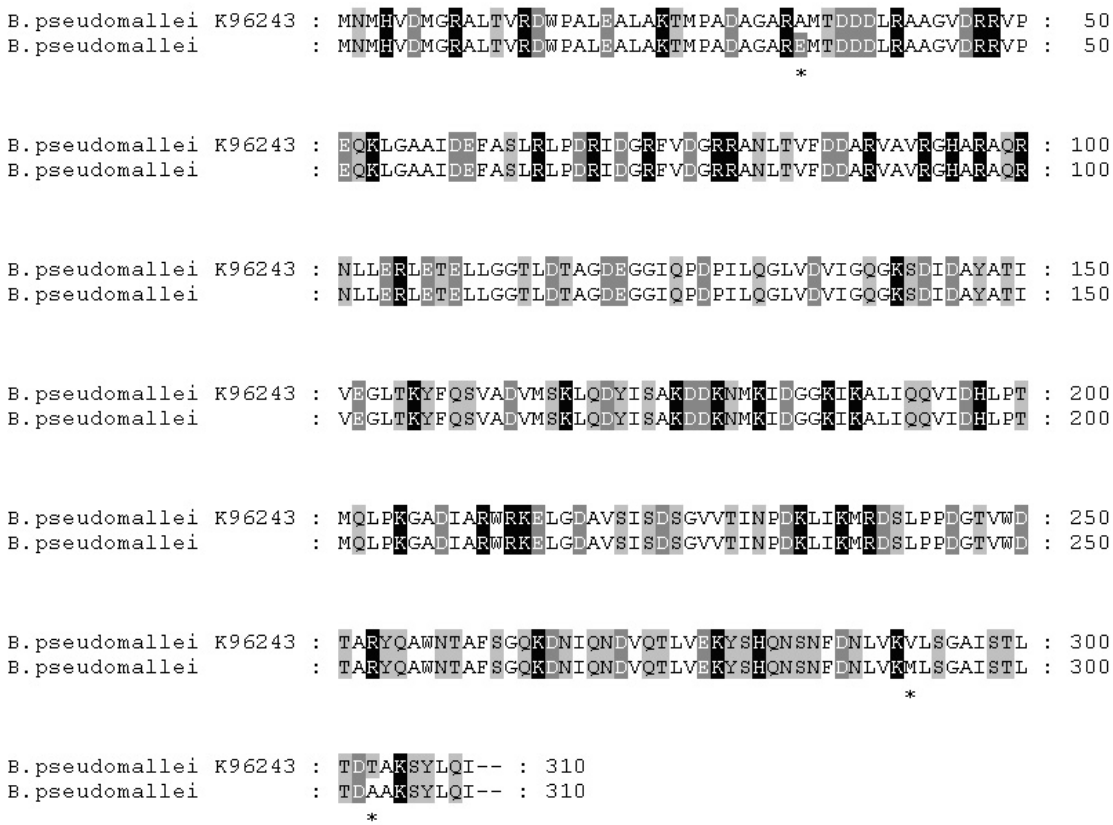
ดีเอ็นเอทั้งหมด 2 ตำแหน่ง (สีทึบ) ดังรูป ในลำดับที่ 220 เปลี่ยนจาก C เป็น T และลำดับที่ 798 เปลี่ยนจาก A เป็น G



รูปที่ 2B แสดงการเปรียบเทียบ สายกรดอะมิโนของโปรตีน Bp7 กับสายอะมิโนของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่มีอยู่ในคลังยีน พบว่ามีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนทั้งหมด 2 ตำแหน่ง (ดอกจันทร์) ดังรูป ในลำดับที่ 74 เปลี่ยนจาก A เป็น V และลำดับที่ 263 เปลี่ยนจาก N เป็น S สีดำแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส สีเทาเข้มแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด สีเทาอ่อนแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติละลายน้ำ สีขาวแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ

รูปที่ 2C แสดงผลการเปรียบเทียบสายดีเอ็นเอของยีน *bipD* ที่ได้จากการทำ PCR กับ ยีน *bipD* ของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่มีอยู่ในคลังยีน พบว่ามีความแตกต่างกันของเบสดีเอ็นเอทั้งหมด 6 ตำแหน่ง (สีทึบ) ดังรูป ในลำดับที่ 101 เปลี่ยนจาก C เป็น A และลำดับที่

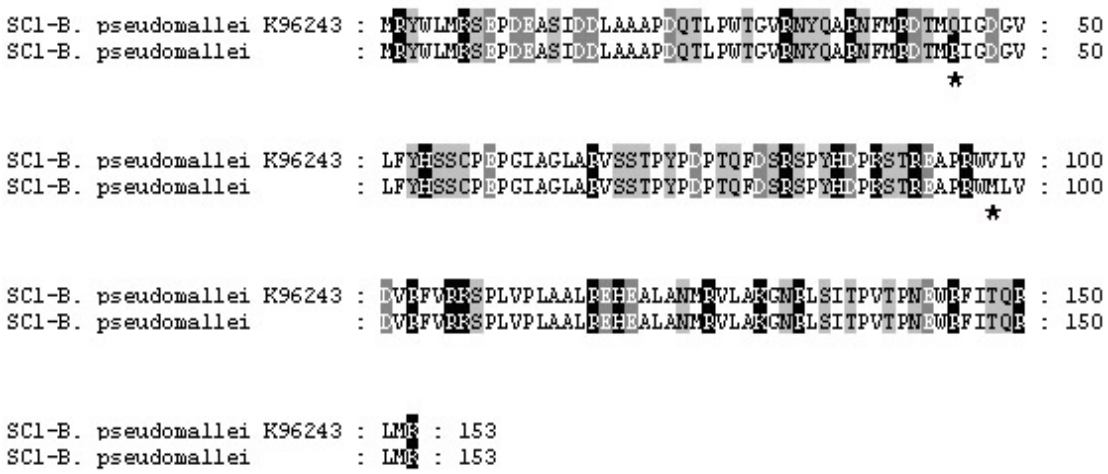
414 เปลี่ยนจาก C เป็น T ในลำดับที่ 522 เปลี่ยนจาก C เป็น G และลำดับที่ 874 เปลี่ยนจาก G เป็น A ในลำดับที่ 903 เปลี่ยนจาก G เป็น A และลำดับที่ 907 เปลี่ยนจาก A เป็น G



รูปที่ 2D แสดงการเปรียบเทียบ สายกรดอะมิโนของโปรตีน BipD กับสายอะมิโนของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่มีอยู่ในคลังยีน พบว่ามีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนทั้งหมด 3 ตำแหน่ง (ดอกจันทร์) ดังรูป ในลำดับที่ 34 เปลี่ยนจาก A เป็น E และลำดับที่ 292 เปลี่ยนจาก V เป็น M ในลำดับที่ 303 เปลี่ยนจาก T เป็น A สีดำแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส สีเทาเข้มแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด สีเทาอ่อนแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติละลายน้ำ สีขาวแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ

```
SC1-B. pseudomallei K96243  : ATGCGCTACTGGCTGATGAAATCCGAACCGGACGAGGCAAGCATCGACGA :  50
SC1-B. pseudomallei         : ATGCGCTACTGGCTGATGAAATCCGAACCGGACGAGGCAAGCATCGACGA :  50

SC1-B. pseudomallei K96243  : CCTCGCCGCCGCCCCCGACCAGACCTTGCCGTGGACCGGCGTGCGCAACT : 100
SC1-B. pseudomallei         : CCTCGCCGCCGCCCCCGACCAGACCTTGCCGTGGACCGGCGTGCGCAACT : 100

SC1-B. pseudomallei K96243  : ATCAGGCGCGCAACTTCATGCGCGACACGATGCAGATCGGCGACGGCGTG : 150
SC1-B. pseudomallei         : ATCAGGCGCGCAACTTCATGCGCGACACGATGCGGATCGGCGACGGCGTG : 150

SC1-B. pseudomallei K96243  : CTGTTCTACCATTCGAGCTGCCCCGAACCCGGTATCGCCGGGCTCGCGCG : 200
SC1-B. pseudomallei         : CTGTTCTACCATTCGAGCTGCCCCGAACCCGGTATCGCCGGGCTCGCGCG : 200

SC1-B. pseudomallei K96243  : AGTCTCGTCGACGCCCTACCCCGACCCCACGCAGTTCGATTCGCGCAGTC : 250
SC1-B. pseudomallei         : AGTCTCGTCGACGCCCTACCCCGACCCCACGCAGTTCGATTCGCGCAGTC : 250

SC1-B. pseudomallei K96243  : CGTACCACGATCCGAAGTCGACGCGGGAAGCGCCGCGCTGGCTACTCGTC : 300
SC1-B. pseudomallei         : CGTACCACGATCCGAAGTCGACGCGGGAAGCGCCGCGCTGGATGCTCGTC : 300

SC1-B. pseudomallei K96243  : GACGTGCGCTTCGTCAGGAAATCGCCGCTCGTTCCCCTCGCCGCGCTGCG : 350
SC1-B. pseudomallei         : GACGTGCGCTTCGTCAGGAAATCGCCGCTCGTTCCCCTTGCCGCGCTGCG : 350

SC1-B. pseudomallei K96243  : CGAGCACGAGGCGCTCGCGAACATGCGCGTGCTCGCGAAGGGCAACCGGC : 400
SC1-B. pseudomallei         : CGAGCACGAGGCGCTCGCGAACATGCGCGTGCTCGCGAAGGGCAACCGGC : 400

SC1-B. pseudomallei K96243  : TGTCGATCACGCCCGTCACGCCAAACGAGTGGCGCTTCATCACGCAGCGC : 450
SC1-B. pseudomallei         : TGTCGATCACGCCCGTCACGCCAAACGAGTGGCGCTTCATCACGCAGCGC : 450

SC1-B. pseudomallei K96243  : CTGATGAAGTGA : 462
SC1-B. pseudomallei         : CTGATGAAGTGA : 462
```

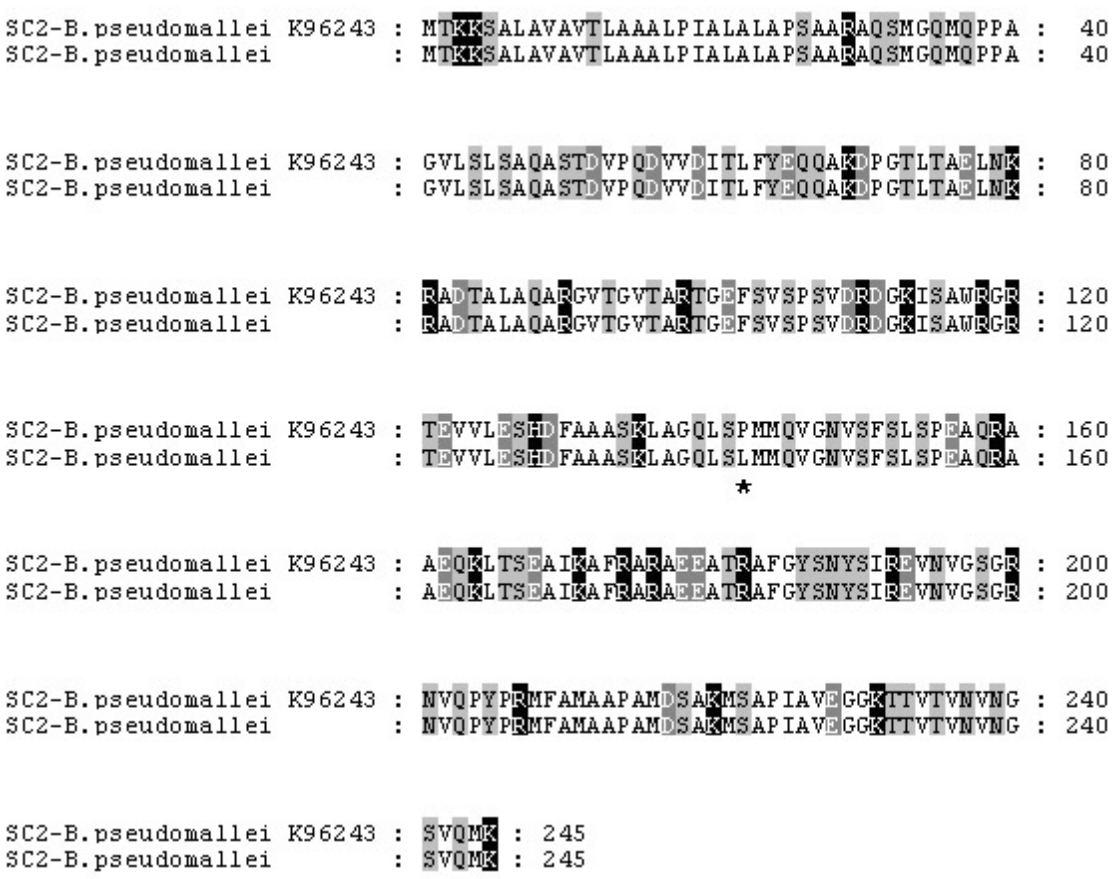
รูปที่ 2E แสดงผลการเปรียบเทียบสายดีเอ็นเอของยีน *Bp3SC1* ที่ได้จากการทำ PCR กับ ยีน *Bp3SC1* ของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่มีอยู่ในคลังยีน พบว่ามีความแตกต่างกันของเบสดีเอ็นเอทั้งหมด 4 ตำแหน่ง (สีทึบ) ดังรูป ในลำดับที่ 134 เปลี่ยนจาก A เป็น G ลำดับที่ 292 เปลี่ยนจาก G เป็น A ลำดับที่ 294 เปลี่ยนจาก A เป็น G และในลำดับที่ 339 เปลี่ยนจาก C เป็น T



รูปที่ 2F แสดงการเปรียบเทียบ สายกรดอะมิโนของโปรตีน Bp3SC1 กับสายอะมิโนของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่มีอยู่ในคลังยีน พบว่ามีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนทั้งหมด 2 ตำแหน่ง (ดอกจันทร์) ดังรูป ในลำดับที่ 45 เปลี่ยนจาก Q เป็น R และลำดับที่ 98 เปลี่ยนจาก V เป็น M สีดำแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส สีเทาเข้มแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด สีเทาอ่อนแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติละลายน้ำ สีขาวแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ

```
SC2-B.pseudomallei K96243 : ATGACGAAAAAATCCGCTCTTGCCGTTGCCGTCACGCTCG :  40
SC2-B.pseudomallei        : ATGACGAAAAAATCCGCTCTTGCCGTTGCCGTCACGCTCG :  40

SC2-B.pseudomallei K96243 : CGGCGGCGCTGCCGATCGCGCTCGCGCTCGCCCCGTCCGC :  80
SC2-B.pseudomallei        : CGGCGGCGCTGCCGATCGCGCTCGCGCTCGCCCCGTCCGC :  80

SC2-B.pseudomallei K96243 : CGCGCGCGCGCAAAGCATGGGGCAGATGCAGCCGCCCGCG : 120
SC2-B.pseudomallei        : CGCGCGCGCGCAAAGCATGGGGCAGATGCAGCCGCCCGCG : 120

SC2-B.pseudomallei K96243 : GGCGTGCTGTCGCTGTCCGCGCAGGCGAGCACCGACGTCC : 160
SC2-B.pseudomallei        : GGCGTGCTGTCGCTGTCCGCGCAGGCGAGCACCGACGTCC : 160

SC2-B.pseudomallei K96243 : CGCAGGACGTCGTCGATATCACGCTGTTCTACGAACAACA : 200
SC2-B.pseudomallei        : CGCAGGACGTCGTCGATATCACGCTGTTCTACGAACAACA : 200

SC2-B.pseudomallei K96243 : GGCGAAGGACCCGGGCACGCTGACCGCGGAGCTGAACAAG : 240
SC2-B.pseudomallei        : GGCGAAGGACCCGGGCACGCTGACCGCGGAGCTGAACAAG : 240

SC2-B.pseudomallei K96243 : CGCGCGGATACGGCGCTCGCGCAGGCGCGCGGGGTCACGG : 280
SC2-B.pseudomallei        : CGCGCGGATACGGCGCTCGCGCAAGCGCGCGGGGTCACGG : 280

SC2-B.pseudomallei K96243 : GCGTCACGGCCCGCACGGGCGAATTCTCGGTGTCGCCGAG : 320
SC2-B.pseudomallei        : GCGTCACGGCCCGCACGGGCGAATTCTCGGTGTCGCCGAG : 320

SC2-B.pseudomallei K96243 : CGTCGATCGCGACGGCAAGATCTCCGCGTGGCGCGGCCGC : 360
SC2-B.pseudomallei        : CGTCGATCGCGACGGCAAGATCTCCGCGTGGCGCGGCCGC : 360

SC2-B.pseudomallei K96243 : ACCGAGGTCGTGCTCGAGTCGCACGACTTCGCGGCCGCAT : 400
SC2-B.pseudomallei        : ACCGAGGTCGTGCTCGAGTCGCACGACTTCGCGGCCGCAT : 400

SC2-B.pseudomallei K96243 : CGAAGCTCGCCGGCCAGTTGAGCCCGATGATGCAGGTGGG : 440
SC2-B.pseudomallei        : CGAAGCTCGCCGGCCAGTTGAGCCTGATGATGCAGGTGGG : 440

SC2-B.pseudomallei K96243 : CAACGTGTCGTTCTCGCTGTCGCCCGAGGCGCAGCGCGCC : 480
SC2-B.pseudomallei        : CAACGTGTCGTTCTCGCTGTCGCCCGAGGCGCAGCGCGCC : 480

SC2-B.pseudomallei K96243 : GCCGAGCAGAAACTCACGTCGGAGGCGATCAAGGCGTTCC : 520
SC2-B.pseudomallei        : GCCGAGCAGAAACTCACGTCGGAGGCGATCAAGGCGTTCC : 520

SC2-B.pseudomallei K96243 : GCGCGCGCGCCGAGGAAGCGACGCGCGCGTTCGGCTACAG : 560
SC2-B.pseudomallei        : GCGCGCGCGCCGAGGAAGCGACGCGTGCGTTCGGCTACAG : 560

SC2-B.pseudomallei K96243 : CAACTACTCGATCCGCGAGGTGAACGTCGGCAGCGGCCGC : 600
SC2-B.pseudomallei        : CAACTACTCGATCCGCGAGGTGAACGTCGGCAGCGGCCGC : 600

SC2-B.pseudomallei K96243 : AACGTGCAGCCGTACCCGCGGATGTTCGCGATGGCCGCGC : 640
SC2-B.pseudomallei        : AACGTGCAGCCGTACCCGCGGATGTTCGCGATGGCCGCGC : 640

SC2-B.pseudomallei K96243 : CCGCGATGGACAGTGCGAAGATGAGCGCGCCGATCGCCGT : 680
SC2-B.pseudomallei        : CCGCGATGGACAGTGCGAAGATGAGCGCGCCGATCGCCGT : 680

SC2-B.pseudomallei K96243 : CGAAGGCGGCAAGACGACCGTGACCGTCAATGTGAACGGC : 720
SC2-B.pseudomallei        : CGAAGGCGGCAAGACGACCGTGACCGTCAATGTGAACGGC : 720
```

รูปที่ 2G แสดงผลการเปรียบเทียบสายดีเอ็นเอของยีน *Bp3SC2* ที่ได้จากการทำ PCR กับ ยีน *Bp3SC2* ของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่มีอยู่ในคลังยีน พบว่ามีความแตกต่างกันของเบสดีเอ็นเอทั้งหมด 3 ตำแหน่ง (สีทึบ) ดังรูป ในลำดับที่ 264 เปลี่ยนจาก G เป็น A และลำดับที่ 425 เปลี่ยนจาก C เป็น T ในลำดับที่ 546 เปลี่ยนจาก C เป็น T



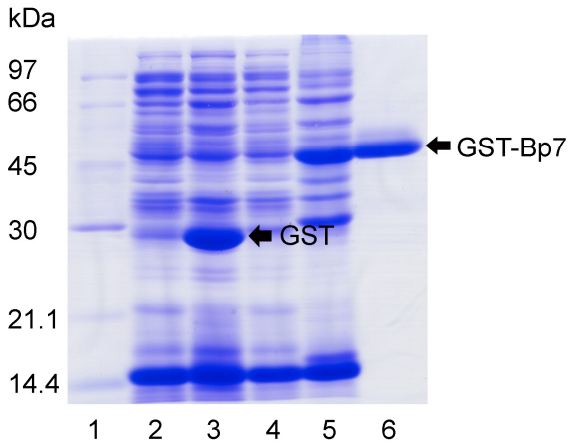
รูปที่ 2H แสดงการเปรียบเทียบ สายกรดอะมิโนของโปรตีน Bp3SC2 กับสายอะมิโนของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่มีอยู่ในคลังยีน พบว่ามีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนทั้งหมด 1 ตำแหน่ง (ดอกจันทร์) ดังรูป ในลำดับที่ 142 เปลี่ยนจาก P เป็น L สีดำแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส สีเทาเข้มแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด สีเทาอ่อนแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติละลายน้ำ สีขาวแสดงกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ

3. การสร้างโปรตีน GST-Bp7, GST-BipD, GST-Bp3SC1 และ GST-Bp3SC2

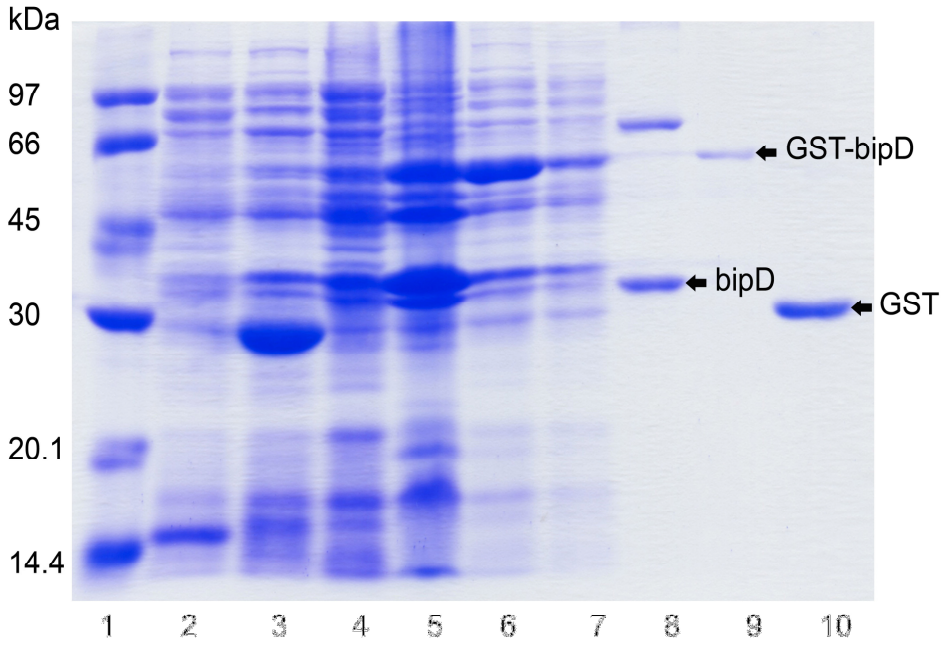
หลังจากที่ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสดีเอ็นเอแล้ว สายดีเอ็นเอที่อยู่ในดีเอ็นเอพาหะ pGEM T-easy จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ออกแบบไว้ในดีเอ็นเอเริ่มต้น (primer) เพื่อนำเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pGEX 4T-1 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอพาหะ สำหรับสร้างโปรตีนจากสายดีเอ็นเอที่นำเข้าไป การเลือกใช้ pGEX 4T-1 เป็นดีเอ็นเอพาหะ ก็เพื่อง่ายต่อการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมที่สร้างขึ้น ด้วยการใช้ GST beads ซึ่งใช้หลักการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบจับจำเพาะ ขนาดโปรตีนของ Bp7, BipD, Bp3SC1 และ Bp3SC2 ที่ได้จากการคำนวณเป็นดังนี้ 28.9, 34, 17.3 และ 25.5 กิโลดาลตัน และขนาดโปรตีนลูกผสมที่สังเกตได้จากการทำ 12% SDS-PAGE เป็นดังนี้ 46 (รูป 3A), 55 (รูป 3B), 37 (รูป 3C) และ 43 (รูป 3D) กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดที่รวมกับโปรตีน Glutathione-s-transferase (GST) ซึ่งมีขนาด 26 กิโลดาลตัน แต่แถบโปรตีนที่ปรากฏในการทำ SDS-PAGE จะมีขนาด 29 กิโลดาลตัน ดังรูป 3A

ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนแต่ละชนิด Bp7, BipD, Bp3SC1 หรือ Bp3SC2 ได้ทำการทดสอบสารละลายโปรตีนแต่ละชนิด กับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิสที่ผ่านการดูดซับ เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าโปรตีนที่ผ่านการสร้างจากดีเอ็นเอพาหะ pGEX 4T-1 สามารถแยกซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิส จากซีรัมรวมของคนปกติได้หรือไม่ (ผลการทดลองได้แสดงในหัวต่อไป) จากการทดลองพบว่าโปรตีน GST-Bp7 และ GST-BipD ให้ผลบวกกับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิส แต่ให้ผลลบกับซีรัมรวมของคนปกติ ดังนั้นจึงนำโปรตีน GST-Bp7 และ GST-BipD ไปทำบริสุทธิ์ต่อไปด้วย GST beads และจากการทดสอบการละลายของโปรตีนกับ PBS บัฟเฟอร์ พบว่าโปรตีน GST-BipD มีการละลายในบัฟเฟอร์ได้ดีกว่าโปรตีน GST-Bp7 จากนั้นนำโปรตีนที่ละลายด้วย PBS บัฟเฟอร์ไปทำบริสุทธิ์ พบว่าโปรตีน GST-BipD สามารถจับจำเพาะกับ GST beads และสามารถทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-BipD ได้ รวมไปถึงสามารถตัดเอาโปรตีน GST ที่เชื่อมต่อกับ โปรตีน BipD ออกได้ ด้วยเอมไซม์ทรอมบิน (thrombin, Sigma®) ทำให้เราได้โปรตีนบริสุทธิ์ BipD ดังรูป 3B

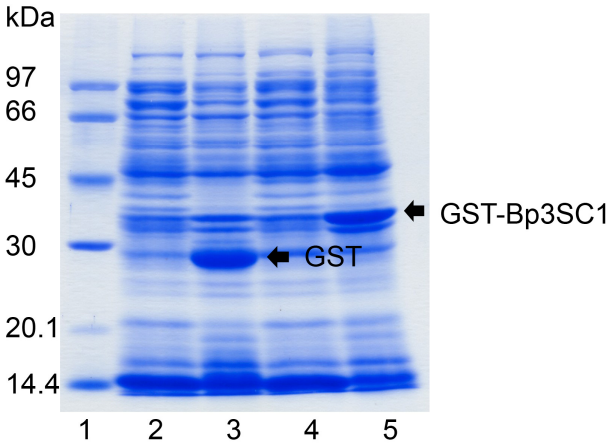
ส่วนโปรตีน GST-Bp7 ที่พบว่าไม่ละลายใน PBS บัฟเฟอร์ หลังจากการทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-Bp7 เราพบว่าโปรตีนดังกล่าวไม่สามารถจับอย่างจำเพาะกับ GST beads และเมื่อทำละลายด้วย 0.05% และ 0.01% SDS ใน PBS บัฟเฟอร์ก็พบว่าโปรตีน GST-Bp7 ละลายได้ดีขึ้น แต่ขณะเดียวกันโปรตีน GST-Bp7 ก็ไม่สามารถจับกับ GST beads ได้ ทำให้ไม่สามารถทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-Bp7 ได้ จึงเปลี่ยนวิธีการทำบริสุทธิ์ จากโครมาโทกราฟฟีแบบจับจำเพาะมาเป็นการสกัดจากเจล SDS-PAGE และผลการทดลองพบว่า สามารถทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-Bp7 ได้ ดังรูปที่ 3A



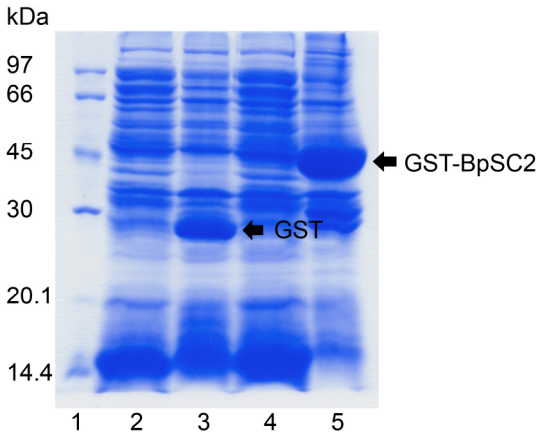
รูปที่ 3A แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GST-Bp7 กับโปรตีน GST ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL-21 ด้วย 12% SDS-PAGE ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน ช่องที่ 2 เซลล์เจ้าบ้านที่มี พลาสมิด pGEX 4T-1 และไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ช่องที่ 3 เซลล์เจ้าบ้านที่พลาสมิด pGEX 4T-1 และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG ช่องที่ 4 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEX 4T-1: Bp7 แต่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ช่องที่ 5 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEX 4T-1: Bp7 และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG ช่องที่ 6 ผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม GST-Bp7 ด้วยวิธีการสกัดจากเจล



รูปที่ 3B แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GST-BipD และโปรตีน GST ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL-21 และตรวจสอบผลการทำบริสุทธิ์โปรตีน BipD ด้วย 12% SDS-PAGE ช่องที่ 1 เป็น โปรตีนมาตรฐาน ช่องที่ 2 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด pGEX 4T-1 และไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ช่องที่ 3 เซลล์เจ้าบ้านที่พลาสมิด pGEX 4T-1 แต่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG ช่องที่ 4 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEX 4T-1: BipD ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ช่องที่ 5 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEX 4T-1: BipD และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG ช่องที่ 6 โปรตีนลูกผสมก่อนผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการจับอย่างจำเพาะกับ GST-beads ช่องที่ 7 โปรตีนลูกผสมหลังผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการจับอย่างจำเพาะ ช่องที่ 8 โปรตีนลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอมไซม์ทรอมบิน (thrombin, Sigma®) จะปรากฏแถบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 30 kDa ซึ่งก็คือโปรตีน BipD ตามที่ลูกศรชี้ และปรากฏแถบโปรตีนขนาด 66 kDa ซึ่งก็คือโปรตีน BSA ช่องที่ 9 ผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม GST-BipD ด้วยวิธีการจับอย่างจำเพาะกับ GST-beads ช่องที่ 10 ผลการทำบริสุทธิ์โปรตีน GST ด้วยวิธีการจับอย่างจำเพาะกับ GST-beads



รูปที่ 3C แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GST-Bp3SC1 และโปรตีน GST ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL-21 ด้วย 12% SDS-PAGE ช่องที่ 1 เป็น โปรตีนมาตรฐานใช้บอกขนาดโปรตีนในช่องอื่นๆ ช่องที่ 2 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด pGEX 4T-1 และไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ช่องที่ 3 เซลล์เจ้าบ้านที่พลาสมิด pGEX 4T-1 แต่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG ช่องที่ 4 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEX 4T-1: Bp3SC1 แต่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ช่องที่ 5 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEX 4T-1: Bp3SC1 และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG



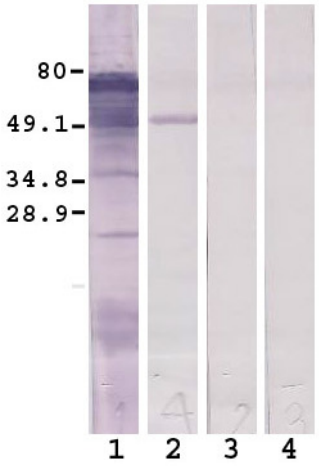
รูปที่ 3D แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Bp3SC2 และโปรตีน GST ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL-21 ด้วย 12% SDS-PAGE ช่องที่ 1 เป็น โปรตีนมาตรฐานใช้บอกขนาดโปรตีนในช่องอื่นๆ ช่องที่ 2 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด pGEX 4T-1 และไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ช่องที่ 3 เซลล์เจ้าบ้านที่พลาสมิด pGEX 4T-1 แต่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG ช่องที่ 4 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEX 4T-1: Bp3SC2 แต่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ช่องที่ 5 เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEX 4T-1: Bp3SC2 และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG

4. การทดสอบโปรตีนลูกผสมเบื้องต้น กับซีรัมรวม ด้วยวิธี Western Blotting

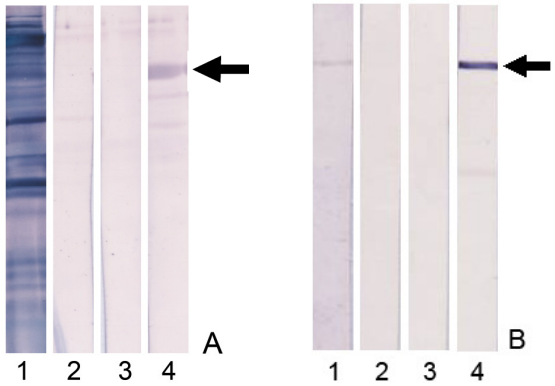
หลังจากที่เหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีนลูกผสมได้เป็นผลสำเร็จแล้ว จึงทำการทดสอบคุณสมบัติโปรตีนลูกผสมดังกล่าว เพื่อการใช้ตรวจหาผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส ด้วยวิธี Western blotting โดยการการเคลื่อนย้ายโปรตีนลูกผสมจากเจล SDS-PAGE สู่ nitrocellulose membrane และนำเมมเบรนที่ผ่านการเคลื่อนย้ายโปรตีน มาทดสอบกับซีรัมรวมของแต่ละกลุ่ม โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ ซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิส ซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิสที่ผ่านการกำจัด แอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว ซีรัมรวมของผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ผ่านการกำจัดแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว และซีรัมรวมของคนที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ ที่ผ่านการกำจัด แอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้วเช่นกัน

ผลการทดสอบโปรตีนลูกผสมพบว่า Bp7 และBipD ให้ผลทดสอบเป็นบวกต่อซีรัมรวมเมลิออยโดซิส และเป็นลบต่อซีรัมรวมของคนปกติ และผู้ป่วยที่ติดเชื้ออื่นๆ แต่ BpSC1

และBpSC2 มีผลทดสอบเป็นลบต่อซีรัมรวมเมลิออยโดซิส รวมไปถึงซีรัมรวมของคนปกติ ผู้ป่วยที่ติดเชื้ออื่นๆ แสดงดังรูปที่ 4A, 4B, 4C, 4D ตามลำดับ

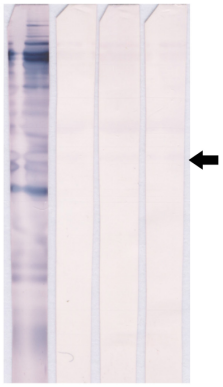


รูปที่ 4A แสดงผลการทำ Western blotting การทดสอบขั้นต้นของโปรตีนสกัดหยาบ GST-Bp7 (42 µg/µl) กับซีรัมรวมกลุ่มต่างๆ ในช่องที่ 1 กับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิส ในช่องที่ 2 กับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิสที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดิ ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว ในช่องที่ 3 กับซีรัมรวมของคนที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ ที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดิ ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว และ ในช่องที่ 4 กับซีรัมรวมของผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดิ ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว

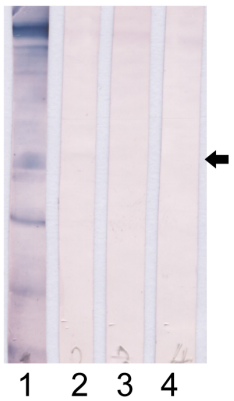


รูปที่ 4B แสดงผลการทำ Western blotting การทดสอบขั้นต้นของโปรตีนสกัดหยาบ GST-BipD (42 µg/µl) ในรูป A และโปรตีนบริสุทธิ์ BipD (6 µg/µl) ในรูป B ในช่องที่ 1 กับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิส ในช่องที่ 2 กับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิสที่ผ่านการดูด

ซับแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว ในช่องที่ 3 กับซีรัมรวมของคนที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ ที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว และ ในช่องที่ 4 กับซีรัมรวมของผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว



รูปที่ 4C แสดงผล การทำ Western blotting การทดสอบขั้นต้นของโปรตีนสกัดหยาบ GST-Bp3SC1 (42 µg/µl) กับซีรัมรวมกลุ่มต่างๆ ในช่องที่ 1 กับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิส ในช่องที่ 2 กับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิสที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว ในช่องที่ 3 กับซีรัมรวมของคนที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ ที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว และ ในช่องที่ 4 กับซีรัมรวมของผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว



รูปที่ 4D แสดงผล การทำ Western blotting การทดสอบขั้นต้นของโปรตีนสกัดหยาบ GST-Bp3SC2 (42 µg/µl) กับซีรัมรวมกลุ่มต่างๆ ในช่องที่ 1 กับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิส ในช่องที่ 2 กับซีรัมรวมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิสที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้า

บ้านออกไปแล้ว ในช่องที่ 3 กับซีรัมรวมของคนที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ ที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว และ ในช่องที่ 4 กับซีรัมรวมของผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ผ่านการดูดซับแอนติบอดี ต่อเซลล์เจ้าบ้านออกไปแล้ว

5. ความไว และความจำเพาะของโปรตีนลูกผสม และโปรตีน

หลังจากการทดสอบเบื้องต้น พบว่าโปรตีนลูกผสม GST-Bp7 และ GST-BipD มีปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส การทดลองขั้นต่อไป จึงดูว่า โปรตีนลูกผสมดังกล่าว สามารถแบ่งแยกกลุ่มผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ออกจากผู้ที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคเมลิออย-โดซิส ได้หรือไม่ ด้วยการทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม GST-Bp7 และ GST-BipD เพื่อลดการเกิดผลบวกปลอม (false positive) จากนั้นนำโปรตีน GST-Bp7 และ GST-BipD ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปทดสอบกับซีรัมแต่ละราย ทั้งหมด 117 ราย ด้วยวิธี Western blotting ผลทดสอบที่ได้นำหาค่าความไว และความจำเพาะ เพื่อบ่งชี้ว่าโปรตีน GST-Bp7 และ GST-BipD สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสได้ หรือไม่

ผลทดสอบพบว่า โปรตีนลูกผสม Bp7 มีความจำเพาะ 74.4% และความไวต่อการเป็นโรคเมลิออยโดซิส 77.8% ส่วนโปรตีนลูกผสม BipD มีความจำเพาะ 90.0% และความไวต่อการเป็นโรคเมลิออยโดซิส 77.8% ดังตารางที่ 5.1 และ 5.2 ตามลำดับ และปริมาณโปรตีนที่ใช้ในทำ Western blotting เท่ากับ 5 µg/ml ซึ่งพบว่าโปรตีน GST เกิด cross reaction จึงได้มีการทดลองต่อไปโดยการตัดส่วนโปรตีน GST ออกด้วยเอนไซม์ทรอมบิน และนำไปทดสอบกับซีรัมอีกครั้ง พบว่าโปรตีนลูกผสม BipD สามารถตัดส่วนโปรตีน GST ออกได้ แต่โปรตีนลูกผสม Bp7 ไม่สามารถตัดได้ จึงได้นำโปรตีน BipD ไปทดสอบต่อไป ผลทดสอบพบว่าโปรตีน BipD มีความจำเพาะ 91.11% และความไวต่อการเป็นโรคเมลิออยโดซิส 100% ดังตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.1 แสดงผลทดสอบโปรตีนลูกผสม GST-Bp7 กับตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 117 ตัวอย่าง การทำ Western blotting

Test result	Reactivity of GST-Bp7 fusion protein	
	Melioidosis	Non Melioidosis
Test Pos.	21	23
Test Neg.	6	67
Total	27	90

Sensitivity of GST-Bp7 fusion protein	77.8%
Specificity of GST-Bp7 fusion protein	74.4%

ตารางที่ 5.2 แสดงผลทดสอบโปรตีนลูกผสม GST-BipD กับตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 117 ตัวอย่าง การทำ Western blotting

Test result	Reactivity of GST-BipD fusion protein	
	Melioidosis serum	Non Melioidosis serum
Test Pos.	21	9
Test Neg.	6	81
Total	27	90

Sensitivity of GST-BipD fusion protein	77.8 %
Specificity of GST-BipD fusion protein	90.0 %

ตารางที่ 5.3 แสดงผลทดสอบโปรตีนลูกผสม BipD กับตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 117 ตัวอย่าง การทำ Western blotting

Test result	Reactivity of BipD protein	
	Melioidosis serum	Non Melioidosis serum
Test Pos.	27	8
Test Neg.	0	82
Total	27	90

Sensitivity of BipD protein	100%
Specificity of BipD protein	91.1%