การผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *Porphyromonas gingivalis*

Specific Antibody Production against *Porphyromonas gingivalis*

บรรเจิด ยะพงศ์

Bunjerd Yapong

050
เลขหมู่ QR187.B3 H21 2540
เลขทะเบียน.....
11 ก.ค. 2540

Order Key...13065...
BIB Key...129827...

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2540

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *Porphyromonas gingivalis*

ผู้เขียน นางบรรเจิด ยะพงศ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2539

บทคัดย่อ

จากรายงานการวิจัยหลายเรื่อง แสดงให้เห็นว่า *Porphyromanas gingivalis* เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบในผู้ใหญ่ การศึกษาความเป็นแอนติเจนและการคิดค้นหาวิธีการตรวจสอบเชื้อดังกล่าว ด้วยวิธีที่ง่าย เร็ว และให้ค่าที่เชื่อถือได้ จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ควรศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของ *P. gingivalis* ATCC 33277 ด้วยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง แล้วละลายใน 10 mM HEPES pH 7.4 ที่มีส่วนผสมของ 0.05 mM PMSF และ 0.3% SLS เก็บ supernatant ที่ได้จากการเตรียมเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก แยกส่วนของ outer membrane ออกมาโดยใช้เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงที่ 100,000 g เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ศึกษาแถบโปรตีนที่อยู่ใน supernatant และ outer membrane โดยวิธี SDS-PAGE ทำการผลิตแอนติบอดีชนิด polyclonal ที่จำเพาะต่อส่วน supernatant และ outer membrane ดังกล่าวในกระต่าย จากการศึกษาความเป็นแอนติเจนของแถบโปรตีนที่ได้โดยวิธี immunoblotting พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ outer membrane ของ *P. gingivalis* ที่ขนาดโมเลกุลระหว่าง 44-98 kDa และทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโปรตีนในส่วน supernatant ที่ขนาดโมเลกุล 44 kDa จากการทดลองพบว่าแอนติบอดีต่อ supernatant ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ขนาด 44 kDa ทั้งในส่วน outer membrane และส่วน supernatant แสดงว่าโปรตีนที่ 44 kDa เป็น common antigen

จากการตรวจความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อแบคทีเรียหลายชนิด โดยวิธี Indirect Immunofluorescence พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อ *P. gingivalis* เท่านั้น ไม่มีการทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ จากวิธีการและความจำเพาะดังกล่าว คาดว่าสามารถนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาทำการตรวจสอบ *P. gingivalis* จาก

ตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบได้ เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัย และรักษาโรคดังกล่าวต่อไป

Thesis Title Specific Antibody Production against *Porphyromonas gingivalis*

Author Mrs.Bunjerd Yapong

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1996

Abstract

Many studies revealed that *Porphyromonas gingivalis* plays important role in adult periodontitis. A simple, rapid and accurate method for microbial detection, as well as the study of its antigenicity is needed.

In this study, *P. gingivalis* ATCC 33277 was ultrasonically disrupted in a solubilizing solution containing 10 mM HEPES, pH 7.4, 0.05 mM PMSF and 0.3% SLS. The supernatant fraction was collected. The pellet was then dissolved in the solubilizing solution. The outer membrane was isolated by centrifugation at 100,000 g for 2 h. The extract proteins of each fraction were then characterized by using SDS-PAGE. Polyclonal antibodies against these two fractions of *P. gingivalis* were raised in rabbits. Immunoblotting was used to indicate the antigenicity of characterized proteins. Six major proteins of outer membrane ranging from 44 to 98 kDa were recognized by sera raised against the supernatant. The 44 kDa protein exhibited obvious reaction in both supernatant and outer membrane fractions so the 44 kDa surface protein seems to be a common antigen.

The antibody specificity was determined by indirect immunofluorescence. Only *Porphyromonas gingivalis* gave a positive result and no cross-reactivity with other bacteria was found. The detection of *P. gingivalis* in subgingival dental plaque samples from adult periodontitis patients using the specific antibody was expected. Clinical diagnosis and treatment will be further implicated.