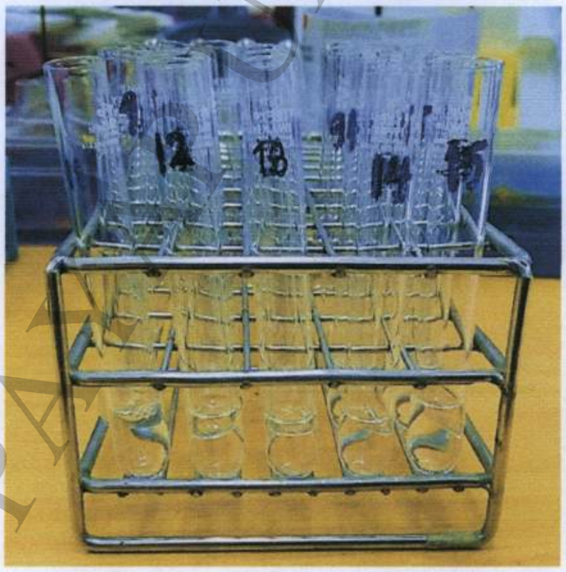
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ X-73

ผลจากการคัดแยกโปรตีนด้วยเครื่องแยกโปรตีนอัตโนมัติ Model AE-6760 NATIVEN (ATTO) ต่อเข้ากับเครื่องรับแยกโปรตีน Fraction collector (ATTO) จะได้โปรตีน OmpH ที่อยู่ในสารละลาย collection buffer ที่มีองค์ประกอบของ 371 mM Tris และ 5% Sucrose pH 8.8 ซึ่งจะได้ fraction โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดต่างๆกันอยู่ในสารละลาย collection buffer (รูปที่ 14) เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตรวจหาความบริสุทธิ์ของโปรตีนต่อไปแล้วนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE ต่อไป



รูปที่ 16 สารละลายโปรตีนที่ได้จากเครื่อง Fraction collector

เมื่อนำ rOmpH fractions มาทำ SDS-PAGE โดยใช้ 12.5% SDS-polyacrylamide gel และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue พบว่าแถบโปรตีนจาก rOmpH fractions มีลักษณะ

PAYAP UNIVERSITY

เป็นเส้นเดี่ยวและมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลตรงกับโปรตีนเป้าหมายที่สนใจศึกษา (ประมาณ 39 KDa) ที่พบในแถบโปรตีนส่วนใหญ่ที่ได้จาก Whole cell Lysate ของ *E. coli* host (ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์) ดังภาพที่ 17

รูปที่ 17 แสดงการนำโปรตีน rOmpH fraction ที่ได้จากเครื่อง electroelutor มาทำ SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue

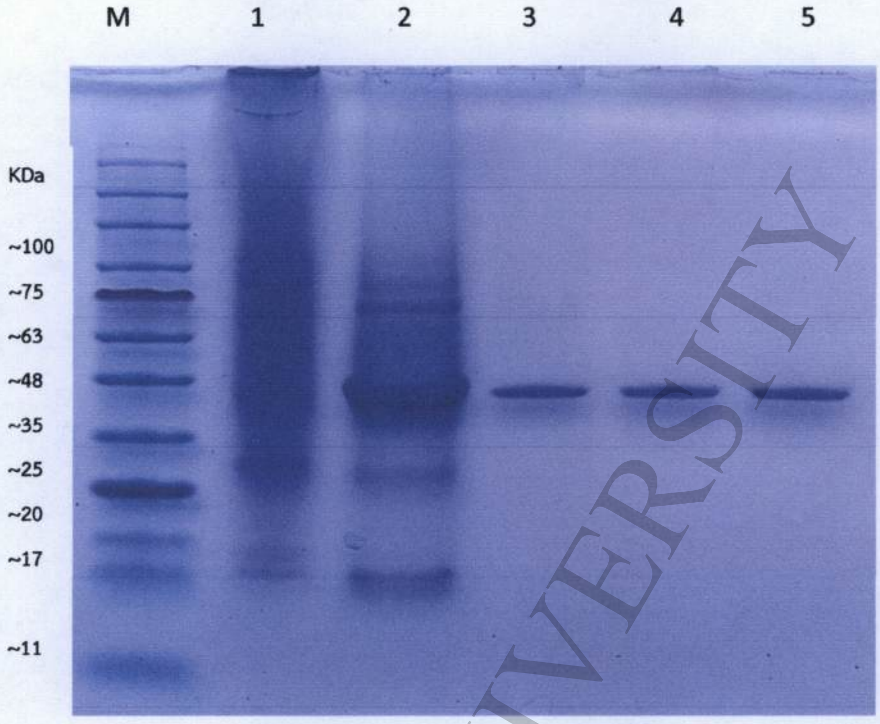
โดย Lane M : BLUeye Prestained Protein Ladder

Lane 1 : Whole cell Lysate ของ *E. coli* host (ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์)

Lane 2-9 : rOmpH fractions ที่ได้จาก electroelutor

เมื่อนำโปรตีน rOmpH ที่อยู่ในสารละลาย collection buffer มาตรวจความบริสุทธิ์เทียบกับ Whole cell Lysate ของ *E. coli* host (ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์) และ Whole cell Lysate ของ *P. multocida* (สายพันธุ์ X-73) ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้เจลสำเร็จรูปจาก NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels ขนาด 1.0 mmx10 well แล้วย้อมสีด้วยสี Coomassie brilliant blue พบว่า rOmpH ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเครื่อง electroelutor ให้แถบโปรตีนตรงกับโปรตีนเป้าหมายที่สนใจศึกษา (ประมาณ 39 KDa) ซึ่งพบในแถบโปรตีนส่วนใหญ่ที่ได้จาก Whole cell Lysate ของ *E. coli* host (ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์) และยังพบใน Whole cell Lysate ของ *P. multocida* (สายพันธุ์ X-73) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคอหิวาต์สัตว์ปีกที่มีในประเทศไทย ดังภาพที่ 18

PAYAP UNIVERSITY



รูปที่ 18 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่อยู่ในสารละลาย collection buffer เทียบกับ Whole cell lysate ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสีด้วยสี Coomassie Briliant Blue

โดย Lane M : BLUeye Prestained Protein Ladder

Lane 1 : Whole cell Lysate ของ *P. multocida* (สายพันธุ์ X-73)

Lane 2 : Whole cell Lysate ของ *E. coli* host (ก่อนนำไปทำให้บริสุทธ์)

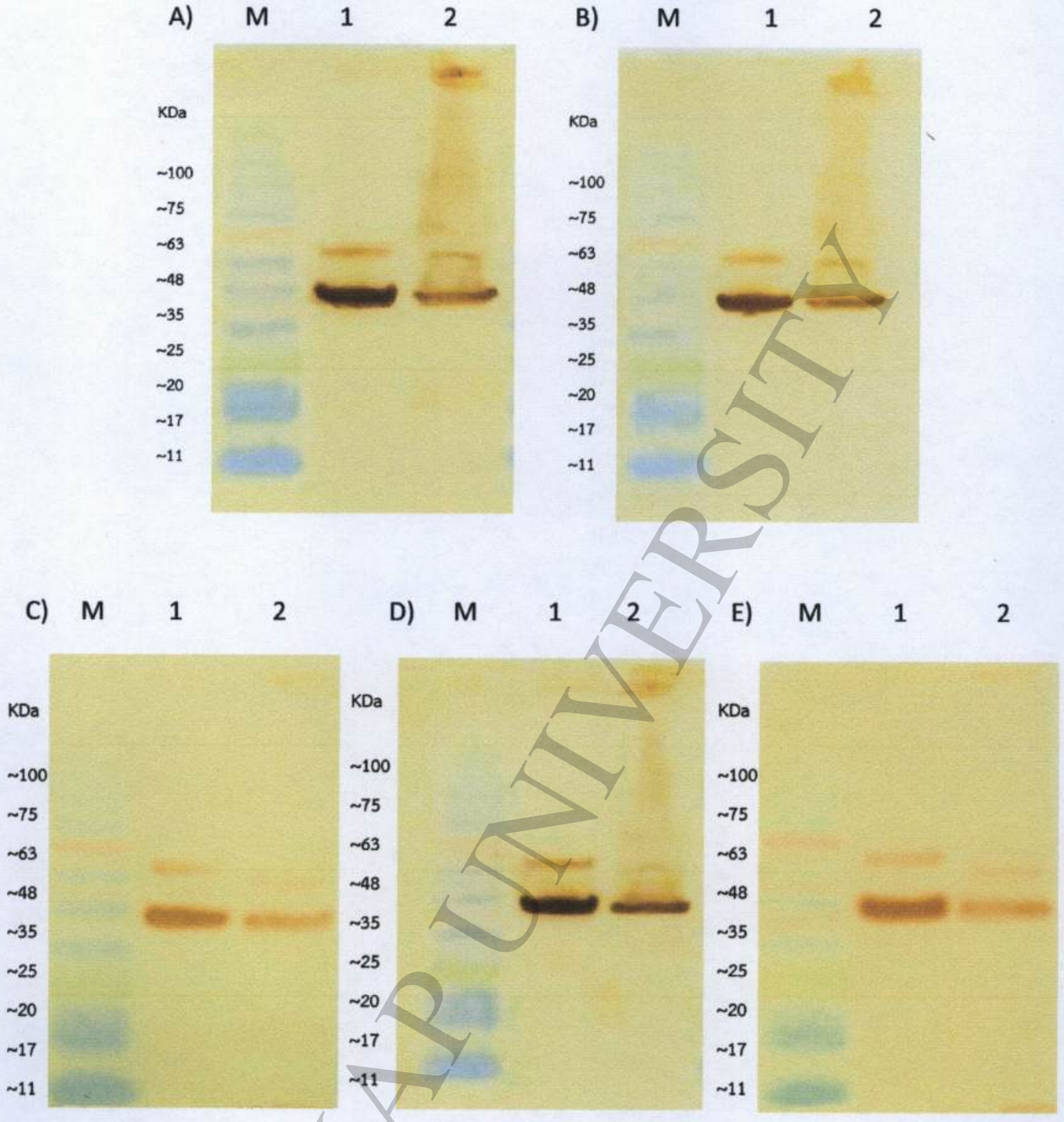
Lane 3 – 5 : rOmpH fractions ที่ได้จาก electroelutor

PAYAP UNIVERSITY

4.2 ผลศึกษาลักษณะเฉพาะของแอนติบอดีจากเป็ดต่อโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein (Omp) H ในการทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ *P. multocida* ที่คัดแยกจากเป็ดที่เป็นโรคด้วยวิธี Western blot

ทดสอบแอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมของเป็ดแต่ละกลุ่ม โดยใช้ Polyacrylamide slab gel ที่ความเข้มข้น 12.5% หลังจากนั้นจะใช้การเคลื่อนย้ายโปรตีนจากเจลไปยัง nitrocellulose membrane ใช้แอนติบอดีตัวแรกเป็น duck serum anti-OmpH/X-73 และใช้แอนติบอดีตัวที่ 2 เป็น HRP conjugated mouse anti-duck IgY antibody พบว่าตัวอย่างซีรัมของเป็ดทั้ง 5 ตัวอย่าง ที่ได้จากกลุ่มที่เคยได้รับโปรตีนลูกผสม OmpH จะมีแถบของโปรตีนส่วนใหญ่ตรงกับแถบของโปรตีนลูกผสมที่ได้จากเครื่อง electroelutor (ประมาณ 39 KDa) ดังรูปที่ 19

PAYAP UNIVERSITY



รูปที่ 19 A) – E) แสดงแถบโปรตีนแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของเป็ดกลุ่มที่ได้รับโปรตีนลูกผสมบนแผ่น nitrocellulose membrane

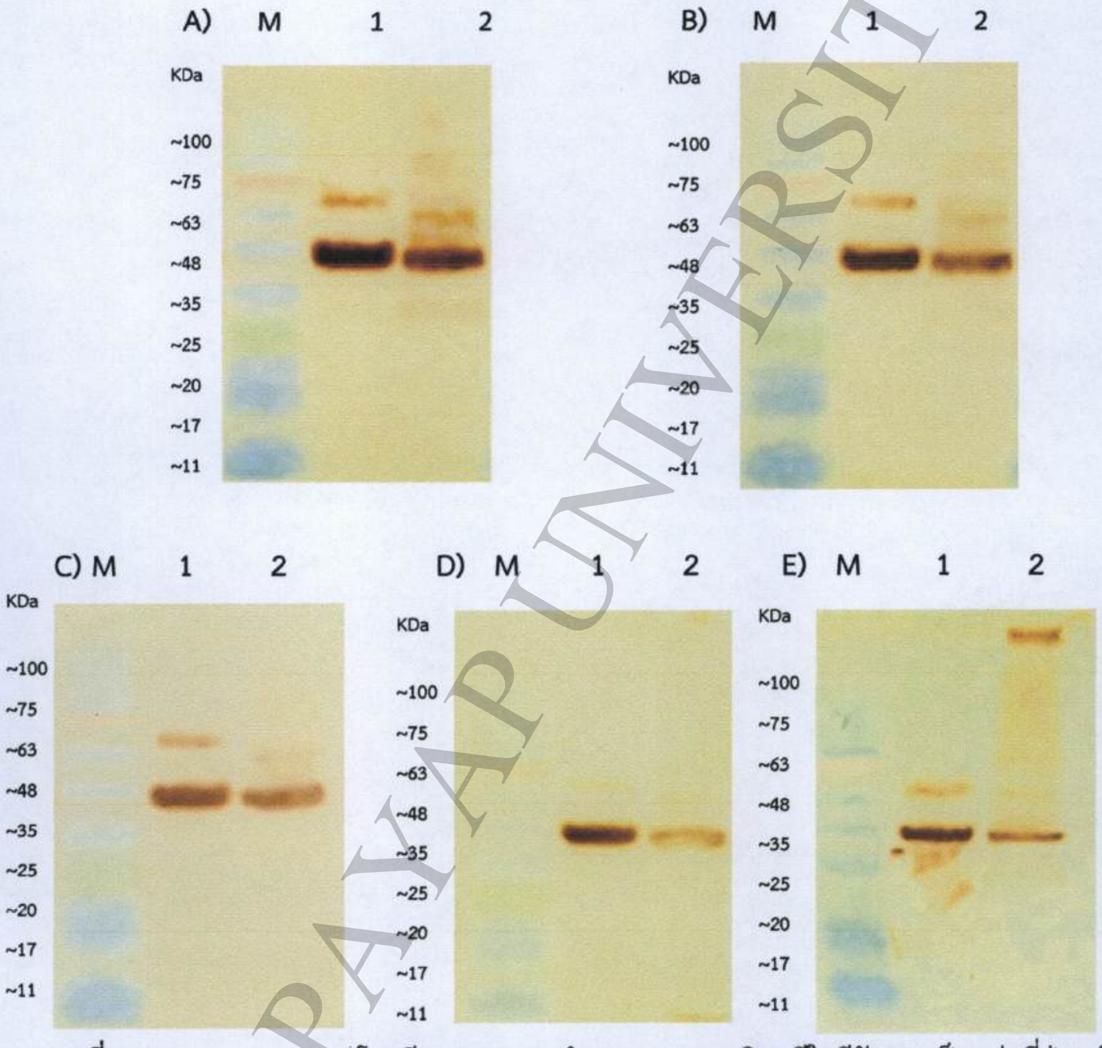
โดย Lane M : BLUeye Prestained Protein Ladder

Lane 1 : rOmpH fractions ที่ได้จาก electroelutor

Lane 2 : Whole cell Lysate ของ *P. multocida* (สายพันธุ์ X-73)

PAYAP UNIVERSITY

เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีของเป็ดต่อโปรตีนลูกผสม OmpH ของเชื้อ *P. multocida* ต่อ Whole cell Lysate ของ *P. multocida* (สายพันธุ์ X-73) ที่คัดแยกจากเป็ดที่เป็นโรคด้วยวิธี Western blot พบว่าตัวอย่างซีรัมของเป็ดที่คัดแยกจากเป็ดที่เป็นโรค ทั้ง 5 ตัวอย่าง จะมีแถบของโปรตีนส่วนใหญ่ตรงกับแถบของโปรตีนลูกผสมที่ได้จากเครื่อง electroelutor (ประมาณ 39 KDa) ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 A) – E) แสดงแถบโปรตีนแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของเป็ดกลุ่มที่ป่วยเป็นโรคอหิวาต์สัตว์ปีกบนแผ่น nitrocellulose membrane

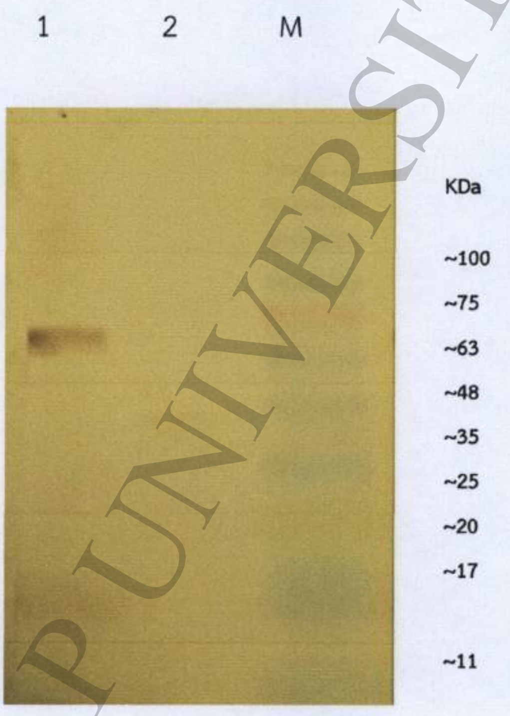
โดย Lane M : BLUeye Prestained Protein Ladder

Lane 1 : rOmpH fractions ที่ได้จาก electroelutor

Lane 2 : Whole cell Lysate ของ *P. multocida* (สายพันธุ์ X-73)

PAYAP UNIVERSITY

เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีของเป็ดที่ไม่ได้รับการฉีดโปรตีนลูกผสม OmpH ของเชื้อ *P. multocida* เทียบกับโปรตีนที่ได้จากโปรตีนลูกผสมที่ได้จากเครื่อง electroelutor ด้วยวิธี Western blot พบว่าตัวอย่างซีรัมของเป็ดที่ไม่ป่วยเป็นโรคอหิวาต์สัตว์ปีกและไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนลูกผสม OmpH ของเชื้อ *P. multocida* (กลุ่มควบคุมลบ) ไม่มีแถบโปรตีนที่ขึ้นตรงกับโปรตีนลูกผสมที่ได้จากเครื่อง electroelutor (ประมาณ 39 KDa) ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 แสดงแถบโปรตีนแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของเป็ดกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดโปรตีนลูกผสม OmpH และ ไม่ป่วยเป็นโรคอหิวาต์สัตว์ปีก บนแผ่น nitrocellulose membrane

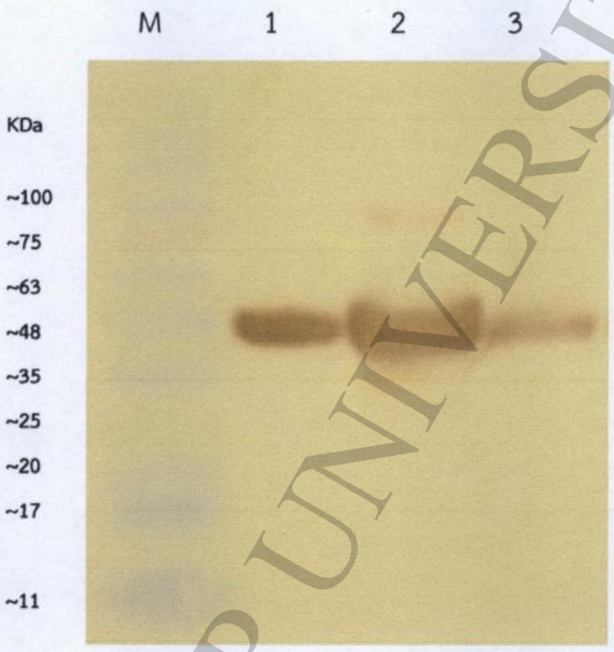
โดย Lane 1 : Whole cell Lysate ของ *P. multocida* (สายพันธุ์ X-73)

Lane 2 : rOmpH fractions ที่ได้จาก electroelutor

Lane M : BLUeye Prestained Protein Ladder

PAYAP UNIVERSITY

เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีของเป็ดที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีก จากกรมปศุสัตว์ เทียบกับโปรตีนที่ได้จากโปรตีนลูกผสมที่ได้จากเครื่อง electroelutor ด้วยวิธี Western blot พบว่ามีแถบโปรตีนจากซีรัมของเป็ดที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกจากกรมปศุสัตว์ (กลุ่มควบคุมบวก) ตรงกับโปรตีนลูกผสมที่ได้จากเครื่อง electroelutor (ประมาณ 39 KDa) ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงแถบโปรตีนแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของเป็ดกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีก จากกรมปศุสัตว์ บนแผ่น nitrocellulose membrane

โดย Lane M : BLUeye Prestained Protein Ladder

Lane 1 : rOmpH fractions ที่ได้จาก electroelutor

Lane 2 : Whole cell Lysate ของ *E. coli* host (ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์)

Lane 3 : Whole cell Lysate ของ *P. multocida* (สายพันธุ์ X-73)

PAYAP UNIVERSITY