

156A00

## รายงานการวิจัย

เรื่อง

คุณสมบัติของแอนติบอดีของเป็ดต่อโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein (Omp) H ในการทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่คัดแยกจากเป็ดที่เป็นโรคด้วยวิธี Western blot

Characterization of Duck Antibody Against Recombinant Outer Membrane Protein (Omp) H to *Pasteurella multocida* Strains Isolated From Duck by Western Blotting

โดย

พิชญานุช พูลเพิ่ม และคณะ

รายงานวิจัย ฉบับที่ 325



พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยพายัพ

ชื่อเรื่อง คุณสมบัติของแอนติบอดีของเปิดต่อโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein (Omp) H ในการทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่คัดแยกจากเปิดที่เป็นโรคด้วยวิธี Western blot

ชื่อคณะนักวิจัย พิชญานุช พูลเพิ่ม และคณะ

ปี 2558

คำสำคัญ: *Pasteurella multocida*, Outer membrane protein (Omp) H, Western blot

### บทคัดย่อ

พาสจูเรลล่า มัลโตซิเดา (*Pasteurella multocida*) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ เป็นสาเหตุของโรคคอหิวตัสต์สัตว์ปีก (fowl cholera) มีปัจจัยก่อโรคสำคัญ เช่น outer membrane protein (Omp) H หรือ porin H (มวลโมเลกุลประมาณ 39 กิโลดาลตัน) ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้ตัวเชื้อยึดเกาะกับโฮสต์ได้ จากผลการศึกษาแอนติบอดีจากเปิดต่อโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein H (rOmpH) ในการทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่คัดแยกจากเปิดที่เป็นโรคพบว่า พบว่าซีรัมของเปิดทั้งที่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนลูกผสม OmpH ซีรัมของเปิดที่ป่วยเป็นโรคคอหิวตัสต์สัตว์ปีก และซีรัมของเปิดที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคคอหิวตัสต์สัตว์ปีกต่างก็ให้แถบโปรตีนที่ตรงกับแถบของโปรตีนลูกผสมที่ได้จากเครื่อง electroelutor อย่างชัดเจน (มวลโมเลกุลประมาณ 39 กิโลดาลตัน) แสดงถึงคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสม OmpH ที่สามารถกระตุ้นให้เปิดสามารถสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนนี้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเปิดที่ติดเชื้อคอหิวตัสต์สัตว์ปีกและเปิดที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคนี้อีกต่างก็สามารถสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อโปรตีน OmpH ได้เช่นกัน ดังนั้นโปรตีนลูกผสม OmpH จึงมีคุณสมบัติเบื้องต้นเหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการศึกษาพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันและควบคุมโรคคอหิวตัสต์สัตว์ปีกโดยเฉพาะในเปิดได้ต่อไป

**Title:** CHARACTERIZATION OF DUCK ANTIBODY AGAINST RECOMBINANT OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP) H TO *PASTEURELLA MULTOCIDA* STRAINS ISOLATED FROM DUCK BY WESTERN BLOTTING

**Researchers:** Poolperm et al.

**Year** 2015

**Key words:** *Pasteurella multocida*, Outer membrane protein (Omp) H, Western blot

### Abstract

*Pasteurella multocida* is a gram-negative bacterium. It is a causative agent of fowl cholera. The specific bacterial virulence factors is outer membrane protein (Omp) H or porin H (molecular mass ~39 KDa) which plays important roles in host cell adhesion. Characterization of duck antibody against recombinant outer membrane protein H (rOmpH) to *Pasteurella multocida* strains isolated from duck found recombinant outer membrane protein H fractions from electroelutor have shown nice clear bands with the same target molecular mass as immunized rOmpH, fowl cholera and vaccinated duck serum (molecular mass ~39 KDa). These properties of rOmpH proteins can induce duck antibody response. Moreover, the finding showed that fowl cholera duck and vaccinated duck could produced antibody response to OmpH proteins, so rOmpH is a good antigen for vaccine development to control and prevention of fowl cholera in duck.

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง คุณสมบัติของแอนติบอดีของเปิดต่อโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein (Omp) H ในการทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่คัดแยกจาก เป็ดที่เป็นโรคด้วยวิธี Western blot สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะผู้บริหารและเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ เครื่องใช้ต่างๆ จนงานวิจัยสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ ผู้ประเมินผลรายงานวิจัยและผู้วิจารณ์งานวิจัย ซึ่งคำแนะนำของท่าน เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงรายงานการวิจัยให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยพายัพที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2558

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
คำย่อและสัญลักษณ์	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	3
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 อหิวาต์สัตว์ปีก	5
2.2 การบอกคุณลักษณะของโปรตีน (Characterization): โดยใช้เทคนิค Electrophoresis	18
2.3 การทำ Western blot	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	24
3.1 เตรียมโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรีย <i>P. multocida</i> สายพันธุ์ X-73	24
3.2 ตัวอย่างซีรัมเปิด	30

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอนติบอดีจากเปิดต่อโปรตีนลูกผสม	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย	32
4.1 การเตรียมโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรีย <i>P. multocida</i> สายพันธุ์ X-73	32
4.2 ผลศึกษาลักษณะเฉพาะของแอนติบอดีจากเปิดต่อโปรตีนลูกผสม	35
บทที่ 5 สรุปผลงานวิจัยและข้อเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม	42
ประวัตินักวิจัย	47
ภาคผนวก	54

PAYAP UNIVERSITY

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงรูปร่างของ เชื้อ <i>P. multocida</i> เมื่อย้อมด้วยสี Gram's stain	6
2. ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของ <i>P. multocida</i>	7
3. ส่วนประกอบของส่วนห่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ	10
4. ตับที่มีเลือดคั่งของไก่ที่เสียชีวิตจากโรคอหิวาต์สัตว์ปีก	14
5. ภาพจุดเลือดออกที่อวัยวะภายในจากซากไก่ที่เสียชีวิตจากโรคอหิวาต์สัตว์ปีก	15
6. แสดงไขแดงแตกในช่องท้องของซากไก่ที่เสียชีวิตจากโรคอหิวาต์สัตว์ปีก	15
7. แสดงโคโลนีของเชื้อ <i>P. multocida</i> สายพันธุ์ X-73 / ซีโรวาร์ A:1	17
8. การแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE	21
9. การตรวจติดตามผลวิธี Western blot	22
10. แสดงการเตรียมเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> ที่มีฮีนในส่วน Outer membrane protein จากเชื้อ <i>P. multocida</i>	25
11. การแยกโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง Electroelutor	27
12. แสดงเจลสำเร็จรูป (NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels)	28
13. เอกสารกำกับวิธีการใช้ NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels	29
14. แสดงเครื่องมือตรวจความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย XCell SureLock Mini cell set	29
15. เชื้อ <i>Pasteurella multocida</i> สายพันธุ์ X-73	30

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
16. สารละลายโปรตีนที่ได้จากเครื่อง Fraction collector	32
17. แสดง rOmpH fraction ที่ได้จากเครื่อง electroelutor มาทำ SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue	33
18. แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่อยู่ในสารละลาย collection buffer เทียบกับ Whole cell lysate	34
19. แสดงแถบโปรตีนแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของเป็ดกลุ่มที่ ได้รับโปรตีนลูกผสม	36
20. แสดงแถบโปรตีนแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของเป็ดกลุ่มที่ป่วยเป็นโรคหิวาต์สัตว์ปีก	37
21. แสดงแถบโปรตีนแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของเป็ดกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดโปรตีนลูกผสม OmpH และ ไม่ป่วยเป็นโรคหิวาต์สัตว์ปีก	38
22. แสดงแถบโปรตีนแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของเป็ดกลุ่มที่ ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคหิวาต์สัตว์ปีก จากกรมปศุสัตว์	39



## คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

1°Ab	Primary antibody
APS	Ammonium persulfate
kDa	Kilo-dalton
HIV	Human immunodeficiency virus
IgG	Immunoglobulin G
mg	Milligram
mM	Millimolar
M	Molar
ng	Nanogram
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sodium hydrogen phosphate
NaOH	Sodium hydroxide
Omp	Outer membrane protein
OmpH	Outer membrane protein H
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	revolutions per minute

## คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

*P. multocida**Pasteurella multocida*

SDS

Sodium dodecyl sulfate

Tris - HCl

Tris-Hydrochloride

PAYAP UNIVERSITY