

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณเงินรายได้
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

การโคลนยีนและการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อ
Pseudomonas aeruginosa ซึ่งวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบ
จีโนมและการผลิตโพลีโคลนอนแอนติบอดี

ปริญทร์ ชัยวิสุทธิธำรงกูร
ศิวาพร ลงยันต์ ภัทริน ศรีดุลงกุลย์ ไพศาล สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

ได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ PA4175 (protease IV), PA0026 (phospholipase C, PlcB) และ PA4625HA (hypothetical protein ที่มี heamagglutination activity domain) ที่พบเฉพาะในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นผลจากการเปรียบเทียบจีโนมของ *Pseudomonas* รวมทั้งการใช้ blastp โดยทำการเพิ่มจำนวนยีนทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และโคลนเข้าสู่ expression vector และนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ภายหลังการกระตุ้นพบว่าสามารถผลิตโปรตีนลูกผสม maltose binding protein (MBP)-tagged PA4175 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 98.8 กิโลดาลตัน โปรตีนลูกผสม glutathione-S-transferase (GST)-tagged PA0026 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 62.7 กิโลดาลตัน และโปรตีนลูกผสม GST-tagged PA4625HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 37 กิโลดาลตัน เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดย SDS-PAGE ได้นำไปใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูเพื่อผลิตแอนติซีรัม เมื่อตรวจสอบโดยวิธี dot blotting พบว่าแอนติซีรัมต่อ PA4175 สามารถจับกับ *P. aeruginosa* ได้ 11 isolate จาก 22 isolate ที่นำมาทดสอบ และพบว่ามี การแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *P. fluorescens* 2 isolate และ *P. chlororaphis*, *P. oleovorans*, *P. putida* ชนิดละ 1 isolate พบว่าแอนติซีรัมต่อ PA0026 สามารถจับกับ *P. aeruginosa* ได้ 21 isolate จาก 22 isolate แต่พบว่ามี การแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *P. fluorescens* 2 isolate และ *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. stutzeri* ชนิดละ 1 isolate และพบว่าแอนติซีรัมต่อ PA4625HA สามารถจับกับ *P. aeruginosa* ได้ 21 isolate จาก 22 isolate แต่พบว่ามี การแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *P. fluorescens* 2 isolate และ *P. chlororaphis*, *P. japonica*, *P. putida* ชนิดละ 1 isolate

ผลจากงานวิจัยนี้หากมีการพัฒนางานวิจัยต่อยอดเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวินิจฉัยเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อไปในอนาคต

Abstract

Polyclonal antibodies specific to three recombinant proteins including PA4175 (protease IV), PA0026 (phospholipase C, PlcB) and PA4625HA (hypothetical protein containing heamagglutination activity domain), found only in *Pseudomonas aeruginosa* were produced. These three *P. aeruginosa*-specific proteins were analyzed by comparative genomics and blastp analysis. Each gene was amplified by PCR, cloned into an expression vector and transformed into *E. coli* BL21. After induction, maltose binding protein (MBP)-tagged PA4175 with molecular mass of 98.8 kDa, glutathione-S-transferase (GST)-tagged PA0026 with molecular mass of 62.7 kDa and GST-tagged PA4625HA with molecular mass of 37 kDa were produced. Each purified recombinant protein was used to immunize mice for production of polyclonal antibody. Using dot blot analysis, the antiserum against PA4175 demonstrated immunoreactivity to 11 isolates of *P. aeruginosa* out of 22 isolates tested. The antibody also displayed cross reaction to 2 isolates of *P. fluorescens* and each isolate of *P. chlororaphis*, *P. oleovorans*, and *P. putida*. The antiserum against PA0026 demonstrated immunoreactivity to 21 isolates of *P. aeruginosa* out of 22 isolates tested. The antibody also displayed cross reaction to 2 isolates of *P. fluorescens* and each isolate of *P. chlororaphis*, *P. putida*, and *P. stutzeri*. The antiserum against PA4625HA demonstrated immunoreactivity to 21 isolates of *P. aeruginosa* out of 22 isolates tested. The antibody also displayed cross reaction to 2 isolates of *P. fluorescens* and each isolate of *P. chlororaphis*, *P. japonica*, and *P. putida*.

Based on this polyclonal antibody production, the generation of monoclonal antibody specific to *P. aeruginosa* without cross reaction to other bacterial species would be helpful for *P. aeruginosa* detection in the future.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนสนับสนุนการวิจัย หอมดวงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2552 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

30 มีนาคม 2554



สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีดำเนินการวิจัย	6
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	10
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	18
เอกสารอ้างอิง	21
ประวัติย่อหัวหน้าโครงการวิจัย	25



บัญชีภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1	5
รูปที่ 2	10
รูปที่ 3	11
รูปที่ 4	11
รูปที่ 5	12
รูปที่ 6	13
รูปที่ 7	14
รูปที่ 8	14
รูปที่ 9	15
รูปที่ 10	15
รูปที่ 11	16
รูปที่ 12	16
รูปที่ 13	17



บทที่ 1

บทนำ

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสภาวะแวดล้อมที่มีความชื้น เนื่องจาก *P. aeruginosa* ก่อให้เกิดโรคในคนได้จึงทำให้ได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยเป็นอย่างมาก เชื้อนี้มักก่อโรคในผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาล ผู้ที่เป็นมะเร็งหรือผู้ที่มีแผลไฟไหม้ สาเหตุการตายของผู้ป่วยพบว่าเกี่ยวข้องกับภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ การดื้อยาของเชื้อและการที่เชื้อสามารถผลิต extracellular enzyme และ toxin (Iglewski BH, 1996)

เชื้อ *P. aeruginosa* จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อให้เกิดการติดเชื้อได้หลายระบบ ทั้งในผู้ที่ได้รับการผ่าตัด มีแผลไฟไหม้ การติดเชื้อในระบบปัสสาวะพบได้บ่อยในผู้ที่ใส่สายสวนปัสสาวะและที่สำคัญคือพบในผู้ป่วยโรค cystic fibrosis (Elkin et al., 2003) และก่อให้เกิดการตายได้ นอกจากนี้เชื้อ *P. aeruginosa* ยังก่อให้เกิดโรคปอดบวมได้ในผู้ที่ใช้เครื่องช่วยหายใจที่มีการ contamination ของเชื้อนี้ สำหรับอวัยวะระบบอื่นๆ อาจก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระดูกตา หู ขั้วกลาง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ หรือ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด ประมาณร้อยละ 15 ของสาเหตุที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบ และพบว่าผู้ที่ติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในกระแสเลือด จะมีอัตราการตายประมาณร้อยละ 50 (Iglewski BH, 1996)

นอกจากเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดโรคแก่มนุษย์แล้ว การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ยังก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมเลี้ยงปลา ซึ่งโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* คือโรคแผลตามลำตัว (Ulcerative disease) และเป็นยังเป็นสาเหตุให้ปลาติดโรคเชื้อราแทรกซ้อนต่อไป ปลาที่มักพบบ่อยว่าเป็นโรคนี้ได้แก่ ปลาดุก ปลาน้ำ ปลาช่อน และปลาสวยงามต่าง ๆ (Austin and Austin, 1999; Noga, 2000) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย

สำหรับวิธีการที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *P. aeruginosa* แบบดั้งเดิม (conventional method) คือการทดสอบทางชีวเคมีทั้งแบบมาตรฐานและการใช้ชุดตรวจเชิงพาณิชย์ ซึ่งการตรวจโดยวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ช้า และใช้ระยะเวลาในการตรวจนาน และผลที่ได้อาจไม่ถูกต้อง (Kiska and Gilligan, 1999; Kiska et al., 1996) ทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปอย่างล่าช้า จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจด้วยวิธีทางโมเลกุล (molecular method) โดยการใช้เทคนิค PCR โดยมีการตรวจหาชิ้นเป้าหมายเช่น 16S rDNA, *oprI*, *oprL* (Jaffe et al., 2001; Lavenir et al., 2007; Qin et al., 2003) แต่ยังคงมีปัญหาในเรื่องของความจำเพาะเนื่องจากมีการแลกเปลี่ยนยีนกับ non-*P. aeruginosa* นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการพบผลบวกปลอมกับการตรวจยีน *toxA* และ *algD* (Lavenir et al., 2007; Qin et al., 2003) อย่างไรก็ตาม ได้มีรายงานว่า การตรวจหาชิ้นที่จำเพาะต่อ *P. aeruginosa* ทั้ง 2 ยีนพร้อมกันคือ *ecfX* และ

gyrB โดยวิธี duplex real-time PCR ให้ผลที่ถูกต้องสูงมาก (Anuj et al., 2008) อย่างไรก็ตามวิธีมีค่าใช้จ่ายที่สูง ซึ่งต้องมีเครื่องมือเฉพาะ และผู้ทำการวิจัยต้องมีความรู้ความชำนาญ

ดังนั้นการศึกษานี้จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ในการนำวิธีทางภูมิคุ้มกันมาใช้ตรวจเชื้อ *P. aeruginosa* โดยมีการนำเทคนิค comparative genomics วิเคราะห์หา *P. aeruginosa* specific proteins และผลิตเป็น recombinant proteins เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว โดยจะผลิตเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* แอนติบอดีนี้คาดว่าจะสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชนิดนี้ โดยใช้เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความแม่นยำสูง ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วและไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาต่อไปเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเพื่อการวินิจฉัยเชื้อ *P. aeruginosa* แบบ strip test ต่อไปในอนาคต



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีความหลากหลายมาก สมาชิกของเชื้อ *Pseudomonas* พบได้ทั้งในสภาวะแวดล้อมตามพื้นดินและทางทะเล และมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อทั้งในพืชและสัตว์ จากการพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้มีความหลากหลายของจีโนมมาก (genomic diversity) และเชื่อว่าจะมีความสามารถในการปรับตัวสูง (genetic adaptability) (Kiil et al., 2008)

เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน เคลื่อนที่ได้ สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สำหรับในคนพบว่าก่อโรคในผู้ที่มีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน เช่นผู้ป่วย AIDS ผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้ที่มีแผลไฟไหม้และผู้ป่วยโรค cystic fibrosis (CF) (Lyczak et al., 2000)

โครงการจีโนมแรกที่เสร็จสมบูรณ์ของ *P. aeruginosa* คือโครงการจีโนมของ *P. aeruginosa* PAO1 (Stover et al., 2000) ซึ่งพบว่าจีโนมมีขนาด 6.3 Mbp และมี 5,570 open reading frame (ORF) และพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม (regulation) สูงถึงร้อยละ 8.4 ซึ่งในขณะนั้นถือว่าเป็นแบคทีเรียที่มี regulator มากที่สุดในบรรดาจีโนมของแบคทีเรีย จากการที่จีโนมของ *P. aeruginosa* มีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนของยีนสูงจึงทำให้ *P. aeruginosa* สามารถปรับตัวและดำรงชีวิตได้ในหลายๆ สภาวะแวดล้อม

ในปัจจุบันนอกเหนือจากโครงการจีโนมของ PAO1 แล้วยังมีโครงการจีโนมของ *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 และ *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ทางคลินิกอีกหลายสายพันธุ์ ทั้งที่สมบูรณ์แล้วและยังไม่สมบูรณ์ จากการเปรียบเทียบจีโนม PAO1 และสายพันธุ์ทางคลินิกอีก 5 สายพันธุ์ (4 สายพันธุ์แยกได้จากผู้ป่วย CF) พบว่าจีโนมของ PAO1 ร้อยละ 80 มีความอนุรักษ์สูง โดยพบความเหมือนกับสายพันธุ์อื่น และพบว่ามีบริเวณใหญ่ๆ 30 บริเวณที่ไม่พบในสายพันธุ์ทางคลินิก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ยีนของ phage, โลกัสที่สร้าง pyoverdine, ยีนของ type I secretion system และระบบ restriction modification (Klockgether et al., 2008)

โครงการจีโนมของ *P. aeruginosa* PA14 เสร็จสิ้นในปี 2006 (Lee et al., 2006) โดยพบว่าจีโนมมีขนาด 6.5 Mbp ซึ่งใหญ่กว่า PAO1 เล็กน้อย สำหรับจีโนมของ PA14 พบว่ามี 5,973 ORF (มากกว่า PAO1 322 ORF) และจากรายงานนี้พบว่า ความรุนแรงของโรคที่เกิดจาก *P. aeruginosa* นั้นมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้องและยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์หนึ่งไม่สามารถนำมาใช้ในการทำนายโรคที่เกิดจากอีกสายพันธุ์หนึ่งได้

จากที่กล่าวมาข้างต้น นอกเหนือจากโครงการจีโนมของ *P. aeruginosa* เช่น PAO1 และ PA14 แล้วยังมีโครงการจีโนมของ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ เช่น *P. putida* ซึ่งแยก

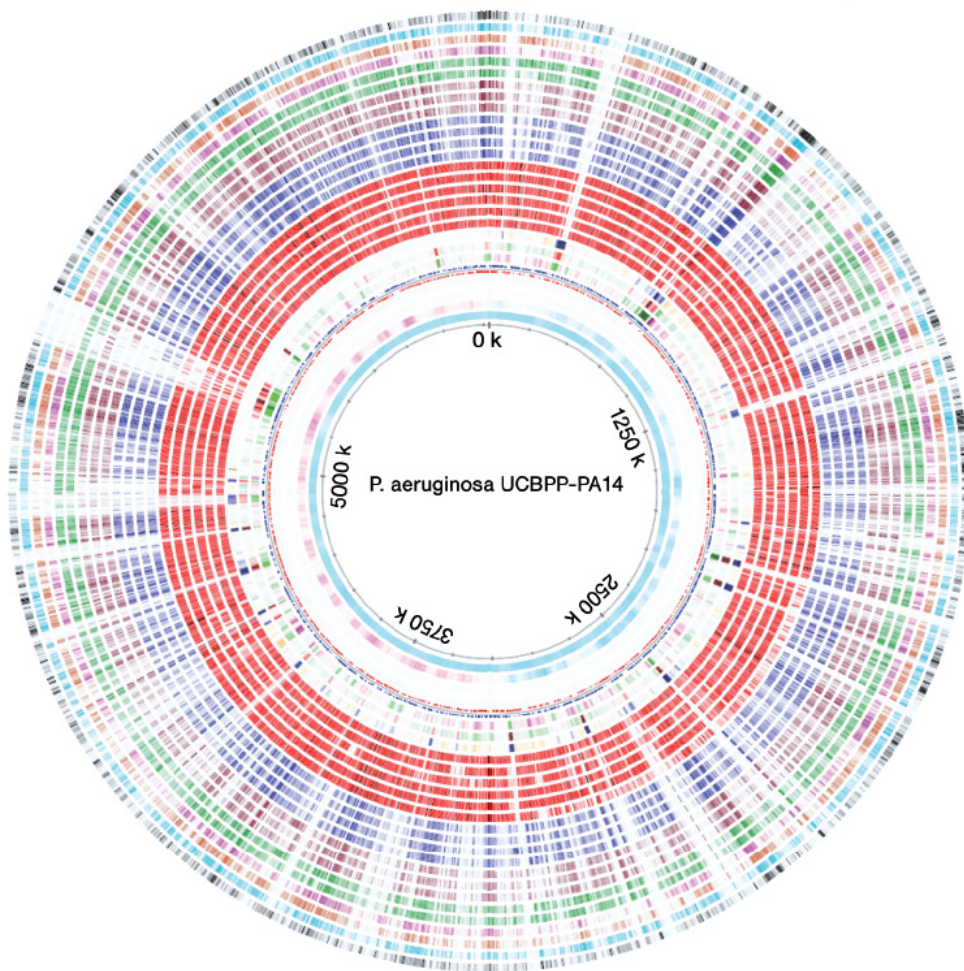
ได้จากดิน โดยมีสายพันธุ์ KT2440 เป็นต้นแบบ (model) ของแบคทีเรียในการศึกษาทั้งในห้องปฏิบัติการและการพัฒนาทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น bioremediation (Kiil et al., 2008) โครงการจีโนมของ KT2440 เสร็จสิ้นในปี 2002 (Nelson et al., 2002)

P. syringae เป็นแบคทีเรียก่อโรคในพืช และมีโครงการจีโนมที่เสร็จสมบูรณ์แล้ว 3 pathovar (*tomato*, *syringae* และ *phaseolicola*) (Joardar et al., 2005; Feil et al., 2005; Buell et al., 2003) สำหรับ *P. fluorescens* มีโครงการจีโนมของ Pf-5 และ PfO-1 ที่เสร็จสมบูรณ์ ส่วน *P. stutzeri* มีโครงการจีโนมของ A1501 เสร็จสมบูรณ์ *P. fluorescens* และ *P. stutzeri* จัดเป็นแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (Haas et al., 2005; Lalucat et al., 2006) สำหรับ *P. entomophila* ซึ่งก่อให้เกิดการติดเชื้อในแมลงหลาย order ก็มีโครงการจีโนมที่เสร็จสมบูรณ์เช่นกัน (Vodovar et al., 2006)

จากการใช้ microarray ในการศึกษา population genetics ของเชื้อ *P. aeruginosa* 240 สายพันธุ์ จากแหล่งต่างๆ พบว่า genotype ที่มีความถี่สูงสุดคือ PA14 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากหลายบริเวณในทวีปยุโรป ทั้งจากผู้ป่วยและแหล่งน้ำต่างๆ นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนของ core genome ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์สูง (มีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เพียงร้อยละ 0.5) ของ *P. aeruginosa* มีค่าสูงถึงร้อยละ 90 (Wiehlmann et al., 2007)

สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบจีโนมของ *Pseudomonas* พบว่ามีการใช้จีโนมถึง 19 จีโนมในการเปรียบเทียบ (www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas) ซึ่งได้แก่ *P. aeruginosa* UCBPP-PA14, *P. aeruginosa* LES, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PACS2, *P. aeruginosa* PA7, *P. aeruginosa* C3719, *P. aeruginosa* 2192, *P. entomophila* L48, *P. mendocina* ymp, *P. stutzeri* A1501, *P. fluorescens* PfO-1, *P. fluorescens* Pf-5, *P. syringae* B728a, *P. syringae* 1448A, *P. syringae* DC3000, *P. putida* GB-1, *P. putida* KT2440, *P. putida* F1, และ *P. putida* W619 โดยแสดงไว้ในรูปแบบที่เรียกว่า BLAST atlas

สำหรับ BLAST atlas เป็นวิธีที่ใช้ในการแสดงให้เห็นถึงข้อมูลจำนวนมากในรูปแบบเดียว โดยมี reference genome และการทำ mapping บริเวณอนุรักษ์ของยีนที่เป็นรหัสของโปรตีน (Hallin et al., 2004) ในรูปที่ 1 เป็น BLAST atlas ของการใช้ *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 เป็น reference genome เปรียบเทียบกับจีโนมของ *Pseudomonas* อีก 18 จีโนม โดยมี UniProt database อยู่วงนอกสุด



รูปที่ 1 BLAST atlas ของ *Pseudomonas* โดยมี *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 เป็น reference genome เปรียบเทียบกับจีโนมของ *Pseudomonas* spp. อีก 18 จีโนม (Kiil et al., 2008)

จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าจีโนมของ *P. aeruginosa* มีการอนุรักษ์สูงถึงร้อยละ 90 (Wiehlmann et al., 2007) ดังนั้นการวิเคราะห์โดยใช้ comparative genomics เพื่อหาโปรตีนที่จำเพาะกับ *P. aeruginosa* จึงมีความเป็นไปได้สูง ซึ่งเมื่อภายหลังจากใช้เทคนิคดังกล่าวแล้ว จะมีการยืนยันผลโดยการใช้ BLASTP จากนั้นจะใช้โปรแกรม PSORT (<http://www.psort.org/>) หรือ ProtFun (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>) ทำนาย localization ของโปรตีน และจะผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนขึ้นเพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว และเชื่อว่าแอนติบอดีที่ได้น่าจะมีความจำเพาะต่อ *P. aeruginosa* ทำให้สามารถนำไปใช้ในการจำแนก *P. aeruginosa* ออกจาก *Pseudomonas* spp. ต่างๆ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ อันจะเป็นประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม การส่งออกต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การวิเคราะห์หาโปรตีนที่จำเพาะต่อ *P. aeruginosa* โดยวิธี comparative genomics

ทำการวิเคราะห์ BLAST atlas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas>) ของ *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 ซึ่งใช้เป็น reference genome ที่เปรียบเทียบกับ *P. aeruginosa* หลาย isolate ซึ่งได้แก่ *P. aeruginosa* LES, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PACS2, *P. aeruginosa* PA7, *P. aeruginosa* C3719, *P. aeruginosa* 2192 และ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ ได้แก่ *P. entomophila* L48, *P. mendocina* ymp, *P. stutzeri* A1501, *P. fluorescens* PfO-1, *P. fluorescens* Pf-5, *P. syringae* B728a, *P. syringae* 1448A, *P. syringae* DC3000, *P. putida* GB-1, *P. putida* KT2440, *P. putida* F1, และ *P. putida* W619 โดยวิเคราะห์หาโปรตีนที่พบเฉพาะใน *P. aeruginosa* และไม่พบใน *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ

หากการใช้ BLAST atlas ให้ผลไม่ดี จะมีการใช้โปรแกรม PSAT (Prokaryotic Sequence Homology Analysis Tool: <http://nwrce.org/psat/>) โดยใช้จีโนมของ *P. aeruginosa* เป็น reference genome เพื่อเปรียบเทียบกับจีโนมของ *Pseudomonas* spp.

ยืนยันผลการวิเคราะห์การหาโปรตีนที่จำเพาะกับ *P. aeruginosa* โดยการนำโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ ไปทำ BLASTP และเลือกโปรตีนที่พบใน *P. aeruginosa* isolate ต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญเท่านั้น จากนั้นวิเคราะห์โปรตีนที่ได้โดยใช้โปรแกรม PSORT (<http://psort.hgc.jp/>) หรือ ProtFun (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>) เพื่อทำนาย localization ของโปรตีนภายในเซลล์ โดยจะเลือกโปรตีนที่คาดว่าจะ เป็น extracellular protein หรือ membrane protein

2. การสกัด DNA ของเชื้อ *P. aeruginosa*

นำเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* หลาย isolate ที่ตรวจสอบชนิดของ *P. aeruginosa* โดยวิธีทางชีวเคมีต่างๆ เพื่อยืนยันความถูกต้องของสปีชีส์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryptic Soy Argar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเลี้ยงและคัดเลือกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) และสกัด DNA จากเชื้อโดยใช้ชุด QiaAmp DNA purification kit (Qiagen, CA, USA) ตามวิธีจากคู่มือของบริษัท

3. การแยก *P. aeruginosa* specific protein genes โดยวิธี PCR

ออกแบบ primer ของ *P. aeruginosa* specific protein genes ซึ่งได้แก่ **PA 4175** (4175F: CG GGA TCC ATG CAT AAG AGA ACG TAC C และ 4175R: C AAG CTT TCA GGG CGC GAA GTA GCG GGA G) **PA0026** (0026F: CG GGA TCC ATG AAA ACC

TTC GCC CGC CTG และ 0026R: C AAG CTT TCA GAG AGC AGT CGG TGC ATC) และ **PA4625HA** (4625HA-F:CG GGA TCC AAC CCC AAC GAG ATC AAG ATC และ 4625HA-R: C AAG CTT GAA GTG TTC GTC GCT GAT GTT C) จากนั้นทำ PCR โดยใช้ DNA ของ *P. aeruginosa* isolate ต่างๆ เป็น template และใช้เอนไซม์ *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen) ที่มี proof-reading activity นำผลผลิต PCR ที่ได้โคลนเข้าสู่ pCR Blunt vector (Invitrogen)

4. การกระตุ้นการแสดงออกของ *P. aeruginosa* specific protein genes

ทำการ subclone *P. aeruginosa* specific protein gene เข้าสู่ expression vector โดยใช้ pMAL-C2 (ในกรณีของ PA4175) หรือ pGEX-6P-1 (ในกรณีของ PA0026 และ PA4625HA) และตรวจสอบความถูกต้องของ ORF โดย DNA sequencing จากนั้น transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 จากนั้นกระตุ้นให้ host ผลิต recombinant protein ในปริมาณมาก โดยนำ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด มาเลี้ยงใน LB broth 10 มิลลิลิตร (ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรผสมอยู่) ปั่นขำคินใน shaker ที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จากนั้นแบ่งเชื้อที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลasks ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จนมี OD ที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5-0.7 แล้วเติม isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ลงไปกระตุ้นโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้เติมบัฟเฟอร์ B (100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea pH 8) 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การตรวจสอบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE

นำ lysate ที่ได้ มาผสมกับบัฟเฟอร์ 2X SDS-treatment ในอัตราส่วน 1:1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pGEX-6P-1 หรือ pMAL-C2 ซึ่งจะผลิตโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) ขนาด 26 กิโลดาลตัน หรือ maltose-binding protein (MBP) ขนาด 50.8 กิโลดาลตัน เป็น positive control (เพื่อดูว่าการกระตุ้นด้วย IPTG ประสบความสำเร็จหรือไม่) และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด เป็น negative control แยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่มีขนาดตรงกับ

การคำนวณ และเทียบกับโปรตีนจาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีและไม่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 หรือ pMAL-C2

6. การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์

การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำ lysate ที่ได้มาแยกโดยใช้ 10% SDS-PAGE ตามขั้นตอน แล้วแช่เจล ใน 0.1M KCl ที่เย็นประมาณ 30 นาที ตัดแถบที่เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนนำไปแช่ใน 1% SDS ข้ามคืน เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในถุง dialysis แล้วแช่ในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง Vacuum concentrator (Speed-Vac.) ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยส่วนหนึ่งจะนำมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวเพื่อสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีและอีกส่วนใช้สำหรับการคัดเลือกโพลีโคลนอลแอนติบอดี

7. การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วจึงผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 เช่นกัน จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาว (Swiss mice) จำนวน 4 ตัว ตัวละ 100 ไมโครลิตร และทุกๆ 2 สัปดาห์ฉีดรีคอมบิแนนท์โปรตีน ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant โดยฉีดกระตุ้นซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ทำการเก็บซีรัมหนูแต่ละตัว นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน PAO1_0026 โดยวิธี Western blotting

8. การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธี Western blotting

นำตัวอย่างโปรตีนซึ่งประกอบด้วยโปรตีนจาก lysate ของ BL21 โปรตีน GST หรือ MBP และรีคอมบิแนนท์โปรตีน ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาแยกโปรตีนแต่ละชนิดตามขนาดด้วย 10 % SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยเครื่อง transblot ใน 1X Towbin buffer โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน 5 % blotto ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 10 นาทีแล้วย้ายลงในแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆ ละ 7 นาที แล้วนำมาบ่มใน horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1:1,500 ด้วย 5% blotto นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างออกด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นย้ายแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนลงในสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS จนกระทั่งเห็นแถบสีเกิดขึ้นแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง

9. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อ *P. aeruginosa* โดยวิธี dot blotting

นำเชื้อ *P. aeruginosa* isolate ต่างๆ 22 isolate (PA1-PA22) เชื้อ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ ได้แก่ *P. acidovorans* 356 (PAc), *P. boreopolis* 1017 (PB), *P. chlororaphis* 9446 (PC), *P. fluorescens* 26030 (PF₁), *P. fluorescens* 13525 (PF₂), *P. japonica* 1526 (PJ), *P. oleovorans* 1097 (PO), *P. putida* 23201 (PP₁), *P. putida* 27522 (PP₂), *P. stutzeri* 2248 (PS) และเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* 22097 (AH), *A. caviae* (AC), *Vibrio harveyi* (VH), *V. parahaemolyticus* 22091 (VP), *V. mimicus* 22088 (VM), *V. cholerae* 22135 (VC) และ *V. fluvialis* 22085 (VF) มาหยดบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อหยด อบที่ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที นำมาบ่มกับแอนติซีรั่ม (เจือจาง 1: 5,000 ใน 5 % blotto) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5 % blotto นำมาบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1: 1,500 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างใน 0.5 % blotto และบ่มในสารละลายสับสเตรตประกอบด้วย 0.03 % DAB, 0.006 % H₂O₂, 0.05 % cobalt chloride



บทที่ 4

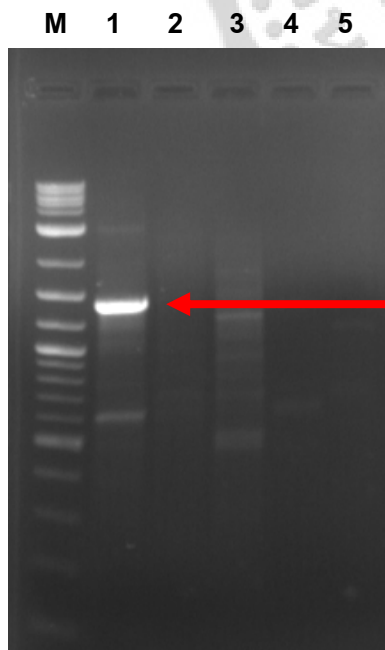
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์หาโปรตีนที่จำเพาะต่อ *P. aeruginosa*

จากการวิเคราะห์หาโปรตีนที่จำเพาะต่อ *P. aeruginosa* โดยการใช้โปรแกรม PSAT blastp และ pSORTb ร่วมกับการวิเคราะห์จากงานวิจัยของ Nouwens และคณะ (2003) พบว่าโปรตีน PA4175 (protein id: NP252864), PA0026 (protein id: NP248716) และ PA4625 (protein id: YP002442591) เป็นโปรตีนที่พบเฉพาะใน *P. aeruginosa* และไม่พบใน *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ โดย PA4175 เป็น protease IV และน่าจะเป็น extracellular protein (จากการวิเคราะห์ด้วย pSORTb) ส่วน PA0026 เป็น phospholipase C, PlcB (จากการวิเคราะห์ด้วย blastp) แต่ไม่สามารถวิเคราะห์หา localization ภายในเซลล์ได้ และ PA4625 เป็น hypothetical protein ที่พบว่ามี hemagglutination activity domain และน่าจะเป็น extracellular protein ดังนั้นจึงมุ่งเป้าการวิจัยในการโคลนและแสดงออกของ PA4175, PA0026 และ PA4625 ส่วนที่มี hemagglutination activity (PA4625HA)

2. การแยก *P. aeruginosa* specific protein genes โดยวิธี PCR

ในการแยกยีน PA4175 (GenBank accession number NC002516) โดยใช้วิธี PCR พบว่าได้แถบผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดที่คาดไว้ คือ 1,386 bp (จากการใช้ template DNA จาก *P. aeruginosa* 25965 isolate) ดังแสดงในรูปที่ 2

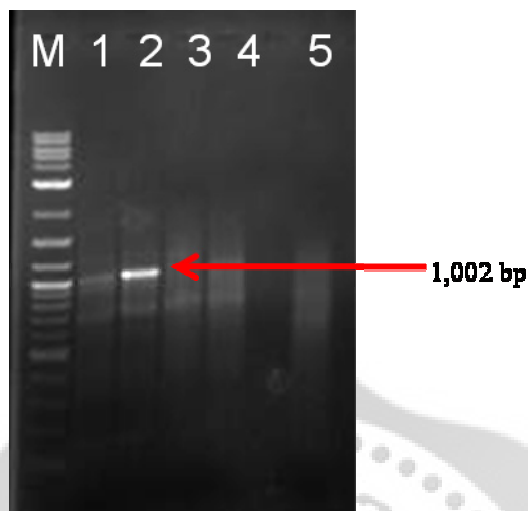


รูปที่ 2 ผลการทำ PCR เพื่อแยกยีน PA4175 ของ *P. aeruginosa*

Lane M : 2 log DNA marker
Lane 1: *P. aeruginosa* 25965,
Lane 2: *P. aeruginosa* 1467,
Lane 3: *P. aeruginosa* 751
Lane 4: *P. aeruginosa* 25742
Lane 5: *P. aeruginosa* 15472

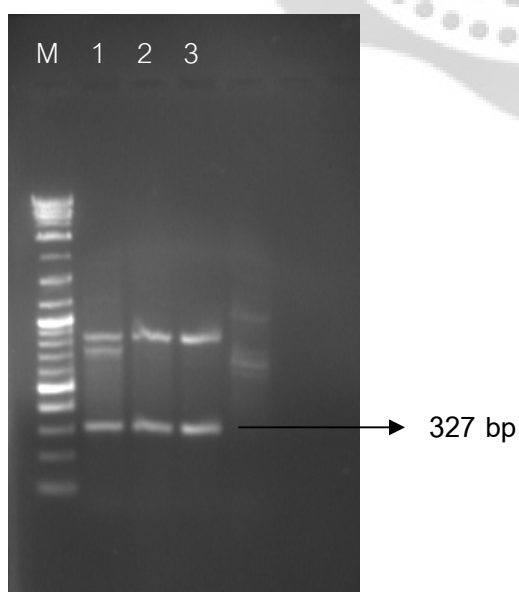
~ 1.4 kb

ในการแยกยีน PA0026 (GenBank accession number NC_002516) โดยใช้วิธี PCR พบว่าได้แถบผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดที่คาดไว้ คือ 1,002 bp (จากการใช้ template DNA จาก *P. aeruginosa* 1467 isolate) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ผลการทำ PCR เพื่อแยกยีน PA0026 ของ *P. aeruginosa* (Lane M: 2 log DNA Ladder; Lane 1: *P. aeruginosa* 25965, Lane 2: *P. aeruginosa* 1467, Lane 3: *P. aeruginosa* 751, Lane 4: *P. aeruginosa* 25000, Lane 5: *P. aeruginosa* 15472)

ในการแยกยีน PA4625HA (GenBank accession number NC_011770) โดยใช้วิธี PCR พบว่าได้แถบผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดที่คาดไว้ คือ 327 bp (จากการใช้ template DNA จาก *P. aeruginosa* ทั้ง 3 isolate) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ผลการทำ PCR เพื่อแยกยีน PA4625HA ของ *P. aeruginosa*

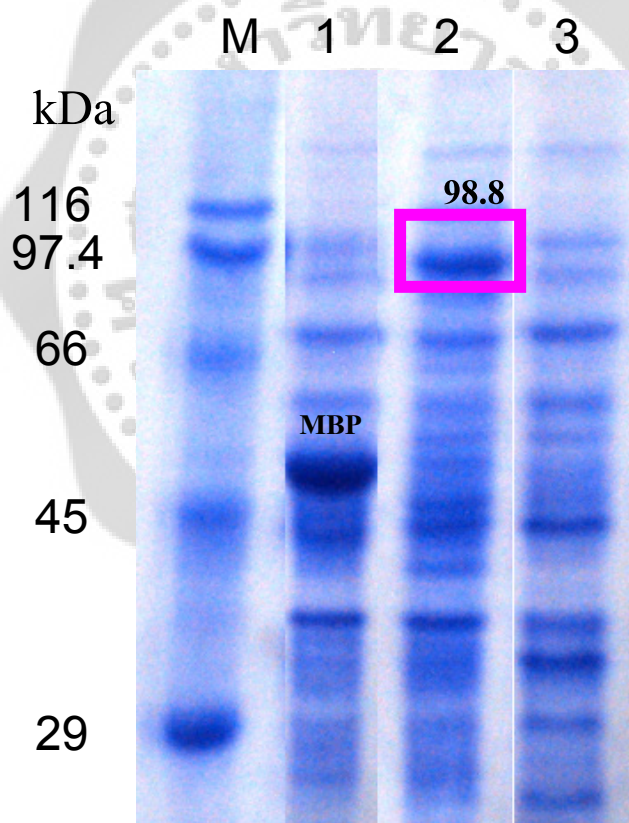
Lane M : 2 log DNA Ladder
Lane 1 : *P. aeruginosa* 1572
Lane 2 : *P. aeruginosa* 1101
Lane 3 : *P. aeruginosa* 1287

ผลผลิต PCR ทั้งหมด ได้ถูกโคลนเข้าสู่ pCR-Blunt vector และนำไปหาลำดับ DNA เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นยีนต่างๆ ดังกล่าวจริง

3. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

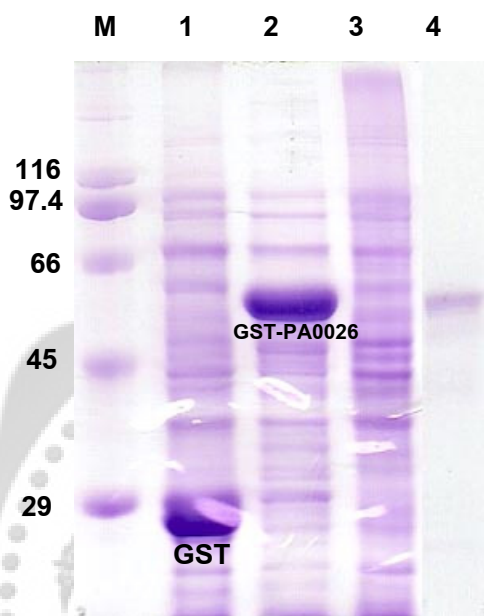
ทำการ subclone ยีน PA4175 เข้าสู่ pMAL-C2 expression vector และ subclone ยีน PA0026 และ PA4625HA เข้าสู่ pGEX-6P-1 expression vector และตรวจสอบความถูกต้องของ ORF โดย DNA sequencing จากนั้น transform recombinant plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 จากนั้นกระตุ้นให้ host ผลิต recombinant protein ในปริมาณมาก

จากการกระตุ้นการแสดงออกของ PA4175 ใน *E. coli* ที่มี PA4175-pMAL-C2 plasmid พบว่าได้โปรตีน MBP-PA4175 ขนาด 98.8 kDa ตามที่ได้คาดไว้จากการคำนวณ (รูปที่ 5 lane 2) และพบการแสดงออกของ maltose binding protein (MBP) ขนาด 50.8 kDa (รูปที่ 5 lane 1) จาก lysate ของ *E. coli* ที่มีเฉพาะ pMAL-C2 plasmid



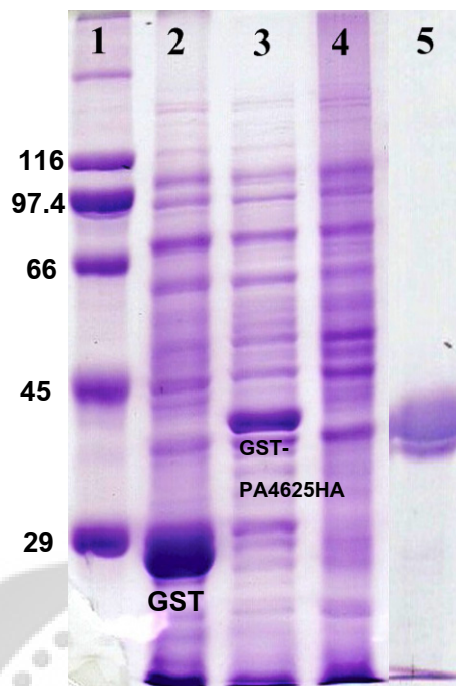
รูปที่ 5 SDS-PAGE ของการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน PA4175 ของ *P. aeruginosa* (Lane M : protein ladder; Lane 1: lysate ของ *E. coli* ที่มีเฉพาะ pMAL-C2 plasmid, Lane 2: lysate ของ *E. coli* ที่มี PA4175-pMAL-C2 recombinant plasmid, Lane 3: lysate ของ *E. coli* ที่ไม่มี plasmid)

จากการกระตุ้นการแสดงออกของ PA0026 ใน *E. coli* ที่มี PA0026-pGEX plasmid พบว่าได้โปรตีน GST-PA0026 ขนาด 62.7 kDa ตามที่ได้คาดไว้จากการคำนวณ (รูปที่ 6 lane 2) และพบการแสดงออกของ glutathione-S-transferase (GST) ขนาด 26 kDa (รูปที่ 6 lane 1) จาก lysate ของ *E. coli* ที่มีเฉพาะ pGEX-6P-1 plasmid



รูปที่ 6 SDS-PAGE ของการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน PA0026 ของ *P. aeruginosa* (Lane M : protein ladder; Lane 1: lysate ของ *E. coli* ที่มีเฉพาะ pGEX-6P-1 plasmid, Lane 2: lysate ของ *E. coli* ที่มี PA0026-pGEX recombinant plasmid, Lane 3: lysate ของ *E. coli* ที่ไม่มี plasmid, lane 4: purified GST-PA0026)

จากการกระตุ้นการแสดงออกของ PA4625HA ใน *E. coli* ที่มี PA4625HA -pGEX plasmid พบว่าได้โปรตีน GST-4625HA ขนาด 37 kDa ตามที่ได้คาดไว้จากการคำนวณ (รูปที่ 7 lane 3) และพบการแสดงออกของ glutathione-S-transferase (GST) ขนาด 26 kDa (รูปที่ 7 lane 2) จาก lysate ของ *E. coli* ที่มีเฉพาะ pGEX-6P-1 plasmid



รูปที่ 7 SDS-PAGE ของการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน PA0026 ของ *P. aeruginosa* (Lane 1 : protein ladder; Lane 2: lysate ของ *E. coli* ที่มีเฉพาะ pGEX-6P-1 plasmid, Lane 3: lysate ของ *E. coli* ที่มี PA4625HA-pGEX recombinant plasmid, Lane 4: lysate ของ *E. coli* ที่ไม่มี plasmid, lane 5: purified GST-PA4625HA)

4. การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting

จากการนำโปรตีน MBP-PA4175 บริสุทธิ์ ไปฉีดในหนูขาวจำนวน 4 ตัว และเลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาเจาะเลือดและเก็บแอนติซีรัม (ที่ adsorp ด้วย MBP เพื่อกำจัด antibody ที่จำเพาะต่อ MBP ออก) ไปทำ Western blotting พบว่าแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะต่อ PA4175 ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 Western blotting ที่แสดงความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อโปรตีน PA4175

Lane 1: lysate ของ *E. coli* ที่มี MBP
Lane 2: lysate ของ *E. coli* ที่มี MBP-PA4175

จากการนำโปรตีน GST-PA0026 บริสุทธิ์ ไปฉีดในหนูขาวจำนวน 4 ตัว และเลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาเจาะเลือดและเก็บแอนติซีรัม (ที่ adsorp ด้วย GST เพื่อกำจัด antibody ที่จำเพาะต่อ GST ออก) ไปทำ Western blotting พบว่าแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะต่อ PA0026 ดังแสดงในรูปที่ 9

1 2



รูปที่ 9 Western blotting ที่แสดง
ความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อโปรตีน
PA0026

Lane 1: lysate ของ *E. coli* ที่มี GST

Lane 2: lysate ของ *E. coli* ที่มี GST-
PA0026

จากการนำโปรตีน GST-PA4625HA บริสุทธิ์ ไปฉีดในหนูขาวจำนวน 4 ตัว และเลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาเจาะเลือดและเก็บแอนติซีรัม (ที่ adsorp ด้วย GST เพื่อกำจัด antibody ที่จำเพาะต่อ GST ออก) ไปทำ Western blotting พบว่าแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะต่อ PA4625HA ดังแสดงในรูปที่ 10 สำหรับแถบขนาดเล็กที่เกิดขึ้น คาดว่าน่าจะเป็น degrade product ของ recombinant protein

1 2



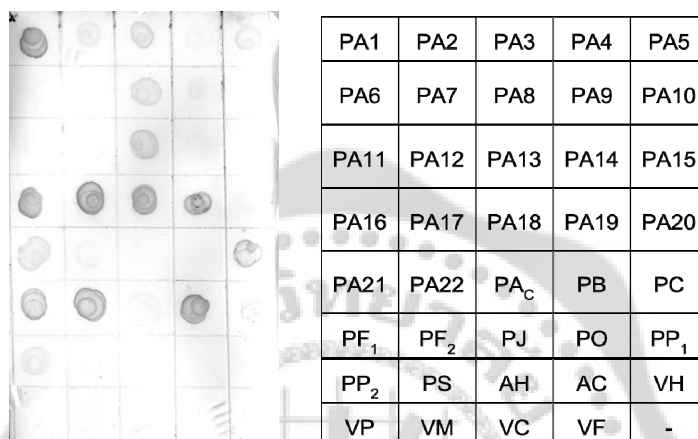
รูปที่ 10 Western blotting ที่แสดง
ความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อโปรตีน
PA4625HA

Lane 1: lysate ของ *E. coli* ที่มี GST

Lane 2: lysate ของ *E. coli* ที่มี GST-
PA4625HA

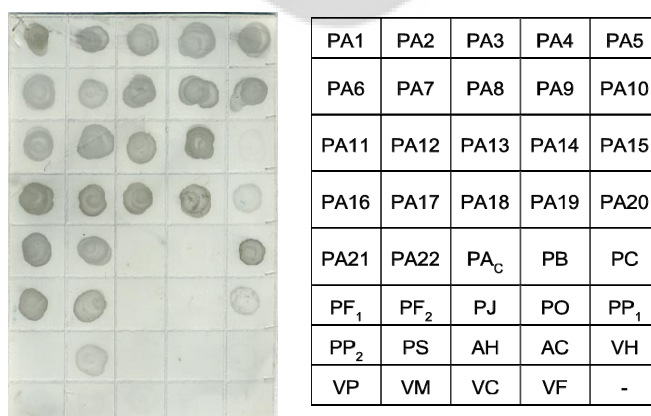
5. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อ *P. aeruginosa* โดยวิธี dot blotting

จากการนำแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อ PA4175 มาทดสอบความจำเพาะต่อ *P. aeruginosa* isolate ต่างๆ (PA) และ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ และแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยวิธี dot blotting พบว่า แอนติซีรั่มต่อโปรตีน PA4175 สามารถจับกับ *P. aeruginosa* ได้เพียง 11 isolate จาก 22 isolate ที่นำมาทดสอบ และพบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับ *P. fluorescens* (PF) 2 isolate และ *P. chlororaphis* (PC), *P. oleovorans* (PO), *P. putida* (PP2) ชนิดละ 1 isolate ดังแสดงในรูปที่ 11



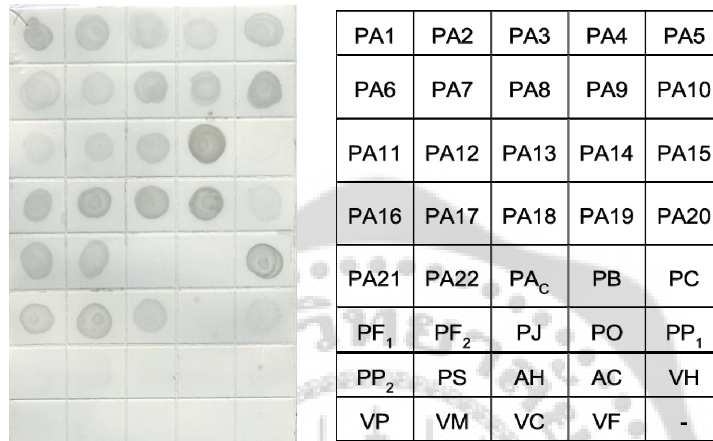
รูปที่ 11 Dot blotting ของการใช้แอนติซีรั่มต่อโปรตีน PA4175 ในการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อ *P. aeruginosa*

จากการนำแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อ PA0026 มาทดสอบความจำเพาะต่อ *P. aeruginosa* isolate ต่างๆ และ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ และแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยวิธี dot blotting พบว่าแอนติซีรั่มต่อโปรตีน PA0026 สามารถจับกับ *P. aeruginosa* ได้ 21 isolate จาก 22 isolate ที่นำมาทดสอบ แต่พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับ *P. fluorescens* 2 isolate และ *P. chlororaphis*, *P. putida* (PP1), *P. stutzeri* (PS) ชนิดละ 1 isolate ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 Dot blotting ของการใช้แอนติซีรั่มต่อโปรตีน PA0026 ในการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อ *P. aeruginosa*

จากการนำแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ PA4625HA มาทดสอบความจำเพาะต่อ *P. aeruginosa* isolate ต่างๆ และ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ และแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยวิธี dot blotting พบว่า แอนติซีรัมต่อโปรตีน PA4625HA สามารถจับกับ *P. aeruginosa* ได้ 21 isolate จาก 22 isolate ที่นำมาทดสอบ แต่พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับ *P. fluorescens* 2 isolate และ *P. chlororaphis*, *P. japonica* (PJ), *P. putida* (PP1) ชนิดละ 1 isolate ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 Dot blotting ของการใช้แอนติซีรัมต่อโปรตีน PA4625HA ในการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อ *P. aeruginosa*

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

เชื้อ *P. aeruginosa* จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อให้เกิดการติดเชื้อได้หลายระบบ ทั้งในผู้ที่ได้รับการผ่าตัด มีแผลไฟไหม้ การติดเชื้อในระบบปัสสาวะพบได้บ่อยในผู้ที่ใส่สายสวนปัสสาวะ และที่สำคัญคือพบในผู้ป่วยโรค cystic fibrosis (Elkin et al., 2003) นอกจากนี้ยังเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดโรคแก้มมนุษย์แล้ว การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ยังก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมเลี้ยงปลา ซึ่งโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* คือโรคแผลตามลำตัว และเป็นยังงั้นสาเหตุให้ปลาติดโรคเชื้อราแทรกซ้อนต่อไป (Austin and Austin, 1999; Noga, 2000) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย

ดังนั้นการศึกษานี้เป็นการนำวิธีทางภูมิคุ้มกันมาใช้ตรวจเชื้อ *P. aeruginosa* โดยมีการนำเทคนิค comparative genomics วิเคราะห์หา *P. aeruginosa* specific proteins และผลิตเป็น recombinant proteins เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว โดยจะผลิตเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* แอนติบอดีนี้คาดว่าจะสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชนิดนี้ โดยใช้เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

จากผลการวิจัยพบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน PA4175 ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *P. aeruginosa* ได้ เนื่องจากการทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 22 isolate พบว่าแอนติบอดีต่อ PA4175 สามารถจับกับเชื้อ *P. aeruginosa* ได้เพียง 11 isolate และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ เชื้อ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ อีก 4 สปีชีส์ โปรตีน PA4175 เป็นเอนไซม์ protease IV ซึ่งเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดพยาธิสภาพโดย *P. aeruginosa* อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงบทบาทที่แน่ชัดของเอนไซม์ชนิดนี้ (Kida et al., 2008; Smith et al., 2006)

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์โดย blastp จะแสดงให้เห็นว่าโปรตีน PA4175 (ซึ่งเป็นเอนไซม์ protease IV) จะพบเฉพาะใน *P. aeruginosa* โดยไม่พบว่ามี ความคล้ายกับ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่น แต่จากการที่แอนติบอดีต่อโปรตีน PA4175 แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่น แสดงให้เห็นว่า *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นอาจมีการสร้างเอนไซม์ protease IV เช่นเดียวกันแต่ยังไม่มีผู้รายงานเกี่ยวกับโปรตีนชนิดนี้จาก *Pseudomonas* สปีชีส์อื่น ในฐานข้อมูล และจากการที่แอนติบอดีต่อโปรตีน PA4175 สามารถจับกับ *P. aeruginosa* ได้เพียงบาง isolate นั้นอาจเป็นข้อบ่งชี้ว่า *P. aeruginosa* เหล่านั้นอาจมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพ เนื่องจากเชื่อว่า protease IV น่าจะเป็น virulence factor หนึ่งของ *P. aeruginosa*

ในกรณีของการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน PA0026 (ซึ่งเป็นเอนไซม์ phospholipase C, PlcB) พบว่าสามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *P. aeruginosa* ได้ค่อนข้างดี เนื่องจากการทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 22 isolate พบว่าแอนติบอดีต่อ PA0026 สามารถจับกับเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ถึง 21 isolate และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่น

เพียง 4 สปีชีส์ได้แก่ *P. fluorescens* 2 isolate และ *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. stutzeri* ชนิดละ 1 isolate แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ เลย

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์โดย blastp จะแสดงให้เห็นว่าโปรตีน PA0026 (ซึ่งเป็นเอนไซม์ phospholipase C, PlcB) จะพบเฉพาะใน *P. aeruginosa* โดยไม่พบว่ามี ความคล้ายกับ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่น แต่จากการที่แอนติบอดีต่อโปรตีน PA0026 แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นอีก 4 สปีชีส์ แสดงให้เห็นว่า *Pseudomonas* สปีชีส์เหล่านั้นอาจมีการสร้างเอนไซม์ phospholipase C, PlcB เช่นเดียวกันแต่ยังไม่มีผู้รายงานเกี่ยวกับโปรตีนชนิดนี้จาก *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นในฐานข้อมูล

เอนไซม์ extracellular phospholipase C (Plc) จาก *P. aeruginosa* ในปัจจุบันพบว่า มี 4 ชนิด ได้แก่ PlcA, PlcH, PlcN และ PlcB โดยทั้ง 4 ชนิด นี้สามารถ hydrolyze phosphatidylcholine ได้ แต่มี PlcA และ PlcB เท่านั้นที่ active ต่อ phosphatidylethanolamine (Barkett et al., 2004; Miller et al., 2008) สำหรับเอนไซม์ phospholipase C ของ *P. aeruginosa* นั้นเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อและทำให้แบคทีเรียสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น (Pollack, 1984)

ในกรณีของการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน PA4625HA (ซึ่งเป็น hypothetical protein ที่มี hemagglutination activity domain) พบว่าสามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *P. aeruginosa* ได้ค่อนข้างดี เนื่องจากการทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 22 isolate พบว่าแอนติบอดีต่อ PA0026 สามารถจับกับเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ถึง 21 isolate และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นเพียง 4 สปีชีส์ได้แก่ *P. fluorescens* 2 isolate และ *P. chlororaphis*, *P. japonica* และ *P. putida* ชนิดละ 1 isolate แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ เลย

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์โดย blastp จะแสดงให้เห็นว่าโปรตีน PA4625HA จะพบเฉพาะใน *P. aeruginosa* ยกเว้นมีความคล้ายอย่างมีนัยสำคัญกับ filamentous hemagglutinin ของ *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 ซึ่งเป็น commensal bacteria ที่พบรากพืช (Paulsen et al., 2005) ดังนั้นการที่แอนติบอดีต่อโปรตีน PA4625HA แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *P. fluorescens* 2 isolate จึงมีความเป็นไปได้สูง ส่วนการที่แอนติบอดีต่อโปรตีน PA4625HA แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นอีก 3 สปีชีส์ แสดงให้เห็นว่า *Pseudomonas* สปีชีส์เหล่านั้นอาจมีการสร้างโปรตีนที่มี hemagglutination activity domain เช่นเดียวกัน

สำหรับ hemagglutination activity ของ *P. aeruginosa* นั้นเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการ virulence factors แต่ในปัจจุบันยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดของ hemagglutination activity (da Silva et al., 2008)

จากผลการทดลองทั้งหมด ชี้ให้เห็นว่า การวิเคราะห์หาโปรตีนที่จำเพาะต่อแบคทีเรียสปีชีส์หนึ่ง มีความเป็นไปได้หากมีการเปรียบเทียบจีโนมและยืนยันผลการวิเคราะห์โดยใช้

blastp และการทำนาย localization ของโปรตีนในแบคทีเรียก็มีส่วนช่วยในการวิเคราะห์โปรตีนนั้นได้ดีขึ้น

งานวิจัยนี้เป็นการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนที่จำเพาะของ *P. aeruginosa* ซึ่งนับจุดเริ่มต้นที่ดีในการพัฒนางานวิจัยต่อยอดเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งจะช่วยในการคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *P. aeruginosa* โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นนั้นเป็นไปได้สูงขึ้น อันจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเพื่อการวินิจฉัยเชื้อ *P. aeruginosa* แบบ strip test ต่อไปในอนาคต



เอกสารอ้างอิง

- Anuj SN, Whiley DM, Kidd TJ, Bell SC, Wainwright CE, Nissen MD, Sloots TP. (2008) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 63: 127-31.
- Austin B. and Austin DA (1999). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. 3rd rev ed. Springer-Praxis, Chichester, UK.
- Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ, Vasil ML. (2004) A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol*. 53: 1089-1098.
- Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay J.F. et al. (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 10181–10186.
- da Silva MEZ, Filho IC, Endo EH, Nakamura CV, Ueda-Nakamura TN, Filho BPD. (2008) Characterisation of potential virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water. 93: 323–334.
- Elkin S, Geddes D. (2003). *Pseudomonas* infection in cystic fibrosis: the battle continues. *Expert Rev Anti Infect Ther*.1: 609-618.
- Feil H, Feil WS, Chain P, Larimer F, DiBartolo G, Copeland A, Lykidis A, Trong S, Nolan M, Goltsman E. et al. (2005) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 11064–11069.
- Fong C, Rohmer L, Radey M, Wasnick M, Brittnacher MJ. (2008) PSAT: A web tool to compare genomic neighborhoods of multiple prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics*. 26:170.
- Haas D and Defago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3: 307–319.
- Hallin PF, Binnewies TT and Ussery DW (2004) Genome update: chromosome atlases. *Microbiology*. 150: 3091–3093.
- Iglewski BH. (1996) *Pseudomonas*. In: *Medical Microbiology*. 4th ed. Baron S, Ed. University of Texas Medical Branch, Galveston.

- Jaffe RI, Lane JD, Bates CW. (2001) Real-time identification of *Pseudomonas aeruginosa* direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction (PCR). J Clin Lab Anal. 15: 131-137.
- Joardar V, Lindeberg M, Jackson RW, Selengut J, Dodson R, Brinkac LM, Daugherty SC, Deboy R, Durkin AS, Giglio MG et al. (2005) Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. J Bacteriol. 187: 6488–6498.
- Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K. (2008) A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. Cell Microbiol. 10:1491-504.
- Kiil K, Binnewies TT, Willenbrock H, Hansen SK, Yang L, Jelsbak L, Ussery DW, Friis C. (2008) Comparative Genomics of *Pseudomonas*, in *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory. (ed. B. H.A. Rehm), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Kiska DL, Kerr A, Jones MC, Caracciolo JA, Eskridge B, Jordan M, Miller S, Hughes D, King N, Gilligan PH (1996) Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 34: 886–891.
- Kiska DL, Gilligan PH (2003) *Pseudomonas*. In: Manual of clinical microbiology. 8th ed. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, Eds. Washington DC: American Society for Microbiology Press, pp. 719–728.
- Klockgether J, W€urdemann D, Wiehlmann L, Binnewies TT, Ussery DW and T€ummler B. (2008) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa*, in *Pseudomonas: Genetics and Molecular Biology*, (ed. P. Cornelis), Horizon Press, Norwich.
- Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, Garcia-Valdes E, and Palleroni NJ (2006) Biology of *Pseudomonas stutzeri*. Microbiol Mol Biol Rev. 70: 510–547.
- Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S, Cournoyer B. (2007) Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. J Microbiol Methods 70: 20-29.
- Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, Diggins LT, He J, Saucier M, Deziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R,

- Rahme LG, and Ausubel FM (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 7, R90.
- Lyczak JB, Cannon CL and Pier GB (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2: 1051–1060.
- Nelson KE, Weinelt C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VA, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M. et al. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.* 4: 799–808.
- Noga EJ. (2000). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. 2nd ed. Mosby-Year book, Inc.
- Nouwens AS, Beatson SA, Whitchurch CB, Walsh BJ, Schweizer HP, Mattick JS, Cordwell SJ. (2003) Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the *las* and *rhl* quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiol* 149: 1311-1322.
- Paulsen IT, Press CM, Ravel J et al. (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol.* 23: 873-878.
- Pollack M. (1984) The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis. Suppl* 3:S617-26.
- Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL (2003). Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4312-4317.
- Smith L, Rose B, Tingpej P, Zhu H, Conibear T, Manos J, Bye P, Elkins M, Willcox M, Bell S, Wainwright C, Harbour C. (2006) Protease IV production in *Pseudomonas aeruginosa* from the lungs of adults with cystic fibrosis. *J Med Microbiol.* 55: 1641-1644.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959–964.
- Vodovar N, Vallenet D, Cruveiller S, Rouy Z, Barbe V, Acosta C, Cattolico L, Jubin C, Lajus A, Segurens B. et al. (2006) Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol*, 24, 673–679.

Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, Köhler T, van Delden C, Weinl C, Slickers P, Tümmler B. (2007) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 104: 8101-8106.



ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

- ชื่อ นายปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร
Mr. Parin Chaivisuthangkura
- เลขประจำตัวประชาชน 3100602471889
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
โทรศัพท์ 0-2649-5000 ต่อ 8511 โทรสาร 02-260-0127

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	สถาบัน
2531	ตรี	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2534	โท	วท.ม.	จุลชีววิทยา (ไวรัสวิทยา)	มหาวิทยาลัยมหิดล
2541	เอก	Ph.D.	Cell Biology (Plant Cell and Molecular Biology)	University of Connecticut, USA

- สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ Molecular Biology, Viral and bacterial infection in shrimp

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.1.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

- Mercier, R.W., P. Chaivisuthangkura, and J.P. Gogarten. 1993. Letter to the editor on b-fructosidase homologues. Plant Mol.Biol. 23, 229-230.
- Sithigorngul, P., P. Chauyhuwong, W. Sithigorngul, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, and P. Menasveta. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 42, 27-34.
- Sithigorngul, P., S. Rukpratarporn, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul, and P. Menasveta. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 49, 71-76.
- Sithigorngul, P., J. Pupeum, C. Krugkasem, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and A. Petsom. 2002. Seven novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. 131, 325-337.
- Sithigorngul, P., N. Panchan, P. Chaivisuthangkura, S. Longyant, W. Sithigorngul and A. Petsom. 2002. Differential expression of CMG peptide and crustacean hyperglycemic hormone (CHHs) in the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Peptides. 23 : 1943-1952.

6. Sithigorngul, P., J. Pupuem, C. Krungkasem, S. Longyant, N. Panchan, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and A. Petsom. 2002. Three novel PYFs : The members of NPY/PP superfamily from the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptides*. 23 : 1895-1906.
7. Panchan, N., W.G. Bendena, P. Browser, P. Lungchukiat, S. S. Tobe, W. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, A. Rangsiruji, A. Petsom, T. Pewnim and P. Sithigorngul. 2003. Immuno-localization of allatostatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalks of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Peptides*. 24 : 1563-1570.
8. Longyant, S., P. Sithigorngul, W. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, N. Thammapalerd and P. Menasveta. 2003. The effect of eyestalk extract on vitellogenin levels in the haemolymph of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Science Asia*. 29 : 371-381.
9. Longyant, S., P. Sithigorngul, W. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, N. Thammapalerd and P. Menasveta. 2004. The effect of eyestalk homogenate on haemolymph vitellogenin levels in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Invert. Reprod. Dev.* 45 (2) : 91-100.
10. Chaivisuthangkura P., J. Tanghabuanbutra, S. Longyant, W. Sithigorngul, S. Rukpratanporn, P. Menasveta and P. Sithigorngul. 2004. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. *ScienceAsia*. 30 : 359-363.
11. Winotaphan, P, P. Sithigorngul, O. Muenpol, S. Longyant, S. Ruakpratanporn, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul, A. Petsom and P. Menasveta. 2005. Monoclonal antibodies specific to haemocytes of black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 18 : 189-198.
12. Panchan N., P. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, S. Longyant, W. Sithigorngul and A. Petsom. 2005. Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. *ScienceAsia*. 31 : 29-35.
13. Phianphak W., S. Rengpipat, S. Rukpratanporn, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. 2005. Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Org.* 63 (2-3) : 161-168.
14. Buranaprapuk, A., P. Chaivisuthangkura, J. Savasti, C.V. Kumar. Efficient photocleavage of lysozyme by a new chiral probe. 2005. *Lett. Org. Chem.* 2:554-558.
15. Longyant, S., P. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, S. Rukpratanporn, W. Sithigorngul and P. Menasveta. 2005. Differences in susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.* 64(1) : 5-12.

16. Rukpratanporn, S., W. Sukhumsirichart, P. Chaivisuthangkura, S. Longyant, W. Sithigorngul, P. Menasveta and P. Sithigorngul. 2005. Generation of monoclonal antibodies specific to hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 65:85-89.
17. Chaivisuthangkura, P., T. Tejangkura, S. Rukpratanporn, S. Longyant, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. 2006. Polyclonal antibodies specific for VP1 and VP3 capsid proteins of Taura syndrome virus (TSV) produced Via gene cloning and expression. Dis. Aquat. Org. 69:249-253.
18. Chaivisuthangkura, P., P. Phattanapajitkul, N. Thammapalerd, S. Rukpratanporn, S. Longyant, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. 2006. Development of a polyclonal antibody specific to VP19 envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV) using a recombinant protein preparation. J. Virol. Methods. 133:180-184.
19. Chaivisuthangkura, P., P. Phattanapajitkul, N. Thammapalerd, S. Rukpratanporn, S. Longyant, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. 2006. Production of polyclonal antibody against recombinant VP26 structural protein of white spot syndrome virus (WSSV). ScienceAsia. 32: 201-204.
20. Longyant, S., S. Sattaman, P. Chaivisuthangkura, S. Rukpratanporn, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. 2006. Experimental infection of yellow head virus (YHV) in some penaeid shrimps and crabs. Aquaculture. 257 :83-91.
21. Sithigorngul, W., S. Rengpipat, A. Tansirisittikul, S. Rukpratanporn, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura and P. Sithigorngul. 2006. Development of monoclonal antibodies for simple identification of *Vibrio alginolyticus*. Lett. Appl. Microbiol. 43 : 436-442.
22. Sithigorngul, W., S. Rukpratanporn, N. Pecharaburanin, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura and P. Sithigorngul. 2006. A simple and rapid, immunochromato-graphic test-strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. Dis. Aquat. Org. 72:101-106.
23. Sithigorngul, W., S. Rukpratanporn, N. Sittidilokratna, N. Pecharaburanin, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura and P. Sithigorngul. 2007. A convenient immunochromato-graphic test strip for rapid diagnosis of yellow-head virus (YHV) infection in shrimp. J. Virol. Methods. 140 :193-199.
24. Longyant, S., K. Prahkarnkao, V. Meevoothisom, S. Rengpipat, S. Rukpratanporn, W. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura and P. Sithigorngul. 2007. Identification of *Aeromonas hydrophila* infection with specific monoclonal antibodies. Mj.Int.J.Sci.Tech. 01(02) :107-119.
25. Sithigorngul P., S. Rukpratanporn, N. Pecharaburanin, P. Suksawat, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura and W. Sithigorngul. 2007. A simple and rapid immuno-chromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*. J. Microbio. Methods. 71 (3) : 256-264.

26. Longyant S., S. Rukpratanporn, P. Chaivisuthangkura, P. Suksawad, C. Srisuk, W. Sithigorngul, S. Piyatiratitivorakul and P. Sithigorngul. 2008. Identification of *Vibrio* spp. in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. J. Invert. Pathology 98: 63-68.
27. Chaivisuthangkura P., T. Tejangkura, S. Rukpratanporn, S. Longyant, W. Sithigorngul, and P. Sithigorngul. 2008. Preferential suppression of yellow head virus (YHV) envelope protein gp116 in shrimp that survive challenge with YHV. Dis. Aquat. Org. 79: 1-8.
28. Longyant S., P. Poyoi, P. Chaivisuthangkura, T. Tejangkura, W. Sithigorngul, S. Rukpratanporn and P. Sithigorngul. 2008. Specific monoclonal antibodies raised against Taura syndrome virus (TSV) capsid protein VP3 detect TSV in single and dual infections with white spot syndrome virus (WSSV). Dis. Aquat. Org. 79: 75-81.
29. Khawsak, P., Deesukon, W., Chaivisuthangkura, P., Sukhumsirichart, W. 2008. Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid shrimp. Mol Cell Probes 22: 177-183.
30. Chaivisuthangkura, P., Tawilert C., Tejangkura, C., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Sithigorngul, W., Sithigorngul, P. 2008. Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus. Virology 381: 261-267.
31. Chaivisuthangkura, P., Srisuk, C., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Sridulyakul, P., & Sithigorngul, P. (2009). Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 162(1-2), 188-193.
32. Sithigorngul, P., Hajimasalaeh, W., Longyant, S., Sridulyakul, P., Rukpratanporn, S., & Chaivisuthangkura, P. (2009). Simple immunoblot and immunohistochemical detection of *Penaeus stylirostris* densovirus using monoclonal antibodies to viral capsid protein expressed heterologously. *Journal of Virological Methods*, 162(1-2), 126-132.
33. Kanhathaisong, B., Wongyounoi, S., Boonprakob, M., Dechsri, P., & Chaivisuthangkura, P. (2009). Introducing a warm temperature adapted rapid cycling "*Brassica rapa*" to a Thai science classroom: A preliminary study on students' involvement in realistic investigation. *International Journal of Learning*, 16(10), 369-378.
34. Srisuk, C., Chaivisuthangkura, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Sridulyakul, P., & Sithigorngul, P. (2010). Rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* by loop-mediated isothermal amplification targeted to the gene of outer membrane protein ompW. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 36-42.
35. Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Srisuk, C., Sridulyakul, P., & Sithigorngul, P. (2010). Enhanced white spot syndrome virus (WSSV) detection sensitivity

- using monoclonal antibody specific to heterologously expressed VP19 envelope protein. *Aquaculture*, 299(1-4), 15-20.
36. Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Hajimasalaeh, W., Sridulyakul, P., Rukpratanporn, S., & Sithigorngul, P. (2010). Improved sensitivity of taura syndrome virus immunodetection with a monoclonal antibody against the recombinant VP2 capsid protein. *Journal of Virological Methods*, 163(2), 433-439.
37. Pengsuk, C., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., Sridulyakul, P., & Sithigorngul, P. (2010). Development of monoclonal antibodies for simple detection and differentiation of *Vibrio mimicus* from *V. cholerae* and *Vibrio* spp. by dot blotting. *Aquaculture*, 300(1-4), 17-24.
38. Gangnonngiw, W., Laisutisan, K., Sriurairatana, S., Senapin, S., Chuchird, N., Limsuwan, C., Chaivisuthangkura, P., Flegel, T.W. (2010). Monodon baculovirus (MBV) infects the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* cultivated in thailand. *Virus Research*, 148(1-2), 24-30.
39. Longyant, S., Chaivasittrakul, K., Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., & Sithigorngul, P. (2010). Simple and direct detection of aeromonas hydrophila infection in the goldfish, carassius auratus (L.), by dot blotting using specific monoclonal antibodies. *Journal of Fish Diseases*, 33(12), 973-984.
40. Srisuk, C., Chaivisuthangkura, P., Sukhumsirichart, W., Sridulyakul, P., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Sithigorngul, P. (2011). Improved immunodetection of *Penaeus monodon* densovirus with monoclonal antibodies raised against recombinant capsid protein. *Aquaculture*, 311, 19-24.
41. Kunanopparat, A., Chaivisuthangkura, P., Senapin, S., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Flegel, T. W., Sithigorngul, P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *Journal of Virological Methods*, 171, 141-148.
42. Prompamorn, P., Sithigorngul, S., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Sridulyakul, P., Chaivisuthangkura, P. (2011). The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Lett Appl Microbiol*, 52, 344-351.