DETECTION OF IMMUNOGENIC PROTEINS IN LEPTOSPIROSIS USING 2D-GEL ELECTROPHORESIS AND IMMUNOBLOTTING

PUTITA SAETUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7355-5
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การตรวจหาโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยใช้วิธี 2D-GEL ELECTROPHORESIS และ IMMUNOBLOTTING (DETECTION OF IMMUNOGENIC PROTEINS IN LEPTOSPIROSIS USING 2D-GEL ELECTROPHORESIS AND IMMUNOBLOTTING)

พุธิตา แซ่ตัน 4636425 SIMI/M
วท.ม. (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อุไรวรรณ โฆษิตานนท์, Ph.D., ชาติชาย กฤตนัย, Ph.D., กัลลยานี ดวงฉวี, M.Sc., ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, M.D., Ph.D.

บทคัดย่อ

เลปโตสไปโรซีสเป็นโรคโดยมีสัตว์เป็นพาหะที่พบว่ามีการระบาดไปทั่วโลก และเป็นโรคชนิดหนึ่งของโรคที่เป็นปัญหาหลักในประเทศไทย อาการทางคลินิกของโรคเลปโตสไปโรซีสในผู้ป่วยจำนวนมากไม่สามารถวินิจฉัยแยกจากโรคไข้อื่นๆได้ วิธีการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซีสอย่างรวดเร็วและถูกต้องจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อแพทย์และผู้ป่วย ความรู้และความเข้าใจในการแสดงออกของโปรตีนเชื้อเลปโตสไปราจึงมีความสำคัญในการช่วยพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยทาง serology และการออกแบบวัคซีน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคจำนวน 4 ซีโรวาร์ และไม่ก่อโรคจำนวน 1 ซีโรวาร์ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยในประเทศไทย โดยใช้วิธี 2D-gel electrophoresis (2-DE) ร่วมกับวิธี immunoblotting และตรวจหาคุณสมบัติทั่วๆไปของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมโดยใช้วิธี MALDI-TOF MS

การทำวิธี immunoblotting จะใช้ซีรัมของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซีสจำนวน 4 คนทำปฏิกิริยากับโปรตีนแต่ละซีโรวาร์ที่แยกได้จากวิธี 2-DE ผลการศึกษาพบว่า สามารถพบจุดโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 5 ซีโรวาร์ที่ทำปฏิกิริยากับ Immunoglobulin M และ G (IgM และ IgG) เท่ากับ 21 และ 28 จุด ตามลำดับ โดยเชื้อซีโรวาร์ Australis พบจำนวนจุดโปรตีนสูงที่สุด คือ 12 จุด เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี IgM และ 16 จุด สำหรับแอนติบอดี IgG ในขณะที่เชื้อซีโรวาร์ Bataviae พบจำนวนจุดโปรตีนน้อยที่สุด คือ 3 จุด เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี IgM และ IgG แต่ละชนิด จุดโปรตีน MU16 เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี IgM และ IgG ซึ่งพบได้ในเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคทั้ง 4 ซีโรวาร์ แต่จะไม่พบในสายพันธุ์ไม่ก่อโรค ในขณะที่จุดโปรตีน MU 17-20 จะพบเฉพาะสายพันธุ์ไม่ก่อโรคเท่านั้น

โปรตีนที่สนใจจำนวน 29 จุด จะถูกวิเคราะห์โดยวิธี MALDI-TOF MS เมื่อเทียบค่าน้ำหนักชิ้นเปปไทด์ของโปรตีน พบว่า โปรตีนจำนวน 24 จุด ให้ผลว่าเป็นเชื้อเลปโตสไปรา นอกจากนี้ยังแสดงค่าความเหมือนและร้อยละของลำดับกรดอะมิโนในอัตราที่สูง สำหรับโปรตีนอีก 5 จุด ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ว่าเป็นของเชื้อเลปโตสไปรา การวิเคราะห์หาคุณสมบัติ hydrophobic และ hydrophilic จากลำดับกรดอะมิโน พบว่าโปรตีน 24 จุด มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาส่วนประกอบของ lipopolysaccharide และ glycoprotein ของเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 5 ซีโรวาร์โดยใช้วิธี one-dimensional gel electrophoresis ร่วมกับการย้อมด้วยสีย้อม lipopolysaccharide และ glycoprotein พบว่าสามารถย้อมติดสีของ lipopolysaccharide และ glycoprotein ได้ 2 diffused bands คือ 25-31 kDa และ 6.5-15 kDa ซึ่งทั้ง 2 ส่วนนี้มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบน้อยมาก

โดยสรุป การใช้วิธี 2-DE ร่วมกับวิธี immunoblotting ประสบความสำเร็จในการตรวจหาและจำแนกคุณสมบัติของโปรตีน (โดยเฉพาะจุดโปรตีน MU 16 ซึ่งพบในเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค และจุดโปรตีน MU 17-20 จะพบเฉพาะสายพันธุ์ไม่ก่อโรค) ที่เข้าข่ายว่ามีความสามารถที่จะนำไปพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยทาง serology และการออกแบบวัคซีนของโรคเลปโตสไปโรซีสต่อไปในอนาคต

106 หน้า ISBN 974-04-7355-5

DETECTION OF IMMUNOGENIC PROTEINS IN LEPTOSPIROSIS USING 2D-GEL ELECTROPHORESIS AND IMMUNOBLOTTING

PUTITA SAETUN 4636425 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: URAIWAN KOSITANONT, Ph.D.,
CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., GALAYANEE DOUNGCHAWEE, M.Sc.,
CHANWIT TRIBUDDHARAT, M.D., Ph.D.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease found worldwide and is one of the major health problems in Thailand. Many clinical cases of leptospirosis are misdiagnosed as other febrile diseases. A rapid and accurate method for the diagnosis of leptospirosis is very important to clinician and patient. Understanding of leptospiral protein expression regulation is needed to develop new serodiagnostic strategies and vaccine design. This study undertook a protein analysis of four pathogenic *Leptospira* serovars Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava and one non-pathogenic serovar Patoc, commonly found in Thailand, which were obtained by using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) combined with immunoblotting, and identified general properties of these detectable immunoreactive proteins by using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

By immunoblotting, 2-DE leptospiral proteins for each serovar were reacted with 4 serum samples from individual leptospirosis patients. It was found that immunoglobulin M and G (IgM and IgG) antibodies against 5 leptospiral serovars were detected in 21 and 28 immunoreactive protein spots, respectively. The highest number of reactive protein spots from serovar Australis were 12 spots for IgM antibodies and 16 spots for IgG antibodies, while the lowest number of reactive protein spots from serovar Bataviae were 3 spots for each of IgM and IgG antibodies. Protein spot MU 16 was the most common immunoreactive result of both IgM and IgG antibodies with all 4 pathogenic strains, but was not found in the non- pathogenic strain. On the other hand, protein spots MU 17-20 were found in the non- pathogenic strain only.

Twenty-nine interesting protein spots were identified by a MALDI-TOF MS. Peptide mass mapping of 24 protein spots were significant matched to *Leptospira*, and showed high scores and percentages of sequence coverage. Five protein spots were not matched to protein data. Identification of hydrophobic and hydrophilic properties for amino acid sequences from 24 protein spots showed that their components contained hydrophilic properties. In addition, lipopolysaccharide (LPS) and glycoprotein from 5 leptospiral serovars were detected by using one-dimensional gel electrophoresis coupled with LPS and glycoprotein staining. Results of LPS and glycoprotein stainings showed abundant 2 major diffused bands, 25-31 kDa and 6.5-15 kDa, containing less protein components.

In conclusion, the 2-DE analysis coupled with immunoblotting has been successfully used to detect and characterize candidate immunogenic proteins, particularly protein spots MU 16 (pathogenic strains) and 17-20 (non-pathogenic strains), which may be a guidance to develop new strategies for serodiagnosis and further vaccine development of leptospirosis.

KEY WORDS : LEPTOSPIRA / TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS / IMMUNOBLOTTING
106 P. ISBN 974-04-7355-5