EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF PERIPLASMIC FLAGELLIN PROTEIN OF *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SEROVAR AUTUMNALIS: THE USE IN DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS

WARAPORN WANNA

A THESIS SUBMITTED IN PARTAIL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

การสร้างและการศึกษาคุณสมบัติโปรตีนเพอริพลาสมิคแฟลกเจลลินของเชื้อ *Leptospira interrogans* ซีโรวาร์ Autumnalis ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส (EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF PERIPLASMIC FLAGELLIN PROTEIN OF *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SEROVAR AUTUMNALIS: THE USE IN DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS)

วราพร วรรณา 4837183 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: อุไรวรรณ โฆษิตานนท์, Ph.D., ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, M.D., Ph.D., กัลลยานี ดวงฉวี, M.Sc.

บทคัดย่อ

เลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่พบมีการแพร่ระบาดทั่วโลกและเป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งที่เป็นปัญหาหลักของประเทศไทย ช่วงแรกของการเป็นโรค ผู้ป่วยมักแสดงอาการที่ไม่จำเพาะซึ่งคล้ายกับอาการของโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุอื่นๆซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและถูกต้องจึงถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งเพราะจะเป็นประโยชน์ในด้านการรักษาได้ทันท่วงที ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้โดยใช้วิธี 2-D gel electrophoresis ร่วมกับวิธี immunoblotting พบว่าโปรตีนเพอริ-พลาสมิคแฟลกเจลลิน (FlaB) ของเชื้อ *Leptospira interrogans* หลายซีโรวาร์ในกลุ่มที่ก่อโรคสามารถทำปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ในซีรั่มของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จึงเห็นว่าโปรตีน FlaB น่าจะนำมาใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสได้ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน FlaB ของเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Autumnalis สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยทำการเพิ่มจำนวน *flaB* gene ของเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Autumnalis และต่อเข้าสู่พลาสมิด pET200/D-TOPO® ได้สำเร็จซึ่งตั้งชื่อพลาสมิดนั้นว่า pAN และสามารถสร้างฟิวชั่นโปรตีน $(His)_6$-tagged FlaB จากเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) ได้สำเร็จ ฟิวชั่นโปรตีนที่ได้เป็นโปรตีนในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ฟิวชั่นโปรตีนที่ทำให้ละลายแล้วนำมาผ่านกระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยผ่าน Histrap™ คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีและทำการตรวจเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนโดยการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry ฟิวชั่นโปรตีนถูกฉีดเข้าไปในกระต่ายเพื่อสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน FlaB เพื่อใช้ในการตรวจหาโปรตีน FlaB จากเชื้อ *Leptospira* จำนวน 9 ซีโรวาร์ ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน FlaB ในทุกๆสปีชีส์และซีโรวาร์ของเชื้อ *Leptospira* ที่ใช้ในการศึกษานี้ความเป็นแอนติเจนของฟิวชั่นโปรตีน FlaB ถูกนำมาทดสอบกับซีรั่มของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสและโรคอื่นๆ รวมทั้งคนสุขภาพแข็งแรงด้วยโดยใช้วิธี IgM immunoblotting พบว่าโปรตีน FlaB ทำปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดีชนิด IgM เฉพาะในซีรั่มของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสเท่านั้น ความไวและความจำเพาะของวิธี FlaB IgM immunoblotting (FlaB IgM-IB) สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี IgM immunoblotting (IgM-IB) คิดเป็นร้อยละ 73 และ 100 ตามลำดับ จะเห็นว่าโปรตีน FlaB น่าจะเหมาะสำหรับใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส นอกจากนี้แอนติบอดีต่อโปรตีน FlaB ที่ผลิตได้ในการศึกษานี้สามารถทำปฏิกิริยาจับกับโปรตีน FlaB ที่มาจากของเชื้อ *Leptospira* ทุกซีโรวาร์ ดังนั้นสามารถใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน FlaB ในการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อ *Leptospira* ได้

119 หน้า

Copyright by Mahidol University

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF PERIPLASMIC FLAGELLIN PROTEIN OF *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SEROVAR AUTUMNALIS: THE USE IN DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS

WARAPORN WANNA 4837183 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

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

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease that has a worldwide distribution, and is one of the major health problems in Thailand. The symptom of early-phase leptospirosis is often non-specific and that can be a major problem in making a diagnosis in the form of febrile illness syndrome. The rapid and accurate diagnosis of leptospirosis is of extreme importance, because antibiotic treatment provides the greatest benefit when administered at the early stage of infection. A previous study by 2-D gel electrophoresis combined with immunoblotting found that periplasmic flagellin (FlaB) protein from several pathogenic *Leptospira* serovars reacted with IgM and IgG in sera of patients with laboratory-confirmed leptospirosis. The data suggested that FlaB protein may be used as an antigen for serodiagnosis of leptospirosis in humans. In this study, a production and characterization of the recombinant FlaB protein of *L. interrogans* serovar Autumnalis was performed. The complete *flaB* gene was successfully amplified and cloned into the expression plasmid, pET200/D-TOPO®, which was designated as pAN. The N-terminal $(His)_6$-tagged FlaB fusion protein was successfully expressed in BL21 Star™ (DE3) *Escherichia coli* as an inclusion body form. The solubilized fusion protein was then purified by using Histrap™ HP column chromatography and analyzed using MALDI-TOF mass spectrometry. This recombinant FlaB protein was then injected into rabbits to generate the anti-FlaB antibody, which was subsequently determined to be conserved among 9 *Leptospira* serovars. The newly developed recombinant FlaB protein was determined for diagnosis of leptospirosis with patient sera with leptospirosis and also sera from patients with non-leptospirosis by IgM immunoblotting, which revealed that FlaB protein were only recognized by IgM antibodies from patient sera with leptospirosis. The sensitivity and specificity of FlaB IgM immunoblotting (FlaB IgM-IB) for serodiagnosis of human leptospirosis compared with IgM immunoblotting (IgM-IB) were evaluated to be 73% and 100%, respectively. Immunoblotting revealed that the recombinant FlaB protein might be suitable as an antigen for diagnosis of human leptospirosis. Moreover, the produced antibody to FlaB protein could react with this antigen among all leptospiral serovars suggesting that the anti-FlaB antibody could be used for *Leptospira* spp. identification.

KEY WORDS: *LEPTOSPIRA INTERROGANS* / PERIPLASMIC FLAGELLIN (FlaB) PROTEIN /IMMUNOBLOTTING

119 pp.

Copyright by Mahidol University