



27 มี.ค. 2532

THE STUDY FOR THE PURIFICATION OF  
OUTER MEMBRANE COMPLEX ANTIGEN OF BACTEROIDES FRAGILIS  
AND THE PRODUCTION OF SPECIFIC ANTIBODY

DARANEE JAMJUREE

๓

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
(PUBLIC HEALTH)

อภินันท์นากการ

๖๓๓

บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล.

IN  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY

1988

12138

ชื่อวิทยานิพนธ์      การศึกษาถึงวิธีการแยกผนังชั้นนอกของเชื้อแบคทีรอยดิส  
ฟราจีลิส ให้บริสุทธิ์และการผลิตแอนติบอดีจำเพาะ

ผู้วิจัย                      น.ล. คารณิ      จามจรี

ปริญญา                      วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

- อัญชลี    ตันท์ศุกศิริ, B.Sc. (Pharm.), M.S. (Micro.)
- กานดา    วัฒนภาส, M.D., M.S. (Hyg.)
- อนงค์    ปริยานนท์, B.Sc. (Pharm.), M.S. (Micro.)
- นายเชิดศักดิ์    อีรบุตร, M.D., M.S. (Micro.)
- นายพิพัฒน์    ลักษมิจรัลกุล, B.Sc. (Med. Tech.), M.S. (Public Health)

วันที่สำเร็จการศึกษา      9 พฤษภาคม 2531

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกผนังชั้นนอกของเชื้อแบคทีรอยดิส ฟราจีลิส ATCC 23745 โดยการนำไปผ่านรูเข็มขนาดเล็ก ใช้ความร้อน สารเคมี ethylene diaminetetraacetate (EDTA) และปั่นโดยใช้รอบความถี่ที่แตกต่างกัน จากนั้นนำมาศึกษาต่อโดยวิธี sucrose density gradient พบว่าให้แถบเส้น 1 เส้น ที่ความหนาแน่น 1.21 กรัม /ลบ.ซม. ซึ่งคาดว่าส่วนที่เตรียมขึ้นนี้เป็นส่วนของผนังชั้นนอกของเชื้อแบคทีรอยดิส ฟราจีลิส จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยการใช้ column chromatography กับ Sephadex G-200 โดยมี 0.5 % sodium deoxycholate เป็นบัฟเฟอร์ ซึ่งช่วยให้ส่วนของไลโปโพลีแซคคาไรด์แตกตัวออกจากส่วนของผนังชั้นนอกของเชื้อ ผลที่ได้จากวิธีการนี้ทำให้ได้ส่วนประกอบของผนังชั้นนอกของเชื้อที่ประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์แคปซูลและโปรตีน จากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าส่วนใหญ่ประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 39 และ คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 24 เมื่อมาวิเคราะห์หาโปรตีนต่อด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าประกอบด้วยโปรตีนสำคัญที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 26,000, 27,000, 39,000, 42,000, 45,000, 52,000

และ 65,000 ดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี immunodiffusion พบว่าปฏิกิริยาของผนังชั้นนอกของเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์ต่อแอนตี้เซรัมที่ผลิตต่อตัวเชื้อ แบคทีรอยดิส ฟราจิลิส ATCC 23745 ให้เส้นตะกอน 1 เส้น

หลังจากนั้นนำส่วนประกอบของผนังชั้นนอกของเชื้อที่แยกได้มาผลิตแอนตี้เซรัมในกระต่ายและนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับแอนตี้เซรัมที่ผลิตจากเชื้อแบคทีรอยดิส ฟราจิลิส เชื้อที่มีชีวิต ในแง่ของความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อแบคทีรอยดิส ฟราจิลิสสายพันธุ์ต่างๆโดยวิธี immunodiffusion, tube agglutination และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

แอนตี้เซรัมต่อส่วนประกอบของผนังชั้นนอกของเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์ให้ระดับไทเตอร์ 1:320 เมื่อทดสอบโดยวิธี tube agglutination และ 1:16,000 เมื่อทดสอบโดยวิธี ELISA ในขณะที่แอนตี้เซรัมต่อตัวเชื้อที่มีชีวิตให้ไทเตอร์สูงถึง 1:1,280 และ 1:128,000 เมื่อทดสอบโดยวิธี tube agglutination และโดยวิธี ELISA ตามลำดับ และเมื่อทดสอบโดยวิธี immunodiffusion พบว่าเกิดเส้นตะกอนในกรณีของการใช้แอนตี้เซรัมต่อเชื้อเป็นเท่านั้น นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าวิธี ELISA inhibition มีความไวต่อการตรวจหาเชื้อได้ในปริมาณที่น้อยที่สุดถึง 0.01 ไมโครกรัมของโปรตีนแอนติเจน

จากการศึกษาถึงความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ แบคทีรอยดิส ฟราจิลิส สายพันธุ์อื่นๆพบว่าแอนตี้เซรัมต่อส่วนประกอบของผนังชั้นนอกของเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์เกิดปฏิกิริยากับแบคทีรอยดิส ฟราจิลิสบางสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ จากผลการศึกษานี้พอที่จะบอกได้ว่าส่วนของโพลีแซคคาไรด์แคปซูลและโปรตีนไม่ใช่ส่วนที่พบกันโดยทั่วไปในเชื้อ แบคทีรอยดิส ฟราจิลิส ตามที่ได้เคยอธิบายไว้ในการศึกษาในอดีตเช่นของ Kasper และ Seller ในปี 1975 ในขณะที่แอนตี้เซรัมที่ผลิตต่อเชื้อเป็นซึ่งมีส่วนประกอบของทั้งไลโปโพลีแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์แคปซูลแสดงความจำเพาะต่อสปีชีส์มากกว่า ผลจากการศึกษาที่พอที่จะบอกได้ว่าส่วนประกอบของผนังชั้นนอกของเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์แคปซูล-โปรตีน ค่อนข้างจะมีคุณสมบัติจำเพาะต่อชนิดหรือสายพันธุ์

สำหรับแอนตี้เซรัมทั้งสองพบว่ามียุติกริยาข้ามกับสปีชีส์อื่นที่ทดสอบเพียงสปีชีส์เดียวคือแบคทีรอยดิส อะแซคคาโรลิตีคัส เมื่อทดสอบโดยวิธี ELISA inhibition

ด้วยปริมาณของ inhibitor ในระดับที่สูงและเมื่อทดสอบโดยวิธี agglutination พบปฏิกิริยาข้ามเฉพาะกับแอนตี้เซรัมต่อเชื้อที่มีชีวิตเท่านั้น จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอาจมีบางส่วนในแคปซูลที่มี antigenic determinant ร่วมกันหรืออาจมีการติดเชื่อของแบคทีรอยดิส อะแซคคาโรลยติคูล ในกระต่ายช่วงที่มีการผลิตแอนตี้เซรัม

ถึงแม้ว่าแอนตี้เซรัมต่อส่วนประกอบของผนังชั้นนอกของเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์จะสามารถตรวจหาเชื้อแบคทีรอยดิส ฟราจิลิสสายพันธุ์ต่างๆ ได้น้อยกว่าแอนตี้เซรัมต่อเชื้อที่มีชีวิต แอนตี้เซรัมนี้ก็ยังคงมีประโยชน์ในแง่ของความจำเป็นในการตรวจหาเชื้อ ถ้าแอนตี้เซรัมนี้สามารถเตรียมให้ครอบคลุมเชื้อหลายๆ สปีโรทัยป์โดยเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมและนำมารวมกันก็เชื่อได้ว่าอาจจะสามารถตรวจหาเชื้อแบคทีรอยดิส ฟราจิลิสสายพันธุ์ต่างๆ ได้กว้างขวางขึ้นซึ่งจะช่วยในการวินิจฉัยในกรณีที่มีการติดเชื่อของแบคทีรอยดิส ฟราจิลิสได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

Thesis Title " The Study for the Purification of Outer Membrane Complex Antigen of Bacteroides fragilis and the Production of Specific Antibody "

Name Miss Daranee Jamjuree

Degree Master of Science (Public Health)

Thesis Supervisory Committee :

Anchalee Tansuphasiri, B.Sc.(Pharm.),M.S.(Micro.)

Kanda Vathanophas, M.D.,M.S.(Hyg.)

Anong Pariyanonda, B.Sc.(Pharm.),M.S.(Micro.)

Chertsak Dhiraputra, M.D.,M.S.(Micro.)

Pipat Luksamijarulkul, B.Sc.(Med. Tech.),M.S.(Public Health)

Date of Graduation May 9, 1988

#### ABSTRACT

The outer membrane complex of Bacteroides fragilis ATCC 23745 was isolated with use of gentle techniques of heat, ethylenediaminetetraacetate (EDTA) treatment, shearing, and differential centrifugation. Relative purity of the preparation was suggested by the formation of a single band in a sucrose density gradient at a density of 1.21 g/ml. At this density was analysed as an outer membrane. The outer membrane complex component including capsular polysaccharide and protein was separated from outer membrane lipopolysaccharides (LPSs) by using column chromato-

graphy with Sephadex G-200 and used 0.5 per cent sodium deoxycholate buffer to disaggregate the LPSs. The major chemical compositions of the purified outer membrane consisted of protein (39 per cent), and carbohydrate (24 per cent). Analysis of the protein components by electrophoresis on polyacrylamide gel, the major proteins were found with the molecular weights of 26,000, 27,000, 39,000, 42,000, 45,000, 52,000, and 85,000 daltons. Immunodiffusion analysis of the purified outer membrane against the homologous whole cell antiserum gave one precipitin line.

Purified outer membrane complex preparation along with the whole viable *B. fragilis* cells were used to develop hyperimmune sera in rabbits. The purified outer membrane complex antiserum and the whole cell antiserum were compared on the basis of their reactivity and specificity with the uses of immunodiffusion technique, tube agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The purified outer membrane complex antiserum gave rather low titre, 1:320 by the tube agglutination test, or 1:18,000 by ELISA test; whereas the whole cell antiserum gave the titre up to 1:1,280 by the agglutination test and 1:128,000 by ELISA test. In an agar gel diffusion test, precipitin lines were found only when tested with whole cell antiserum. The ELISA inhibition test described had

exquisite sensitivity and was capable of detecting as little as 0.01  $\mu$ g of protein present in the antigen preparation.

Specificity to detect other B. fragilis strains were studied and the results showed that the purified outer membrane complex antiserum reacted with some B. fragilis tested strains whereas the whole cell antiserum reacted with all B. fragilis tested strains. These results were suggested that the purified outer membrane complex antigen is not the common antigen as described by the previous studies. Whereas the serum elicited by whole cell antigen which was represented of both LPSs and capsular polysaccharide showed more species-specific. It was suggested that the capsular polysaccharide and protein was rather type specific antigen and the whole cell antigen was rather species-specific antigen.

Cross-reaction to other species and genera were only observed with B. asaccharolyticus ATCC 25280 for both antisera when tested by ELISA inhibition but in rather high concentration of inhibitor. When the agglutination test was used, this cross-reaction was observed only for the whole cell antiserum. This result showed that they may share some antigenic determinant in their capsules or past infection with B. asaccharolyticus in rabbits may be existed.

Although the purified outer membrane complex antiserum could detect B. fragilis strains less than the whole cell antiserum, the purified outer membrane complex antiserum remained useful in the case of its specificity. If the purified outer membrane complex antiserum prepared from a wide range of serotypes by selecting appropriate strains and possibly pooled, it may be possible to detect a very broad range of B. fragilis antigens directly from clinical specimens and thus provide an accuracy and rapid diagnosis of B. fragilis infection.