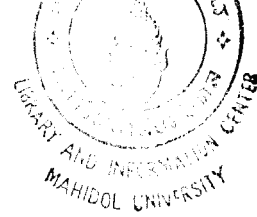


13 JUN 2003



**EXPRESSION AND PURIFICATION OF CRYSTALLINE
SURFACE LAYER RECOMBINANT PROTEIN OF *RICKETTSIA
TYPHI* FOR USE AS ANTIGEN IN SPECIFIC ANTIBODY
DETECTION TEST IN MURINE TYPHUS**

VONGSAKORN POONPIRIYA
=

With cover elements

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(CLINICAL PATHOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003**

ISBN 974-04-2845-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
V9462
2003
C. 2

EXPRESSION AND PURIFICATION OF CRYSTALLINE SURFACE LAYER
RECOMBINANT PROTEIN OF *RICKETTSIA TYPHI* FOR USE AS ANTIGEN IN
SPECIFIC ANTIBODY DETECTION TEST IN MURINE TYPHUS

VONGSAKORN POONPIRIYA 4236346 RACP/M

M.Sc.(CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISOR : MONGKOL KUNAKORN M.D.,
SUMALEE TUNGPRADABKUL Ph.D.

ABSTRACT

Rickettsia typhi (formerly named *Rickettsia mooseri*) is a Gram negative, obligate intracellular bacteria. It is the causative agent of murine typhus or endemic typhus, which has a worldwide distribution, especially in tropical countries. The main vector of murine typhus is *Xenopsylla cheopis*, a rat flea which maintains *Rickettsia typhi* in rodents.

Many studies have revealed that bacterial S-layers play many roles such as a protective coat, a molecular sieve or as a structure involved in cell adhesion and surface recognition. *Rickettsia typhi* also posses the S-layers externally to the outer membrane as encoded by *slpT* gene, which is translated into Crystalline Surface layer protein (SLP). In 1996 Hahn and Chang characterized the SlpT protein of *Rickettsia typhi* as the protective antigen against murine typhus and also found that it reacted strongly with antiserum of patient with murine typhus.

The purpose of this research is to select a part of SlpT of *Rickettsia typhi* to be cloned. A 400bps piece of *SlpT* gene encoded for a 10.2 kDa recombinant protein was cloned. After expression and the purification process, this 10.2 kDa protein was examined for antigenicity with murine typhus positive antiserum. The final result showed that this part of SlpT didn't have enough antigenicity to give a positive reaction with murine typhus antiserum.

KEY WORDS: *RICKETTSIA TYPHI* / CRYATLLINE SURFACE LAYER
PROTEIN / *slpT* GENE / MURINE TYPHUS

93 P. ISBN 974-04-2845-2

การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ Crystalline Surface Layer ของเชื้อ *Rickettsia typhi* สำหรับใช้เป็นแอนติเจน ในการทดสอบหาแอนติบอดีจำเพาะ ในผู้ป่วยโรค Murine typhus
(EXPRESSION AND PURIFICATION OF CRYSTALLINE SURFACE LAYER RECOMBINANT PROTEIN OF *RICKETTSIA TYPHI* FOR USE AS ANTIGEN IN SPECIFIC ANTIBODY DETECTION TEST IN MURINE TYPHUS)

วงศกร พูนพิริยะ 4236346 RACP/M

วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : มงคล คุณากร M.D., สุมาลี ตั้งประดับกุล Ph.D.

บทคัดย่อ

Rickettsia typhi หรือ *Rickettsia mooseri* จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และมีคุณสมบัติเป็น obligate intracellular bacteria ซึ่งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเชื้อชนิดนี้ จำเป็นต้องอาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตอื่นเท่านั้น เชื้อ *Rickettsia typhi* ซึ่งเป็นสาเหตุของการก่อโรค murine typhus (endemic typhus) นี้สามารถพบการระบาดของโรคได้ในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบทวีปเขตร้อน โดยการติดต่อของโรค จะอาศัยหมัดในตระกูล *Xenopsylla cheopis* ของหนูบ้านเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ

งานค้นคว้าวิจัยในแบคทีเรีย ชี้ให้เห็นว่าผนังเซลล์ส่วนนอก ซึ่งเรียกว่า S-layers มีบทบาทกำหนดการทำงานที่สำคัญหลายอย่างของเชื้อ เช่น เป็นผนังที่ช่วยป้องกันเชื้อจากสิ่งแวดล้อม, ทำหน้าที่กรองสาร หรือ เป็นตำแหน่งที่ช่วยในการยึดติด และเป็นที่ยึดจำของผนังเซลล์อื่น เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Hahn และ Chang ในปี 1996 พบว่า โปรตีน crystalline surface layer ของเชื้อ *Rickettsia typhi* กำหนดโดยยีน *slpT* สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะของผู้ป่วยโรค murine typhus ได้

งานวิจัยนี้ได้เลือกชิ้นยีนขนาด 400 เบส จากขนาดทั้งหมด 3991 เบส ของยีน *slpT* มาโคลนเพื่อใช้เป็นแอนติเจน โดยชิ้นยีนดังกล่าวนี้จะถูกแสดงออกในรูปของโปรตีนขนาด 10.2 kDa หลังจากผ่านกระบวนการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ และนำไปทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วยโรค murine typhus แล้ว พบว่า ชิ้นยีนดังกล่าวนี้ไม่มีคุณสมบัติเพียงพอในการเป็นแอนติบอดีจำเพาะ ที่จะสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะที่มีอยู่ในซีรัมของผู้ป่วยที่นำมาทดสอบได้