



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ :

การทดลองผลิตวัคซีนเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลังอย่างมีหลัก
การสำหรับโรคmelioidosis

Construction of a rationally live attenuated
vaccine for melioidosis

โดย ผศ. ดร. ปรีชา หอมจำปา และคณะ

31 มกราคม 2547



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ :

การทดลองผลิตวัคซีนเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลังอย่างมีหลัก
การสำหรับโรคmelioidosis

**Construction of a rationally live attenuated
vaccine for melioidosis**

โดย ผศ. ดร. ปรีชา หอมจำปา และคณะ

31 มกราคม 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ :

การทดลองผลิตวัคซีนเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลัง อย่างมีหลักการสำหรับโรคเมลิออยโดซิส

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา หอมจำปา
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มยุรี ลุนช่วง
3. รองศาสตราจารย์ ศรีวิไล วโรภาสตระกูล
4. รองศาสตราจารย์ อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์

สังกัด

คณะเทคนิคการแพทย์ มข
คณะเทคนิคการแพทย์ มข
คณะเทคนิคการแพทย์ มข
คณะเทคนิคการแพทย์ มข

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการ : เมลิออยโดซิส

บทคัดย่อ

การกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ (cell-mediated immunity) เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการคุ้มกันโรคที่เกิดจากเชื้อที่สามารถอาศัยอยู่ได้ภายในเซลล์ (intracellular organism) เช่นเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคmelioidosis และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าวัคซีนเชื้อเป็นสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ได้ดี โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดลองผลิตวัคซีนเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนกำลังลงอย่างมีหลักการสำหรับโรคmelioidosis และเพื่อที่จะประเมินศักยภาพในการที่จะนำมาใช้เป็นวัคซีน โดยใช้หนูเป็นโมเดลในการศึกษา การผลิตวัคซีนดังกล่าวจะอาศัยหลักการที่เรียกว่า rational attenuation โดยการกลาย (mutate) จีน *aroC* ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อในร่างกายของโฮสต์ การดำเนินการเริ่มจากการโคลนจีน *aroC* จากเชื้อ *B.pseudomallei* สายพันธุ์ PHB111 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย โดยอาศัยวิธีการ complement เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ที่จีน *aroC* ถูกทำให้กลายไป การโคลนจีน *aroC* ทำได้โดยการเตรียม partial Sau3AI DNA library ขนาด 2-4 Kb จากนั้นนำไป transform เข้าเชื้อ *E.coli aroC* mutant และคัดเลือกโคลนที่ต้องการโดยการเลี้ยงใน M9 minimal medium ได้ complementing clone จำนวน 3 โคลน เลือก plasmid clone ที่มีขนาดเล็กที่สุด คือ pPHE 146 เพื่อทำการศึกษาดำเนินตำแหน่งของ *aroC* gene โดยเทียบจาก genome sequence ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่มีรายงานไว้แล้ว ได้ทำการตัด *XhoI* fragment ขนาด 438 bp ซึ่งอยู่ภายใน *aroC* gene ออกไป โคลนที่ได้คือ pPHE149 จะสูญเสียความสามารถในการ complement *E.coli aroC* mutant จากนั้นได้ทำการโคลน *SmaI/HindIII* fragment ซึ่งมี $\Delta aroC$ จาก pPHE149 เข้าไปในเวกเตอร์ pEX19Tc ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่มี *sacB* gene ซึ่งใช้เป็น counterselectable marker โคลนที่ถูกตัดที่ได้คือ PHE 150 ถูกนำไป conjugated กับเชื้อ *B.pseudomallei* PHB111 และเลือก transconjugants ที่ต้องการบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 5% sucrose เป็นส่วนผสม จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่ฟุ้งสาร aromix ซึ่งจะเป็นเชื้อ *B.pseudomallei* ที่ต้องการ คัดเลือกเชื้อที่ต้องการได้ 2 โคลน (PHB116 และ PHB117) และเลือกเชื้อ PHB117 เพื่อศึกษาต่อไป ผลการตรวจยืนยัน genotype โดยวิธี Southern blotting และวิธี PCR ได้ผลถูกต้องโดยไม่มีส่วนของเวกเตอร์แทรกอยู่ในโครโมโซมของเชื้อ PHB 117 ผลการศึกษาโดยการ immunize หนู Balb/c พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ PHB 116 มีความอ่อนแรงลงอย่างมากโดยมีค่า LD50 มากกว่า 1.96×10^6 cfu ทั้งทาง intraperitoneal และ nasal เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้น PHB111 ซึ่งมีค่า LD50 น้อยกว่า 20 cfu ผลการศึกษาศักยภาพในการใช้เป็นวัคซีน พบว่าการ immunize หนู Balb/c

ทาง intraperitoneal ด้วยเชื้อกลายพันธุ์ PHB 117 จำนวนประมาณ 4×10^7 cfu ครั้งเดียว หรือสองครั้ง ห่างกัน 2 อาทิตย์ จะไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด protective immunity ในหนู เมื่อ challenge หนูดังกล่าวด้วยเชื้อตั้งต้น PHB111 ในจำนวนเชื้อประมาณ 10 เท่าของ จำนวน LD50 ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาเพื่อดูว่า การ immunize หนู ทาง nasal จะคุ้มกันได้หรือไม่ รวมทั้งการศึกษาในหนูสายพันธุ์ชนิดเพื่อดูว่าจะแตกต่างจากหนูที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้หรือไม่

Abstract

The *aroC* gene from *Burkholderia pseudomallei* strain PHB111, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate phospholyase (chorismate synthase) was cloned by complementation of the *aroC* mutation in *E. coli* after electroporation with a *Sau3AI* DNA library constructed in pUC18 which had been restricted with *Bam*HI. The *Xho*I fragment of 438 Kb internal of the cloned *aroC* gene was deleted and the resultant *aroC*-containing fragment was reintroduced by allelic exchange into the chromosome of the parental *B. pseudomallei* PHB111 via conjugation using pEX19Tc, a suicide vector containing a *sacB* gene as a counterselectable marker. Two independent Δ *aroC* mutants of *B. pseudomallei* designated PHB116 and PHB117 were isolated. The marker-free *aroC* mutant of *B. pseudomallei* was highly attenuated in a Balb/c mouse model. However, mice immunized intraperitoneally with either a single dose or two doses of the *B. pseudomallei aroC* mutant were not protected against a lethal parental strain challenge. Protection study via nasal inoculation is underway to determine if this route can induce protection.

Executive Summary

ปัญหาวิจัย

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคmelioidosis สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้สูง ถ้าไม่ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้อง นอกจากนี้เชื้อยังสามารถหลบซ่อนอยู่ในร่างกายและอาจก่อให้เกิด relapse ได้ ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันโรคนี้ วัคซีนที่น่าจะได้ผลดีสำหรับเชื้อนี้เป็นเชื้อชนิด intracellular bacteria น่าจะเป็นวัคซีนเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลัง การทำให้เชื้ออ่อนกำลังลงอย่างมีหลักการ น่าจะเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับ เพราะทำให้ทราบถึงหลักการที่ทำให้เชื้ออ่อนกำลังลง นอกจากนี้เชื้อต้องอ่อนกำลังโดยไม่ขึ้นกับว่าระบบภูมิคุ้มกันของผู้ได้รับวัคซีนจะดีหรือไม่ก็ตาม การศึกษาวิจัยทำให้ทราบว่า เชื้อที่มีการกลายของจีนใน pathway ที่ใช้สังเคราะห์สาร aromatic amino acids เช่น จีน *aroA*, *aroC* ฯ จะอ่อนกำลังลงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพราะไม่มี pathway ดังกล่าว ทำให้ไม่มีสารอาหารอย่างเพียงพอที่จะทำให้เชื้อกลายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในร่างกายของโฮสต์ เชื้อจึงอ่อนกำลัง แต่น่าจะอยู่ในร่างกายได้ระยะเวลานานพอที่จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

วัตถุประสงค์

1. ผลิตเชื้อ *B.pseudomallei* ที่มีการกลายของจีน *aroC*
2. ทดสอบการอ่อนกำลังและประเมินศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัคซีนเชื้อเป็นในหนูทดลอง

ผลการศึกษา

ได้ทำการโคลนจีน *aroC* จากเชื้อ *B.pseudomallei* โดยวิธี complementation ของเชื้อ *E.coli* *aroC* mutant ทำ restriction map เพื่อทราบตำแหน่งของจีน *aroC* และได้ทำการตัดส่วนกลางของจีนออกไปจำนวน 438 bp จากนั้นได้นำจีน *aroC* ที่ทำให้กลายดังกล่าวแล้วเข้าไปแทนที่ จีน *aroC* ปกติบนโครโมโซมของเชื้อ *B.pseudomallei* ตั้งต้น โดยอาศัยคุณสมบัติของจีน *sacB* ทำให้สามารถผลิตเชื้อ *B.pseudomallei* ที่มีการกลายของจีน *aroC* โดยที่ใช้จีนดื้อยาในการคัดเลือก ผลการศึกษาในหนูทดลองพบว่าเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตได้ มีความอ่อนแอลงอย่างเห็นได้ชัดตามที่คาดไว้ อย่างไรก็ตามผลการประเมินศักยภาพพบว่าเชื้อกลายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถกระตุ้น protective immunity ในหนู Balb/c เมื่อให้เชื้อเข้าทางช่องท้อง

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางที่ใกล้เคียงกับการติดเชื้อโดยธรรมชาติ เช่นทางช่องจมูก รวมทั้งทดลองในหนูที่มีพันธุกรรมต่างไปจากหนูสายพันธุ์ Balb/c

เนื้อหางานวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

1. การโคลน (clone) จีน *aroC** จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
2. การทำ restriction map ของจีนที่โคลนได้
3. การผลิต marker-free *aroC* mutant ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
4. การทดสอบระดับการการอ่อนกำลังของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei aroC* mutant
5. ประเมินศักยภาพของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตได้ ในการใช้เป็นวัคซีนเชื้อเป็นในหนู Balb/c

1. การโคลนจีน *aroC* จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

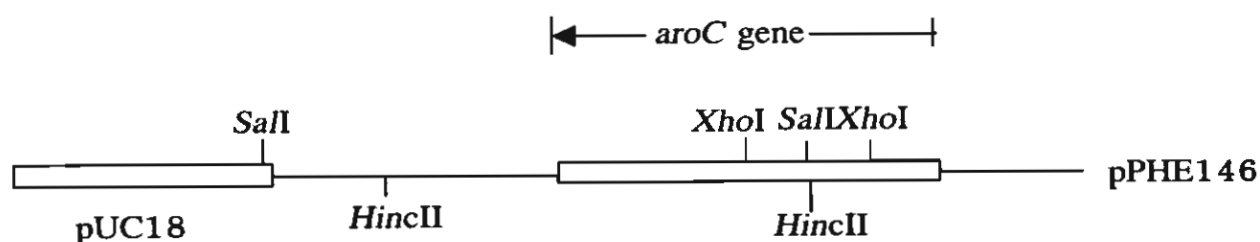
การโคลนจีน *aroC* จะเริ่มจากการเตรียม DNA library โดยสกัด genomic DNA จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* สายพันธุ์ PHB 111 จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แบบ partial แล้วนำมา run agarose gel electrophoresis ตัดชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 2-4 Kb แล้วนำมาสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น insert ซึ่งจะถูกนำไป ligate เข้ากับเวกเตอร์ pUC18 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ calf intestinal phosphatase และสกัดให้บริสุทธิ์แล้ว จากนั้นนำ ligated products ที่ได้ไป transform เข้าในเชื้อ *E.coli aroC* mutant (PHE106) เลือก complementing clones ที่ต้องการโดยการนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 minimal medium ได้โคลนที่ต้องการจำนวน 3 โคลน ตั้งชื่อว่า PHE 145, PHE146 และ PHE147 ตามลำดับ

ทำการสกัด recombinant plasmid จากเชื้อทั้งสามโคลน แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของ plasmid โดย agarose electrophoresis พบว่า plasmid จากโคลน PHE146 มีขนาดเล็กสุด จึงเลือกโคลน PHE146 เพื่อทำการศึกษาต่อไป จากการตรวจสอบอีกครั้งพบว่าเพื่อนำ pPHE146 (ซึ่งเป็น plasmid ที่สกัดจากโคลน PHE146) ไป transform เข้าในเชื้อ *E.coli aroC* mutant พบว่าสามารถ complement เชื้อนี้ได้ แสดงว่า pPHE146 มี functional *aroC* จาก *B.pseudomallei* จริง

*กรุณาอ่านคำชี้แจงในภาคผนวก

2. การทำ restriction map ของ pPHE146

ได้เลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดในการตัด pPHE146 โดยพิจารณาจากฐานข้อมูลของ Sanger Institute ซึ่งได้ทำ genome sequencing ของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อทำ agarose gel electrophoresis แล้วได้ข้อมูลตรงกับของ Sanger Institute ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดง partial restriction map ของ pPHE146 แสดงเฉพาะ restriction sites ที่สำคัญ (ไม่ได้วาดให้ได้สัดส่วนจริง)

เพื่อยืนยันว่า pPHE146 เป็นโคลนที่มี *aroC* จริง ได้ทำ sequencing โดยทำการ subcloning ดังนี้ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SalI* ในการตัด pPHE146 เพื่อ delete *SalI* fragment ออกไป จากนั้นทำ religation fragment ที่เหลือ เมื่อทำ cloning ได้โคลนที่ถูกต้องและตั้งชื่อว่า PHE154 จากนั้นได้ส่งโคลนนี้ไปทำ sequencing โดยใช้ forward primer ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผลการทำ sequencing ยืนยันว่าเป็น *aroC* จริง ดังรูปที่ 2

3' GAGCGCGCT CATGTAGCCG CGCACCTCGA CGCCGAAGCG CTCGCGCAGC
CACTTCTTCG CGATCGCGCC GCGCCGACG ACGGGCGCCG TCAGCCGCGC
GGACGAGCGG CCGCCGCCGC GATAGTCGCG CACGCCGTAC TTTTGCCAGT
AGGTGTAATC GGCATGGCCC GGGCGGAACG TCTCGGCGAT GTTGCCGTAG
TCCTTGCTGC GCTGGTCGGT GTTGCGGATC AGGAGCGCGA TCGGCGCGCC
GGTCGTCACG CCCTCGAACA CGCCGGACAG GATCTCGACC TGGTCGGGCT
CCTGGACGCT GCGTGACGTG GCGCGGACGT GCCGGGCTTG CGGCGGTCTGA
GCTCGAGCTG GACGTCGGCT TCCGTGAGCG CCATGCCCGG 5'

รูปที่ 2 แสดง partial sequence ของ *aroC* ถัดจาก *SalI* site เข้าไปซึ่งเป็นด้าน 3' end