

- Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, Zehner-Hansen S, Jarrige B, Daijardin JB. Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 720-4.
- Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1982.
- Farr RW. Leptospirosis. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1-8.
- Galton MM, Powers DK, Hall AM, Cornell RG. A rapid microscopic-slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. *Am J Vet Res* 1958; 19: 505-12.
- Gussenhoven GC, van der Hoorn MAWG, Goris MGA, Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, van Ingen CW, Smits HL. Lepto-Dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira* specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 92-7.
- Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. *J Bacteriol* 1967; 94: 27-31.
- Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH. Detection of leptospiral DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1035-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 11-4.
- Merien F, Amouriaux PP, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2219-24.
- Masri SA, Nguyen PT, Gale SP, Howard CJ, Jung SC. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Can J Vet Res* 1997; 61:15-20.
- Milner AR, Jackson KB, Woodruff K, Smart IJ. Enzyme-linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infections caused by *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 539-42.

- Pappas MG, Ballou WR, Gray MR, Takafuji ET, Miller RN, Hockmeyer WT. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot-ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34: 346-54.
- Quang NN, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Cao VV, Doan TT, Sakolvaree Y, Srimanote P, Chaicumpa W. Diagnosis of enteric fever caused by *Salmonella* spp. in Vietnam by a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1997; 15: 205-12.
- Silva MV, Nakamura PM, Carmargo ED, Batista L, Vaz AJ, Romero EC, Brandao AP. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG and IgA antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 650-5.
- Smits HL, Eapen CK, Sugathan S, Kuriakose M, Gasem MH, Yersin C, Sasaki D, Pujianto B, Vestering M, Abdoel TH, Gussenhoven GC. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 166-9.
- Sulzer CR, Glosser JW, Rogers F, Jones WLJ, Fris M. Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1975; 2: 218-21.
- Terpstra WJ, Schoone GJ, ter Schegget J. Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridization with ³²P- and biotin-labelled probes. *J Med Microbiol* 1986; 22: 23-8.
- Thiermann AB. Leptospirosis: current development and trends. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 184: 722-5.
- Thiermann AB. Isolation of leptospires in diagnosis of leptospirosis. *Mod Vet Pract* 1984; 65: 758-9.
- Torten M, Shenberg E, van der Horden J. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis. *J Infect Dis* 1966; 166: 537-43.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4.
- Turner LH. Leptospirosis II. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1968; 62: 880-99.

- Van Eys GJJM, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MTE, ter Schegget J, Terpstra WJ. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2258-62.
- Watt G, Alquiza LM, Padre LP, Tuazon ML, Laughlin LW. The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *J Infect Dis* 1988; 157: 840-2.
- Winslow WE, Merry DJ, Pirc MC, Devine P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1938-42.
- Zaki SR, Shieh WJ. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet* 1996; 347: 535-6.

โครงการย่อยที่ 2

การพัฒนาวีธีวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอนเทอโรฮีโมราจิกเอสเชอริเชีย โคไล

(Development of diagnostic method for enterohemorrhagic

Escherichia coli infections)

รายละเอียดของงานวิจัยโครงการย่อยที่ 2

การพัฒนาวีธีวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอนเทอโรฮีโมราจิกเอชเชอริเชียโคไล

การวิจัยในส่วนของโครงการย่อยที่สองนี้นอกจากงานที่เสนอไว้แล้ว คณะผู้วิจัยยังได้วิจัยเพิ่มเติมเรื่อง genotypes และ phenotypes ของ Shiga toxin producing *E. coli* ใน reservoir hosts คือ วัว ควาย อีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

I. การพัฒนาวีธีวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอนเทอโรฮีโมราจิกเอชเชอริเชียโคไล หรือ อีโคไลที่ผลิต ชิกาท็อกซิน

1. การเตรียม homogenates หรือ lysate (Ly) จากแบคทีเรียต่าง ๆ (ตารางที่ 2.1)

นำแบคทีเรียจาก stock cultures มา streak ลงบน trypticase soy agar (TSA) plate แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ตัด colonies (2-3 colonies) จาก overnight plate ใส่ลงใน 50 ml trypticase soy broth (TSB) ใน flask ขนาด 150 มล. นำ flask ไป incubate ที่ 37°C ใน shaking incubator เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำ culture ไปปั่นที่ $10,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำ bacterial pellet ไป suspend ใน deionized distilled water ให้ได้ optical density เป็น 2.0 ที่ 540 nm นำไป sonicate ที่ 20 kHz เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง แบ่ง เป็น aliquots เล็กๆ แล้วเก็บไว้ที่ -20°C

2. การเตรียม lipopolysaccharide (LPS) จาก *E. coli* serogroup O157

ผู้วิจัยได้รับ *E. coli* O157 ซึ่งเป็น clinical isolate มาจากประเทศญี่ปุ่น ในการเตรียม LPS ได้นำแบคทีเรียจาก stock culture มา plate ลงบน TSA เช่นเดียวกับการเตรียม whole cell lysate แล้ว pick growing colonies จาก plate ไป inoculate ลงใน TSB, incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำแบคทีเรียใน TSB ไป inoculate ลงใน Roux bottles ที่มี agar slants เตรียมจาก TSA 250 มล. ขวดละ 3 มล. เอียงขวดไปมาเพื่อให้ inoculum ครอบคลุมทั่วพื้นผิวของ agar slant แล้ว incubate ขวดทั้งหมดที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรวบรวม bacteria ที่เจริญบนพื้นผิวของ agar slants โดยใช้ลูกแก้ว (glass beads) และ sterile normal saline solution (NSS) กลิ้งไปมาให้แบคทีเรียหลุดออกจากผิวของ agar slants แล้วดูดออกมาปั่นล้าง bacteria ด้วย NSS ด้วยความเร็ว $10,000 \times g$ ที่ 4°C, 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที นำ bacterial pellet จากการปั่นล้างครั้งสุดท้าย ไป suspend ใน NSS โดยคำนวณให้ได้ bacterial weight 10-20 mg/ml. ผสม 90% phenol ปริมาตรเท่ากันลงใน bacterial suspension นำของผสมไปอุ่นที่ 65-68°C ในขณะเดียวกันให้กวนอย่างแรงและสม่ำเสมอเป็นเวลา 20-30 นาที ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วเก็บไว้ให้เย็นที่ 4°C ก่อนนำไปปั่นที่ $5,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้แยกเป็นชั้น ๆ ใช้ serological pipettes ดูดแยกชั้นน้ำ (aqueous phase) ซึ่งเป็นชั้นบน เก็บรวมไว้ (ต้องระมัดระวังไม่ให้ดูดชั้นกลางซึ่งเป็นชั้น nucleic acid หรือชั้นล่างซึ่งเป็น protein

ปนมมา) นำชั้น aqueous phase ที่เก็บมาได้มาวัดปริมาตรแล้วผสมกับ absolute ethanol ปริมาณเท่ากันที่แช่เย็นไว้ที่ 4°C ใช้ใยแก้วซึ่งซอมนกันหลายๆ ชั้น กรองตะกอนขาว ๆ ที่เกิดขึ้น ออกเก็บส่วนที่เป็นน้ำมาผสมกับ absolute ethanol อีก 4 ปริมาตร เก็บ preparation ไว้ที่ 4°C ค้างคืนแล้วนำไปปั่นที่ $5,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายน้ำ ปริมาตรน้อยๆ dialyse ในน้ำเกลือกำจัดแอลกอฮอล์ออกให้หมดจะได้ crude LPS หรือเรียกว่า เป็น first extracted LPS แล้วนำไปสกัดด้วยฟีนอลซ้ำอีกครั้งจนได้ second extracted LPS นำ preparation ไปปั่นที่ $100,000 \times g$, 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำ pellet ที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรน้อย ๆ ให้เป็น homogeneous solution นำไปหา dry weight แล้วแบ่งเก็บเป็น aliquots เล็กๆ (pure LPS) รูปที่ 2.1 แสดง SDS-PAGE-separated *E. coli*: O157 Ly และ LPS ที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (รูปที่ 2.1, Block I) และ Silver stain (รูปที่ 2.1, Block II)

3. การจัดหาและการเตรียม Toxins ต่าง ๆ

3.1 Cholera toxin (CT) ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Company, USA

3.2 Heat-labile enterotoxin (LT) จากเชื้อ enterotoxigenic *E. coli* เตรียมจาก recombinant clone ที่มี *hlt* gene ซึ่งได้รับความกรุณาจาก Professor Dr. Hisao Kurazono, Head, Department of Medical Technology, Institute of Health Sciences, University of Okayama, Japan ผู้ซึ่งเป็น collaborator โดยขั้นตอนในการเตรียม LT ได้ปฏิบัติตามวิธีของ Clements and Finkelstein (1978) และ Uesaka *et al.* (1994) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังนี้

นำ recombinant bacteria มา grow ใน LB broth ซึ่งมี ampicillin ผสมอยู่ 100 µg/ml ที่ 37°C ใน shaking incubator เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำ culture มาปั่นที่ $10,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อ collect bacterial cells นำ bacterial pellet ที่ได้มา suspend ใน 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6 ซึ่งมี NaCl ผสมอยู่ 0.9% จากนั้นทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกโดย sonication ที่ 20 kHz 2 นาที 5 ครั้ง หลังจากกำจัด cell debris ออกไปโดยการปั่นดังกล่าวข้างต้นอีกครั้งหนึ่งแล้วจึงนำ supernatant ซึ่งเป็น lysate จากเซลล์มา precipitate ด้วย 65% ammonium sulphate คือใส่ผง ammonium sulphate 398 กรัม/supernatant 1 ลิตร ตะกอนที่ได้จะเป็น crude LT นำไปละลายใน TEAN buffer แล้ว dialyse ใน buffer เดียวกันนี้ที่ 4°C ค้างคืน แล้ววัดค่า protein content (Bradford, 1976) ในขั้นตอนสุดท้ายนำ crude LT ไปผ่าน immobilized galactose column โดยซื้อ resin ชนิดนี้มาจากบริษัท Pierce Co. เมือง Rockford, USA โดย pack ใน glass column ขนาด 1.5×10.0 ซม. หลังจาก equilibrate column ด้วย TEAN buffer นำ crude LT มาผ่านลงไปซึ่ง LT จะจับกับ galactose ใน column ส่วนที่ไม่จับกับ galactose จะถูกล้างออกไปให้หมดด้วย TEAN buffer แล้วจึง elute bound LT ออกจาก column โดยใช้ 0.5 M galactose ใน TEAN buffer เก็บ eluates เป็น fractions เล็กๆ fraction ละ 1 มล. นำไปอ่าน optical density (OD) ที่ 280 nm หลังจากนั้นจึง pool รวม

fractions ที่มี optical density เข้าด้วยกันจะเป็น pool ของ pure LT นำไป concentrate โดยปั่นใน Centriprep-30 แล้ววัดค่า protein content (Bradford, 1976) รูปที่ 2.2 แสดง SDS-PAGE separated pure LT ที่ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue จะเห็นว่าประกอบด้วย A และ B subunits ณ ตำแหน่ง 32.2 kDa (A subunits) และ 11.8 kDa (B subunits) แบ่งเก็บ pure LT เป็น aliquots เล็ก ๆ ไว้ที่ -20°C ซึ่งต่อมาใช้เป็น heterologous toxin เพื่อตรวจสอบ specificities ของ monoclonal antibodies ต่อ O157 LPS, Stx-1 และ Stx-2

3.3. Purification of Stx-1 และ Stx-2

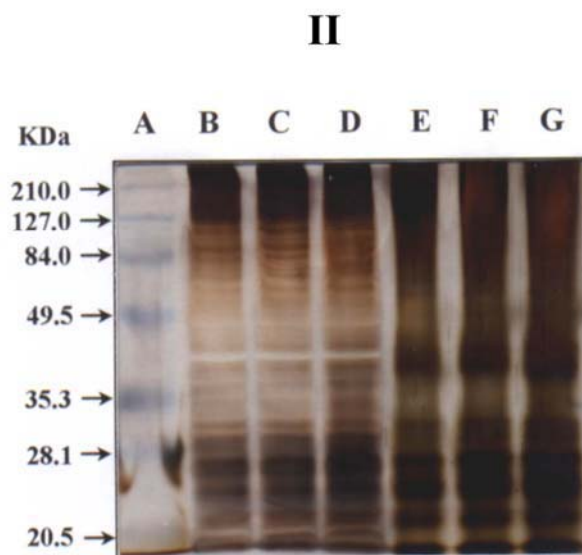
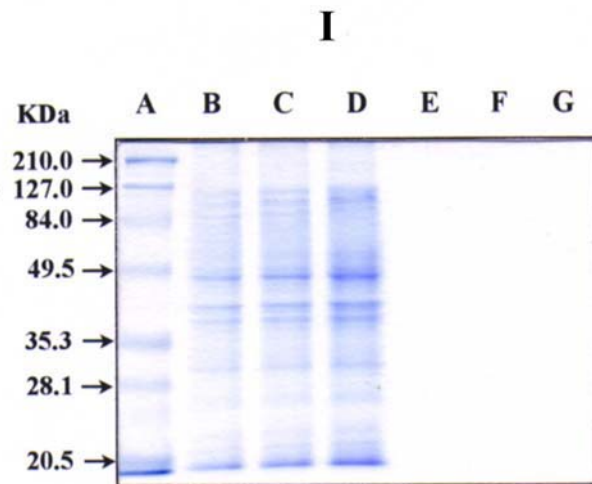
Source ของ Stx-1 คือ recombinant *E. coli* M1061 ซึ่ง carry 2.1 kb *Bam*H1-*Bgl*II fragment ของ *stx-1* ที่ ligate อยู่กับ vector pUC118 โดยได้รับมาจาก Professor Hisao Kurazono (Kurazono *et al.*, 1987), Professor and Head, Department of Medical Technology, Institute of Health Sciences, University of Okayama, Japan ส่วน source ของ Stx-2 คือ recombinant *E. coli* M1061 ซึ่ง carry 4.6 kb *Eco*RI fragment ของ *stx-2* ซึ่ง ligate อยู่กับ pCH253 vector (Yutsudo *et al.*, 1987a) การ purify Stx-1 ใช้วิธีของ Kurazono *et al.* (1987) และการ purify Stx-2 ใช้วิธีของ Yutsudo *et al.* (1987b) โดยดัดแปลงเล็กน้อย รายละเอียดของการเตรียมมีดังนี้:-

นำแบคทีเรียที่ carry *stx-1* ไป grow ใน Luria-Bertani (LB) broth ซึ่งผสม Ampicillin อยู่ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ โดย incubate 37°C shaking incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียซึ่ง carry *stx-2* gene นำไป grow ใน Mueller-Hinton broth ซึ่งมี Trimethoprim ผสมอยู่ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำ cultures ไปปั่นเพื่อ pack bacterial cells ที่ $5,000 \times g$, 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ pellet ไป resuspend ใน phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 ที่ผสม Polymyxin B ไว้ 6,000 units/ml นำ bacterial cells ไปทำให้แตกโดย sonication ที่ 20 kHz 2 นาที 5 ครั้ง หลังจากนั้นเอา cell debris ออกแล้ว นำ supernatant ไป precipitate ด้วย 80% ammonium sulphate (516 g/l) ตะกอน precipitate ที่ได้นำไปละลายใน 50 mM Tris-HCl, pH 8.6 แล้ว dialyse ใน buffer เดียวกันนี้ที่ 4°C ค้างคืน preparation นี้เรียกว่า crude toxin ซึ่งจะนำไป purify ต่อด้วย DEAE-fast flow chromatography (column size 2.0×45.0 cm) ซึ่ง equilibrate ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.6 ไว้แล้ว หลังจาก apply crude toxin แล้วล้าง column ด้วย buffer เดิมแล้ว elute protein ออกมาโดยใช้ 0-0.5 M NaCl ใน Tris-HCl buffer, pH 8.6 เก็บ fraction ละ 10 ml แล้วตรวจ OD ของทุก fraction ที่ 280 nm จากนั้นตรวจว่า fraction ใดมี toxin โดยนำไปทดสอบด้วยวิธี double diffusion โดยการดูปฏิกิริยาของ precipitation ของ fraction กับ rabbit polyclonal antibodies ต่อ Stx-1 หรือ Stx-2 (Yutsudo *et al.*, 1987b) พบว่า fractions ที่มี toxin (ให้ precipitin bands ต่อ anti-toxin) ถูก elute ออกมาในช่วงระหว่าง 0.12 - 0.24 M (NaCl) (รูปที่ 2.3) นำ fractions ที่มี toxin มา pool รวมกัน นำแต่ละ pool ไป concentrate ด้วย Amicon PM10 membrane ultrafiltration และ Centriprep-30

ตารางที่ 2.1 List of heterologous antigens used for testing cross-reactivity of MAbs to EHEC O157 LPS, Stx-1 and Stx-2

No.	Strain/ Antigen	No.	Strain/ Antigen
1	<i>Shigella flexneri</i> 1a	46	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
2	<i>S. flexneri</i> 1b	47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	<i>S. flexneri</i> 2a	48	<i>Aeromonas hydrophila</i>
4	<i>S. flexneri</i> 2b	49	<i>Escherichia coli</i> (K12)
5	<i>S. flexneri</i> 3a	50	<i>E. coli</i> O86
6	<i>S. flexneri</i> 3b	51	<i>E. coli</i> O125
7	<i>S. flexneri</i> 4a	52	<i>E. coli</i> O126
8	<i>S. flexneri</i> 4b	53	<i>E. coli</i> 49/32
9	<i>S. flexneri</i> 6	54	EIEC 54/32
10	<i>S. flexneri</i> x	55	EHEC (VT1)
11	<i>S. flexneri</i> y	56	EHEC (VT2)
12	<i>S. dysenteriae</i> 1	57	EHEC (VT2vh)
13	<i>S. dysenteriae</i> 2	58	EHEC (VT2vp)
14	LPS of <i>S. dysenteriae</i> 1	59	EHEC (MC1061)
15	<i>S. boydii</i> 1	60	EHEC (VT2, K243)
16	<i>S. boydii</i> 2	61	EHEC (SLT I, CG-94-2017-1)
17	<i>S. boydii</i> 4	62	EHEC (SLT I, SPH-1624-1)
18	<i>S. boydii</i> 12	63	EHEC (SLT I, II, CP-32-1)
19	<i>S. sonnei</i> phase I	64	EHEC O111ac:H40 (V-474-2)
20	<i>S. sonnei</i> phase II	65	EHEC O111ac:H40 (V-826-2)
21	LPS of <i>S. sonnei</i> phase I	66	ETEC (SPH-2389-1)
22	<i>Salmonella</i> Paratyphi A	67	ETEC (SPH-2436-1)
23	<i>S. Paratyphi</i> C	68	ETEC (CJ-612-6)
24	<i>Salmonella</i> group C	69	<i>E. coli</i> (LT, ST, CJ-1270-1)
25	<i>Salmonella</i> group E	70	<i>E. coli</i> (ST, CAM-10-1)
26	<i>S. Typhi</i>	71	<i>E. coli</i> (LT, CJ-1417-1)
27	<i>S. Typhimurium</i>	72	<i>E. coli</i> (LT, CP-10-1)
28	<i>S. Panama</i>	73	EAggEC (W 177-1-1)
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	74	EPEC (W 393-1-1)
30	<i>Enterobacter aerogenes</i>	75	EPEC (W 225-1-2)
31	<i>E. cloacae</i>	76	EPEC (467-1-1)
32	<i>Citrobacter diversus</i>	77	EPEC (215-1-1)
33	<i>C. freundii</i>	78	EPEC (412-1-1)
34	<i>Serratia marcescens</i>	79	DAEC (WC 407-1-4)
35	<i>Proteus rettgerii</i>	80	DMS 1 (<i>S. sonnei</i> phase I)
36	<i>P. vulgaris</i>	81	DMS 2 (<i>S. flexneri</i> 2a)
37	<i>Morganella morganii</i>	82	DMS 3 (untyped)
38	<i>Vibrio fluvialis</i>	83	DMS 4 (<i>S. sonnei</i> phase I)
39	<i>V. alginolyticus</i>	84	DMS 5 (<i>S. flexneri</i> 6)
40	<i>V. cholerae</i> Inaba	85	DMS 6 (<i>S. flexneri</i> 6)
41	<i>V. cholerae</i> Ogawa	86	DMS 8 (untyped)
42	<i>V. cholerae</i> non-O1	87	DMS 10 (<i>S. flexneri</i> 2a)
43	<i>V. cholerae</i> 215/35	88	DMS 11 (<i>S. boydii</i> 5)
44	<i>V. cholerae</i> 287/35	89	Cholera toxin (CT)
45	<i>V. cholerae</i> 536/35	90	Heat-labile enterotoxin (LT)

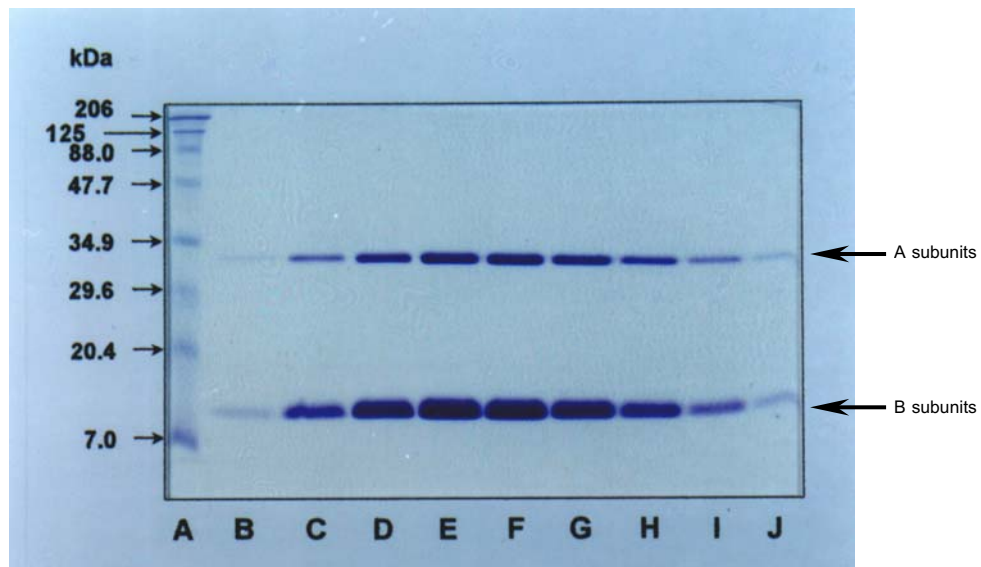
CT, cholera toxin; DAEC, diffusely adherent *E. coli*; DMS, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand; EAggEC, enteroaggregative *E. coli*; EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*; EIEC, enteroinvasive *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; LT, heat-labile enterotoxin of ETEC; ST, heat-stable enterotoxin of ETEC; SLT, Shiga-like toxin or VT,



รูปที่ 2.1 แสดง patterns ของ SDS-PAGE-separated homogenate (lanes B, C และ D) และ LPS (lanes E, F และ G) ของ *E. coli* O157

Block I ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue

Block II ย้อมด้วย Silver stain



รูปที่ 2.2 แสดง SDS-PAGE-separated pure LT ของ enterotoxigenic *E. coli* ที่ elute ออกมาจาก immobilized galactose-resin column

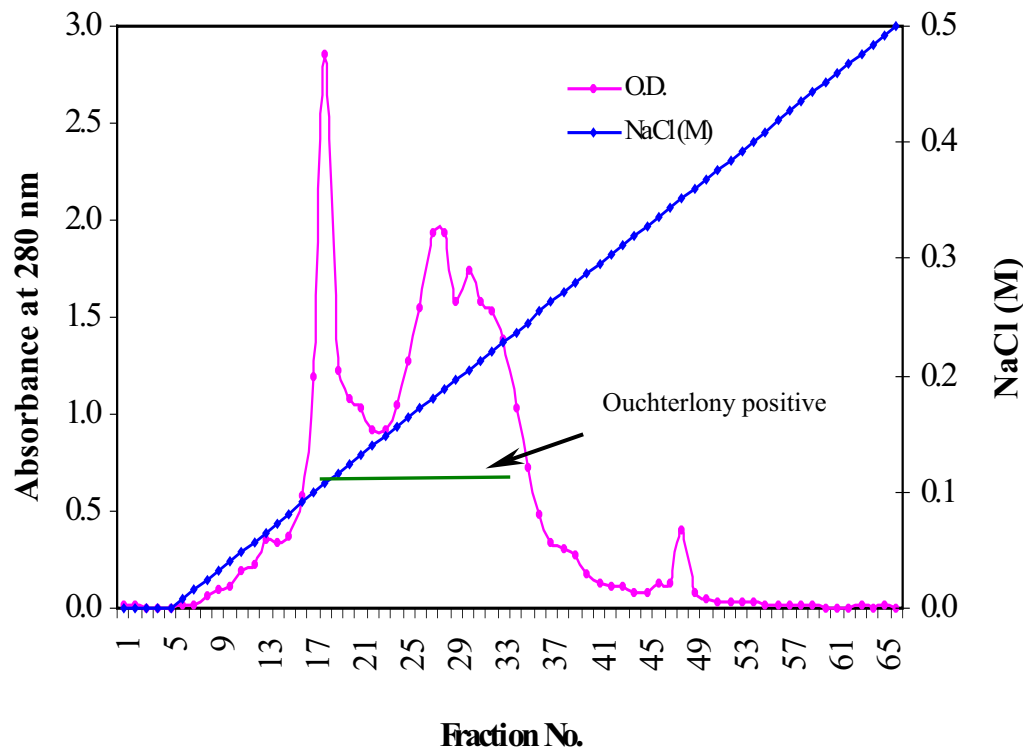
Lanes B-J: SDS-PAGE-separated patterns of fractions eluted from the galactose-resin column

A subunits at 32.2 kDa

B subunits at 11.8 kDa

Lane A, broad range molecular weight markers

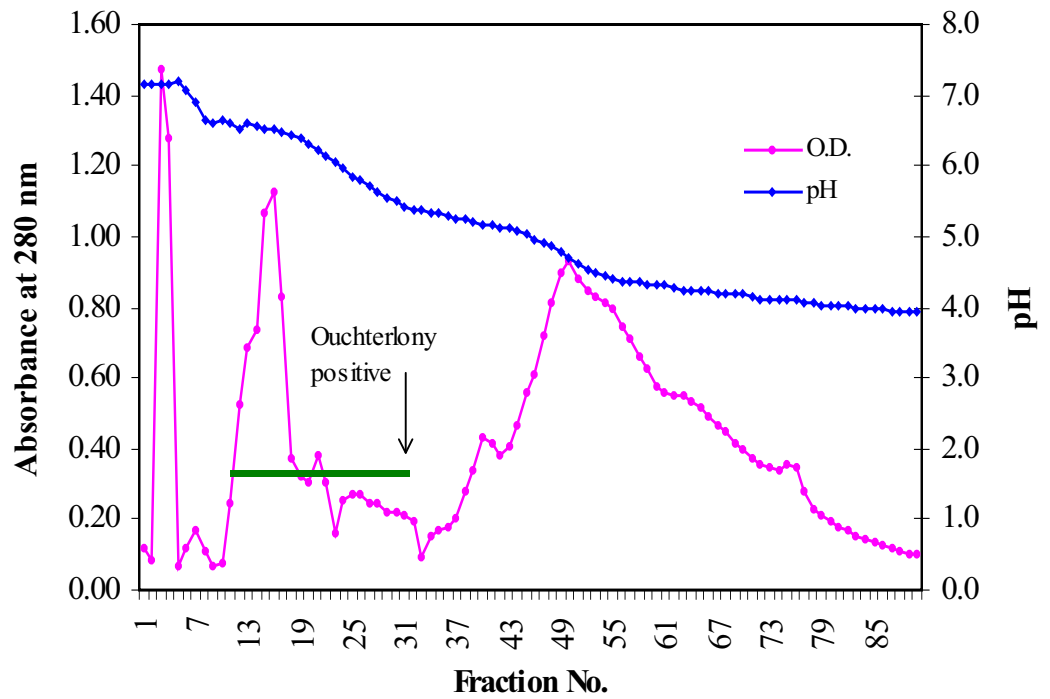
Numbers at the left are molecular weights in kDa



รูปที่ 2.3 Chromatogram ของ Stx-1 ที่ elute ออกมาจาก DEAE fast flow column

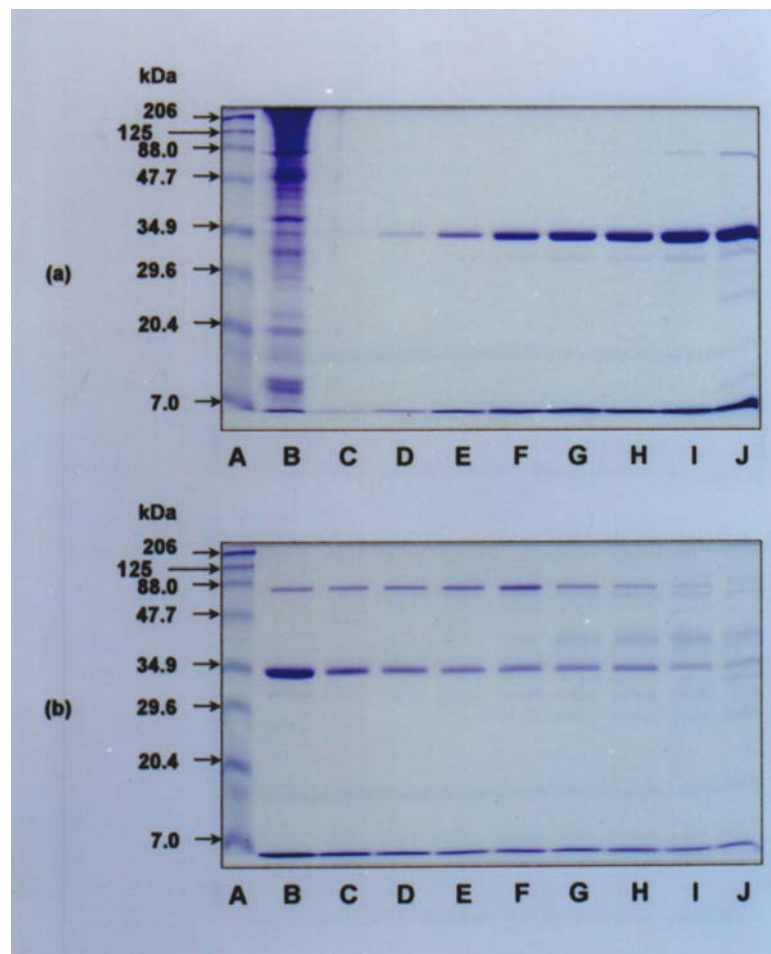
Bar สีเขียว (ลูกศรชี้) แสดง fractions ที่มี Stx-1 จากการตรวจสอบด้วย double diffusion test ต่อ rabbit anti-Stx-1 จะเห็นว่า Stx-1 ถูก elute ออกมาในช่วง 0.12-0.24 M NaCl

(Amicon, Beverly, MA, USA) เมื่อ concentrate แล้ว preparation ที่ได้ (3 ml) เรียกว่า Stx-IEC นำไป dialyse ใน 25 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.4 และนำไป apply ใน polybuffer exchanger PBE 94 column (1.0 × 45.0 cm) (บริษัท Pharmacia Fine Chemical, Sweden) ซึ่ง equilibrate ไว้ด้วย imidazole buffer แล้ว elute protein ออกมาด้วย gradient pH 7.0 ถึง 4.0 โดยใช้ polybuffer 74, pH 4.0 (Pharmacia Fine Chemical, Sweden) นำแต่ละ fraction (fraction ของ Stx-CF) ไปตรวจหา toxin โดยวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่าพบ Stx positive fractions ถูก elute ออกมาในช่วง pH 5.5 ถึง 6.6 (รูปที่ 2.4) นำ toxin positive fractions ไปตรวจสอบโดยการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant blue เพื่อ identify toxin bands (A subunits ของ Stx-1 และ Stx-2 จะอยู่ตรงตำแหน่ง 33.5 และ 33.7 kDa ตามลำดับ ส่วน B subunits ของ Stx-1 และ Stx-2 จะอยู่ตรงตำแหน่ง 6.6 และ 6.5 kDa ตามลำดับ) (Takeda *et al.*, 1993) พบว่าบาง fractions มีมากกว่า 2 bands (รูปที่ 2.5) ดู fractions ที่มี toxin โดยการตรวจด้วย double diffusion และในการแยกด้วย SDS-PAGE และการย้อมสีปรากฏ bands ตรงตำแหน่ง A subunits และ B subunits ถูกต้องและให้ SDS-PAGE pattern แบบเดียวกัน มารวมเข้าด้วยกัน แล้ว dialyse ใน buffer ที่เหมาะสมโดยใช้ 50 mM PBS, pH 6.0 ที่มี 0.2 M NaCl สำหรับ Stx-1 และใช้ 50 mM PBS, pH 8.0 สำหรับ Stx-2 หลังจาก dialyse แล้วนำไป concentrate โดยใช้ Centriprep-30 เมื่อนำแต่ละ pool ไปแยกด้วย SDS-PAGE แล้วย้อมสีอีกครั้งหนึ่ง (รูปที่ 2.6 แสดง SDS-PAGE patterns ของ Stx-CF pools) จะเห็นได้ว่า pools ของ fractions 10 และ 11 (lane B) และ pool ของ fractions 12-14 (lane C) ให้ bands 2 bands ตรงกับตำแหน่ง Stx-1A และ Stx-1B ดังนั้น 2 pools นี้จึงเป็น pure Stx-1 ส่วน pools อื่น (pools ของ fractions 15 และ 17, fraction 16, pools ของ fractions 18-19, 20-21 และ 22-24 [lanes D, E, F, G และ H]) มี bands มากกว่า 2 bands (partially purified Stx-1) นำ pools ของ fractions 15 และ 17, fraction 16, pools ของ fractions 18 และ 19, 20 และ 21, และ 22-24 ไป concentrate และหาปริมาณโปรตีนเรียก preparation ส่วนนี้ว่า “Stx-CF” ซึ่งต้องนำไป purify ต่อด้วยวิธี gel filtration โดยใช้ fast protein liquid chromatography (FPLC) (Pharmacia Fine Chemical, Sweden) ทั้งนี้โดยใช้ Superose-6HR 10/30 prepacked column เป็นขั้นตอนสุดท้าย รูปที่ 2.7 แสดง chromatogram ของ Stx-1-CF pools ต่าง ๆ จาก chromatofocusing column จะเห็นว่า Stx-CF pool ใดที่เป็น partially purified toxin ก็จะทำให้ chromatogram มากกว่า 1 peak ส่วน Stx-CF pool ที่มี pure toxin อยู่แล้ว เช่น pool 12-14 ก็จะมี peak เดียวใน chromatogram ในการ purify Stx ในขั้นตอนสุดท้ายด้วย Superose-6HR FPLC นั้น นำ Stx-CF ที่มี protein range 3-5 mg ปริมาตร 150 µl และกรองแล้วมา inject ผ่าน sample loop ของ column หลังจากนั้น elute ด้วย equilibrate buffer (50 mM PBS, pH 6.0 containing 0.2 M NaCl สำหรับ Stx-1; Tris-HCl, pH 8.0 สำหรับ Stx-2) โดยใช้ flow rate 0.4 มล/นาที/หลอด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยปล่อยให้ eluent ที่ผ่านออกมาจาก column ให้ detect OD ได้ด้วย UV-1, 280 nm 0.2 AUFS แล้วเก็บด้วย fraction collector (Frac 100, Pharmacia Fine Chemical, Sweden) วัด OD ของแต่ละ



รูปที่ 2.4 Chromatogram ของ Stx-1 ที่ elute ออกมาจาก chromatofocusing column (fraction volume 5 ml)

เส้นทึบ (ลูกศรชี้) แสดง fractions ที่มี toxin จากการตรวจด้วย gel double diffusion test ต่อ rabbit anti-Stx-1 ซึ่งถูก elute ออกมาในช่วง pH 5.5 ถึง 6.6



รูปที่ 2.5 SDS-PAGE patterns ของ fractions ที่มี Stx-1 ที่ elute ออกมาจาก chromatofocusing column

Lanes A of (a) and (b) are molecular weight markers

(a) Lane B, SDS-PAGE-separated crude Stx-1

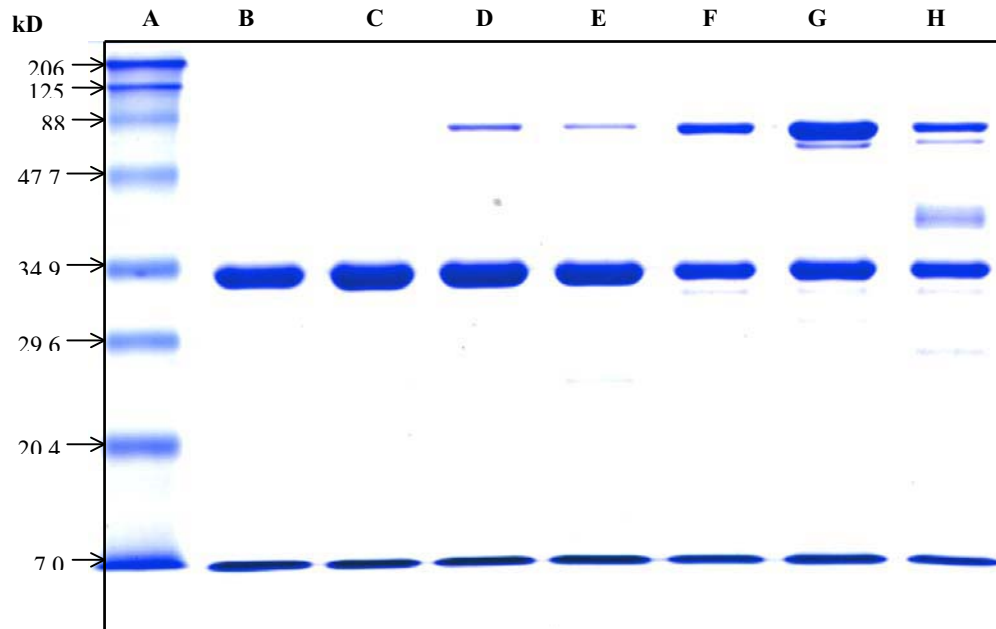
Lanes C-J, patterns ของ fractions 8-15

(b) Lanes B-J, patterns ของ fractions 16-24

A subunits at 33.7 kDa

B subunits at 6.6 kDa

Numbers at the left are molecular weights in kDa



รูปที่ 2.6 แสดง SDS-PAGE patterns ของ concentrated pools ต่าง ๆ จากรูปที่ 2.4 และ 2.5 คือ

Lane B, pool ของ fractions 10 และ 11 (pure Stx-1)

Lane C, pool ของ fractions 10 – 14 (pure Stx-1)

Lane D, pool ของ fractions 15 และ 17 (partially purified Stx-1)

Lane E, fraction 16 (partially purified Stx-1)

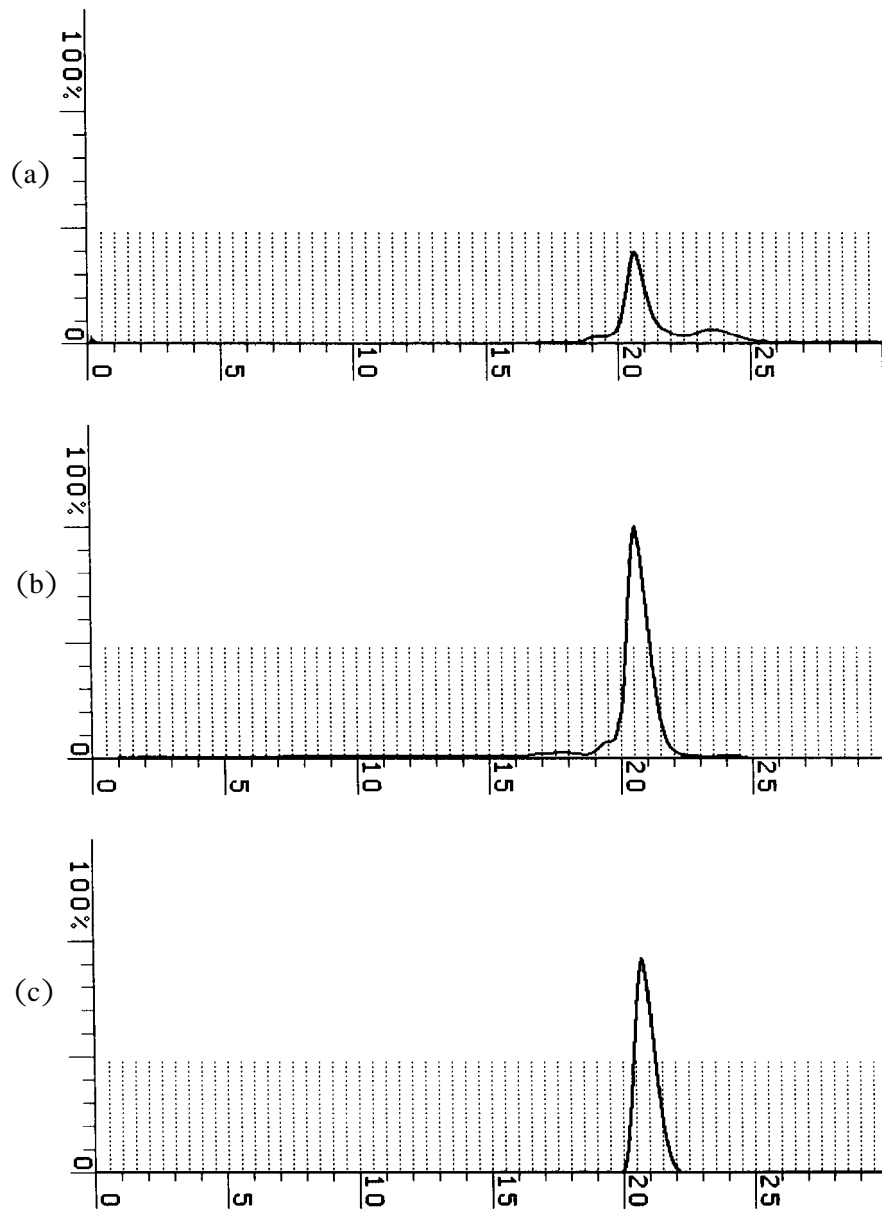
Lane F, pool ของ fractions 18-19 (partially purified Stx-1)

Lane G, pool ของ fractions 20-21 (partially purified Stx-1)

Lane H, pool ของ fractions 22-24 (partially purified Stx-1)

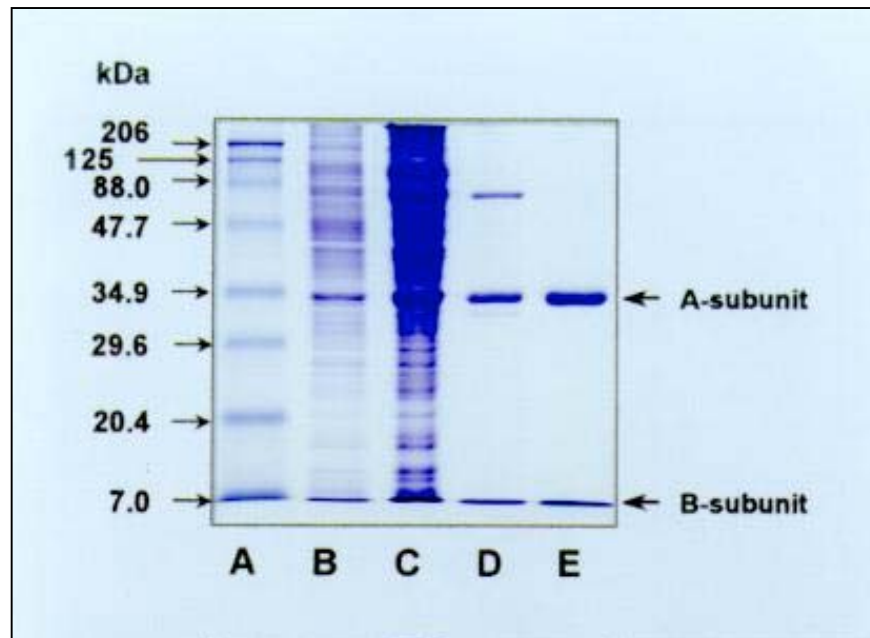
Lane A, molecular weight standard markers

Numbers at the left are molecular weights in kDa



รูปที่ 2.7 แสดง FPLC chromatograms ของ Stx-1-CF fractions ต่าง ๆ

- (a) pool ของ fractions 22-24 (lane H รูปที่ 2.6) ซึ่งเป็น partially purified Stx-1 มีหลาย peaks ใน chromatogram
- (b) fraction 16 (lane E รูปที่ 2.6) = partially purified Stx-1 มีหลาย peaks ใน chromatogram
- (c) pool ของ fractions 12-14 (lane C รูปที่ 2.6 = pure Stx-1) มี peak เดียวใน chromatogram



รูปที่ 2.8 แสดง SDS-PAGE (non-reducing condition) patterns ของ Stx-1 preparations ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการ purify

Lane A, molecular weight standard markers

Lane B, crude Stx-1 หลังจาก ammonium sulphate precipitation

Lane C, Stx-1 preparation จาก DEAE-Sepharose column

Lane D, partially purified Stx-1 จาก chromatofocusing column

Lane E, pure Stx-1 จาก chromatofocusing column ซึ่งเหมือนกับ pure Stx-1 จาก FPLC column

fraction แล้วพิมพ์ chromatogram ออกมา หลังจากนั้นนำแต่ละ fraction ที่ show appropriate peak ใน chromatogram ไปทดสอบกับ rabbit polyclonal antibodies ต่อ Stx แต่ละชนิด และเพื่อเป็นการยืนยันว่า preparation สุดท้ายนี้เป็น pure Stx จึงได้นำแต่ละ preparation ไป run ใน SDS-PAGE ใน non-reducing condition แล้วย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant blue รูปที่ 2.8 แสดงให้เห็นถึง SDS-PAGE-separated patterns ของ Stx-1 ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการ purify

3.4 การเตรียม Stx-2 toxoid

เนื่องจาก Stx-2 มีความเป็นพิษต่อหนู mice มาก ถ้าจะใช้ immunize หนู mice โดยตรงจะทำให้หนู mice ตายเพราะ toxic/lethal dose มีปริมาณต่ำมากเมื่อเทียบกับ immunogenic dose ดังนั้น ในการ immunize หนู BALB/c เพื่อเตรียม immune splenocytes สำหรับการผลิต hybridomas จึงมีความจำเป็นต้อง detoxify Stx-2 เพื่อให้เป็น toxoid เพื่อลดความเป็นพิษแต่ยังคงความเป็น immunigen เสียก่อน การเตรียม immunogenic Stx-2 toxoid ทำได้โดยการนำ Stx-2-IEC มาเจือจางเป็น 0.5 mg/ml ใน 10 mM PBS, pH 7.4 และ dialyse against 0.4% formalin ใน PBS ที่ 37°C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น dialyse กำจัดเอา trace ของ formalin ออกให้หมดโดย dialyse ใน PBS ที่ 4°C ค้างคืนโดยเปลี่ยน buffer หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นตรวจว่า Stx-2 toxoid ยังมี toxicity ต่อ Vero cells อยู่หรือไม่ โดยเติม toxoid ลงใน Vero cell culture และจะใช้ toxoid ในการ immunize BALB/c ต่อเมื่อ preparation นั้นไม่เป็นพิษต่อ Vero cells

4. การ immunize หนู BALB/c เพื่อให้ได้ immune splenocytes

ได้ immunize หนู BALB/c เพศเมีย อายุ 5-7 สัปดาห์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS), US Component กรุงเทพฯ 3 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว โดยก่อน immunize ได้เจาะเลือดหนูแต่ละตัวเพื่อเก็บไว้เป็น normal control serum (NS) หนูกลุ่มแรก immunize ด้วย O157 Ly ส่วนกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 immunize ด้วย holo Stx-1-IEC และ Stx-2 toxoid ตามลำดับ แอนติเจนใน dose แรก ผสมกับ complete Freund's adjuvant ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal; I/P) หลังจากนั้นฉีด booster doses อีก 2 ครั้ง ทุกๆ สองสัปดาห์แต่ผสม immunogens เดิมใน incomplete Freund's adjuvant ปริมาณ immunogens ใน dose แรกคือ O157 Ly 50 µg, Stx-1-IEC และ Stx-2 toxoid ปริมาณ 2 µg ส่วนใน booster doses เพิ่ม O157 Ly เป็น 70 และ 100 µg ตามลำดับ ส่วน Stx-1-IEC และ Stx-2 toxoid เพิ่มเป็นอย่างละ 5 µg หลังจากฉีด dose ที่ 3 แล้วสองสัปดาห์ เจาะเลือดหนูทุกตัวเพื่อนำมาตรวจ indirect ELISA titers ต่อ homologous antigens และตรวจ antibody patterns ต่อ SDS-PAGE-separated homologous antigens ด้วย Western blotting (WB) เมื่อพบว่าซีรัมของ immunized mice มี ELISA titers สูงและให้ WB

patterns ต่อ homologous antigens เหมาะสม จึงนำ spleens ของหนูตัวที่มี titers สูงสุดไปใช้เป็น immune splenocytes สำหรับเตรียม hybridomas ต่อไป

5. Cell hybridization (fusion) เพื่อเตรียม hybridomas และ monoclonal antibodies (MAb)

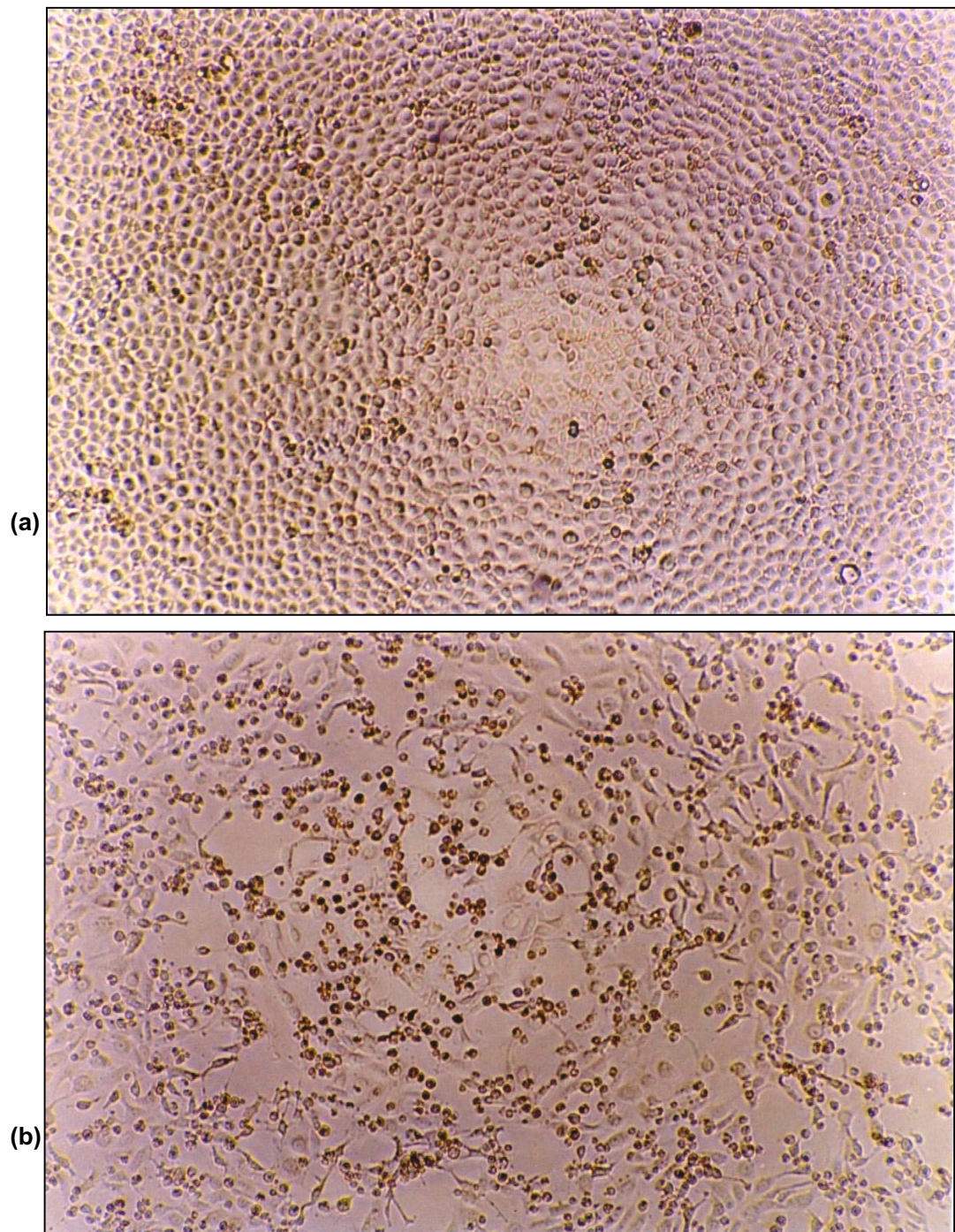
Immunized mice ในแต่ละกลุ่มซึ่งมี serum indirect ELISA titer สูงสุด และให้ WB patterns ต่อ homologous antigens เหมาะสม (คือ ซีรัมหนูที่ immunized ด้วย O157 Ly มี reactive bands ต่อโปรตีนต่าง ๆ เห็นเป็น bands เดียวที่ molecular weights ต่าง ๆ กัน และมี antibodies ต่อ O157 LPS ซึ่งเห็นเป็น ladder หรือ diffused bands ส่วนหนูที่ immunized ด้วย Stx-1-IEC และ Stx-2 toxoid มี antibody reactive bands ตรงตำแหน่ง A และ B subunits ของ Stx-1 และ Stx-2) จะถูกเลือกมาเป็น immune splenocyte donors เพื่อ fuse กับ myeloma cells สำหรับผลิต hybridomas

ก่อนการทำ cell fusion 4 วันได้นัดกระตุ้นหนูที่เลือกให้เป็น splenocyte donors ด้วย immunogens เดิมเข้าเส้นเลือดโดยละลาย immunogens ปริมาณครึ่งหนึ่งของ last booster dose ใน NSS ปริมาตร 0.2 ml หลังจาก intravenous booster 4 วันและเป็นวันที่ทำ cells fusion เจาะเลือดหนูแต่ละตัวแยกซีรัมไว้เป็น positive (immune) serum (PS หรือ IS) ฆ่าหนูด้วยวิธี cervical dislocation แล้ว disinfect ภายนอกตัวหนูโดยจุ่มลงใน 70% ethyl alcohol ทั้งตัว หลังจากนั้นตัดม้ามออกมาล้างและบดเอา spleen cells ใส่ลงใน RPMI-1640 medium โดยใช้ sterile technique ทุกขั้นตอน บั่นล้างเซลล์ใน RPMI medium แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ใน hemacytometer และใช้ trypan blue exclusion method พบว่า เซลล์มีชีวิตอยู่มากกว่า 98% ของ nucleated cells ทั้งหมด จึงนำไป fuse กับ P3x-63-Ag8.653 myeloma cells ซึ่ง harvest มาจาก culture flasks ในขณะที่เซลล์กำลังอยู่ในระยะ late exponential phase (cells มี viability มากกว่า 98% เช่นกัน) ในอัตราส่วน myeloma cells:spleen cells = 1:10 โดยใช้ polyethylene glycol (PEG) 4,000 เป็น fusogen หลังจากนั้น cells ให้เป็น common pellet แล้ว resuspend cells ใน RPMI-1640 medium แล้วล้าง 2-3 ครั้ง ท้ายสุดนำ cell pellet ไป resuspend ใน selective medium คือ HAT medium ผสม 15% bovine serum โดยปรับให้มี 10^6 cells/ml จากนั้นแบ่ง 200 μ l aliquots ลงใน 96-wells tissue culture plates แล้ว incubate plates ไว้ที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator ตรวจดู cultures ภายใต้ inverted microscope ทุกวัน เมื่อปรากฏเป็นกลุ่มเซลล์ hybrids ที่ refractile กว่า background ซึ่งประกอบด้วย cell debris จึงเปลี่ยน medium ใหม่ในระยะเวลาที่เหมาะสม หลังจาก hybrids แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากแล้ว นำ undiluted culture supernatants ไปตรวจหาแอนติบอดีต่อ homologous antigens โดยวิธี indirect ELISA เมื่อพบว่า เซลล์จาก culture wells หลุมใดให้ผลบวกโดยมี indirect ELISA optical density สูงกว่า 0.1 นำเซลล์จากหลุมนั้นไป clone โดยวิธี limiting dilution โดยมี normal splenocytes เป็น feeder cells เพื่อให้ได้โคลนเดี่ยว (monoclones = hybridomas)

6. Vero cytotoxic assay

ในการทำ Vero cytotoxic assay ได้ใช้ African Green Monkey kidney (Vero) cells และวิธีของ Gentry และ Dalrymple (1980) โดยได้รับ Vero cells มาจากแพทย์หญิงคุณหญิง อนันต์ นิศาลักษณ์ ภาควิชาไวรัสวิทยา AFIRMS กรุงเทพฯ ได้นำ Vero cells มาเลี้ยงใน MEM tissue culture medium เพื่อ maintain ไว้ขณะทำ experiments ในขณะที่อีกส่วนหนึ่ง cryopreserved ไว้ใน liquid N₂ Tank

เมื่อจะทำการทดสอบดูว่า preparation หรือ sample ใดมี Shiga toxin ได้นำ cells มา plate ลงใน tissue culture wells หลุมละ 100 µl (10⁵ cells) แล้ว incubate plate ที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator ซ้ำมติน นำ sterile toxin preparation หรือตัวอย่างที่จะตรวจหา Shiga toxin (undiluted preparation หรือ individual dilutions) มาเติมลงใน well ที่มี Vero cells หลุมละ 100 µl โดยใน plate เดียวกันมี positive control (Stx-1 หรือ Stx-2 แล้วแต่กรณี) และ negative control ที่เหมาะสม (เช่น spent culture medium of P3x-63-Ag8.653, sample diluent เป็นต้น) อยู่ด้วย หลังจาก incubate ที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator 48 ชั่วโมง แล้วนำ plate มาตรวจดู cytopathic effect (CPE) โดยใช้ inverted microscope (โปรดดูรูป 2.11) นอกจากนี้ยังสามารถเก็บ plate ไว้ได้นาน โดยล้างเอา detached cells และ medium ในหลุมออกให้หมดด้วย phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) แล้วย้อมเซลล์ที่ยังติดอยู่กับกัน wells ใน plate ด้วย 0.13% crystal violet ใน 5% ethanol-2% formalin-PBS เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงล้าง excess stain ออกด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำประปาก็ได้ ปลอ่ยให้ plate แห้ง แล้วจึงนำมาตรวจดู cytotoxicity ซึ่งบริเวณที่ไม่มีสีคือบริเวณที่เกิด cytotoxicity และเซลล์ตายจึงหลุดออกจากการเกาะที่ plate ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับ negative control ซึ่งสี crystal violet จะติดที่กัน well อย่างสม่ำเสมอ (ไม่มี toxicity) ส่วน positive control (มี toxin) จะต้องมีการ unstained area มากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณ toxin ถ้ามีมากและเซลล์ตายหมดก็จะเห็นว่าที่กัน wells ที่มี positive control แทบไม่มีสีติดอยู่เลย



រូបភាព 2.9

The cytopathic effect (CPE) of Vero cells caused by Shiga toxin

- (a) Monolayer of Vero cells in normal culture condition
- (b) CPE of Vero cells in the presence of Shiga toxin (Vero cytotoxicity)

7. Serological methods ต่าง ๆที่ใช้ตรวจหาความเฉพาะของ monoclonal antibodies, cross-reactivity checking และ antigenic specificities

7.1 Indirect ELISA

Indirect ELISA นี้นอกจากจะใช้เป็นวิธีตรวจหาระดับ antibody titer ในซีรัมของ immunized mice, screen หา positive hybrids (นำ spent culture medium มาตรวจ) และ ตรวจระดับ antibody titer ใน spent culture medium ของ selected hybridomas แล้ว ยังใช้สำหรับตรวจ cross-reactivities ของ MAbs ต่างๆต่อ heterologous antigens (analytical specificity) ด้วย ขั้นตอนการทำ indirect ELISA สำหรับงานวิจัยในส่วนนี้เหมือนกับ indirect ELISA โครงการย่อยที่ 1 ทุกประการยกเว้นแอนติเจนที่ใช้ coat plates ซึ่งแตกต่างออกไปตามความเหมาะสมของจุดประสงค์แต่ละครั้งในการทำการทดสอบ

7.2 Dot-ELISA

ได้ใช้ Dot-ELISA สำหรับตรวจ analytical specificity ของ MAb ต่างๆต่อ homologous และ heterologous antigens นอกจากนี้ยังใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนเป้าหมายในตัวอย่างส่งตรวจ (specimens) จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงในภายหลัง อย่างไรก็ตามวิธี dot-ELISA ต่างจาก dot-blot-ELISA ที่ใช้ตรวจหา *Leptospira* antigen ในปัสสาวะ ที่แสดงไว้ในโครงการย่อยที่ 1 เล็กน้อย กล่าวคือแทนที่จะใช้ slot-blot device หยดตัวอย่างลงบน nitrocellulose ในโครงการย่อยที่ 2 นี้ใช้ automatic pipette และ tips หยดตัวอย่าง 1-3 µl แบบ manual แทน หลังจากตัวอย่างบน nitrocellulose แห้งดีแล้ว ขั้นตอนต่อไปของ dot-ELISA ทำเช่นเดียวกับในโครงการย่อยที่ 1 และใช้ reagents เดียวกันทุกประการ

7.3 SDS-PAGE และ Western blot analysis

ในการแยก antigen ด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ในโครงการย่อยที่ 2 นี้ ใช้ 4% stacking gel และ 12% separating gel สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับ MAb ต่อ LPS ของ *E. coli* O157 และใช้ 16% separating gel สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับ Shiga toxins

Western blot analysis ทำโดยการ transblot SDS-PAGE-separated antigens ลงบน NC จากนั้น blocked unoccupied sites บน NC ด้วย 3% BSA, 0.5% gelatin ใน PBS แล้วล้าง NC ก่อนนำไป react กับ antibody preparation หลังจากนั้น revealed antigen-antibody reactive bands โดยการทำปฏิกิริยากับ second antibody-enzyme conjugate และ substrate

8. Specimens จากมนุษย์ (human specimens)

ได้เก็บตัวอย่างอุจจาระ 3 ชุด ด้วยกันคือ

ตัวอย่างชุดที่ 1 เป็น rectal swabs จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงจำนวน 499 ราย ที่ไปรับการรักษาที่โรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย ในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง สิงหาคม ได้เก็บ rectal swabs ใส่ Cary-Blair transport medium ส่งไปเพาะเชื้อที่ Clinical Microbiology Laboratory Unit ของโรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี หลังจากนั้นจึงนำ swab นั้นไป enrich ด้วย buffered peptone water (BPW) 4 มล. ข้ามคืน แล้วแบ่งเป็น 2 aliquots แยก aliquots แรกไปต้มเพื่อใช้ทำ MAb-based dot-ELISA เพื่อตรวจหา O157 LPS, Shiga-toxins 1 และ 2 ต่อไป สำหรับ aliquots ที่สองนำไปเก็บที่ -20°C เพื่อใช้ทำ PCR, Western blot analysis และ/หรือ Vero cytotoxic assay ในกรณีที่ MAb-based dot-ELISA ให้ผลไม่ตรงกับผลการเพาะเชื้อ

ตัวอย่างชุดที่ 2 เป็น rectal swabs จากผู้ป่วยอุจจาระร่วง 42 ราย ชาวเวียดนาม ที่ไปรับการรักษาที่โรงพยาบาลชื่อ “108” Hospital ที่ฮานอย ได้เก็บ rectal swabs จากผู้ป่วยแต่ละคนใส่ใน buffered glycerol saline (BGS) ซึ่งเป็นเพียง preservation medium (ไม่ใช่ enrichment medium) ปริมาตร 4 มล. แล้วส่งไปเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล “108” จากนั้นนำ BGS หลอดเดียวกันไปต้ม 20 นาที แล้วส่งไปตรวจหา O157 LPS, Shiga toxin 1 และ 2 ที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

ตัวอย่างชุดที่ 3 เป็น stool samples ของผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น 5 คน ที่มีอาการอุจจาระร่วงแบบ hemorrhagic colitis ซึ่ง stool samples เหล่านี้เก็บไว้ใน freezer ที่ Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo, Japan ซึ่ง samples เหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากแพทย์หญิง อะมิกิ คาอิ การเพาะแยกเชื้อและการตรวจหา Shiga toxins โดย PCR ได้ทำที่ประเทศญี่ปุ่นแต่เก็บผลการตรวจสอบไว้ก่อน ส่วนการตรวจหาแอนติเจนใน stool aliquots ทำโดยนักวิทยาศาสตร์ ที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

ผลการตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อและการตรวจหาแอนติเจนโดย MAb-based dot-ELISA นำมาเปิดพร้อมกันและตัวอย่างใดให้ผลไม่ตรงกัน ต้องนำตัวอย่างไปตรวจหาแอนติเจน คือ ตรวจหา O157 LPS โดย SDS-PAGE และ Western blot analysis และตรวจหา Shiga toxins โดย Vero cytotoxic assay

ผลการวิจัย (Results)

1 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา และโมโนโคลนาลแอนติบอดี

1.1 Hybridomas secreting monoclonal antibodies to *E. coli* O157 LPS

ได้ใช้หนู BALB/c อายุ 6-7 สัปดาห์ เมื่อเริ่มต้นการ immunize (whole cell homogenate ของ *E. coli* O157) จำนวน 5 ตัว โดยใช้ dose, route และ schedule เหมือนๆ กันภายหลังการให้ booster dose ครั้งสุดท้าย ได้ตรวจพบว่าหนูตัวที่ 4 มี serum antibody titer ต่อ homologous antigen สูงที่สุดคือ 1:51,200 จึงใช้ spleen cells จากหนูตัวนี้ hybridize กับ myeloma cells พบว่าสามารถ aliquot fused cells ใส่ลงใน 96-wells tissue culture plates จำนวน 1,488 wells (well ละ 200 μ l) ด้วยกัน หลังจาก incubate plates ที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator และเปลี่ยน medium อย่างเหมาะสม พบว่ามี growing hybrids อยู่จำนวน 194 wells (13%) และเมื่อนำ spent culture medium จาก wells ที่มี growing hybrids ไปทดสอบหาแอนติบอดีต่อ O157 Ly (homologous antigen) พบว่า spent culture medium จากเซลล์ (polyhybrids) จำนวน 18 หลุม มีแอนติบอดี จึงนำเซลล์จาก 18 หลุมนี้ไปแยกเป็นเซลล์เดี่ยว (monocloning) และทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีใน spent culture medium ของ monoclones (hybridomas) พบว่า hybridomas จาก 4 wells มีแอนติบอดีเฉพาะต่อ O157 Ly/LPS เท่านั้นโดยไม่มี cross-reaction ต่อ heterologous antigens อื่นๆ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.1 ผู้วิจัยได้เลือก hybridoma ชื่อ clone 13C9 มาเลี้ยงสำหรับการผลิต monoclonal antibodies (MAb) ให้มากพอเพื่อใช้เป็น detection reagent ต่อไป

Characteristics ของ MAb จาก clone 13C9 (MAb13C9) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.4 จะเห็นว่า MAb13C9 เป็น immunoglobulin ชนิด γ 3 และ light chain เป็น kappa (K) ที่มีความจำเพาะต่อ O157 LPS และเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนถึง stationary phase แล้ว spent culture medium มี indirect ELISA titer 1:2,048 (20,480 EU/ml) และ MAb13C9 ให้ Western blot pattern ต่อ O157 LPS เป็น smears/ladders ดังแสดงใน Block I รูปที่ 2.10

1.2 Hybridomas secreting monoclonal antibodies to A and B subunits of Shiga toxin-1 (Stx-1)

ได้ immunized หนู BALB/c จำนวน 5 ตัว เช่นเดียวกัน ภายหลังให้ booster dose สุดท้ายแล้ว 7 วัน พบว่า serum antibodies ต่อ homologous antigen ของ immunized mice ทุกตัว (Stx-1-IEC) มี titer มากกว่า 1:10,240 เมื่อทดสอบด้วย indirect ELISA นอกจากนี้ยังได้นำซีรัมของหนูแต่ละตัวไปวิเคราะห์ด้วย Western blot analysis ว่ามีแอนติบอดีต่อ Stx-1A และ Stx-1B หรือไม่โดยใช้ SDS-PAGE-separated Stx-1-IEC หรือ Stx-1-CF ผู้วิจัยได้ใช้หนูตัวที่ 2 ซึ่งมี serum antibody titer ต่อ homologous antigen สูงที่สุด และมี reactive bands ต่อ

Stx-1 เป็น spleen cell donor โดยนำ splenocytes จากหนูตัวนี้ไป fuse กับ myeloma cells P3x-63-Ag8.653 ในการผลิต hybridomas เมื่อ hybridized แล้ว พบว่ามีเซลล์จาก 532 tissue culture wells จากทั้งหมด 1,080 wells ที่มี growing hybrids (49.3%) จาก 532 wells นี้ spent culture medium จาก 20 wells มีแอนติบอดีต่อ homologous antigen คือ Stx-1-IEC หรือ Stx-1-CF และมี bands ต่อ Stx-1A และ/หรือ Stx-1B ใน Western blot analysis ดังนั้นจึงนำเซลล์จาก 20 wells นี้ไปทำ monocloning โดยวิธี limiting dilution method ซึ่งได้ hybridomas 51 clones ด้วยกัน (Table 2.2) โดย 31 clones สร้าง MAb ต่อ Stx-1A และ 12 clones สร้าง MAb ต่อ Stx-1B immunoglobulins ที่ผลิตโดย clones ทั้งหมดเป็น γ ($\gamma 1$, $\gamma 2a$ หรือ $\gamma 2b$) และ K isotypes และไม่ cross-react กับ heterologous antigens ใน Table 2.1 เมื่อตรวจสอบโดยวิธี indirect ELISA และ dot-ELISA คณะผู้วิจัยได้เลือก hybridomas ชื่อ clones 11G3 และ 3D4 ไว้เพื่อผลิต MAb ต่อ Stx-1A และ Stx-1B ตามลำดับ (โปรดดูรูปใน Block II ของรูปที่ 2.10) ทั้งสอง clones เมื่อเลี้ยงใน tissue culture จนถึง stationary phase จะปล่อย MAb ออกมาใน spent culture fluids วัดเป็น indirect ELISA titers ได้ 1:1,280 และ 1:320 (12,800 EU/ml และ 3,200 EU/ml) ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2)

1.3 Hybridomas secreting monoclonal antibodies to Shiga toxin-2 (Stx-2)

ในการทดลองนี้ใช้ BALB/c จำนวน 10 ตัว นำมา immunize โดยใช้ Stx-2 toxoid เป็น immunogen ภายหลัง booster dose ครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ หนู mice ทุกตัวมี serum antibody titer สูงกว่า 1:10,000 และมี antibodies ที่ reactive ต่อ Stx-2A และ Stx-2B เมื่อตรวจด้วย Western blot analysis ต่อ SDS-PAGE-separated Stx-2-IEC จึงเลือกหนูตัวที่ 1 ซึ่งมี serum antibody titer 1:12,800 ต่อ homologous antigen เป็น spleen cell donor ซึ่งสามารถ aliquoted fused cells ลงใน tissue culture wells ได้ 1,088 พบว่ามี 229 wells (21%) ที่มี growing polyhybrids อย่างไรก็ตามพบว่ามีเพียง cells จาก tissue culture well เพียงหลุมเดียวที่สร้างแอนติบอดีต่อ Stx-2B จึงนำ cells จาก well นี้ไป monocloning และพบว่าได้ 8 hybridomas ซึ่งผลิต MAb ต่อ Stx-2B และ immunoglobulins เป็น $\gamma 2aK$ ได้เลือก clone ชื่อ 13D2 ไว้สำหรับผลิต MAb ต่อ Stx-2B สำหรับใช้เป็น antigen detection reagent ต่อไป เมื่อ clone 13D2 เจริญเติบโตเต็มที่ พบว่า spent culture medium มี indirect ELISA titer 1:2,560 (25,600 EU/ml)

เนื่องจากใน first cell fusion ไม่สามารถผลิต hybridomas ซึ่งมีความจำเพาะต่อ Stx-2A ดังนั้นเพื่อให้มี hybridomas ซึ่งหลั่ง MAb ต่อ Stx-2A จึงได้ใช้ immunized mouse อีก 1 ตัว ซึ่งมี serum antibody titer 1:25,600 ต่อ homologous antigen ในการทำ cell hybridization อีกครั้งหนึ่ง จาก tissue culture wells จำนวน 1,612 wells พบว่าทุก wells มี growing hybrids (100%) และ 460 wells (28.5%) ให้แอนติบอดีต่อ Stx-2-CF ผู้วิจัยได้นำเซลล์จาก 13 wells ไปทำ monocloning และได้ hybridomas 23 clones ซึ่งผลิต MAb ต่อ Stx-

2A subunits และ immunoglobulins เป็น γ ($\gamma 1$ หรือ $\gamma 2a$) ได้เลือก clone 26F9 ซึ่ง secrete MAb ชนิด $\gamma 1$ ใน spent culture medium ขณะเซลล์เจริญเต็มที่และมี indirect ELISA titer 1:160 (1,600 EU/ml) ไว้ใช้ในการวิจัยต่อไป ตารางที่ 2.3 แสดงรายละเอียดของ hybridomas ต่อ Stx-2

คุณสมบัติต่างๆ ของ clone 13C9 (MAb ต่อ O157 LPS), 11G3 (MAb ต่อ Stx-1A), 3D4 (MAb ต่อ Stx-1B), 26F9 (MAb ต่อ Stx-2A) และ 13D2 (MAb ต่อ Stx-2B) ได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 2.4 สำหรับ Western blot patterns ใน Blocks I, II และ III ของรูปที่ 2.10 ตามลำดับ แสดงให้เห็น antigenic specificities ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.4

รูปที่ 2.11 แสดงตัวอย่าง hybridoma clone ใน tissue culture

ตารางที่ 2.2 List of hybridomas generated against Stx-1 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies

No.	Hybridoma	Specific to subunit of Stx1*	Indirect ELISA titer	ELISA units (EU/ml)**	Max. Stx1 dose neutralized by MAb***	IgG subclass
1	1E11B5	A-subunit	1: 160	1,600	nd	nd
2	1E11B6	A-subunit	1: 320	3,200	nd	nd
3	1E11C2	A-subunit	1:160	1,600	<10CD ₅₀	IgG _{2a} , κ
4	1E11C4	A-subunit	1:320	3,200	<10CD ₅₀	IgG _{2a} , κ
5	1E11C10	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
6	3C9B5	B-subunit	1:160	1,600	≥1000CD ₅₀	IgG ₁ , κ
7	3C9B10	B-subunit	1:320	3,200	nd	nd
✓ 8	3C9D4	B-subunit	1:320	3,200	≥1000CD ₅₀	IgG ₁ , κ
9	6C8F7	B-subunit	1:320	3,200	≥1000CD ₅₀	IgG ₁ , κ
10	6C8G7	B-subunit	1:160	1,600	≥1000CD ₅₀	IgG ₁ , κ
11	6G5A4	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
12	6G5A5	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
13	6G5A6	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
14	6G5B9	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
15	6G5C4	A-subunit	1:160	1,600	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
16	8B4E4	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
17	8B4E7	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
18	8B4E9	A-subunit	1:1280	12,800	nd	nd
19	8B4F6	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
20	8B4G3	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
21	8B4H2	A-subunit	1:1,280	12,800	nd	nd
22	8B4H4	A-subunit	1:1,280	12,800	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
23	9G6E4	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
✓ 24	11E3G3	A-subunit	1:1,280	12,800	100CD ₅₀	IgG ₁ , κ
25	11E3G11	A-subunit	1:1,280	12,800	100CD ₅₀	IgG ₁ , κ
26	11E3H2	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
27	12D7B3	B-subunit	1:640	6,400	nd	nd
28	12D7B4	B-subunit	1:160	1,600	100CD ₅₀	IgG ₁ , κ

(ต่อหน้าถัดไป)

ตารางที่ 2.2 List of hybridomas generated against Stx-1 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies (cont.)

No.	Hybridoma	Specific to subunit of Stx1*	Indirect ELISA titer	ELISA units (EU/ml)**	Max. dose of Stx1 neutralized by MAb***	IgG subclass
29	12D7B5	B-subunit	1:640	6,400	nd	nd
30	12D7B10	B-subunit	1:1,280	12,800	100CD ₅₀	IgG ₁ , κ
31	12D7C10	B-subunit	1:1,280	12,800	nd	nd
32	12D9E11	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
33	12D9F3	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
34	12D9F6	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
35	12D9F7	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
36	12D9G3	A-subunit	1:160	1,600	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
37	12D9G5	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
38	13C10C11	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG _{2a} , κ
39	14B8C2	B-subunit	1:320	3,200	≥1000CD ₅₀	IgG _{2b} κ
40	14B8D4	B-subunit	1:1,280	12,800	≥1000CD ₅₀	IgG _{2b} κ
41	16D5B7	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
42	16D5B9	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
43	16D5B11	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
44	16D5C1	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
45	16D5C5	A-subunit	1:80	800	nd	nd
46	16D5C11	A-subunit	1:1,280	12,800	nd	nd
47	16D5C12	A-subunit	1:1,280	12,800	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
48	16D5D1	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
49	16D5D2	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
50	16D5D7	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
51	16D5D12	A-subunit	1:1,280	12,800	nd	nd

* = The subunits of Stx1 were specified by the locations of the reaction bands on NCM

** = One indirect ELISA unit was the smallest amount of the antibody in 100 µl of the MAb preparation that still gave the positive ELISA reaction (OD ≥ 0.05)

*** = The highest amount of Stx1-IEC that can be neutralized by 1ml of undiluted MAb. The data are expressed as the number of CD₅₀ of Stx1-IEC

nd = not done

✓ = Monoclonal chosen for further characterization of their MAb

ตารางที่ 2.3 Hybridomas generated against Stx-2 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies

No.	Hybridoma	Specific to subunit of Stx2*	Indirect ELISA titer	ELISA units (EU/ml)**	Max. dose of Stx2 neutralized by MAb***	IgG subclass
⇒ 1	1D10D7	A-subunit	1:20	200	nd	IgG _{2a} κ
⇒ 2	1D10H6	A-subunit	1:10	100	nd	IgG _{2a} κ
3	3D11B8	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
4	3D11D2	A-subunit	1:80	800	nd	nd
5	3D11E3	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
6	3D11F3	A-subunit	1:160	1,600	<10CD ₅₀	nd
⇒ 7	3D11G7	A-subunit	1:160	1,600	<10CD ₅₀	nd
8	3D11H8	A-subunit	1:320	3,200	nd	IgG ₁ κ
9	3E9C11	A-subunit	1:320	3,200	100CD ₅₀	IgG _{2a} κ
10	7D8C10	A-subunit	1:10	100	nd	nd
⇒ 11	7D8D2	A-subunit	1:160	1,600	100CD ₅₀	nd
12	7D8H8	A-subunit	1:20	200	<10CD ₅₀	IgG ₁ κ
13	8B7C4	A-subunit	1:80	800	nd	nd
14	8B7E7	A-subunit	1:160	1,600	<10CD ₅₀	IgG ₁ κ
15	8B7F4	A-subunit	1:40	400	nd	nd
16	8B7H6	A-subunit	nd	nd	nd	nd
17	26E9B3	A-subunit	1:80	800	nd	nd
18	26E9C1	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
19	26E9C5	A-subunit	1:160	1,600	100CD ₅₀	nd
20	26E9C6	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
21	26E9D9	A-subunit	1:80	800	nd	nd

(ต่อหน้าถัดไป)

ตารางที่ 2.3 Hybridomas generated against Stx-2 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies (cont.)

No.	Hybridoma	Specific to subunit of Stx2*	Indirect ELISA titer	ELISA units (EU/ml)**	Max. dose of Stx2 neutralized by MAb***	IgG subclass
22	26E9D11	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
✓ 23	26E9F9	A-subunit	1:160	1,600	100CD ₅₀	IgG ₁ κ
24	13D4C2	B-subunit	1:640	6,400	nd	IgG _{2a} κ
25	13D4C4	B-subunit	1:640	6,400	1000CD ₅₀	IgG _{2a} κ
26	13D4C8	B-subunit	1:640	6,400	nd	IgG _{2a} κ
27	13D4C9	B-subunit	1:1280	12,800	nd	IgG _{2a} κ
28	13D4C10	B-subunit	1:1280	12,800	nd	IgG _{2a} κ
✓ 29	13D4D2	B-subunit	1:2560	25,600	1000CD ₅₀	IgG _{2a} κ
30	13D4D3	B-subunit	1:1280	12,800	nd	IgG _{2a} κ
31	13D4D5	B-subunit	1:2560	25,600	100CD ₅₀	IgG _{2a} κ

* = The subunits of Stx2 were specified by the locations of the reactive bands on NCM

** = One indirect ELISA unit was the smallest amount of the antibody in 100 µl of the MAb that still gave the positive ELISA reaction (OD ≥ 0.05)

*** = The highest amount of Stx1-IEC that can be neutralized by 1 ml of undiluted MAb. The data are expressed as the number of CD₅₀ of Stx2-IEC

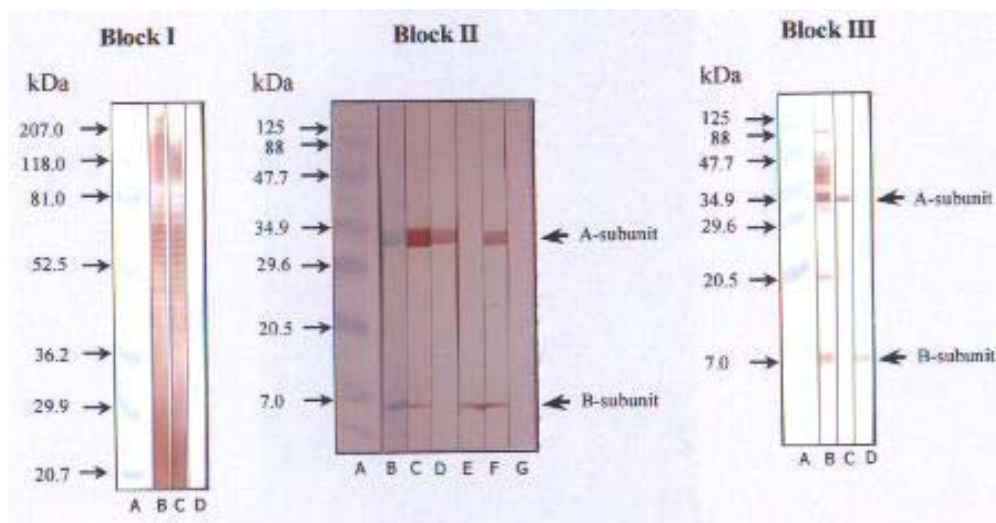
nd = not done

⇒ = Clones which their MAb had cross-reactivity to some heterologous antigens.

✓ = Monoclones which their MAb were chosen for further characterization

ตารางที่ 2.4 Specific hybridomas, their secreted Ig isotypes, antigenic specificities of their MAb, and the indirect ELISA titers of their culture fluids at stationary phase of *in vitro* growth

Hybridoma clone	Ig Isotypes		Antigenic specificity of MAb revealed by WB	Reciprocal indirect ELISA titer against homologous antigen
	H chain	L chain		
13C9	$\gamma 3$	κ	O157 LPS	2,048
11G3	$\gamma 1$	κ	Stx-1A	1,280
3D4	$\gamma 1$	κ	Stx-1B	320
26F9	$\gamma 1$	κ	Stx-2A	160
13D2	$\gamma 2a$	κ	Stx-2B	2,560



រូបភាព 2.10 Western blot (WB) patterns of monoclonal antibodies secreted by the selected hybridomas, i.e., clone 13C9 (Block I), clones 11G3 and 3D4 (Block II) and clones 26F9 and 13D2 (Block III) against SDS-PAGE-separated homologous antigens

Numbers at left of all blocks are molecular weight in kilodaltons

Lanes A of all blocks are standard molecular weight markers

Lanes B, C and D of block I are WB patterns of mouse immune serum, MAb 13C9 and culture fluid of P3x-63-Ag8.653 myeloma cells, respectively against the SDS-PAGE-separated O157 LPS

Lane B of block II is SDS-PAGE-separated purified Stx-1 stained with Amido black. Lanes C-G are WB patterns of mouse immune serum, MAb 11G3, MAb 3D4, combination of MAb 11G3 and MAb 3D4 and culture fluid of P3x-63-Ag8.653 myeloma cells, respectively against the SDS-PAGE-separated pure Stx-1

Lanes B, C and D of block III are WB patterns of mouse immune serum, MAb 26F9 and MAb 13D2, respectively against the SDS-PAGE-separated Stx-2-IEC



รูปที่ 2.11 Representative hybridoma in tissue culture

1.4 ผลการตรวจหาแอนติเจนและการเพาะ-แยกและ identify เชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

1.4.1 การเตรียม antigen detection reagents เพื่อตรวจหาแอนติเจนต่างๆ ใน stools และ rectal swab cultures ดังนี้

Detection antigen สำหรับตรวจหา O157 LPS ได้แก่ monoclonal antibodies (MAb) จาก clone 13C9 (specific ต่อ *E. coli* O157 LPS)

Detection reagent สำหรับตรวจหา Shiga-toxin 1 ได้แก่ combination of MAb จาก clones 11G3 (specific ต่อ Stx-1A) และ 3D4 (specific ต่อ Stx-1B)

Detection reagent สำหรับตรวจหา Shiga-toxin 2 ได้แก่ combination of MAb จาก clones 26F9 (specific ต่อ Stx-2A) และ 13D2 (specific ต่อ Stx-2B)

โดยเตรียมให้แต่ละ preparation มีเนื้อ antibodies ต่อ specific epitope 80 indirect ELISA units (80 EU) ต่อ 1 มล.

1.4.2 ผลการตรวจหาแอนติเจนของ enterohemorrhagic *E. coli* ในตัวอย่าง

อุจจาระและ rectal swab cultures จากผู้ป่วย

จากการใช้วิธี dot-ELISA โดยใช้ MAb เฉพาะจากข้อ 1.4.1 เป็น detection reagents ได้ผลดังนี้

1. มีตัวอย่างอุจจาระ/rectal swab cultures จำนวน 9 ตัวอย่างจากทั้งหมด 546 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAb-based dot-ELISA คือ

Stool samples จากผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นทั้ง 5 ตัวอย่าง

Rectal swab cultures จากผู้ป่วยชาวไทย 4 ตัวอย่าง จาก 499 ตัวอย่าง

ตัวอย่างอุจจาระ/rectal swabs จำนวน 537 จาก 546 ตัวอย่างมีผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ enterohemorrhagic *E. coli* โดย MAb-based dot-ELISA เป็นลบได้แก่ 495 ตัวอย่างจากผู้ป่วยชาวไทยและ 42 ตัวอย่างจากผู้ป่วยชาวเวียดนาม

2. Stool samples 5 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นที่ให้ผลบวก โดย dot-ELISA มีรายละเอียดคือ

2 ตัวอย่างให้ผล O157 LPS⁺, Stx-1⁻, Stx-2⁺

1 ตัวอย่างให้ผล O157 LPS⁺, Stx-1⁺, Stx-2⁻

1 ตัวอย่างให้ผล O157 LPS⁺, Stx-1⁺, Stx-2⁺

1 ตัวอย่างให้ผล O157 LPS⁻, Stx-1⁺, Stx-2⁺

3. Rectal swab samples จากผู้ป่วยชาวไทย 4 ตัวอย่างที่ให้ผล dot-ELISA เป็นบวก มีรายละเอียด ดังนี้

1 รายให้ผล O157 LPS⁺, Stx-1⁻, Stx-2⁻

3 รายให้ผล O157 LPS⁻, Stx-1⁻, Stx-2⁺

1.4.3 ผลการเพาะ-แยก และ identify เชื้อโดยวิธีมาตรฐานและการ confirm ด้วย PCR เพื่อตรวจหาชนิดของ O157 LPS และ *stx-1* และ *stx-2*

การเพาะ-แยกและ identify เชื้อจากตัวอย่างอุจจาระและการทำ PCR เพื่อหา O157 LPS gene, *stx-1* และ *stx-2* ในตัวอย่างจากอุจจาระของผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น ทำที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของ Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo, Japan โดย Dr. Akemi Kai เป็นผู้ทำและเก็บผลการทดสอบไว้จนเมื่อได้ผลการทดสอบด้วย dot-ELISA แล้วจึงนำมา reveal พบว่าได้ผลตรงกันทุกประการ คือ

เป็น *E. coli* O157 4 isolates

2 isolates เป็น Stx-1⁻, Stx-2⁺

1 isolates เป็น Stx-1⁺, Stx-2⁻

1 isolates เป็น Stx-1⁺, Stx-2⁺

และเป็น *E. coli* serogroup อื่น 1 isolate คือ non-O157 *E. coli* Stx-1⁺, Stx-2⁺

การเพาะ-แยกและ identify เชื้อจาก rectal swab cultures ของผู้ป่วยชาวไทยทำที่โรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 499 ราย ส่วนการเพาะ-แยกและ identify เชื้อจากตัวอย่างผู้ป่วยชาวเวียดนาม 42 ราย ทำที่ “108” Hospital, Hanoi

ผลสรุปของการเพาะ-แยกและ identify เชื้อและการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างโดย MAb-based dot-ELISA ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ผลการเพาะ-แยกและ identified เชื้อ และ MAb-based dot-ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างอุจจาระ/rectal swab cultures จำนวน 628 ตัวอย่าง

เชื้อที่ตรวจพบ (จำนวนตัวอย่าง)	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	ผลของ MAb-based dot-ELISA เมื่อใช้ MAb ที่มีความเฉพาะต่อ		
		O157 LPS	Stx-1	Stx-2
ตัวอย่างที่ผล dot-ELISA เป็นบวก				
<i>E. coli</i> O157 (2)	ชาวญี่ปุ่น	+	-	+
<i>E. coli</i> O157 (1)	ชาวญี่ปุ่น	+	+	-
<i>E. coli</i> O157 (1)	ชาวญี่ปุ่น	+	+	+
<i>E. coli</i> non-O157 (1)	ชาวญี่ปุ่น	-	+	+
Untypeable <i>E. coli</i> (1)	ชาวไทย	+	-	-
Untypeable <i>E. coli</i> (3)	ชาวไทย	-	-	+
ตัวอย่างที่ให้ผล dot-ELISA เป็นลบ				
<i>Aeromonas hydrophila</i> (2)	ชาวไทย	-	-	-
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (8)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i> (9)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp. (67)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp. (5)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp. and <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Shigella</i> spp.	40 Vietnamese, 58 Thai	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (7)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (42)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> Ogawa (1)	ชาวไทย	-	-	-
No pathogens were isolated (378)	2 Vietnamese, 376 Thai	-	-	-

+, dot-ELISA positive

-, dot-ELISA negative

1.5 Multiplex PCR เพื่อตรวจหาเอ็นของ O157 LPS และ *stx-1* และ *stx-2*

เนื่องจากในการเพาะ-แยกและ identify เชื้อจากอุจจาระ/rectal swabs จากผู้ป่วยซึ่งทำ ที่โรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรีโดยปกติรายงานเพียงว่าใน rectal swab cultures ของผู้ป่วยอุจจาระร่วง ตรวจพบ *E. coli* โดยไม่พบ pathogens อื่น แต่ไม่ได้ทำ serogrouping หรือ serotyping ของเชื้อ *E. coli* ที่พบ รวมทั้งไม่เก็บเชื้อ *E. coli* ไว้ด้วย (หน่วยบริการทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลส่วนใหญ่ไม่เก็บ *E. coli* ไว้เพราะพบมากทุกวัน จะรายงานเพียง enteropathogenic *E. coli* เท่านั้น) จึงไม่มี *E. coli* isolates ของผู้ป่วยชาวไทย 4 ราย (ซึ่งผลการตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี dot-ELISA เป็นบวก) สำหรับมาตรวจหา O157 LPS หรือ Stx-1 และ Stx-2 หรือทำ PCR จากเชื้อโดยตรงได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำ rectal swab samples ของผู้ป่วยที่ให้ผล dot-ELISA เป็นบวกทั้ง 4 รายมาใช้เป็น DNA template ทั้งโดยตรง หรือทั้งการสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐานและการใช้ Chelex แล้วนำมาทำ multiplex PCR เพื่อหา DNA ของ O157 LPS, Stx-1 และ Stx-2 โดยได้รับ Primer mixture มาจาก Professor Dr. Shinji Yamasaki, Research Institute International Medical Center of Japan แต่เนื่องจาก multiplex PCR primers จดสิทธิบัตรไว้จึงไม่สามารถเปิดเผย content และ sequences ของ primers ได้ อย่างไรก็ตาม PCR amplicons ของ O157 LPS, *stx-1* และ *stx-2* DNA ซึ่ง amplify โดย multiplex primers มีขนาด 457 bp, 349 bp และ 112 bp ตามลำดับ

PCR reaction mixture ประกอบด้วย

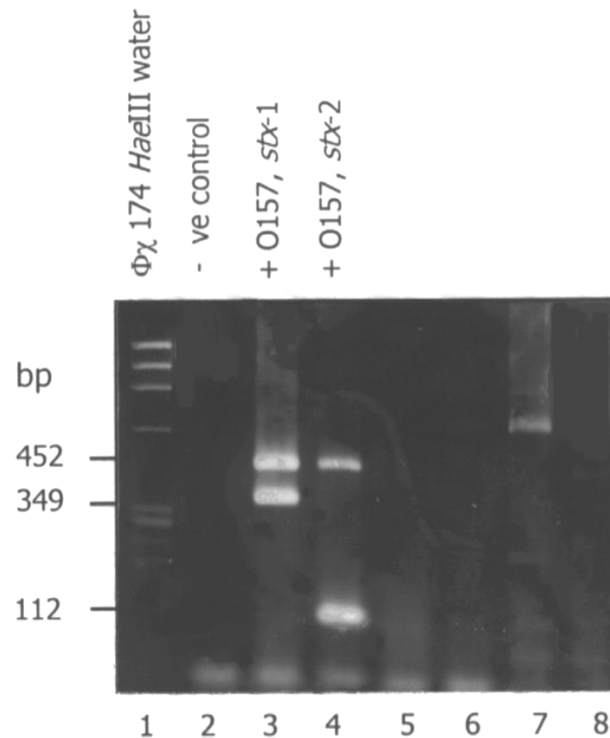
- 17.35 µl sterile ultra-pure distilled water
- 2.5 µl dNTP mixture (2.5 mM each, Takara Co., Japan)
- 3 µl ของ 10 × PCR buffer
- 3 µl each of primer (10 pM/µl)
- 0.15 µl *Taq* DNA polymerase (5U/ml, Perkin Elmer, USA)
- 1 µl DNA template

PCR condition ได้แก่

- Initial warming ที่ 94° C, 5 นาที
- 35 cycles of denaturation ที่ 94° C, 1.5 นาที
- Annealing ที่ 55° C, 1.5 นาที
- Extension ที่ 72° C, 1.5 นาที
- Final extension ที่ 72° C, 7 นาที

โดยใช้ Thermal Cycler Gene Amp® PCR System model 9700, PE Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA

นำ PCR products ไป electrophoresed ใน 2% agarose ใน TAE buffer, pH 8.0 ที่ 80 Volts เป็นเวลา 30 นาที หรือเมื่อ dye front เคลื่อนที่ไปจนได้ระยะทางถึงประมาณ 60% ของ gel length นำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide solution (0.5 µg/ml) เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วดู amplicons ด้วย UV Transilluminator (Fotodyn Incorporation, Wisconsin, USA) โดยใช้ clinical isolates คือ *E. coli* O157 ที่มี *stx*-1 และ *stx*-2 เป็น positive controls พบว่า ไม่สามารถ amplify DNA ของ O157 LPS และ *stx*-1 และ *stx*-2 จาก rectal swab samples ของผู้ป่วยชาวไทย 4 คนที่ ผลการตรวจด้วย MAb-based dot-ELISA ให้ผล positive โดย MAb ต่อ O157 LPS (1 sample) และ 3 samples ที่ positive โดย MAb Stx-2 ได้ ในขณะที่ positive controls ให้ผลตรงกันทุกประการ (โปรดดูรูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 ผล multiplex PCR เพื่อ amplify genes of O157 LPS, *stx*-1 และ *stx*-2 ใน stool samples ซึ่งให้ผลบวกโดย MAb-Based dot-ELISA

1, marker ($\Phi\chi$ 174 *Hae*III)

2, negative control

3, positive control O157, *stx*-1

4, positive control O157, *stx*-2

5-8, stool samples which were dot-ELISA-positive (ไม่สามารถ amplify ได้ เข้าใจว่า stool samples มี *Taq* polymerase inhibitors) จึงเปลี่ยนไปทำ Western blotting และ Vero cytotoxicity test แทน และพบว่าตัวอย่างมี O157 LPS (รูปที่ 2.13) หรือ Stx จริง (ไม่ได้แสดงผล)

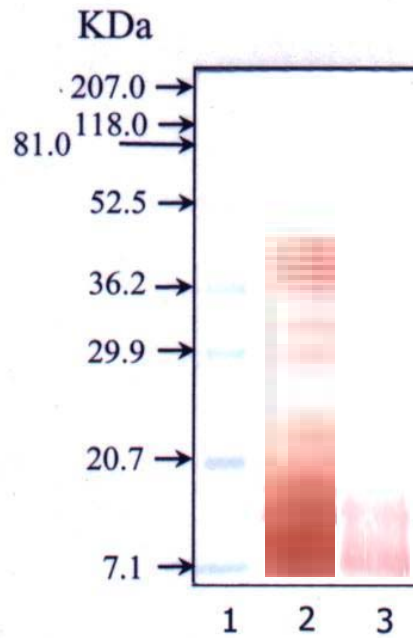
เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าการ amplify DNA จาก stool samples ไม่ใคร่ได้ผลดีนัก ทั้งนี้เพราะ stool samples มักมี *Taq* DNA polymerase inhibitors รบกวน การที่ positive controls ให้ผลถูกต้องเป็นเพราะ positive controls เป็น pure isolates ไม่ใช่ stool sample และเพื่อยืนยันว่า stool samples มี DNA polymerase inhibitors จริงเราได้ใส่ positive controls ลงใน stool samples แล้วนำไปทำ PCR เช่นเดิม ผลปรากฏว่าไม่สามารถ amplify DNA ของ positive controls ใน stool samples ได้ แสดงว่า stool samples มี PCR inhibitors จริง

1.6 Western blot analysis และ Verocytotoxicity test เพื่อตรวจหา O157 LPS และ Stx-2 ใน MAb-based dot-ELISA positive rectal swab samples

ได้นำ rectal swab cultures ของผู้ป่วยทั้ง 4 รายที่ให้ผลบวกต่อ MAb-based dot-ELISA ไป dialysed ในน้ำกลั่นแล้ว lyophilized เพื่อ concentrate จากนั้นนำไป run ใน SDS-PAGE แล้วทำ Western blot analysis โดยใช้ MAbO157 LPS สำหรับตัวอย่างที่ MAb-dot-ELISA ให้ผลบวก O157 LPS และใช้ MAbStx-2 ใน Western blot analysis ของ samples ที่ dot-ELISA ให้ผลบวก Stx-2

ผลของ Western blot analysis (WB) พบว่า ใน rectal swab sample ที่ให้ผลบวก MAbO157 LPS มี O157 LPS อยู่จริงโดย WB ให้ผลเป็น smear pattern กับ MAbO157 LPS จาก clone 13C9 (โปรตีนรูปที่ 2.13) ในขณะที่ rectal swab samples ที่ให้ผลบวก MAbStx-2 dot-ELISA มองไม่เห็น bands ของ Stx-2 ไม่ว่าจะเป็นตรงตำแหน่ง Stx-2A (≈ 33 kDa) หรือ Stx-2B (≈ 7.0 kDa) ก็ตาม

ดังนั้น rectal swab samples ทั้งสาม samples จึงถูกนำไปทดสอบ Vero cytotoxicity test โดยนำไปกรองผ่าน millipore membrane เพื่อทำให้ปลอดเชื้อแล้วนำไปเติมลงใน Vero cell culture ผลปรากฏว่าทั้งสาม samples ก่อให้เกิด cytopathic effect ต่อ Vero cell จริง โดยมีการหลุดของเซลล์เช่นเดียวกับผลที่แสดงไว้ในรูป 2.11(b) ซึ่งแสดงว่าทั้งสามตัวอย่างมี Shiga-toxin อยู่จริง อย่างไรก็ตามทั้งสามตัวอย่างมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะทำ neutralization test โดย MAbStx-2A + MAbStx-2B หรือใช้ polyclonal antibodies ต่อ Stx-2 ได้



รูปที่ 2.13 Western blot pattern ของ rectal swab culture ของผู้ป่วยซึ่งผลการตรวจด้วย MAb-based dot-ELISA เป็นบวกเมื่อใช้ MAbO157 LPS จาก clone 13C9 เป็น detection reagent

Lane 1, molecular weight markers

Lane 2, WB of the dot-ELISA positive control (*E. coli* O157 LPS)

Lane 3, WB of O157 LPS positive sample

II. การศึกษาเชื้อ Shiga- toxin producing *E. coli* (STEC) จากตัวอย่างอุจจาระวัว - ควาย ในประเทศไทย และการศึกษา genotypes และ phenotypes ต่าง ๆ

Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) หรือ Verocytotoxin producing *E. coli* หรือ enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ซึ่งเป็นสาเหตุของ hemorrhagic colitis (HC) และ/หรือ hemolytic uremic syndrome ในคนนั้น เป็นที่ทราบกันดีว่ามี วัว-ควาย เป็น reservoir host คนจะติดเชื้อโดยการบริโภคผลิตภัณฑ์จาก วัว-ควาย ที่มี *E. coli* เหล่านี้เป็นเพื่อนอยู่ เช่น ดื่มนม รับประทานเนื้อสด เช่น แฮมเบอร์เกอร์ที่ไม่สุก รับประทานผักดิบที่ใช้มูลวัว-ควายเป็นปุ๋ย หรือน้ำที่ใช้รดผักสวนครัวที่มีการปนเปื้อนอุจจาระวัว-ควาย โดยไม่ได้ล้างให้สะอาด เป็นต้น การระบาดของโรคติดเชื้อ EHEC มีรายงานบ่อยๆ ในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ญี่ปุ่น แคนาดา เยอรมัน อังกฤษ สกอตแลนด์ ออสเตรเลีย เป็นต้น สำหรับในประเทศไทย ข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ EHEC หรือ STEC มีน้อยมาก และเนื่องจากงานวิจัยที่เสนอในโครงการของเมธีวิจัยอาวุโส โครงการย่อยที่ 2 ได้สำเร็จก่อนกำหนดเวลา คณะผู้วิจัยจึงได้ขยายการวิจัยออกไปในส่วนของ การสำรวจหาเชื้อ STEC ในอุจจาระของวัว-ควายในประเทศไทย รวมทั้ง ศึกษา genotypes และ phenotypes ของเชื้อเหล่านี้ด้วย

รายละเอียดของงานวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. การ isolate เชื้อ STEC จากอุจจาระวัว-ควาย

ได้เก็บ fecal samples จากอุจจาระวัว-ควาย ที่เลี้ยงโดยชาวบ้านบริเวณรอบๆ กรุงเทพมหานคร และจังหวัดอื่นๆ จำนวน 139 ตัวอย่างโดยเก็บประมาณตัวอย่างละ 100 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสะอาดแล้วนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการทันที เมื่อถึงห้องปฏิบัติการได้ incubate ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างประมาณ 1 loop ใส่ลงใน EC broth แล้ว enriched ไว้ใน shaking incubator 37°C ซ้ำมคืน หลังจากนั้นนำ culture มาตรวจหาว่ามี Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) และ *E. coli* O157 หรือไม่โดยวิธี multiplex PCR จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกไปทำ serial dilution ใน PBS นำ dilution 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาณ 100 μ l ไป spread ลงบน MacConkey agar plates แล้ว incubate ที่ 37°C, 24 ชั่วโมง จากนั้น picked colonies จากแต่ละ plate ประมาณ 50-60 colonies ต่อ plate ไป screen หา O157, *stx-1* และ *stx-2* โดย multiplex PCR อีกครั้งหนึ่ง เก็บ colonies ที่ให้ผลบวกไว้สำหรับการศึกษาต่อไป

2. PCR เพื่อการ detect *E. coli* O157, *stx-1* และ *stx-2*

ได้ใช้ primers ซึ่งตีพิมพ์ไว้แล้วโดย Pal et al. (1999) ได้แก่คู่ที่ 1 คือ EVT1 5'-CAACATGGATCTCAG-3'; และ EVT2-5' CCCCTCAACTGCTAATA-3'; คู่ที่ 2 คือ EVS-5' ATCAGTCGTCACACTGCTGGT-3', และ EVC2-5' CTGCTGTCACAGTGACAAA-3' เพื่อ

amplify *stx-1* และ *stx-2* ตามลำดับ ส่วน primers สำหรับ *E. coli* O157 เป็น patent sequences ของบริษัทในประเทศญี่ปุ่น จึงไม่สามารถเปิดเผยได้

ขั้นตอนการทำ PCR มีดังนี้

นำ bacterial culture ที่ enrich ไว้แล้วมา dilute ใน TE แล้วต้มในน้ำเดือด 20 นาที และใช้ sample ที่ต้มแล้วนี้เป็น PCR template ส่วน PCR reaction mixture ประกอบด้วย ultra-pure distilled water 9.125 μ l, primers แต่ละตัว 3 μ l (10 μ M), dNTP mixture 2.5 μ l (2.5 mM แต่ละตัว), Tag DNA polymerase 0.375 μ l (2 units/ μ l) และ DNA template 3 μ l ส่วน PCR condition ได้แก่ การ warm ที่ 94°C 5 นาที แล้ว denaturation 35 cycles ที่ 94°C เป็นเวลา 1.5 นาที annealing ที่ 55°C เป็นเวลา 1.5 นาที extraction ที่ 72°C, 1.5 นาที และ final cycle extension 7 นาที ที่ 72°C โดยใช้ Thermal Cycler GeneAmp® PCR System Model 9700, PE Applied Biosystem Perkin Elmer, U.S.A. จากนั้นนำ amplicons ไป electrophoresed ใน 2% agarose ใน TAE (Tris-acetate EDTA, pH 8.0) buffer ที่ 100 volts ประมาณ 30 นาที หรือเมื่อ dye front เคลื่อนที่ไปประมาณ 60% ของความยาวของ gel จึงหยุดกระแสไฟฟ้าแล้วนำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide (0.5 μ g/ml) เป็นเวลา 15 นาที แล้วดู amplicons ด้วย UV trans-illuminator โดย positive results จะพบว่ามี amplicons ขนาด 450 bp, 349 bp และ 112 bp สำหรับ *E. coli* O157, *stx-1* และ *stx-2* ตามลำดับ (รูปที่ 2.14)

นำ enriched culture ซึ่งให้ผล positive PCR ไป plate ลงบน Mac Conkey agar แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง picked colonies 50-100 single colonies ไป screened หา gene ของ *E. coli* O157, *stx-1* และ *stx-2* โดย multiplex PCR เช่นเดียวกับที่อธิบายไว้แล้วข้างต้น

พบว่าจากตัวอย่างอุจจาระวัว 139 samples มี 27 samples ที่ให้ผลบวก O157, *stx-1* และ/หรือ *stx-2*

เมื่อนำแต่ละ colonies จาก 27 ตัวอย่างที่ให้ผล multiplex PCR เป็นบวกไปตรวจหา O157, *stx-1* และ *stx-2* อีกครั้งหนึ่งพบว่า 48 colonies (strains) ให้ผลบวกใน 49 isolates นี้ 22 isolates (44.9%) ให้ผลบวกทั้ง *stx-1* และ *stx-2* และ 22 isolates (44.9%) ให้ผลบวกเฉพาะ *stx-2*, 4 isolates ให้ผลบวก *stx-1* (8.2%) เพียงอย่างเดียว และ 1 isolate (2%) ให้ผลบวก *E. coli* O157 amplicon (ตารางที่ 2.6) STEC isolates ที่ได้จะนำไปศึกษา genotypes อื่นๆและ phenotypes ต่างๆ เช่น ตรวจหา O157 LPS, Stx-1 และ Stx-2 ด้วย MAb-based dot-ELISA ตรวจหา hemolysin โดยใช้ blood agar plates ตรวจหา Shiga toxin ด้วย Vero cytotoxic assay ตรวจหา serogroups และ serotypes โดย polyvalent และ monovalent antisera นอกจากนี้ได้ศึกษา plasmid profiles และ rRNA โดย ERIC-PCR ถึงความสัมพันธ์ในระดับ genome ของเชื้อและใช้วิธี PCR เพื่อหา virulence genes อื่นๆ เช่น *eae*, *hlyA*, *etpD* และ *katP* ด้วย

ตารางที่ 2.6 Phenotypic and genotypic characteristics of the 49 *E. coli* isolates

Sample no.	Strain code	Sserogroup	O157 LPS	Hemolysis	Vero-cytotoxicity	Chromosomal genes				Plasmid genes				Resistotype*
						<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>fliC</i>	<i>cpd</i>	<i>hlyA</i>	<i>katP</i>	<i>O157</i>	
1	TC 1-16	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
	TC 1-17	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
	TC 1-21	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
	TC 1-22	Rough	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
3	TC 3	O15	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	S
5	TC 5-7	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
9	TC 9-28	O157	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	S
12	TC 12	O15	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	R
14	TC 14-3	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
	TC 14-5	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
20	TC 20-7	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
27	TC 27-32	O142	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	S
50	TC 50-22	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 50-25	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 50-28	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
52	TC 52-2	ONT	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 52-6	O8	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
53	TC 53-4	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
58	TC 58-2	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 58-3	Rough	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 58-6	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
59	TC 59-1	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 59-3	O152	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 59-10	O15	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
62	TC 62-24	O29	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
68	TC 68-8	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 68-76	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
69	TC 69-5	ONT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ND	S
84	TC 84-6	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 84-10	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
89	TC 89-3	Rough	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 89-43	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	S
90	TC 90-1	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
	TC 90-2	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
	TC 90-5	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
	TC 90-42	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
	TC 90-48	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
91	TC 91-39	O27	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	S
93	TC 93-28	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
115	TC 115-21	ONT	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	ND	S
119	TC 119-21	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	ND	S
120	TC 120-3	O8	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 120-12	O8	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	ND	S
125	TC 125-9	O8	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
127	TC 127-2	ONT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ND	S
	TC 127-5	O168	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
130	TC 130-22	O8	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 130-24	O8	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 130-25	O8	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	S

ONT = untypable

ND = not done

3. MAb-based dot-ELISA เพื่อตรวจหา O157 LPS, Stx-1 และ Stx-2 (Chaicumpa *et al.*, 1998b)

นำเชื้อซึ่งผ่าน enrichment ที่ 37°C ข้ามคืนปริมาตร 500 μ l ไปต้ม 30 นาที ก่อนนำไปทดสอบด้วย dot-ELISA โดยหยด sample ละ 3 μ l ลงบน NC strips, blocked แล้ว reacted กับ MAb แต่ละ specificity คือ O157, Stx-1 และ Stx-2 ส่วน control NC strip ซึ่งหยด samples ไว้เช่นเดียวกันให้ reacted กับ spent medium ของ P3x-63-Ag8.653 myeloma cells ล้าง NC strips หลังจาก incubated กับ MAb หรือ medium control 20 นาที นำ NC strips ทั้งคู่ไปจุ่มใน rabbit anti-mouse immunoglobulin-enzyme conjugate เป็นเวลา 20 นาที ล้างแล้วนำไป reacted กับ substrate เพื่อ develop สี

4. ERIC-PCR

ใช้ genomic DNA เป็น template และใช้ ERIC Primers คือ:

IR 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

และ 2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

PCR reaction mixture ประกอบด้วย ultra-pure distilled water 28.5 μ l, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ l, primers แต่ละตัว (10 μ M) 5 μ l, dNTP mixture (2.5 mM แต่ละตัว) 4 μ l, *Taq* DNA polymerase (5 units/ μ l) 0.5 μ l และ DNA template 2 μ l

PCR condition คือ:

initial warming 94°C, 2 นาที

denaturation 25 cycles ที่ 94°C, 1 นาที

annealing ที่ 65°C, 1 นาที

extension ที่ 72°C, 1 นาที

โดยใช้ Thermal Cycler GeneAmp® PCR System model 9,700, PE Applied Biosystem, Perkin-Elmers, USA

นำ Amplified product ที่ได้ไป electrophoresed ใน 2% agarose ใน TAE (Tris-acetate EDTA, pH 8.0) buffer ที่ 100 volts เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงจะ stain gel ด้วย 0.5 μ g/ml ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที แล้วดู amplicons ด้วย UV Trans-illuminater (Fotodyn Incorporation, Wisconsin, USA)

5. การศึกษา Plasmid profiles

เตรียม plasmid DNA ของ STEC โดยจะสกัดจาก culture ที่เลี้ยงข้ามคืนใน broth ปริมาตร 3 ml โดยใช้ alkaline lysis method ตามวิธีของ Kado และ Liu (1981) นำ plasmid

ไป electrophoresed ใน 0.5% agarose gel โดยใช้ TAE buffer แล้วย้อม gel ด้วย ethidium bromide แล้วตรวจดูด้วยกล้อง UV ดังข้างต้น โดยจะ estimate molecular sizes ของ plasmid ด้วยการเปรียบเทียบการเคลื่อนที่กับ plasmids ที่ทราบขนาดโมเลกุลอยู่แล้ว (extract จาก *E. coli* EDL 933 reference strain)

6. การทำ serogrouping และ serotyping

จะนำ positive STEC isolates ไปตรวจหา serogroups และ serotypes โดยวิธีของ Bettelheim และ Thomson (1987) และ Chandler และ Bettelheim (1974) ตามลำดับ โดยจะใช้ full range O sera (O1 to O169) และ H sera (H1 to H56) ตามลำดับ

7. Cytotoxic assay

โปรดดูวิธีทำในโครงการย่อยที่ 2

8. Hemolytic activity testing

จะ streak แบคทีเรียลงบน tryptic soy agar (Difco) plate ซึ่งมี 5% washed human blood cells ผสมอยู่ หลังจาก incubate plate ประมาณ 18 ชั่วโมง ที่ 37°C จึงตรวจดูว่ามี hemolysis รอบๆ bacterial colonies หรือไม่ (Schmidt *et al.*, 1999)

ผลการวิจัย

ผลการศึกษา virulence genes ต่างๆ และ plasmid profiles ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากวัวทั้ง 49 สายพันธุ์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.6

การศึกษา plasmid profiles ของเชื้อทั้ง 49 isolates พบว่าสามารถแยกได้เป็น 8 กลุ่มตามตารางที่ 2.7

สามารถสรุปผลการศึกษา phenotypes และ genotypes ได้ดังนี้

1. จาก 49 isolates พบว่ามีเพียง strain TC9-28 (พบ amplicon ของ gene O157) เท่านั้นที่ให้ผลบวก MAb-based-dot-ELISA ต่อ monoclonal antibodies เฉพาะต่อ O157 LPS

2. จำนวน (ยกเว้น TC9-28) 48 isolates ให้ผล Vero cytotoxic assay เป็นบวก แสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการผลิต Shiga toxin ได้จริง

3. 37 isolates จาก 49 isolates ผลิต hemolysin และทำให้เกิด α -hemolysis (ไม่ใช่ typical enterohemolytic phenotype) คือ zone จะ clear มีขนาดใหญ่เห็นได้ชัดภายหลังจาก incubate เชื้อแล้วประมาณ 18 ชั่วโมง

4. Virulence gene profiles มีดังนี้: จำนวนสายพันธุ์ที่มี genes *eae*, *tir*, *etpD*, *hlyA* และ *katP* คือ 2, 2, 0, 38, และ 3 strains ตามลำดับ โดย isolates ที่ให้ผลบวก *eae* gene (encode intimin adhesin) คือ TC3 และ TC12 ซึ่งทั้งสอง isolates นี้ให้ผลบวก *tir* gene (encode translocated intimin receptor ซึ่งเป็น type III secretion system) และเป็น serogroup O15 ทั้งสองสายพันธุ์

5. ทุก isolates ที่มี *hlyA* gene (38 isolates) ผลิต hemolysin ได้โดยจะเห็นลักษณะของ hemolysis เมื่อเลี้ยงบน human blood group O agar ยกเว้น isolate TC3 ซึ่งตรวจพบ *hlyA* gene แต่ไม่ผลิต hemolysin (Hly)

6. เมื่อพิจารณา isolates จากการมี virulence genes ต่างๆ คือ chromosomal genes: *stx-1*, *stx-2*, *eae* และ *tir* และ plasmid genes คือ *hlyA*, *katP* และ *etpD* แล้วพบว่าสามารถแยก isolates ได้เป็น 8 กลุ่ม (ตารางที่ 2.7) โดย predominant profile คือ profile ที่ 1 ($stx^{1+,2+}$, eae^- , tir^- , $etpD^-$, $hlyA^+$ และ $katP^-$) ซึ่งมีถึง 22 isolates

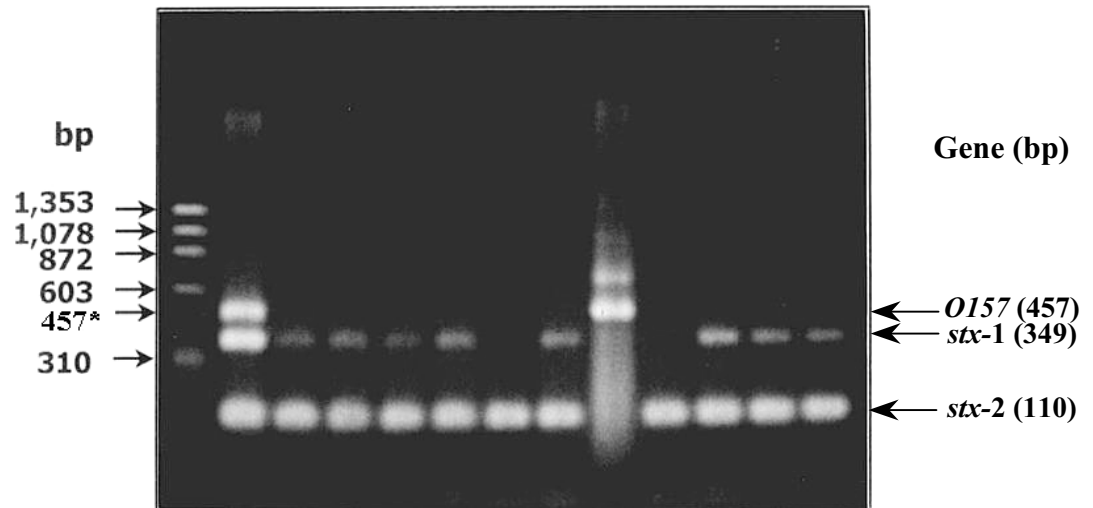
7. ทั้ง 49 isolates มีความไวต่อยาปฏิชีวนะตาม criteria ของ National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) ยกเว้น TC12 isolate ซึ่งดื้อยา ampicillin, chloramphenicol และ trimethoprim/ sulfamethoxazole

ตารางที่ 2.7 Eight groups of virulence gene profiles and serogroups of strains of each profile

Group	Number (%)	Serogroup (No.)	Virulence genes						
			<i>stx-1</i>	<i>stx-2</i>	<i>eae</i>	<i>tir</i>	<i>etpD</i>	<i>hlyA</i>	<i>katP</i>
1	22 (44.9)	ONT (14)	+	+	-	-	-	+	-
		Rough (3)							
		O8 (3)							
		O27 (1)							
		O29 (1)							
2	2 (4.08)	O15 (2)	-	+	+	+	-	+	-
3	1 (2.04)	O157 (1)	-	-	-	-	-	+	-
4	10 (20.41)	ONT (5)	-	+	-	-	-	+	-
		O8 (2)							
		O15 (1)							
		O142 (1)							
		O152 (1)							
5	3 (6.12)	ONT (1)	+	-	-	-	-	+	-
		O8 (2)							
6	3 (6.12)	ONT (3)	-	+	-	-	-	-	+
7	7 (14.29)	ONT (6)	-	+	-	-	-	-	-
		O168 (1)							
8	1 (2.04)	ONT (1)	+	-	-	-	-	-	-

8. จากทั้งหมด 49 isolates พบว่าสามารถจัดแบ่ง 46 isolates ออกได้เป็น 9 plasmid profiles ส่วนอีก 3 isolates ไม่มี plasmid ใดๆ (ผลจากการสกัด 5 ครั้ง) จำนวน plasmid จากแต่ละ strains ผันแปรจาก 1-8 plasmids และมีขนาดต่างๆ กัน จาก 1-9 kb (ตารางที่ 2.8)

9. จากการศึกษาด้วย ERIC-PCR พบว่าสามารถแยกทั้ง 49 isolates ตาม amplimers ที่ได้จาก ERIC-PCR ออกเป็น 14 profiles (ตารางที่ 2.9) คือให้ bands 3-6 bands และมีขนาดตั้งแต่ <100 ถึง 3,000 bp



รูปที่ 2.14 The *stx*-1, *stx*-2 and *O*157 LPS amplicons at 110, 349 and 457, respectively

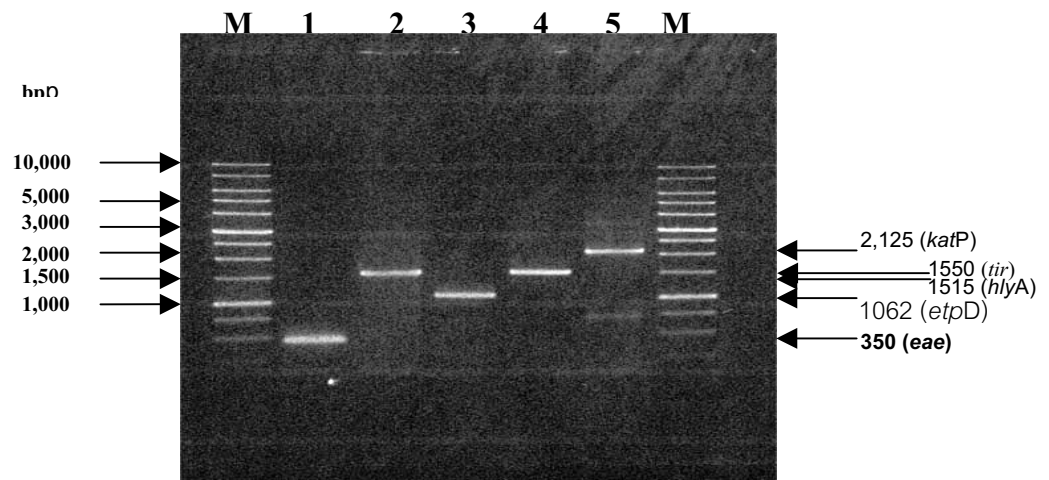
M, DNA markers

Pos, Positive control (*O*157 amplicon at 457 bp, and *stx*-1 and *stx*-2 amplicons at 349 and 110 bp, respectively)

Lanes 1-4, 6, 9-11, positive *stx*-1 and *stx*-2 (stx^{1+} , stx^{2+})

Lanes 5 and 8, positive *stx*-2 only (stx^{1-} , stx^{2+})

Lane 7, positive *O*157 (stx^{1-2-} , *O*157)



รูปที่ 2.15 **The representative amplicons of STEC virulence genes on 0.8% agarose gel electrophoresis**

M, 1 kb marker; Lane 1, the 350 bp amplicon of *eae* gene; Lane 2, the 1,550 bp amplicon of *tir* gene; Lane 3, the 1,062 bp amplicon of *etpD* gene; Lane 4, the 1,515 bp amplicon of *hlyA* gene; Lane 5, the 2,125 bp amplicon of *katP* gene

Numbers at the left are sizes of DNA in basepairs

ตารางที่ 2.8 The overall results of plasmid profiles

Profile	Number positive (%)	Number of plasmid (s)	Plasmid size (kb)
1	1 (2.04)	5	9,7.5, 7, 1.4, 1
2	5 (10.20)	8	9, 8, 7.5, 7, 5, 4.5, 1.4, 1
3	1 (2.04)	1	5
4	2 (4.08)	2	5 , 2.5
5	3 (6.12)	2	9, 8
6	17 (34.69)	1	9
7	7 (14.29)	2	8, 4.5
8	2 (4.08)	2	8, 5
9	8 (16.33)	4	8, 5.5, 5, 4
No plasmid	3 (6.12)	0	-

ตารางที่ 2.9 Overall results of ERIC-PCR

Profile	Number(%)	Number of band (s)	DNA fragments size (kb)
1	26 (53.07)	3	1.2, 0.25, 0.1
2	2 (4.08)	4	1.2, 1, 0.2, 0.1
3	1 (2.04)	6	2, 1.2, 0.7, 0.35, 0.2, 0.1
4	2 (4.08)	3	1, 0.2, 0.1
5	1 (2.04)	4	1.2, 0.5, 0.2, 0.1
6	1 (2.04)	3	1.2, 0.3, 0.1
7	1 (2.04)	5	2.5, 1, 0.35, 0.2, 0.1
8	1 (2.04)	3	1.2, 0.2, 0.1
9	5 (10.21)	3	0.7, 0.2, 0.1
10	2 (4.08)	6	2.5, 1.5, 1.2, 0.3, 0.2, 0.1
11	4 (8.16)	4	2.5, 1, 0.2, 0.1
12	1 (2.04)	5	2.5, 1.2, 1, 0.2, 0.1
13	1 (2.04)	4	1.2, 0.3, 0.2, 0.1
14	1 (2.04)	4	1.2, 0.25, 0.2, 0.1
Total	49 (100)		

References

- Acheson DWK. Nomenclature of enterotoxins. *Lancet* 1998; 351: 1003.
- Barrett TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM. Laboratory investigation of a multistage food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 3013-7.
- Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barrett TJ, Wells JG, Baron R, Kobayashi J. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the Washington experience. *JAMA* 1994; 272: 1349-53.
- Bettelheim KA, Brown JE, Lolekha S, Echeverria P. Serotypes of *Escherichia coli* that hybridized with DNA probes for genes encoding Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and serogroup O157 enterohemorrhagic *E. coli* fimbriae isolated from adults with diarrhea in Thailand. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 293-5.
- Bettelheim KA, Thompson CJA. New method of serotyping *Escherichia coli*: implementation and verification. *J Clin Microbiol* 1987; 25(5): 781-786.
- Boyce TG, Swerdlow DL, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 364-8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Brown JE, Echeverria P, Taylor DN, Seriwatana J, Vanapruks V, Lexomboon U, Neill RN, Newland JW. Determination by DNA hybridization of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Thailand. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 291-294.
- Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 248-50.

- Chaicumpa W, Thin-inta W, Khusmith S, Tapchaisri P, Echeverria P, Kalambaheti T, Chongsa-nguan M. Detection with monoclonal antibody of *Salmonella typhi* antigen 9 in specimens from patients. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1824-30.
- Chaicumpa W, Chongsa-nguan M, Kalambaheti T, Wilairatana P, Srimanote P, Mahakunkijcharoen Y, Looareesuwan S, Sakolvaree Y. Immunogenicity of liposome-associated and refined antigen oral cholera vaccines in Thai volunteers. *Vaccine* 1998a; 16: 678-84.
- Chaicumpa W, Srimanote P, Sakolvaree Y, Kalambaheti T, Chongsa-nguan M, Tapchaisri P, Eampokalap B, Moolasart P, Nair GB, Echeverria P. Rapid diagnosis of cholera caused by *Vibrio cholerae* O139. *J Clin Microbiol* 1998b; 36: 3595-600.
- Chandler ME, Bettelheim KA. A rapid method of identifying *Escherichia coli* H antigens. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Avt Orig*, 1974; A229: 74-9.
- Chapman PA. Isolation, identification, and typing of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. *PHLS Microbiology Digest* 1994; 11: 13-17.
- Chapman PA, Siddons CA, Zadik PM, Jewes L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1991; 35: 107-10.
- Chongsa-nguan M, Nair GB, Ramamurthy T, Yamasaki S, Chaisri U, Tongtawe P, Tapchaisri P, Sakolvaree Y, Mahakunkijcharoen Y, Kurazono H, Hayashi H, Takeda Y, Chaicumpa W. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolation from cattle in Bangkok. *Abstracts of The Fourth International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-producing Escherichia coli*, 2000; Abstract # 107, Kyoto, Japan.
- Clement JD, Finkelstein RA. Immunological cross-reactivity between heat-labile enterotoxin(s) of *Escherichia coli* and subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Infect Immun* 1978; 21: 1036-9.
- Cubbon MD, Coia JE, Hanson MF, Thomson-Carter FM. A comparison of immunomagnetic separation, direct culture and polymerase chain reaction for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in human faeces. *J Med Microbiol* 1996; 44: 219-22.

- Datz M, Janetzki-Mittmann C, Franke S, Gunzer F, Schmidt H, Karch H. Analysis of the EHEC O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and Shiga-like toxin structural genes. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 791-7.
- Fitzpatrick M. Hemolytic uremic syndrome and *E. coli* O157. *BMJ* 1999; 318: 684-5.
- Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2188-91.
- Galfre G, Howe SC, Milstein C, Butcher GW, Howard JC. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 1977; 266: 550-2.
- Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 656-662.
- Gentry MK, Dalrymple JM. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 361-6.
- Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infection caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 60-98.
- Hedemashi J, *et al.* Molecular typing of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 isolates in Japan by using PFGE. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1675-80.
- Hii JH, Gyles C, Morooka T, Karmali MA, Clarke R, DeGrandis S, Brunton JL. Development of Verotoxin 2 and Verotoxin 2 variant (VT2v)-specific oligonucleotide probes on the basis of the nucleotide sequence of the B cistron of *vt2v* from *Escherichia coli* E32511 and B2F1. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2704-9.
- Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7839-43.

- Karmali MA, Petric M, Bielaszewska M. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxin) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 396-9.
- Karmali MA, Petric M, Steele BT. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983; i: 619-20.
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Plerning PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151: 775-82.
- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1977; 18: 775-9.
- Kurazono H, Sasakawa C, Yoshikawa M, Tekeda Y. Cloning of a Vero toxin (VT1, Shiga-like toxin 1) gene from a *vt1*-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 44: 23-6.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- Le Saux N, Spika JS, Friesen B, Johnson L, Melnychuk D, Anderson C, Dion R, Rahman M, Tostowarky W. Ground beef consumption in non-commercial settings is a risk factor for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection in Canada. *J Infect Dis* 1993; 167: 500-2.
- Levine MM, Xu JG, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H, Wachsmuth K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotype that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 1987; 156: 175-182.
- Louie M, de Azavedo J, Clarke R, Borczyk A, Lior H, Richter M, Brunton J. Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of Verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol Infect* 1994; 112: 449-61.
- Martin A P, Wendy J, Rasik K, Alexander B. Epidemiologic subtyping of *E. coli* serogroup O157 strains isolate in Ontario by phage typing and PFGE. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2366-8.

- McQuigge M, Ellis A, Stratton J, Aramini J, Middleton D, Jamieson F, Ciebin B, Majowicz S, Middleton B, Patterson D, Paton J. A large outbreak of *E. coli* O157:H7 and *Campylobacter* infections due to contaminated municipal drinking water. *The Fourth International Symposium and Workshop on Shiga-Toxin (Verocytotoxin) - Producing Escherichia coli Infections*. Oct. 29- Nov. 2, 2000, Kyoto, Japan.
- Meng J, Zhao S, Zhao T, Doyle MP. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157: H7 isolates by pulse-field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis. *J Med Microbiol* 1995; 42: 258-63.
- Mogbal NE, Ferreira MAS, Howie AJ, Milford DV, Raafat F, Taylor CM. The late histologic findings in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *J Pediatr* 1998; 133: 220-3.
- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud, F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 995-8.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Micro Rev* 1998; 11: 142-201.
- Newland JW, Neill RJ. DNA probes for Shiga-like toxin I and II and for toxin-converting bacteriophages. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1292-7.
- Pal A, Ghosh S, Ramamurthy T, Yamasaki S, Tsukamoto T, Bhattacharya SK, Nair GB, Takeda Y. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta India. *Indian J Med Res* 1999; 110: 83-85.
- Paton AW, Paton JC, Goldwater PN, Manning PA. Direct detection of *Escherichia coli* shiga-like toxin genes in primary fecal cultures using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3063-7.
- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assay for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb* O157. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 598-602.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-7.

- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl J Med* 1983; 308: 681-5.
- Ro O, Sunao I, Shu-ichi N, Akimito W, Shiro Y, Haruo W. Genotypic variations of Shiga toxin-converting phage from enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 isolates. *J Med Microbiol* 2000; 49: 565-74.
- Schmidt H, Karch H, Beutin L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 117: 189-96.
- Schmidt H, Geitz C, Tarr PI, Frosch M, Karch H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genotypic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis* 1999; 179: 115-23.
- Smith HR, Scotland SM. Isolation and identification methods for *Escherichia coli* O157 and other Verocytotoxin-producing strains. *J Clin Pathol* 1993; 46: 10-7.
- Suthienkul O, Brown JE, Seriwatana J, Tienthongdee S, Sastravaha S, Echeverria P. Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. *Appl Environ Microbiol* 1990; 53: 2394-6.
- Takeda Y, Kurazono H, Yamasaki S. Vero toxins (Shiga-like toxins) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (Verocytotoxin-producing *E. coli*). *Microbiol Immunol* 1993; 37: 591-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4.
- Udo K, Fiona M, Thomsan C, Pennington TH. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by PFGE and comparison with that by bacteriophage typing. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 959-61.

- Uesaka Y, Otsuka Y, Lin Z, Yamasaki S, Yamaoka J, Kurazono H, Takeda Y. Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin using immobilized galactose. *Microb Pathog* 1994; 16: 71-6.
- Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides; extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbo Chem* 1965; 5: 83-91.
- Willshaw GA, Smith HR, Scotland SM, Field AM, Rowe B. Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding Verocytotoxins: comparison of cloned sequences determinating VT1 and VT2 and development of specific gene probes. *J Clin Microbiol* 1987; 133: 1309-17.
- WHO. Manual of national workshop on transfer of appropriate technology for diagnosis and surveillance of shigellosis (Myanmar, Thailand, Nepal, Sri Lanka, Bangladesh). *South East Asia Regional Office, Bangkok* 1989.
- Yutsudo T, Kurazono H, Sasakawa C, Yoshikawa M, Iwaya M, Takeda T, Takeda Y. Cloning of a Vero toxin (VT2) gene from a *vt2*-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 1987a; 48: 273-276.
- Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y. Purification and some properties of a Vero toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. *Microb Pathog* 1987b; 3: 21-30.
- Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 1993; 39: 155-8.

โครงการย่อยที่ 3

**การเตรียมส่วนประกอบของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิดกิน
และทดสอบประสิทธิภาพของแอดจูแวนท์ชนิดใหม่**

**(Preparation of Oral Cholera Vaccine Component and Efficacy
Testing of New Vaccine Adjuvant)**

โครงการย่อยที่ 3 ส่วนที่ 1

การผลิต *V. cholerae* O1 Toxin co-regulated pili (Tcp) โดยพันธุวิศวกรรมเพื่อเตรียม fimbriae (pilin) ปริมาณมากสำหรับใช้เป็น oral cholera vaccine component

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียม probe จาก *V. cholerae* classical biotype, Inaba serotype

Nucleotide sequence ของ pilin subunit (*tcpA*; toxin co-regulated pilus) ได้มาจาก gene bank database; accession number M33514 Oligo primers 1 คู่ ได้เลือกมาเพื่อการสร้าง PCR product ขนาดประมาณ 500 bp ซึ่ง PCR product นี้นำไปใช้ในการเตรียม PCR probe โดยขั้นตอนการเตรียมจะใส่ DIG labelling ลงใน master mix และ PCR probe นี้จะนำไปใช้ในการ screening genomic DNA library ต่อไป

การออกแบบ PCR primers

tcpA DNA

					position
AAAAAATAAA	AAACACAGCA	AAAATGACAT	CTGTCAATTG	TAGGTGACTT	50
TGTGTGGTTA	AATGTGCGTG	TTGCTTACGT	TATCTAAAAA	AGACCAAGCG	100
ACGCATTCT	TTAAAGACAG	TAAAATGGTG	GAGTTACATA	AATATGCAAT	150
TATTAACAACA	GCTTTTAAAG	AAGAAATTTG	TAAAAGAAGA	ACACGATAAG	200
AAAACCGGTC	AAGAGGGTAT	GACATTACTC	GAAGTGATCA	TCGTTCTAGG	250
<u>CATTATGGGG</u>	<u>GTGGTTTCGG</u>	CGGGGGTTGT	TACTCTGGCG	CAGCGTGCGA	300
TTGATTGCGA	GATTATGACC	AAGGCCGCGC	AAAGTCTCAA	TAGTATCCAA	350
GTTGCACTGA	CACAGACATA	CCGTGGTCTA	GGTAATTATC	CAGCAACAGC	400
TGATGCGACA	GCTGCTAGTA	AGCTAACTTC	AGGCTTGGTT	AGTTTAGGTA	450
AAATATCATC	CGATGAGGCA	AAAAACCCAT	TCAATGGTAC	AAATATGAAT	500
ATTTTTTCAT	TTCCGCGTAA	TGCAGCAGCT	AATAAAGCAT	TTGCAATTTC	550
AGTGGATGGT	CTGACACAGG	CTCAATGCAA	GACACTTATT	ACCAAGTTCG	600
GTGATATGTT	CCCATATATT	GCAATCAAAG	CTGGTGGCGC	AGTAGCACTT	650
GCAGATCTAG	GTGATTTTGA	GAATTCTGCA	GCAGCGGCTG	AGACAGGCGT	700
TGGTGTGATC	<u>AAATCTATCG</u>	<u>CTCCCGCTAG</u>	TAAGAATTTA	GA TCTAACGA	750
ACATCACTCA	CGTTGAGAAA	TTATGTAAAG	GTACTGCTCC	ATTCGGCGTT	800
GCATTTGGTA	ACAGCTAATT	CAAATAAGTT	TGTTAACTT	AATCTTAACG	850
TTGCCCATTA	AATAATGGGC	AACTTATTAA	ATTCAATGTG	GTATCAATAT	850
GAGAAAATAC	CAACAAGGTG	TCGGATTATT	GGAGGCGATT	CTGGCTTCTG	900
CGTATTAGGG	ATGGCATTGG	TCGCTGCTGG	GAGCTATTAC	AAGCGGGAAG	1000
CTGAACATCAT	GATTAAATCC	AGTAACGCAT	TTGATGTTAT	TGAGTTGT	1050

P-1 forward primer design from position 253 to 271

5'..... TTA TGG GGG TGG TTT CGG3'

P-2 Reverse primer design from position 713 to 731 in the reverse complement view

5'..... GCG GGA GCG ATA GAT TTG3'

ขนาดของ PCR product คือ 475 bp

การเตรียม DIG-labeling PCR probe

ในการศึกษาครั้งนี้ DNA probe ที่ใช้ในกระบวนการ Southern hybridization และ colony hybridization สร้างขึ้นโดยวิธี PCR จาก oligo primers ที่ออกแบบไว้ข้างต้น และ genomic DNA จาก *V. cholerae*, classical biotype strain 569B จะสังเกตว่า gene *tcpA* ที่นำมาศึกษาและออกแบบ primer เป็นของ classical biotype จึงได้ใช้ genomic DNA จาก strain 569B ซึ่งเป็น classical biotype เช่นเดียวกันมาเป็น template ได้เคยทดลองใช้ genomic DNA จาก strain O17SR EI Tor biotype เป็น template แต่คู่ oligo primers ที่เลือกไว้ไม่สามารถ amplify O17SR ได้ แสดงว่าลำดับ nucleotide sequence ของ *tcpA* จาก *V. cholerae* ทั้งสอง biotypes นั้นมีความแตกต่างกัน

ปฏิกิริยา PCR เพื่อการเตรียม probe มีส่วนประกอบดังนี้

2.5	μl	2mM dNTPs
2.5	μl	10 × <i>Taq</i> buffer
0.5	μl	10 × DIG labeling nucleotide (DIG-dUTP) (Roche)
1.0	μl	primer I
1.0	μl	primer II
17.25	μl	DW
0.25	μl	<i>Taq</i> polymerase enzyme
25.0	μl	total volume

Amplification cycle จะทำซ้ำ 35 รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วย

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 1 นาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55°C	เป็นเวลา 1 นาที
Extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 1 นาที

PCR product ที่ได้นำไปแยกโดย agarose gel electrophoresis แล้วตัด PCR product ออกจาก gel และนำไปละลายใน hybridization buffer ให้ได้ความเข้มข้นของ DNA ประมาณ 50-100 ng/ml

2. Southern hybridization ของ PCR probe ที่สร้างจาก *tcpA* *V. cholerae* ของ classical biotype

นำ Genomic DNA จาก *V. cholerae* ทั้ง classical และ EI Tor biotypes ไปย่อยด้วย restriction enzyme ต่าง ๆ ซึ่งมีอยู่ใน multiple cloning sites ของ plasmid vector pBluescript II KS ดังนี้; *Bam*HI, *Cl*al, *H*incII, *H*indIII, *E*coRI, *E*coRV, *X*baI แล้วจึงนำ genomic DNA เหล่านี้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel และทำการ transfer DNA ไปยัง nylon membrane โดยวิธี capillary transfer ตามวิธีที่รายงานโดย Southern *et al.* (1975) ผลจากการทดลองนี้ทำให้เราทราบขนาดและชนิดของ restriction enzyme-fragments ของ DNA ที่ gene *tcpA* ตั้งอยู่ เมื่อเลือกได้ว่าจะ

clone ชิ้นส่วน DNA ชนิดใด จะได้สร้าง genomic library ของชิ้นส่วน DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme ชนิดนั้น ๆ

จากรูปที่ 3.1 ชิ้นส่วน DNA จาก *V. cholerae* El Tor biotype strain O17SR ที่ตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I และ *Hinc*II มีขนาดประมาณ 4.5 kb อันเป็นขนาดที่เหมาะสมในการโคลน ในที่นี้ได้เลือกทำการโคลน *Cla*I-DNA เนื่องจาก *Cla*I เมื่อย่อย DNA จะได้ชิ้นส่วนที่เป็น sticky end ซึ่งจะง่ายในการโคลน ในขณะที่ *Hinc*II จะได้ชิ้นส่วน DNA ที่เป็น blunt end ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการ ligation ของชิ้นส่วนเหล่านี้ไม่ดีเท่าที่ควร จากผล Southern hybridization เหล่านี้ จึงได้เลือกที่จะโคลน ชิ้นส่วน DNA ซึ่งได้จากการที่ตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I

ข้อสังเกตจากผล Southern hybridization คือ probe ที่สร้างขึ้นจาก *V. cholerae* Classical biotype สามารถที่จะ hybridize ต่อ El Tor biotype แสดงว่า *tcpA* ของทั้งสอง biotypes มีความคล้ายคลึงกัน แม้ว่าจะไม่ identical แต่ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะโคลน *tcp* จาก El Tor biotype, Ogawa serotype ซึ่งได้มีรายงานการระบาดในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา

3. การสร้าง library ของชิ้นส่วน genomic DNA ของ *V. cholerae* El Tor biotype, strain O17SR ที่ตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I

เตรียม Genomic DNA จาก *V. cholerae* O17SR จากเชื้อที่เลี้ยงใน liquid medium เป็นเวลา 18-24 ชม. โดยวิธี CTAB precipitation ซึ่งรายงานโดย Ausubel *et al.* (1993) แล้วนำ genomic DNA ที่ได้ไปตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I เป็นเวลา 24 ชม. ต่อจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ enzyme โดยนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที

เตรียม DNA จาก plasmid pBluescript II KS โดยวิธีซึ่งรายงานโดย Birnboim *et al.* (1979) แล้วนำ plasmid DNA ไปตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I เป็นเวลา 24 ชม. แล้วกำจัดโมเลกุล PO₄ ส่วนปลายของสาย DNA ออก โดยให้ทำปฏิกิริยากับ calf intestine alkaline phosphatase 1 unit ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นกำจัด alkaline phosphatase enzyme ออกจาก DNA โดยสกัดด้วยสารละลาย phenol ปริมาตรเท่าตัวของ DNA แล้วจึงใช้สารละลาย chloroform ปริมาตรเท่าตัว สกัดสาร phenol ที่หลงเหลืออยู่ในสารละลาย DNA ต่อจากนั้นจึงตกตะกอน DNA โดยวิธี ethanol precipitation โดยการใส่ 3 M sodium acetate, pH 4.6 ในปริมาตร 1/10 ของสารละลาย DNA และใส่ absolute ethanol ในปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลาย DNA ต่อมาจึงปั่นตะกอน DNA ใน microcentrifuge ที่ 13,000 × *g* เป็นเวลา 15 นาที หลังจากล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol แล้วจึงทำให้แห้ง และละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 20-40 µl

ปฏิกิริยา ligation เพื่อเชื่อมต่อ plasmid DNA กับ genomic DNA ข้างต้นของ *V. cholerae* O17SR ทำโดยใช้ enzyme T4 DNA ligase (Roche) โดยใช้ plasmid vector ในปริมาณ 10 ng และ insert DNA ในสัดส่วน 1 : 3 (vector : insert) โดยใช้ enzyme 1-5 unit ในปริมาตร 20 µl และ

incubate ที่ 16°C เป็นเวลา 16-18 ชม. ต่อมานำ preparation ไปทำแห้งโดย vacuum centrifugation แล้วจึงล้าง DNA pellet ด้วย 70% ethanol ทำให้แห้งแล้วจึงละลายในน้ำกลั่น 20 µl ต่อมานำ preparation ปริมาตร 2 µl มาใช้ในกระบวนการ transformation ไปสู่ electrocompetent *E. coli* DH5α โดยใช้เครื่อง Electroporator EC-100 แล้วนำ *E. coli* cells ที่ถูก transform ไป recover ใน SOC medium โดยเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วจึงนำไป spread ใน LB agar ที่ประกอบด้วย 100 µg/ml Ampicillin และ 0.16 µg/ml X-gal. Library ที่มี DNA insert จะปรากฏเป็น colonies สีขาว และส่วน colony สีน้ำเงินซึ่งเป็นเซลล์ที่มีแต่ vector จากการทำการทดลองพบว่า มีสัดส่วนของ colony สีขาวมากกว่า 70% ซึ่ง library ที่ได้นำไปใช้ในกระบวนการ colony hybridization เพื่อการ screen หา clone ที่มี *tcpA*

4. Colony hybridization

วัสดุ สารเคมีและสารละลาย buffer ที่ใช้

Nitrocellulose membrane; diameter 82 mm (Whatmann)

Hybridization buffer

0.1% N-laurylsarcosine Na-salt

0.02% SDS

5% milk powder in 5 × SSC solution

Denaturation solution; 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl

Neutralization solution; 1.0 M Tris-HCl, pH 7.5; 1.5 M NaCl

2 × SSC buffer; 0.3 mM NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0

Proteinase K; 2 mg/ml Proteinase K in 2 × SSC buffer

Low stringency washing solution; 2 × SSC, 0.1% SDS

High stringency washing solution; 0.1 × SSC, 0.1% SDS

Anti-Digoxigenin-AP* (750 units/ml Anti-Digoxigenin, Fab fragments conjugated to alkaline phosphatase [Roche])

NBT solution (75 mg/ml nitroblue tetrazolium salt in 70% dimethylformamide [v/v])

BCIP solution (50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate [BCIP], toluidinium salt in 100% dimethylformamide)

Washing buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween-20 [v/v])

Blocking solution (5% skim milk in 100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5)

Detection buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5)

Colony lift

ทำการ spread *E. coli* cell library ลงบน LB agar plate โดยให้ได้จำนวน colonies ประมาณ 100-300 ต่อ plate หลังจาก incubate ข้ามคืนแล้วจึงใช้ nitrocellulose membrane disc (Whatmann เส้นผ่าศูนย์กลาง 82 mm) วางบนผิว LB agar เพื่อ transfer colony ไปยัง membrane ต่อจากนั้นนำแผ่น membrane ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย denaturation 5 นาที สารละลาย neutralization 15 นาที และสารละลาย $2 \times \text{SSC}$ 10 นาที โดยการนำกระดาษกรอง Whatmann 3 mm ไปทำให้เปียกด้วยสารละลายข้างต้นแล้ววางแผ่น membrane ลงบนกระดาษกรองนั้น ให้ colony อยู่ด้านบน ต่อจากนั้นจึงทำการกระบวนการ cross-linked DNA โดยนำไปอบใน vacuum oven ที่ 80°C เป็นเวลา 30 นาที

Proteinase K treatment

นำแผ่น membrane ที่อบแล้วนี้ไปทำให้เปียกด้วยสารละลาย $2 \times \text{SSC}$ แล้วใส่สารละลาย proteinase K (2 mg/ml) ปริมาตร 0.5 ml ลงบนแผ่น membrane และ incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. ต่อจากนั้นล้างเอา cell debris ออกด้วยสารละลาย $2 \times \text{SSC}$

Hybridization

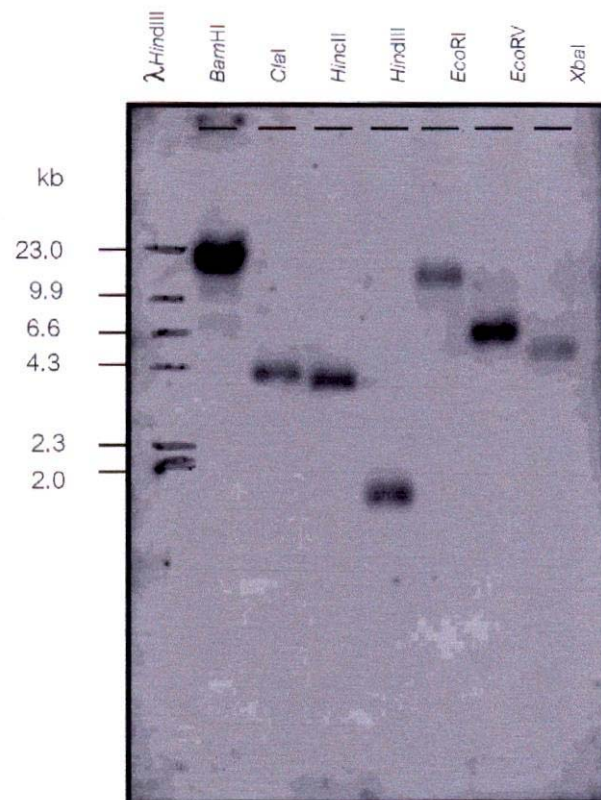
นำแผ่น membrane ไปทำ pre-hybridization โดย incubate กับ hybridization buffer ที่ 68°C เป็นเวลา 1-2 ชม. แล้วนำไป incubate กับ DIG-labeling PCR probe ที่ 68°C เป็นเวลา 16-18 ชม.

Stringency washes

หลังจากกระบวนการ hybridization นำแผ่น membrane ไปล้างด้วย low stringency washing solution ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วย high stringency washing solution ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 15 นาที อีก 2 ครั้ง

Colorimetric detection

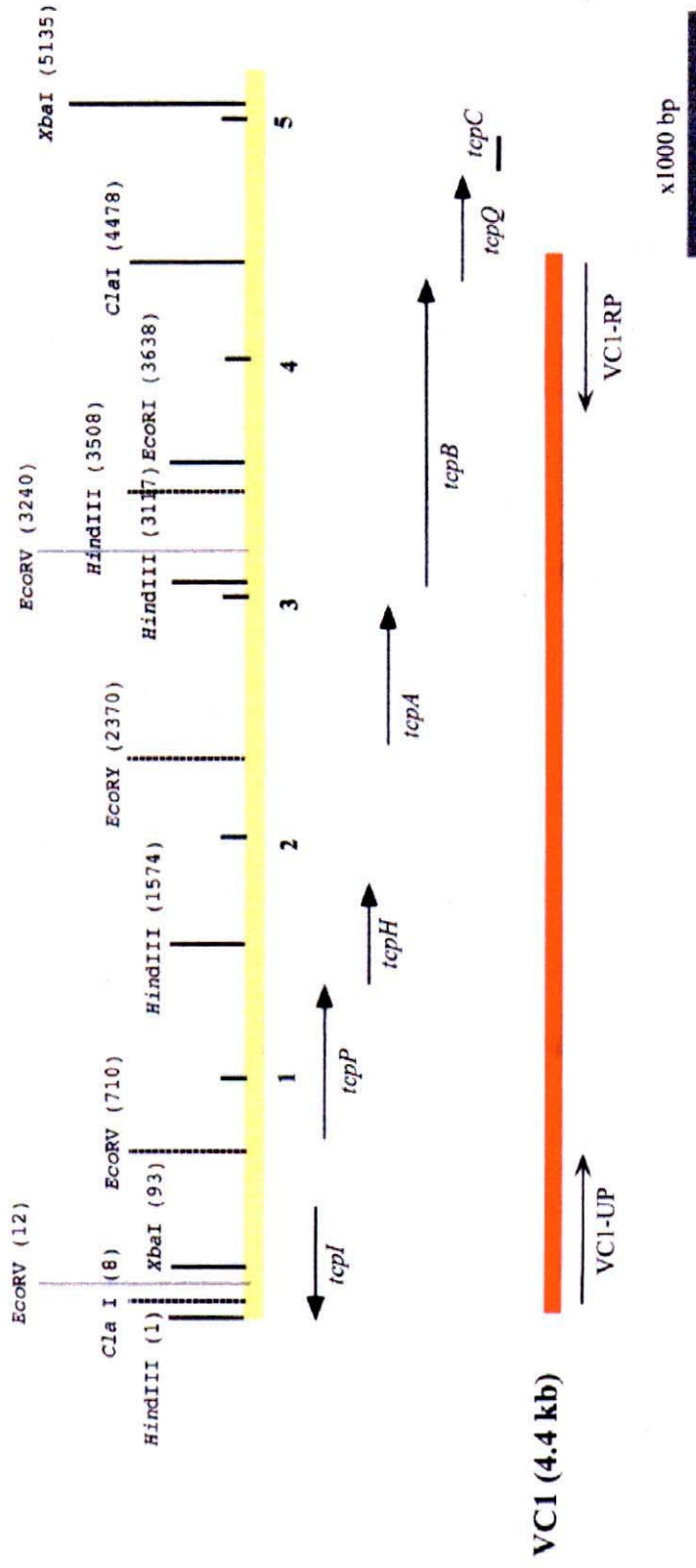
ล้างแผ่น membrane ด้วย buffer I แล้วนำไป incubate ใน blocking buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อมานำ membrane ไป incubate ในสารละลาย anti-dioxigenin-alkaline phosphatase ที่ความเจือจาง 1: 10,000 ใน blocking buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นล้าง membrane ด้วย washing buffer 2 ครั้ง และนำไปแช่ใน buffer III (detection buffer) ก่อนที่จะใส่ color substrate ซึ่งเตรียมโดยการผสม NBT solution ปริมาตร 45 μl และ BCIP solution ปริมาตร 35 μl ใน 10 ml buffer III แล้วนำไป run ใน gel electrophoresis membrane ในถุงพลาสติกและเก็บในที่มืดอย่างน้อย 12 ชม. แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น colony ที่ให้ผลบวกจะมีสีม่วง นำ colony เหล่านี้ไป inoculate ลงใน LB broth ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ผสมอยู่แล้วจึงนำ *E. coli* culture นี้ไปสกัดเอา plasmid เพื่อเป็นการยืนยันว่ามียีนส์ *tcpA* อยู่ใน clone ที่เลือกไว้จริง



รูปที่ 3.1

Results of Southern hybridization of PCR probe derived for *tcp* of *V. cholerae* classical biotype, Inaba serotype, strain 569B against some restriction enzyme-digested DNA of *V. cholerae* El Tor biotype strain O17SR.

The positions of *HindIII*-digested lambda DNA size markers (kb) are shown in the most left lane



รูปที่ 3.2 แสดงโครงสร้างของ *tcp* locus จาก *V. cholerae* El Tor biotype (accession no. X 74730)

Nucleotide sequence จาก clone VC1 จะ assembly กับ sequence ของ locus นี้ที่ตำแหน่ง *Cla*I site และขนาดของ insert ประมาณ 4.4 kb ขนาดเท่ากับข้อมูลจาก gene bank ดังแสดงในรูป