# การวิเคราะห์แอนติเจนของ *Pasteurella multocida* สายพันธุ์กลายพันธุ์

# โดย SDS-PAGE และ Western blot

นางสาว มาลัย เหลือมพล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-708-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17657735

# Antigenic Analysis of *Pasteurella multocida* Mutant Strains by SDS-PAGE and Western Blot

Miss Malai Luempol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-633-708-4

| | |
|---|---|
| Thesis title | Antigenic Analysis of *Pasteurella multocida* Mutant Strains by SDS-PAGE and Western Blot |
| By | Miss Malai Luempol |
| Department | Inter-Department of Medical Microbiology |
| Thesis Advisor | Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D. |
| Thesis Co-advisor | Instructor Kriengsag Saitanu, D.V.M, Ph.D. |

---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Santi Thoongsuwan
..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

Santi Thoongsuwan
..... Chairman

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Vimolmas Lipipun
..... Thesis Advisor

(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

Kriengsag Saitanu
..... Thesis Co-advisor

(Instructor Kriengsag Saitanu, D.V.M, Ph.D.)

Nikom Chaisiri
..... Member

(Associate Professor Nikom Chaisiri, Ph.D.)

มาลัย เหลือมพล : การวิเคราะห์แอนติเจนของ *Pasteurella multocida* สายพันธุ์กลายพันธุ์ โดย SDS-PAGE และ Western blot อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ. นสพ. ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู, 146 หน้า ISBN 974-633-708-4

การศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคและการป้องกันโรคในเป็ดต่อการ challenge ด้วยเชื้อ *Pasteurella multocida* สายพันธุ์ Pm-vac พบว่า เชื้อ *Pasteurella multocida* สายพันธุ์กลายพันธุ์ 2T35, 2/1U3, และ 1S24 มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ สายพันธุ์ 3T5, 2/1U2, และ 1S15 มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง สายพันธุ์ 2T35, 3T5, และ 2/1U2 มีความสามารถในการป้องกันโรคสูง และสายพันธุ์ 2/1U3, 1S15, และ 1S24 มีความสามารถในการป้องกันโรคต่ำ

การวิเคราะห์แอนติเจนโดยวิธี SDS-PAGE ของเชื้อสายพันธุ์ Pm-vac, 3005, 2T35, 2/1U2 และ 1S24 พบว่ามีรูปแบบของโปรตีน จากสารสกัดต่างๆ ที่คล้ายกัน โดยในสารสกัดจาก KSCN พบโปรตีนเหมือนกันในทุกสายพันธุ์ที่ 36, 38, 58, 60, 61, 63, 77 และ 80 kDa รูปแบบโปรตีนของสารสกัด capsule มีโปรตีนเหมือนกันในทุกสายพันธุ์ที่ 36, 38, 58, 60 และ 63 kDa และ โปรตีนของสารสกัด OMP พบโปรตีนเหมือนกันที่น้ำหนัก 29, 31, 38 และ 48 kDa เชื้อจากทุกสายพันธุ์ พบ LPS ที่น้ำหนัก 7 kDa

การตอบสนองของกระต่ายต่อแอนติเจนต่างๆของเชื้อ *P. multocida* ตรวจโดยวิธี ELISA พบว่ากระต่ายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ โดยตรวจพบแอนติบอดีในวันที่ 21 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรก ระดับแอนติบอดีไตเตอร์เพิ่มขึ้นถึง $10^3$-$10^6$ ในช่วงวันที่ 35-49 และเริ่มลดลงในช่วงวันที่ 70-90 ซึ่งระดับแอนติบอดีไตเตอร์อยู่ในระดับ $10^3$-$10^5$ แอนติเจนชนิด sonicated cell ของ Pm-vac 3005 และ 2T35 กระตุ้นกระต่ายให้มีการตอบสนอง และ มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าชนิด whole cell สารสกัดจาก KSCN ให้ผลเหมือนกับ สารสกัด capsule

การศึกษาถึงความจำเพาะของแอนติเจนในสารสกัดต่างๆต่ออิมมูนซีรั่มจากกระต่ายโดยวิธี Western blot พบว่า สารสกัดจาก KSCN สารสกัด capsule สารสกัด OMP และ สารสกัด LPS มีความแตกต่างโดยพบทั้ง strong และ weak reaction ของแอนติบอดีต่อแอนติเจน อิมมูนซีรั่มมีความจำเพาะ ต่อแอนติเจนต่างๆ ในสารสกัดที่ 7, 36, 38, 45, 48, 52, 55 and 77 kDa

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## C 645486 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD : ANTIGENIC ANALYSIS/ *PASTEURELLA MULTOCIDA*/ MUTANT STRAIN/ SDS-PAGE/ WESTERN BLOT

MALAI LUEMPOL : ANTIGENIC ANALYSIS OF *PASTEURELLA MULTOCIDA* MUTANT STRAINS BY SDS-PAGE AND WESTERN BLOT. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : INSTRUCTOR KRIENGSAG SAITANU, D.V.M., Ph.D. 146 pp. ISBN 974-633-708-4

The study of virulence and protective immunity in ducks against challenge with *P. multocida* strain Pm-vac showed that *P. multocida* mutant strains 2T35, 2/1U3 and 1S24 were low virulent, but 3T5, 2/1U2 and 1S15 were high virulent. *P. multocida* 2T35, 3T5 and 2/1U2 were high protection and 2/1U3, 1S15 and 1S24 were low protection.

Analysis of antigen extracts by SDS-PAGE of strains Pm-vac, 3005, 2T35, 2/1U2 and 1S24 revealed their differences in intensities and in major and minor protein patterns among antigen extracts and strains of *P. multocida*. The similar protein bands of their KSCN antigen extracts were observed at 36, 38, 58, 60, 61, 63, 77, and 80 kDa. Protein profiles of capsule were similar at 36, 38, 58, 60 and 63 kDa. Similar outer membrane proteins (OMP) at 29, 31, 38 and 48 kDa were observed. All strains expressed lipopolysaccharide (LPS) at 7 kDa.

The immune response of rabbit against various antigens of *P. multocida* were analyzed by ELISA. The antibody titers were detectable at day 21 after first immunization and had high antibody titers of $10^3$-$10^6$ at days 35-49. The titers were gradually decreased with times, but the titers of $10^3$-$10^5$ were still observed at days 70-90. The sonicated cells of Pm-vac, 3005, 2T35 produced higher antibody titers than that of whole cell antigen, KSCN antigen extract and capsule showed similar immune response.

The study of specificity of antigen extract to rabbit immune sera by western blot showed that KSCN antigen extract, capsule, OMP and LPS extract showed differences as strong and weak reactions. The immune sera recognized various antigens in each antigen extract at 7, 36, 38, 45, 48, 52, 55 and 77 kDa.

**ภาควิชา** สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ **ลายมือชื่อนิสิต** Malai Luempol

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาทางการแพทย์ **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา** Vimolmas Lipipun

**ปีการศึกษา** 2538 **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** Kriengsag Saitanu

# ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my esteem for my advisors, Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D., of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and Instructor Kriengsag Saitanu, D.V.M., Ph.D., of the Division of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University. Their expert advice, counsel, and encouragement assisted greatly in the thesis.

I would like to express my sincere appreciation for my thesis committee, Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D., Dean of Graduate School and associate Professor Nikom Chaisiri, Ph.D. of the Division of Biochemistry,Department of Physiology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, for their valuable suggestions, criticism and corrections of this thesis.

Special acknowledgement is sincerely due to Graduate School, Animal Vaccine Research Unit and Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

My appreciation also goes to all of those whose names have not been mentioned, for helping me whether directly or indirectly to make this work a reality.

Finally, my thesis would not be made possible without the excellent assistance and wholehearted support from my beloved friends and family. Many thanks to them all.

**CONTENTS**


PAGE

ABSTRACT (Thai)..... iv

ABSTRACT ( English)..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

TABLES..... viii

FIGURES..... x

ABBREVIATIONS..... xii

CHAPTER

I. INTRODUCTION..... 1

II. REVIEW OF THE RELEVANT LITERATURES..... 4

III. MATERIALS AND METHODS..... 23

IV. RESULTS..... 46

V. DISCUSSION..... 105

REFERENCES..... 117

APPENDIX..... 133

BIOGRAPHY..... 146

# LIST OF TABLES


| Tables | Page |
|---|---|
| 1. Differential characteristics of the species of the genus Pasteurella | 5 |
| 2. Early attempts at classification of *P. multocida* | 8 |
| 3. Current systems of classification of *P. multocida* | 10 |
| 4. Designation of serotypes of *P. multocida* by the Carter-Heddleston method | 11 |
| 5. Designation of serotypes of *P. multocida* by the Namioka-Carter method | 12 |
| 6. Mortality of ducks after intramuscular injections with parental strains and mutant strains of *P. multocida* and protection of ducks against challenge | 47 |
| 7. Mortality of ducks after intramuscular injections with strains of *P. multocida* | 48 |
| 8. Survival of ducks after challenge with *P. multocida* Pm-vac | 49 |
| 9. Protein concentrations of antigens of *P. multocida* parental and mutant strains | 52 |
| 10. Molecular weight of KSCN antigen extracts of *P. multocida* parental strains and mutant strains | 56 |
| 11. Molecular weight of capsule extracts of *P. multocida* parental strains and mutant strains | 57 |
| 12. Molecular weight of OMP extracts of *P. multocida* parental strains and mutant strains | 58 |

13. Molecular weight of LPS extracts of *P. multocida* parental strains and mutant strains 58

14. Antibody titer of rabbit immune sera against whole cells of *P. multocida* 69

15. Antibody titer of rabbit immune sera against sonicated cells of *P. multocida* 70

16. Antibody titer of rabbit immune sera against KSCN antigen extract and capsule extract of 2T35 71

# LIST OF FIGURES


| Figures | Page |
|---|---|
| 1. Standard curve for protein determinations | 51 |
| 2. SDS-PAGE analysis of KSCN antigen extract and capsule on 7.5% gels | 59 |
| 3. SDS-PAGE analysis of KSCN antigen extract and capsule on 10% gels | 60 |
| 4. SDS-PAGE analysis of KSCN antigen extract on 15% gels | 61 |
| 5. SDS-PAGE analysis of capsule extract on 15% gels | 62 |
| 6. SDS-PAGE analysis of OMP extract on 10% and 15% gels | 63 |
| 7. SDS-PAGE analysis of LPS extract on 15% gels | 64 |
| 8. Standard curve of molecular weight protein markers (31-200 kDa) | 65 |
| 9. Standard curve of molecular weight protein markers (6.5-200 kDa) | 66 |
| 10. Titration curve of rabbit immune serum against whole cell Pm-vac | 72 |
| 11. Titration curve of rabbit immune serum against whole cell 3005 | 73 |
| 12. Titration curve of rabbit immune serum against whole cell 2T35 | 74 |
| 13. Titration curve of rabbit immune serum against whole cell 1S24 | 75 |
| 14. Titration curve of rabbit immune serum against sonicated cell Pm-vac | 76 |
| 15. Titration curve of rabbit immune serum against sonicated cell 3005 | 77 |
| 16. Titration curve of rabbit immune serum against sonicated cell 2T35 | 78 |
| 17. Titration curve of rabbit immune serum against KSCN antigen extract 2T35 | 79 |
| 18. Titration curve of rabbit immune serum against capsule 2T35 | 80 |

19. Determination of antibody titer of rabbit immunized with whole cell Pm-vac 81

20. Determination of antibody titer of rabbit immunized with whole cell 3005 82

21. Determination of antibody titer of rabbit immunized with whole cell 2T35 83

22. Determination of antibody titer of rabbit immunized with whole cell 1S24 84

23. Determination of antibody titer of rabbit immunized with sonicated cell Pm-vac 85

24. Determination of antibody titer of rabbit immunized with sonicated cell 3005 86

25. Determination of antibody titer of rabbit immunized with sonicated cell 2T35 87

26. Determination of antibody titer of rabbit immunized with KSCN extract 2T35 88

27. Determination of antibody titer of rabbit immunized with capsule 2T35 89

28. Comparison of antibody titer of immune sera against antigens of Pm-vac 90

29. Comparison of antibody titer of immune sera against antigens of 3005 91

30. Comparison of antibody titer of immune sera against antigens of 2T35 92

31. Comparison of antibody titer of immune sera against antigens of 2T35 93

32. Western blot analysis of KSCN antigen extract of Pm-vac with immune sera 97

33. Western blot analysis of KSCN antigen extract of 2T35 with immune sera 98

34. Western blot analysis of capsule extract of Pm-vac with immune sera 99

35. Western blot analysis of capsule extract of 2T35 with immune sera 100

36. Western blot analysis of OMP extract of Pm-vac with immune sera 101

37. Western blot analysis of OMP extract of 2T35 with immune sera 102

38. Western blot analysis of LPS extract of Pm-vac with immune sera 103

39. Western blot analysis of LPS extract of 2T35 with immune sera 104

## ABBREVIATIONS

| | |
|---|---|
| BHI | Brain heart infusion |
| BSA | Bovine serum albumin |
| °c | Degree(s) celsius |
| cm | Centrimeter |
| EDTA | Ethylenediamine tetra acetic acid |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| gm | Gram |
| g | Gravity |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| hr | Hour(s) |
| Ig | Immunoglobulin |
| IM | Intramuscular |
| IV | Intravenous |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogram |
| KSCN | Potassium thiocyanate |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| µ | Micron |
| µg | Microgram |

| | |
|---|---|
| µl | Microliter |
| M | Molar |
| mA | Milliampare |
| mg | Milligram |
| ml | Milliliter |
| min | Minute |
| MW | Molecular weight |
| NSS | Normal saline solution |
| OD | Optical density |
| OMP | Outer membrane protein |
| OPD | o-Phenylenediamine |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| PBS-T | Phosphate buffer saline with Tween 20 |
| % | Percent |
| SC | Subcutaneous |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| TAE | Tris acetate ethylenediamine tetra acetic acid |
| TBA | Tryptose blood agar |
| TBS | Tris buffer saline |
| TEMED | N,N,N′,N′- tetra methylethylenediamine |
| V | Voltage |