การวิเคราะห์แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธีอิมมูโนบล็อตติ้ง

นางสาวจันทนา เมฆสีประหลาด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2532

ISBN 974-576-791-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015961
I17498818

IMMUNOBLOTTING ANALYSIS OF LEPTOSPIRAL ANTIGEN

Ms. Chantana Mekseepralard

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

1989

ISBN 974-576-791-3

Thesis Title	Immunoblotting Analysis OF Leptospiral Antigen
By	Ms. Chantana Mekseepralard
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D.
Co-Advisor	Instructor Pakathip Reynolds, M.Sc.

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

Thavorn Vajrabhaya Dean of the Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis committee:

Prakitsin Sihanonth Chairman

(Associate Professor Prakitsin Sihanonth, Ph.D.)

Reutai Sakulramrung Thesis Advisor

(Associate Professor Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D.

Pakathip Reynolds Co-Advisor

(Instructor Pakathip Reynolds, M.Sc.)

Visith Sitprija Member

(Professor Visith Sitprija, M.D., Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University.

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จันทนา เมฆสีประหลาด : การวิเคราะห์แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธีอิมมูโนบล็อตติ้ง (IMMUNOBLOTTING ANALYSIS OF LEPTOSPIRAL ANTIGEN) อ.ที่ปรึกษา : รศ. พ.ญ. ฤทัย สกุลแรมรุ่ง, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ผกาทิพย์ เรโนลด์, 98 หน้า. ISBN 974-576-791-3

การวิเคราะห์ sonic extract ของเชื้อเลปโตสไปรา 4 ซีโรวาร์ ได้แก่ ซีโรวาร์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค คือ Leptospira biflexa serovar patoc กับซีโรวาร์ที่ก่อให้เกิดโรคซึ่งตรวจพบในผู้ป่วยมากที่สุด 3 ซีโรวาร์ (ได้แก่ L. interrogans serovar bataviae, autumnalis and icterohaemorrhagiae) ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ประกอบด้วยโปรตีนจำนวนมากมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 25-90 กิโลดาลตัน

Sonic extract เหล่านี้ สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราซีโรวาร์ต่าง ๆ ได้ และจากการทำอิมมูโนบล็อตด้วยแอนติบอดีที่สร้างจากกระต่ายพบ Common antigen หลาย bands มีน้ำหนักโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน และ 33-34 หรือ 32-33 กิโลดาลตัน ในกลุ่ม nonpathogenic และ pathogenic leptospira ตามลำดับ Specific antigen ที่พบได้เฉพาะใน L. biflexa serovar patoc คือ แอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 52 และ 46 กิโลดาลตัน ส่วนแอนติเจนที่ 45, 41 และ 30 กิโลดาลตัน พบได้เฉพาะใน L. interrogans ผลการวิเคราะห์ด้วยน้ำเหลืองผู้ป่วยที่ติดเชื้อ L. interrogans serovar bataviae หรือ autumnalis หรือ icterohaemorrhagiae แสดงให้เห็นว่า specific antigen ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน พบได้เฉพาะในเชื้อกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคและที่มีน้ำหนักโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน เป็น common antigen ของเชื้อเลปโตสไปรา ทั้งนี้ น้ำเหลืองผู้ป่วยโรคซิฟิลิสสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ common antigen นี้ได้

Specific pathogenic leptospiral antigen น่าจะมีความสำคัญเป็นประโยชน์ในการแยก pathogenic leptospira ใช้เตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ specific pathogenic antigen และอิมมูโนบล็อตติ้งเป็นวิธีที่มีประโยชน์ซึ่งจะใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาหาวิธีตรวจต่าง ๆ เพื่อช่วยวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสให้รวดเร็วต่อไป

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีวิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต Chantana Meksupralard.
สาขาวิชา จุลชีวิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Rutai Sakulramrung

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHANTANA MEKSEEPRALARD : IMMUNOBLOTTING ANALYSIS OF LEPTOSPIRAL ANTIGEN. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. REUTAI SAKULRAMRUNG, M.D., Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : INSTRUCTOR PAKATHIP REYNOLDS, M.Sc. 98 PP. ISBN 974-576-791-3

Sonic extracts from four serovars, representative of three pathogenic Leptospira interrogans serovar bataviae, autumnalis and icterohaemorrhagiae; and one non-pathogenic L. biflexa serovar patoc were studied by SDS-PAGE and immunoblotting. A complex pattern of protein bands with molecular weights ranging from 25 to 90 kd was readily discernible for each serovar.

Immunoblotting with homologous and heterologous rabbit antisera against leptospira revealed a 60 kd common antigen on all serovars tested and a doublet band of 32-33 kd or 33-34 kd on L. interrogans or L. biflexa respectively. Two specific antigens at Mw of 52 and 46 kd were of L. biflexa whereas three specific pathogenic leptospiral antigens of Mw 45, 41 and 30 kd were of all interrogans. Immunostainning with homologous and heterologous patient's sera against each serovar of interrogans recognized a specific pathogenic leptospiral antigen at 30 kd and a 60 kd common antigen. However, this 60 kd common antigen in Leptospira cross-reacted with the serum from a syphilitic patient.

Specific pathogenic leptospiral antigens may play important role in the characterization of L. interrogans and the preparation of specific antibody. The immunoblotting technique is a valuable method for the development of further useful diagnostic tests in leptospirosis.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต Chantana Mekseepralard

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Reutai Sakulramrung

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Pakathip Reynolds

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere appreciation and gratitude to the following whose assistance have made the completion of this work possible.

Ass. Prof. Dr. Reutai Sakulramrung and Instructor Pakathip Reynolds of the Division of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisors, for their invaluable advice, constructive criticisms and strong encouragement throughout the course of this study.

Dr. Somatat Wongsawang, Associate Professor of the Division of Microbiology, Department of Pathology, and Dr. Nicom Chaisiri, Associate Professor of the Division of Biochemistry, Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for their guidance in the technic of electrophoresis and for the use of the Vertical Slab Gel Electrophoresis equipments.

Dr. Pornthep Tiensiwakul, Assistant Professor of Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for his helpful counsel in the method of electrotransfer and for the utilization of the Electrophoretic Transfer Cell.

Dr. Bruce L. Reynolds, of Adelaide University, for helping the preparation of the English manuscript.

Mr. Urai Potha, Bangkok Leptospirosis Centre, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for his generous supply of Leptospira strains and determination of leptospiral antibody.

Dr. Usanee Vongsthongsri, Assistant Professor of Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for the encouragement of the preparation of this manuscript.

Instructor Wilai Saksirisumpun, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for providing the sonicator.

Science Division, Thai Red Cross Society, Queen Saovabha Memorial Institute, for the service of the high speed centrifugation apparatus.

Many thanks to all staff and personnel in the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their reassurance and providing of facilities needed.

I am deeply indebted to my family for their moral support, patience and understanding.

Finally, I am grateful to the Graduate School, Chulalongkorn University and the Rachadapiseksompoj-China Medical Board Research Funds, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for funding of this research.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENT vi

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xii

ABBREVIATIONS xiv

OBJECTIVES xvi

CHAPTER

I. INTRODUCTION 1

II. LITERATURE REVIEW 5

2.1 History 5

2.2 Characteristic of *Leptospira* 6

2.3 Cultivation 9

2.4 Taxonomy 11

2.5 Leptospiral Antigens 12

2.5.1 Axial filament antigen 13

2.5.2 Outer envelope antigen 14

2.6 Infection and Epidemiology 15

2.7 Immunological Response 18

2.8 Laboratory Diagnosis 19

2.8.1 Isolation of Leptospirae 19

2.8.2 Serological Tests 21

Page

III. MATERIALS AND METHODS 26

3.1 Experimental Animals 26

3.2 Bacterial Strains 26

3.3 Preparation of Sonic Extracted Leptospiral Antigens 26

3.4 Determination of Protein Concentration 27

3.5 Preparation of Rabbit Anti-Leptospiral Antisera .. 28

3.6 Microscopic Agglutination Test for Determination of Leptospiral Antibody 29

3.7 Study Design 31

3.8 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) with the Discontinuous Buffer System of Laemmli 31

3.8.1 Sample Preparation 31

3.8.2 Preparation of Electorphoretic Gels 32

3.8.3 Electrophoresis 33

3.9 Immunoblotting 33

3.9.1 Preparation for Blotting 33

3.9.2 Electorphoretic Blotting 34

3.9.3 Immunoblotting 36

3.9.3.1 Immunostaining with Rabbit Anti-Leptospiral Antisera 36

3.9.3.2 Immunostaining with Human Antisera 37

3.10 Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining 38

3.11 India Ink Staining 39

3.12 Estimation of Molecular Weight by Relative Standard Molecular Weight Curve 39

Page

IV. RESULTS 40

4.1 Leptospiral Antibody Titer by Microscopic Agglutination Test 40

4.2 Leptospiral Protein Profiles on SDS-PAGE 42

4.3 Analysis of Sonic Extracted Leptospiral Antigens Immunoblotted against Homologous and Heterologous Rabbit Anti-Leptospiral Antisera 44

4.4 Analysis of Sonic Extracted Leptospiral Antigens Immunoblotted with Human Antisera against Pathogenic Leptospira 54

4.5 Cross-reactivity Between Sonic Extracted Leptospiral Antigens and Positive-TPHA Serum 60

V. DISCUSSION 64

Conclusion 68

REFERENCES 70

APPENDIX I 86

APPENDIX II 89

APPENDIX III 96

BIOGRAPHY 98

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	List of various serovars in *Leptospira* discovered on the world	8
2	Serological tests for determination of leptospiral antibodies	22
3	The protein concentration of sonic extracted leptospiral antigen by Lowry method	28
4	Summary of optimal conditions for immunostaining	38
5	Agglutinating activity of antileptospiral sera as measured by MAT	41
6	Summary of immunoblotting analysis of leptospiral antigens against rabbit anti-leptospiral antibodies	53
7	Summary of immunoblotting analysis of leptospiral antigens using human antiserum against pathogenic leptospira	62
8	Comparison of leptsopiral antigen profiles by immunoblotting using rabbit antisera and human antisera	63

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	End point Determination of MAT on a dilution plate ..	30
2	Assembly for electrophoretic blotting procedure	35
3	SDS-PAGE profiles of sonic extracted leptospiral antigens stained with Coomassie blue R-250	43
4	Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens with rabbit antiserum against *L. biflexa* serovar patoc	45
5	Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens with rabbit antiserum against *L. interrogans* serovar bataviae	47
6	Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens with rabbit antiserum against *L. interrogans* serovar autumnalis	48
7	Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens with rabbit antiserum against *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae	51
8	Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens with pooled normal rabbit sera	52
9	Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens using human antiserum against *L. interrogans* serovar bataviae	55
10	Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens using human antiserum against *L. interrogans* serovar autumnalis	57

Figure Page

11 Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens using human antiserum against *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae 58

12 Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens using pooled normal human sera 59

13 Immunoblotting of sonic extracted leptospiral antigens using positive-TPHA human serum 61

14 The standard curve of protein concentration ranging from 30-300 g of BSA is determined by Lowry method 96

15 The relative standard molecular weight curve 97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

BSA	=	Bovine serum albumin
°c	=	degree celsius
cm	=	Centrimetre
CMIR	=	Cell mediated immune response
CF	=	Complement fixation
Dil	=	Diluted
D. W.	=	Distilled water
EDTA	=	Ethylenediaminetetra-acetic acid
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
E.S.S.	=	Erythrocyte sensitizing substance
et al.	=	et alii
etc.	=	et cetera
g	=	gravity
gm	=	gram
h	=	hour
HA	=	Haemagglutination
IF	=	Immunofluorescent
Ig	=	Immunoglobulin
IgG	=	Immunoglobulin G
IgM	=	Immunoglobulin M
IHA	=	Indirect haemagglutination
IP	=	Immunoperoxidase
Kd	=	kilodalton
Kg	=	kilogram
LA	=	Latex agglutination

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

M	=	molarity
mA	=	milliampere
MAT	=	Microscopic agglutination test
mg	=	milligram
min	=	minutes
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
Mw	=	molecular weight
nm	=	nanometre
N.S.S.	=	Normal saline solution
OE	=	outer envelope
PBS	=	Phosphate buffer saline
PC	=	Protoplasmic cylinder
Rf	=	relative mobility
SDS-PAGE	=	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	=	N, N, N', N' - Tetramethylethylenediamine
TPHA	=	Treponema pallidum Haemagglutination Assay
μm	=	micrometre
V	=	volt
W/V	=	weight by volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBJECTIVE

1. To study the protein profiles of leptospiral antigen by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

2. To study the common antigen in Genus *Leptospira* and specific antigen in pathogenic leptospira by Immunoblotting.

3. Preliminary study of the antibody response against leptospiral infection in rabbit and human.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย