# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

(1 ธันวาคม 2537-30 พฤศจิกายน 2540)

การผลิตแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและการวิเคราะห์ Gene
ที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนเพื่อประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส

นายสุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน
หัวหน้าโครงการ

[redacted]

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

(1 ธันวาคม 2537-30 พฤศจิกายน 2540)

การผลิตแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและการวิเคราะห์ Gene
ที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนเพื่อประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส

นายสุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน
หัวหน้าโครงการ

วันที่ - 5 ต.ค. 2546
เลขทะเบียน 00261
เลขเรียกหนังสือ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม เทาเวอร์
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400
โทร. 298-0455 โทรสาร 298-0476
Home page : http://www.trf.or.th
E-mail : trf-info@trf.or.th

ห้องสมุด
สกว TRF

สัญญาเลขที่ RSA/21/2537

รายงานรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

---

**ชื่อโครงการ** : การผลิตแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและการวิเคราะห์ Gene ที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนเพื่อประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส

**ชื่อหัวหน้าโครงการ** นายสุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน

1. Executive Summary :

1.1 วัตถุประสงค์

1.1.1 ทำการสร้าง *B. pseudomallei* genomic libraries ใน *E. coli.* screen หา positive clone ที่สร้าง antigen ของเชื้อ *B. pseudomallei*

1.1.2 ทำการวิเคราะห์ clone ดังกล่าว โดยศึกษาหาลำดับเบสของ ดี เอ็น เอ ของ clone ที่ผลิตแอนติเจน เพื่อศึกษาหา promotor ของ gene ดังกล่าว ตลอดจนผลิตแอนติเจนให้ได้บริสุทธิ์และมากพอต่อการนำไปใช้งาน

1.2 ผลงานหรือกิจกรรมที่ทำได้จริง (อย่างย่อ)

ได้ทำการสร้าง *B. pseudomallei* genomic libraries ใน *E.coli* โดยใช้ enzyme *Xho I* มาตัด chromosomal DNA แล้ว clone เข้าไปใน XL-1 Blue *E.coli* โดยใช้ $pKS^-$ เป็น vector ผลปรากฏว่าให้ efficiency = $2x10^6$ cells/ug DNA (Transformed โดยใช้วิธีของ Hanahan.D.) แต่เนื่องจากผลการ check Blue/white พบว่า colony ส่วนใหญ่เป็น Blue colony ซึ่งแสดงถึงว่า colony ดังกล่าวไม่มี insert จึงได้ทำการ construct ใหม่โดยเปลี่ยน Enzyme เป็น *Sac II* ซึ่งสามารถตัด chromosome ของ *B.pseudomallei* ได้เป็นขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่ 1 kb-4 kb ซึ่งเหมาะแก่การ clone จึงได้ใช้ *Sac II* แทน และเมื่อทำการสร้าง libraries ได้พบว่าให้ efficiency = $5x10^6$ cells/ug DNA โดยมี white = $2x10^5$ cells/ug DNA เมื่อเอา libraries นี้มา screen ด้วย rabbit anti-crude *B.pseudomallei*, anti-CF (culture-filtrate Ag) และ anti-PCE (partially

purified cell extract antigen) และ anti-SOM (Somatic crude antigen) โดยใช้ swine anti-rabit-HRP และ alpha-4-chloro-naphtol เป็น secondary antibody และเป็น substrate ตามลำดับ หลังจาก screen ไปทั้งสิ้น 6,100 white colonies พบว่ามี positive clones อยู่ 20 clones แต่เมื่อนำ clones ดังกล่าวมาเลี้ยงเพื่อให้ expressed products โดย induce ด้วย IPIG แล้วจึงนำ protein ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot พบว่ามีเพียง clone เดียว (clone # 35) ให้ชื่อเรียกภายหลังว่า pKKU-SA35 เท่านั้นที่สร้างโปรตีนขนาดประมาณ 36.5 kDa ที่ทำปฏิกิริยากับ rabbit anti *B.pseudomallei* นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการสร้าง genomic libraries ใน *E. coli* โดยใช้ enzyme *Pst I* มาตัด chromosomal DNA แล้ว clones เข้าไปใน XL-1 Blue *E. coli* โดยใช้ pKS$^-$ เป็น Vector ผลปรากฏว่าเมื่อทำการ screen หา recombinant (white colonies) ได้ 2,000 colonies พบว่ามี positive clones อยู่เพียง 2 clones เท่านั้นที่เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western blot กับ rabbit anti *B. pseudomallei* แล้วให้ผล positive ให้ชื่อเรียก clones ดังกล่าวว่าเป็น pKKU-P18 และ pKKU-P3 จากการศึกษา characterize ของ clone ทั้งสาม โดยใช้ซีรัมจากผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส และโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่า clone pKKU-SA35 มีศักยภาพที่ดีที่สุดที่จะนำไปใช้ในการสร้าง specific antigen สำหรับการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ได้ทำการวิเคราะห์แอนติเจนที่ผลิตจาก positive clones ทั้งสามด้วยวิธี Western blot โดยใช้ซีรั่มจากผู้ป่วยเมลิออยโดสิส แล้วนำผลที่ได้ไปเทียบกับแอนติเจนที่เตรียมจาก culture-filtrated ของเชื้อแล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Dot immunoassay พบว่า แอนติเจนที่ผลิตจาก clone pKKU-SA35 ให้ sensitivity ในการ detection ของแอนติบอดีในผู้ป่วย septicenic melioidosis ได้ดีกว่า clone อื่น และดีกว่าแอนติเจนที่เตรียมจาก CF และใช้วิธี dot immunoassay และแอนติเจนที่ผลิตจาก clone pKKU-SA35 จะให้ specificity สูงกว่า clone อื่นและ CF Ag เช่นกัน (วิธี dot immunoassay ได้ตีพิมพ์แล้วในวารสาร Southeast Asian J. Trop.Med.Pub. ในปี 1996; 26: 329 - 334) ผู้วิจัยได้ศึกษาวิเคราะห์ clone ทั้งสาม โดยการทำ restriction map ของ insert ทั้งสาม clones และวิธี RFLP พบว่า clone pKKU-SA35 และ pKKU-P3 มี insert ที่มี map ใกล้เคียงกันมาก จึงได้ทำการวิเคราะห์เฉพาะ clone pKKU-SA35 และ pKKU-P18 ต่อไปโดยการนำ insert DNA ไปหาลำดับเบสด้วยวิธี Dideoxy chain termination ทั้งวิธี manual และ automate และได้ทราบลำดับเบสของ clone ทั้งสองไปบางส่วนแล้ว โดยทราบประมาณ clone ละ 1,000 b. นอกจากนี้ยังได้ทำการ subclone ทั้งสองโดยนำ insert ของ clone ทั้งสองไป subclone ลงไปในพาหะใหม่ (Vector) ที่มีชื่อเรียกว่า pGEX -5X -3 เพื่อต้องการให้สามารถแยกให้แอนติเจนที่ผลิตได้ให้บริสุทธิ์ โดย Vecfor pGEX -5X -3 นี้ จะมี tac promotor และมี GST (Glutathione -S-transferase) โดยแอนติเจนที่เราผลิตได้จะเป็น fusion

protein อยู่กับ GST แล้วจึงนำ fusion protein นี้แยกออกจากโปรตีนอื่น ๆ ของ *E. coli* ด้วยวิธี Affinity chromatography ในการทดลองครั้งนี้สามารถ subclone เอาชิ้น insert ของ pKKU-SA35 เข้าสู่ pGEX-5X-3 ได้ แต่โปรตีนที่ผลิตได้พบว่าเป็น inclusion body (precipetate) ไม่เป็น soluble จึงไม่สามารถที่จะแยกให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธี Affinity chromatography เพื่อให้การนำเอาแอนติเจนที่ผลิตได้จาก clone pKKU-SA35 ไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพ ตลอดจนโรคเมลิออยโดสิส เป็นโรคที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการระบาดของโรคหนอนพยาธิ์ชุกชุม ผู้วิจัยจึงได้นำแอนติเจนที่ผลิตจาก clone นี้ไปทดสอบกับ serum ผู้ป่วยจำนวน 24 รายที่เป็นโรคหนอน พยาธิ์ชนิดต่างๆ เช่น Opisthorchiasis, Hookworm, Strongiloides, Taenia, Ecchinococcosis และโรคติดเชื้อ minute fluke, พบว่าแอนติเจนจาก clone pKKU-SA35 ที่มีขนาดโมเลกุล 36.5 kDa ไม่มีปฏิกิริยาข้ามพวกกับ serum จากผู้ป่วยโรคหนอนพยาธิ์ดังกล่าวเลย ดังนั้น แอนติเจนดังกล่าวน่าจะมีศักยภาพที่ดีในการนำไปใช้เป็น immunodiagnostic antigen ต่อไป

เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสของ clone pKKU-SA35 มาวิเคราะห์เทียบกับ genes อื่น ๆ ใน Gen Bank โดยอาศัย program blast x โดย translate both strands ของ pKKU-SA35 sequence ใน 6 reading frames พบว่ามีความใกล้ เคียงกับ gene (วิเคราะห์ดูจากจุลชีพที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน) ของ *Xanthomonas campestris* ที่ควบคุมการสร้าง UDP-glucose dehydrogenase และ gene ของ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ควบคุมการสร้าง glycerol kinase

นอกจากนั้นแล้ว ผู้วิจัยยังได้พยายามจะผลิตแอนติเจนดังกล่าวให้มีปริมาณมากขึ้น โดยการเปลี่ยน Vector จาก pKS, pGEX มาเป็น pTrcHis ซึ่งมี Vector ทั้ง 3 reading frames เป็น A,B,C. ใช้ Trc promotor ซึ่ง protein ที่ได้จะเป็น fusion protein กับ series ของ six histidine residue ซึ่งสามารถใช้ในการ purification ได้ และมี enterokinase cleavage recognition sequence อยู่ตรงระหว่าง histidine กับ fusion protein จะทำให้สามารถ cleavage เอา fusion protein ออกได้หลังจากการ purification แต่เนื่องจาก Vector ดังกล่าวไม่มี multiple cloning sites ที่เป็น *Sac II* ซึ่ง เป็น enzyme ที่ใช้ในการ clone ของ gene ใน pKKU-SA35 จึงทำให้การ subclone เป็นไปได้ลำบาก ผู้วิจัยได้ purify insert จาก clone pKKU-SA35 ด้วย *Sac II* แล้วทำให้เป็น blunt end โดยใช้ T4 DNA polymerase หลังจากนั้น นำชิ้น insert ไป subclone เข้า pTrcHis ที่ตัดด้วย *Xho I* ที่ทำให้เป็น blunt end เช่นกันด้วย Klenow polymerase โดยทำทั้ง 3 Vector คือ A,B,C ผลปรากฏว่าได้ clone ที่มี insert แต่ไม่มีการ experssion ซึ่งทำให้ไม่สามารถ subclone และ purify product ได้ ขณะนี้ผู้วิจัยกำลังแก้ปัญหาดังกล่าวอยู่ด้วย และใช้ adaptar ในการ clone แทน

## 2. ผลงานวิจัยที่ทำประกอบด้วย

### 2.1 วัตถุประสงค์

2.1.1 ในรอบปีแรกของงานวิจัย มีวัตถุประสงค์รวมคือการสร้าง genomic DNA libraries ของ *B. pseudomallei* ใน *E. coli* และค้นหา positive clone ที่สามารถสร้าง product ที่มีคุณสมบัติเป็น antigen ของเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อนำไปใช้เป็น immunodiagnotic antigen สำหรับตรวจหา antibody ต่อไป

2.1.2 ทำการวิเคราะห์ positive clones ที่ได้ด้วยวิธี Western blot และศึกษาความจำเพาะของ clones ดังกล่าว ตลอดจน ศึกษาหาลำดับเบสของดี เอ็น เอ ในชิ้น insert ของ clones ดังกล่าว และทำการ subclone เข้าสู่พาหะใหม่ เพื่อแยกให้บริสุทธิ์ของแอนติเจนที่ clone ดังกล่าวผลิตขึ้น

### 2.2 การดำเนินงานในโครงการที่ผ่านมา

2.2.1 ทำการผลิต polyclonal anti-*B. pseudomallei* ในกระต่ายโดย polyclonal anti-*B. pseudomallei* antibodies นี้ สำหรับใช้ในการ screen หา positive clones จาก genomic DNA libraries. Antibodies ที่เตรียมกระทำโดยการฉีด Somatic antigen (SOM) หรือ Culture-filtrated antigen (CF) หรือ Partially purified cell extract antigen (PCE) ที่ความเข้มข้น 0.25 μg/kg (rabbit) ในปริมาณ 1 ml เข้าไปในกระต่ายแต่ละตัว โดยแบ่งกระต่ายที่ใช้ออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 2 ตัว กลุ่มที่ 1 ฉีด SOM กลุ่มที่ 2 ฉีด CF และกลุ่มที่ 3 ฉีด PCE. การฉีดเมื่อฉีดครั้งแรกจะฉีดร่วมกับ Complete Freund Adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากการฉีดครั้งแรกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จะทำการฉีดครั้งที่ 2 (booster) โดยฉีดที่ความเข้มข้นและปริมาณแอนติเจนเท่าเดิม แต่ไม่มี CFA หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะทำการ bleed กระต่ายและนำ antibodies ที่ได้มาตรวจ check titer ด้วยวิธี immunodiffusion (ID) และ Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blot โดยใช้ SOM, CF และ PCE เป็น antigen

2.2.2 การสร้าง Genomic DNA libraries ใน *E. coli*

ผู้วิจัยได้ทำการสร้าง Genomic DNA libraries โดยนำเอา *B. pseudomallei* genomic DNA (สกัดด้วยวิธีของ Miller และคณะ 1988) มาตัดด้วยเอ็นซัยม์ (restriction endonuclease) เพื่อที่จะดูว่ามี enzyme ใดที่สามารถตัด genomic DNA ของ *B. pseudomallei* แล้วให้ได้ขนาด DNA อยู่ระหว่าง 1-6 kb (kilobase) (เนื่องจากเหตุผลที่ว่า specific antigen ของเชื้อนี้ คือ protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 19.5 kDa, 18.0 kDa, 40 kDa และ 20.5 kDa) เมื่อทราบแล้วว่า enzyme ตัวใดสามารถตัด genomic DNA ของเชื้อ แล้วได้ขนาด DNA ที่ต้องการจึงนำ enzyme นั้นมาใช้ในการ cloning ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่ามี enzyme ตัวที่เหมาะสม เช่น *Xho I*, *Pst I* และ *Sac II* (ดูรายละเอียดในข้อ 2.3) ผู้วิจัยจึงได้นำ genomic DNA นี้มา clone โดยใช้ pBluescrpit (pKS$^-$) เป็น vector (ดู map ในรูปที่ 1) และนำเข้าสู่ Host XL-1 Blue *E. coli* (ใน proprosal ที่ propose ไว้ในตอนแรก จะใช้ pGEX-5X-3 เป็น Vector ซึ่งจะได้ expressed products เป็น fusion protein กับ GST (Glutathione-S-transferase) แต่เนื่องจาก พบว่าในคนปกติอาจมี antibodies ต่อ GST ซึ่งจะมีผลต่อการ characterize positive clone ที่ได้ จึงได้ทำการเปลี่ยน Vector ใหม่เป็น pKS$^-$ ซึ่งจะได้ product เป็น fusion protein กับ β-galactosidase แทน ผู้วิจัยตั้งใจว่า ถ้าได้ clone ที่ specific แล้วจะ subclone จาก pKS$^-$ เข้าสู่ pGEX-5X-3 อีกครั้ง เพื่อง่ายต่อการ purified product มาใช้ต่อไป) นำ DNA ที่ตัดด้วย enzyme *Xho I* หรือ *Sac II* หรือ *Pst I* มาต่อเข้ากับ pKS$^-$ ที่ตัดด้วย enzyme เดียวกัน และ dephophorylation แล้วด้วย CIP) หลังจากนั้นนำ recombinant plasmid เข้าสู่ *E. coli* ด้วยวิธี Transformation (วิธีของ Hanahan, D) select clones โดย plate transformants ลงบน LB-Amp ager (Amp = Ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 μg/ml) ทำการ screen positive clone ด้วยวิธี polyclonal antibodies ที่ได้จากข้อ 2.2.1 (ดูรายละเอียดขั้นตอนการทำ cloning ในรูปที่ 2)

2.2.3 การ screen หา positive clones

ทำการ screen หา positive clone โดยทำ master plate แล้ว lift colonies นำ colonies มา lysis แล้ว ทำปฏิกิริยา ด้วย rabbit polyclonal antibodies โดยใช้ swine-anti-rabbit-peroxidase (HRP) เป็น secondary antibodies ดูผลที่ได้โดยการ develop ด้วย 4 CN (4-chloro-naphtol) ให้ผล positive เป็นสีม่วงบน nitrocellulose (หมายเหตุ : ก่อนที่จะนำ antibody มาใช้ในการ screen ได้ ทำการ preabsorb antibody ต่อ *E. coli* ออกก่อน)

2.2.4 การวิเคราะห์ positive clone ทางด้าน protein

ทำการศึกษา positive clone ที่ได้ด้วยวิธีในข้อ 2.2.3 อีกครั้ง หลังจากนั้นจึงสกัด plasmid DNA จาก clone ทั้ง 3 แล้วนำมา run agarose gel electrophoresis ใน 0.7% gel เพื่อดูขนาดของ insert นอกจากนั้นยังนำเอา clone ทั้งสามที่ให้ชื่อว่า pKKU-SA35, pKKU-P3 และ pKKU-P18 มาเลี้ยงภายใต้ condition ของ Ampicillin และ induce ด้วย IPTG จากนั้นนำเอา cell ของ clone ทั้งสามมา ผสม กับ SDS-PAGE buffer แล้วนำมา run SDS-PAGE ทำ Western blot และดู antigenicity ของ clone โดยใช้ polyclonal antibodies ในข้อ 2.2.1 และใช้ serum จากผู้ป่วย melioidosis และผู้ป่วยโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆได้แก่ serum จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* group B, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* not group D, *Streptococus pnumoniae*, *Pseudomonas stutseri*

2.2.5 การวิเคราะห์ positive clone ทางด้าน DNA

นำ positive clones ที่ได้มาสกัด plasmid แล้ว purify inserts ของ clones โดยการนำเอา plasmid DNA มาตัดด้วย enzyme ชนิดที่ใช้ในการ clone หลังจากนั้น purify insert โดยการ run electrophoresis และตัดเอาชิ้น insert จากวุ้นมาสกัด DNA นำ insert DNA ที่ได้มา labelled ด้วย Fluorescence โดยใช้วิธี Random primer extension (ECL system) หรือวิธีของ Digoxigenin หลังจากนั้นนำ genomic DNA ของ *B. pseudomallei* มาตัดด้วย Restriction enzyme ชนิดต่าง ๆ คือ *Pst I*, *Sac II*, *Sma I*, *Xha I*, *Hind III*, *Nco I*, *Sal I*, *EcoR I* แล้วเอา prodects ที่ได้มาแยกด้วย agarose gel electrophoresis และ southern blot แล้วนำไป hybridize กับ probe ที่ได้จาก clone ทั้ง 3 เพื่อดูว่า gene ที่ clone ได้มีการกระจายอยู่ใน chromosome ของเชื้อมากน้อยเพียงใดแล่ะ 3 clones ที่ได้มีความสัมพันธ์กันอย่างไร

นอกจากนั้นยังได้ศึกษาถึง restriction map ของ clone ทั้งสามคือ pKKU-P3, pKKU-P18 และ pKKU-SA35 เพื่อประโยชน์ในการ subclone และวิเคราะห์ gene ต่อไป

2.2.6 เปรียบเทียบศักยภาพของแอนติเจนที่ผลิตได้จาก clone

เปรียบเทียบศักยภาพของแอนติเจนที่ผลิตได้จาก positive clone ทั้งสามคือ pKKU-P3, pKKU-P18 และ pKKU-SA35 ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot โดยทำการเลี้ยง clones ทั้งสามใน LB broth ที่ผสมกับ Ampicillin 100ug/ml แล้วนำไปเขย่าที่ 37°C หลังจากที่เชื้อทั้งสามเจริญเข้าสู่ log phase จะทำการเติม IPTG ลงไปแล้วเขย่าต่อค้างคืน หลังจากนั้นจึงเอาเชื้อทั้งสาม clones มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western Blot กับซีรั่มผู้ป่วยเมลิออยโด

สิส, ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น โดยนำผลไปเปรียบเทียบกับการตรวจโดยใช้ CF Ag ด้วยวิธี dot immunoassay (ดูรายละเอียดการเตรียม CF Ag และการทำ dot immunoassay ที่ตีพิมพ์แล้วใน Wongratanacheewin et. al., 1995, Southeast Asian J. Trop. Pub. Hlth : 26;2:329-334.)

2.2.7 ทำการหาลำดับเบสของ clones

ทำการหาลำดับเบสดี เอ็น เอ ของ clones ที่สนใจ (pKKU-SA35 และ pKKU-P18) ด้วยวิธี dideoxy chain termination โดยใช้ T7 DNA sequencing (Pharmacia) และ Cycle sequencing (PCR sequencing) ซึ่งกระทำด้วยวิธี manual sequencing และใช้ Cy5 Autoread DNA sequencing (Pharmacia) ซึ่งกระทำด้วยวิธี Automate เนื่องจาก insert ที่ต้องการหาลำดับเบสนั้นมีขนาด DNA ประมาณ 1.6 Kb. และ 2.0 Kb ตามลำดับ ทำให้มีความจำเป็นต้องมีการ subclone ชิ้น insert ให้เล็กลงเพื่อให้สามารถหาลำดับเบสของทั้งชิ้นได้ด้วยวิธีดังกล่าว การ subclone ได้ทำการ subclone โดยอาศัย restriction enzyme *Bam HI, EcoR I, Pst I* และ *Sal I* สำหรับ clone pKKU-P18 และใช้ restriction enzyme *EcoR I* สำหรับ clone pKKU-SA35 โดยทำการ subclone เข้าสู่ Blucscript KS plasmid vector (ดูรูปที่ 3 ประกอบ)

2.2.8 การ subclone สู่ pGEX-5X -3

การ subclone ชิ้น insert DNA เข้าสู่ pGEX-5X -3 เพื่อการแยกให้บริสุทธิ์ ผู้วิจัยได้ทำการแยกชิ้น insert ของ DNA จาก clone pKKU-SA35 และ pKKU-P18 ด้วยการตัด recombinant plasmid ด้วย restriction enzymes *Sac II* และ *Pst I* ตามลำดับ หลังจากนั้น นำ digestion product ไปแยกด้วย 0.7% agarose gel electrophoresis แล้วแยกเอาชิ้น insert ที่ตัดออกจาก recombinant plasmid ด้วยการตัดเอา DNA ในวุ้นออกมาบดและสกัดด้วย phenol/chloroform. ตกตะกอน DNA ด้วย absolute ethanol นำ DNA ที่ได้ไปตัดเอาส่วน protruding 3' ends ของชิ้น insert ทั้งสอง (ที่ตัดด้วย Sac II และ Pst I) ออกด้วย enzyme T4 DNA polymerase ซึ่ง enzyme นี้จะตัด DNA ที่เป็น unpaired 3' tail ออกเพื่อให้เป็น blunt end จากนั้นนำ DNA blunt end ที่ได้มา clone เข้าสู่ pGEX-5X-3 ที่ตำแหน่ง *Sma I* แล้ว transformed เข้าสู่เจ้าบ้าน XL-1 Blue *E. coli* ด้วยวิธี Electroporation (ดูรูปที่ 4 ประกอบ)

2.2.9 วิเคราะห์ clone pGEX-5X-3

วิเคราะห์ clone จาก pGEX-5X-3 โดยดูการผลิตโปรตีนและการใช้ Affiinty chromatography แยกให้บริสุทธิ์ แอนติเจนที่ผลิตได้ หลังจากที่ทำการค้นหา clone ที่ transformed ในข้อ 2.2.8 ได้แล้วนำเอา clone ดังกล่าวไปเลี้ยงใน LB-Ampicillin (2ml) เขย่าที่ 37°C จนได้ O.D.

ประมาณ 0.6-0.8 (ประมาณ 3-5 ชั่วโมง) หลังจากนั้นเติม IPTG (final concentration = 0.1 mM) เขย่าต่อที่ 37°C ค้างคืน หลังจากนั้นนำเอา cell ที่ได้มาปั่น 5 วินาทีที่ 10,000 rpm. เทส่วนใสทิ้ง resuspend cell ด้วย 300 ul PBS ที่เย็น (เก็บไว้ 10 ul. เพื่อนำไป run SDS-PAGE) นำเอา cell ดังกล่าวไปทำให้แตกด้วย sonicator ปั่นเอาส่วนใสมาแยก เอา fusion protein ด้วย Glutathione Sepharose 4B bead แล้ว elute protein ออกด้วย reduce glutathione นำเอา fusion protein ที่ elute ได้มา run ด้วย ส่วน pellet ที่เหลือจาก cell lysis เก็บเอามา run SDS-PAGE เพื่อไปเปรียบเทียบจากนั้นศึกษาหาแอนติเจนที่ผลิตได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot โดยใช้ polyclonal antibodies ที่ใช้ในการ screen libraries ในตอนต้น

2.2.10 การแยกให้บริสุทธิ์แอนติเจน

ผู้วิจัยได้พยายามแยกให้บริสุทธิ์แอนติเจนที่จำเพาะขนาด 40 KDa จาก CF Ag ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot ลงบน membrane ชนิด PVDF โดยการทำ SDS-PAGE ผู้วิจัยได้เตรียม sample ในปฏิกิริยาที่ป้องกันการเกิด N-terminal blocking โดยอาศัย thioglycolate และ treat sample ที่ 37°C 10 นาที (แทนที่จะเป็น 100°C) หลังจากนั้น blot เอา Ag ลงบน PVDF แล้วตัดเอาเฉพาะโปรตีนขนาดที่ต้องการบน PVDF นำไปทำ protein sequencing ด้วยวิธี Edman degradation โดยใช้เครื่องของ ABI เพื่อต้องการหาลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนนี้ เพื่อจะได้นำมาทำเป็น primers ในการ screen หา positive clone อีกทอดหนึ่ง Approach นี้เป็น approach หนึ่งซึ่งผู้วิจัยคิดจะทำ แต่ไม่ได้ระบุไว้ใน proposal ตั้งแต่ตอนแรก ถ้าวิธีนี้ได้ผลจะทำให้มีโอกาสที่ผลิตได้ clone แอนติเจนขนาด 40 KDa ได้มากขึ้น

2.2.11 การศึกษาความจำเพาะของ recombinant antigen จาก clone pKKU-SA35 และผู้ป่วยติดเชื้อหนอนพยาธิ

เพื่อให้ recambinant protein ที่ผลิตจาก pKKU-SA35 มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ได้ดีในการพัฒนา immuodiagnosis โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ ซึ่งมีการระบาดของโรคเมลิออยโดสิส และโรคหนอนพยาธิ์ชุกชุม ผู้วิจัยจึงได้นำเอา recombinont protein ที่ผลิตมาจาก clone pKKU-SA35 ไปทดสอบกับ serum ผู้ป่วยโรคหนอนพยาธิ์ต่าง ๆ เช่น *Opisthorchis viverrini*, Minute Fluke, Hookworm, Strongyloid, *Taenia spp.* *Ecchinococcus spp.*, จำนวน 28 ราย ด้วยวิธี SDS-PAGE and Western blot

2.2.12 การศึกษา insert ของ clone pKKU-SA35 ใน *B.pseudomallei isolates* ต่าง ๆ

เพื่อให้ทราบถึงการกระจายตัวของ gene ที่ได้จาก clone pKKU-SA35 ในเชื้อ *B.pseudomallei isolates* ต่าง ๆ เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรค ในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* ต่าง *isolates* กัน ผู้วิจัยได้ทำการสกัด genomic DNA ของเชื้อ *B.pseudomallei isolates* ต่าง ๆ จำนวน 20 isolates นำไปตัดด้วย enzymes ชนิดต่าง ๆ เช่น *BamH I , Sac II* หลังจากนั้นแยก digested products ด้วย agarose gel electrophoresis แล้วนำไปทำ southern blot และ hybridize กับ pKKU-SA35 insert ที่ laballed ด้วย Dlgoxiginin

2.2.13 การ subclone insert ของ pKKU- SA35 เข้าสู่ pTrcHis

ผู้วิจัยได้ทำการ subclone pKKU- SA35 Vector เดิมที่อยู่ใน pKS เข้าสู่ Vector ใหม่คือ pTrcHis (q Vector map ในรูปที่ 5) เนื่องมาจากเคยทำการ subclone pKKU-SA35 insert เข้าสู่ pGEX-5X-3 แล้วผลผลิตที่ได้จะเกิดเป็น insoluble protein ไม่สามาถ purify ได้ ประกอบกับ yield ของ recombinant protein ที่ได้นั้นต่ำมากเมื่อเทียบกับ Total protein ผู้วิจัยได้เปลี่ยน Vector เป็น pTrcHis ซึ่งเป็น experssion vector ที่มีทั้ง 3 reading frames คือ A, B, C. protein ที่ได้จะ fuse กับ six tandem histidine (His) 6 ซึ่งตัดอยู่ด้วย N-terminal ของ peptide ที่ต้องการให้ experss ทำให้สามารถ purify protein ได้โดยอาศัย (His) 6 bind กับ resin ด้วยวิธี Column Chramatography หลังจากนั้นถึง elute เอา protein ออามา ผู้วิจัยได้ purify เอาชิ้น insert ของ pKKU-SA35 ออกด้วย *Sac II* หลังจากนั้นใช้ enzyme $T_4$ DNA polymerase ทำให้เป็น blunt end และไปเชื่อมต่อกับ pTrcHis ที่ตัดด้วย *Xho I* และทำให้เป็น blunt end ด้วย Klenow DNA polymerase จากนั้นนำเข้าสู่ Host XL1-Blue *E. coli* ด้วยวิธี Electroporation และ plate บน *LB-Ampicollin agar plates* ทำการหา *recombinant clone* ด้วยการสกัดหา และดูขนาดของ plosmid ด้วยวิธี rapid alkali และ run agarose gel electrophoresis ในการทำ subclone ครั้งนี้ผู้วิจัยทำทั้ง 3 read frames คือ A, B, C.

2.2.14 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ clone pKKU-SA35

ผู้วิจัยได้ศึกษา และวิเคราะห์ลำดับเบสของ clone pKKU-SA35 ทั้งหมด 1,017 b และ clone pKKU-P18 จำนวน 700 b เพื่อเปรียบเทียบ Hamology กับ genes อื่นๆ โดยข้อมูลจาก Gen Bank ด้วยโปรแกรม Blastx ทั้ง 6 reading frames (both strands)

2.3 ผลที่ได้รับ

2.3.1 Construction of genomic libraries :

ในครั้งแรกของการศึกษาพบว่า Enzyme *Xho I* มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการ cloning (ดูรูปที่ 7 ประกอบ) คือเมื่อนำไปตัด genomic DNA แล้วให้ขนาดของ DNA ตามต้องการ แต่เมื่อนำไป clone เข้า pKS (ดู map ของ vector ในรูปที่ 1) และเมื่อ select transformant ด้วย Ampicillin และ IPTG, X-gal แล้วพบว่าให้ efficiency 2 x $10^6$ cells/μg แต่ colony ที่ได้เป็น Blue ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าไม่มี insert จึงได้ทำการ cloning ใหม่ โดยเปลี่ยน enzyme เป็น *Sac II* และ *Pst I* เมื่อทำการ select transformant และดู efficiancy ของการ Transform แล้วให้ผลดังในตารางที่ 1 ส่วนขนาดของ insert ใน genomic DNA libraries นั้นได้ขนาดที่กระจายตามต้องการ

2.3.2 Production of polyclonal anti *B. pseudomallei* antibodies :

ผู้วิจัยสามารถเตรียม anti-SOM, anti-PCE และ anti-CF antibodies ได้ โดย antibodies ทั้งสามเมื่อนำมาทดสอบกับ SOM, PCE และ CF พบว่าสามารถ ทำปฏิกิริยา กับ protien ที่มีความจำเพาะของเชื้อคือ 18.0 kDa, 19.5 kDa, 20.5 kDa และ 40 kDa จึงนำ antibodies ทั้งสามมา pooled รวมกันในอัตราส่วน 1:1:1 แล้ว preabsorb ด้วย *E. coli* (XL-1 Blue) lysate ก่อนนำไปใช้ screen หา positive clones ใน genomic lebiaries ที่ได้จาก ข้อ 2.3.1 ต่อไป

<u>ตารางที่ 1</u> แสดงอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง Vector (pKS) กับ *B. pseudomallei* genomic DNA และ effeciency ของการ Transformation ในการสร้าง genomic DNA libraries.

| Vector : insert ratio (molar ratio) | | Effeciency of of Transfarmation (cells/μg DNA/ml) | |
|---|---|---|---|
| *Sac II* | *Pst I* | Total | White colonies |
| - | 1:2 | $4.11 \times 10^5$ | $1.64 \times 10^5$ |
| 1:5 | - | $1.0 \times 10^5$ | $4.0 \times 10^4$ |
| 1:6 | - | $2.1 \times 10^5$ | $1.1 \times 10^5$ |
| 1:7 | - | $2.0 \times 10^5$ | $1.0 \times 10^5$ |
| 1:8 | - | $1.6 \times 10^5$ | $8.3 \times 10^4$ |

pKS control in *Pst I* enzyme = $7.16 \times 10^6$ cells/μg/ml

pKS control in *Sac II* enzyme = $5.0 \times 10^6$ cells/μg/ml

จากผลในตารางที่ 1 ผู้วิจัยได้ใช้ Libraries ของ *Pst* I ใน ratio 1:2 และ *Sac* II ใน ratio 1:6

2.3.3 Screening of the transformants :

หลังจากที่ทำการ screen white colonies จาก genomic DNA libraries ที่สร้างจาก *Sac II* และ *Pst I* ไปทั้งหมด 6,100 และ 2,000 colonies ตามลำดับ แล้วพบว่ามี positive clones จาก *Sac II* libraries มี 20 clones และจาก *Pst I* libraries มี 2 clones แต่ positive clones จาก *Sac II* libraries เมื่อนำมา grow และ induce ด้วย IPTG นำ protien ที่ได้มา run SDS-PAGE และ Western blot กับ antibodies ในข้อ 2.3.2 พบว่ามีเพียง 1 clone ที่ให้ผล positive ซึ่งต่อมาให้ชื่อว่า pKKU-SA35 ส่วน clone ที่ได้จาก *Pst I* ให้ชื่อเรียกว่า pKKU-P3 และ pKKU-P18

2.3.4 Analysis of the positive clones :

นำ clones ที่ให้ผล positive กับ antibodies ในข้อ 2.3.3 มาศึกษาต่อโดยใช้ antibodies จาก serum ผู้ป่วยที่เป็น melioidosis และ serum ผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่น ๆ เพื่อดู cross reactivity ของ antigen ที่ expressed โดย clones ดังกล่าว จากการศึกษาโดยใช้วิธี SDS-

PAGE และ Westem blot กับ serum ผู้ป่วยดังกล่าวโดยใช้ dilution ของ serum 1:100 และ secondary antibody (rabbit-anti-HIgG-HRP 1:1000) ได้ผลตามรูปที่ 7 และ 8 ตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 แสดงถึงขนาดของ proteins และ DNA ที่ expressed โดย positive clones

| Clones | Expressed protein (kDa) | Approximately Size of Insert (kb) |
|---|---|---|
| pKKU-SA35 | 36.5 | 1.6 |
| pKKU-P3 | 36.0 | 1.5 |
| pKKU-P18 | 33.0 | 2.0 |

ตารางที่ 3 แสดงผลของ specificity และ sensitivity ของ antigen ที่ expressed โดย clones pKKU-SA35, pKKU-P3 และ pKKU-P18.

| Source of sera | Number of positive/Total tested | | |
|---|---|---|---|
| | pKKU-SA35 | pKKU-P3 | pKKU-P18 |
| Septicemic melioidosis | 28/35 | 9/18 | 5/18 |
| Localized melioidosis | 1/10 | 11/35 | 10/35 |
| Other bacterial infections | 4/42* | 8/42** | 4/42*** |

* Cross-reacted with 3 sera from patients with *E. coli* infections and 1 sera from *K. pneumoniae* infection.

** Cross-reacted with

- 2 sera from *E. coli* infection
- 1 serum from *Streptococcus* not gr D
- 1 serum from *S. pneumoniae*
- 2 sera from *Salmanella* B.
- 1 serum from *Pseudomonas stutseri*
- 1 serum from *K. pneumoniae*

*** Cross-reacted with

- 2 sera from *E. coli* infections
- 2 sera from *K. pneumoniae* infections

จากผลการศึกษาจะพบว่า clone pKKU-SA35 ให้ผล sensitivity เมื่อนำมาทดสอบกับผู้ป่วย melioidosis ได้ดีที่สุด แต่ยังมี cross-reaction กับ *E. coli* และ *K. pneumoniae* แต่เนื่องจาก serum ของผู้ป่วยติดเชื้อ *E. coli* กับ *K. pneumoniae* ได้มาจากผู้ป่วยใน endomic area ของ *B. pseudomallei* ดังนั้นในขณะนี้ผู้วิจัยกำลังทำการทดสอบ clone ดังกล่าวกับผู้ป่วยติดเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่อยู่ใน non-endomic area

2.3.5 ผู้วิจัยได้ characterize restriction map ของ clone pKKU-P3 และ pKKU-P18 และ pKKU-SA35 ไว้แล้ว ดังรูปที่ 9 จาก restriction map จะพบว่า clone pKKU-P3 และ clone pKKU-SA35 อาจจะมี origin มาจาก gene เดียวกัน เนื่องจากมี map ที่คล้ายกันมาก จึงได้นำเฉพาะ clone pKKU-SA35 ไปวิเคราะห์ต่อไป

2.3.6 ผู้วิจัยได้ characterize clone pKKU-P3 , pKKU-P18 และ pKKU-SA35 ด้วยวิธี southern blot hybridization กับ genomic DNA (ดูรายละเอียดวิธีในข้อ 2.2.5) ไว้แล้วดังรูปที่ 10,11 และ 12

2.3.7 จากการเปรียบเทียบ แอนติเจนที่ผลิตได้จาก clone ทั้งสามคือ pKKU-P3, pKKU-P18, และ pKKU-SA35 เมื่อนำไปทำ SDS-PAGE และ Western blot กับซีรั่มผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส, ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น โดยการเปรียบเทียบจะนำไปเปรียบเทียบกับแอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อปกติ (CF Ag) และใช้วิธี dot immunoassay ผลที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** แสดงความเป็นแอนติเจนของโปรตีนที่ผลิตจาก clone pKKU-P3, pKKU-P18 และ pKKU-SA35 เมื่อทำปฏิกิริยากับซีรั่มผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส, โรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot โดยเทียบกับ CF Ag ของวิธี dot immunoassay

| Type of Sera | Number of posivives/ Total sera tested | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dot immunoassay | แอนติเจนจาก pKKU-P3 | แอนติเจนจาก pKKU-P18 | แอนติเจนจาก pKKU-SA35 |
| Septicemic melioidosis | 14/18 | 9/18 | 5/18 | 28/35 |
| Localized melioidosis | 27/35 | 10/35 | 10/35 | 1/10 |
| Other bacterial infections | 10/42 | 8/42 | 4/42 | 4/42 |

จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่า ในกรณีที่ผู้ป่วยเป็น septicemic melioidosis เมื่อใช้แอนติเจนจาก clone pKKU-SA35 มาตรวจหาแอนติบอดีจะให้ผล positive ถึง 80% ( 28จาก 35) ซึ่งมากกว่าการใช้แอนติเจนจากวิธีอื่น ๆ และแอนติเจนจาก clone pKKU-SA35 ก็ให้ผล cross-reaction น้อยกว่าแอนติเจนจากวิธีอื่น ๆ (cross-reaction เพียง 4 จาก 42 ราย หรือ 9.5% cross-reaction หรือ specificity = 90.5%) ซึ่งเมื่อตรวจกับไปว่าซีรั่มที่เกิด cross-reaction 4 รายนั้นเป็นซีรั่มจากผู้ป่วยติดเชื้อ *Escherichia coli* 2 ราย และ *Klebsiella pneumonia* 2 ราย ซึ่งผู้ป่วย 4 ราย นี้เป็นผู้ป่วยจาก endemic area อาจมีแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomalliei* อยู่แล้วก็ได้ อาจไม่ใช่ cros-reaction ที่แท้จริง ผู้วิจัยจึงได้นำเอาซีรั่ม (ด้วยความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.สถิตย์ สิริสิงห) ที่เป็นผู้ป่วยติดเชื้อ *E. coli* 2 ราย จาก non-endemic area มาศึกษาพบว่า ให้ผลลบ หรือไม่มี cross-reactions. แสดงว่า clone pKKU-SA35 น่าจะมีศักยภาพดีในการที่จะนำมาศึกษาหาลำดับเบส เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

2.3.8 ผลการ subclone pKKU-P18 และ pKKU-SA35 ทำให้เราได้ clone ใหม่ซึ่งมีขนาด insert เล็กลง เพื่อง่ายต่อการทำ sequencing คือจาก clone pKKU-P18 เราจะได้ clone ที่มี insert ส่วนของ clone นี้ โดยการ subclone แล้วได้ clone เรียกว่า P18 Bam, P18Eco/Pst, P18Sal ตามลำดับ (ดูรูปที่ 3) ส่วน clone pKKU-SA35 ได้ทำการ subclone ได้ clone ชื่อว่า SA35 EcoRI โดยใช้ enzyme EcoRI (ดู restriction map ของ clone pKKU-P18 และ pKKU-

SA35 ประกอบ) หลังจากนั้นนำ clone ทั้งสี่ใหม่ที่เกิดจากการ subclone กับ clone pKKU-P18 และ pKKU-SA35 ไปทำ DNA sequencing ทั้งวิธี manual และ automate ได้ผลดังรูปที่ 13-17

2.3.9 เนื่องจาก clone pKKU-SA35 มีศักยภาพสูงที่สุดในการนำไปใช้จึงได้ทำการ subclone จากชิ้น insert ของ pKKU-P18 และ pKKU-SA35 ไปยังพาหะใหม่คือ pGEX-5X-3 ปรากฏว่าผู้วิจัยสามารถ subclone pKKU-SA35 ไปยัง pGEX-5X-3 ได้สำเร็จ ตั้งชื่อ clone ใหม่ ว่า pGEX-SA35

2.3.10 เมื่อนำเอา clone pGEX-SA35 จากข้อ 2.3.9 มาเลี้ยงและ induce ให้สร้าง โปรตีน ผลปรากฏว่าดังรูปที่ 18 และ 19 รูปที่ 18 แสดงให้เห็นถึงผลของ SDS-PAGE patterns ของ โปรตีนที่สร้างจาก pGEX-5X-3, pGEX-SA35 และรูปที่ 19 แสดงถึงโปรตีนที่สร้างจาก clone pGEX-5X-3 และ pGEX-SA35 เมื่อนำไปทำ Western blot และทำปฏิกิริยากับ rabbit polyclonal antibody ที่ใช้ในการ screen libraries โดยมี swine anti-rabbit-HRP เป็น conjugate จากผลดัง กล่าวพบว่า clone pGEX-SA35 สามารถสร้างแอนติเจนได้ แต่แอนติเจนที่ผลิตได้ พบเป็น insoluble ไม่พบในการแยกจากส่วนใสโดยอาศัย Affinity chromatography (รูปที่ 19 lane ที่ 3, 6 และ 9)

2.3.11 ผู้วิจัยได้พยายามที่จะทำ partial amino acid sequence จากด้าน N-terminal ของโปรตีน 40 kDa ด้วยวิธี Edman degradation แต่พบว่าไม่สามารถดำเนินการได้สำเร็จ ในตอนแรก อาจเนื่องจากตัวอย่างที่นำไป sequence น้อยเกินไป หรือมี N-terminal blocking

2.3.12 จากการศึกษาความจำเพาะของ recombinant protein จาก clone pKKU-SA35 กับผู้ป่วยติดเชื้อหนอนพยาธิชนิดต่างๆ จำนวน 28 ราย พบว่า serum ผู้ป่วยโรค หนอนพยาธิดังกล่าวไม่มีปฏิกิริยาข้ามพวกกับ recombinant protein ดังกล่าวเลย แสดงว่า recombinant protein ดังกล่าวมีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็น immunodiagnosis ของโรคเมลิ ออยโดสิส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือง ซึ่งมีการระบาดของโรคพยาธิชุกชุมได้ เป็นอย่างดี (ดูรูปที่ 20 ประกอบ)

2.3.13. จากการศึกษาการกระจายตัวของ gene ที่ clone ได้ใน pKKU-SA35 ด้วยวิธี Southern blot และ Hybridization พบว่า gene นี้เป็น gene ที่ค่อนข้าง Conserve คือ กระจายในทุก isolates ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่ทำการศึกษา (ดูรูปที่ 21) ผลดังกล่าวเป็น

ปัจจัยหนึ่งซึ่งจะมีประโยชน์มากในการนำเอาผลผลิตของ gene นี้มาใช้ในการวินิจฉัยโรค ดังที่กล่าวมาในข้อ 2.3.12

2.3.14 ผู้วิจัยได้ทำการ serum หา recombinant plasmid จากการ subclone ของ pKKU-SA35 insert เข้าสู่ pTrcHis vector พบว่าได้ clone ที่มี insert ทั้ง 3 reading frames ตั้งชื่อเรียกว่า pTrcHis-35A, pTrcHis-35B และ pTrcHis-35C (ดังรูปที่ 22)ตามที่ต้องการ

2.3.15 ผู้วิจัยได้ serach หา protein ใน GenBank ที่มี Homology กับลำดับเบส ของ pKKU-SA35 และ pKKU-P18 เพื่อ translate เป็น protein ทั้ง 6 reading frames (both stends) ได้ผลดังตารางที่ 5 และ 6 และลำดับเบสบางส่วนของ clone pKKU-SA35 และ pKKU-P18 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 23 และ 24

3. กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

3.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ :

คณะผู้วิจัยได้ตีพิมพ์งานที่ศึกษาหา specific antigen ของเชื้อ *B. pseudomallei* และการประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ทางห้องปฏิบัติการโดยการตรวจหา antibodies และล่าสุดในปี 1995 ผู้วิจัยได้ตีพิมพ์ การนำเอา antigen นี้ไปใช้ในการทำ ELISA และงานในโครงการนี้กำลังจะส่งไปตีพิมพ์ในวารสาร Am.J.Trop.Med.Hyg. (รายละเอียดในข้อ 3)

1. Wongratanacheewin, S., Tattawasart, U., Lulitanond, V., Wongwajana, S., Sermswan, R.W., Sookpranee, M., Nuntirooj, K. 1993. Characterization of *Pseudomonas pseudomallei* antigens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 24: 107-113.

2. Wongratanacheewin, S., Amornpunt, S., Sermswan, R. W., Tattawasart, U., Wongwajana, S. 1995 Use of culture-filtrated antigens in an ELISA and a Dot immunoassay for diagnosis of melioidosis. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 26: 329-334.

3. Wongratanacheewin, S., Sermswon R.W. cloning and experssion of *B. pseudomallei* immunodiagnotic antigen in *E.coli*. (Manuscript in preparation)

3.2 ผลงานวิจัยอื่น ๆ

1. Rattanathongkom, A., Sermswan, R.W., Wongratanacheewin, S. 1997. Detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood samples using polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probe. 11:25-31.

3.3 จำนวนและรายละเอียดการได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

1. เป็น Invited speaker ในการประชุมระดับนานาชาติเรื่อง " 2nd seminar on Food-Borne Parasitic Zoonoses : Current Problems, Epidemiology, Food Safety and Contro! ที่โรงแรมโฆษะ จ. ขอนแก่น (จัดโดย SEAMEO TROPMED NETWORK) ระหว่างวันที่ 6-9 ธันวาคม 2538 ในหัวข้อเรื่อง "Cellular and Molecular Biology of Liver Fluke"

2. เป็นหนึ่งในคณะผู้วิจัย review และ list problems ของหัวข้อเรื่อง Melioidosis : A National Problem ซึ่งได้รับการสนับสนุนโดย สกว.

3. เป็นวิทยากรในการประชุมระดมความคิดในหัวข้อเรื่อง Melioidosis : A National Problem ในวันที่ 18 ธันวาคม 2538 ณ ศศินทร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (จัดโดย สกว.)

4. เป็นวิทยากรรับเชิญในการประชุมวิชาการประจำปีคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ในระหว่างวันที่ 11-13 ตุลาคม 2538 ในหัวข้อเรื่อง "Molecular Diagnosis in Clinical Practice

5. เป็นวิทยากรรับเชิญในการประชุมวิชาการทุกวันพุธ ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในหัวข้อเรื่อง

5.1 Myasthenia Gravis ในวันที่ 28 มิถุนายน 2538

5.2 Melioidosis ในวันที่ 27 ธันวาคม 2538

6. เป็น วิทยากรรับเชิญในการประชุมวิชาการประจำปี เนื่องในโอกาสครบรอบ 10 ปี คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ระหว่างวันที่ 8-9 สิงหาคม 2539 ในหัวข้อเรื่อง "Research and Development in Laboratory Diagnosis of Melioidosis"

7. เป็นวิทยากรรับเชิญในการประชุมวิชาการทุกวันพุธ ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในหัวข้อเรื่อง "Molecular Diagnosis in Medical Applications" ในวันที่ 18 กันยายน 2539

8. เป็นวิทยากรและประธานฝ่ายวิชาการในการจัดอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "DNA Sequencing and Gene Analysis in Life Sscience" จุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในวันที่ 19-23 กุมภาพันธ์ 2539 มีผู้เข้าร่วมประชุมจำนวน 180 ท่าน

9. เป็นวิทยากรในการจัดอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "PCR Technology and Application. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในวันที่ 10-14 มีนาคม 2540 มีผู้เข้าร่วมประชุมจำนวน 150 ท่าน

3.4 การเชื่อมโยงทางวิชาการนักวิชาการอื่น ๆ ทั้งในและต่างประเทศ

ผู้วิจัยได้มีโครงการวิจัยร่วมกับนักวิจัยในคณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศ. ดร. สถิตย์ สิริสิงห สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และกลุ่มนักวิจัยจาก NIH ในประเทศไทย เพื่อแลกเปลี่ยนข้อมูลผลงานวิจัยตลอดจนเชื่อมโยงข้อมูลวิจัยต่าง ๆ ยังผลให้นำผลงานที่ได้ทั้งหมดสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

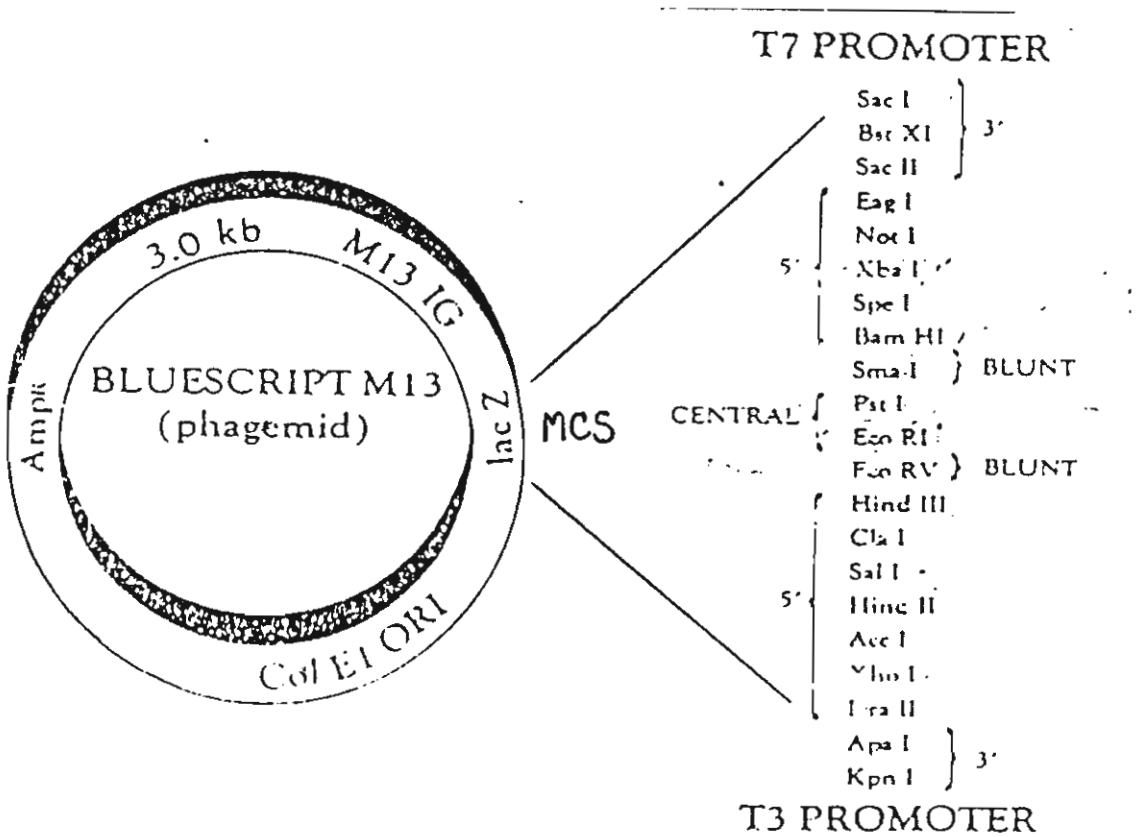
อนึ่งผู้วิจัยยังมีการแลกเปลี่ยนความรู้เทคโนโลยีความช่วยเหลือ ทางด้านเทคนิคต่าง ๆ กับ Dr. Janet McInnes แห่ง University of Guelph ประเทศแคนนาดา โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้าน molecular biology

ผู้วิจัยมีทีมงานวิจัยที่สามารถเชื่อมโยงจุดต่าง ๆ ของปัญหาโรคเมลิออยโดสิสในประเทศไทย เพื่อระดมความคิดในการจัดตั้งโครงการวิจัยที่มีศักยภาพ ในการแก้ปัญหาด้านนี้โดยเฉพาะ ในปัจจุบันเป็นทีมงานวิจัยหลักของมหาวิทยาลัยขอนแก่นในการศึกษาเรื่อง Melioidosis ซึ่งในทีมงานนี้ประกอบไปด้วย แพทย์ นักวิชาการ นักวิจัย สัตวแพทย์ และเทคนิคการแพทย์ รวมกันจำนวนไม่น้อยกว่า 20 ท่าน

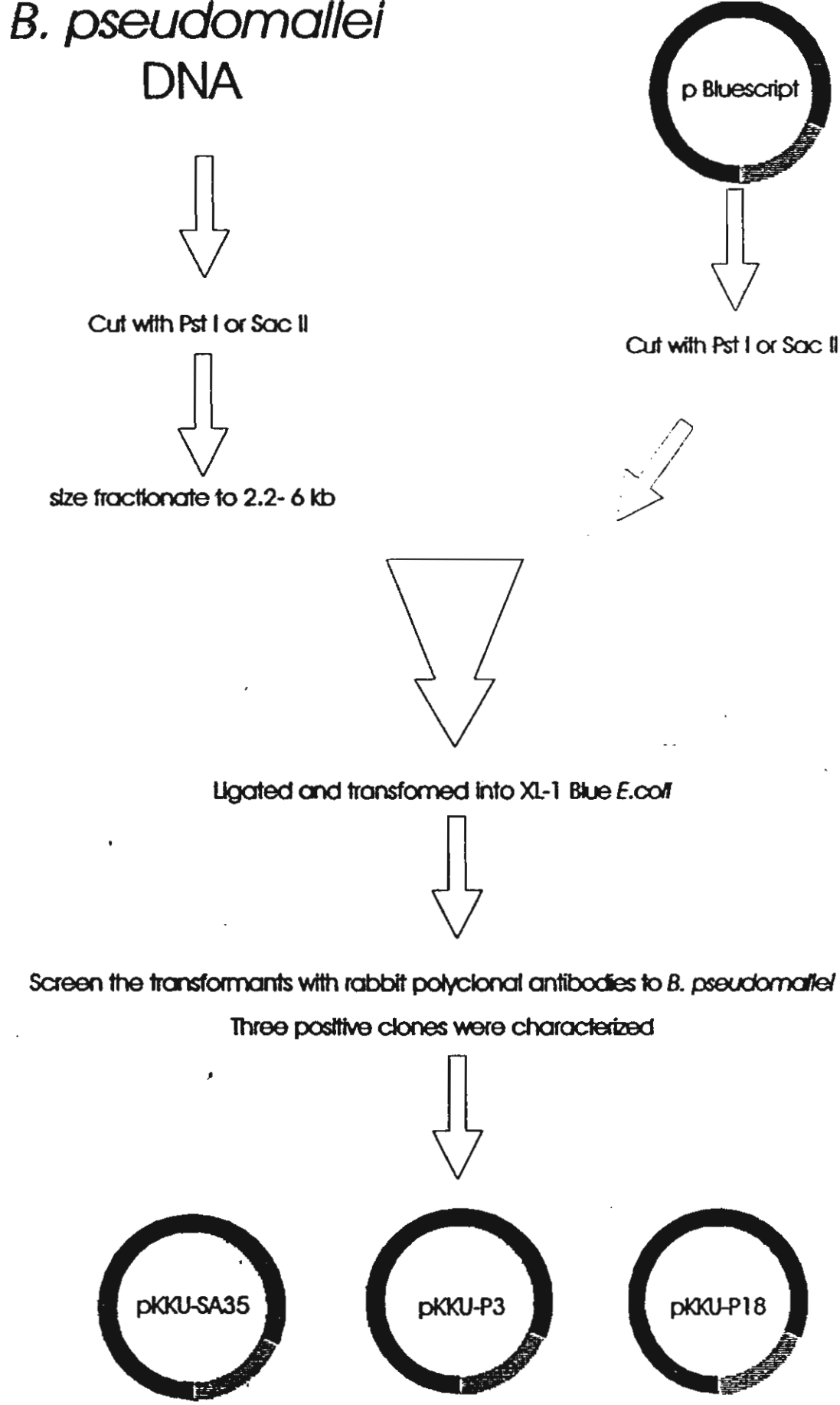
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400
โทร.298-0455 โทรสาร 298-0476
Home page : http://www.trf.or.th
E-mail : trfinfo@trf.or.th

4. ปัญหาและอุปสรรคและข้อเสนอแนะ

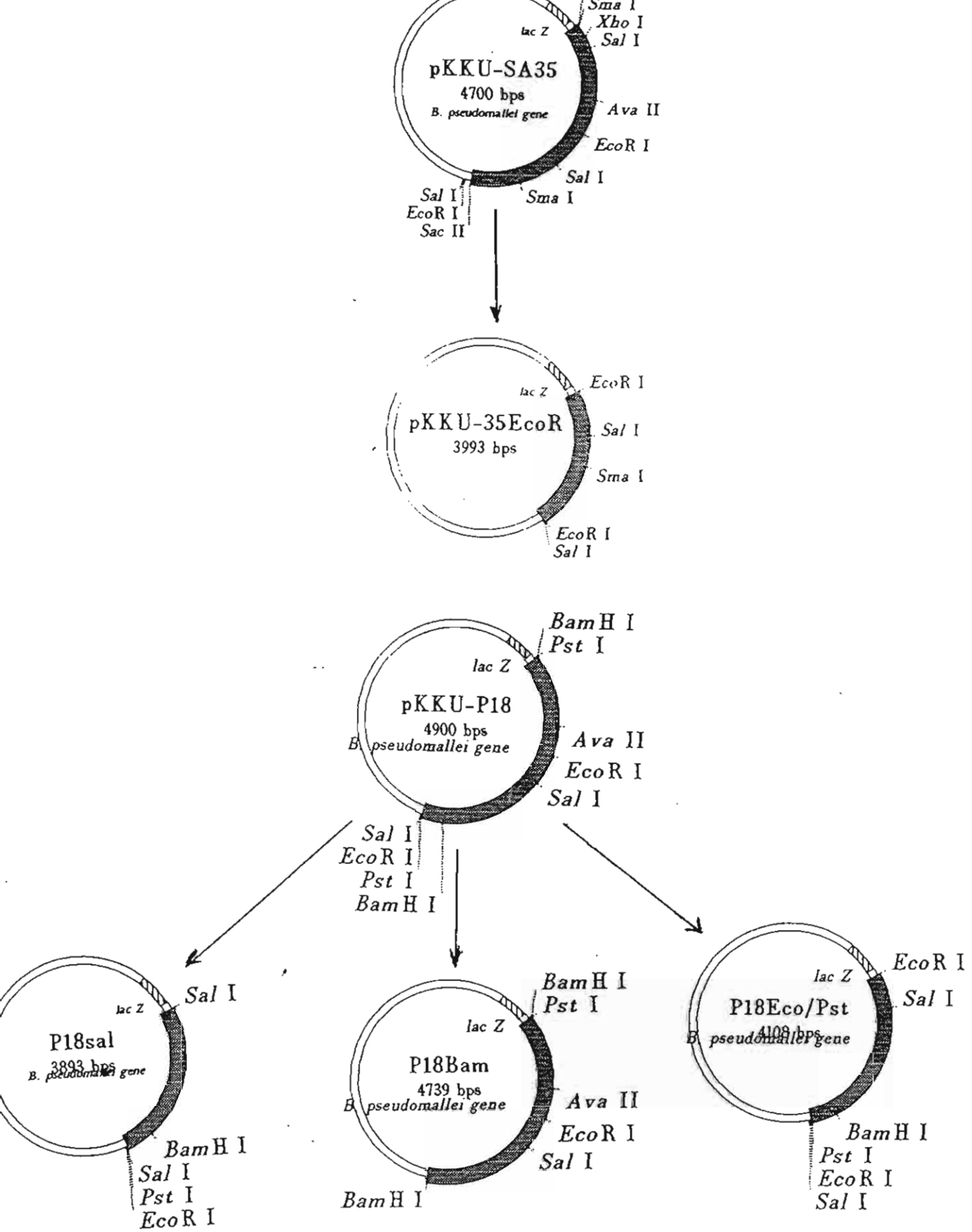
โครงการวิจัยนี้เป็นไปตามเป้าหมาย หรือ output ที่วางไว้ในตอนต้น อาจมีปัญหาอยู่บ้างในด้านเทคนิคในการทำ sequencing, การ subclone เนื่องจากผู้วิจัยมีประสบกาณ์ไม่มากนักในงานดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามได้พยายามเรียนรู้ และศึกษาจากผู้มีประสบการณ์ ตลอดจนที่ปรึกษาโครงการทำให้งานเป็นไปได้ดีระดับหนึ่ง ผู้วิจัยคิดว่าประสบการณ์จากการวิจัยครั้งนี้ทำให้สามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้พัฒนางานวิจัยอื่นๆ ต่อไป นอกจากนั้นยังมีปัญหามากในการใช้จ่ายของเงินรายได้ที่มหาวิทยาลัยสมทบ ซึ่งจะต้องดำเนินตามระเบียบราชการทุกประการทำให้ยากแก่การดำเนินการเป็นอย่างมาก ปัจจุบันผู้วิจัยมีปัญหาอย่างมากในการจดสิทธิบัตร ขั้นตอนในการดำเนินการขอจดสิทธิบัตร ทั้งในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากมหาวิทยาลัยต้นสังกัดไม่มีหน่วยงานที่จะคอยส่งเสริมด้านนี้ ทำให้งานวิจัยที่ออกมาไม่ได้มีการขอจดสิทธิบัตรแต่อย่างใด ขณะเดียวกันค่าใช้จ่ายในการจดก็สูง ทำให้โอกาสเป็นไปได้ที่จะจดมีอยู่น้อยมาก ถ้าเป็นไปได้อยากให้ สกว. ช่วยเป็นผู้ดำเนินการในเรื่องนี้ หรืออาจช่วยกระตุ้นให้มหาวิทยาลัยสนใจด้านนี้บ้าง ไม่เฉพาะแต่งานวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจาก สกว. เท่านั้น



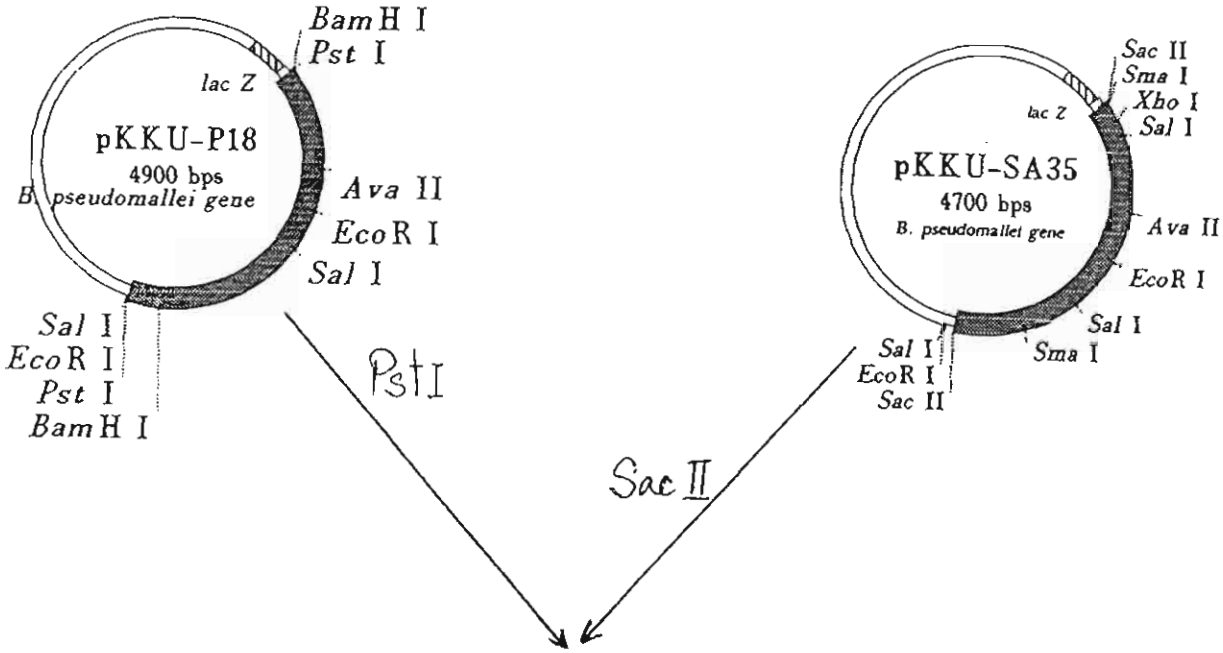

**รูปที่ 1** แสดง Vactor map ของ pKS




**รูปที่ 2** แสดงขั้นตอนการ cloning เข้าสู่ pKS




**<u>รูปที่ 3</u>** แสดงขั้นตอน subclone pKKU-P18 และ pKKU-SA35 ด้วย enzyme BamH I, EcoR I, Pst I, Sal I และ EcoR I, ก่อนที่จะนำไปหาลำดับเบสด้วยวิธี Manual และ Automate Dideoxy termination




Run agarose gel electrophoresis

↓

↓

Purify Insert from the gel by cut the gel and phenol/chloroform

↓

↓

Convert the protruding end into blunt end by T4 DNA polymerase

↓

↓

Ligat the DNA separately to pGEX-5X-3 at Sma I site

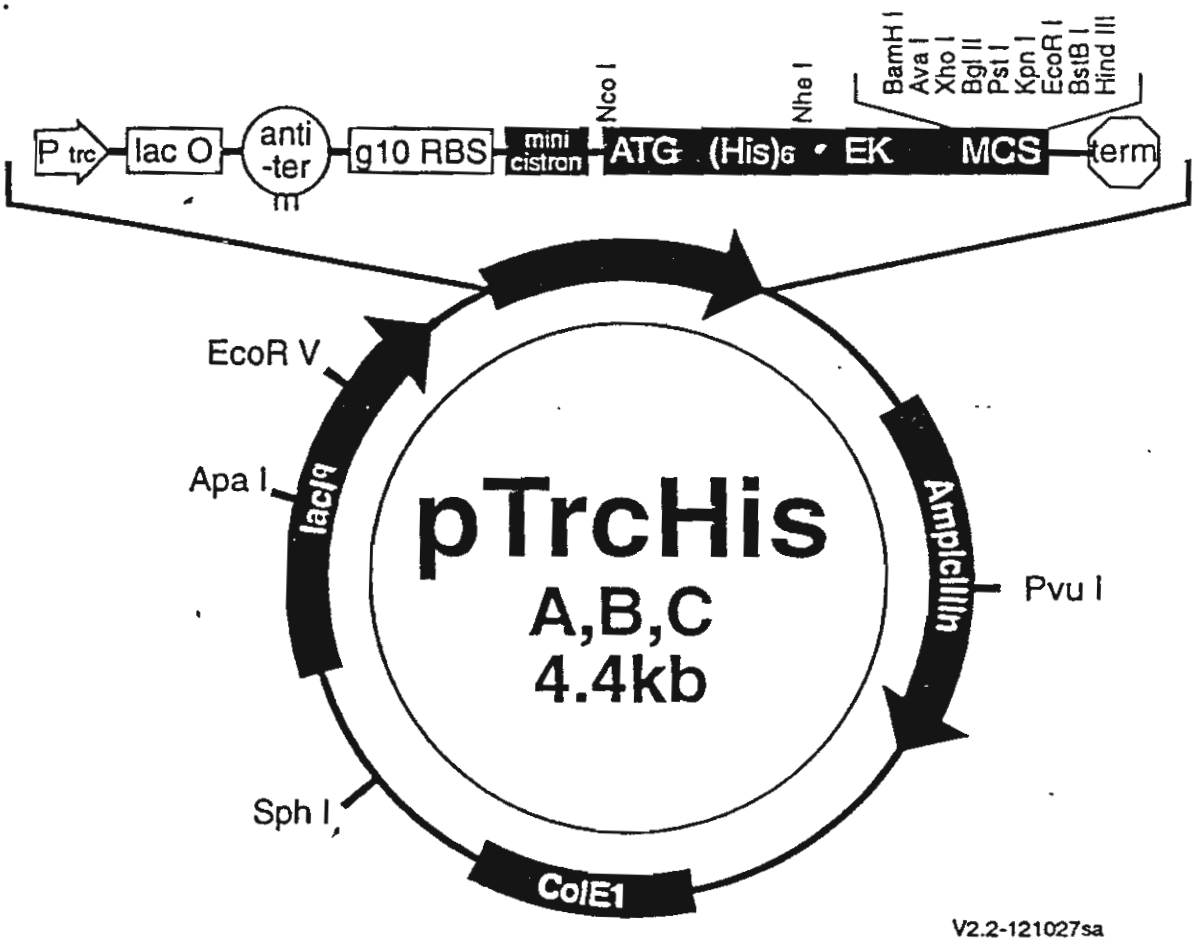
↓

↓

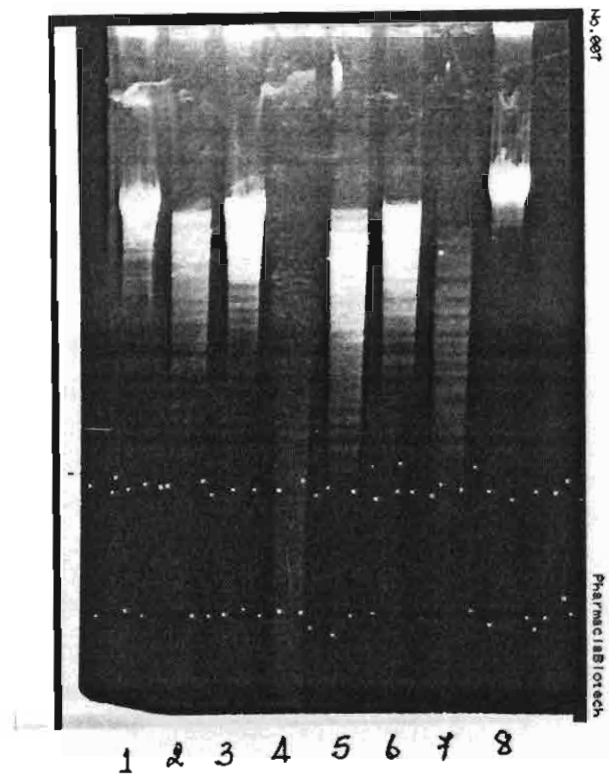
↓

Transformed into XL-1 Blue *E.coli*

**รูปที่ 4** แสดงขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์ ชิ้น insert DNA ของ clone pKKU-P18 และ pKKU-SA35 ด้วย enzyme. Pst I และ Sac II ตามลำดับ แล้วนำชิ้น DNA ไปทำให้เป็น blunt end ก่อนที่จะนำไป clone เข้าสู่ PGEX-5X-3 ที่ Sma I site.




**รูปที่ 5** แสดง Vactor map ของ pTrcHis A, B, C




**<u>รูปที่ 6</u>** แสดงผลของการใช้ restriction endonuclease ชนิดต่าง ๆ มาตัด chromosomal DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei*

Lane 1 : *B. pseudomallei* DNA ตัดด้วย *Hind III*

Lane 2 : *B. pseudomallei* DNA ตัดด้วย *EcoR I*

Lane 3 : *B. pseudomallei* DNA ตัดด้วย *BamH I*

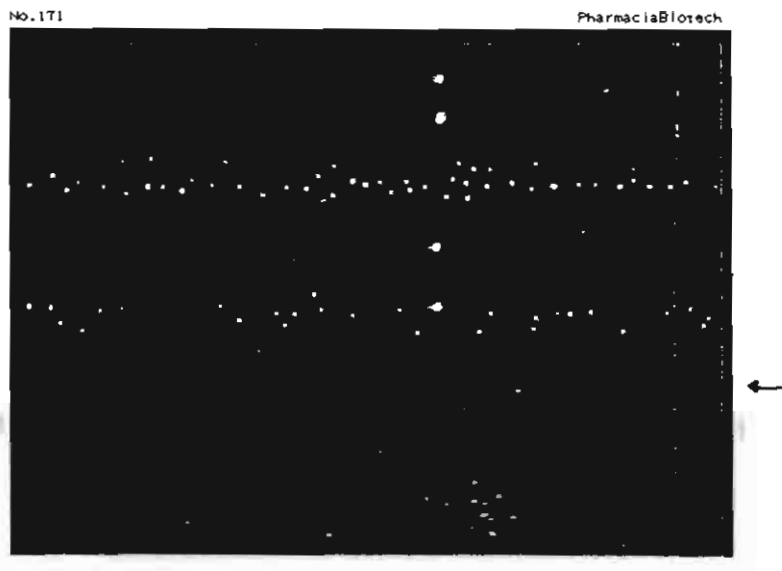
Lane 4 : *B. pseudomallei* DNA ตัดด้วย *Hinf I*

Lane 5 : *B. pseudomallei* DNA ตัดด้วย *Pst II*

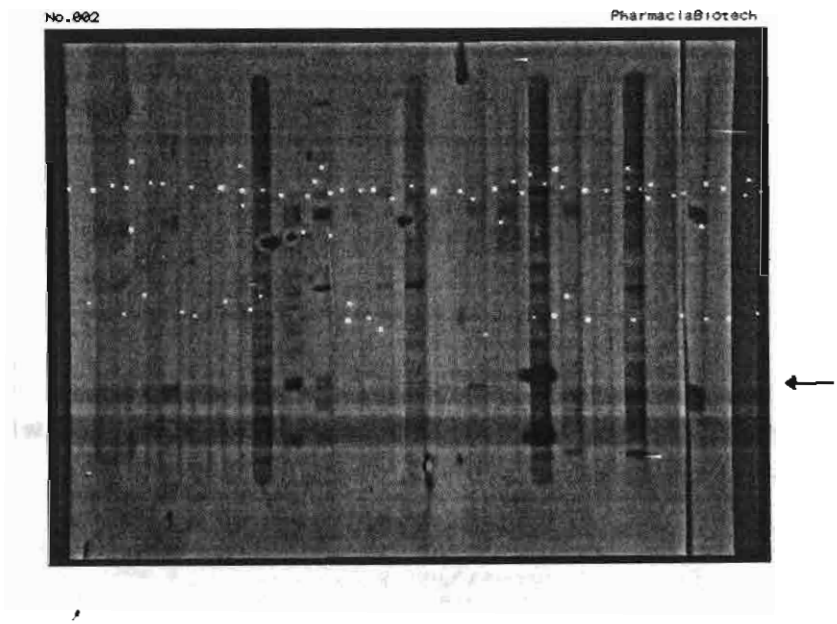
Lane 6 : *B. pseudomallei* DNA ตัดด้วย *Sma II*

Lane 7 : *B. pseudomallei* DNA ตัดด้วย *Xho I*

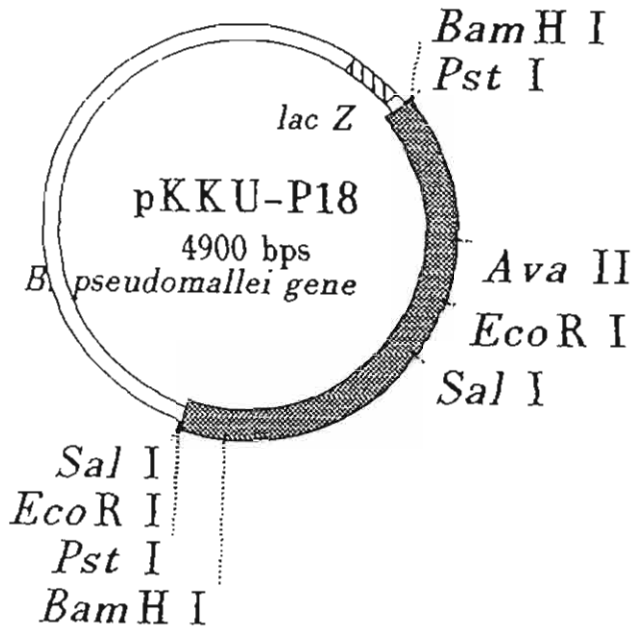
Lane 8 : *B. pseudomallei* DNA ตัดด้วย *Xba I*

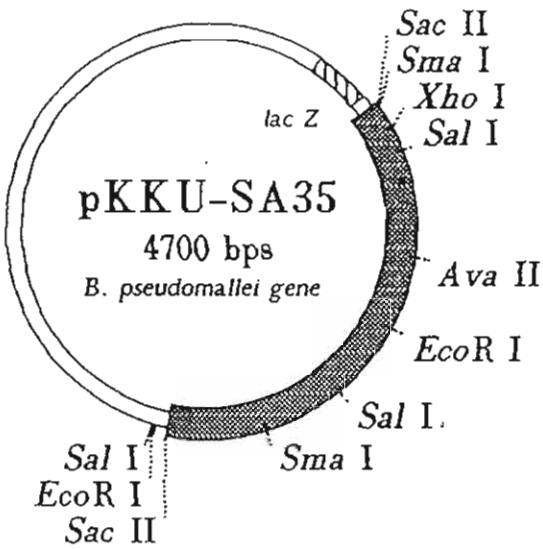


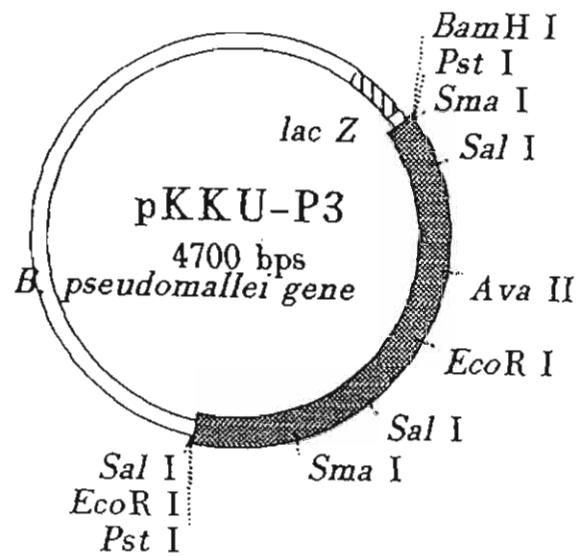

<u>รูปที่ 7</u> แสดงผลของ SDS-PAGE และ Western blot analysis ของ expressed antigens จาก clone pKKU-SA35 กับ serum ผู้ป่วยโรค melioidosis และ serum ผู้ป่วยโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ลูกศร แสดงให้เห็นถึง expressed antigen ที่ทำปฏิกิริยากับ polyclonal rabbit anti *B. pseudomallei* Ab และ serum ผู้ป่วยโรค melioidosis



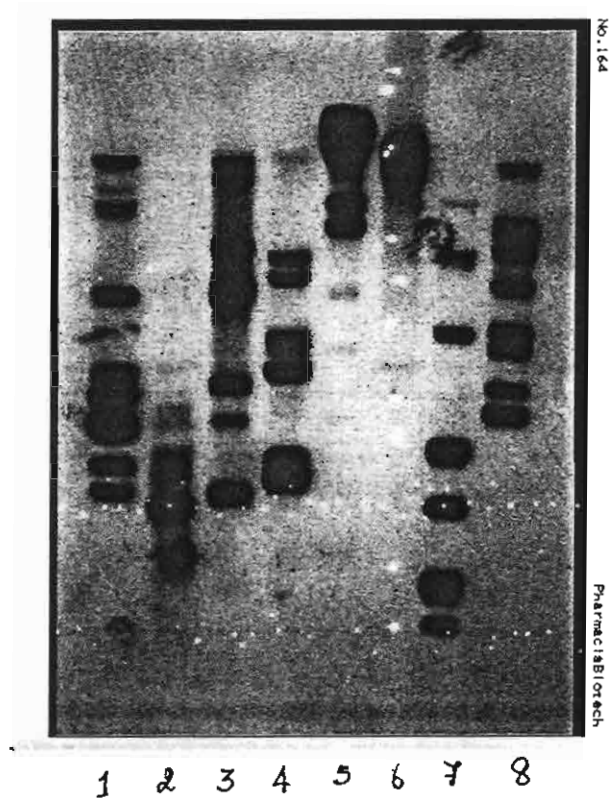

<u>รูปที่ 8</u> แสดงผลของ SDS-PAGE และ Western blot analysis ของ expressed antigens จาก clone pKKU-P18 กับ serum ผู้ป่วยโรค melioidosis และ serum ผู้ป่วยโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ลูกศร แสดงให้เห็นถึง expressed antigen ที่ทำปฏิกิริยากับ polyclonal rabbit anti *B. pseudomallei* Ab และ serum ผู้ป่วยโรค melioidosis




**<u>รูปที่ 9</u>** แสดง restriction maps ของ insert DNA เทียบกันระหว่าง clone pKKU-P3, pKKU-P18 และ pKKU-SA35 บริเวณที่มีสีทึบคือ insert DNA จาก *B. pseudomallei*




**รูปที่ 10** แสดงผลของการทำ Southern blot analysis โดยใช้ genomic DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* มาตัดด้วย enzyme ชนิดต่าง ๆ แล้วนำมาทำ southern blot โดย probe กับ pKKU-P3 insert DNA ที่ labell ด้วยวิธี ECL system เมื่อ genomic DNA มาตัดด้วย enzyme ต่าง ๆ คือ

Lane 1 ตัดด้วย enzyme *Pst I*

Lane 2 ตัดด้วย enzyme *Sac II*

Lane 3 ตัดด้วย enzyme *Sma I*

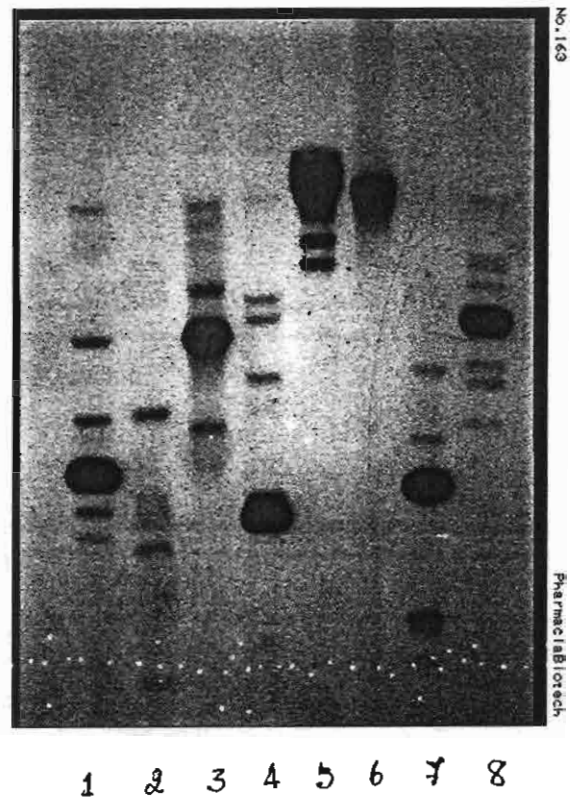
Lane 4 ตัดด้วย enzyme *Xho I*

Lane 5 ตัดด้วย enzyme *Hind III*

Lane 6 ตัดด้วย enzyme *Nco I*

Lane 7 ตัดด้วย enzyme *Sal I*

Lane 8 ตัดด้วย enzyme *EcoR I*




**รูปที่ 11** แสดงผลของการทำ Southern blot analysis โดยใช้ genomic DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* มาตัดด้วย enzyme ชนิดต่าง ๆ แล้วนำมาทำ southern blot โดย probe กับ pKKU-P18 insert DNA ที่ labell ด้วยวิธี ECL system เมื่อ genomic DNA มาตัดด้วย enzyme ต่าง ๆ คือ

Lane 1 ตัดด้วย enzyme *Pst I*

Lane 2 ตัดด้วย enzyme *Sac II*

Lane 3 ตัดด้วย enzyme *Sma I*

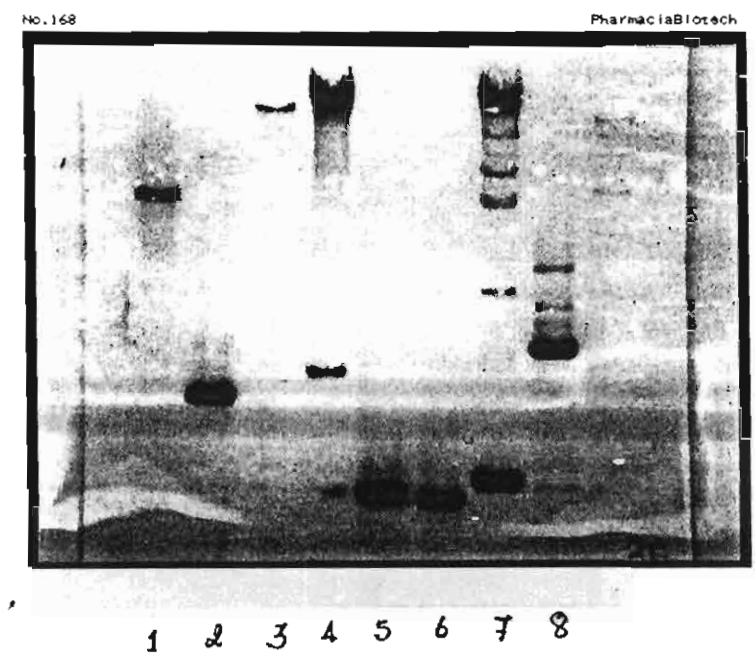
Lane 4 ตัดด้วย enzyme *Xho I*

Lane 5 ตัดด้วย enzyme *Hind III*

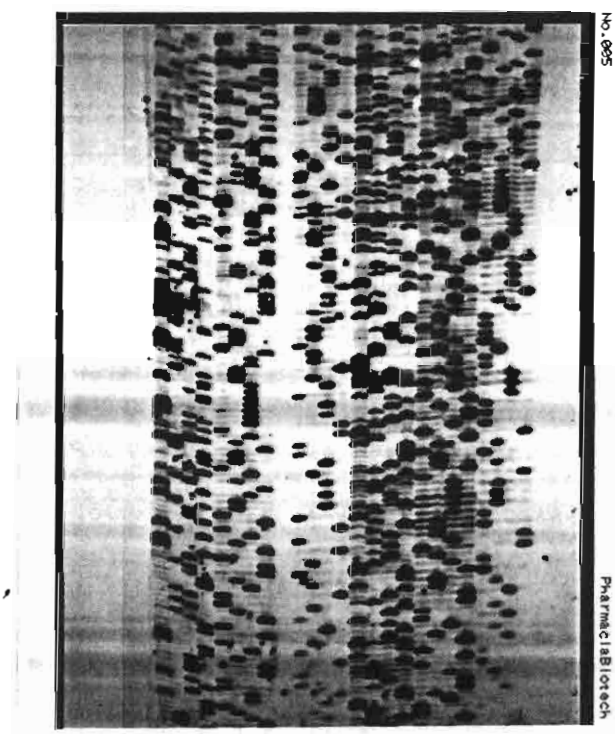
Lane 6 ตัดด้วย enzyme *Nco I*

Lane 7 ตัดด้วย enzyme *Sal I*

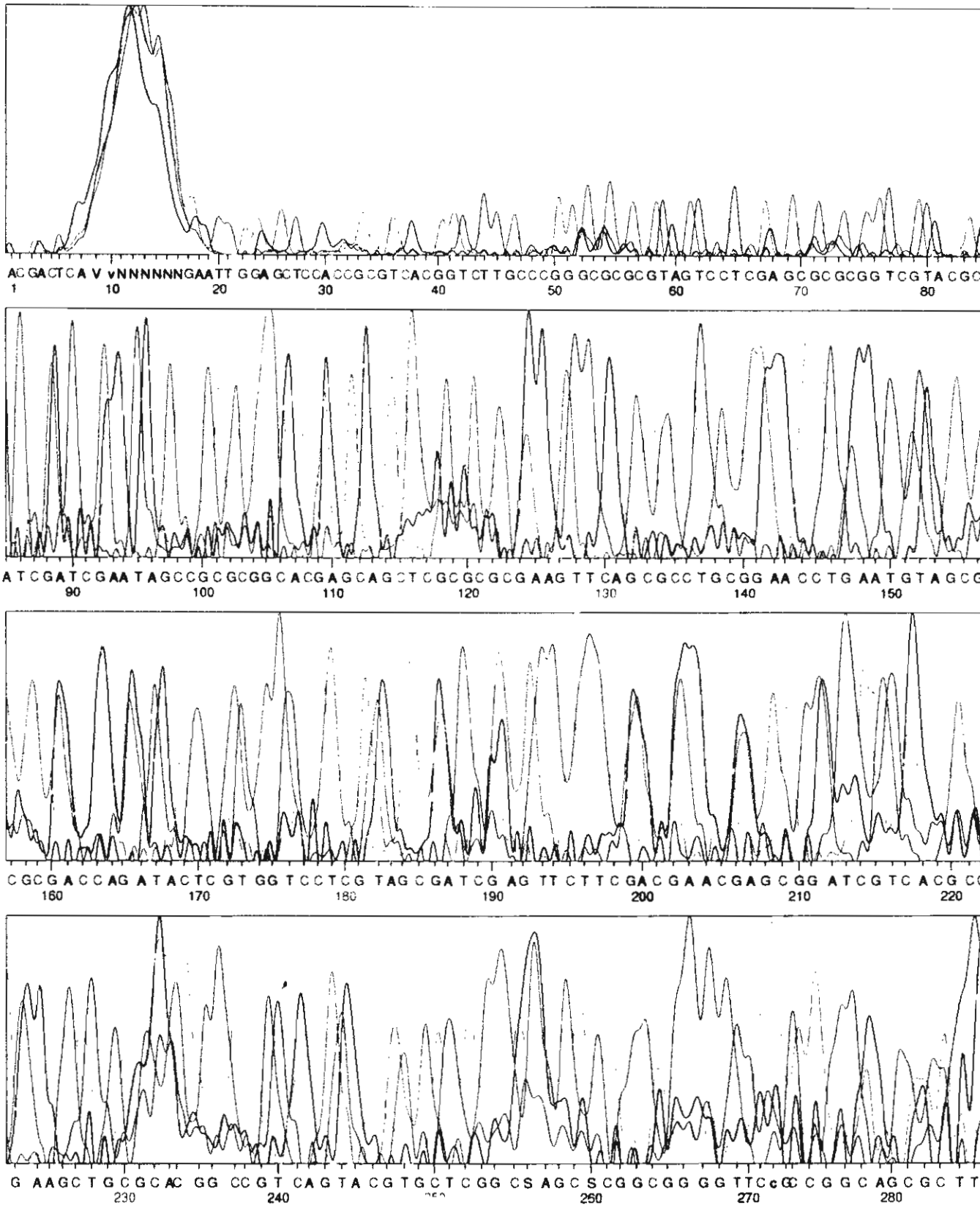
Lane 8 ตัดด้วย enzyme *EcoR I*



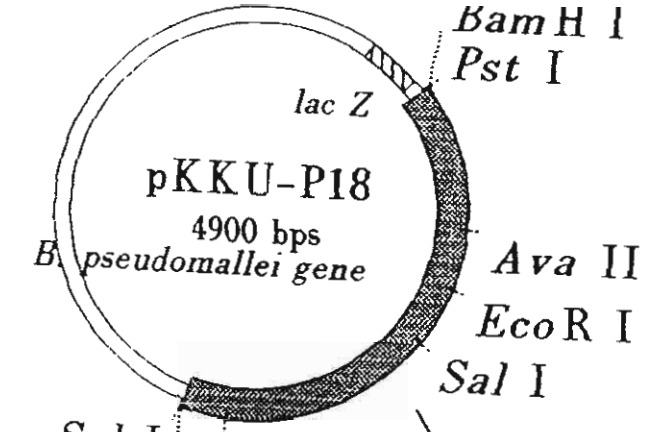

**รูปที่ 12** แสดงผลของ RFLP เมื่อนำ genomic DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* มาตัดด้วย enzyme Bam HI (lane1), EoR I (lane 2) Hind III (lane 3), Pst I (lane 4), Sal I (lane 5), Sac II (lane 6), Sma I (lane 7), Xho I (lane 8) แล้ว southern blot ไปยัง membrane, hybridize กับ pKKU-SA35 insert DNA ที่ label ด้วย Digoxiginin (Colorimetric method)




**รูปที่ 13** แสดงตัวอย่างผลการทำ DNA sequencing




**รูปที่ 14** แสดงตัวอย่างและการทำ DNA sequencing ด้วยวิธี Automate (ใช้วิธี Cy5-autoread DNA sequencing)

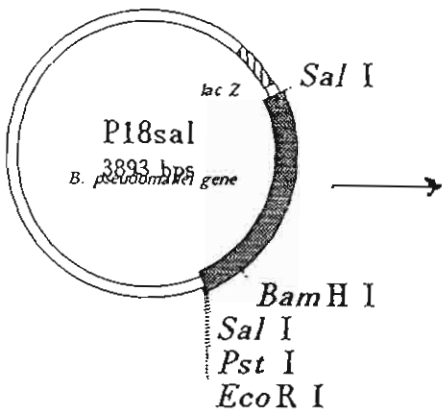



```
Residues: 1 to 535 of 535          10-02-1996  10:00:37

          v         v         v         v         v         v         v
GAAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAA    70
CTTTAATTGGGAGTGATTTCCCTTGTTTTCGACCATGGCCCGGGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATT

          v         v         v         v         v         v         v
GCTTGATATCGAATTCCTGCAGAAGCGCCCGGAAGTCGTCCAGATCGGGCTGCGCGTCGCCGGCGCCCCTC   140
CGAACTATAGCTTAAGGACGTCTTCGCGGGCCTTCAGCAGGTCTAGCCCGACGCGCAGCGGCGCGGGGAC

          v         v         v         v         v         v         v
GCCCGATTCGTCCGGATCCGCATCGCGCGACTCGTAGTCGCGTTCATTGTCGGCGGCGTCTTCGTCCTCG   210
CGGGCTAAGCAGGCCTAGGCGTAGCGCGCTGAGCATCAGCGCAAGTAACAGCCGCCGCAGAAGCAGGAGC

          v         v         v         v         v         v         v
TCCGCTGAAGCACCAGTTCGCTCTACCGATGCTTGCTTGGCTCGACTGATCTTCTCAGACTCGGCTTGCG   280
AGGCGACTTCGTGGTCAAGCGAGATGGCTACGAACGAACCGAGCTGACTAGAAGAGTCTGAGCCGAACGC

          v         v         v         v         v         v         v
GATCGTGGCGCTTCGATTTCGGCATGGTCGTCTCGTTTATTGAGGCGGCAAATACTTCAGCGGATCGACA   350
CTAGCACCGCGAAGCTAAAGCCGTACCAGCAGAGCAAATAACTCCGCCGTTTATGAAGTCGCCTAGCTGT

          v         v         v         v         v         v         v
GGTTTACCCTCCCGGCGAACCTCGAAATGCAGCATCACGCGGTCGGAATCACTATTGCCCATCTCTGCGA   420
CCAAATGGGACGGCCGCTTGGAGCTTTACGTCGTAGTGCGCCAGCCTTAGTGATAACGGGTAGAGACGCT

          v         v         v         v         v         v         v
TCTNVNRGVCTTHGTCACCGCGTCCCCCTCTTTTACCATCAAAGCGCGATTGTGTGCATACVCCGTGAGG   490
AGANBNYCBGAADCAGTGGCGCAGGGGGAGAAAATGGTAGTTTCGCGCTAACACACGTATGBGGCACTCC

          v         v         v         v
WTAAGTTGCGTCGTGCTTGATGATAATGAGGTTGCCGTAGCCNYN   535
WATTCAACGCAGCACGAACTACTATTACTCCAACGGCATCGGNRN
```

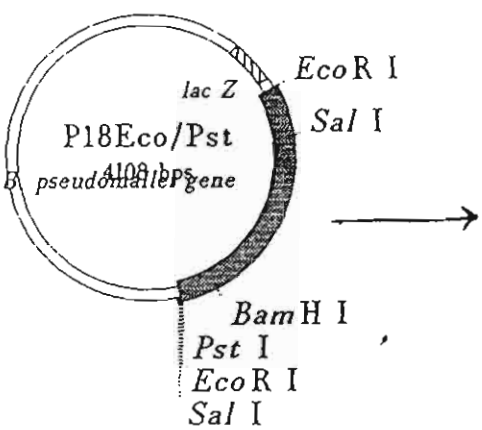
Reverse Primer

```
Residues: 1 to 296 of 296          10-02-1996  10:00:29

          v         v         v         v         v         v         v
NAANACGANNNNNNNNGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCC    70
NTTNTGCTNNNNNNNNCCCGCTTAACCTCGAGGTGGCGCCACCGCCGGCGAGATCTTGATCACCTAGGGG

          v         v         v         v         v         v         v
CGGGCTGCAGCTCGATCTCACGCATACGCAGATGCTCGCAGCCACGCGCGATTGGGCGCGTGCCGGGAGC   140
GCCCGACGTCGAGCTAGAGTGCGTATGCGTCTACGAGCGTCGGTGCGCGCTAACCCGCGCACGGCCCTCG

          v         v         v         v         v         v         v
GGCGCTTCATGAGCGGCGAGCNCGCGAAGNGNTTTCCGCTCGYCGCTCGAGGATCTGAAGCGCGAGCCGC   210
CCGCGAAGTACTCGCCGCTCGNGCGCTTCNCNAAAGGCGAGCRGCGAGCTCCTAGACTTCGCGCTCGGCG

          v         v         v         v         v         v         v
GCAAGCCCGAGGGCCGCGTGGCGGAGCGCCAGGCGGCGGGAGACGCCGCCCGCCAGCGCCTCACCGCGGC   280
CGTTCGGGCTCCCGGGCGCACCGCCTCGCGGTCCGCCGCCCTCTGCGGCGGGCGGTCGCGGAGTGGCGCCG

          v
CGCCNNNNCGCCCNCC   296
GCGGNNNNGCGGGNGG
```

**รูปที่ 15** แสดงลำดับเบสบางส่วนของ insert จาก clone pKKU-P18

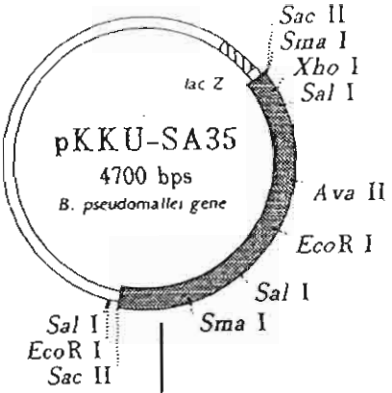



```
        v         v         v         v         v         v         v
GGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATMCCCCGGGCTGCAGCCCGTCTCAGATTGC    70
CCTCGAGGTGGCGCCACCGCCGGCGAGATCTTGATCACCTAKGGGGCCCGACGTCGGGCAGAGTCTAACG

        v         v         v         v         v         v         v
TGACAAACCCTCGCCAAGTGCGGGGTTTTGTTTTTTAATGGCGTGATGCTGAAGACGCCCATGCCCACGC   140
ACTGTTTGGGAGCGGTTCACGCCCCAAAACAAAAAATTACCGCACTACGACTTCTGCGGGTACGGGTGCG

        v         v         v         v         v         v         v
AGCACGAACTCGAGATGGTGACGCTCGAGGAACTCGTGCCGAAGGACCACCTGCTGCGCCAGATCGATGC   210
TCGTGCTTGAGCTCTACCACTGCGAGCTCCTTGAGCACGGCTTCCTGGTGGACGACGCGGTCTAGCTACG

        v         v         v         v
GGCGGTGGATTTCGAGTTCATCCGCGCGAAGGTGGCGCATCTGTA    255
CCGCCACCTAAAGCTCAAGTAGGCGCGCTTCCACCGCGTAGACAT
```




```
Residues: 1 to 248 of 248          11-21-1996  10:17:01

        v         v         v         v         v         v         v
TACGACTCACTABGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTG    70
ATGCTGAGTGATVCTTAACCTCGAGGTGGCGCCACCGCCGGCGAGATCTTGATCACCTAGGGGGCCCGAC

        v         v         v         v         v         v         v
CAGCTCGATCTCACGCATACGCAGATGCTCGCAGCCACGCGCGATTGGGCGCGTGCCGGGAGCGGCGCTT   140
GTCGAGCTAGAGTGCGTATGCGTCTACGAGCGTCGGTGCGCGCTAACCCGCGCACGGCCCTCGCCGCGAA

        v         v         v         v         v         v         v
CATGAGCGGCGAGCCCGAAGGGTTTCCGCTCGCGCTCGAGGATCTGAAGCGCGAGCCGCGCAAGCCCGAG   210
GTACTCGCCGCTCGGGCTTCCCAAAGGCGAGCGCGAGCTCCTAGACTTCGCGCTCGGCGCGTTCGGGCTC

        v         v         v
CGCCGCGTGGCGGAGCGCCAGGCGGCGGGAGACGCCGC    248
CCGGCGCACCGCCTCGCGGTCCGCCGCCCTCTGCGGCG
```

**รูปที่ 16** แสดงลำดับเบสบางส่วนของ insert จาก clone P18 Eco/Pst และ P18 sal ซึ่งเป็น subclone ของ pKKU-P18 โดยใช้ universal primers




Universal Primer

Reverse Primer

sidues: 1 to 540 of 540 10-02-1996 09:57:29

GACTCANNNNNNNNGAATTGGAGCTCCACCGCGTCACGGTCTTGCCCGGGCGCGCGTAGTCCTCGAGC 70
CTGAGTNNNNNNNNCTTAACCTCGAGGTGGCGCAGTGCCAGAACGGGCCCGCGCCCATCAGGAGCTCG

GCGGTCGTACGCATCGATCGAATAGCCGCGCGGCACGAGCAGCTCGCGCGCGAAGTTCAGCGCCTGCG 140
CGCCAGCATGCGTAGCTAGCTTATCGGCGCGCCGTGCTCGTCGAGCGCGCGCTTCAAGTCGCGGACGC

ACCTGAATGTAGCGCGCGACCAGATACTCGTGGTCCTCGTAGCGATCGAGTTCTTCGACGAACGAGCG 210
TGGACTTACATCGCGCGCTGGTCTATGAGCACCAGGAGCATCGCTAGCTCAAGAAGCTGCTTGCTCGC

CGTCACGCCGAAGCTGCGCACGGCCGTCAGTACGTGCTCGGCNAGCNCGGCGGGGTTCCGCCGGCAG 280
AGCAGTGCGGCTTCGACGCGTGCCGGCAGTCATGCACGAGCCGNTCGNGCCGCCCCAAGGCGGCCGTC

CTTNNGGCNCYYCNCNAGGTTGGGTGGCGAGTCGATCCTCGNNCCTTNGCGGTACNTTGTTCGAACGT 350
GAANNCCGNGRRGNGNTCCAACCCACCGCTCAGCTAGGAGCNNGGAANCGCCATGNAACAAGCTTGCA

YGGNCCGCCAGCGANNTYGTAGGATYGTGNTCNGGCCNNAGNACGGAGNCCGCTTCGTYGGGCNCGNG 420
RCCNGGCGGTCGCTNNARCATCCTARCACNAGNCCGGNNTCNTGCCTCNGGCGAAGCARCCCGNGCNC

AANNNCGNCGNAGCGNTNGGCTTTCNAGCNTTGTACNGAAACANGCGNCGGACNTNNNNGACCGTNTA 490
TTNNNGCNGCNTCGCNANCCGAAAGNTCGNAACATGNCTTTGTNCGCNGCCTGNANNNNCTGGCANAT

ATTGCCCCGAGCTNCANTACTATGAG/ GCTNYTANCGCNCATATCYAC 540
TAACGGGGCTCGANGTNATGATACTCTCGANRATNGCGNGTATAGRTG

Nucleic Acid Sequence of 35RAUTO.DNA
Residues: 1 to 555 of 555 10-02-1996 10:00:21

GAAATTAACCTCACTAAAGGGGAACAAAAGCTGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAA 70
CTTTAATTGGAGTGATTTCCCCTTGTTTTCGACCATGGCCCGGGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATT

GCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGCCGTGGCC 140
CGAACTATAGCTTAAGGACGTCGGGCCCCCTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCGGTGGCGCCGGCACCGG

GTTGCGGCCGCGCCCGGCGCTGACGCCCCCGCGCCGGCCAACGGCGCCCTTGCCGGCCGCCGCCCCGCCG 210
CAACGCCGGCGCGGCCCGCGACTGCGGGGGCGCGGCCGGTTGCCGCGGGAACGGCCGGCGGCGGGGCGGC

TTCGAACCCGCCGCGCTCGCGGCCAGCGTCGCGCCCGCCGAGGCGGCCGCGCCAGGCGCGCCCGGCCGCG 280
AAGCTTGGGCGGCGCGAGCGCCGCTCGCAGCGCGGGCGGCTCCGCCGGCGCGGTCCGCGCGGGCCGGCGC

CGAGCGCNCGCTGTCGCGCACNCGCCGCGGCGGCAGGCGGCAATGCGAATTTGATGACGATTGGCTGAGC 350
GCTCGCGNGCGACAGCGCGTGNGCGGCGCCGCCGTCCGCCGTTACGCTTAAACTACTGCTAACCGACTCG

AATCCTTGCCCTTCGATTCAAGAAACGCAAGCNGCAAGGCGAACCCGAAGTCGCTCCATTTACCCTGGTA 420
TTAGGAACGGGAAGCTAAGTTCTTTCCCTTCGNCGTTCCGCTTGGGCTTCAGCGAGGTAAATGGGACCAT

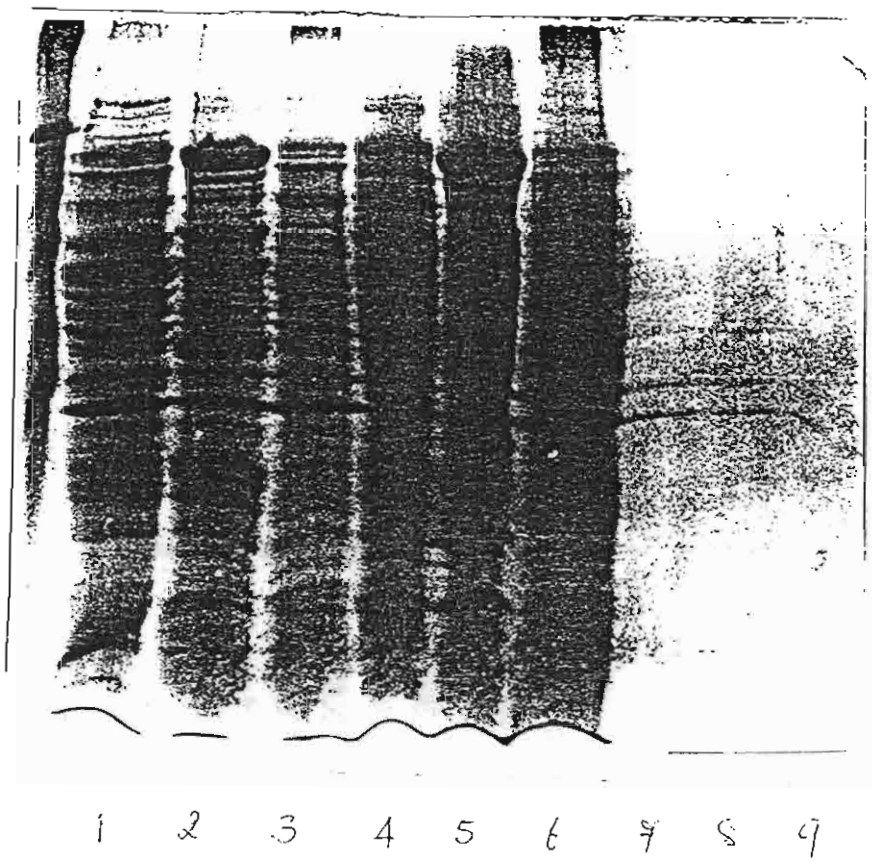
CTAGGAGAAGATATGCAACACACGATGAAAAAGCTGGCAGNNNNNNACGTTCGTCGCGGTCGTGTCGCTC 490

GATCCTCTTCTATACGTTGTGTGCTACTTTTTCGACCGTCNNNNNNTGCAAGCAGCGCCAGCACAGCGAG

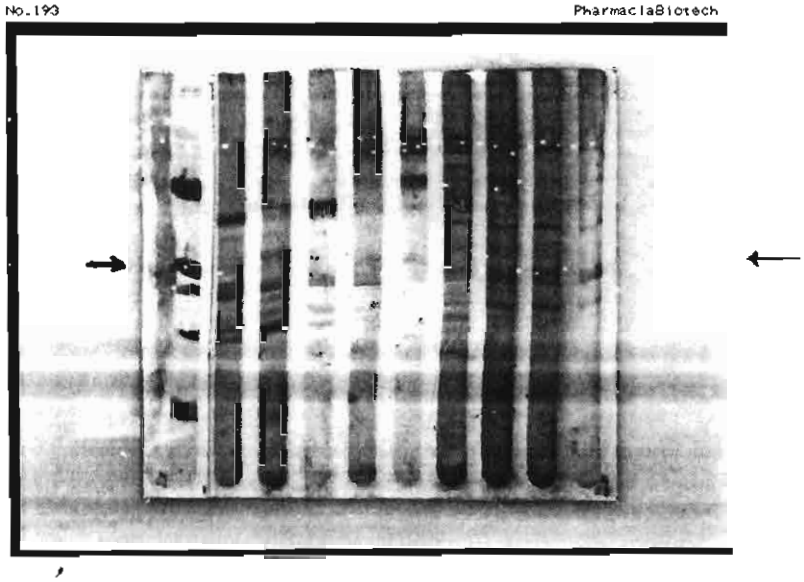
GCGGNNACNNYNCNCNCGGATGACGTCAAGATCGGTTTTGNGCNCGCCGATGACAANNNNCNGGNN 555
CGCCNNTGNNRNGNGNGCCTACTGCAGTTCTAGCCAAAACNCGNCGGCTACTGTTNNNNGNCCNN

**รูปที่ 17** แสดงลำดับเบสบางส่วนของ insert จาก clone pKKU-SA35

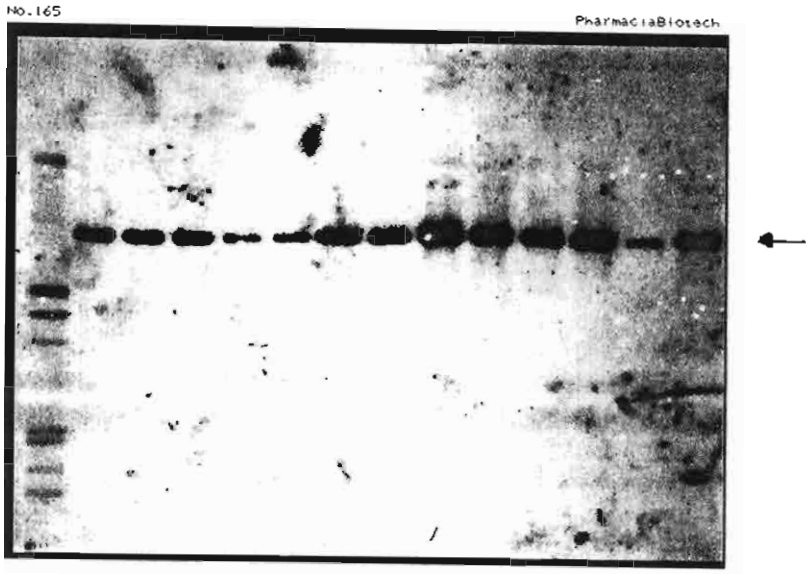
<u>รูปที่ 18</u> แสดงให้เห็นถึง SDS-PAGE pattern ของ PGEX-5X-3 (lanes 1, 4 และ 7) และ clone PGEX-SA35 (lanes 3, 6 และ 9) เมื่อ induce ด้วย IPTG และนำเอา cell suspension lanes 1 และ 4) cell pellet หลังจากทำให้ cell แตกด้วย sonicator (lanes 3 และ 6) และส่วนใสของ cell เมื่อทำให้ cell แตกแล้ว ผ่าน glutathione-sepharese 4B และ elute จาก Glutathione-sepharese 4B



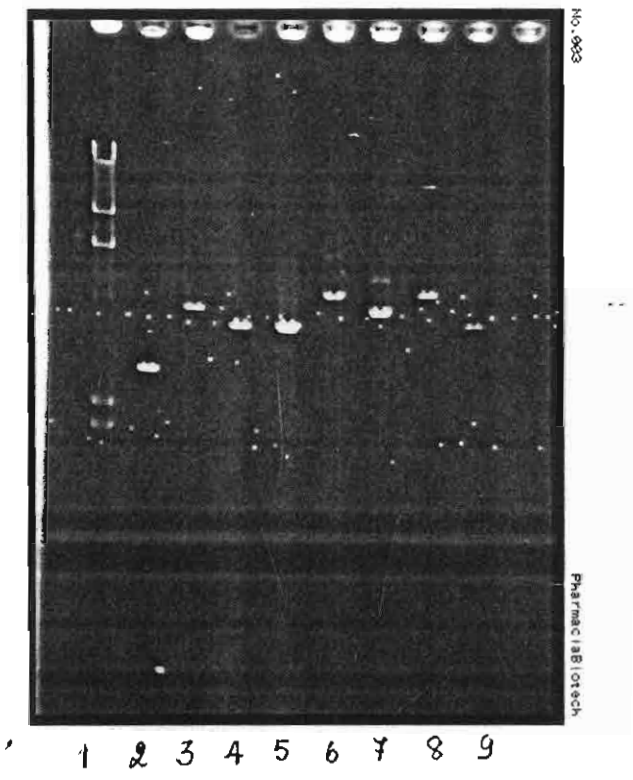

**รูปที่ 19** แสดงให้เห็นถึง SDS-PAGE และ Western blot ของ PGEX-5X-3 (lanes 1, 4 และ 7) และ clone PGEX-SA35 (lanes 3, 6 และ 9) เมื่อ induce ด้วย IPTG และนำเอา cell supension (lanes 1 และ 4) cell pellet หลังจากทำให้ cell แตกด้วย sonicator (lanes 3 และ 6) และส่วนใส ของ cell เมื่อทำให้ cell แตกแล้ว elute จาก Glutathione-sepharose 4B เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ rabbit polyclonal antibody ที่ใช้ในการ screen libraries โดยมี swine anti-rabbit-HRP เป็น conjugate. ศรชี้แสดงให้เห็นถึง แอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับ rabbit polyclonal antibody ที่ไม่พบใน pGEX-5X-3



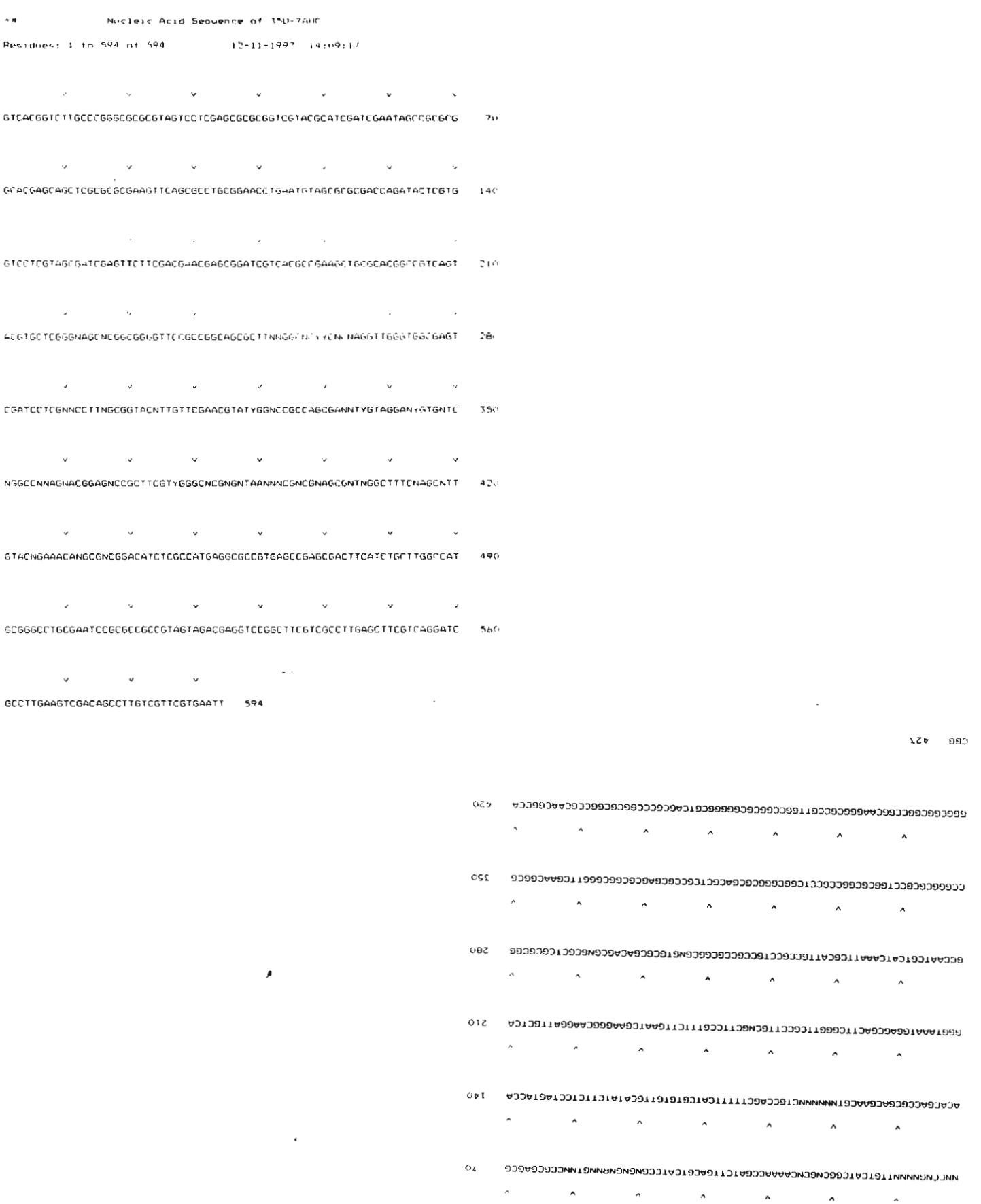

<u>รูปที่ 20</u> แสดงผลของ SDS-PAGE และ Western blot analysis ของ expressed antigens จาก clone pKKU-SA35 กับ serum ผู้ป่วยโรคพยาธิ์ชนิดต่าง ๆ ลูกศรชี้คือ antigens ที่ expressed โดย clone pKKU-SA35 จากรูปแสดงให้เห็นว่า antigens ดังกล่าวไม่มีปฏิกิริยาข้ามพวกกับ serum ผู้ป่วยโรคพยาธิ์




<u>รูปที่ 21</u> รูปแสดงผล Southern blot analysis ของ *B.pseudomallei* DNA isolates ที่ตัดด้วย *Bam HI* แล้ว Hybridized กับ pKKU-SA35 insert ที่ label ด้วย Digoxiginin Lane ซ้ายมือคือ DIG-marker จากรูปแสดงให้เห็นว่า gene ที่ clone ได้ใน pKKU-SA35 สามารถพบทุก isolates ของ *B. pseudomallei*




<u>รูปที่ 22</u> รูปแสดง Ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis ของ plasmid DNA ที่สกัดจากการ subclone ของ pKKU-SA35 เข้าสู่ pTrcHis Vector lane 1 คือ λ/Hind III markers lane 2 คือ Vector pTrcHis ตัดด้วย *EcoRI* lane 3-9 คือ recombinant plasmid ที่ตัดด้วย *EcoRI*




**<u>รูปที่ 23</u>** แสดงลำดับเบสจำนวน 549 b ซึ่ง sequence จากด้าน Universal primer ของ clone pKKU-SA35 (รูปบน) และ 423 b ซึ่ง sequence จากด้าน reversed primer ของ clone pKKU-SA35 (รูปล่าง)

```
         v         v         v         v         v         v         v
GAAGCGCCCGGAAGTCGTCCAGATCGGGCTGCGCGTCGCCGCGCCCCTCGCCCGATTCGTCCGGATCCGC    70

         v         v         v         v         v         v         v
ATCGCGCGACTCGTAGTCGCGTTCATTGTCGGCGGCGTCTTCGTCCTCGTCCGCTGAAGCACCAGTTCGC   140

         v         v         v         v         v         v         v
TCTACCGATGCTTGCTTGGCTCGACTGATCTTCTCAGACTCGGCTTGCGGATCGTGGCGCTTCGATTTCG   210

         v         v         v         v         v         v         v
GCATGGTCGTCTCGTTTATTGAGGCGGCAAATACTTCAGCGGATCGACAGGTTTACCCTGCCGGCGAACC   280

         v         v         v         v         v         v         v
TCGAAATGCAGCATCACGCGGTCGGAATGACTATTGCCCATCTCTGCGATCTNVNRGVCTTHGTCACCGC   350

         v         v         v         v         v         v         v
GTCCCCCTCTTTTACCATCAAAGCGCGATTGTGTGCATACVCCGTGAGGWTAAGTTGCGTCGTGCTTGAT   420

         v         v
GATAATGAGGTTGCCGTAGCCNYN    444
```

```
         v         v         v         v         v         v         v
GCTCGATCTCACGCATACGCAGATGCTCGCAGCCACGCGCGATTGGGCGCGTGCCGGGAGCGGCGCTTCA    70

         v         v         v         v         v         v         v
TGAGCGGCGAGCNCGCGAAGNGNTTTCCGCTCGYCGCTCGAGGATCTGAAGCGCGAGCCGCGCAAGCCCG   140

         v         v         v         v         v         v         v
AGGGCCGCGTGGCGGAGCGCCAGGCGGCGGGAGACGCCGCCCGCCAGCGCCTCACCGCGGCCGCCNNNNC   210

GCCCNCC    217
```

**<u>รูปที่ 24</u>** แสดงลำดับเบสจำนวน 444 b ซึ่ง sequence จากด้าน reversed primer และ clone pKKU-P18 (รูปบน) และ 217 b ซึ่ง sequence จากด้าน Universal primer pKKU-P18 (รูปล่าง)

| Sequences producing High-scoring Segment Pairs: | Frame | Score | P(N) | N |
|---|---|---|---|---|
| gi\|2343283 (AF015297) IE2hom [Human herpesvi... | +2 | 77 | 0.0016 | 2 |
| gi\|862478 (U13194) major immediate-early pr... | +2 | 77 | 0.0099 | 2 |
| pir\|\|S54834 HP8 peptide - human (fragment) | +2 | 81 | 0.018 | 1 |
| gnl\|PID\|e264597 (X87248) HP8 peptide [Homo sapiens] | +2 | 81 | 0.018 | 1 |
| gnl\|PID\|e198124 (Z54163) hnRNP protein [Chironomu... | +2 | 78 | 0.046 | 1 |
| pir\|\|A37282 52K active chromatin boundary pro... | +2 | 74 | 0.15 | 1 |
| gi\|459202 (U07055) vitellogenin 1 [Fundulus... | +2 | 74 | 0.15 | 1 |
| gi\|7637 (X62599) 52-kD bracketing protein... | +2 | 74 | 0.15 | 1 |
| gnl\|PID\|d1012147 (D79986) similar to human DNA-bin... | -2 | 58 | 0.24 | 2 |
| sp\|P33479\|IE18_PRVKA IMMEDIATE-EARLY PROTEIN IE180 >pi... | +2 | 60 | 0.34 | 2 |
| sp\|P50809\|VE2_HPV36 REGULATORY PROTEIN E2 >gi\|1020222... | -3 | 58 | 0.40 | 2 |
| gnl\|PID\|e288240 (Z81518) F28D9.a [Caenorhabditis ... | +2 | 70 | 0.45 | 1 |
| gi\|1658503 (U75467) Atu [Drosophila melanoga... | +2 | 63 | 0.50 | 2 |
| sp\|P36783\|VE2_HPV14 REGULATORY PROTEIN E2 >pir\|\|S3647... | -3 | 55 | 0.59 | 2 |
| gi\|1890099 (U87459) autoimmunogenic cancer/t... | -3 | 61 | 0.64 | 2 |
| gi\|1134957 (U41162) unidentified ORF [Burkho... | -3 | 68 | 0.68 | 1 |
| gi\|1044855 (Z66521) W02B12.2 [Caenorhabditis... | +2 | 68 | 0.68 | 1 |
| pir\|\|D34768 ORF4 protein - Orf virus (strain ... | +2 | 68 | 0.68 | 1 |
| pir\|\|S14085 protamine - common cuttlefish | -3 | 47 | 0.75 | 2 |
| pir\|\|A45195 adenylylcyclase type V-alpha - do... | +2 | 67 | 0.79 | 1 |
| sp\|P30803\|CYA5_CANFA ADENYLATE CYCLASE, TYPE V (ATP PY... | +2 | 67 | 0.79 | 1 |
| gnl\|PID\|d1021620 (AB002322) KIAA0324 [Homo sapiens] | -3 | 57 | 0.81 | 2 |
| bbs\|169646 protamine [Monodonta turbinata, g... | -3 | 48 | 0.85 | 2 |
| sp\|P08345\|VE2_BPV4 REGULATORY PROTEIN E2 >pir\|\|W2WLB... | +2 | 66 | 0.88 | 1 |
| gi\|2105277 (U86920) similar to variola A13L ... | +2 | 57 | 0.90 | 3 |
| gi\|2444455 (AB020765) hypothetical protein [... | -2 | 62 | 0.91 | 2 |
| pir\|\|S14086 protamine - common cuttlefish | -3 | 48 | 0.92 | 2 |
| pir\|\|A37792 spectrin beta-H chain - fruit fly... | +3 | 64 | 0.98 | 1 |
| gi\|7655 (X53992) betaH spectrin [Drosophi... | +3 | 64 | 0.98 | 1 |
| sp\|P35307\|HSP1_ORNAN SPERM PROTAMINE P1 >gi\|407152 (Z2... | -3 | 64 | 0.98 | 1 |
| gi\|1146167 (L43595) cytochrome bd [Azotobact... | +3 | 64 | 0.98 | 1 |
| sp\|P23926\|ANR_PSEAE TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR PROTEIN... | +3 | 64 | 0.98 | 1 |
| gi\|1621359 (U70826) vitellogenin II precurso... | +2 | 64 | 0.98 | 1 |
| sp\|P80001\|PRT1_SEPOF SPERMATID-SPECIFIC PROTEIN T1 (CO... | -3 | 47 | 0.99 | 2 |

<u>ตารางที่ 5</u> แสดงผลการ search หา Homology ของ sequence จาก pKKU-SA35 ในฐานข้อมูล GenBank ด้วย Blast X

| Sequences producing High-scoring Segment Pairs: | | Frame | Score | P(N) | N |
|---|---|---|---|---|---|
| pir\|\|C34768 | ORF2 protein - Orf virus (strain ... | +1 | 67 | 0.016 | 2 |
| pir\|\|B48013 | proline-rich proteoglycan 2 precu... | +1 | 61 | 0.022 | 2 |
| gi\|1184112 | (U46138) Zn-induced protein [Oryz... | -2 | 56 | 0.068 | 3 |
| pir\|\|S16506 | hypothetical protein - human | +1 | 52 | 0.068 | 3 |
| gnl\|PID\|e288240 | (Z81518) F28D9.a [Caenorhabditis ... | +3 | 70 | 0.095 | 1 |
| gnl\|PID\|e282242 | (X79027) unknown [Microbacterium ... | +1 | 57 | 0.10 | 2 |
| gi\|1039474 | (U36798) platelet cGI-PDE [Homo s... | +1 | 69 | 0.13 | 1 |
| gi\|1044856 | (Z66521) W02B12.3 [Caenorhabditis... | +3 | 69 | 0.13 | 1 |
| sp\|P41176\|KAS2_STRCM | PUTATIVE POLYKETIDE BETA-KETOACYL... | +1 | 57 | 0.13 | 2 |
| pir\|\|A55335 | myelin regulatory factor 1 - mous... | +3 | 54 | 0.14 | 3 |
| gnl\|PID\|e304179 | (Z86099) very large tegument prot... | +1 | 52 | 0.15 | 2 |
| gi\|555924 | (U14648) putative myelin regulato... | +3 | 54 | 0.15 | 3 |
| pir\|\|D29149 | proline-rich protein - mouse (fra... | +3 | 54 | 0.18 | 2 |
| pir\|\|C29149 | proline-rich protein - mouse (fra... | +3 | 56 | 0.22 | 2 |
| pir\|\|A44093 | cGMP-inhibited cAMP phosphodieste... | +1 | 67 | 0.23 | 1 |
| gi\|862478 | (U13194) major immediate-early pr... | +2 | 67 | 0.23 | 1 |
| sp\|P04922\|CSP_PLAKN | CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN PRECURSO... | +1 | 67 | 0.23 | 1 |
| gi\|2343283 | (AF015297) IE2hom [Human herpesvi... | +2 | 67 | 0.23 | 1 |
| sp\|P70315\|WASP_MOUSE | WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN ... | -2 | 61 | 0.23 | 2 |
| gi\|1150834 | (U42471) Wiscott-Aldrich Syndrome... | -2 | 61 | 0.23 | 2 |
| pir\|\|B24264 | proline-rich protein MP3 - mouse ... | +3 | 59 | 0.24 | 2 |
| pir\|\|A24264 | proline-rich protein MP2 - mouse ... | +3 | 56 | 0.24 | 2 |
| pir\|\|B40505 | hypothetical protein - suid herpe... | +1 | 54 | 0.24 | 3 |
| sp\|P05142\|PRP2_MOUSE | PROLINE-RICH PROTEIN MP-2 PRECURS... | +3 | 56 | 0.25 | 2 |
| gi\|190504 | (K03205) salivary proline-rich pr... | +3 | 45 | 0.27 | 3 |
| sp\|P05143\|PRP3_MOUSE | PROLINE-RICH PROTEIN MP-3 >gi\|200... | +3 | 59 | 0.29 | 2 |
| gi\|1145304 | (U38179) cyclic nucleotide phosph... | +1 | 66 | 0.30 | 1 |
| pir\|\|A28996 | proline-rich protein M14 precurso... | +3 | 59 | 0.30 | 2 |
| gnl\|PID\|d1009167 | (D49708) RNA binding protein (tra... | +3 | 51 | 0.33 | 3 |
| gi\|1888505 | (U64032) alpha 1d adrenoceptor [O... | +1 | 59 | 0.33 | 2 |
| sp\|P11596\|TRSF_DROME | FEMALE-SPECIFIC TRANSFORMER PROTE... | +3 | 49 | 0.34 | 3 |
| bbs\|134298 | (S62936) PRB1S precursor protein=... | +3 | 45 | 0.37 | 3 |
| pir\|\|B34768 | ORF5 protein - Orf virus (strain ... | -2 | 65 | 0.39 | 1 |
| gi\|1109849 | (U41538) coded for by C. elegans ... | -2 | 65 | 0.39 | 1 |

**ตารางที่ 6** แสดงผลการ search หา Homology ของ sequence จาก pKKU-P18 ในฐานข้อมูล GenBank ด้วย Blast X

**สัญญาเลขที่** RSA/21/2537

**รายงานการเงิน ในรอบ 3 ปี (ตลอดโครงการ)**

---

**ชื่อโครงการ :** การผลิตแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและการวิเคราะห์ Gene ที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนเพื่อประยุกต์ใช้ ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส

**ชื่อหัวหน้าโครงการ** นายสุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน

**รายงานในช่วงวันที่** 1 ธันวาคม 2537 ถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน 2540

## รายจ่ายประจำงวดปัจจุบัน

| หมวด (ตามเอกสารโครงการ) | รายจ่ายจากรายงานครั้งก่อน | รายจ่ายคราวนี้ | รวมสะสม |
|---|---|---|---|
| 1. ค่าจ้าง | 321,210.00 | 57,000.00 | 378,200.00 |
| 2. ค่าตอบแทนเมธีวิจัย | 450,000.00 | - | 450,000.00 |
| 3. ค่าตอบแทน (อื่น ๆ) | - | - | - |
| 4. ค่าใช้สอย | 3,953.00 | 2,365.00 | 6,318.00 |
| 5. ค่าวัสดุ | 274,553.50 | 196,001.55 | 470,555.05 |
| 6. ค่าครุภัณฑ์ | - | - | - |
| 7. ..... | - | - | - |
| 8. ..... | - | - | - |
| รวม | 1,049,706.50 | 255,366.55 | 1,305,073.05 |

## จำนวนเงินที่ได้รับและเงินคงเหลือ

| | | | |
|---|---|---|---|
| งวดที่ 1 | ได้รับจาก สกว. | 360,000.00 | บาท |
| | ได้รับจากมหาวิทยาลัย | 100,000.00 | บาท |
| | อื่น ๆ (เช่น ยกมาจากงวดก่อนและดอกเบี้ย | - | บาท |
| | รวม | 460,000.00 | บาท |
| | รายจ่าย | 263,490.75 | บาท |
| | เหลือ | 196,509.25 | บาท |
| งวดที่ 2 | ได้รับจาก สกว. | - | บาท |
| | ได้รับจากมหาวิทยาลัย | 100,000.00 | บาท |
| | อื่น ๆ (เช่น ยกมาจากงวดก่อนและดอกเบี้ย) | 202,855.41 | บาท |
| | รวม | 302,855.41 | บาท |
| | รายจ่าย | 193,138.00 | บาท |
| | เหลือ | 109,717.41 | บาท |
| งวดที่ 3 | ได้รับจาก สกว. | 360,000.00 | บาท |
| | ได้รับจากมหาวิทยาลัย | - | บาท |
| | อื่น ๆ (เช่น ยกมาจากงวดก่อนและดอกเบี้ย) | 119,100.16 | บาท |
| | รวม | 479,100.16 | บาท |
| | รายจ่าย | 233,017.00 | บาท |
| | เหลือ | 246,083.16 | บาท |
| งวดที่ 4 | ได้รับจาก สกว. | - | บาท |
| | ได้รับจากมหาวิทยาลัย | 100,000.00 | บาท |
| | อื่น ๆ (เช่น ยกมาจากงวดก่อนและดอกเบี้ย) | 246,083.16 | บาท |
| | รวม | 346,083.16 | บาท |
| | รายจ่าย | 154,558.00 | บาท |
| | เหลือ | 191,525.16 | บาท |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **งวดที่ 5** | ได้รับจาก สกว. | 270,000.00 | บาท |
| | ได้รับจากมหาวิทยาลัย | - | บาท |
| | อื่น ๆ (เช่น ยกมาจากงวดก่อนและดอกเบี้ย | 194,809.80 | บาท |
| | รวม | 464,809.80 | บาท |
| | รายจ่าย | 205,502.75 | บาท |
| | เหลือ | 259,307.05 | บาท |
| **งวดที่ 6** | ได้รับจาก สกว. | - | บาท |
| | ได้รับจากมหาวิทยาลัย | - | บาท |
| | อื่น ๆ (เช่น ยกมาจากงวดก่อนและดอกเบี้ย) | 267,914.75 | บาท |
| | รวม | 267,914.75 | บาท |
| | รายจ่าย | 255,366.55 | บาท |
| | เหลือ | 12,548.20 | บาท |