บทคัดย่อ

T 161671

การกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ (cell-mediated immunity) เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการคุ้มกันโรคที่เกิดจากเชื้อที่สามารถอาศัยอยู่ได้ภายในเซลล์ (intracellular organism) เช่นเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดซิส และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าวัคซีนเชื้อเป็นสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มทางด้านเซลล์ได้ดี โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดลองผลิตวัคซีนเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนกำลังลงอย่างมีหลักการสำหรับโรคเมลิออยโดซิส และเพื่อที่จะประเมินศักยภาพในการที่จะนำมาใช้เป็นวัคซีน โดยใช้หนูเป็นโมเดลในการศึกษา การผลิตวัคซีนดังกล่าวจะอาศัยหลักการที่เรียก rational attenuation โดยการกลาย (mutate) จีน *aroC* ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อในร่างกายของโฮส การดำเนินการเริ่มจากการโคลนจีน *aroC* จากเชื้อ *B.pseudomallei* สายพันธ์ PHB111 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย โดยอาศัยวิธีการ complement เชื้อ *E.coli* สายพันธ์ที่จีน *aroC* ถูกทำให้กลายไป การโคลนจีน *aroC* ทำได้โดยการเตรียม partial *Sau*3AI DNA library ขนาด 2-4 Kb จากนั้นนำไป transform เข้าเชื้อ *E.coli aroC* mutant และคัดเลือกโคลนที่ต้องการโดยการเลี้ยงใน M9 minimal medium ได้ complementing clone จำนวน 3 โคลน เลือก plasmid clone ที่มีขนาดเล็กสุด คือ pPHE 146 เพื่อทำการศึกษาต่อถึงตำแหน่งของ *aroC* gene โดยเทียบจาก genome sequence ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่มีรายงานไว้แล้ว ได้ทำการตัด *Xho*I fragment ขนาด 438 bp ซึ่งอยู่ภายใน *aroC* gene ออกไป โคลนที่ได้คือ pPHE149 จะสูญเสียความสามารถในการ complement *E.coli aroC* mutant จากนั้นได้ทำการโคลน *Sma*I/*Hin*dIII fragment ซึ่งมี Δ *aroC* จาก pPHE149 เข้าไปในเวคเตอร์ pEX19Tc ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่มี *sacB* gene ซึ่งใช้เป็น counterselectable marker โคลนที่ถูกต้องที่ได้คือ PHE 150 ถูกนำไป conjugated กับเชื้อ *B.pseudomallei* PHB111 และเลือก transconjugants ที่ต้องการบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 5% sucrose เป็นส่วนผสม จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่พึ่งสาร aromix ซึ่งจะเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ต้องการ คัดเลือกเชื้อที่ต้องการได้ 2 โคลน (PHB116 และ PHB117) และเลือกเชื้อ PHB117 เพื่อศึกษาต่อไป ผลการตรวจยืนยัน genotype โดยวิธี Southern blotting และวิธี PCR ได้ผลถูกต้องโดยไม่มีส่วนของเวคเตอร์แทรกอยู่ในโครโมโซมของเชื้อ PHB 117 ผลการศึกษาโดยการ immunize หนู Balb/c พบว่าเชื้อกลายพันธ์ PHB 116 มีความอ่อนแรงลงอย่างมากโดยมีค่า LD50 มากกว่า 1.96×10^6 cfu ทั้งทาง intraperitoneal และ nasal เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้น PHB111 ซึ่งมีค่า LD50 น้อยกว่า 20 cfu ผลการศึกษาศักยภาพในการใช้เป็นวัคซีน พบว่าการ immunize หนู Balb/c

ทาง intraperitoneal ด้วยเชื้อกลายพันธ์ PHB 117 จำนวนประมาณ 4 x 10^7 cfu ครั้งเดียว หรือสองครั้ง ห่างกัน 2 อาทิตย์ จะไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด protective immnity ในหนู เมื่อ challenge หนูดังกล่าวด้วยเชื้อตั้งต้น PHB111 ในจำนวนเชื้อประมาณ 10 เท่าของจำนวน LD50 ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาเพื่อดูว่า การ immunize หนู ทาง nasal จะคุ้มกันได้หรือไม่ รวมทั้งการศึกษาในหนูสายพันธ์ชนิดเพื่อดูว่าจะแตกต่างจากหนูที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้หรือไม่

Abstract

TE 161671

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