ไฟย์ซาล อับดีชาคูร์ เอช ฮาซซาน : เอกลักษณ์ระดับโมเลกุลของเชื้อ *Escherichia coli* 20 ชนิด จากซากอูฐแรกเกิดในสหรัฐอาหรับเอมิเรตส์ และการผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวต่อเชื้อ *E. coli* (MOLECULAR IDENTIFICATION OF 20 *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM DEAD NEONATAL CAMELS (*Camelus dromedarius*) IN UAE AND GENERATION OF A SINGLE-DOMAIN ANTIBODY (sdAb) AGAINST *E. coli* อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 118 หน้า.

เชื้อ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae หลายชนิดพบเป็นจุลชีพในลำไส้และระบบทางเดินอาหารของลูกสัตว์ โดยส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรคยกเว้นในกรณีที่สัตว์มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในการศึกษานี้เราได้ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อจากลูกอูฐ (*Camelus dromedarius*) ช่วงอายุ 1 ถึง 2 สัปดาห์ ที่ตายด้วยภาวะ colisepticemic และ colibacilosis ในการทดลองแรก เพื่อจำแนกเชื้อ *E. coli* ก่อโรคที่เป็นสาเหตุการตายของลูกอูฐแรกเกิด โดยนำเชื้อ *E. coli* จำนวน 20 ตัวอย่าง ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างซากลูกอูฐ ทำการเพิ่มจำนวนของยีน 16SrRNA *E. coli* ด้วยเทคนิค conventional PCR และใช้เทคนิค real-time PCR ร่วมกับชุดน้ำยา Power Chek Diarrheal *E. coli* 4-plex Real-time PCR Kit I and II (Kogenebiotech, Seoul, Korea) เพื่อตรวจยีน 8 ชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* ก่อโรค พบว่าทุกตัวอย่างแสดงผลเป็นลบ จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ซึ่งแยกเชื้อ *E. coli* ออกเป็น 6 กลุ่ม และพบว่าเชื้อตัวอย่างมีลำดับเบสตรงกับเชื้อ *E. coli* ที่เป็นจุลชีพประจำถิ่นที่ไม่ก่อโรค แต่เนื่องด้วยระบบภูมิคุ้มของลูกอูฐแรกเกิดที่ยังไม่สมบูรณ์ และการได้รับเชื้อเพิ่ม ทั้งทางน้ำนมแม่ที่ปนเปื้อนหรืออาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะทำให้เชื้อ *E. coli* ส่งผลต่อร่างการสัตว์ให้ได้รับความเสียหายและตายในที่สุด

การทดลองที่สอง เป็นการผลิตนาโนบอดียับยั้งลิโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E. coli* (anti *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) nanobody) โดยการเพิ่มจำนวนยีนควบคุมการแสดงออกของลิโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E. coli* จากอูฐที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยอาศัย Flexi® vector (Promega. USA) เพื่อทำการสร้าง VHH library และตัวอย่าง RNA ทั้งหมดที่แยกได้จาก preverbal blood lymphocytes (PBLs) ของอูฐที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันนาน 70 วัน สามารถผลิต DNA ขนาด 400bp จาก VHH primer จากนั้นทำการเชื่อมชิ้นส่วน DNA กับ pF1AT7 Flexi® Vector (Promega USA) ตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ SgfI และ PmeI เพื่อให้ได้ JM109 *E. coli* competent cells ขนาด 6.9 x 10^4 cfu/µg ตาม VHH library จากนั้น สุ่มเลือกเชื้อจำนวน 48 โคโลนี เพื่อเพาะเลี้ยงและทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้ inclusion bodies และ periplasmic protein ต่อลิโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *E. coli*

ในขณะเดียวกัน plasmid DNA ถูกสกัดจาก 48 โคโลนีตัวอย่างและย่อยด้วยเอนไซม์ SgfI และ PmeI หลังจากทำ PCR พบว่า มี 11 โคโลนีให้ผลบวกต่อ VHH gene และสามารถวิเคราะห์

ลำดับเบสด้วย Big Dye terminator kit (Applied Bio systems. USA) ได้จาก 6 โคโลนีตัวอย่าง โดยใช้ฐานข้อมูล GenBank และ IMGT และจากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของ DNA และโปรตีน โดยใช้ Clustal Omega software ซึ่งพบว่าตรงกับลำดับเบสของ VHH gene

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

FAYSAL ABDISHAKUR H HASSAN : MOLECULAR IDENTIFICATION OF 20 *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM DEAD NEONATAL CAMELS (*Camelus dromedarius*) IN UAE AND GENERATION OF A SINGLE-DOMAIN ANTIBODY (sdAb) AGAINST *E. coli*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 118 PP.

ESCHERICHIA COLI/16SrRNA *E.coli*/LIPOPOLYSACHARIDE LPS/VHH LIBRARY/NANOBODY

Escherichia coli is a member of the *Enterobacteriaceae* family. Many *E. coli* strains are predominantly found as commensal flora in the intestine that colonise the gastrointestinal tract of new-born animals. The majority do not cause any disease unless the host is immuno-suppressed. In this study, we fucued microbial sample from dead camel calves (*Camelus dromedarius*) (aged one or two weeks) from postmortem samples identified as colisepticemic or colibacillosis. The first phase of this study was to identify whether any pathogenic *E. coli* is the causative agent of neonatal camel death. Twenty *E. coli* isolates were collected and successfully amplified with conventional PCR of the 16SrRNA *E. coli* gene. Subsequently, we ran the commercial real-time kits Power Chek Diarrheal *E. coli* 4-plex Real-time PCR Kit I and II, which target eight pathogenic *E. coli* genes known to produce diseases, which give negative results for all samples. This occurred even after sequencing and blasting against the GenBank database with the six known pathogenic *E. coli* strains excluded and GenBank data matching only commensal *E. coli* flora. Subsequently, the immune system of new born camels is weak and immature. Therefore, infections of the normal flora may be caused by ingestion of

contaminated mother's milk or unhygienic food where the commensal *E. coli* easily evade host defences leading to host damage or even death.

The second phase of this study involved production of an anti *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) nanobody from the pF1AT7 Flexi® expression vector (Promega. USA) and construction of a VHH library obtained from immunised camels (*Camelus dromedaries*). Total RNA was isolated from peripheral blood lymphocytes (PBLs) collected 70 days after immunization with the experimental camel, 400bp DNA fragment from the VHH primer pair was amplified and ligated into the pF1AT7 Flexi® vector (Promega USA) after digestion with *SgfI* and *PmeI*, two rarely-cutting restriction endonucleases, followed by ligation and transformed by heat shock into JM109 *E. coli* competent cells (Promega USA.). The ligated vector was successfully transformed, resulting in VHH library at the size of 6.9 x 10^4 cfu/µg. Forty-eight randomly picked colonies were cultivated and productive expression was induced then tested by ELISA using inclusion bodies and periplasmic protein on *E. coli* lipopolysaccharide coated plates. Simultaneously, plasmid DNA was isolated from a duplicated set of 48 picked colonies and digested with *SgfI* and *PmeI* enzymes. Then, PCR of the VHH gene was performed and with 11 colonies and six of them were positive, followed by successful sequences with the BigDye terminator kit (Applied Bio systems. USA). Further, samples were analysed with the GenBank database, IMGT database, and multiple sequencing alignment of both DNA and protein using Clustal Omega software on the EBI web site. All analyses were similar to those of VHH in data sequenced before.

School of Biotechnology Student's Signature _____

Academic Year 2017 Advisor's Signature _____