รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อพัฒนาชุดตรวจ

Construction and production of recombinant antibody against antigens of *Schistosoma mekongi* and *Schistosoma japonicum* in mammalian cells for diagnosis

ผศ.ดร.พรอนันต์ เกื้อไข่

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๕๐๐๖๒

สัญญาเลขที่ ๑๙/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อพัฒนาชุดตรวจ

Construction and production of recombinant antibody against antigens of *Schistosoma mekongi* and *Schistosoma japonicum* in mammalian cells for diagnosis

ผศ.ดร.พรอนันต์ เกื้อไข่

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๖๒

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 19/2562

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 19/2562).

บทคัดย่อ

โรคพยาธิใบไม้เลือดนับว่าเป็นโรคติดต่อที่สำคัญโรคหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประชากรโลกมาแล้วหลายประเทศ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดให้โรคนี้เป็นโรคติดต่อในเขตร้อนที่มีความสำคัญเป็นที่สองรองมาจากโรคมาลาเรีย ปัจจุบันประชากรทั้งหมดในโลกคาดว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้เลือด ประมาณ 200 ล้านคน พยาธิใบไม้เลือด (blood flukes) เป็นพยาธิใบไม้ที่ตัวเต็มวัยแยกเพศ คือมีตัวผู้และตัวเมีย พยาธิใบไม้เลือดที่ก่อโรคในมนุษย์หลักๆ มี 4 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi*, *Schitosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobium* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัด RNA ของเชื้อพยาธิแล้วนำมาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณของ CatB2 และ CatL genes โดยการทำ PCR ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ CatB2 หรือ CatL gene ในพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. และศึกษาความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในพยาธิตัวอื่น พบว่าโปรตีน CatB2 และ CatL มี signal peptide ส่วนผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน SmCatB2 กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นๆ โดยเปรียบเทียบกับ *S. japonicum*, *S. mekongi*, *C. sinensis*, *F. hepatica*, *M. musculus*, *B. taurus* และ *H. sapiens* โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ Active sites คือบริเวณ Cysteine Histidine และ Asparagine พบส่วนของ Cysteine residues ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase และได้ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmCatL กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นอื่น โดยเปรียบเทียบกับพยาธิ *S. haematobium* และ *S. japonicum* ซึ่งเป็นพยาธิในกลุ่มเดียวกันกับพยาธิ *S. mansoni* และพยาธิ *F. gigantica*, *F. hepatica*, *P. westermani* และ *C. sinensis* ซึ่งเป็นพยาธิในกลุ่มใกล้เคียง และเปรียบเทียบกับโฮสท์ในธรรมชาติได้แก่ คน หนู และวัว โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ Active sites คือบริเวณ Glutamine Glycine Cysteine Histidine และ Asparagine พบส่วนของ Cysteine residues ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase นอกจากนี้พบส่วนของโปรตีน SmCatL ที่มีการเติม N-glycosylation ที่อะมิโน asparagine และพบบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโนคือ ERFNIN และผู้วิจัยจะทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CatB2 และ CatL ของพยาธิใบไม้เลือดทั้ง 3 สปีชีส์ (*S. mekongi, S.mansoni* และ *S. japonicum*) และจะพัฒนาเป็นชุดตรวจสำหรับโรค schistosomiasis ต่อไปในอนาคต

Keywords : *Schistosoma* spp., cathepsinL, cathepsinB2, cloning, blood flukes

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทนำ	1
เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	3
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
เนื้อเรื่อง	5
รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	12
สรุปผลการวิจัย	23
อภิปรายและวิจารณ์	24
รายงานการเงิน	26
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	28

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หน้า

รูปที่ 1 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. 2
รูปที่ 2 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA 10
รูปที่ 3 แสดงชุดตรวจแบบ ICS 11
รูปที่ 4 Signal peptide ในโปรตีนสังเคราะห์ SmCatB2 14
รูปที่ 5 Phylogenetic tree ของ CatB2 16
รูปที่ 6 Signal peptide ในโปรตีนสังเคราะห์ SmCatL 19
รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ของ SmCatL กับ CatL ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น 22

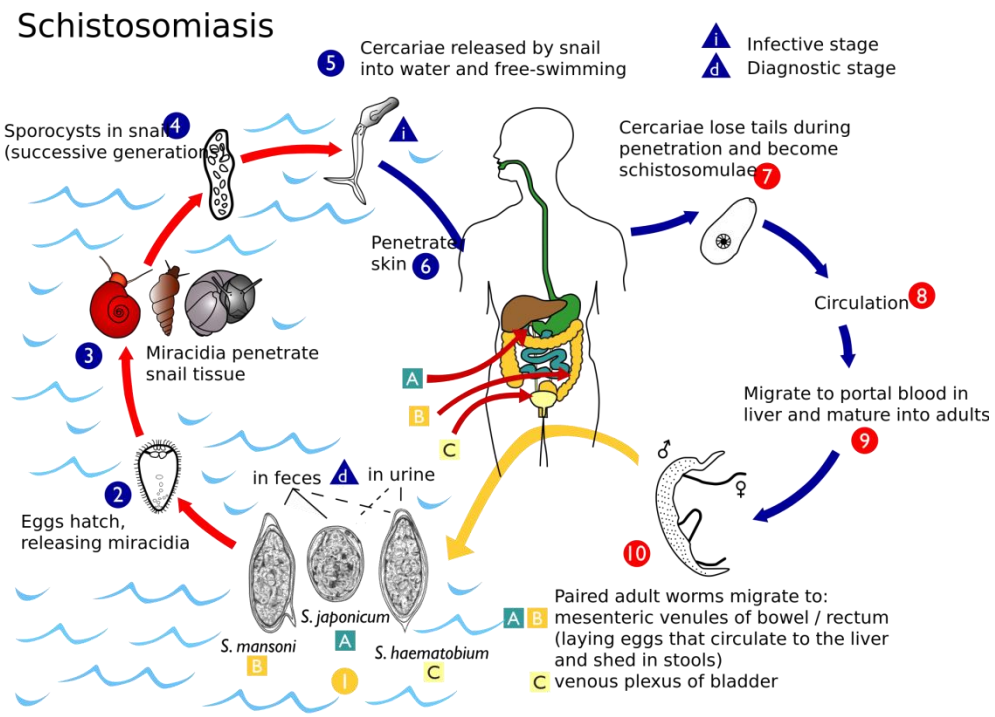
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

CatL	Cathepsin L
CatB	Cathepsin B
Sj	*Schistosoma japonicum*
Smek	*Schistosoma mekongi*
Sm	*Schistosoma mansoni*
Sh	*Schistosoma hematobium*
r	recombinant
cDNA	Complementary DNA
PCR	Polymerase chain reaction

บทนำ (Introduction)

เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

โรคพยาธิใบไม้เลือดนับว่าเป็นโรคติดต่อที่สำคัญโรคหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประชากรโลกมาแล้วหลายประเทศ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดให้โรคนี้เป็นโรคติดต่อในเขตร้อนที่มีความสำคัญเป็นที่สองรองมาจากโรคมาลาเรีย ปัจจุบันประชากรทั้งหมดในโลกคาดว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้เลือด ประมาณ 200 ล้านคน พยาธิใบไม้เลือด (blood flukes) เป็นพยาธิใบไม้ที่ตัวเต็มวัยแยกเพศ คือมีตัวผู้และตัวเมีย พยาธิใบไม้เลือดที่ก่อโรคในมนุษย์หลักๆ มี 4 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi*, *Schitosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobium* ในประเทศลุ่มแม่น้ำโขง เช่น ลาว กัมพูชา รวมถึงประเทศไทยมีการรายงานการระบาดการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด 2 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi* และ *Schitosoma japonicum* ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยเฉพาะตังหวัดที่ติดลุ่มน้ำโขง เช่น จังหวัดอุบลราชธานี (Colley et al., 2014; Ohmae et al., 2004) โรคพยาธิใบไม้เลือด schistosomiasis มีสาเหตุเกิดจากการสัมผัสน้ำจากแหล่งน้ำจืดธรรมชาติที่มีตัวอ่อนระยะติดต่อ (cercariae) โดยมีหอยเป็นตัวช่วยให้พยาธินี้เจริญต่อไป พยาธิสภาพส่วนใหญ่เกิดจากการที่พยาธิตัวแก่ใช้ sucker ดูดเกาะผนังหลอดเลือดดำ ซึ่งทำให้เกิดระคายเคือง เกิดลักษณะเป็น granuloma ขึ้นมา ในรายที่เป็นมากๆ ทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อในตับหรือลำไส้ ผู้ป่วยมีอาการตับและม้ามโต ถ่ายเป็นมูกเลือด เป็นต้น วงจรชีวิตของ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* เริ่มจากไข่พยาธิที่ปนมากับอุจจาระของคนที่ติดเชื้อลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ไข่ก็จะฟักกลายเป็นตัวอ่อนระยะ miracidium แล้ว miracidium ก็จะไชเข้าสู่หอยที่เป็นตัวกลางของพยาธิชนิดนี้ หลังจากนั้น miracidium ก็จะเจริญเป็นระยะต่างๆ ในหอย สุดท้ายตัวอ่อนระยะ cercariae ออกมาจากหอยเมื่อคนมาสัมผัสแหล่งน้ำที่มี cercariae พยาธิก็จะไชผ่านผิวหนังของคนทำให้ด้รับเชื้อไป และเมื่อ cercariae เข้าร่างกายมันจะเคลื่อนที่เข้าหลอดเลือดและจะเจริญ พัฒนาเป็นตัวเต็มวัยที่ตับ แล้วตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียก็จะเข้าคู่กันและเคลื่อนที่ไปอยู่ที่หลอดเลือดดำที่ผนังลำไส้ต่อไป



รูปที่ 1 แสดง วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp.

พยาธิสภาพของการติดเชื้อ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* แบ่งเป็น 2 ระยะใหญ่ๆ คือ acute และ chronic schistosomiasis โดย acute schistosomiasis มักมีอาการที่สำคัญ คือ ปวดท้อง ท้องขึ้น ท้องเฟ้อ ปวดเจ็บบริเวณตับ มีไข้เป็นๆ หายๆ เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย และผอมลง และเมื่อพยาธิเข้าสู่ตัวเต็มวัย มีการปล่อยไข่ออกมาและร่างกายของคนที่ติดเชื้อจะมีการตอบสนองต่อไข่ทำให้เกิด immune complex ขึ้น ซึ่ง immune complex นี้จะถูกกำจัด เป็นผลทำให้ตับ และ ม้ามโตได้ และกรณีที่มี polymorphonuclear cell (PMN) ที่มาล้อมรอบไข่ที่ถูกปล่อยออกมาจากพยาธิทำให้เกิด granuloma ขึ้น ในบริเวณที่มี granuloma ไข่ที่ฝังอยู่ใต้เยื่อบุผนังลำไส้มักจะทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียงทำให้เกิดการอักเสบและมี fibrous พร้อมกับการมีแคลเซียมมาพอกรอบๆไข่เหล่านี้ (Richter et al., 2016; Keang et al., 2007; Dumurgier et al., 1990; Monchy et al., 1990) ส่วน chronic schistosomiasis พยาธิสภาพเกิดได้หลายๆ ตำแหน่ง เช่น ตับ ลำไส้ ซึ่งมักจะเป็นการอักเสบและในลำไส้อาจพัฒนาไปเป็นมะเร็งลำไส้ได้

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ *Schitosoma japonicum* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของคนที่ติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์ จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนาวิธีตรวจการติดโรคพยาธิโดยใช้เทคนิค immunoassay เพื่อให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ อย่างไรก็ตามจนถึงบัดนี้ก็ยังไม่สามารถใช้วิธี immunoassay ทดแทนวิธีตรวจไข่ในอุจจาระได้ และการวิจัยและการพัฒนาการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Schistosoma mekongi* และ *Schitosoma japonicum* ยังมีน้อย และแอนติเจนที่ใช้ไม่ค่อยมีความจำเพาะและวิธีตรวจยังมีความไว (Sensitivity) ไม่สูงพอ (Sangfuang et al., 2016) อีกทั้งยังไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเสาะหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะสูง

และวิธีในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของพยาธิ และในวิจัยพัฒนาชุดตรวจที่ผ่านมานั้นใช้แอนตอบอดีที่เป็นโมโนโคนอลและโพลีโคนอลแอนติบอดี ซึ่งมีข้อเสียในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมในด้านคุณภาพของชุดตรวจ เนื่องจากโพลีโคนอลแอนติบอดีที่ผลิตไม่สามรถควบคุมคุณภาพได้เพราะการตอบสนองของสัตว์แต่ละตัวแต่ละรอบที่ผลิตไม่เหมือนกัน ส่วนโมโนโคนอลแอนติบอดีนั้นเป็นแบบเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำให้ไม่มีความสเถียรในการสร้างแอนติบอดีและเมื่อเลี้ยงไปนานๆจะทำให้การสร้างแอนติบอดีลดลง จึงเป็นปัญหาในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ดังนั้นคณะวิจัยซึ่งได้เห็นแนวโน้มที่จะสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรค schistosomiasis ด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีแทนเพื่อให้การสร้างแอนติบอดีมีความคงตัว คณะวิจัยจึงเห็นว่าควรมีการสร้างและพัฒนาชุดตรวจ ให้เป็นนวัตกรรมที่สร้างขึ้นจากคนไทย ซึ่งจะสามารถแก้ใขปัญหาโรคพยาธิใบไม้เลือดในประเทศได้

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคพยาธิใบไม้เลือดนับว่าเป็นโรคติดต่อที่สำคัญโรคหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประชากรโลกมาแล้วหลายประเทศ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดให้โรคนี้เป็นโรคติดต่อในเขตร้อนที่มีความสำคัญเป็นที่สองรองมาจากโรคมาลาเรีย ปัจจุบันประชากรทั้งหมดในโลกคาดว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้เลือด ประมาณ 200 ล้านคน พยาธิใบไม้เลือด (blood flukes) เป็นพยาธิใบไม้ที่ตัวเต็มวัยแยกเพศ คือมีตัวผู้และตัวเมีย พยาธิใบไม้เลือดที่ก่อโรคในมนุษย์หลักๆ มี 4 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi*, *Schitosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobium* ในประเทศไทยมีการรายงานการระบาดการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด 2 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi* และ *Schitosoma japonicum* ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยเฉพาะตังหวัดที่ติดลุ่มน้ำโขง เช่น จังหวัดอุบลราชธานี โรคพยาธิใบไม้เลือด schistosomiasis มีสาเหตุเกิดจากการสัมผัสน้ำจากแหล่งน้ำจืดธรรมชาติที่มีตัวอ่อนระยะติดต่อ (cercariae) โดยมีหอยเป็นตัวช่วยให้พยาธินี้เจริญต่อไป พยาธิสภาพส่วนใหญ่เกิดจากการที่พยาธิตัวแก่ใช้ sucker ดูดเกาะผนังหลอดเลือดดำ ซึ่งทำให้เกิดระคายเคือง เกิดลักษณะเป็น granuloma ขึ้นมา ในรายที่เป็นมากๆ ทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อในตับหรือลำไส้ ผู้ป่วยมีอาการตับและม้ามโต ถ่ายเป็นมูกเลือด เป็นต้น วงจรชีวิตของ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* เริ่มจากไข่พยาธิที่ปนมากับอุจจาระของคนที่ติดเชื้อลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ไข่ก็จะฟักกลายเป็นตัวอ่อนระยะ miracidium แล้ว miracidium ก็จะไชเข้าสู่หอยที่เป็นตัวกลางของพยาธิชนิดนี้ หลังจากนั้น miracidium ก็จะเจริญเป็นระยะต่างๆ ในหอย สุดท้ายตัวอ่อนระยะ cercariae ออกมาจากหอยเมื่อคนมาสัมผัสแหล่งน้ำที่มี cercariae พยาธิก็จะไชผ่านผิวหนังของคนทำให้ได้รับเชื้อไป และเมื่อ cercariae เข้าร่างกายมันจะเคลื่อนที่เข้าหลอดเลือดและจะเจริญ พัฒนาเป็นตัวเต็มวัยที่ตับ แล้วตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียก็จะเข้าคู่กันและเคลื่อนที่ไปอยู่ที่หลอดเลือดดำที่ผนังลำไส้ต่อไป

พยาธิสภาพของการติดเชื้อ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* แบ่งเป็น 2 ระยะใหญ่ๆ คือ acute และ chronic schistosomiasis โดย acute schistosomiasis มักมีอาการที่สำคัญ คือ ปวดท้อง ท้องขึ้น ท้องเฟ้อ ปวดเจ็บบริเวณตับ มีไข้เป็นๆ หายๆ เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย และผอมลง และเมื่อพยาธิเข้าสู่ตัวเต็มวัย มีการปล่อยไข่ออกมาและร่างกายของคนที่ติดเชื้อจะมีการตอบสนองต่อไข่ทำให้เกิด

immune complex ขึ้น ซึ่ง immune complex นี้จะถูกกำจัด เป็นผลทำให้ตับ และ ม้ามโตได้ และกรณีที่มี polymorphonuclear cell (PMN) ที่มาล้อมรอบไข่ที่ถูกปล่อยออกมาจากพยาธิทำให้เกิด granuloma ขึ้น ในบริเวณที่มี granuloma ไข่ที่ฝังอยู่ใต้เยื่อบุผนังลำไส้มักจะทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียงทำให้เกิดการอักเสบและมี fibrous พร้อมกับการมีแคลเซียมมาพอกรอบๆไข่เหล่านี้ ส่วน chronic schistosomiasis พยาธิสภาพเกิดได้หลายๆ ตำแหน่ง เช่น ตับ ลำไส้ ซึ่งมักจะเป็นการอักเสบและในลำไส้อาจพัฒนาไปเป็นมะเร็งลำไส้ได้

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ *Schitosoma japonicum* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของคนที่ติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์ จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนาวิธีตรวจการติดโรคพยาธิโดยใช้เทคนิค immunoassay เพื่อให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ อย่างไรก็ตามจนถึงบัดนี้ก็ยังไม่สามารถใช้วิธี immunoassay ทดแทนวิธีตรวจไข่ในอุจจาระได้ และการวิจัยและการพัฒนาการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Schistosoma mekongi* และ *Schitosoma japonicum* ยังมีน้อย และแอนติเจนที่ใช้ไม่ค่อยมีความจำเพาะและวิธีตรวจยังมีความไว (Sensitivity) ไม่สูงพอ อีกทั้งยังไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเสาะหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะสูงและวิธีในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของพยาธิ และในวิจัยพัฒนาชุดตรวจที่ผ่านมานั้นใช้แอนตอบอดีที่เป็นโมโนโคนอลและโพลีโคนอลแอนติบอดี ซึ่งมีข้อเสียในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมในด้านคุณภาพของชุดตรวจ เนื่องจากโพลีโคนอลแอนติบอดีที่ผลิตไม่สามรถควบคุมคุณภาพได้เพราะการตอบสนองของสัตว์แต่ละตัวแต่ละรอบที่ผลิตไม่เหมือนกัน ส่วนโมโนโคนอลแอนติบอดีนั้นเป็นแบบเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำให้ไม่มีความสเถียรในการสร้างแอนติบอดีและเมื่อเลี้ยงไปนานๆจะทำให้การสร้างแอนติบอดีลดลง จึงเป็นปัญหาในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ดังนั้นคณะวิจัยซึ่งได้เห็นแนวโน้มที่จะสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรค schistosomiasis ด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีแทนเพื่อให้การสร้างแอนติบอดีมีความคงตัว คณะวิจัยจึงเห็นว่าควรมีการสร้างและพัฒนาชุดตรวจ ให้เป็นนวัตกรรมที่สร้างขึ้นจากคนไทย ซึ่งจะสามารถแก้ไขปัญหาโรคพยาธิใบไม้เลือดในประเทศได้

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อแอนติเจนของ *Schistosoma mekongi* และ *Schitosoma japonicum* เพื่อพัฒนาศักยภาพของชุดตรวจให้สามารถตรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ *Schitosoma japonicum* ได้ทุกระยะของการติดเชื้อ เพื่อการผลิตเชิงอุสาหกรรม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวาร

คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์บทความวิชาการในวารสารนานาชาติที่มี impact factor ค่อนข้างดี (Q1 หรือ Q2) ได้ไม่น้อยกว่า 1 บทความ

หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. โรงพยาบาล และบุคลากรทางการแพทย์
2. กระทรวงสาธารณสุข
3. ประชาชนทั่วไป

เนื้อเรื่อง (Main body)

รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

การโคลนยีนและผลิตรีคอมบริแนนท์โปรตีน ศึกษาคุณลักษณะของจีน และโปรตีนเป้าหมาย

การสังเคราะห์ recombinant proteins

กระบวนการผลิต recombinant proteins ของจีนเป้าหมายจะกระทำโดยใช้ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b และ pET-21b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของจีนและสุดท้ายทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ หลักจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มาศึกษาคุณลักษณะโดยวิธี ต่างๆ เช่น PCR, real time PCR, western blot, ELISA, immunohistochemistry เป็นต้น

การโคลนยีนที่สร้างแอนติบอดี

ทำการสกัด total RNA ของเซลล์ hybridoma โดยสารละลาย TRIzol (Invitrogen) วิธีการสกัดทำตามวิธีที่แนะนำในหนังสือคู่มือสารละลาย RNA ที่ได้ต้องมีคุณภาพดีและไม่มี DNA ปน เปื้อน โดยจะทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้เพื่อสังเคราะห์ cDNA

การสังเคราะห์ cDNA ทำได้โดยใช้ RNA ที่สกัดได้เป็นสายต้นแบบ (template) โดยมี oligo dT เป็น primer สำหรับให้เอนไซม์ RNA reverse transcriptase สามารถสร้างสาย cDNA complementary กับ RNA ต้นแบบได้ และทำการโคลนยีนที่สร้างแอนติบอดี ด้วยวิธี PCR จากนั้นนำยีนที่โคลนได้มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGTM-T Easy เพื่อทำการหาลำดับเบสว่าเป็นเป็นยันที่สร้างแอนติบอดี จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนเก็บไว้เพื่อเป็นต้นแบบในการทำ recombinant monoclonal antibody ต่อไป

การสังเคราะห์ recombinant antigen และ recombinant monoclone antibody

กระบวนการผลิต recombinant antigen ของจีนเป้าหมาย และ recombinant monoclone antibody จะกระทำโดยใช้ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b และ pET-21b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของจีนและสุดท้ายทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การพัฒนาและทดสอบวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ

การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb)

นำ recombinant proteins ฉีดเข้าช่องท้องของหนูทดลอง (intraperitoneal injection) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนในหนูทดลองสร้างและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในม้าม โดยการฉีดกระตุ้นจำนวน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะฉีดห่างกัน 3 สัปดาห์ จากนั้นทำการฉีดเข้าเส้นเลือดบริเวณ หาง (tail vein) ก่อนทำการแยกเซลล์ม้าม 3 วัน เมื่อครบกำหนดทำการแยกเซลล์ม้ามที่ได้จากหนูที่มีการฉีดกระตุ้นเพื่อใช้สำหรับเชื่อมกับเซลล์ myeloma

นำเซลล์ myeloma และเซลล์ม้ามมาทำการเชื่อมต่อกันด้วย polyethyleneglycol (PEG) นำเซลล์ hybridoma ที่ได้หยอดลงใน 96 well plate แล้วนำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมปริมาณ CO_2 ที่ร้อยละ 5 และทำการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี limiting dilution หลังจากนั้นจึงคัดเลือกโคลนด้วย enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และ enzyme linked immunoelectrotransfer blot (EITB) ทำการตรวจหา class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Immunopure Monoclonal Antibody Isotyping kit (HRP/ABTS) (PIERCE) ซึ่งใช้หลักการ sandwich ELISA

การผลิตรีคอมบิแนนท์โมโนโคนอลแอนติบอดี (rMoAb)

การโคลนยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาวและสายสั้นเข้าสู่ pGEM-T vector นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีน ES ของพยาธิ *S. mekongi* และ *S. japonicum* มาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด Gencatch™ total RNA miniprep (Epoch life sciences) จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA ของโมเลกุลแอนติบอดีสายยาวด้วย MuIgCHgamma reverse primer (5′-CTGGACAGGG ATCCAGAGTTCCA-3′) และ cDNA ของโมเลกุลแอนติบอดีสายสั้นด้วย MuIgCLKappa reverse primer (5′-CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAC-3′)จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีสายยาวและสายสั้นด้วยเทคนิค RACE-PCR โดยนำ cDNA ของโมเลกุลสายยาวและสายสั้นที่สังเคราะห์ขึ้นมาเติม homopolymeric dG ที่บริเวณปลาย 5′ โดยใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้RACE dCTP forward primer และ MuIgCHgammaNested reverse primer (5′-TARCCYTTGACMAGGCATCC-3′) สำหรับยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาว ส่วนยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายสั้นนั้นจะใช้ RACE dCTP forward

primer (5′CAAGGAATTCCCCCCCCCCCCCC-3′) และ MuIgCLKappa Nested reverse primer (5′-CGTTCACT GCCATCAATC-3′) นำชิ้นยีนโมเลกุลสายยาวและสายสั้นที่ได้มาเติม singledA ที่บริเวณปลาย 3′ ด้วยเอนไซม์ Ex taq DNA polymerase จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector แล้วนำเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ DH5α ด้วยเทคนิค heat shock transformation และทำการคัดเลือก transformant บนอาหารที่จำเพาะ โดยสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบ recombinant clone ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้T7 promoter forward primer (5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′) และ MuIgCHgammaNested reverse primer สำหรับยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาว ส่วนยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายสั้นนั้นจะใช้ T7 promoter forward primer และ MuIgCLKappaNested reverse primer จากนั้นน า recombinant clone ที่มีชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาวและสายสั้นมาเพาะเลี้ยงและสกัด recombinant plasmid ด้วยชุดสกัด Gencatch™ plus plasmid DNA miniprep (Epoch life sciences) น า recombinant plasmid ที่ได้มาทำปฏิกิริยาPCR sequencing โดยใช้ T7 promoter forward primer จากนั้นนำ PCR products ที่ได้มาอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดี (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและโมเลกุลสายสั้นสำหรับนำมาใช้ในการออกแบบไพร์เมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนส่วน variable region ต่อไป การโคลนยีนส่วน variable region เข้าสู่ mammalian expression vector นำ recombinant plasmid ที่บรรจุชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนส่วน variable region ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ HB3VH forwardprimer (5′-CTGCTTAAGGG CGTCCAATGCGAAGTGAAACTGGTGGAGTCT-3′) คู่กับ HB3VH reverse primer (5′-ACTAGGGCCCTT TGTGCTAGAGGAGACTGTGAGAGTGGT-3′) สำหรับโมเลกุลสายยาวซึ่งออกแบบให้มี AflII restriction site ที่ปลาย 5′ ของ forward primer และ PspOMI restriction site ที่ปลาย 3′ ของ reverse primer ส่วนโมเลกุล สายสั้นจะใช้ HB3VL forward primer (5′ACCACCGCCGACATTGTGATGACCCAGTCT-3′) คู่กับ HB3VL reverse primer (5′-TTCCAGCTTTGTCCCACCGCCGAA-3′) จากนั้นนำยีนส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและเวกเตอร์ pcDNA3.4-CHγ ที่บรรจุยีนส่วน constant region ชนิด gammaของมนุษย์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ AflII และ PspOMI แล้วจึงเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับเวกเตอร์สำหรับยีนส่วน variable region ของโมเลกุลสายสั้นนั้นจะนำมาเติมหมู่ฟอสเฟตที่บริเวณปลาย 5′ โดยใช้เอนไซม์ T4 polynucleotide kinase แล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pcDNA3.4-CLK ที่บรรจุชิ้นยีนส่วน constant region ชนิด kappa ของมนุษย์ที่นำหมู่ฟอสเฟตที่บริเวณปลาย 5′ ออก จากนั้นนำเวกเตอร์ที่เชื่อมต่อกับชิ้นยีนแล้วเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ DH5α ด้วยเทคนิค heat shock transformation และทำการคัดเลือก transformant บนอาหาร 2XYT-AG agar หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารมาตรวจสอบ recombinant clone ที่มีชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลในส่วน variable region ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ XbaIKozHuHleader forward primer (5′-

GACTCTAGAGGATCGAACCCTGCCGCCACCATGGAGTTCGGA-3′) คู่กับ pcDNA3.4 reverse primer (5′-CAACATAGTTAAGAATACCAGTC-3′) สำหรับตรวจสอบโมเลกุลสายยาว และ XbaIKozHuKleader forward primer (5′-GACTCTAGAGGATCGAACCCTGCCGCCACCATGGAGA CTCCA-3′) คู่กับ pcDNA3.4 reverse primer สำหรับโมเลกุลสายสั้น จากนั้นนำ recombinant clone ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2XYT-A broth และสกัด recombinant plasmid มาทำปฏิกิริยา PCR sequencing โดยใช้ CMVpSeq forward primer (5′-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3′) และนำ PCR products ที่ได้มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและสายสั้น เพื่อคัดเลือก recombinant plasmid ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องเพื่อนำไปใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อไป

การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนตบิอดีและการทำแอนติบอดีให้มีความบริสุทธ์นำ heavy chain recombinant plasmid และ light chain recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์human embryonic kidney 293-F (invitrogen) โดยใช้ Gencarrier-1™ transfection reagent (Epoch life sciences) จากนั้นนำ transfected เซลล์ไปเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วันจึงเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาแยกรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค affinity chromatography โดยใช้โปรตีน A sepharose™ (GE Healthcare) หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ได้มาตรวจสอบคุณลักษณะเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ western blot ตามลำดับการวิเคราะห์ค่า antibody titer และ sensitivity ในการตรวจหาการติดเชื้อ Fasciolosis ด้วยเทคนิค sandwich ELISA และ Dot-ELISA ดังกล่าวมาข้างต้น และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความไวและ ความจำเพาะต่อ Fasciolosis โดยใช้สูตรคำนวณของ Lalkhen และ McCluskey (2008)

การตรวจคุณลักษณะของ MoAb ด้วยวิธี immunoblotting

เมื่อได้ MoAb แล้วเราจะนำ MoAb ไปตรวจการทำปฏิกิริยากับ recombinant proteins เป้าหมายและโปรตีนธรรมชาติชนิดเดียวกันที่มีอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพยาธิ เช่น ภายในตัว (whole body proteins) โปรตีนจากชั้นผิว (tegument proteins-TA) และโปรตีนจากสารขับถ่ายและคัดหลั่งจากพยาธิ (excretory-secretory protein-ES)

การสกัดโปรตีนแอนติเจนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิเพื่อนำมาทดสอบกับ MoAb

นำพยาธิตัวเต็มวัยที่เก็บจากตับหนูที่เชื้อที่มาสกัดโปรตีนจากชั้นผิว (TA) ใน extracting buffer ซึ่งประกอบด้วย 1XPBS pH 7.4 ที่มี 1% (v/v) nonidet P-40, 1% (w/v) sodium deoxycholate, และ 0.025% (w/v) phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) โดยแช่พยาธิเป็นเวลา 30 นาที นำชั้น TA ที่หลุดออกมาไป sonicate โดยใช้ ultrasonic disintegrator ที่ amplitude 10-14 micron นาน 1 นาที ทำ 5 รอบ นำ suspension มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 xg ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส นาน 15 นาที นำ supernate ที่ได้มาวัดความเข้มข้นของโปรตีน จากนั้นเก็บ supernate ที่มี TA แอนติเจน ไว้ที่ -20° เซลเซียส เพื่อนำมาทำการทดสอบต่อไป ส่วนลำตัวของพยาธิที่เหลือจะถูกสกัดต่อไป และ homogenized จนละเอียดแล้วปั่นเอา supernatant ที่มี whole body (WB) แอนติเจนเก็บไว้ใช้ต่อไป ส่วน excretory-secretory

(ES) แอนติเจน ได้จากการ incubate พยาธิตัวเต็มวัยเป็น ๆ ที่เก็บมาจากตับโคใน RPMI medium 2 ชั่วโมง แล้วเก็บ medium เพื่อนำไปปั่นตกตะกอน ส่วน supernatart คือ ES แอนติเจนที่จะเก็บไว้ใช้ต่อไป

การแยกโปรตีนโดยใช้ sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำ supernates ที่ได้ข้างต้น และ recombinant proteins มาทำการแยกโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE ด้วยวิธีของ Laemmli, 1970 โดยนำ supernate ที่มีปริมาณโปรตีน 25 μg มาแยกในส่วน SDS-polyacrylamide mini-slab gel ที่มี 10% acrylamide separating gel และ 3% acrylamide stacking gel ทำการ electrophoresis ใน running buffer ที่มี 25 mM Tris, 192 mM glycine และ 0.1% SDS, pH 8.3 โดยใช้ ที่ความต่างศักย์ 200 V ที่อุณหภูมิ 10-15° เซลเซียส

Western blotting

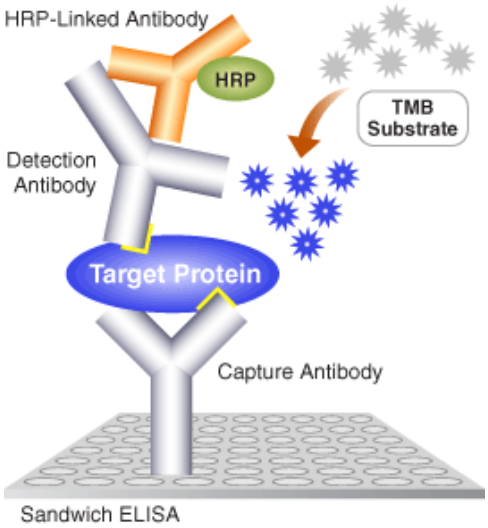
หลังจากทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้ว ทำการย้ายโปรตีนจาก gel สู่ PVDF membrane ใน transferring buffer ที่มี 40 mM Tris, pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 20% (v/v) methanol, และ 0.05% SDS ทำการย้ายโปรตีนโดยใช้ constant voltage ที่ 10 v, อุณหภูมิ 10-15° เซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (over-night) ใช้ Mini Trans-Blot^{R} transfertank

นำแผ่น PVDF membrane ที่ได้มา block ด้วย 3% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween-20 ใน 1XPBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย PBST (ประกอบด้วย PBS pH 7.4 ที่มี 0.1% (v/v) Tween-20) นำแผ่น membrane ที่ถูก block แล้วมาทำการตรวจหาโปรตีนที่เป็นแอนติเจนเป้าหมาย โดยใช้ monoclonal antibodies ที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย 1XPBS-Tween นานครั้งละ 10 นาที ทำการตรวจปฏิกิริยาการจับระหว่าง antigen และ antibody ที่เกิดขึ้น โดยใส่ horseradish peroxidase – conjugated secondary antibody บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย 1XPBS-Tween เติม peroxidase substrate solution ที่มี 1.3 mM diaminobenzidine (DAB), 0.02% (v/v) H_2O_2 ใน PBS pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่น membrane แช่ในน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง แล้วนำมาวิเคราะห์ผล ในการทำ SDS-PAGE ใช้ pre-stained protein markers เป็น molecular weight control

การนำ MoAb และ recombinant proteins ไปพัฒนาวิธีตรวจการติดเชื้อพยาธิ

การพัฒนาวิธีตรวจแบบ sandwich ELISA

เป็นวิธีที่มี sensitivity สูงใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และ *S. japonicum* ขั้นตอน ในการตรวจหาแอนติเจนดังกล่าวแสดงโดยย่อ โดยแผนผังและภาพประกอบ ดังนี้



รูปที่ 2 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA

เคลือบ ELISA plate ด้วย แอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเป้าหมาย

↓

ใส่โมโนโคลนัลแอนติบอดี (capture antibody) ลงในหลุมของ ELISA plate

↓

ใส่ skim milk เพื่อ block non specific binding

↓

ใส่ซีรั่มสัตว์ที่ติดเชื้อลงในหลุมของ ELISA plate

↓

ใส่โพลีโคลนัลแอนติบอดี ต่อแอนติเจนเป้าหมายที่เชื่อมกับ biotin (detection antibody)

↓

ใส่ streptavidin-HRP ลงในหลุมของ ELISA plate

↓

ใส่ TMB substrate ลงในหลุมของ ELISA plate

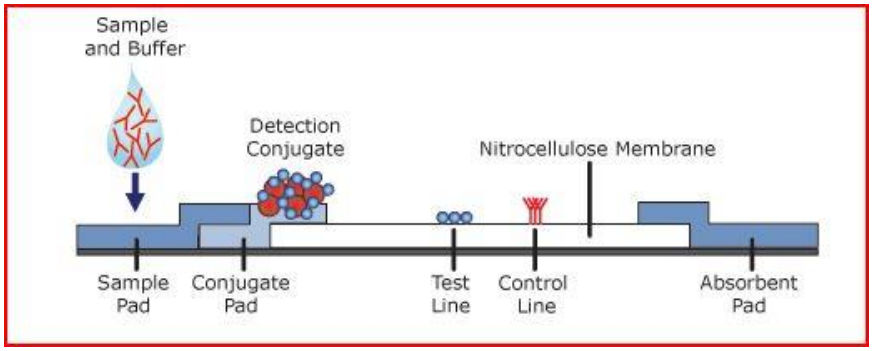
↓

หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N HCl แล้วอ่าน OD

แผนภูมิที่ 1 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA

***การพัฒนาวิธีตรวจสอบ immuno-chromatography* (Immunochromatographic strip (ICS) test)**

ICS test ใช้หลักการของ immunochromatography เป็นการตรวจสอบชนิด rapid qualitative หรือ semi-quantitative ใช้สำหรับตรวจแอนติเจนเป้าหมาย ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ เลือด และซีรั่ม เป็นต้น



รูปที่ 3 แสดงชุดตรวจแบบ ICS

ICS ประกอบด้วย ส่วนสำคัญ 4 ส่วน ได้แก่ sample pad, conjugate release pad, analytical membrane และ wicking (absorbent) pad (ดูภาพประกอบ)

1. Sample pad เป็นส่วนที่ใช้ใส่ตัวอย่างที่ต้องการตรวจ ตัวอย่างจะเคลื่อนที่โดย capillary action ไปยังส่วน conjugate release pad และ analytical membrane
2. Conjugate release pad เป็นส่วนที่ประกอบด้วย โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles ที่จำเพาะต่อแอนติเจนเป้าหมาย
3. Analytical lines เป็นส่วนที่ประกอบด้วย โพลีโคลนัลแอนติบอดี ต่อแอนติเจนซึ่งเป็นบริเวณทดสอบ (capture line) และ แอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles ซึ่งเป็นบริเวณควบคุม (control line)
4. Absorbent pad เป็นส่วนที่ใช้ในการควบคุมการเคลื่อนตัวของแอนติเจน ในตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

การแปลผลการทดสอบของ ICS test

เมื่อหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ เช่น เลือด ในบริเวณ sample pad ตัวอย่างดังกล่าว จะเคลื่อนตัวโดย capillary action ในกรณีที่ตัวอย่างมีแอนติเจนปนอยู่จะเกิดแถบสีขึ้น 2 แถบซึ่งมาจากแอนติเจนที่จับตัวกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles เป็น antibody-antigen complex เคลื่อนตัวไปจับกับ โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนี้ในบริเวณทดสอบ (capture line) และ มาจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particlesจับตัวกับแอนติบอดีต่อโมโนโคลนัล แอนติบอดีที่บริเวณควบคุม (control line) แต่ในกรณีที่ตัวอย่างไม่มีแอนติเจนปนอยู่ จะเกิดแถบสีขึ้นเพียงแถบเดียวจากโมโนโคลนัล

แอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles จับตัวกับแอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่บริเวณควบคุม (control line) จากข้อมูลที่ได้จะนำคู่ MoAb และ PoAb และแอนติเจนที่แสดงผลดีที่สุดไป พัฒนาเป็นวิธีตรวจสอบ ที่จะนำไปใช้ในภาคสนามต่อไป

ผลการวิจัย (Results)

การโคลนยีน Cathepsin B2 (SmCatB2)

ทำการเชื่อมยีน SmCatB2 ของพยาธิใบไม้ตับ *Schistosoma mansoni* เข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector (DNA ligation) แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของ *E.coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation ต่อมานำเชื้อไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและนำไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในเชื้อ *E.coli* DH5α โดยทำการเลือกเชื้อที่เพาะเลี้ยงมาโคโลนี 10 colonies เพื่อนำมาตรวจสอบหายีน CatB2 ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

การสกัดพลาสมิดและการหาลำดับเบสของโคลน SmCatB2

นำโคลนเลี้ยงใน LB broth ที่มียา ampicillin ผสมอยู่ บ่มที่ 37 °C เขย่าตลอด เวลา เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดแล้วส่งทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ถัดมาได้นำผลการทำ DNA sequencing มาแปลรหัสจากลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโน

การเปรียบลำดับกรดอะมิโน

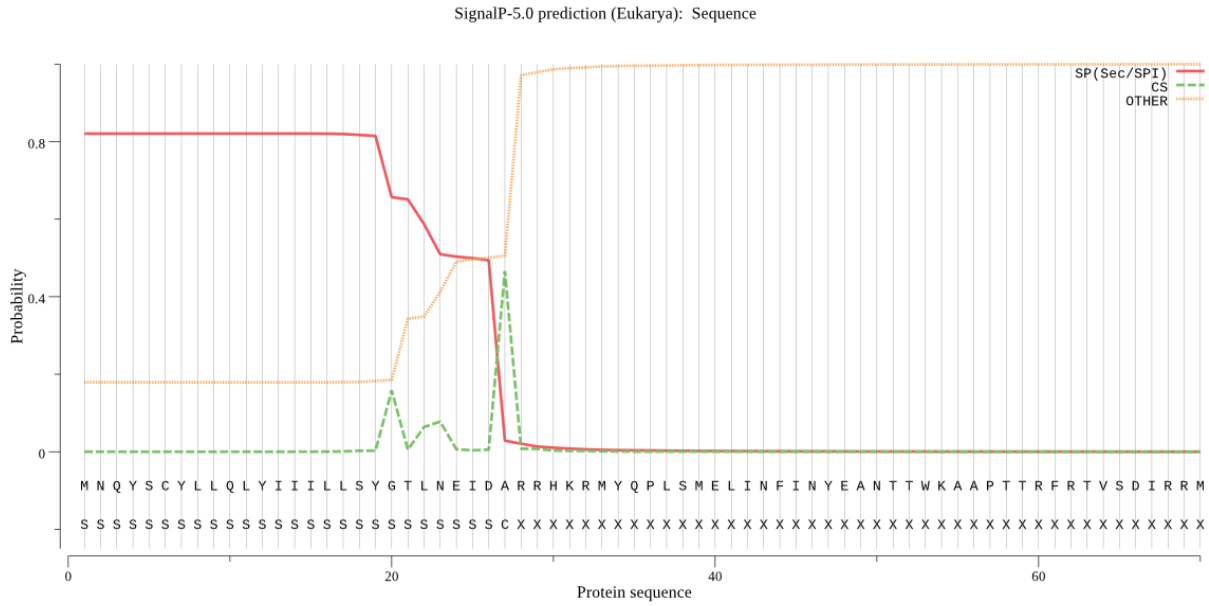
ลำดับต่อมาทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลเพื่อตรวจสอบดูความเหมือนกันระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน SmCatB2 กับโปรตีน CatB2 ในพยาธิ *Schistosoma mansoni* ได้ผลดังนี้

```
J1_T7       MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
J2_T7       MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
J3_T7       MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
J5_T7       MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
J1_SP6      MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
J2_SP6      MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
J5_SP6      MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
J4_T7       MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
J3_SP6      MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
J4_SP6      MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR    60
            ************************************************************

J1_T7       FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
J2_T7       FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
J3_T7       FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
J5_T7       FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
J1_SP6      FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
J2_SP6      FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
J5_SP6      FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
J4_T7       FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
J3_SP6      FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
J4_SP6      FRTVSDIRRMLGALPDPNGEQLETLCTGYISDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRDQSSCG    120
```

```
                ************************************************************

J1_T7           SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
J2_T7           SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
J3_T7           SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
J5_T7           SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
J1_SP6          SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
J2_SP6          SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
J5_SP6          SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
J4_T7           SCWAFGAVEAMSDRICIRSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
J3_SP6          SCWAFGAVEAMSDRICIRSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
J4_SP6          SCWAFGAVEAMSDRICIRSKGKHKPFLSAENLVSCCSSCGMGCNGGFPHSAWLYWKNQGI    180
                *****************:******************************************

J1_T7           VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
J2_T7           VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
J3_T7           VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
J5_T7           VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
J1_SP6          VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
J2_SP6          VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
J5_SP6          VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
J4_T7           VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
J3_SP6          VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
J4_SP6          VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPYEKDKWYGE    240
                ************************************************************

J1_T7           KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
J2_T7           KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
J3_T7           KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
J5_T7           KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
J1_SP6          KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
J2_SP6          KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
J5_SP6          KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
J4_T7           KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
J3_SP6          KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
J4_SP6          KVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGGHAVRLLGWGE    300
                ************************************************************

J1_T7           ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
J2_T7           ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
J3_T7           ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
J5_T7           ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
J1_SP6          ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
J2_SP6          ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
J5_SP6          ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
J4_T7           ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
J3_SP6          ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
J4_SP6          ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN 347
                *********************************************
```

จากผลการเปรียบเทียบทั้ง 5 โคลน พบว่าโคลนที่ 1 มีลำดับอะมิโนตรงกับโปรตีน CatB2 ทำให้โคลนที่ 1 มีความเหมาะสมสำหรับนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนถัดต่อไป

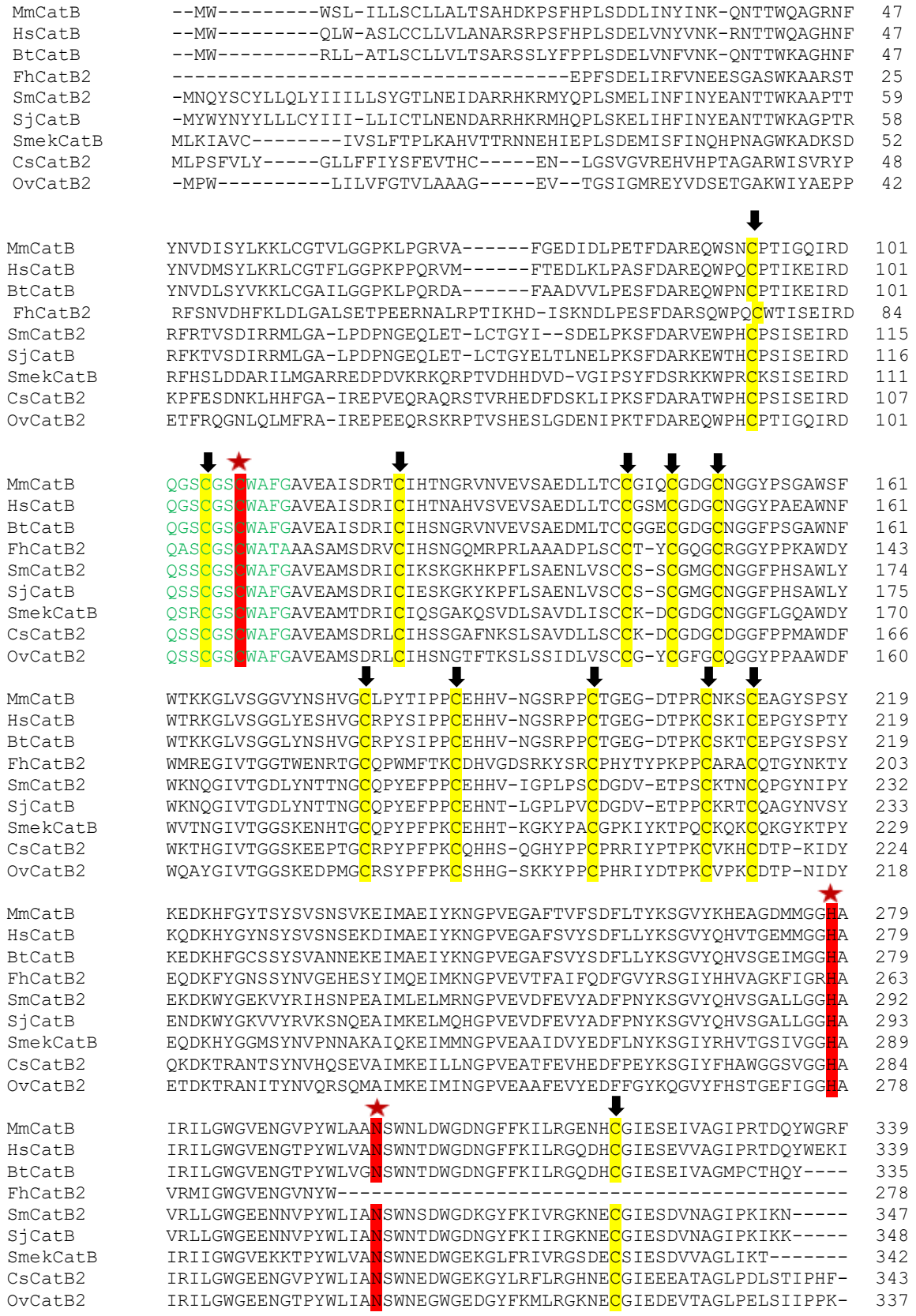
การตรวจสอบ Signal peptide



รูปที่ 4 Signal peptide ในโปรตีนสังเคราะห์ SmCatB2

จากการตรวจสอบ Signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP โดยทำนาย Signal peptide ในโปรตีนสังเคราะห์ SmCatB2 พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน SmCatB2 มีส่วนของ Signal peptide

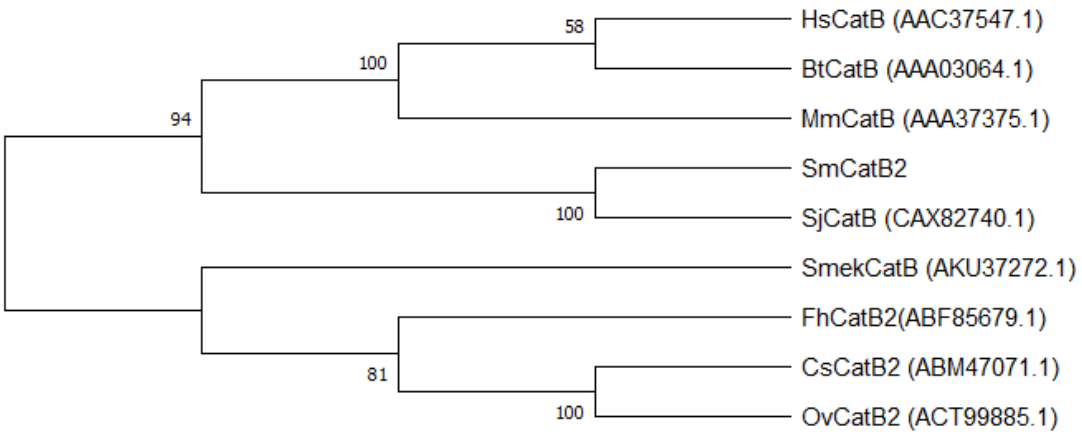
การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Cathepsin B2 ของ *Schistosoma mansoni* กับ species อื่น



⬇ : Cysteine residues ★ : Active sites QSSCGSCWAFG : Thiol consensus pattern

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน SmCatB2 กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นๆ โดยเปรียบเทียบกับ *S. japonicum* (CAX82740.1), *S. mekongi* (AKU37272.1), *C. sinensis* (ABM47071.1), *F. hepatica* (ABF85679.1), *M. musculus* (AAA37375.1), *B. taurus* (AAA03064.1) และ *H. sapiens* (AAC37547.1) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ Active sites คือบริเวณ Cysteine Histidine และ Asparagine (สัญลักษณ์ดาว) พบส่วนของ Cysteine residues (สัญลักษณ์ลูกศรสีดำ) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase

การทำ Phylogenetic tree เพื่อดูความใกล้ชิดของโปรตีน Cathepsin B2 ในสิ่งมีชีวิต species ต่างๆ



รูปที่ 5 Phylogenetic tree ของ CatB2

จากแผนภาพ Phylogenetic tree พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmCatB2 ที่สังเคราะห์ขึ้นมามีความใกล้ชิดกับกลุ่มพยาธิ *S. japonicum*

การโคลนยีน Cathepsin L (SmCatL)

ทำการเชื่อมยีน SmCatL ของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mansoni* เข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector (DNA ligation) แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของ *E.coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation ต่อมานำเชื้อไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและนำไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในเชื้อ *E.coli* DH5α โดยทำการเลือกเชื้อที่เพาะเลี้ยงมาโคโลนี 10 colonies เพื่อนำมาตรวจสอบหายีน CatL ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปรันเจล agarose 1% ได้ผลดังนี้ จากผลการทำ Colony PCR ข้างต้น พบว่าโคลนที่ 2, 5, 8 และ 9 เกิด band ขนาดประมาณ 1,000 bp เมื่อเทียบกับ DNA ladder จึงคาดว่าโคลนที่ 2, 5, 8 และ 9 น่าจะมียีน SmCatL อยู่ จึงนำดังกล่าวไปสกัด พลาสมิดและทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับเบสต่อไป

การสกัดพลาสมิดและการหาลำดับเบสของ clone ที่ 2, 5, 8 และ 9

นำโคลนที่ 2, 5, 8 และ 9 มาเลี้ยงใน LB broth ที่มียา ampicillin ผสมอยู่ บ่มที่ 37 °C เขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดแล้วส่งทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ถัดมาได้นำผลการทำ DNA sequencing มาแปลรหัสจากลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโน ได้ผลดังนี้

```
DNA:  atgaagtgtttcctatgtttgactgctttttttgtagtcgttgttggtgattctggtttc
+1fr: M  K  C  F  L  C  L  T  A  F  F  V  V  V  V  G  D  S  G  F

DNA:  agaaagtggtcaaatctcgagccttcattatctctgggtagacttttgagcaacaggtt
+1fr: R  K  W  S  N  L  E  P  S  L  S  L  G  R  L  F  E  Q  Q  V

DNA:  aaagagggcgtgcctggctctgtaaatgttgagctgcttgacgacattattgcagcttgg
+1fr: K  E  G  V  P  G  S  V  N  V  E  L  L  D  D  I  I  A  A  W

DNA:  aaatttttcaaaattcaattcaagcgagcttataatggtattcatgaggaaacaaggcga
+1fr: K  F  F  K  I  Q  F  K  R  A  Y  N  G  I  H  E  E  T  R  R

DNA:  ttctttatattctcggctaatttcgtcaagatgatggagcacaaccatgcctttcaagaa
+1fr: F  F  I  F  S  A  N  F  V  K  M  M  E  H  N  H  A  F  Q  E

DNA:  ggcaaggtgacatacaaaatgggtgtcaatgaatttactgataaaactgactatgaactt
+1fr: G  K  V  T  Y  K  M  G  V  N  E  F  T  D  K  T  D  Y  E  L

DNA:  aaaaagttgcgtggatataaagtcactagtggtgctatcagacataaagggtcgacgttt
+1fr: K  K  L  R  G  Y  K  V  T  S  G  A  I  R  H  K  G  S  T  F

DNA:  attaggtcagaacatactaaactcccgagcaaggttgattggcgaagagaaggggcagta
+1fr: I  R  S  E  H  T  K  L  P  S  K  V  D  W  R  R  E  G  A  V

DNA:  accgatgtaaaaaatcaaggccaatgtggttcatgttgggcattctctacaacgggagct
+1fr: T  D  V  K  N  Q  G  Q  C  G  S  C  W  A  F  S  T  T  G  A

DNA:  atagaaggtcaacactatcgtaaaactaaccgtctagttaatttgtccgagcagcaattg
```

```
+1fr: I  E  G  Q  H  Y  R  K  T  N  R  L  V  N  L  S  E  Q  Q  L

DNA:  gttgattgtagcaagagttatggaaataatggttgttctggtggtctaatgaattcggcg
+1fr: V  D  C  S  K  S  Y  G  N  N  G  C  S  G  G  L  M  N  S  A

DNA:  tttgaatatgttcgcgacaatgaaggcattgattctgagatttcctatccatatgcatct
+1fr: F  E  Y  V  R  D  N  E  G  I  D  S  E  I  S  Y  P  Y  A  S

DNA:  ggtgatggaacggaaaataatagatgtttattcaatgcttcaaacattttagctcaggtt
+1fr: G  D  G  T  E  N  N  R  C  L  F  N  A  S  N  I  L  A  Q  V

DNA:  acaggctatgtaaacattcacgaaggtgacgagcgtgcattaatggatgctgtggcgaca
+1fr: T  G  Y  V  N  I  H  E  G  D  E  R  A  L  M  D  A  V  A  T

DNA:  aaaggtcctgtttcagttgccattaatgctggtcttcccagtttttctatgtacaaatca
+1fr: K  G  P  V  S  V  A  I  N  A  G  L  P  S  F  S  M  Y  K  S

DNA:  ggcatctattcagatactgattgtgagggcacgttagatgcccttgatcatggggttctg
+1fr: G  I  Y  S  D  T  D  C  E  G  T  L  D  A  L  D  H  G  V  L

DNA:  gtggtgggttatggagaagaaaatggtcggtcatattggcttataaagaatagttggggt
+1fr: V  V  G  Y  G  E  E  N  G  R  S  Y  W  L  I  K  N  S  W  G

DNA:  gaagagtggggtgaaaaagggtatattaaaatctcaaagggttctcataatatgtgtggt
+1fr: E  E  W  G  E  K  G  Y  I  K  I  S  K  G  S  H  N  M  C  G

DNA:  gttgccagtgcggcttcataccctctagtatga
+1fr: V  A  S  A  A  S  Y  P  L  V  *
```

การเปรียบลำดับกรดอะมิโน

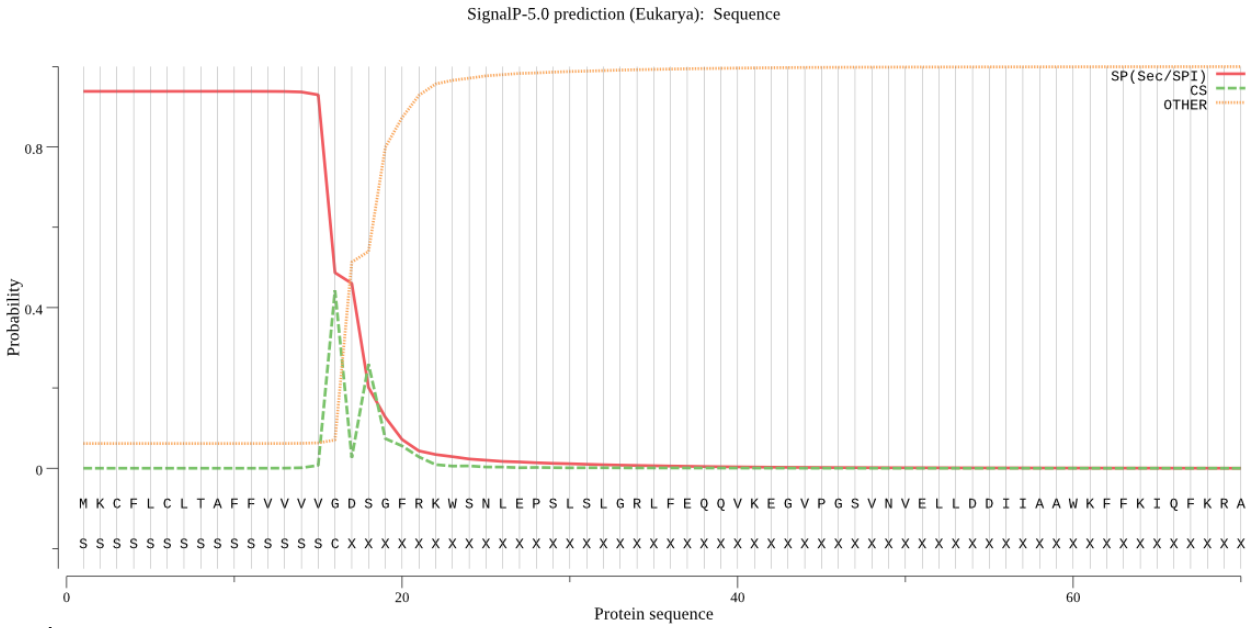
ลำดับต่อมาทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลเพื่อตรวจสอบดูความเหมือนกันระหว่างโปนตีน SmCatL สังเคราะห์ขึ้นมากับโปรตีน CatL (GenBank: ABV71063.1) ในพยาธิ *Schistosoma mansoni* ได้ผลดังนี้

```
ABV71063.1
MKCFLCLTAFFVVVVGDSGFRKWSNLEPSLSLGRLFEQQVKEGVPGSVNVELLDDIIAAW
SmCatL
MKCFLCLTAFFVVVVGDSGFRKWSNLEPSLSLGRLFEQQVKEGVPGSVNVELLDDIIAAW

ABV71063.1
KFFKIQFKRAYNGIHEETRRFFIFSANFVKMMEHNHAFQEGKVTYKMGVNEFTDKTDYEL
SmCatL
KFFKIQFKRAYNGIHEETRRFFIFSANFVKMMEHNHAFQEGKVTYKMGVNEFTDKTDYEL


ABV71063.1
KKLRGYKVTSGAIRHKGSTFIRSEHTKLPSKVDWRREGAVTDVKNQGQCGSCWAFSTTGA
SmCatL
KKLRGYKVTSGAIRHKGSTFIRSEHTKLPSKVDWRREGAVTDVKNQGQCGSCWAFSTTGA

ABV71063.1
IEGQHYRKTNRLVNLSEQQLVDCSKSYGNNGCSGGLMNSAFEYVRDNEGIDSEISYPYVS
```

```
SmCatL
IEGQHYRKTNRLVNLSEQQLVDCSKSYGNNGCSGGLMNSAFEYVRDNEGIDSEISYPYAS

ABV71063.1
GDGTENNRCLFNASNILAQVTGYVNIHEGDERALMDAVATKGPVSVAINAGLPSFSMYKS
SmCatL
GDGTENNRCLFNASNILAQVTGYVNIHEGDERALMDAVATKGPVSVAINAGLPSFSMYKS

ABV71063.1
GIYSDTDCEGTLDALDHGVLVVGYGEENGRSYWLIKNSWGEEWGEKGYIKISKGSHNMCG
SmCatL
GIYSDTDCEGTLDALDHGVLVVGYGEENGRSYWLIKNSWGEEWGEKGYIKISKGSHNMCG

ABV71063.1      VASAASYPLV
SmCatL          VASAASYPLV
```

จากผลการเปรียบเทียบลำดับอะมิโนของโปนตีน SmCatL สังเคราะห์ขึ้นมากับโปรตีน CatL (GenBank: ABV71063.1) พบว่ามีลำดับอะมิโนตรงกับโปรตีน CatL (GenBank: ABV71063.1) ทำให้โคลนที่มียีน SmCatL มีความเหมาะสมสำหรับนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนถัดต่อไป

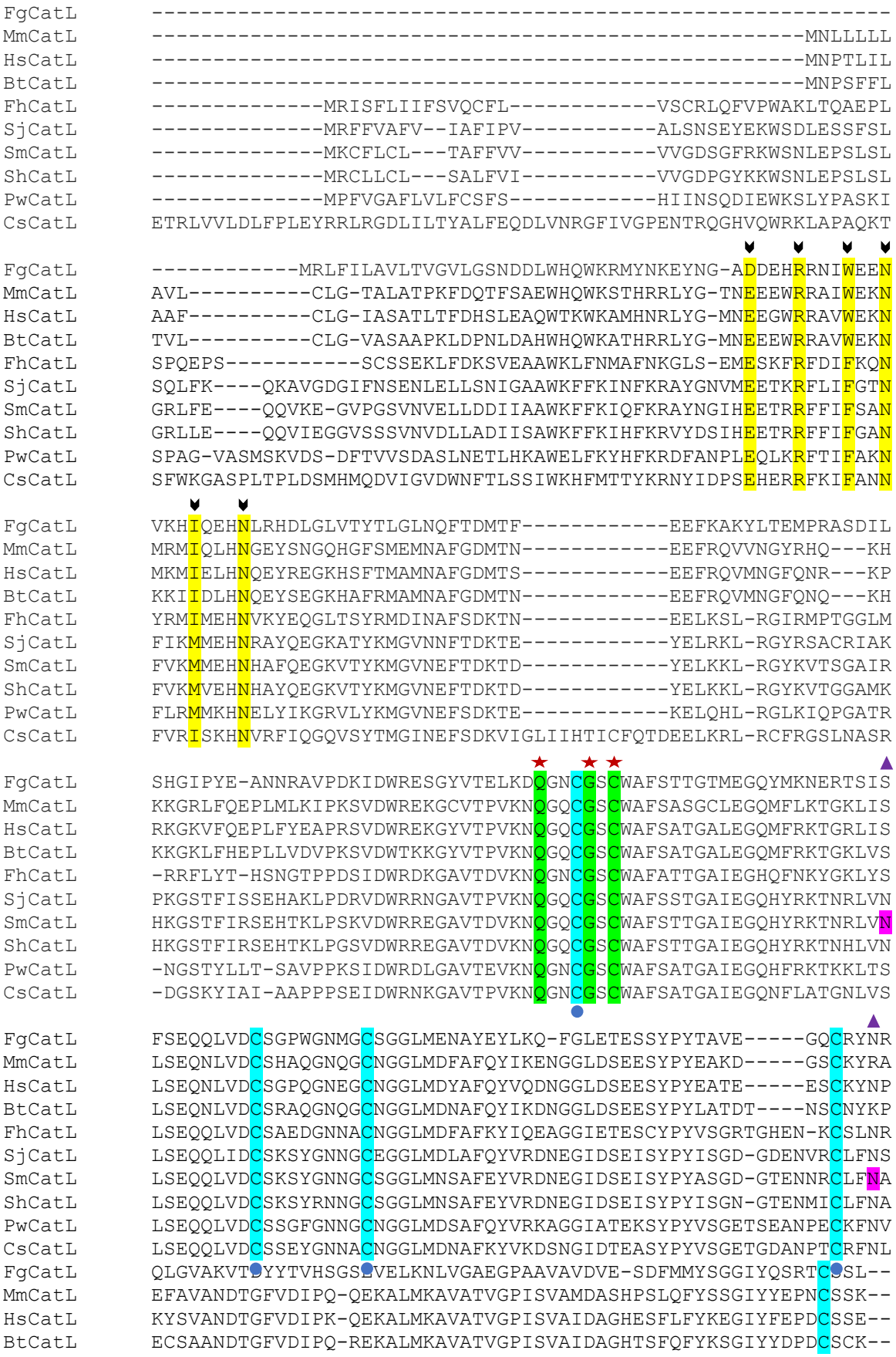
การตรวจสอบ Signal peptide



รูปที่ 6 Signal peptide ในโปรตีนสังเคราะห์ SmCatL

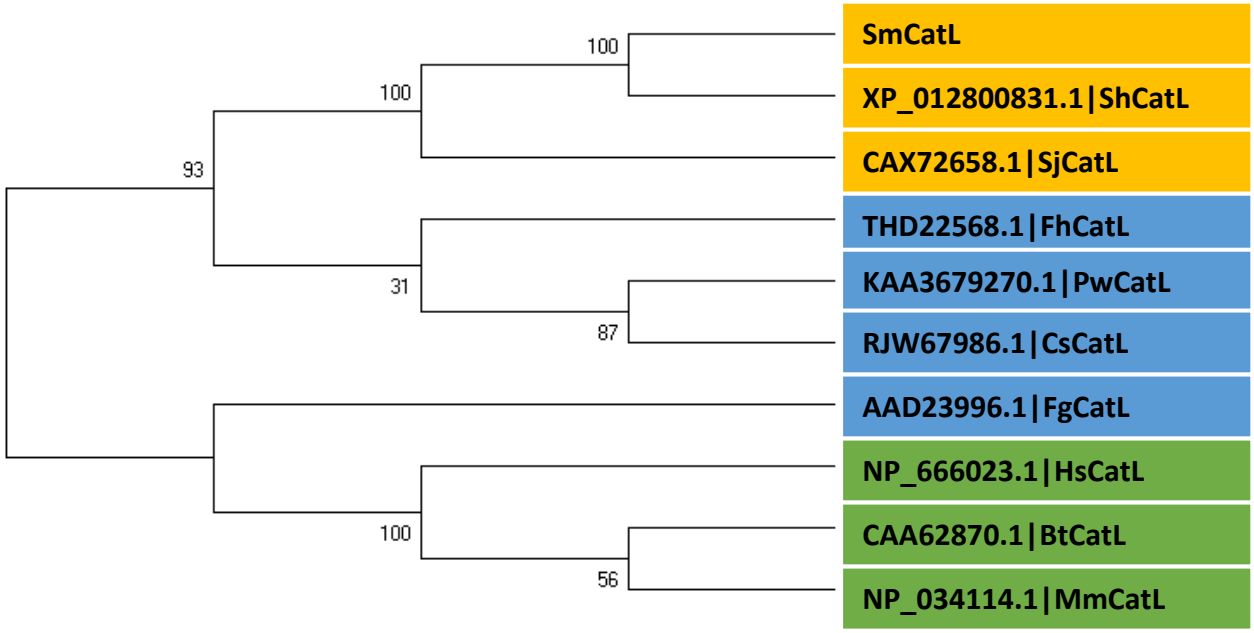
ทำการตรวจสอบ Signal peptide ผ่านเว็บไซต์ http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ จากการทำนาย Signal peptide ในโปรตีนสังเคราะห์ SmCatL พบว่ามีส่วนของโปรตีนที่เป็น Signal peptide คือระหว่างอะมิโน glycine กับ aspartic acid ตำแหน่งที่ 16-17 เป็นการบ่งบอกว่าโปรตีน CatL จะต้องมีการหลั่งออกนอกเซลล์ก่อนที่จะเป็น mature โปรตีน ดังนั้นการที่จะสังเคราะห์โปรตีนจึงเหมาะกับการตัดส่วนของโปรตีนที่เป็น signal peptide ออกก่อนแล้วจึงนำโปรตีน SmCatL ไปทำการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป

การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนของ Cathepsin L ของ *Schistosoma mansoni* กับ species อื่น



ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmCatL กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นอื่น โดยเปรียบเทียบกับพยาธิ *S. haematobium* (XP_012800831.1) และ *S. japonicum* (CAX72658.1) ซึ่งเป็นพยาธิในกลุ่มเดียวกันกับพยาธิ *S. mansoni* และพยาธิ *F. gigantica* (AAD23996.1), *F. hepatica* (THD22568.1), *P. westermani* (KAA3679270.1) และ *C. sinensis* (RJW67986.1) ซึ่งเป็นพยาธิในกลุ่มใกล้เคียง และเปรียบเทียบกับโฮสท์ในธรรมชาติได้แก่ คน (NP_666023.1) หนู (NP_034114.1) และวัว (CAA62870.1) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ Active sites คือบริเวณ Glutamine Glycine Cysteine Histidine และ Asparagine (สัญลักษณ์ดาว) พบส่วนของ Cysteine residues (สัญลักษณ์วงกลมทึบ) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase นอกจากนี้พบส่วนของโปรตีน SmCatL ที่มีการเติม N-glycosylation ที่อะมิโน asparagine (สัญลักษณ์สามเหลี่ยมทึบ) และพบบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโนคือ ERFNIN

การทำ Phylogenetic tree เพื่อดูความใกล้ชิดของโปรตีน Cathepsin L ในสิ่งมีชีวิต species ต่างๆ



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ของ SmCatL กับ CatL ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

จากแผนภาพ Phylogenetic tree พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmCatL ที่สังเคราะห์ขึ้นมามีความใกล้ชิดกับกลุ่มพยาธิ *S. haematobium* กับ *S. japonicum*

สรุปผลการวิจัย

จากการสกัด RNA ของเชื้อพยาธิแล้วนำมาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณของ CatB2 และ CatL genes โดยการทำ PCR ตามด้วยทำการ ligation เข้าสู่โคลนนิ่งเวคเตอร์คือ pGEM-T Easy vector และทำการ transformation เข้าสู่โฮสต์เซลล์คือ *E. coli* (DH5α) และทำการตรวจสอบการส่งผ่านยีนเข้าสู่เซลล์โฮสต์ด้วยวิธี colony PCR พบว่าโคลนที่มี band ขึ้นคือ มีการส่งผ่านเวกเตอร์ที่มี CatB2 หรือ CatL gene ได้สำเร็จ ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ CatB2 หรือ CatL gene ในพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. และศึกษาความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในพยาธิตัวอื่น พบว่าโปรตีน CatB2 และ CatL มี signal peptide ส่วนผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน SmCatB2 กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นๆ โดยเปรียบเทียบกับ *S. japonicum* (CAX82740.1), *S. mekongi* (AKU37272.1), *C. sinensis* (ABM47071.1), *F. hepatica* (ABF85679.1), *M. musculus* (AAA37375.1), *B. taurus* (AAA03064.1) และ *H. sapiens* (AAC37547.1) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ Active sites คือบริเวณ Cysteine Histidine และ Asparagine พบส่วนของ Cysteine residues ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase และผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmCatL กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นอื่น โดยเปรียบเทียบกับพยาธิ *S. haematobium* (XP_012800831.1) และ *S. japonicum* (CAX72658.1) ซึ่งเป็นพยาธิในกลุ่มเดียวกันกับพยาธิ *S. mansoni* และพยาธิ *F. gigantica* (AAD23996.1), *F. hepatica* (THD22568.1), *P. westermani* (KAA3679270.1) และ *C. sinensis* (RJW67986.1) ซึ่งเป็นพยาธิในกลุ่มใกล้เคียง และเปรียบเทียบกับโฮสท์ในธรรมชาติได้แก่ คน (NP_666023.1) หนู (NP_034114.1) และวัว (CAA62870.1) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ Active sites คือบริเวณ Glutamine Glycine Cysteine Histidine และ Asparagine พบส่วนของ Cysteine residues ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase นอกจากนี้พบส่วนของโปรตีน SmCatL ที่มีการเติม N-glycosylation ที่อะมิโน asparagine และพบบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโนคือ ERFNIN

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

โรคพยาธิใบไม้เลือดนับว่าเป็นโรคติดต่อที่สำคัญโรคหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประชากรโลกมาแล้วหลายประเทศ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดให้โรคนี้เป็นโรคติดต่อในเขตร้อนที่มีความสำคัญเป็นที่สองรองมาจากโรคมาลาเรีย ปัจจุบันประชากรทั้งหมดในโลกคาดว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้เลือด ประมาณ 200 ล้านคน พยาธิใบไม้เลือด (blood flukes) เป็นพยาธิใบไม้ที่ตัวเต็มวัยแยกเพศ คือมีตัวผู้และตัวเมีย พยาธิใบไม้เลือดที่ก่อโรคในมนุษย์หลักๆ มี 4 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi*, *Schitosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobium* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัด RNA ของเชื้อพยาธิแล้วนำมาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณของ CatB2 และ CatL genes โดยการทำ PCR ตามด้วยทำการ ligation เข้าสู่โคลนนิ่งเวคเตอร์คือ pGEM-T Easy vector และทำการ transformation เข้าสู่โฮสต์เซลล์คือ *E. coli* (DH5α) และทำการตรวจสอบการส่งผ่านยีนเข้าสู่เซลล์โฮสต์ด้วยวิธี colony PCR พบว่าโคลนที่มี band ขึ้นคือ มีการส่งผ่านเวกเตอร์ที่มี CatB2 หรือ CatL gene ได้สำเร็จ ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ CatB2 หรือ CatL gene ในพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. และศึกษาความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในพยาธิตัวอื่น พบว่าโปรตีน CatB2 และ CatL มี signal peptide บ่งบอกถึงโปรตีนชนิดนี้มีการทำงานจำเพาะที่ตำแหน่งเป้าหมายและมีการหลั่งออกนอกเซลล์เพื่อไปทำงานที่ตำแหน่งอื่นๆ หากมีสัญญาณเกิดขึ้นอาจหมายความว่าโปรตีนนั้นๆ สามารถหลั่งออกนอกเซลล์เพื่อไปทำงาน ณ ตำแหน่งอื่นๆ ได้ จึงเหมาะสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจเนื่องจากมีการปล่อย หรือหลุดออกมาจากตัวพยาธิเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดของโฮสต์ ซึ่งทำให้ใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายในการวินิจฉัยได้ ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน SmCatB2 กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นๆ โดยเปรียบเทียบกับ *S. japonicum* (CAX82740.1), *S. mekongi* (AKU37272.1), *C. sinensis* (ABM47071.1), *F. hepatica* (ABF85679.1), *M. musculus* (AAA37375.1), *B. taurus* (AAA03064.1) และ *H. sapiens* (AAC37547.1) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ Active sites คือบริเวณ Cysteine Histidine และ Asparagine (สัญลักษณ์ดาว) พบส่วนของ Cysteine residues (สัญลักษณ์ลูกศรสีดำ) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmCatL กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นอื่น โดยเปรียบเทียบกับพยาธิ *S. haematobium* (XP_012800831.1) และ *S. japonicum* (CAX72658.1) ซึ่งเป็นพยาธิในกลุ่มเดียวกันกับพยาธิ *S. mansoni* และพยาธิ *F. gigantica* (AAD23996.1), *F. hepatica* (THD22568.1), *P. westermani* (KAA3679270.1) และ *C. sinensis* (RJW67986.1) ซึ่งเป็นพยาธิในกลุ่มใกล้เคียง และเปรียบเทียบกับโฮสท์ในธรรมชาติได้แก่ คน (NP_666023.1) หนู (NP_034114.1) และวัว (CAA62870.1) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ Active sites คือบริเวณ Glutamine Glycine Cysteine Histidine และ Asparagine (สัญลักษณ์ดาว) พบส่วนของ Cysteine residues (สัญลักษณ์วงกลม

ทึบ) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase นอกจากนี้พบส่วนของโปรตีน SmCatL ที่มีการเติม N-glycosylation ที่อะมิโน asparagine (สัญลักษณ์สามเหลี่ยมทึบ) และพบบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโนคือ ERFNIN และผู้วิจัยจะทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CatB2 และ CatL ของพยาธิใบไม้เลือดทั้ง 3 สปีชีส์ (*S. mekongi*, *S.mansoni* และ *S. japonicum*) และจะพัฒนาเป็นชุดตรวจและวัคซีนสำหรับโรค schistosomiasis ต่อไปในอนาค

สรุปและเสนอแนะ

ไม่มี

(5) ผลผลิต (Output)

(5.1) ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชิการทั้งในและระดับชาติ และนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์

(5.2) การจดสิทธิบัตร

ไม่มี

(5.3) ผลงานเชิงพาณิชย์ (มรการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

ไม่มี

(5.4) ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ไม่มี

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 3930100116xxx สัญญาเลขที่ 19/2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อพัฒนาชุดตรวจ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. พรอนันต์ เกื้อไข่

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2562

ระยะเวลาดำเนินการ.....1.....ปี.....3.....เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	404,150	บาท	เมื่อวัน 30 เดือน ตุลาคม	ปี 2561
งวดที่ 2 (40%)	323,320	บาท	เมื่อวัน 26 เดือน สิงหาคม	ปี 2562
งวดที่ 3 (10%)		บาท	เมื่อวัน - เดือน -	ปี -
รวม	727,470			

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	24,000	24,000	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	554,470	554,470	-
4. ค่าใช้สอย	149,000	149,000	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	80,830	80,830	-
รวม	808,300	808,300	-

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม (Bibliography)

Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. Lancet. 2014;383(9936):2253–64.

Dumurgier C, Tay KH, Surith TN, Rathat C, Buisson Y, Monchy D, Sinuon M, Socheat D, Urbani C, Chaem S, et al. Place of surgery in the prevention of recurrences of digestive haemorrhages at the patients presenting a portal hypertension due to Schistosoma Mekongi. Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990). 2006;99(5):365–71.

Keang H, Odermatt P, Odermatt-Biays S, Cheam S, Degremont A, Hatz C. Liver morbidity due to Schistosoma Mekongi in Cambodia after seven rounds of mass drug administration. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007;101(8):759–65.

Monchy D, Dumurgier C, Heng TK, Hong K, Khun H, Hou SV, Sok KE, Huerre MR. Histology of liver lesions due to Schistosoma Mekongi. About six cases with severe portal hypertension operated in Cambodia. Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990). 2006;99(5):359–64.

Ohmae H, Sinuon M, Kirinoki M, Matsumoto J, Chigusa Y, Socheat D, Matsuda H. Schistosomiasis mekongi: from discovery to control. Parasitol Int. 2004;53(2):135–42.

Richter J, Azoulay D, Dong Y, Holtfreter MC, Akpata R, Calderaro J, El-Scheich T, Breuer M, Neumayr A, Hatz C, et al. Ultrasonography of gallbladder abnormalities due to schistosomiasis. Parasitol Res. 2016; 115(8):2917–24.

Sangfuang M, Chusongsang Y, Limpanont Y, Vanichviriyakit R, Chotwiwatthanakun C, Sobhon P, Preyavichyapugdee N. Schistosoma mekongi cathepsin B and its use in the development of an immunodiagnosis. Acta Trop. 2016; 155:11-9.