



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ
โปรตีนของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ
Schistosoma japonicum ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อ
พัฒนาชุดตรวจ

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

ผศ.ดร.พรอนันต์ เกื้อไข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๕๐๐๖๒
สัญญาเลขที่ ๑๙/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ
โปรตีนของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ
Schistosoma japonicum ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อ
พัฒนาชุดตรวจ

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

ผศ.ดร.พรอนันต์ เกื้อไข

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*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobium* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัด RNA ของเชื้อพยาธิแล้วนำมาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณของ CatB2 และ CatL genes โดยการทำให้ 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 และเปรียบเทียบกับโฮสต์ในธรรมชาติได้แก่ คน หุน 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 และผู้วิจัยจะทำการศึกษารายละเอียดของโปรตีน 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 <i>Schistosoma</i> 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)

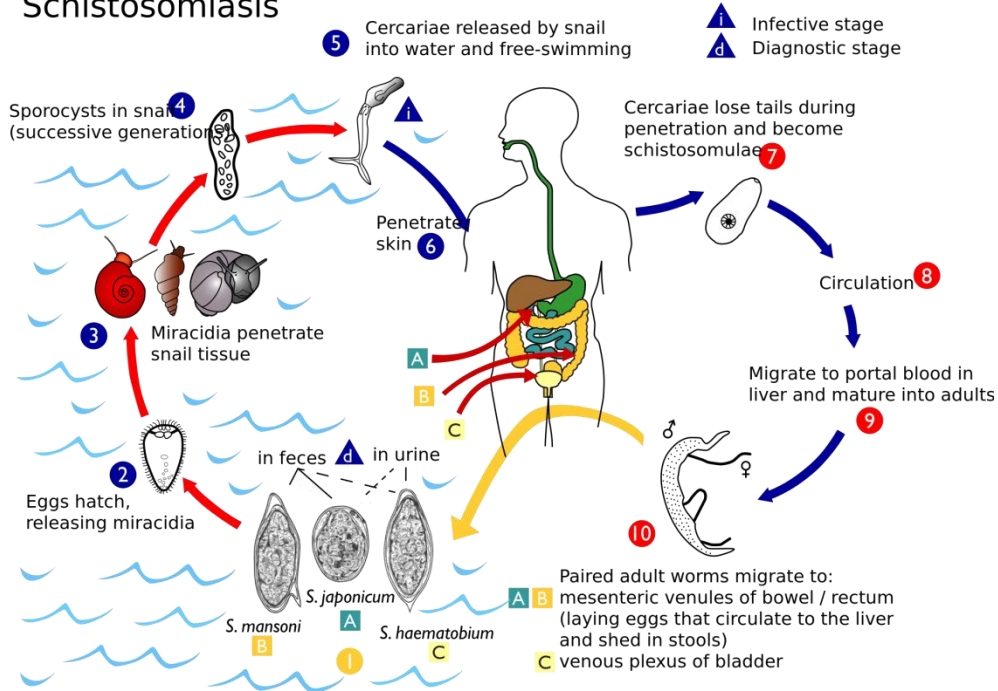
CatL	Cathepsin L
CatB	Cathepsin B
Sj	<i>Schistosoma japonicum</i>
Smek	<i>Schistosoma mekongi</i>
Sm	<i>Schistosoma mansoni</i>
Sh	<i>Schistosoma hematobium</i>
r	recombinant
cDNA	Complementary DNA
PCR	Polymerase chain reaction

บทนำ (Introduction)

เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

โรคพยาธิใบไม้เลือดนับว่าเป็นโรคติดต่อที่สำคัญโรคหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประชากรโลกมาแล้วหลายประเทศ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดให้โรคนี้เป็นโรคติดต่อในเขตร้อนที่มีความสำคัญเป็นที่สองรองมาจากโรคมาลาเรีย ปัจจุบันประชากรทั้งหมดในโลกคาดว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้เลือด ประมาณ 200 ล้านคน พยาธิใบไม้เลือด (blood flukes) เป็นพยาธิใบไม้ที่ตัวเต็มวัยแยกเพศ คือมีตัวผู้และตัวเมีย พยาธิใบไม้เลือดที่ก่อโรคในมนุษย์หลักๆ มี 4 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobium* ในประเทศลุ่มแม่น้ำโขง เช่น ลาว กัมพูชา รวมถึงประเทศไทยมีการรายงานการระบาดของโรคพยาธิใบไม้เลือด 2 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยเฉพาะจังหวัดที่ติดลุ่มน้ำโขง 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 พยาธิก็จะไชผ่านผิวหนังของคน ทำให้ได้รับเชื้อไป และเมื่อ cercariae หาร่างกายมันจะเคลื่อนที่เข้าหลอดเลือดและจะเจริญ พัฒนาเป็นตัวเต็มวัยที่ตับ แล้วตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียก็จะเข้าคู่กันและเคลื่อนที่ไปอยู่ที่หลอดเลือดดำที่ผนังลำไส้ต่อไป

Schistosomiasis



รูปที่ 1 แสดง วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp.

พยาธิสภาพของการติดเชื้อ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* แบ่งเป็น 2 ระยะใหญ่ๆ คือ acute และ chronic schistosomiasis โดย acute schistosomiasis มักมีอาการที่สำคัญคือ ปวดท้อง ท้องขึ้น ท้องเฟ้อ ปวดเจ็บบริเวณตับ มีไข้เป็นๆ หายๆ เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย และผอมลง และเมื่อพยาธิเข้าสู่ตัวเต็มวัย มีการปล่อยไข่ออกมาและร่างกายของคนติดเชื้อจะมีการตอบสนองต่อไข่ทำให้เกิด immune complex ขึ้น ซึ่ง immune complex นี้จะถูกกำจัด เป็นผลทำให้ตับ และ ม้ามโตได้ และกรณีที่มี polymorphonuclear cell (PMN) ที่มาล้อมรอบไข่ที่ถูกปล่อยออกมาจากพยาธิทำให้เกิด granuloma ขึ้น ในบริเวณที่มี granuloma ไข่ที่ฝังอยู่ใต้เยื่อบุผนังลำไส้มักจะทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียงทำให้เกิดการอักเสบและมี fibrous พร้อมกับการมีแคลเซียมมาพอรอบๆไข่เหล่านี้ (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 *Schistosoma japonicum* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของคนติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์ จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนาวิธีตรวจการติดเชื้อพยาธิโดยใช้เทคนิค immunoassay เพื่อให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ อย่างไรก็ตามจนถึงบัดนี้ก็ยังไม่สามารถใช้วิธี immunoassay ทดแทนวิธีตรวจไข่ในอุจจาระได้ และการวิจัยและการพัฒนาการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* ยังมีน้อย และแอนติเจนที่ใช้ไม่ค่อยมีความจำเพาะและวิธีตรวจยังมีความไว (Sensitivity) ไม่สูงพอ (Sangfuang et al., 2016) อีกทั้งยังไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเสาะหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะสูง

และวิธีในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของพยาธิ และในวิจัยพัฒนาชุดตรวจที่ผ่านมานั้นใช้แอนติบอดีที่เป็นโมโนโคลนอลและโพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีข้อเสียในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมในด้านคุณภาพของชุดตรวจ เนื่องจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้เพราะการตอบสนองของสัตว์แต่ละตัวแต่ละรอบที่ผลิตไม่เหมือนกัน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นเป็นแบบเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำให้ไม่มีความเสถียรในการสร้างแอนติบอดีและเมื่อเลี้ยงไปนานๆจะทำให้การสร้างแอนติบอดีลดลง จึงเป็นปัญหาในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ดังนั้นคณะวิจัยซึ่งได้เห็นแนวโน้มที่จะสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรค schistosomiasis ด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีแทนเพื่อให้อการสร้างแอนติบอดีมีความคงตัว คณะวิจัยจึงเห็นว่าควรมีการสร้างและพัฒนาชุดตรวจ ให้เป็นนวัตกรรมที่สร้างขึ้นจากคนไทย ซึ่งจะสามารถแก้ไขปัญหาโรคพยาธิใบไม้เลือดในประเทศได้

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคพยาธิใบไม้เลือดนับว่าเป็นโรคติดต่อที่สำคัญโรคหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประชากรโลกมาแล้วหลายประเทศ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดให้โรคนี้เป็นโรคติดต่อในเขตร้อนที่มีความสำคัญเป็นที่สองรองมาจากโรคมาลาเรีย ปัจจุบันประชากรทั้งหมดในโลกคาดว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้เลือด ประมาณ 200 ล้านคน พยาธิใบไม้เลือด (blood flukes) เป็นพยาธิใบไม้ที่ตัวเต็มวัยแยกเพศ คือมีตัวผู้และตัวเมีย พยาธิใบไม้เลือดที่ก่อโรคในมนุษย์หลักๆ มี 4 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobium* ในประเทศไทยมีการรายงานการระบาดของการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด 2 ชนิด คือ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยเฉพาะจังหวัดที่ติดลุ่มน้ำโขง 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* เริ่มจากไข่พยาธิที่ปนมากับอุจจาระของคน que ติดเชื้อลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ 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 มักมีอาการที่สำคัญคือ ปวดท้อง ท้องขึ้น ท้องเฟ้อ ปวดเจ็บบริเวณตับ มีไข้เป็นๆ หายๆ เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย และผอมลง และเมื่อพยาธิเข้าสู่ตัวเต็มวัย มีการปล่อยไข่ออกมาและร่างกายของคน que ติดเชื้อจะมีการตอบสนองต่อไข่ทำให้เกิด

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 พยาธิสภาพเกิดได้ หลายๆ ตำแหน่ง เช่น ตับ ลำไส้ ซึ่งมักจะเป็นการอักเสบและในลำไส้อาจพัฒนาไปเป็นมะเร็งลำไส้ได้

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของคนที่ติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์ จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนาวิธีตรวจการติดเชื้อพยาธิโดยใช้เทคนิค immunoassay เพื่อให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ อย่างไรก็ตามจนถึงบัดนี้ก็ยังไม่สามารถใช้วิธี immunoassay ทดแทนวิธีตรวจไข่ในอุจจาระได้ และการวิจัยและการพัฒนาการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* ยังมีน้อย และแอนติเจนที่ใช้ไม่ค่อยมีความจำเพาะและวิธีตรวจยังมีความไว (Sensitivity) ไม่สูงพอ อีกทั้งยังไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเสาะหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะสูงและวิธีในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของพยาธิ และในวิจัยพัฒนาชุดตรวจที่ผ่านมานั้นใช้แอนติบอดีที่เป็นโมโนโคลนอลและโพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีข้อเสียในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมในด้านคุณภาพของชุดตรวจเนื่องจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้เพราะการตอบสนองของสัตว์แต่ละตัวแต่ละรอบที่ผลิตไม่เหมือนกัน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นเป็นแบบเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำให้ไม่มีความเสถียรในการสร้างแอนติบอดีและเมื่อเลี้ยงไปนานๆทำให้การสร้างแอนติบอดีลดลง จึงเป็นปัญหาในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ดังนั้นคณะวิจัยซึ่งได้เห็นแนวโน้มที่จะสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรค schistosomiasis ด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีแทนเพื่อให้การสร้างแอนติบอดีมีความคงตัว คณะวิจัยจึงเห็นว่าควรมีการสร้างและพัฒนาชุดตรวจ ให้เป็นนวัตกรรมที่สร้างขึ้นจากคนไทย ซึ่งจะสามารถแก้ไขปัญหาโรคพยาธิใบไม้เลือดในประเทศได้

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อแอนติเจนของ *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* เพื่อพัฒนาศักยภาพของชุดตรวจให้สามารถตรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และ *Schistosoma japonicum* ได้ทุกระยะของการติดเชื้อ เพื่อการผลิตเชิงอุตสาหกรรม

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)

การโคลนยีนและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน 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) ซึ่งเป็นเซลล์แบคทีเรีย *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 ที่สกัดได้ที่ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -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 เพื่อทำการหาลำดับเบสว่าเป็นเป็นยีนที่สร้างแอนติบอดี จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนเก็บไว้เพื่อเป็นต้นแบบในการทำ recombinant monoclonal antibody ต่อไป

การสังเคราะห์ recombinant antigen และ recombinant monoclonal antibody

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

การพัฒนาและทดสอบวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MoAb)

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

นำเซลล์ myeloma และเซลล์ม้ามมาทำการเชื่อมต่อกันด้วย polyethyleneglycol (PEG) นำเซลล์ hybridoma ที่ได้หยอดลงใน 96 well plate แล้วนำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมปริมาณ CO₂ ที่ร้อยละ 5 และทำการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี limiting dilution หลังจากนั้นจึงคัดเลือกโคลนด้วย enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และ enzyme linked immunoelectrotransfer blot (EITB) ทำการตรวจหา class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Immunopure Monoclonal Antibody Isotyping kit (HRP/ABTS) (PIERCE) ซึ่งใช้หลักการ sandwich ELISA

การผลิตรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดี (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 MulgCHgamma reverse primer (5'-CTGGACAGGG ATCCAGAGTTCCA-3') และ cDNA ของโมเลกุลแอนติบอดีสายสั้นด้วย MulgCLKappa reverse primer (5'-CTCATTCTGTTGAAGCTCTTGAC-3') จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีสายยาวและสายสั้นด้วยเทคนิค RACE-PCR โดยนำ cDNA ของโมเลกุลสายยาวและสายสั้นที่สังเคราะห์ขึ้นมาเติม homopolymeric dG ที่บริเวณปลาย 5' โดยใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ RACE dCTP forward primer และ MulgCHgammaNested reverse primer (5'-TARCCYTTGACMAGGCATCC-3') สำหรับยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาว ส่วนยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายสั้นนั้นจะใช้ RACE dCTP forward

primer (5'CAAGGAATTCCCCCCCCCCCC-3') และ MulgCLKappa Nested reverse primer (5'-CGTTCCTACT GCCATCAATC-3') นำชิ้นยีนโมเลกุลสายยาวและสายสั้นที่ได้มาเติม singledA ที่บริเวณปลาย 3' ด้วยเอนไซม์ Ex taq DNA polymerase จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector แล้วนำเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ DH5 α ด้วยเทคนิค heat shock transformation และทำการคัดเลือก transformant บนอาหารที่จำเพาะ โดยสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบ recombinant clone ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ T7 promoter forward primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') และ MulgCHgammaNested reverse primer สำหรับยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาว ส่วนยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายสั้นนั้นจะใช้ T7 promoter forward primer และ MulgCLKappaNested reverse primer จากนั้นนำ recombinant clone ที่มีชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาวและสายสั้นมาเพาะเลี้ยงและสกัด recombinant plasmid ด้วยชุดสกัด Gencatch™ plus plasmid DNA miniprep (Epoch life sciences) นำ recombinant plasmid ที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR sequencing โดยใช้ T7 promoter forward primer จากนั้นนำ PCR products ที่ได้มาอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดี (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและโมเลกุลสายสั้นสำหรับนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนส่วน variable region ต่อไป การโคลนยีนส่วน variable region เข้าสู่ mammalian expression vector นำ recombinant plasmid ที่บรรจุชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนส่วน variable region ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ HB3VH forward primer (5'-CTGCTTAAGGG CGTCCAATGCGAAGTGAACTGGTGGAGTCT-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 ส่วนโมเลกุลสายสั้นจะใช้ HB3VL forward primer (5'ACCACCGCCGACATTGTGATGACCCAGTCT-3') คู่กับ HB3VL reverse primer (5'-TTCCAGCTTTGTCCACCGCCGAA-3') จากนั้นนำยีนส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและเวกเตอร์ pcDNA3.4-CHY ที่บรรจุยีนส่วน constant region ชนิด gamma ของมนุษย์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ AflII และ PspOMI แล้วจึงเชื่อมต่อยีนเข้ากับเวกเตอร์สำหรับยีนส่วน variable region ของโมเลกุลสายสั้นนั้นจะนำมาเติมหมู่ฟอสเฟตที่บริเวณปลาย 5' โดยใช้เอนไซม์ T4 polynucleotide kinase แล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pcDNA3.4-CLK ที่บรรจุชิ้นยีนส่วน constant region ชนิด kappa ของมนุษย์ที่นำหมู่ฟอสเฟตที่บริเวณปลาย 5' ออก จากนั้นนำเวกเตอร์ที่เชื่อมต่อกับชิ้นยีนแล้วเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ DH5 α ด้วยเทคนิค heat shock transformation และทำการคัดเลือก transformant บนอาหาร 2XYT-AG agar หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารมาตรวจสอบ recombinant clone ที่มีชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลในส่วน variable region ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ XbaIKozHuHleader forward primer (5'-

GACTCTAGAGGATCGAACCCCTGCCGCCACCATGGAGTTCGGA-3') คู่กับ pcDNA3.4 reverse primer (5'-CAACATAGTTAAGAATACCAGTC-3') สำหรับตรวจสอบโมเลกุลสายยาว และ XbaIKozHuKleader forward primer (5'-GACTCTAGAGGATCGAACCCCTGCCGCCACCATGGAGA 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

การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีและการทำแอนติบอดีให้มีความบริสุทธิ์นำ heavy chain recombinant plasmid และ light chain recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์ human 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) หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ได้มาตรวจสอบคุณสมบัติเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ western blot ตามลำดับการวิเคราะห์ค่า antibody titer และ sensitivity ในการตรวจหาการติดเชื้อ Fasciolosis ด้วยเทคนิค sandwich ELISA และ Dot-ELISA ดังกล่าวมาข้างต้น และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความไวและความจำเพาะต่อ Fasciolosis โดยใช้สูตรคำนวณของ Lalkhen และ McCluskey (2008)

การตรวจสอบคุณสมบัติของ MoAb ด้วยวิธี immunoblotting

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

การสกัดโปรตีนแอนติเจนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิเพื่อนำมาทดสอบกับ MoAb

นำพยาธิตัวเต็มวัยที่เก็บจากตั๊กแตนที่เชื้อที่มาสกัดโปรตีนจากชั้นผิว (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 นำชิ้น 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 supernatant 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

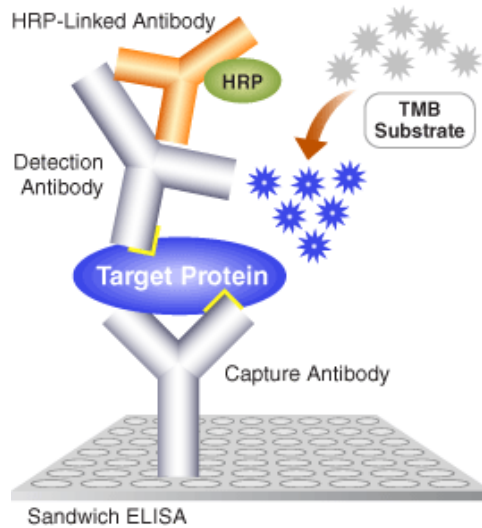
หลังจากทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้ว ทำการย้ายโปรตีนจาก gel สู่ PVDF membrane ใน transferring buffer ที่มี 40 mM Tris, pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 20% (v/v) methanol, และ 0.05% SDS ทำการย้ายโปรตีนโดยใช้ constant voltage ที่ 10 v, อุณหภูมิ 10-15° 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) H₂O₂ ใน PBS pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่น membrane แช่น้ำกลั่น 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



ใส่ซีรัมสัตว์ที่ติดเชื้อลงในหลุมของ ELISA plate



ใส่โพลีโคลนัลแอนติบอดี ต่อแอนติเจนเป้าหมายที่เชื่อมกับ biotin (detection antibody)



ใส่ streptavidin-HRP ลงในหลุมของ ELISA plate



ใส่ TMB substrate ลงในหลุมของ ELISA plate

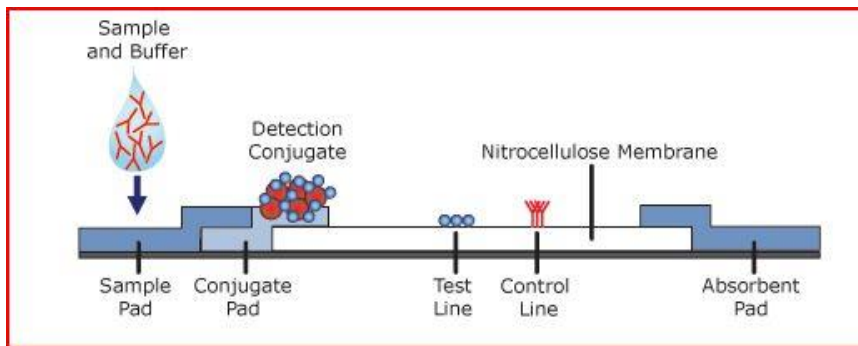


หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N HCl แล้วอ่าน OD

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 และ ชีรุ่ม 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 particles จับตัวกับแอนติบอดีต่อโมโนโคลนัล แอนติบอดีที่บริเวณควบคุม (control line) แต่ในกรณีที่ตัวอย่างไม่มีแอนติเจนปนอยู่ จะเกิดแถบสีขึ้นเพียงแถบเดียวจากโมโนโคลนัล

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

ผลการวิจัย (Results)

การโคลนยีน Cathepsin B2 (SmCatB2)

ทำการเชื่อมยีน SmCatB2 ของพยาธิใบไม้ตับ *Schistosoma mansoni* เข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector (DNA ligation) แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของ *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation ต่อมานำเชื้อไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและนำไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในเชื้อ *E.coli* DH5 α โดยทำการเลือกเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงมาโคโลนี 10 colonies เพื่อนำมาตรวจสอบหายีน CatB2 ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไป วิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

การสกัดพลาสมิดและการหาลำดับเบสของโคลน SmCatB2

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

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน

ลำดับต่อมาทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลเพื่อตรวจสอบดูความเหมือนกัน ระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน SmCatB2 กับโปรตีน CatB2 ในพยาธิ *Schistosoma mansoni* ได้ผลดังนี้

J1_T7	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60
J2_T7	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60
J3_T7	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60
J5_T7	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60
J1_SP6	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60
J2_SP6	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60
J5_SP6	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60
J4_T7	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60
J3_SP6	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60
J4_SP6	MNQYSCYLLQLYIIIIILSYGTLNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTR	60

J1_T7	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120
J2_T7	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120
J3_T7	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120
J5_T7	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120
J1_SP6	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120
J2_SP6	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120
J5_SP6	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120
J4_T7	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120
J3_SP6	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120
J4_SP6	FRTVSDIRRM LGALPDPNGEQLETLC TGYISDEL PKSF DARVEWPH CPSISEIRDQSSCG	120

J1_T7	SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180
J2_T7	SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180
J3_T7	SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180
J5_T7	SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180
J1_SP6	SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180
J2_SP6	SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180
J5_SP6	SCWAFGAVEAMSDRICIKSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180
J4_T7	SCWAFGAVEAMSDRICIRSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180
J3_SP6	SCWAFGAVEAMSDRICIRSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180
J4_SP6	SCWAFGAVEAMSDRICIRSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMGCNNGGFPHSAWLYWKNQGI	180

*****.*****

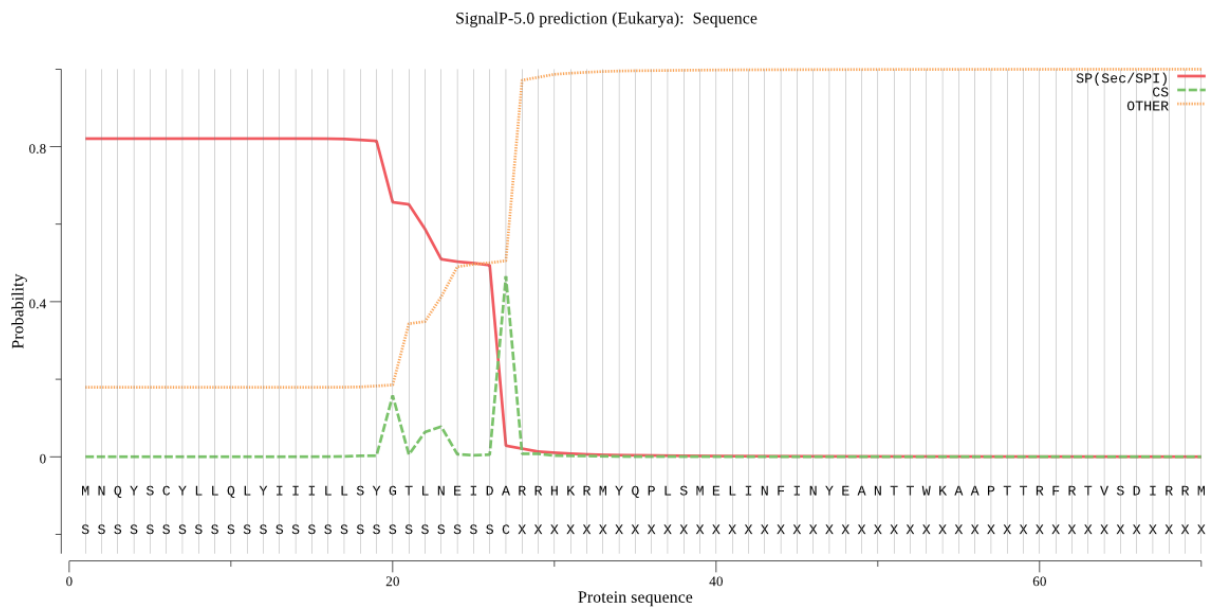
J1_T7	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	240
J2_T7	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	240
J3_T7	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	240
J5_T7	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	240
J1_SP6	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	240
J2_SP6	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	240
J5_SP6	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	240
J4_T7	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	240
J3_SP6	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	240
J4_SP6	VTGDLYNTTNGCQPYEFPPCEHHVIGPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNIPEYKDKWYGE	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	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 347
J2_T7	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 347
J3_T7	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 347
J5_T7	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 347
J1_SP6	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 347
J2_SP6	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 347
J5_SP6	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 347
J4_T7	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 347
J3_SP6	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 347
J4_SP6	ENNVPYWLIANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDNAGIPKIKN 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

MmCatB	--MW-----WSL- ILLSCLLALTSAHDKPSFHPLSDDLINYNK-QNTTWQAGRNF	47
HsCatB	--MW-----QLW-ASLCCLLVLANARSRPSFHPLSDELVNYVVK-RNTTWQAGHNF	47
BtCatB	--MW-----RLL-ATLSCLLVLT SARSSLYFPPLSDELVNFVVK-QNTTWKAGHNF	47
FhCatB2	-----EPFSDDELIRFVNEESGASWKAARST	25
SmCatB2	-MNQYSCYLLQLYIIIIISYGLTNEIDARRHKRMYQPLSMELINFINEANTTWKAAPT	59
SjCatB	-MYWYNYLLLCYIIII-LLICTLNENDARRHKRMHQPLSKELIHFINEANTTWKAGPTR	58
SmekCatB	MLKIAVC-----IVSLFTPLKAHVTRNNEHIEPLSDEMISFINQHPNAGWKADKSD	52
CsCatB2	MLPSFVLY-----GLLFFIYSFEVTHC-----EN--LGSVGVREHVHPTAGARWISVRYP	48
OvCatB2	-MPW-----LILVFGTVLAAAG-----EV--TGSIGMREYVDSETGAKWIIYAEP	42



MmCatB	YNVDISYLKLCGTVLGGPKLPGRVA-----FGEDIDLPEFDAREQWSNCPPTIGQIRD	101
HsCatB	YNVDMSYLKRLCGTFLGGPKPPQRM-----FTEDLKLPAFDAREQWPQCPTIKEIRD	101
BtCatB	YNVDLSYVKKLCGAILGGPKLPQRDA-----FAADVLPESFDAREQWPNCPTIKEIRD	101
FhCatB2	RFSNVDFKLDLGLALSETPEERNALRPTIKHD-ISKNDLPESFDARSQWPQCWTISEIRD	84
SmCatB2	RFRTVSDIRRLGA-LPDPNGEQLET-LCTGYI--SDELPKSFDARVEWPHCPSISEIRD	115
SjCatB	RFKTVSDIRRLGA-LPDPNGEQLET-LCTGYELTLNELPKSFDARKEWTHCPSISEIRD	116
SmekCatB	RFHSLDDARILMGARREDPDVKKRQRPVTDHHDVD-VGIPSYFDSRKKWPRCKSISEIRD	111
CsCatB2	KPFESDNKLHHFGA-IREPVEQRAQRSTVRHEDFDSKLIPKSFDARATWPHCPSISEIRD	107
OvCatB2	ETFRQGNLQLMFRA-IREPEEQRSKRPTVSHESLGDENIPKTFDAREQWPHCPTIGQIRD	101

MmCatB	QSGCGS [★] WAFGAVEAISDRIC [↓] IHTNGRVNVEVSAEDLLTCCG [↓] IQC [↓] GDGC [↓] NGGYPSGAWSF	161
HsCatB	QSGCGS [★] WAFGAVEAISDRIC [↓] IHTNAHVSVEVSAEDLLTCCGSMCGDGC [↓] NGGYPAEAWNF	161
BtCatB	QSGCGS [★] WAFGAVEAISDRIC [↓] IHSNGRVNVEVSAEDMLTCCGGE [↓] CGDGC [↓] NGGFPSGAWNF	161
FhCatB2	QASCGS [★] WATAAASAMSDRVC [↓] IHNSGQMRPRLAAADPLSCCT-YCGQGC [↓] RGGYPPKAWDY	143
SmCatB2	QSSCGS [★] WAFGAVEAMSDRIC [↓] IKSKGKHKPFLSAENLVSCCS-SCGMGC [↓] NGGFPHSAWLY	174
SjCatB	QSSCGS [★] WAFGAVEAMSDRIC [↓] IESKGYKPFLLSAENLVSCCS-SCGMGC [↓] NGGFPHSAWLY	175
SmekCatB	QSRCGS [★] WAFGAVEAMTDRIC [↓] IQSGAKQSVDLSAVDLISCK-DCGDGC [↓] NGGFPGQAWDY	170
CsCatB2	QSSCGS [★] WAFGAVEAMSDRLC [↓] IHSSGAFNKSLSAVDLISCK-DCGDGC [↓] DGGFPPMAWDF	166
OvCatB2	QSSCGS [★] WAFGAVEAMSDRLC [↓] IHSNGTFTKSLSSIDLVSCKG-YCGFGC [↓] QGGYPPAAWDF	160

MmCatB	WTKKGLVSGGVYN [↓] SHVGC [↓] LPYTI [↓] PPCE [↓] HHV-NGSRPPCTGEG-DTPRC [↓] NKSC [↓] EAGYSPSY	219
HsCatB	WTRKGLVSGGLY [↓] ESHVGC [↓] CRPYSI [↓] PPCE [↓] HHV-NGSRPPCTGEG-DTPKCSKI [↓] CEPGYSPTY	219
BtCatB	WTKKGLVSGGLYN [↓] SHVGC [↓] CRPYSI [↓] PPCE [↓] HHV-NGSRPPCTGEG-DTPKCSKT [↓] CEPGYSPTY	219
FhCatB2	WMREGIVTGGT [↓] WENRTGC [↓] QPWFMT [↓] KCDHVGDSRKYSRC [↓] PHYTYPKPPCARAC [↓] TGYNKTY	203
SmCatB2	WKNQGI [↓] VTGDLYNT [↓] TNGC [↓] QPYEFP [↓] PE [↓] HHV-IGPLPSCDGDV-ETPSC [↓] KTNC [↓] QPGYNIPY	232
SjCatB	WKNQGI [↓] VTGDLYNT [↓] TNGC [↓] QPYEFP [↓] PE [↓] HNT-LGPLPVC [↓] DGDV-ETPPC [↓] KRTC [↓] QAGYNVSY	233
SmekCatB	WVTNGI [↓] VTGGSKENHT [↓] GC [↓] QPYFP [↓] PKCE [↓] HHT-KGKYPAC [↓] GPKIYKTP [↓] CKQK [↓] QKGYKTPY	229
CsCatB2	WKT [↓] HGI [↓] VTGGSK [↓] EPTGC [↓] CRPYFP [↓] PKQH [↓] HS-QGHYPP [↓] CP [↓] RIYPT [↓] PKV [↓] KHCDTP-KIDY	224
OvCatB2	WQAYGI [↓] VTGGSK [↓] EDPMG [↓] CRSYFP [↓] PKSSH [↓] HG-SKYP [↓] PC [↓] PHRIYDTPK [↓] VPKCDTP-NIDY	218

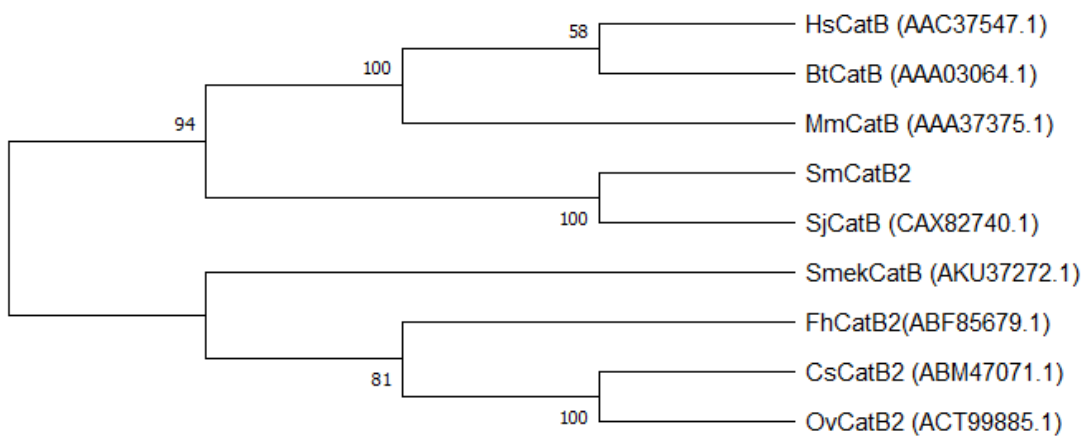
MmCatB	KEDKHFGYTSYSVNSVKEIMAEIYKNGPVEGAFTVFSDFLTYKSGVYKHEAGDMMGGHA	279
HsCatB	KQDKHYGNSYSVNSSEKDIMAEIYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQHVTGEMMGGHA	279
BtCatB	KEDKHFGCSSYSVANNEKEIMAEIYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQHVSGEIMGGHA	279
FhCatB2	EQDKFYGNSSYNVGEHESYIMQEIMKNGPVEVTF [★] AI [↓] FQDFGVYRSGIYHHVAGKFIGRHA	263
SmCatB2	EKDKWYGEKVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVS [★] GALLGGHA	292
SjCatB	ENDKWYGEKVYRVKSNQEAIMKELMQHGPVEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVS [★] GALLGGHA	293
SmekCatB	EQDKHYGMSYNVNNAKAIQKEIMMNGPVEAIDVYEDFLNYKSGIYRHVVTGSI [★] VGGHA	289
CsCatB2	QDKKTRANTSYNVHQSEVAIMKEILLNGPVEATFEVHEDFPEYKSGIYFHAWGGSVGGHA	284
OvCatB2	ETDKTRANITYNVQRSQMAIMKEIMINGPVEAAFEVYEDFFGYKQGVYFHSTGEFIGGHA	278

MmCatB	IRILGWGVENGVPYWLANSWNLDWGDNGFFKILRGENHCG [↓] IESEIVAGIPRTDQYWGRF	339
HsCatB	IRILGWGVENGTPYWLANSWNTDWGDNGFFKILRGQDHC [↓] IESEIVVAGIPRTDQYWEKI	339
BtCatB	IRILGWGVENGTPYWLANSWNTDWGDNGFFKILRGQDHC [↓] IESEIVAGMPCTHQY----	335
FhCatB2	VRMIGWGVENGVNW-----	278
SmCatB2	VRLLGWGEENNVPYWLANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECG [↓] IESDVNAGIPKIKN----	347
SjCatB	VRLLGWGEENNVPYWLANSWNTDWGDNGYFKIIRGKNECG [↓] IESDVNAGIPKIKN----	348
SmekCatB	IRILGWGEKKT [★] PYWLANSWNE [↓] DWGEKGLFRIVRGSDECSIESDVVAGLIKT-----	342
CsCatB2	IRILGWGEENGVPYWLANSWNE [↓] DWGEKGLRFLRGHNECG [↓] IEEATAGLPDLSTIPHF-	343
OvCatB2	IRILGWGEENGTPYWLANSWNE [↓] GWGEDGYFKMLRGKNECG [↓] IEDEVTAGLPELSIIPPK-	337

↓ : Cysteine residues ★ : Active sites QSSCGS[★]WAFG : 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 ที่สังเคราะห์ขึ้นมา มีความใกล้ชิดกับกลุ่มพยาธิ *S. japonicum*

การโคลนยีน Cathepsin L (SmCatL)

ทำการเชื่อมยีน SmCatL ของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mansoni* เข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector (DNA ligation) แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของ *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation ต่อมานำเชื้อไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและนำไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในเชื้อ *E.coli* DH5 α โดยทำการเลือกเชื้อที่เพาะเลี้ยงมาโคลนนี้ 10 colonies เพื่อนำมาตรวจสอบหา ยีน 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: atgaagtgtttcctatgtttgactgctttttttgtagtcggttggtggtgattctggtttc
+1fr: M K C F L C L T A F F V V V V G D S G F

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

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

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

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

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

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

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

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

DNA: atagaaggtcaacactatcgtaaaactaacctgtagttaatttggcggagcagcaattg

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

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

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

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

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

DNA: gaagagtggggtgaaaagggtatattaaaatctcaaagggttctcataatatgtgtggt
+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

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

ABV71063.1
MKCFLCLTAFFVVVVGDSGFRKWSNLEPSLSLGRLEFQQVKEGVPGSVNVVELLDDIIAAW
SmCatL
MKCFLCLTAFFVVVVGDSGFRKWSNLEPSLSLGRLEFQQVKEGVPGSVNVVELLDDIIAAW

ABV71063.1
KFFKIQFKRAYNGIHEETRRFFIFSANFVKMMEHNHAFQEGKVTYKMGVNEFTDKTDYEL
SmCatL
KFFKIQFKRAYNGIHEETRRFFIFSANFVKMMEHNHAFQEGKVTYKMGVNEFTDKTDYEL

ABV71063.1
KKLRGYKVTSGAIRHKGSTFIRSEHTKLPSKVDWRREGAVTDVKNQGQCGSCWAFSTTGA
SmCatL
KKLRGYKVTSGAIRHKGSTFIRSEHTKLPSKVDWRREGAVTDVKNQGQCGSCWAFSTTGA

ABV71063.1
IEGQHYRKTNRLVNLSEQQLVDCSKSYGNGCSGGLMNSAFEYVRDNEGIDSEISYPYVS

การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนของ Cathepsin L ของ *Schistosoma mansoni* กับ species อื่น

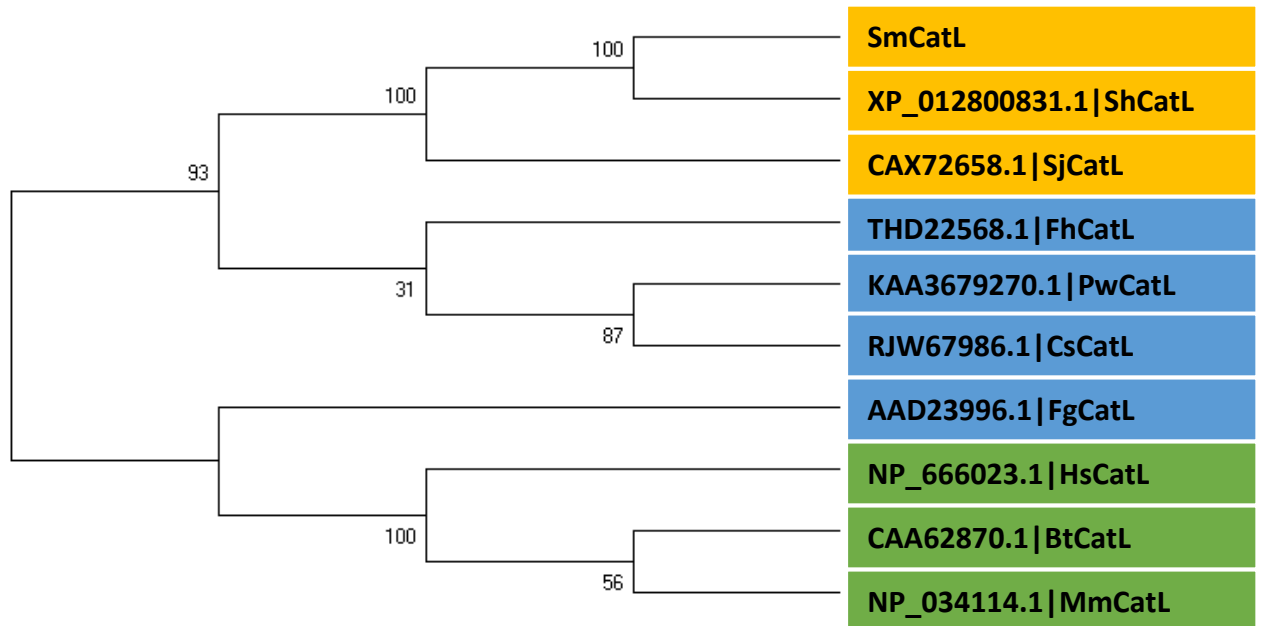
FgCatL	-----
MmCatL	-----MNL L L L L L
HsCatL	-----MNPTL L I L
BtCatL	-----MNP S F F L
FhCatL	-----MRISFLI I F S V Q C F L-----V S C R L Q F V P W A K L T Q A E P L
SjCatL	-----MRFFVAFV--IAFIPV-----ALSNSEYEKWS D L E S S F S L
SmCatL	-----MKCFLCL---TAFV V-----V V G D S G F R K W S N L E P S L S L
ShCatL	-----MRCLLCL---SALFVI-----V V G D P G Y K K W S N L E P S L S L
PwCatL	-----MPFVGAFLV L F C S F S-----H I I N S Q D I E W K S L Y P A S K I
CsCatL	E T R L V V L D L F P L E Y R R L R G D L I L T Y A L F E Q D L V N R G F I V G P E N T R Q G H V Q W R K L A P A Q K T
FgCatL	-----M R L F I L A V L T V G V L G S N D D L W H Q W K R M Y N K E Y N G - A D D E H R R N I W E E N
MmCatL	AVL-----C L G - T A L A T P K F D Q T F S A E W H Q W K S T H R R L Y G - T N E E W R R A I W E K N
HsCatL	AAF-----C L G - I A S A T L T F D H S L E A Q W T K W K A M H N R L Y G - M N E E G W R R A V W E K N
BtCatL	T V L -----C L G - V A S A A P K L D P N L D A H W H Q W K A T H R R L Y G - M N E E W R R A V W E K N
FhCatL	S P Q E P S -----S C S S E K L F D K S V E A A W K L F N M A F N K G L S - E M E S K F R F D I F K Q N
SjCatL	S Q L F K --- Q K A V G D G I F N S E N L E L L S N I G A A W K F F K I N F K R A Y G N V M E E T K R F L I F G T N
SmCatL	G R L F E --- Q Q V K E - G V P G S V N V E L L D D I I A A W K F F K I Q F K R A Y N G I H E E T R R F F I F S A N
ShCatL	G R L L E --- Q Q V I E G G V S S S V N V D L L A D I I S A W K F F K I H F K R V Y D S I H E E T R R F F I F G A N
PwCatL	S P A G - V A S M S K V D S - D F T V V S D A S L N E T L H K A W E L F K Y H F K R D F A N P L E Q L K R F T I F A K N
CsCatL	S F W K G A S P L T P L D S M H M Q D V I G V D W N F T L S S I W K H F M T T Y K R N Y I D P S E H E R R F K I F A N N
FgCatL	V K H I Q E H N L R H D L G L V T Y T L G L N Q F T D M T F -----E E F K A K Y L T E M P R A S D I L
MmCatL	M R M I Q L H N G E Y S N G Q H G F S M E M N A F G D M T N -----E E F R Q V V N G Y R H Q ---K H
HsCatL	M K M I E L H N Q E Y R E G K H S F T M A M N A F G D M T S -----E E F R Q V M N G F Q N R ---K P
BtCatL	K K I I D L H N Q E Y S E G K H A F R M A M N A F G D M T N -----E E F R Q V M N G F Q N Q ---K H
FhCatL	Y R M I M E H N V K Y E Q G L T S Y R M D I N A F S D K T N -----E E L K S L - R G I R M P T G G L M
SjCatL	F I K M M E H N R A Y Q E G K A T Y K M G V N N F T D K T E -----Y E L R K L - R G Y R S A C R I A K
SmCatL	F V K M M E H N H A F Q E G K V T Y K M G V N E F T D K T D -----Y E L K K L - R G Y K V T S G A I R
ShCatL	F V K M V E H N H A Y Q E G K V T Y K M G V N E F T D K T D -----Y E L K K L - R G Y K V T G G A M K
PwCatL	F L R M M K H N E L Y I K G R V L Y K M G V N E F S D K T E -----K E L Q H L - R G L K I Q P G A T R
CsCatL	F V R I S K H N V R F I Q G Q V S Y T M G I N E F S D K V I G L I I H T I C F Q T D E E L K R L - R C F R G S L N A S R
FgCatL	S H G I P Y E - A N N R A V P D K I D W R E S G Y V T E L K D G N C G S W A F S T T G T M E G Q Y M K N E R T S I S
MmCatL	K K G R L F Q E P L M L K I P K S V D W R E K G C V T P V K N O G Q C G S W A F S A S G C L E G Q M F L K T G K L I S
HsCatL	R K G K V F Q E P L F Y E A P R S V D W R E K G Y V T P V K N O G Q C G S W A F S A T G A L E G Q M F R K T G R L I S
BtCatL	K K G K L F H E P L L V D V P K S V D W T K K G Y V T P V K N O G Q C G S W A F S A T G A L E G Q M F R K T G K L V S
FhCatL	-R R F L Y T - H S N G T P P D S I D W R D K G A V T D V K N O G N C G S W A F A T T G A I E G H Q F N K Y G K L Y S
SjCatL	P K G S T F I S S E H A K L P D R V D W R R N G A V T P V K N O G Q C G S W A F S S T G A I E G Q H Y R K T N R L V N
SmCatL	H K G S T F I R S E H T K L P S K V D W R R E G A V T D V K N O G Q C G S W A F S T T G A I E G Q H Y R K T N R L V N
ShCatL	H K G S T F I R S E H T K L P G S V D W R R E G A V T D V K N O G Q C G S W A F S T T G A I E G Q H Y R K T N H L V N
PwCatL	-N G S T Y L L T - S A V P P K S I D W R D L G A V T E V K N O G N C G S W A F S A T G A I E G Q H F R K T K L L T S
CsCatL	-D G S K Y I A I - A A P P P S E I D W R N K G A V T P V K N O G N C G S W A F S A T G A I E G Q N F L A T G N L V S
FgCatL	F S E Q Q L V D C S G P W G N M G C S G G L M E N A Y E Y L K Q - F G L E T E S S Y P Y T A V E -----G Q C R Y N R
MmCatL	L S E Q N L V D C S H A Q G N Q G C N G G L M D F A F Q Y I K E N G G L D S E E S Y P Y E A K D -----G S C K Y R A
HsCatL	L S E Q N L V D C S G P Q G N E G C N G G L M D Y A F Q Y V Q D N G G L D S E E S Y P Y E A T E -----E S C K Y N P
BtCatL	L S E Q N L V D C S R A Q G N Q G C N G G L M D N A F Q Y I K D N G G L D S E E S Y P Y L A T D T -----N S C N Y K P
FhCatL	L S E Q Q L V D C S A E D G N N A C N G G L M D F A F K Y I Q E A G G I E T E S C Y P Y V S G R T G H E N - K C S L N R
SjCatL	L S E Q Q L I D C S K S Y G N N G C E G G L M D L A F Q Y V R D N E G I D S E I S Y P Y I S G D - G D E N V R C L F N S
SmCatL	L S E Q Q L V D C S K S Y G N N G C S G G L M N S A F E Y V R D N E G I D S E I S Y P Y A S G D - G T E N N R C L F N A
ShCatL	L S E Q Q L V D C S K S Y R N N G C S G G L M N S A F E Y V R D N E G I D S E I S Y P Y I S G N - G T E N M I C L F N A
PwCatL	L S E Q Q L V D C S S G F G N N G C N G G L M D S A F Q Y V R K A G G I A T E K S Y P Y V S G E T S E A N P E C K F N V
CsCatL	L S E Q Q L V D C S S E Y G N N A C N G G L M D N A F K Y V K D S N G I D T E A S Y P Y V S G E T G D A N P T C R F N L
FgCatL	Q L G V A K V T ● Y Y T V H S G S ● V E L K N L V G A E G P A A V A V D V E - S D F M M Y S G G I Y Q S R T C ● S L - -
MmCatL	E F A V A N D T G F V D I P Q - Q E K A L M K A V A T V G P I S V A M D A S H P S L Q F Y S S G I Y Y E P N C S S K - -
HsCatL	K Y S V A N D T G F V D I P K - Q E K A L M K A V A T V G P I S V A I D A G H E S F L F Y K E G I Y F E P D C S S E - -
BtCatL	E C S A A N D T G F V D I P Q - R E K A L M K A V A T V G P I S V A I D A G H T S F Q F Y K S G I Y Y D P D C S C K - -

FhCatL	TCFVAHVKGYRDLPKADELALMSAVGLEGPVAIAINAGLPSFSFYASGVYEDVQC	GG EED
SjCatL	TNIMAQVTGYINIHEGDERALMNAVATIGPVSVAINAGLSSFSMYKSGIYSDPE	CASASE
SmCatL	SNILAQVTGYVNIHEGDERALMDAVATKGPVSVAINAGLPSFSMYKSGIYSDT	DC EGTLD
ShCatL	SNIVAQVSGYVSIHEGDERALMDAVATKGPVSVAINAGLPSFSMYKSGVYSDI	GC EGTLD
PwCatL	TIAAATVTGYVDVPQFNEYALRQALAMHGPIISIAINAGLPSFSPSYKSGIYY	DKDCSGDLE
CsCatL	KEAVVRVTGYIDLPRGQVSELKQAVGHYGPISVAINAGLPSFMSYKSGVYSDD	QCSSD--
FgCatL	RVN [★] HAVLAVGYGTQ----GGTDYWIVK [★] NSWGSSWGERGYIRMVRNRGNM	CGIASLASLPM
MmCatL	NLDHGVLVVGYYEGTDSNKNKYWLVKNSWGSEWGMGYIKIAKDRDNHC	GLATAASYPV
HsCatL	DMDHGVLVVGYYGFESTESDNNKYWLVKNSWGEWGMGGYVKMAKDRRNHC	GIASAASYPT
BtCatL	DLDHGVLVVGYYGFEGTDSNNKFWLVKNSWGPEWGWNGYVKMAKDQNNHC	GIATAASYPT
FhCatL	DLDHGVLVVGYYGRE----NGIDYWLVKNSWGPWHGEKGYIKMRNKHNM	CGVATVASYPL
SjCatL	DLDHGVLVVGYYGIE----DGKPYWLKNSWGEDWGDGYVKILKDSKNM	CGVASAASYPL
SmCatL	ALDHGVLVVGYYGEE----NGRSYWLKNSWGEWGEKGYIKISKGSHNM	CGVASAASYPL
ShCatL	ALDHGVLVVGYYGKE----NGHSYWLKNSWGEDWGENGYIKILKDSHNM	CGVASAASYPL
PwCatL	SLDHGVLVVGYYGEE----NRVPYWIKNSWGEWGEQGYVRILRNSKNM	CGVTSSASYPL
CsCatL	DLDHGVLVVGYYGEE----NGIPYWLKNSWGPWHGENGYVKILRDHNNLC	CGVASMASYPL
FgCatL	VARFP	
MmCatL	VN---	
HsCatL	V----	
BtCatL	V----	
FhCatL	V----	
SjCatL	V----	
SmCatL	V----	
ShCatL	V----	
PwCatL	V----	
CsCatL	M----	

● : Cysteine residues ★ : Active sites ▼ : ERFNIN-motif ▲ : N-glycosylation

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 และเปรียบเทียบกับโฮสต์ในธรรมชาติได้แก่ 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 โดยการทำให้ PCR ตามด้วยทำการ ligation เข้าสู่โคลนนิ่งเวกเตอร์คือ pGEM-T Easy vector และทำการ transformation เข้าสู่โฮสต์เซลล์คือ *E. coli* (DH5 α) 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 และเปรียบเทียบกับโฮสต์ในธรรมชาติได้แก่ 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*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobium* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัด RNA ของเชื้อพยาธิแล้วนำมาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณของ CatB2 และ CatL genes โดยการทำให้ PCR ตามด้วยทำการ ligation เข้าสู่โคลนนิ่งเวกเตอร์คือ pGEM-T Easy vector และทำการ transformation เข้าสู่โฮสต์เซลล์คือ *E. coli* (DH5 α) 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 และเปรียบเทียบกับโฮสต์ในธรรมชาติได้แก่ 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 ต่อไปในอนาคต

สรุปและเสนอแนะ

ไม่มี

(5) ผลผลิต (Output)

(5.1) ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ 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 เกื้อไข

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2562

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

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 404,150 บาท เมื่อวันที่ 30 เดือน ตุลาคม ปี 2561

งวดที่ 2 (40%) 323,320 บาท เมื่อวันที่ 26 เดือน สิงหาคม ปี 2562

งวดที่ 3 (10%) บาท เมื่อวันที่ - เดือน - ปี -

รวม 727,470

รายจ่าย

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. ค่าธรรมเนียมอุดหนุน สถาบัน	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.