

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การค้นหาวัดชิ้นแอนติเจนตัวใหม่ของโรคเลปโตสไปโรซิสโดยอาศัยโปรตีโอมิกส์ของโปรตีนบนผิวเซลล์

Identification of new leptospirosis vaccine antigens by cell-surface proteomics

รายนามคณะผู้วิจัย

- (1) รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- (2) Associate professor Alain Jacquet
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- (3) อาจารย์ ดร. ไตรวัชร ฟิลิษฐ์กุล
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- (4) พันโท นสพ นพดล แสงจันทร์
แผนกสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2561 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นพ.เกียรติ รักรัษฎธรรม ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ผู้ช่วยวิจัยและ นิสิตปริญญาโท-เอกของกลุ่มวิจัยโรคเลปโตสไปโรซิสทุกคน รวมทั้งขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัย คณะ แพทยศาสตร์ ที่ช่วยประสานงานด้วยดีมาโดยตลอด

บทคัดย่อภาษาไทย

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคที่มีการแพร่กระจายในหลายพื้นที่รวมทั้งประเทศไทย มีสาเหตุมาจากเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค ซึ่งพยาธิกำเนิดของโรคยังไม่ทราบชัดเจน โปรตีนบนผิวเซลล์เป็นส่วนแรก que เชื้อสัมผัสกับเซลล์ของโฮสต์และสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนาวัคซีน การหาโปรตีนบนผิวเซลล์ทั้งหมดจะเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการศึกษาพยาธิกำเนิด และการค้นหาวัคซีนตัวใหม่ งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อจำแนกโปรตีนบนผิวเซลล์ทั้งหมดของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค *Leptospira interrogans* serovar Pomona ในการศึกษานี้ใช้ 2 วิธี ในการคัดแยกโปรตีนบนผิวเซลล์ออกจากโปรตีนอื่น ได้แก่ วิธีการย่อยโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease shaving) และวิธีการติดฉลากโปรตีนที่ผิวเซลล์ด้วยไบโอติน (surface biotinylation) ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้จาก เชื้อเลปโตสไปราที่มีสภาพสมบูรณ์ไม่แตก (intact cells) ภายหลังการถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเนสเค (proteinase K) และติดฉลากด้วยไบโอติน ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ถูกตรวจสอบโดยวิธีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent staining) และ เวสเทิร์น บล๊อตติง (Western blotting) ตรวจสอบโปรตีน FlaA1 ซึ่งอยู่ระหว่างผนังเซลล์ชั้นนอกกับชั้นในของเชื้อ และโปรตีน OmpL1 หรือ OmpL47 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทราบก่อนหน้านี้อแล้วว่าเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ แล้วจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปจำแนกชนิดโปรตีนด้วยวิธี liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) และวิเคราะห์ทำนายตำแหน่งของโปรตีนที่ได้ด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน (protein database) ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนที่คาดว่าจะมีตำแหน่งอยู่ที่ผนังเซลล์ชั้นนอก 130 ชนิดจากวิธีย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ และ 212 ชนิดจากวิธีติดฉลากด้วยไบโอติน เมื่อจัดลำดับโปรตีนด้วยปริมาณการแสดงออกพบว่า 12 โปรตีนถูกพบในทุกครั้งของทั้ง 2 วิธี และ 9 โปรตีนถูกพิสูจน์แล้วว่าเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ ได้แก่ LipL32 LipL41 LipL71 LipL46 OmpL36 LipL21 OmpL1 Elongation factor Tu และ Loa22 ดังนั้นงานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลโปรตีนบนผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค *Leptospira interrogans* serovar Pomona รวมทั้งยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่ยังไม่เคยทราบว่าเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ และจะนำไปใช้ศึกษาพัฒนาวัคซีนตัวใหม่ต่อไปในอนาคต

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Leptospirosis is a re-emerging zoonosis of global distribution including Thailand. It caused by pathogenic *Leptospira*. The pathogenesis of leptospirosis remains unclear. Surface-exposed outer membrane proteins (OMPs) are the first components for interactions with host cells and immune system and should be potential targets for vaccine development. The study of surface proteomics will be important for better understanding of pathogenesis and identification of new vaccine candidates. This study aimed to identify surface proteome of pathogenic *Leptospira* by surface shaving using proteinase K and surface biotinylation. Intact leptospiral proteins were labeled with biotin (Sulfo-NHS-SS-Biotin). After proteinase K treatment and biotinylation, the membrane integrity of leptospire was determined by immunofluorescence staining and Western blotting using antibodies against periplasmic protein FlaA1 and known surface-exposed outer membrane protein OmpL1 or OmpL47. Proteins obtained from both methods were further identified by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS). We found 212 putative OMPs from surface biotinylation and 130 putative OMPs from surface shaving. Based on protein abundance by MaxQuant software, 12 OMPs were found in all replicate experiments of both methods. Nine proteins have already confirmed as surface exposed OMPs including LipL32, LipL41, LipL71, LipL46, OmpL36, LipL21, OmpL1, Elongation factor Tu, and Loa22. Therefore, this study was able to obtain surface-exposed OMPs of *Leptospira interrogans* serovar Pomona. There were several hypothetical proteins that are putative surface-exposed OMPs and should be evaluate as new vaccine candidates in the future.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญภาพ	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย	7
บทนำ	8
วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	10
อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	29
บรรณานุกรม	31
ประวัติคณะผู้วิจัย	35

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1	12
รูปที่ 2	13
รูปที่ 3	15
รูปที่ 4	15
รูปที่ 5	16
รูปที่ 6	18
รูปที่ 7	18
รูปที่ 8	20
รูปที่ 9	20
รูปที่ 10	23
รูปที่ 11	25

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

C	Cytoplasm
E	Elute
EC	Extracellular
DTT	Dithiothreitol
F	Flow through
IM	Inner Membrane
LC	Liquid chromatography
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
MS	Mass spectrometry
MW	Molecular weight
OM	Outer Membrane
OMP	Outer Membrane Protein
P	Periplasm
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Th1	T helper 1 cell
UNK	Unknown
W	Wash

บทนำ (Introduction)

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่พบมากที่สุดในโลกและถือเป็นโรคอุบัติใหม่ที่ สำคัญโดยเฉพาะจากภาวะโลกร้อน โรคนี้เกิดจากเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (*Leptospira interrogans*) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิด spirochete ที่มีลักษณะเป็นเกลียวบาง ขนาดกว้างประมาณ 0.1 ไมโครเมตร ยาว 6-20 ไมโครเมตร เคลื่อนไหวได้โดยอาศัย endoflagella สามารถก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ ปัจจุบันเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคมีรายงานมากกว่า 250 serovars แตกต่างกันตามภูมิศาสตร์ ปัจจุบันมีการใช้วิธีทางชีวโมเลกุลเพื่อดูความใกล้เคียงของลำดับเบสของ DNA ในการใช้แยก species ออกเป็นอย่างน้อย 20 species ซึ่งไม่สัมพันธ์กับวิธีทาง serology (1-6)

เชื้อเลปโตสไปราสามารถติดต่อได้จากการสัมผัสสิ่งขับถ่ายโดยเฉพาะปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อซึ่งปนเปื้อนอยู่ตามน้ำ ดินทรายเปียกชื้น หรือ พืช ผัก สำหรับประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อในหนู สุนัข โค กระบือ สุกร และแมว ส่วนใหญ่พบการระบาดของโรคในช่วงปลายฤดูฝนต่อฤดูหนาว (ตุลาคม-ธันวาคม) เชื้อสามารถไชเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังตามรอยแผลและเยื่อของปาก ตา จมูก หรือทางผิวหนังปกติที่เปียกชุ่มเนื่องจากแช่น้ำอยู่นาน เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะเข้าสู่กระแสเลือดแล้วกระจายไปตามอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต ลำไส้ เยื่อหุ้มสมอง ปอด หัวใจ ทำให้เกิดการอักเสบของอวัยวะเหล่านั้น ผู้ติดเชื้ออาจไม่ปรากฏอาการ จนถึงมีอาการรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ อาการและอาการแสดงที่พบได้แก่ ไข้เฉียบพลัน ปวดศีรษะรุนแรง หนาวสั่น ปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง ตาแดง ตาอักเสบrecurrent uveitis เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เหลือง โลหิตจาง ตับและไตวาย จุดเลือดออกตามผิวหนังและเยื่อ เยื่อออกในปอด (3, 7, 8)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบ humoral หรือแอนติบอดีมีความสำคัญต่อภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคเลปโตสไปโรซิส เนื่องจากภูมิคุ้มกันต้านต่อเชื้อเลปโตสไปราที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติหลังการติดเชื้อและสามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำเป็นภูมิคุ้มกันแบบ humoral และการเกิด passive immunity อาศัยแอนติบอดีเป็นหลัก (9-11) ส่วนระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (cell-mediated immunity) ยังมีการศึกษาน้อยแต่มีรายงานที่บ่งชี้ว่ามีความสำคัญในการป้องกันโรค เช่น การป้องกันการติดเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar Hardjo โดยใช้ killed vaccine กระตุ้น Th1 immunity (12) และกระตุ้นให้เกิดการสร้าง WC1+ gamma delta T cell memory population (13) การกระตุ้นเม็ดเลือดขาวด้วยเชื้อเลปโตสไปรา *in vitro* พบว่าทำให้มีการสร้าง TCR $\gamma\delta$ + T cell ซึ่งหลั่ง interferon (IFN)- γ (14)

ปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีจำหน่ายในปัจจุบันเป็นวัคซีนผลิตจากเชื้อตาย (bacterins หรือ whole cell killed vaccine) มีที่ใช้ส่วนใหญ่ในสัตว์และใช้อย่างจำกัดในคน (15) เนื่องจากมีข้อเสียหลายประการ คือ มีประสิทธิภาพในการป้องกันจำเพาะต่อ serovar ที่ใช้ผลิตวัคซีนแต่ไม่ป้องกันข้าม serovars อื่นๆ ภูมิคุ้มกันชนิดแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นอยู่ได้ไม่นาน ทำให้ต้องฉีดกระตุ้นทุก 1-2 ปี นอกจากนี้ ยังทำให้เกิดอาการข้างเคียงสูง และอาจมีโรคภูมิต้านทานตัวเองเกิด autoimmune ได้ (16) มีรายงานการพัฒนา subunit vaccine โดยเลือกวัคซีนแอนติเจนที่มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่อยู่ชั้นเซลล์ชั้นนอก

(outer membrane protein, OMP) ของเชื้อเลปโตสไปราและมีการแสดงออกอย่างอนุรักษ์ในเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค มีการแสดงออกขณะเชื้อก่อโรคในสัตว์ทดลองและในคน และกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี ตัวอย่างเช่น Lip32, LigA, LigB, OmpL1, LipL21 และ Loa22 (16-26) ดังนั้น วัคซีนยังต้องได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

วัคซีนแอนติเจนส่วนใหญ่ที่เลือกใช้เป็นส่วนประกอบของวัคซีนชนิดซับยูนิต (subunit vaccine) เป็นโปรตีนที่ผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อเลปโตสไปรา (16) เพื่อให้สามารถจับกับแอนติบอดีได้ดี โดยเลือกจากโปรตีนที่มีการศึกษาในรายงานก่อนหน้านี้ที่แสดงว่าเป็นโปรตีนที่ผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อเลปโตสไปรา (27-30) อย่างไรก็ตาม โปรตีนที่ผนังเซลล์ชั้นนอกไม่จำเป็นต้องเป็นโปรตีนที่มีส่วนที่ยื่นออกมานอกผิวเซลล์ (surface-exposed) ยกตัวอย่างเช่น โปรตีน Lip32 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผนังเซลล์ชั้นนอกที่มีปริมาณมากที่สุดของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (31) และเคยมีรายงานว่าอยู่ที่ผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปรา (19) แต่ต่อมาพบว่าโปรตีน Lip32 ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K จึงน่าจะฝังอยู่ในผนังเซลล์เป็นส่วนใหญ่ (subsurface) (32) ดังนั้น จึงยังเป็นที่ยกเถียงถึงความสำคัญของโปรตีนนี้ในแง่ของการเป็นปัจจัยก่อโรคและการนำมาใช้เป็นวัคซีนแอนติเจน (33) ซึ่งให้ผลที่หลากหลายในการป้องกันโรคในสัตว์ทดลอง (34-36)

ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาโปรตีนที่มีส่วนที่ยื่นออกมานอกผิวเซลล์ (cell-surface หรือ surface-exposed) ของเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ และพบว่ามียุทธศาสตร์ในการนำไปใช้เป็นวัคซีนแอนติเจนเนื่องจากมีส่วนที่สามารถจับกับแอนติบอดีได้จึงน่าจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ดี ได้แก่ การศึกษา cell-surface proteomics หรือ surfomics โดยการใช้เอนไซม์ protease ย่อย หรือโกน (shaving) โปรตีนส่วนที่ยื่นออกมานอกผิวเซลล์ (37-39) การใช้ surface biotinylation (40) เป็นต้น สำหรับเชื้อเลปโตสไปรามีรายงานการศึกษาด้วยวิธีดังกล่าวเฉพาะโปรตีนบางตัวที่เลือกมาเท่านั้น ได้แก่ OmpL36, OmpL37, OmpL47 and OmpL54 (23) แต่ยังไม่มีการศึกษาที่เป็น high-throughput แล้วทำการคัดเลือกมาเป็นวัคซีนแอนติเจน

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods) และผลการวิจัย (Results)

1. การค้นหาโปรตีนที่บนผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปรา (cell-surface proteomics)

1.1. วิธี protease shaving

เพื่อให้ได้ surface-exposed OMP ผู้วิจัยเลือกใช้เอนไซม์ proteinase K ที่มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีนมาย่อยโปรตีนจากผนังเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ ซึ่งวิธีนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายเพื่อค้นหา surface-exposed OMP และวัคซีนแอนติเจนตัวใหม่ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (1-3) โดยทดสอบหาความเข้มข้นของ proteinase K ที่เหมาะสมไม่ทำให้เซลล์แตก

ขั้นตอนการทดลอง

เพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (*Leptospira interrogans* serovar Pomona) ให้ได้ระยะ log-phase ทำการปั่นล้างเพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 xg เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 2 ครั้ง นำเชื้อที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ (intact cells) จำนวน 1×10^{10} เซลล์ มาบ่มกับ proteinase K buffer (เอนไซม์ proteinase K ใน 10 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 buffer pH 8.0) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย protease inhibitor บ่มเก็บตัวอย่างเซลล์ที่ความเร็วรอบ 9,000 xg เป็นเวลา 5 นาที และปั่นล้างด้วย Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นตัวอย่างถูกแยกออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วน cell pellet ซึ่งถูกนำไปตรวจหาตรวจยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งของโปรตีน (subcellular localization protein marker) ในเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี immunoblotting และส่วน supernatant ซึ่งมีส่วนของโปรตีนที่เป็น surface-exposed จะถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและระบุชนิดด้วยวิธี liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ในลำดับต่อไป

การตรวจยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ภายหลังการบ่มกับ proteinase K ใช้เซลล์จากส่วน cell pellet ตรวจสอบ 2 วิธี ได้แก่

1. การย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด SYTO9 และ propidium iodide (PI) กลุ่มทดลองควบคุม ได้แก่ เชื้อที่ไม่ได้บ่มกับ proteinase K buffer (intact cells เป็น negative control) และเชื้อที่ถูกทำลายผนังเซลล์ด้วยเมทานอล (methanol-treated cells เป็น positive control) บ่มตัวอย่างกับสีฟลูออเรสเซนต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บั่นล้างสีส่วนเกินที่ความเร็วรอบ 9,000 xg เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นส่องดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 1
2. วิธี immunoblotting โดยแยกโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate agarose gel electrophoresis (SDS-PAGE) และทำ Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งของโปรตีน ตรวจหา subcellular localization protein marker ของเชื้อเลปโตสไปรา

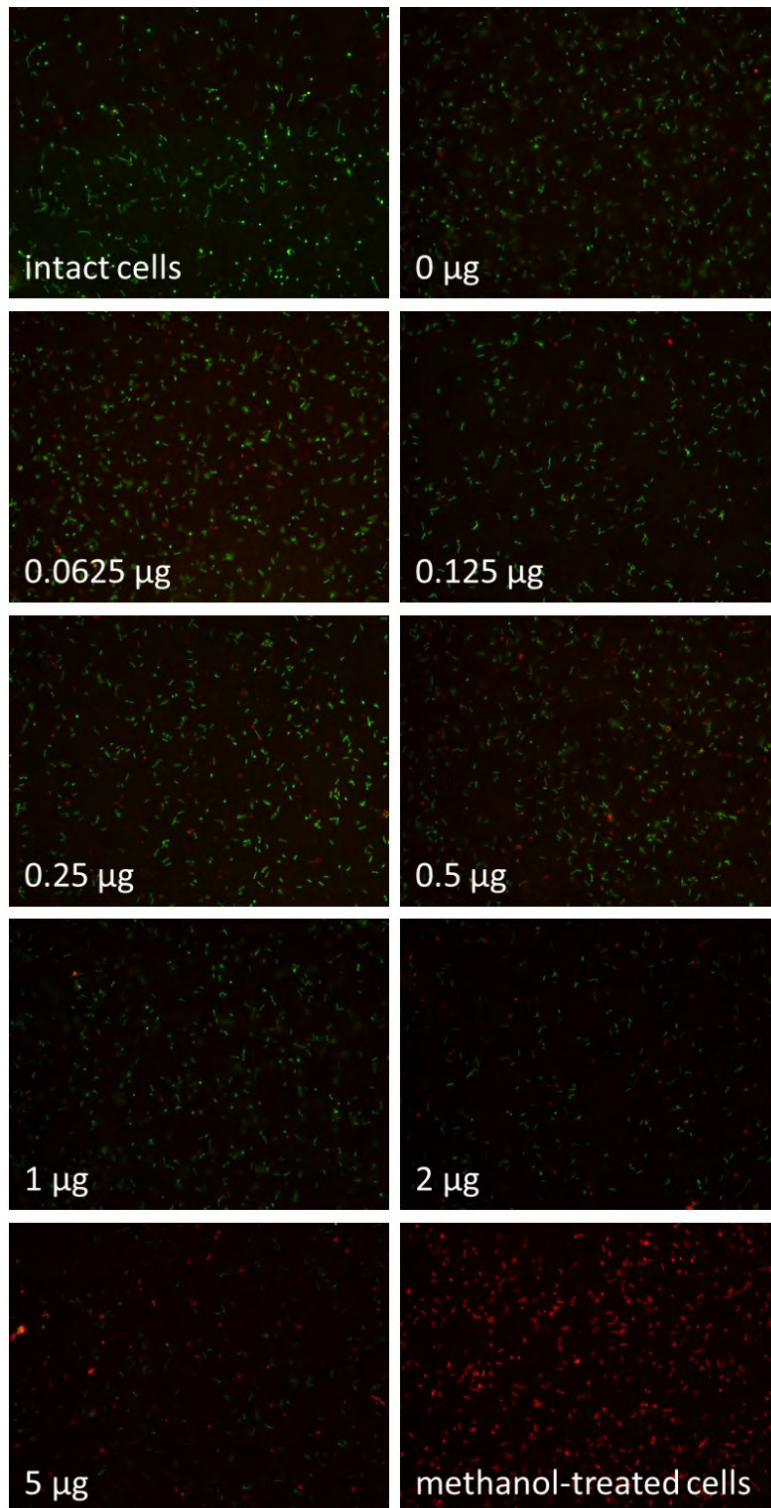
ไปรา ได้แก่ แอนติบอดีต่อโปรตีนที่มีการศึกษาขั้นนัยมาก่อนแล้วว่าเป็น surface-exposed OMP ได้แก่ OmpL47 หรือ OmpL1 โดยใช้ rabbit anti-OmpL47 หรือ rabbit anti-OmpL1 polyclonal antibody (1:5,000) และโปรตีนที่อยู่ในชั้นเพอริพลาสมิซึม ได้แก่ FlaA1 โดยใช้ rabbit anti-FlaA1 polyclonal antibody (1:5,000) เป็น primary antibody และใช้ HRP-conjugated sheep anti-rabbit IgG polyclonal antibody (1:5,000) เป็น secondary antibody จากนั้นเติม chemiluminescence substrate และตรวจหาสัญญาณพร้อมกับบันทึกภาพด้วยเครื่อง Chemidoc ผลทดลองแสดงในรูปที่ 2

ผลการทดลอง

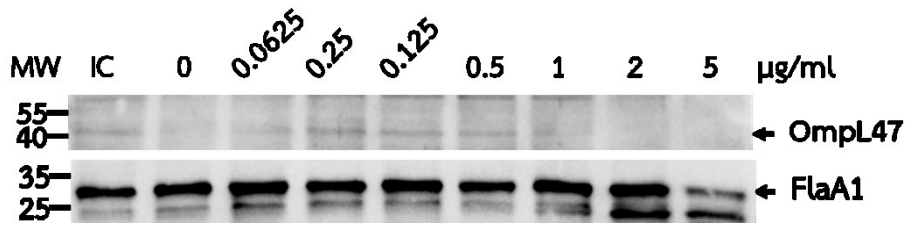
ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเบื้องต้น (ไม่ได้แสดงผล) โดยบ่มเชื้อกับเอนไซม์ความเข้มข้น 0-100 µg/ml และผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ถึงแม้การใช้เอนไซม์ความเข้มข้นมากกว่า 5 µg/ml จะสามารถทำให้เซลล์แตกเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิดการปนเปื้อนของโปรตีนจากโครงสร้างอื่นในปริมาณมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้เอนไซม์ความเข้มข้นต่ำกว่า 5 µg/ml ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้เซลล์ยังคงสภาพสมบูรณ์ (intact cells) ทำให้ได้ตัวอย่างใน supernatant มี surface-exposed OMP มากที่สุด และมีการปนเปื้อนของโปรตีนจากโครงสร้างอื่นน้อยที่สุด

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อบ่มเชื้อกับ proteinase K ความเข้มข้น 0 ถึง 5 µg/ml การแตกของเซลล์แปรผันตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ (รูปที่ 1) เซลล์ที่ย้อมติดสี PI ซึ่งย้อมติดสีแดงเฉพาะเซลล์ที่แตกสลาย มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูงขึ้น และเซลล์ที่ไม่แตกซึ่งย้อมติดสี SYTO9 ติดสีเขียวมีแนวโน้มลดลง โดยที่ความเข้มข้น 1 µg/ml หรือน้อยกว่ามีเซลล์ที่ยังสมบูรณ์ประมาณร้อยละ 95 เมื่อตรวจยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ด้วยวิธี immunoblotting ของโปรตีนของเซลล์ภายหลังการบ่มเชื้อกับเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 0-5 µg/ml ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีน FlaA1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในชั้นเพอริพลาสมิซึมของเชื้อเลปโตสไปรายังคงพบอยู่ในตัวเซลล์ สังเกตได้จากการพบโปรตีน FlaA1 ในตัวอย่างส่วน cell pellet (รูปที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามโปรตีน FlaA1 มีแนวโน้มถูกย่อยเมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 5 µg/ml สังเกตได้จากความเข้มลดลงเมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นอื่น บ่งชี้ว่าผนังชั้นนอกของเซลล์แตก นอกจากนั้น เมื่อตรวจหาโปรตีน OmpL47 ซึ่งถูกพิสูจน์ก่อนหน้านี้แล้วว่าเป็น surface-exposed OMP พบว่าโปรตีนดังกล่าวถูกย่อยออกจากตัวเซลล์เมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 µg/ml เป็นต้นไป สังเกตได้จากความเข้มของโปรตีน OmpL47 ในตัวอย่างส่วน cell pellet เริ่มลดลงหลังจากบ่มเชื้อกับเอนไซม์ความเข้มข้น 1 µg/ml (รูปที่ 2) ดังนั้น การใช้เอนไซม์ proteinase K ที่ความเข้มข้น 1 µg/ml เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถตัด surface-exposed OMPs ให้ไปอยู่ในตัวอย่างส่วน supernatant โดยที่เซลล์ไม่แตก

จากผลการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยจึงนำตัวอย่างโปรตีนในส่วน supernatant ที่ได้จากการบ่มเชื้อกับ
เอนไซม์ความเข้มข้น 1 µg/ml ไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS/MS ในลำดับต่อไป
เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะมี surface-exposed OMPs โดยมีโปรตีนจากตำแหน่ง
อื่นปนเปื้อนน้อย



รูปที่ 1 ตรวจสอบยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ หลังจากบ่มเชื้อกับ proteinase K ที่ความเข้มข้น 0-5 $\mu\text{g/ml}$ ตัวอย่างถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด SYTO9 และ PI หลังจากนั้นส่องดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ (intact cells) ติดสีเขียวของสี SYTO9 ขณะที่เซลล์ที่ผนังเซลล์ถูกทำลายและ methanol-treated cells ติดสีแดงของสี PI



รูปที่ 2 ตรวจยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ด้วยวิธี immunoblotting หลังจากบ่มเชื้อกับ proteinase K ที่ความเข้มข้น 0-5 µg/ml ตัวอย่างส่วน cell pellet ถูกนำมาตรวจหา subcellular localization protein marker โดยใช้ antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน OmpL47 (47 กิโลดาลตัน) และ FlaA1 (35 กิโลดาลตัน) ขนาดของโปรตีนมาตรฐานแสดงที่แถบด้านซ้ายมือ (MW) หน่วยเป็นกิโลดาลตัน, intact cells (IC) ถูกใช้เป็นการทดลองควบคุม

1.2. วิธี surface biotinylation

วิธี surface biotinylation เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการแยกโปรตีนบนผิวเซลล์ (4) โดยคุณสมบัติของ biotin ที่เป็น membrane impermeable agent กล่าวคือ มีคุณสมบัติ hydrophilic ที่ไม่สามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เช่น Sulfo-NHS-SS-Biotin สามารถนำมาใช้ติดฉลากโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ที่สมบูรณ์ ไม่มีการแตกสลาย เพื่อลดการปนเปื้อนของโปรตีนจากตำแหน่งอื่นในเซลล์

ขั้นตอนการทดลอง

เพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (*Leptospira interrogans* serovar Pomona) ให้ได้ระยะ log-phase ทำการปั่นล้างเพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 xg เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นแบ่งเชื้อเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 (ICB) และส่วนที่ 2 (IC) เป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ (intact cells) ส่วนที่ 3 (SCB) เป็นเซลล์ที่ถูกทำลายผนังเซลล์ให้แตกด้วยวิธี sonication (sonicated cells) แต่ละส่วนมีเชื้อจำนวน 1×10^{10} เซลล์

นำเชื้อตัวอย่างจากส่วนที่ 1 และ 3 มาติดฉลากโปรตีนด้วยการบ่มกับ Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo scientific) (0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ Biotin ใน PBS pH 8.0) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย quenching buffer กำจัด biotin ส่วนเกินออกจากตัวอย่างส่วนที่ 1 ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 2 ครั้ง ส่วนที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ถูกติดฉลากด้วย biotin (negative control) และส่วนที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุมโปรตีนทั้งหมด (ไซโตพลาสซึม ผนังเซลล์ด้านใน เพอริพลาสซึม และ ผนังเซลล์ด้านนอก) ที่ถูกติดฉลากด้วย biotin (positive control)

ทำการย่อยโปรตีนจากตัวอย่างทั้งหมดอีกครั้งด้วย lysis buffer และทำการคัดแยกโปรตีนที่ถูกติดฉลากให้บริสุทธิ์ด้วย neutral avidin agarose column (Thermo scientific) ตามขั้นตอนและวิธีการที่ผู้จัดจำหน่ายแนะนำ จากนั้นตรวจยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์หลังจากการติดฉลากด้วย biotin ด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด SYTO9 และ PI เช่นเดียวกับวิธีที่ใช้ในการศึกษา cell-surface proteomics ด้วยวิธี proteinase K shaving ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3

ตรวจหาโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย biotin ด้วยวิธี immunoblotting โดยแยกโปรตีนที่ติดฉลากด้วยวิธี SDS-PAGE และหลังจากนั้นตรวจหา biotin ที่ติดกับโปรตีนด้วยการใช้ HRP-conjugated streptavidin (BD Pharmingen) (1:5,000) เป็นตัวตรวจจับ หลังจากนั้นเติม chemiluminescence substrate และตรวจหาสัญญาณพร้อมกับบันทึกภาพด้วยเครื่อง Chemidoc ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4

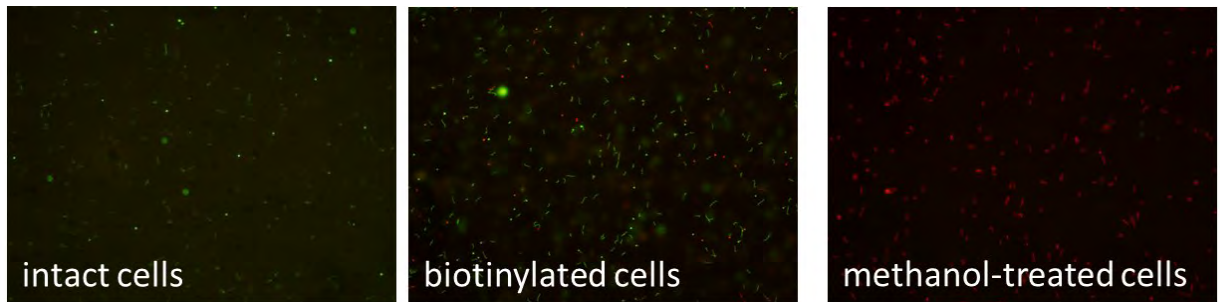
ตรวจยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์หลังจากการติดฉลากด้วย biotin ด้วยวิธี immunoblotting เช่นเดียวกับวิธีที่ใช้ในการศึกษา cell-surface proteomics ด้วยวิธี proteinase K shaving แต่ใช้การตรวจหาโปรตีน OmpL1 แทน OmpL47 ในการเป็น subcellular localization protein marker ของ surface-exposed OMP (แอนติบอดีมีอยู่จำกัดทำให้ต้องเปลี่ยนเป็นแอนติบอดีต่อ OmpL1 ซึ่งก็เป็นโปรตีนที่ยืนยันแล้วว่า surface-exposed เช่นเดียวกับ OmpL47) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5

ผลการทดลอง

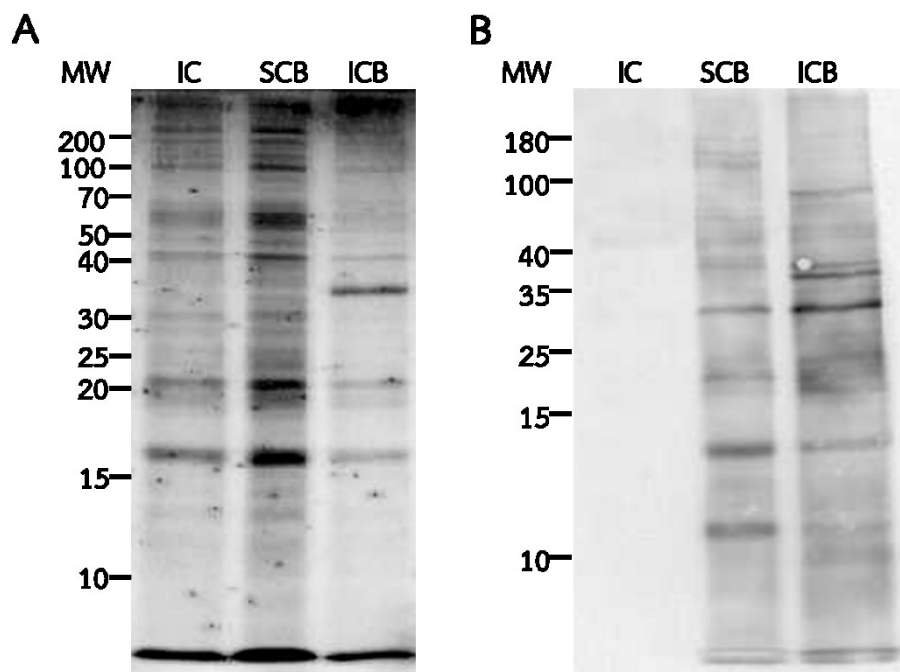
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การติดฉลากเซลล์ด้วย biotin ทำให้เกิดการแตกของเซลล์ในปริมาณน้อยมาก สังเกตได้จากการพบเซลล์ที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ซึ่งย้อมติดสี SYTO9 สีเขียวที่มีสัดส่วนอย่างน้อยร้อยละ 80 ซึ่งมากกว่าอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับเซลล์ตายย้อมติดสี PI สีแดงซึ่งมีจำนวนน้อย (รูปที่ 3) หลังจากนั้นได้ใช้วิธี immunoblotting ในการตรวจหาโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย biotin ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถตรวจพบโปรตีนที่ติดฉลากด้วย biotin ในตัวอย่างเซลล์ที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ (ICB) แต่ในปริมาณน้อยกว่าโปรตีนจากเซลล์ที่ทำให้ผนังเซลล์แตก (SCB) ที่ถูกติดฉลากด้วย biotin และตรวจไม่พบโปรตีนที่ติดฉลาก biotin ในตัวอย่างเซลล์ที่ไม่ถูกติดฉลาก (IC) (รูปที่ 4)

หลังจากสกัดแยกโปรตีนด้วย avidin column และตรวจหา โปรตีน OmpL1 และ FlaA1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถตรวจพบโปรตีน OmpL1 ซึ่งถูกใช้เป็นตัวแทนของ surface-exposed OMP ในตัวอย่างโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย biotin และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย avidin column แล้ว (E) (รูปที่ 5) นอกจากนั้นยังพบว่า ตัวอย่างดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีน FlaA1 ซึ่งถูกใช้เป็นตัวแทนของโปรตีนในชั้นเพอริพลาซิม สังเกตได้จากการตรวจไม่พบโปรตีน FlaA1 ในตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างที่สกัดได้ดังกล่าวจะมี surface-exposed OMP อยู่

จากผลการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยจึงนำตัวอย่างโปรตีนที่ติดฉลาก biotin ที่สกัดได้จากส่วนที่ 2 (ICB) ไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS/MS ในลำดับต่อไป เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะมี surface-exposed OMP โดยมีโปรตีนจากตำแหน่งอื่นปนเปื้อนน้อย



รูปที่ 3 ตรวจสอบยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ หลังจากเชื้อถูกติดฉลากด้วย biotin (surface biotinylation) ตัวอย่างถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด SYTO9 และ PI หลังจากนั้นส่องดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ (intact cells) ติดสีเขียวของสี SYTO9 ขณะที่เซลล์ที่ผนังเซลล์ถูกแตกและ methanol-treated cells ติดสีแดงของสี PI



รูปที่ 4 โปรตีนของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pomona ปริมาณ 1×10^{10} เซลล์ ที่ถูกติดฉลากด้วย Sulfo-NHS-SS-Biotin ตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE (A) และ immunoblotting (B) ขนาด

ของโปรตีนมาตรฐานแสดงที่แถบด้านซ้ายมือ (MW) หน่วยเป็นกิโลดาลตัน, โปรตีนของเชื้อที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์และไม่ถูกติดฉลากด้วย biotin (IC), โปรตีนของเชื้อที่มีผนังเซลล์ที่ถูกทำให้แตกด้วยวิธี sonication และติดฉลากด้วย biotin (SCB) และโปรตีนของเชื้อที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์และถูกติดฉลากด้วย biotin (ICB)



รูปที่ 5 ตรวจสอบยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ด้วยวิธี immunoblotting หลังจากเชื้อถูกติดฉลากด้วย Sulfo-NHS-SS-Biotin และทำให้สกัดแยกด้วย avidin column ตัวอย่างโปรตีนถูกนำมาตรวจหา subcellular localization protein marker โดยใช้ antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน OmpL1 (31 กิโลดาลตัน) และ FlaA1 (35 กิโลดาลตัน) ขนาดของโปรตีนมาตรฐานแสดงที่แถบด้านซ้ายมือ (MW) หน่วยเป็นกิโลดาลตัน, intact cells (IC) และ sonicated cells (SC) ถูกใช้เป็นการทดลองควบคุม, Flow-through (F), น้ำล้าง column ครั้งที่ 1 (W1), น้ำล้าง column ครั้งที่ 2 (W2), น้ำล้าง column ครั้งที่ 3 (W3), น้ำล้าง column ครั้งที่ 4 (W4) และตัวอย่างโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย biotin (E)

1.3. ตรวจสอบและวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS/MS

โปรตีนที่คาดว่าเป็น surface-exposed ที่สกัดแยกจากทั้ง 2 วิธี ใช้วิธี LC-MS/MS ในการตรวจหาชนิดของโปรตีนเนื่องจากมีความไวสูง สามารถตรวจหาชนิดของโปรตีนที่แม้จะมีปริมาณน้อย และให้ข้อมูลถึงปริมาณที่สามารถนำมาเปรียบเทียบความมากน้อยของของโปรตีนแต่ละชนิดได้

เตรียมตัวอย่างโปรตีนด้วย Trysin digestion และ peptide purification

ขั้นตอนการทดลอง

คัดแยกโปรตีนที่ได้จากวิธี protease shaving และ surface biotinylation ด้วยวิธี SDS-PAGE ตัดเจลให้มีขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร และ สกัดโปรตีนด้วยสาร Ambic (25 mM NH_4HCO_3 ที่มี acetonitrile (ACN) ผสมอยู่ในอัตราส่วน 50%) ทำโปรตีนให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง speed vacuum จากนั้นทำการ rehydrate โปรตีนด้วยสาร 10 mM DTT ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และสาร 55 mM Iodacetamide ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด ทำการสกัดโปรตีนซ้ำอีกครั้งด้วยสาร ACN เข้มข้น 100% และทำโปรตีนให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง speed vacuum

ย่อยโปรตีนด้วย trypsin solution บนน้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที และ 25 mM NH_4HCO_3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเติม 50% ACN/ 0.1% formic acid (FA) และเขย่าอย่างรุนแรงเป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วน supernatant เพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS/MS ในลำดับต่อไป

วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS/MS

ขั้นตอนการทดลอง

เพิ่มความเข้มข้นและลดปริมาตรของตัวอย่างโปรตีนให้เหลือ 10 ไมโครลิตรด้วยเครื่อง speed vacuum ก่อนนำตัวอย่างโปรตีนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Q-Exactive Orbitrap Plus mass spectrometer ร่วมกับ EASY-nLC1000 system และ nano-electrospray ion source (Thermo Scientific) ตัวอย่างถูกฉีดไปยัง EASY-Spray PepMap RSLC C18 Column (Thermo Fisher Scientific, 2 μm , 100 \AA , 50 μm x 25 cm) และ C18 nanoAcquity UPLC trap column (Waters, 0.18 x 20 mm, 5 μm , 100 \AA) ที่อัตราการไหล 300 นาโนลิตรต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และแยกโปรตีนด้วย BEH300C18 nanoAcquity UPLC column (Waters, 0.075 x 250 mm, 1.7 μm , 300 \AA) โดยใช้ linear gradient เท่ากับ 5–40% ของ solvent B เป็นเวลา 60 นาที จากนั้น peptide ถูก elute ด้วยสาร 5-20% acetonitrile ที่มีส่วนผสมของ 0.1% FA เป็นเวลา 43 นาที ตามด้วย 20-40% acetonitrile ที่มีส่วนผสมของ 0.1% FA เป็นเวลา 10 นาที ที่อัตราการไหล 300 นาโนลิตรต่อนาที ตั้งค่าความละเอียดในการวัดแบบ full scan เท่ากับ 70,000 ตามด้วย 10 data-dependent MS2 scans เท่ากับ 17,500 และ MS scan เท่ากับ 400-1600 m/z

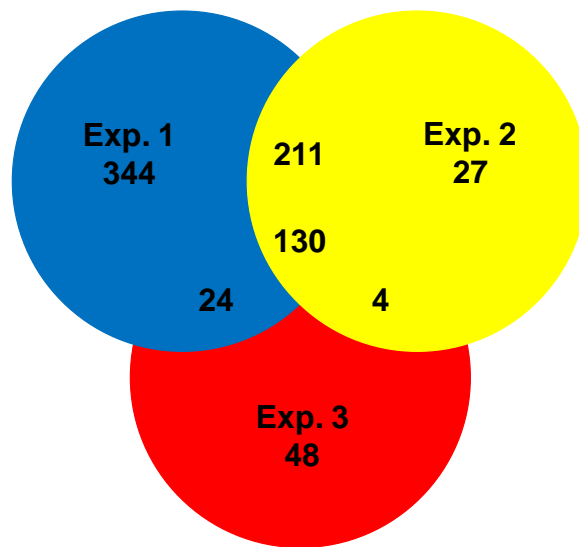
ค่า Peak list generating software ถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Thermo Xcalibur 3.0.63.3 โดยตั้งค่าการวิเคราะห์ตามมาตรฐานของโปรแกรม จากนั้น Mass spectra data ถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม X! tandem software และ Global Proteome Machine (GPM) database โดยอ้างอิงกับฐานข้อมูลของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1130 โปรตีนที่พบทั้งหมดจากการทดลอง 3 ครั้ง แสดงในรูปที่ 6 และ 7

ผลการทดลอง

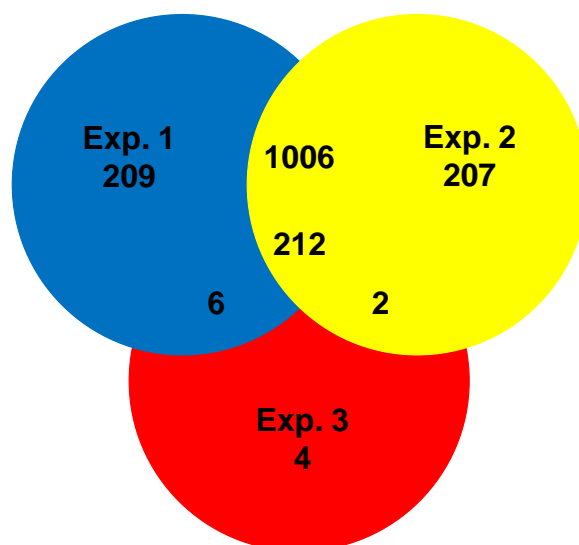
ผลการทดลองจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธี protease shaving 3 ครั้งที่ยกอิสระจากกัน (biological triplicate) แสดงให้เห็นว่า โปรตีนทั้งหมดที่แยกได้จากการเตรียมตัวอย่างครั้งที่ 1 มีจำนวน 709 ชนิด ครั้งที่ 2 มีจำนวน 372 ชนิด และ ครั้งที่ 3 มีจำนวน 206 ชนิด เมื่อนำโปรตีนที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาเปรียบเทียบกันพบว่า มีโปรตีน 130 ชนิดที่พบในตัวอย่างโปรตีนทั้ง 3 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 3.6 ของโปรตีนทั้งหมดในเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1130 (รูปที่ 6) ในขณะที่ ผลการทดลองจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธี surface biotinylation 3 ครั้งที่ยกอิสระจากกัน แสดงให้เห็นว่า โปรตีนทั้งหมดที่แยกได้จากการเตรียมตัวอย่างครั้งที่ 1 มีจำนวน

1,433 ชนิด ครั้งที่ 2 มีจำนวน 1,427 ชนิด และ ครั้งที่ 3 มีจำนวน 224 ชนิด เมื่อนำโปรตีนที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาเปรียบเทียบกันพบว่า มีโปรตีน 212 ชนิดที่พบในตัวอย่างโปรตีนทั้ง 3 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 5.8 ของโปรตีนทั้งหมดในเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1130 (รูปที่ 7)

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยนำ Mass spectra data ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยโปรแกรม MaxQuant เพื่อจัดลำดับโปรตีนที่มีการแสดงออกสูงที่สุด 100 ลำดับแรก เพื่อเพิ่มข้อมูลในการตัดสินใจเลือกโปรตีนที่อาจจะเป็น surface-exposed OMP และเป็นวัคซีนที่ดี



รูปที่ 6 จำนวนโปรตีนที่พบทั้งหมดจากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี protease shaving และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลการทดลองแต่ละครั้ง (Exp) แสดงในวงกลมแต่ละสี โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ



รูปที่ 7 จำนวนโปรตีนที่พบทั้งหมดจากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี surface biotinylation และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลการทดลองแต่ละครั้ง (Exp) แสดงในวงกลมแต่ละสี โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

1.4. วิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของโปรตีนด้วยโปรแกรม MaxQuant

โปรตีนบนผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีการแสดงออกปริมาณมากอาจถูกจับด้วยแอนติบอดีจากโฮสต์ได้ง่ายกว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกน้อย ดังนั้นโปรตีนที่มีการแสดงออกมากจึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้เป็นวัคซีนแอนติเจน ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิดที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้า ด้วยโปรแกรม MaxQuant

ขั้นตอนการทดลอง

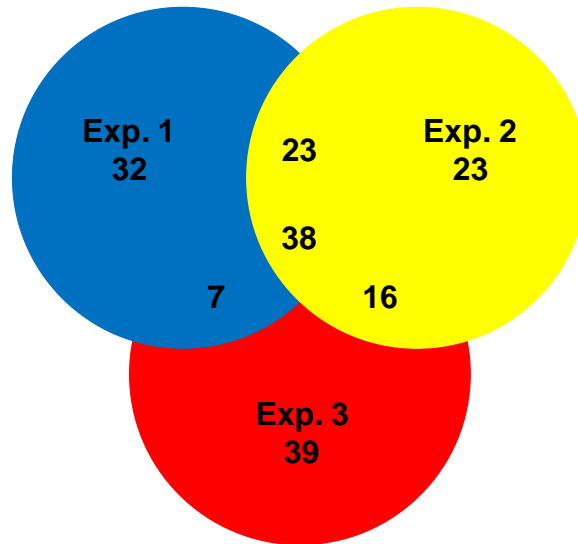
วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากตัวอย่าง protease shaving และ surface biotinylation ด้วยโปรแกรม MaxQuant โดยตั้งค่าโปรแกรมดังนี้ Group specific parameters เป็น label free quantification (LFQ); LFQ min ratio count = 2; LFQ min. number of neighbors = 3; LFQ average number of neighbors = 6 ตั้งค่า Configuration sequence databases เป็น *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130; Source = Uniprot; Taxonomy = 267671 ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MaxQuant จะแสดงให้เห็นลำดับของโปรตีนที่มีการแสดงออกเรียงจากมากไปน้อยตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 และ 9 และ ตารางที่ 1

ผลการทดลอง

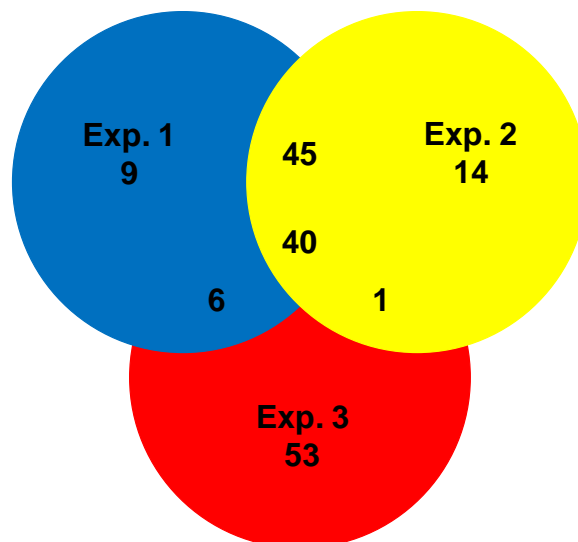
จากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี protease shaving และ surface biotinylation นำข้อมูล mass spectra data มาจัดลำดับโปรตีนที่มีปริมาณการแสดงออกมากที่สุดเรียงลำดับจาก 1 ถึง 100 และนำโปรตีนที่ได้มาเปรียบเทียบกันพบว่า มีโปรตีน 38 ชนิด ที่พบในทุกตัวอย่าง (3 ซ้ำ) ที่เตรียมด้วยวิธี protease shaving (รูปที่ 8) และ มีโปรตีน 40 ชนิด ที่พบในทุกตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธี surface biotinylation (รูปที่ 9)

เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดจากทั้ง 2 วิธีมาเปรียบเทียบกันพบว่า มีโปรตีน 12 ชนิดที่พบในทุกตัวอย่าง (3 ซ้ำจาก surface shaving และ 3 ซ้ำจาก Surface biotinylation) โดย 9 โปรตีนถูกพิสูจน์แล้วว่าเป็น surface exposed OMP ได้แก่ LipI32 LipL41 LipL71 LipL46 OmpL36 LipL21 OmpL1 Elongation factor Tu และ Loa22 (ตารางที่ 1) ในขณะที่ GroEL เป็น OMP แต่ไม่มีส่วนที่ยื่นออกมานอกผิวเซลล์ Flagellin protein พบในส่วน inner membrane และ Endonuclease เป็นโปรตีนที่ถูก secrete ออกนอกเซลล์

นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอื่นๆที่น่าสนใจ ที่พบในตัวอย่างตั้งแต่ 4 ซ้ำขึ้นไป จำนวน 23 โปรตีน ซึ่งผู้วิจัยจะนำเทคนิคทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) มาใช้ในการพยากรณ์คุณลักษณะที่เกี่ยวข้องกับ outer membrane protein ในลำดับถัดไป



รูปที่ 8 จำนวนโปรตีนที่มีปริมาณการแสดงออกมากที่สุด 100 อันดับแรก จากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี protease shaving วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง LC-MS/MS และวิเคราะห์ปริมาณด้วยโปรแกรม MaxQuant ผลการทดลองแต่ละครั้ง (Exp) แสดงในวงกลมแต่ละสี โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง



รูปที่ 9 จำนวนโปรตีนที่มีปริมาณการแสดงออกมากที่สุด 100 อันดับแรก จากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี surface biotinylation วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง LC-MS/MS และวิเคราะห์ปริมาณ

ด้วยโปรแกรม MaxQuant ผลการทดลองแต่ละครั้ง (Exp) แสดงในวงกลมแต่ละสี โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

ตารางที่ 1 โปรตีนที่มีปริมาณการแสดงออกสูงและพบในทุกตัวอย่างในการทดลอง

รหัสโปรตีน	ชื่อโปรตีน	หน้าที่	ตำแหน่ง ^a
LIC11335	GroEL	Chaperonin	OM
LIC11352	LipL32	Surface lipoprotein	OM+S
LIC11890	LIC11890	Flagellin protein	IM
LIC12875	Tuf	Elongation factor Tu	OM+S
LIC12966	LipL41	Hypothetical protein	OM+S
LIC11003	LipL71	Lipoprotein	OM+S
LIC11885	LipL46	Lipoprotein	OM+S
LIC13166	OmpL36	Coagulase	OM+S
LIC10191	Loa22	Hypothetical protein	OM+S
LIC10011	LipL21	Hypothetical protein	OM+S
LIC10973	OmpL1	Outer membrane protein	OM+S
LIC11687	LIC11687	Endonuclease	EC

^a C = cytoplasmic protein, IM = inner membrane, P = periplasmic protein, OM = outer membrane, EC= extracellular protein และ UNK = unknown protein

1.5. ทำนายคุณลักษณะของโปรตีนด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics)

โปรตีนบนผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องมีตำแหน่งอยู่บนผนังเซลล์ชั้นนอก ซึ่งต้องอาศัยการทำงานของโครงสร้าง signal peptide ในการขนส่งและสร้างโปรตีนบนผนังเซลล์ ในปัจจุบันการใช้โปรแกรมทางชีวสารสนเทศศาสตร์เพื่อทำนายคุณลักษณะต่างๆของโปรตีนมีความน่าเชื่อถือมากขึ้นและเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลาย เพื่อเพิ่มโอกาสในการคัดเลือกให้ได้โปรตีนบนผิวเซลล์ชั้นนอก

ขั้นตอนการทดลอง

ผู้วิจัยใช้หลายโปรแกรมทางชีวสารสนเทศศาสตร์ทำนายตำแหน่ง subcellular localization และ signal peptide ของโปรตีนทุกชนิดที่ได้จากการศึกษา surface proteome โดยโปรแกรมที่ใช้ในการทำนาย subcellular localization ได้แก่ Psortb, Cello, SoSuiGramN และ GNeg-mPLoc ในขณะที่

โปรแกรมที่ใช้ในการทำนาย signal peptide ได้แก่ Predisi, SignalP และ Signal-CF ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pomona ที่ได้จากฐานข้อมูลของ Victorian Bioinformatics Consortium (VBC) ถูกนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียแกรม negative ทั้งหมด ด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศศาสตร์แต่ละชนิด นอกจากนั้น ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ความอนุรักษ์ในเชื้อสายพันธุก่อโรคของโปรตีนที่ได้จากการศึกษา surface proteome ด้วยโปรแกรม Blast เทียบกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI), Victorian Bioinformatics Consortium (VBC) และ Universal Protein Resource (UniProt) ผลการทดลองบางส่วนแสดงในรูปที่ 10 และสรุปในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณลักษณะของโปรตีนที่ถูกทำนายด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศศาสตร์

รหัสโปรตีน	หน้าที่	พยากรณ์ตำแหน่งของโปรตีน ^a				พยากรณ์ signal peptide ^b		
		Psortb	Cello	GNeg- mPLoc	SoSui GramN	predisi	Signal P	Signal -CF
LIC10411	hypothetical protein	UNK	C, P	EC	P	Y	Y	Y
LIC12233	Fructose-bisphosphate aldolase	UNK	C, P	C	C	N	N	N
LIC11531	flagellin protein	P	C, IM	EC	C	N	N	Y
LIC11219	ahpC, peroxiredoxin	C	C	C	C	N	N	N
LIC10606	DNA-bindingstress protein	C	C	C	C	N	N	N
LIC11194	citrate lyase	C	C	C	C	N	N	N
LIC12812	Serine protease MucD	P	P, OM	P	UNK	Y	N	Y
LIC12017	Chaperone protein ClpB	C	C	C	C	N	N	N
LIC12544	DNA binding protein	UNK	OM	IM	IM	N	N	N
LIC10531	Lipid A 4'-kinase	C	C	IM	IM	N	N	Y
LIC12631	hemolysin	EC	EC, OM	EC	EC	N	N	N
LIC20249	AcnA, aconitate hydratase	C	P	IM	C	N	N	N
LIC10208	Cytochrome c oxidase subunit 2	CM	IM, P	IM, P	IM	Y	N	Y
LIC12407	Putative glutamine synthetase protein	C	P, C	C	C	N	N	N
LIC11793	sppA, signal peptide peptidase	CM	OM	C	OM	N	N	Y
LIC11115	Thiosulfate sulfurtransferase	C	C, P	C	C	N	N	N
LIC10788	flaA-1, flagellar filament sheath protein	C	P, OM, EC	IM	C	Y	N	N
LIC12082	cysK, cysteine synthase	C	C	IM, C	C	N	N	N
LIC11848	Uncharacterized protein	UNK	C, P	IM	P	Y	Y	Y
LIC11182	Uncharacterized protein	P	C, P	P	C	N	N	N
LIC11782	Uncharacterized protein	C	C	P	C	N	N	Y
LIC12829	Citrate synthase	C	C	IM, C	C	N	N	N

^a C = cytoplasmic protein, IM = inner membrane, P = periplasmic protein, OM = outer membrane, EC= extracellular protein และ UNK = unknown protein

^b Y = มี signal peptide และ N = ไม่มี signal peptide

2. คัดเลือกหาโปรตีนที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเป็นวัคซีนแอนติเจน

ผู้วิจัยคัดเลือกโปรตีนที่จะนำไปใช้ทดสอบเป็นวัคซีนแอนติเจนตัวใหม่ที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในชั้นถัดไปจากผลการศึกษา surface proteome ทั้ง 2 วิธี ได้แก่ โปรตีนที่มีปริมาณการแสดงออกมากในลำดับต้นของโปรตีนทั้งหมด และโปรตีนต้องถูกทำนายว่าเป็นโปรตีนบนผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane protein, OMP) มี signal peptide และ มีความอนุรักษ์ในเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับโปรตีนที่เกี่ยวข้อง เช่น การศึกษาเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนดังกล่าวได้รับการยืนยันแล้วว่าเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ชั้นนอก มีการแสดงออกในระหว่างที่เชื้อก่อโรค และมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะนำไปสู่การคัดเลือกโปรตีนที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุด 10 ชนิด ที่จะใช้เป็นวัคซีนแอนติเจนต่อไป จากหลักเกณฑ์ดังกล่าวข้างต้นผู้วิจัยได้เลือกโปรตีน LIP3974, LIP2711, LIP1275, LIP2256, LIP0740, LIP0980, LIP1079, LIP1774, LIP3228 และ LIP3675 ซึ่งเรียกชื่อโปรตีนตามการอ้างอิงจากฐานข้อมูล Victorian Bioinformatics Consortium ของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pomona

ชั้นถัดไปจะทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อคัดเลือกโปรตีนที่เหมาะสม โดยศึกษาการแสดงออกของยีนในขณะที่เชื้อสัมผัสกับซีรัมของมนุษย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นสภาวะที่เลียนแบบ *in vivo* เมื่อเชื้ออยู่ในกระแสเลือด เปรียบเทียบกับเชื้อที่เลี้ยงในหลอดทดลอง *in vitro*

ขั้นตอนการทดลอง

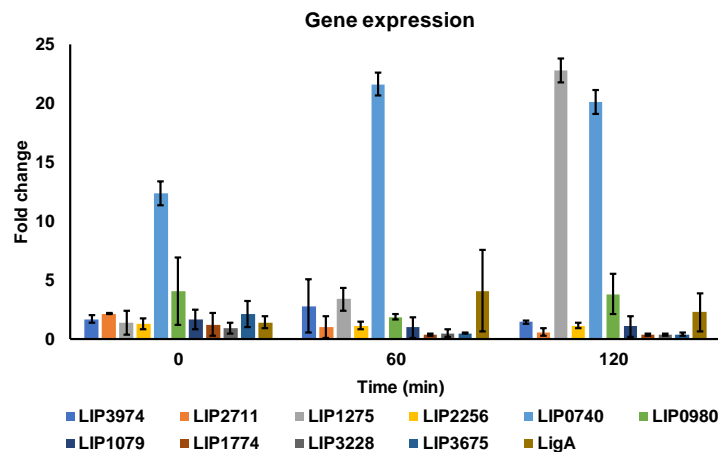
เพื่อยืนยันการมีบทบาทของโปรตีนที่ถูกคัดเลือกต่อกระบวนการก่อโรคของเชื้อเลปโตสไปโรซิส ผู้วิจัยได้ทำการจำลองสภาวะการติดเชื้อ โดยบ่มเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคกับซีรัมของคนสุขภาพดี และศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real time RT-PCR ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

บ่มเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pomona จำนวน 1×10^8 เซลล์ กับ ซีรัมมนุษย์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 60 และ 120 นาที หรือ บ่มเชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 60 และ 120 นาที สกัด RNA จากเชื้อด้วยสาร Trizol (Invitrogen) และ กำจัด DNA ที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง RNA ด้วยเอนไซม์ Dnase I (NEB) ตามขั้นตอนที่ผู้จำหน่ายระบุ จากนั้นสร้าง cDNA จากตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ด้วยสาร iScript First strand cDNA Synthesis (Biorad) และ ตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่ถูกคัดเลือกด้วยเทคนิค SSoAdv Eva green real time PCR (Biorad) ตามขั้นตอนที่ผู้จำหน่ายระบุ ร่วมกับไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนที่สนใจ

วิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนที่ถูกคัดเลือกเทียบกับปริมาณการแสดงออกของยีน *flaA1* (house-keeping gene) วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีนที่ถูกคัดเลือก ในสภาวะจำลองการติดเชื้อเทียบกับสภาวะปกติ ด้วยสมการ $2^{-\Delta\Delta ct}$

ผลการทดลอง

ผลการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง แสดงให้เห็นว่า ในระหว่างที่เชื้อสัมผัสกับซีรัมของมนุษย์เป็นเวลา 60 นาที ยีน *LIP0740* มีการแสดงออกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ถูกเลือกกับยีน *LigA* ซึ่งถูกใช้เป็นยีนควบคุมในการทดลองนี้เนื่องจากเป็นยีนที่ได้รับการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วว่ามี การแสดงออกเพิ่มขึ้น *in vivo* และโปรตีน *LigA* เมื่อใช้เป็นวัคซีนแอนติเจนสามารถป้องกันโรคในสัตว์ทดลองได้ 60-100% พบว่ามีเพียงยีน *LIP0740* ที่มีการแสดงออกของยีนสูงกว่ายีน *LigA* ในขณะที่ยีน *LIP3974* มีการแสดงออกไม่แตกต่างกับยีน *LigA* อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มเวลาในการสัมผัสกับซีรัมเป็น 120 นาทีพบว่า ยีน *LIP1275* มีการแสดงออกมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ถูกเลือกกับยีน *LigA* พบว่า ยีน *LIP1275*, *LIP0740* และ *LIP0980* มีอัตราการเปลี่ยนแปลงของยีนสูงกว่ายีน *LigA* ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 11 จากผลการทดลองทั้งหมด ผู้วิจัยได้คัดเลือกยีน *LIP3794*, *LIP1275*, *LIP0740* และ *LIP0980* ในการนำไปใช้ศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นวัคซีนแอนติเจนตัวใหม่ต่อไปในอนาคต



รูปที่ 11 การแสดงออกของยีนที่ถูกคัดเลือกในขณะที่เชื้อสัมผัสกับซีรัมของมนุษย์เปรียบเทียบกับเชื้อที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง *in vitro* ตรวจวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real time RT-PCR และคำนวณการเปลี่ยนแปลงของยีนด้วยสมการ $2^{-\Delta\Delta ct}$

อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

โปรตีนบนผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีการแสดงออกปริมาณมากอาจถูกจับด้วยแอนติบอดีจากโฮสต์ได้ง่ายกว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกน้อย ดังนั้นโปรตีนที่มีการแสดงออกมากจึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้เป็นวัคซีนแอนติเจน โครงการวิจัยนี้ศึกษา surface proteome ของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (*Leptospira interrogans* serovar Pomona) จากตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมด้วยวิธี surface enzyme shaving และ surface biotinylation เพื่อค้นหา surface-exposed OMP ทั้งหมดของเชื้อเลปโตสไปรา

ผู้วิจัยได้ใช้เอนไซม์ proteinase K ที่มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีน มาย่อยโปรตีนจากผนังเซลล์ชั้นนอกที่ surface-exposed ของเชื้อเลปโตสไปราที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ วิธีนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายเพื่อค้นหา surface-exposed OMP และวัคซีนแอนติเจนตัวใหม่ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (1-3) หลังจากบ่มเชื้อกับเอนไซม์แล้ว ตัวอย่างจะถูกปั่นแยกเป็นสองส่วน ได้แก่ ส่วน supernatant ที่มี surface-exposed OMP และส่วน cell pellet ที่มีโปรตีนจากโครงสร้างอื่น เช่น โปรตีนจากไซโตพลาสซึม ผนังเซลล์ชั้นใน และ เพอริพลาสซึม ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมที่ไม่ทำลายผนังเซลล์ส่วนนอกและไม่ทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์ซึ่งถือว่าการเพิ่มการปนเปื้อนของโปรตีนจากโครงสร้างอื่นเมื่อบ่มเชื้อกับ proteinase K buffer ความเข้มข้น 0 ถึง 5 µg/ml การแตกสลายของเซลล์แปรผันตรงกับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ (รูปที่ 1) เมื่อตรวจยืนยันความสมบูรณ์ของผนังเซลล์โดยการตรวจหา subcellular localization protein marker ด้วยวิธี immunoblotting ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อบ่มเชื้อกับเอนไซม์ ความเข้มข้น 0-5 µg/ml โปรตีน FlaA1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในชั้นเพอริพลาสซึมของเชื้อเลปโตสไปรายังคงพบอยู่ในตัวเซลล์ (รูปที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามโปรตีน FlaA1 มีแนวโน้มถูกตัดและหลุดออกจากตัวเซลล์เมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 5 µg/ml ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่โปรตีนตัวอื่นในชั้นเพอริพลาสซึมหรือโปรตีนจากโครงสร้างอื่นจะปนเปื้อนในตัวอย่างส่วน supernatant ด้วย นอกจากนั้นแล้ว เมื่อตรวจหาโปรตีน OmpL47 ซึ่งถูกพิสูจน์แล้วว่าเป็น surface-exposed OMP พบว่า โปรตีนดังกล่าวถูกตัดออกจากตัวเซลล์เมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 µg/ml เป็นต้นไป ดังนั้น ผู้วิจัยจึงนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากการบ่มเชื้อกับเอนไซม์ความเข้มข้น 1 µg/ml ไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS/MS ในลำดับต่อไป เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวเซลล์ส่วนใหญ่ยังสมบูรณ์ไม่แตก (intact cells) มีความเป็นไปได้ในส่วน supernatant จะมี surface-exposed OMP ในปริมาณมาก และมีโปรตีนจากส่วนอื่นปนเปื้อนน้อย

วิธี surface biotinylation เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการแยกโปรตีนบนผิวเซลล์ (4) ด้วยคุณสมบัติการใช้ biotin ชนิดที่เป็น membrane impermeable agent กล่าวคือ มีคุณสมบัติ hydrophilic ที่ไม่สามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เช่น Sulfo-NHS-SS-Biotin ดังนั้นจึงนิยมนำมาใช้ติดฉลากโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ที่สมบูรณ์ ไม่มีการแตกสลายหรือมีการปนเปื้อนของโปรตีนจากโครงสร้างอื่นในเซลล์ เมื่อทำการคัดแยกโปรตีนด้วยการใช้ avidin column ที่จับจำเพาะกับ biotin จะทำให้สามารถแยกโปรตีนบนผิว

เซลล์ที่ถูกติดฉลากด้วย biotin ออกจากโปรตีนอื่นที่ไม่ถูกติดฉลากได้ ดังนั้นการใช้เซลล์ที่ไม่มีการแตกของผนังเซลล์ จึงเป็นสิ่งสำคัญในการคัดแยกให้ได้ surface-exposed OMP

ผู้วิจัยได้ทำการติดฉลากโปรตีนที่ผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราด้วย Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo scientific) เพื่อลดการติดฉลากของ biotin ไปยังโปรตีนที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง เช่น โปรตีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โปรตีนจากภายในเซลล์หรือจากโครงสร้างอื่นของเชื้อเลปโตสไปรา ผู้วิจัยได้ทำการปั่นล้างตัวอย่างเชื้อด้วยความเร็วรอบต่ำเพื่อป้องกันการแตกสลายของเซลล์ก่อนที่จะนำมาติดฉลาก และทำการทดลองในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำเพื่อลดการเกิด endocytosis ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ขั้นตอนและวิธีการที่ผู้วิจัยใช้มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจ ทำให้เกิดการแตกของเซลล์ในปริมาณน้อย (รูปที่ 3) หลังจากนั้นได้ใช้วิธี immunoblotting ในการตรวจหาโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย biotin ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถตรวจพบโปรตีนที่ติดฉลาก biotin ในตัวอย่างเซลล์ที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ (ICB) ในปริมาณน้อยกว่าโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากเซลล์ที่ผนังเซลล์แตก (SCB) และไม่พบโปรตีนที่ติดฉลาก biotin ในตัวอย่างเซลล์ที่ไม่ถูกติดฉลาก (IC) (รูปที่ 4) ตามที่คาดไว้ ดังนั้น ผู้วิจัยสามารถนำตัวอย่างโปรตีนจากเชื้อที่มีผนังเซลล์สมบูรณ์ที่ถูกติดฉลากด้วย biotin (ICB) ไปทำการคัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี avidin column ได้

หลังจากคัดแยกโปรตีนด้วย avidin column ผู้วิจัยได้ตรวจหา subcellular localization protein marker โดยใช้ antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน OmpL1 และ FlaA1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถตรวจพบโปรตีน OmpL1 ซึ่งถูกใช้เป็นตัวแทนของ surface-exposed OMP ในตัวอย่างโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย biotin และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย avidin column แล้ว (E) (รูปที่ 5) นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอย่างดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีน FlaA1 ซึ่งถูกใช้เป็นตัวแทนของโปรตีนในชั้นเพอริพลาซซึม ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างดังกล่าวจะมี surface-exposed OMP อยู่ จากผลการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยจึงนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากการติดฉลากด้วย biotin และทำให้บริสุทธิ์ด้วย avidin column ไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี LC-MS/MS ในลำดับต่อไป เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะมี surface-exposed OMP ในปริมาณมาก และมีโปรตีนจากส่วนอื่นปนเปื้อนน้อย

ชนิดของโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างที่ได้จากทั้ง 2 วิธี ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งมีความไวสูง สามารถตรวจหาโปรตีนที่มีปริมาณน้อยได้ รวมไปถึงการให้ข้อมูลถึงปริมาณที่สามารถนำมาเปรียบเทียบความมากน้อยของชนิดของโปรตีน นอกจากนี้ยังใช้โปรแกรม X-Tandem Global Proteome Machine (GPM) database และ MaxQuant เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีน เพื่อแสดงให้เห็นชนิดและปริมาณของโปรตีนที่อาจเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ชั้นนอก เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ร่วมกันพบว่า โปรตีน 12 ชนิดพบในทุกตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ โดย 9 โปรตีนถูกพิสูจน์แล้วว่าเป็น surface exposed OMP ได้แก่ LipL32 LipL41 LipL71 LipL46 OmpL36 LipL21 OmpL1 Elongation factor Tu และ LIC10191 (ตารางที่ 1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ขั้นตอนและวิธีการที่ใช้ในการทดลองมีความน่าเชื่อถือและ

สามารถคัดแยกโปรตีนที่เป็น surface exposed OMP ได้ นอกจากนั้นยังมีโปรตีนอื่นๆที่น่าสนใจ ที่พบในตัวอย่างอย่างน้อย 3 ซ้ำ จำนวน 23 โปรตีน และยังไม่ถูกทดสอบยืนยันการเป็น surface exposed OMP

ในปัจจุบันการใช้โปรแกรมทางชีวสารสนเทศศาสตร์เพื่อทำนายคุณลักษณะต่างๆของโปรตีนมีความน่าเชื่อถือมากขึ้นและเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายในกลุ่มผู้วิจัยและพัฒนาวัคซีน ผู้วิจัยจึงนำเทคนิคทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) มาใช้ในการพยากรณ์คุณลักษณะของทั้งโปรตีนทั้ง 23 ชนิด โดยเน้นไปที่คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับ outer membrane protein เช่น subcellular localization และ signal peptide เนื่องจากโปรตีนบนผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องมีตำแหน่งอยู่บนผนังเซลล์ชั้นนอก ซึ่งต้องอาศัยการทำงานของโครงสร้าง signal peptide ในการขนส่งและสร้างโปรตีนบนผนังเซลล์ โดยผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2

ผู้วิจัยคัดเลือกโปรตีนด้วยเงื่อนไขสำคัญ 2 ประการ ได้แก่ โปรตีนที่ถูกเลือกต้องมีปริมาณการแสดงออกมากในตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา surface proteome ทั้ง 2 วิธี ปริมาณการแสดงออกต้องมากกว่าหรือเท่ากับการแสดงออกของโปรตีน LigA ที่ถูกพิสูจน์แล้วว่า เป็น surface exposed OMP และมีคุณสมบัติในการป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์ทดลอง โปรตีนที่ถูกเลือกต้องถูกทำนายว่าเป็นโปรตีนผนังเซลล์ชั้นนอก มี signal peptide และ มีความอนุรักษ์ในเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค นอกจากนั้นผู้วิจัยยังได้ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง เช่น การศึกษาเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ชั้นนอก มีการแสดงออกในระหว่างที่เชื้อก่อโรค มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และสามารถป้องกันการเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์ทดลองได้ ซึ่งจะนำไปสู่การเลือกโปรตีนที่น่าสนใจที่สุด 10 ชนิด ได้แก่โปรตีน LIP3974, LIP2711, LIP1275, LIP2256, LIP0740, LIP0980, LIP1079, LIP1774, LIP3228 และ LIP3675 ที่จะนำไปใช้ทดสอบเป็นวัคซีนแอนติเจนในอนาคต

เพื่อยืนยันบทบาทของโปรตีนที่ถูกคัดเลือกต่อกระบวนการก่อโรคของเชื้อเลปโตสไปโรซิส ผู้วิจัยทำการจำลองสภาวะการติดเชื้อ *in vivo* โดยบ่มเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคกับซีรัมของคนสุขภาพดี และศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real time RT-PCR ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีน *LIP3794*, *LIP1275*, *LIP0740* และ *LIP0980* เป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงในระหว่างที่เชื้อสัมผัสกับซีรัมของมนุษย์ (รูปที่ 11) อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้จำเป็นต้องมีผลการทดลองโดยใช้วิธีอื่นควบคู่ไปด้วย เช่น การพิสูจน์คุณสมบัติการมี immunogenicity ของโปรตีนกับซีรัมของผู้ป่วย และการพิสูจน์ยืนยันคุณสมบัติของการเป็น surface exposed OMP ซึ่งอยู่ในระหว่างการดำเนินการในขณะนี้ เนื่องจากต้องใช้ recombinant protein และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแต่ละชนิด

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อจำแนกโปรตีนบนผิวเซลล์ทั้งหมดของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค *Leptospira interrogans* serovar Pomona ด้วยวิธีการย่อยโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วยเอนไซม์โปรติเอส และวิธีการติดฉลากโปรตีนด้วยไบโอติน (Sulfo-NHS-SS-Biotin) และ ร่วมกับแมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS/MS)

เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีน ตามด้วยการทำนายตำแหน่งของโปรตีนด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน (protein database)

เชื้อเลปโตสไปราที่มีสภาพสมบูรณ์ (intact cells) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีนเนสเค (proteinase K) ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม และโปรตีนผิวเซลล์ที่ติดฉลากด้วยไบโอดีน ถูกจำแนกชนิดโปรตีนด้วย LC-MS/MS ทำให้ได้โปรตีนที่คาดว่าจะมีตำแหน่งอยู่ที่ผนังเซลล์ชั้นนอก 130 และ 212 ชนิดตามลำดับ เมื่อจัดลำดับโปรตีนด้วยปริมาณการแสดงออกพบว่า 12 โปรตีนถูกพบในทุกครั้งของทั้ง 2 วิธี และ 9 โปรตีนถูกพิสูจน์แล้วว่าเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ ได้แก่ LipI32 LipL41 LipL71 LipL46 OmpL36 LipL21 OmpL1 Elongation factor Tu และ Loa22 ดังนั้นงานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลโปรตีนบนผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค *Leptospira interrogans* serovar Pomona รวมทั้งยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่ยังไม่เคยทราบว่าเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นวัคซีนแอนติเจนตัวใหม่ต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการพิสูจน์ยืนยันคุณสมบัติของการเป็น surface exposed OMP ของโปรตีนที่ยังไม่เคยพิสูจน์มาก่อน ซึ่งอยู่ในระหว่างการดำเนินการในขณะนี้ เนื่องจากต้องใช้ recombinant protein และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแต่ละชนิด
2. ควรตรวจสอบคุณสมบัติเพิ่มเติมของโปรตีนที่จะนำไปใช้เป็นวัคซีนแอนติเจนเพิ่มเติม เช่น การแสดงออกในโฮสต์ และ immunogenicity โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วย

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Vinetz JM. Leptospirosis. Current opinion in infectious diseases. 2001;14(5):527-38. Epub 2002/04/20.
2. McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. Current opinion in infectious diseases. 2005;18(5):376-86. Epub 2005/09/09.
3. Adler B, de la Pena Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. Veterinary microbiology. 2009.
4. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. Journal of biosciences. 2008;33(4):557-69. Epub 2009/02/12.
5. Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, et al. *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008;58(Pt 10):2305-8. Epub 2008/10/10.
6. Wuthiekanun V, Sirisukkarn N, Daengsupa P, Sakaraserane P, Sangkakam A, Chierakul W, et al. Clinical diagnosis and geographic distribution of leptospirosis, Thailand. Emerging infectious diseases. 2007;13(1):124-6. Epub 2007/03/21.
7. Levett PN. Sequence-based typing of leptospira: epidemiology in the genomic era. PLoS neglected tropical diseases. 2007;1(2):e120. Epub 2007/12/07.
8. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006;56(Pt 3):671-3. Epub 2006/03/04.
9. Adler B, de la Pena Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. Veterinary microbiology. 2010;140(3-4):287-96. Epub 2009/04/07.
10. Adler B, Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. Infection and immunity. 1977;17(1):67-72. Epub 1977/07/01.
11. Adler B, Faine S. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. Journal of medical microbiology. 1978;11(4):387-400. Epub 1978/11/01.
12. Levett PN. Leptospirosis. Clinical microbiology reviews. 2001;14(2):296-326. Epub 2001/04/09.

13. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infection and immunity*. 2001;69(12):7550-8. Epub 2001/11/14.
14. Blumerman SL, Herzig CT, Baldwin CL. WC1+ gammadelta T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. *European journal of immunology*. 2007;37(5):1204-16. Epub 2007/04/13.
15. Klimpel GR, Matthias MA, Vinetz JM. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. *J Immunol*. 2003;171(3):1447-55. Epub 2003/07/23.
16. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microbial pathogenesis*. 2005;39(4):139-47. Epub 2005/09/20.
17. Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, Morais ZM, Goncales AP, Silva AS, et al. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infection and immunity*. 2009;77(3):1137-43. Epub 2008/12/31.
18. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;73(5):408-19. Epub 2011/01/06.
19. Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczy P, Timoney JF, et al. LfhA, a novel Factor H binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infection and immunity*. 2006;74(5):2659-66. Epub 2006/04/20.
20. Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E, et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PloS one*. 2007;2(11):e1188. Epub 2007/11/15.
21. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(6):995-1004. Epub 2012/02/01.
22. Choy HA. Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: inhibition of alternative and classical pathways of complement. *PloS one*. 2012;7(7):e41566. Epub 2012/08/23.

23. Siqueira GH, Atzingen MV, de Souza GO, Vasconcellos SA, Nascimento AL. *Leptospira interrogans* Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3b and C4b degradation. *Microbiology*. 2016;162(2):295-308. Epub 2015/11/29.
24. Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Morais ZM, Vasconcellos SA, Cianciarullo AM, et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infection and immunity*. 2010;78(7):3207-16. Epub 2010/04/21.
25. Domingos RF, Vieira ML, Romero EC, Goncales AP, de Morais ZM, Vasconcellos SA, et al. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. *BMC microbiology*. 2012;12:50. Epub 2012/04/03.
26. Faisal SM, Yan W, Chen CS, Palaniappan RU, McDonough SP, Chang YF. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine*. 2008;26(2):277-87. Epub 2007/12/07.
27. Coutinho ML, Choy HA, Kelley MM, Matsunaga J, Babbitt JT, Lewis MS, et al. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(12):e1422. Epub 2011/12/20.
28. Cao Y, Faisal SM, Yan W, Chang YC, McDonough SP, Zhang N, et al. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. *Vaccine*. 2011;29(43):7379-86. Epub 2011/08/02.
29. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Breda LC, Vasconcellos SA, Figueira CP, Picardeau M, et al. Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte *Leptospira biflexa* expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. *Immunology letters*. 2016;173:61-8. Epub 2016/03/16.
30. Li Y, Leneghan DB, Miura K, Nikolaeva D, Brian IJ, Dicks MD, et al. Enhancing immunogenicity and transmission-blocking activity of malaria vaccines by fusing Pfs25 to IMX313 multimerization technology. *Scientific reports*. 2016;6:18848. Epub 2016/01/09.
31. Didierlaurent AM, Collignon C, Bourguignon P, Wouters S, Fierens K, Fochesato M, et al. Enhancement of adaptive immunity by the human vaccine adjuvant AS01 depends on activated dendritic cells. *J Immunol*. 2014;193(4):1920-30. Epub 2014/07/16.

32. Beernink PT, Shaughnessy J, Ram S, Granoff DM. Impaired immunogenicity of a meningococcal factor H binding protein vaccine engineered to eliminate factor h binding. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2010;17(7):1074-8. Epub 2010/06/04.
33. Rossi R, Granoff DM, Beernink PT. Meningococcal factor H binding protein vaccines with decreased binding to human complement factor H have enhanced immunogenicity in human factor H transgenic mice. *Vaccine*. 2013;31(46):5451-7. Epub 2013/09/17.

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. (ภาษาไทย) แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล
(ภาษาอังกฤษ) Dr.Kanitha Patarakul
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 2499 00005 28 0
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงาน และสถานที่ติดต่อ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 0-2256-4132 โทรศัพท์มือถือ 08-1344-5909 โทรสาร 0-2252-5952
E-mail: kpatarakul@gmail.com และ Kanitha.Pa@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	2536
Georgetown University, USA	PhD	Microbiology	2542
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วุฒิปัตร์แพทยสภา	อายุรศาสตร์	2546

การอบรมและเพิ่มความชำนาญ

1. ทุนเพิ่มพูนความรู้ ณ ต่างประเทศ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็น visiting professor ที่ Monash University เมือง Melbourne ประเทศออสเตรเลีย ปี พ.ศ. 2552
2. ทุนเพิ่มพูนความรู้ ณ ต่างประเทศระยะสั้น คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Fondation Mérieux เพื่อเข้าร่วมอบรมในหลักสูตร "15th Advanced Course of Vaccinology (ADVAC) 2014" ณ สถาบัน Fondation Mérieux และ Université de Genève ที่เมือง Annecy ประเทศ ฝรั่งเศส ปี พ.ศ. 2557
3. ทุนจาก European Commission FP7 project (Advanced Immunization Technologies) ADITEC และ World Health Organization (WHO) เพื่อเข้ารับการอบรมเชิงปฏิบัติการ "4th WHO training course on adjuvants and vaccine formulation" ณ Vaccine Formulation Laboratory ที่ University of Lausanne, เมือง Lausanne สมาพันธรัฐสวิส ปี พ.ศ. 2558
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)
แบคทีเรียวิทยา อณูชีววิทยา วัคซีนวิทยา
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย:

โครงการวิจัยเรื่องดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์ทดลองแบบจำลอง (DNA vaccine for leptospirosis in animal model) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2553-2555 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2.1 การศึกษากระบวนการเกิดออกโต้ฟาจีโดยเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคในเซลล์แมคโครฟาจของมนุษย์และหนู กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2555

7.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดชัษุชนิดในการป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิส โครงการยุทธศาสตร์การวิจัยเชิงลึก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช คลัสเตอร์ สุขภาพ ประจำปีงบประมาณ 2556

7.2.3 การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยหาแอนติเจนของ เลปโตสไปโรซิส และไข่เด็กก๊แบบอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่ตรวจได้ทั้งสองโรคในชุดตรวจชุดเดียว ทุนวิจัยมุ่งเป้าด้านสุขภาพและชีวเวชศาสตร์ สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข ประจำปี 2556-2557

7.2.4 การค้นหาโปรตีนชนิดใหม่ของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคที่จับกับ Factor H complement regulator เพื่อนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิส ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2558-2559

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Patarakul K, Lo M, Adler B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* upon exposure to serum. BMC Microbiology 2010 Jan 29;10(1):31.
2. Chaemchuen S, Rungpragayphan S, Poovorawan Y, Patarakul K. Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*, by random phage display peptide library. Vet Microbiol. 2011 Nov 21;153(1-2):178-85.
3. Buaklin A, Palaga T, Hannaman D, Kerdkaew R, Patarakul K*, Jacquet A*. Optimization of the immunogenicity of a DNA vaccine encoding a bacterial outer membrane lipoprotein. Mol Biotechnol. 2014 Oct;56(10):903-10. *co-corresponding authors
4. Umthong S, Buaklin A, Jacquet A, Sangjun N, Kerdkaew R, Patarakul K*, Palaga T* Immunogenicity of a DNA and Recombinant Protein Vaccine Combining LipL32 and Loa22 for Leptospirosis Using Chitosan as a Delivery System. J Microbiol Biotechnol. 2015 Apr 28;25(4):526-36. *co-corresponding authors

ผู้ร่วมวิจัย

NAME: Associate Professor Dr. Alain Jacquet

WORK ADDRESS: Chulalongkorn University,
Vaccine Research Center
Department of Medicine, Faculty of Medicine,
Pattayapat Building, 8th floor, Room # 807
1873 Rama IV Road, Pathumwan,
Bangkok 10330, Thailand.
Phone: 02 2564579 Fax: 02 6523100
E-mail: alain.j@chula.ac.th

CITIZENSHIP: Belgian

EDUCATIONS:

1986-1989 Ph. D. in Chemistry. Option Biochemistry

Mention "Grande Distinction".

Université Libre de Bruxelles, Department of General Chemistry

1982-1986 Licence in chemistry. Option Biochemistry

Mention "Grande Distinction".

A belgian licence degree is roughly equivalent to a master's degree in chemistry,

Université Libre de Bruxelles

APPOINTMENTS:

From 1989 to march 2009:

- Principal investigator of the Laboratory of Experimental Allergy (formerly Department of Applied Genetics).
- Associate Professor at ULB. Université Libre de Bruxelles, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires, Laboratoire d'Allergologie Expérimentale
- Design of recombinant vaccines against infectious diseases and since 1999, against house dust mite allergy.

Since April 2009:

- Associate Professor at Chulalongkorn University. Principal investigator and Group leader of the Recombinant Vaccine Unit of the Division of Allergy and Clinical Immunology (Prof. Kiat Ruxrungtham, M.D.)

- Design of recombinant vaccine against house dust mite allergy.

TECHNOLOGICAL EXPERTISE Protein biochemistry (SDS-PAGE, Western blot, Glycosylation characterization, enzymatic digestion, protein assays), Protein purification (any type of liquid chromatography including FPLC, ultrafiltration, precipitation, concentration), Recombinant protein expression (in E.coli, yeast, insect and mammalian cells), animal cell culture (mammalian cell lines as well as primary immune cells), large scale cell culture in bioreactors, Recombinant DNA technology (cloning, PCR, sequencing), Immune assays: ELISA for antibody titer determinations, competition ELISA, Cytokine assays, T-cell reactivity, Dendritic cell activation, Basophil activation, Animal model of allergy, Airway hyperresponsiveness measurement, Bronchoalveolar lavage, Protein and naked DNA vaccination (formulation with adjuvants)

PUBLICATIONS

1. E. Adam, L. Delbrassine, C. Bouillot, V. Reynders, AC. Mailleux, E. Muraille and **A. Jacquet**. Probiotic E.coli Nissle 1917 activates dendritic cells and prevents house dust mite allergy through toll-like receptor 4-dependent pathway. *European Journal of Immunology* 2010;40:1995-2005.
2. A. Chevigné, M.E. Dumez, M. Dumoulin, A. Matagne, **A. Jacquet** and M. Galleni. Comparative study of mature and zymogen mite cysteine protease stability and pH unfolding. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800:937-945.
3. **A. Jacquet**. The role of the house dust mite-induced innate immunity in development of allergic response. *International Archives Allergy Immunol*, 2010, 155:95-105
4. P. Pulsawat, S. Piboonpocanun, S. Sirivichayakul, S. Buranapraditkun, **A Jacquet**, M Shimada, O Kenji, K Ruxrungtham. Production and Immunogenicity of Hypoallergenic Codon-Optimized DNA Vaccine Encoding Mature Der p 1 Allergen. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2010;20:582-90
5. M Lejeune, JM Miró, E De Lazzari, F García, X Claramonte, E Martínez, E Ribera, J Arrizabalaga, JR Arribas, P Domingo, E Ferrer, M Plana, ME Valls, D Podzamczar, T Pumarola, **A Jacquet**, J Mallolas, JM Gatell, T Gallart; the Spanish Toxoplasma gondii Study Group. Restoration of T Cell Responses to Toxoplasma gondii after Successful Combined Antiretroviral Therapy in Patients with AIDS with Previous Toxoplasmic Encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2011;52:662-670

6. **A.Jacquet.** Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response. *Clin Exp Allergy.* 2011 Mar;41(3):305-11
7. **A.Jacquet.** The role of innate immunity activation in house dust mite allergy. *Trends Mol Med.* 2011;17(10):604-11.
8. S Tourdot, S Airouche, N Berjont, A Da Silveira, L Mascarell, **A Jacquet**, L Caplier, M Langelot, V Baron-Bodo, P Moingeon. Evaluation of therapeutic sublingual vaccines in a murine model of chronic house dust mite allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2011 Dec;41(12):1784-92.
9. K. Chokeshai-u-saha, S. Buranapraditkun, **A. Jacquet**, C. Nguyen and K. Ruxrungtham. A two-step non-flow cytometry-based naïve B cell isolation method and its application in Staphylococcal enterotoxin B (SEB) presentation. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2012, 30(3):214-23
10. **A. Jacquet.** Innate immune responses in house dust mite allergy. *ISRN Allergy.* 2013, ;2013:735031
11. **A.Jacquet.** Probiotic-derived factors: efficient treatment for allergic asthma? *Clin Exp. Allergy.* 2013, 43(3):268-70
12. P. Pulsawat, P. Pitakpolrat, E. Prompetchara, T. Kaewamatawong, S. Sirivichayakul, S. Buranapraditkun, D. Hannaman, K. Ruxrungtham, **A. Jacquet.** Optimization of a Der p 2-based prophylactic DNA vaccine against house dust mite allergy. *Immunol Letters.* 2013 151:23-30.
13. P. Pulsawat, **A. Jacquet.** Is electroporation decisive for the efficacy of DNA vaccine against house dust mite allergy?. *Exp Review Vaccines,* 2013, 12:977-9.
14. M.E. Dumez, J. Herman, V. Campizi, M. Galleni, **A. Jacquet**, A. Chevigné. Orchestration of an Uncommon Maturation Cascade of the House Dust Mite Protease Allergen Quartet. *Front Immunol.* 2014;5:138.
15. P. Pulsawat M. Theeraapisakkun, E. Nony, M. Le Mignon, K. Jain, A. Buaklin, J. Wongpiyabovorn, K. Ruxrungtham, **A. Jacquet.** Characterization of the house dust mite allergen Der p 21 produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2014; 101C:8-13.

16. A. Buaklin, T. Palaga, D. Hannaman, R. Kerdkaew, K. Patarakul K, **A. Jacquet**. Optimization of the Immunogenicity of a DNA Vaccine Encoding a Bacterial Outer Membrane Lipoprotein. Mol Biotechnol.;56(10):903-10
17. S. Umthong, A. Buaklin, **A Jacquet**, N. Sangjun, R. Kerdkaew, K. Patarakul, T. Palaga. Immunogenicity of a DNA and Recombinant Protein Vaccine Combining LipL32 and Loa22 for Leptospirosis Using Chitosan as a Delivery System. J Microbiol Biotechnol. 2015;25(4):526-36
18. A. Bouaziz, D. Walgraffe, C. Bouillot, J. Herman, J. Foguene, A. Gothot, R. Louis, F. Hentges, **A. Jacquet**, AC. Maillieux, A. Chevigné, M. Galleni, E. Adam E, M.E. Dumez. Development of recombinant stable house dust mite allergen Der p 3 molecules for component-resolved diagnosis and specific immunotherapy. Clin Exp Allergy. 2015;45(4):823-34.

ผู้ร่วมวิจัย

1. (ภาษาไทย) พันโท น.สพ. นพดล แสงจันทร์
(ภาษาอังกฤษ) LTC Noppadon Sangjun
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3869900092543
3. ตำแหน่งปัจจุบัน หัวหน้าแผนก
4. หน่วยงาน และสถานที่ติดต่อ
แผนกสัตว์ทดลอง กองวิเคราะห์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร
โทรศัพท์ 0 2644 8074 โทรศัพท์มือถือ 08 9888 6502 โทรสาร 0 2644 8074
E-mail noppadon625@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	สัตวแพทยศาสตร์ บัณฑิต		2537
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	พยาธิชีววิทยาทางสัตว แพทย์	2551

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมัธยมศึกษา)

พิษวิทยา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย:

- การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของผงชูรส และแป้งข้าวเจ้า กับวัสดุห้ามเลือด Celox® ต่อการห้ามเลือดเฉพาะที่ในหนูแรท

7.2 ผู้ร่วมวิจัย:

- การทดสอบความปลอดภัยและสมบัติการย่อยสลายทางชีวภาพของวัสดุห้ามเลือดสำหรับใช้ภายในร่างกายในหนู Mice
- การศึกษาตัวชี้วัดชีวภาพ นิวโทรฟิล จีแล็กทีเนส แอสไซซิเอทเตด ไลโปคาลินในการตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ชักนำให้เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส
- ดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์ทดลองแบบจำลอง

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีที่ผ่านมา)

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่

1. Umthong S, Buaklin A, Jacquet A, **Sangjun N**, Kerdkaew R, Patarakul K, Palaga T. 2015. Immunogenicity of a DNA and Recombinant Protein Vaccine Combining LipL32 and Loa22 for Leptospirosis Using Chitosan as a Delivery System. J Microbiol Biotechnol. 25(4):526-36.
2. Pilakasiri K, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Pilakasiri C, Chaipunko S. Koedpuech K and Pudgerd A. 2014. Detection of Leptospiral Antigen in the Lung of Hamster Infected with Leptospira interrogans, Serovar Pyrogenes by Immunoperoxidase Technique. Siriraj Med J. 66(6) (Suppl):56-62.
3. Pilakasiri K, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Pilakasiri C, Pudgerd A, Koedpuech K and Chaipunko S. 2014. Immunoperoxidase Localization of the Leptospiral antigen in The Kidney of The Infected Hamsters with Leptospira interrogans Serovar Pyrogenes. Siriraj Med J. 66(6) (Suppl):174-179.
4. Pilakasiri K, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Pilakasiri C, Koedpuech K. and Pudgerd A. 2014. Localization of Leptospiral Antigen in the Hamster Liver Infected with Leptospira interrogans Serovar Pyrogenes by Immunoperoxidase Technique. Siriraj Med J. 66 (6) (Suppl):168-173.

5. Pilakasiri K, Parichatikanond P, Thakerngpol K, Pilakasiri C, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Koedpuech K and Tachaw A. 2014. The Ultrastructural Study of the Hamster Liver Infected with *Leptospira interrogans*. *Siriraj Med J.* 66(6) (Suppl): 50-55.
6. Pilakasiri K, Thakerngpol K, Parichatikanond P, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Koedpuech K and Panmark P. 2014. The Ultrastructural Study of the Hamster Kidneys Infected with *Leptospira interrogans*. *Siriraj Med J.* 66(6) (Suppl):180-186.
7. Kumpunya S, Patarakul K, **Sangjun N**, Komane P, Srisawat N. 2014. Development of animal models for the study of Leptospirosis associated acute kidney injury. *J Nephro Soc Thai.* 20(3):53-58.
8. Rodkvamtook W, Gaywee J, Kanjanavanit S, Ruangareerate T, Richards AL, **Sangjun N**, Jeamwattanalert P, Sirisopana N. 2013. Scrub typhus outbreak, northern Thailand, 2006-2007. *Emerg Infect Dis.* 19(5):774-777.
9. Kositanont U, Prasajaka P, Trakulsomboon S, **Sangjun N**, Phulsuksombati D. 2012. Fingerprints by pulsed-field gel electrophoresis of leptospire isolated from field rats and comparison with reference *Leptospira* serovars. *Asian Biomedicine.* 6(4):557-564.
10. Janvikul W, Ngamviriyavong P, Uppanun P, Tanjak P, **Sangjun N**. 2012. Antibacterial Wound Healing Gels from Oligochitosan Salts. *Advanced Materials Research.* 506:31-34.
11. Pilakasiri K, Molee P, Sringermyuang D, **Sangjun N**, Channasanon S, Tanodekaew S. 2011. Efficacy of chitin-PAA-GTMAC gel in promoting wound healing: animal study. *J Mater Sci: Mater Med.* 22(11):2497-2504.
12. Rodkvamtook W, Ruang-areerate T, Gaywee J, Richards A L, Jeamwattanalert P, Bodhidatta D, **Sangjun N**, Prasartvit A, Jatisatienr A and Jatisatienr C. 2011. Isolation and Characterization of *Orientia tsutsugamushi* from Rodents Captured following a Scrub Typhus Outbreak at a Military Training Base, Bothong District, Chonburi Province, Central Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 84(4):599-607.