การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์เพื่อเป็นเป้าหมาย ในการคัดเลือกสารเสมือนแอนติบอดีโดยวิธีแอปตาเมอร์เทคโนโลยี

Production of Recombinant Protein Targeting in Selection of Antibody-like Substance Using Aptamer Technology

อุไรวรรณ โฆษิตานนท์[1*] ชรินทร์ ถาวรคุโณ[2] วรวัลย์ เดชาวิชิตเลิศ[1]
กัลลยานี ดวงฉวี[3] ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์[4] และ วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์[5]
Uraiwan Kositanont[1*] Charin Thawornkuno[2] Worawan Dachavichitlead[1]
Galayanee Doungchawee[3] Chatchawan Srisawat[4] and Wutikorn Rodkvamtook[5]
[1]คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ [2]คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
[3]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล [4]คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
[5]กองวิจัยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร
[1]Faculty of Public Health, Thammasat University [2]Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University
[3]Faculty of Medical Technology, Mahidol University [4]Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University
[5]AFRIMS
[*]Corresponding author E-mail: uraiwan.kos@mahidol.ac.th

www.nest.lru.ac.th

บทคัดย่อ

โรคเลปโตสไปโรสิสเป็นปัญหาในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก โรคนี้อยู่ในกลุ่มไข้เฉียบพลันซึ่งมีอาการสำคัญ คือ ไข้ ปวดศีรษะ ซึ่งเป็นอาการที่ไม่จำเพาะและไม่สามารถเจาะจงไปยังโรคหนึ่งโรคใด การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการยืนยันการวินิจฉัยอาการทางคลินิก วิธีวินิจฉัยผู้ป่วยในระยะต้นของโรค คือการตรวจหาสาร DNA และแอนติเจนของเชื้อ วิธีการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะ จำเป็นต้องมีแอนติบอดีต่อเชื้อซึ่งนิยมใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่การผลิตมีความยุ่งยากมากและต้องเตรียมในหนู จึงมีแนวคิดการสร้างสารเสมือนแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี Aptamer Technology ซึ่งในกระบวนการต้องมีโปรตีนสังเคราะห์เป้าหมาย ในงานวิจัยนี้ผลิตโปรตีนสังเคราะห์เป้าหมายในการคัดเลือก Aptamer ให้ได้สารเสมือนแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราซึ่งสามารถใช้ตรวจหาแอนติเจนจำเพาะ โปรตีน Electron Transfer Flavoprotein subunit beta (ETF_beta) เหมาะสมเป็นโปรตีนสังเคราะห์เป้าหมาย เนื่องจากให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดี และเป็นโปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ในงานวิจัยนี้ได้แยกโปรตีน ETF_beta จากเชื้อ *Leptospira interrogans* Serovar Autumnalis โดยวิธี Alkaline Plasmolysis จากนั้นนำไปจำแนกด้วยวิธี LC-MS/MS ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Mascot Search Engine ผล MASCOT Search ได้ High Score มีค่า 110 และ Mass Value มีค่า 27.103 จากนั้นได้สังเคราะห์ Recombinant โปรตีน ETF_beta ได้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนระหว่างโปรตีน Recombinant ETF_beta และ *Leptospira interrogans* serovar Lai (GeneBank accession numbers AE010300) เท่ากับร้อยละ 97 และร้อยละ 96 ตามลำดับ นำ Recombinant ETF_beta protein วิเคราะห์ ด้วย LC-MS/MS ผลของ MASCOT Search พบว่า ตรงกับ ETF Subunit beta ของ *Leptospira interrogans* มีค่า Protein Score เท่ากับ 962 และมี Molecular Weight เท่ากับ 27 kDa จากผลการวิจัยได้โปรตีนสังเคราะห์เป้าหมายของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ ETF_beta ใช้ในการคัดเลือก Aptamer ต่อไป

คำสำคัญ: โปรตีนรีคอมบิแนนท์ สารเสมือนแอนติบอดี แอปตาเมอร์เทคโนโลยี

ABSTRACT

Leptospirosis is a problematic disease in the world. Leptospirosis is one of acute febrile illness group whose symptoms of the early phase with non-specific of fever and headache resulting a problem in mistake of diagnosis. Laboratory diagnosis is important for confirmation of clinical diagnosis. The tests in early diagnosis are DNA detection and Antigen detection. Antigen detection test requires specific monoclonal antibody. However, its production in mice is very difficult. This leading to the idea of synthetic antibody-like substance using Aptamer technology needs target protein. In this study, production of recombinant protein targeting to positive select specific aptamer as antibody-like substance to further detect antigen for diagnosis of leptospirosis. Electron transfer flavoprotein subunit beta (ETF_beta) protein is appropriate because of low molecular weight 25 kDa with high antigenicity. Outer membrane proteins were isolated from *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis using alkaline plasmolysis. Separated proteins by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS) were analyzed by Mascot search engine. The results showed the ETF_beta protein had the high score of 110 and mass value of 27.103. Characterization of recombinant ETF_beta was performed. Nucleotide and amino acid sequences of recombinant ETF_beta compared with *L. interrogans* serovar Lai (GeneBank accession numbers AE010300) were 97% และ 96%, respectively. The result of recombinant ETF_beta protein analyzed by LC-MS/MS showed the matching protein of ETF subunit beta of *L. interrogans* with protein score of 962 and molecular weight of 27 kDa. The recombinant ETF_beta in this study will be further used as target protein in selection step of specific aptamer.

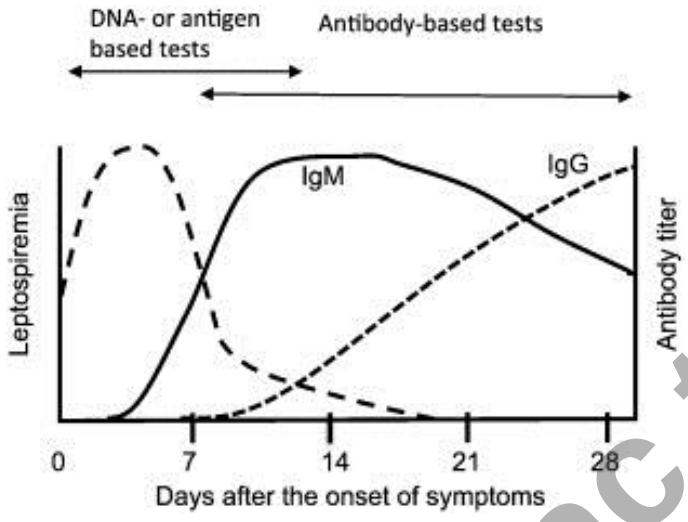
Keywords: Recombinant Protein, Antibody-like Substance, Aptamer Technology

บทนำ

ไข้เฉียบพลัน (Acute Febrile Illness หรือ Undifferentiated Fever) เป็นอาการที่พบบ่อยในโรคซึ่งเป็นปัญหาในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย อาการสำคัญ คือ ไข้ ปวดศีรษะ ซึ่งเป็นอาการที่ไม่จำเพาะและไม่สามารถเจาะจงไปยังโรคหนึ่งโรคใด สาเหตุอาจเกิดจากการติดเชื้อจุลชีพหรือไม่ใช่จุลชีพ ไข้ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส ที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ ไข้เลือดออก โรคเลปโตสไปโรสิส โรคสครับไทฟัส และไข้หวัดใหญ่ เนื่องจากอาการไข้ในระยะแรกของโรคกลุ่มดังกล่าวจะคล้ายกันส่วนใหญ่ ไม่อาจแยกได้ว่าเป็นโรคใด การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการยืนยันการวินิจฉัยอาการทางคลินิก นอกจากนี้เชื้อเลปโตสไปราซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคเลปโตสไปโรสิส ยังคงไวต่อยาปฏิชีวนะ จึงสามารถรักษาให้หายได้ด้วยยาปฏิชีวนะ

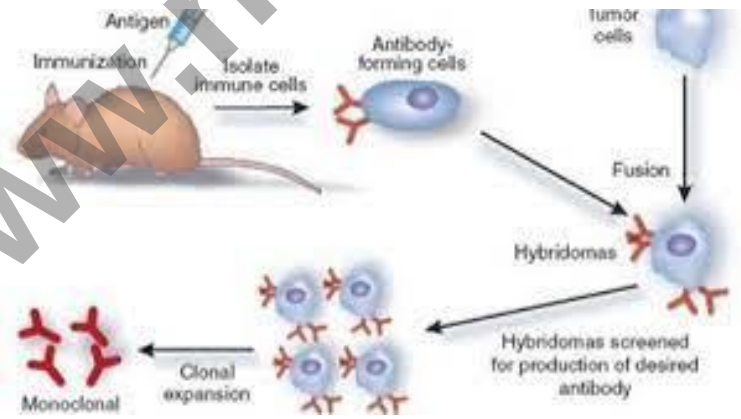
การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการ [1]-[3] มีวิธีการหลักอยู่ 4 วิธี ดังนี้ 1) วิธีการย้อมตัวอย่างตรวจโดยตรง ส่วนใหญ่ใช้การย้อมสีซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวต่ำและมักพบผลบวกปลอม 2) การแยกเชื้อ การแยกเชื้อเลปโตสไปรายุ่งยากมากเพราะเชื้อเลปโตสไปราต้องใช้อาหารพิเศษ 3) วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราและวิธีการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา และ 4) วิธีการตรวจหากรดนิวคลิอิกระดับโมเลกุล เป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ยังมีความยุ่งยากในภาคสนาม หลังจากการติดเชื้อตามธรรมชาติของเชื้อเลปโตสไปรา ในกระแสเลือดของผู้ป่วยสามารถตรวจพบสารกรดนิวคลิอิก DNA และหรือแอนติเจนประมาณ 1-7 วัน หลังอาการป่วย ซึ่งอาจนานถึง 14 วัน และตรวจพบแอนติบอดีหลังอาการป่วยราว 3-14 วัน หรือนานกว่านั้น [4] ดังแสดงในภาพที่ 1 ถึงแม้ว่าวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา เป็นวิธีที่นิยมใช้ในงานบริการทางห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่ตามหลักการหลังจากการติดเชื้อ สามารถตรวจพบกรดนิวคลิอิกและแอนติเจนของเชื้อ ก่อนตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ

www.ncst.lru.ac.th



ภาพที่ 1 Diagram of leptospires in blood, antigen and antibody appear in leptospirosis patient [4]

วิธีการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อจึงเป็นวิธีวินิจฉัยในระยะต้นของโรค การใช้วิธีนี้จำเป็นต้องมีแอนติบอดี ส่วนใหญ่นิยมใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody) ต่อเชื้อ วิธีการทั่วไปที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น โดยการฉีดแอนติเจนเข้าไปในหนูเพื่อให้หนูสร้างภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนชนิดนั้น จากนั้นจึงใช้เทคนิคการสร้างเซลล์ผสม (Hybridoma Technology) ระหว่าง B Lymphocyte (บี ลิมโฟไซต์) กับ Myeloma Cell (เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว) เพื่อสร้างเป็น Hybridomas ซึ่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ [5] การคัดแยกเอาเฉพาะ Hybridomas โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ Nucleotides (Aminopterin) แบบปกติ ดังนั้นเซลล์ B Lymphocyte ที่ปกติเท่านั้นจึงจะเจริญต่อไปได้ และจะต้องนำ Hybridomas ไปคัดแยกหาโคลนเดี่ยวที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ต้องการได้ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 Diagram of Production of Monoclonal Antibody [5]

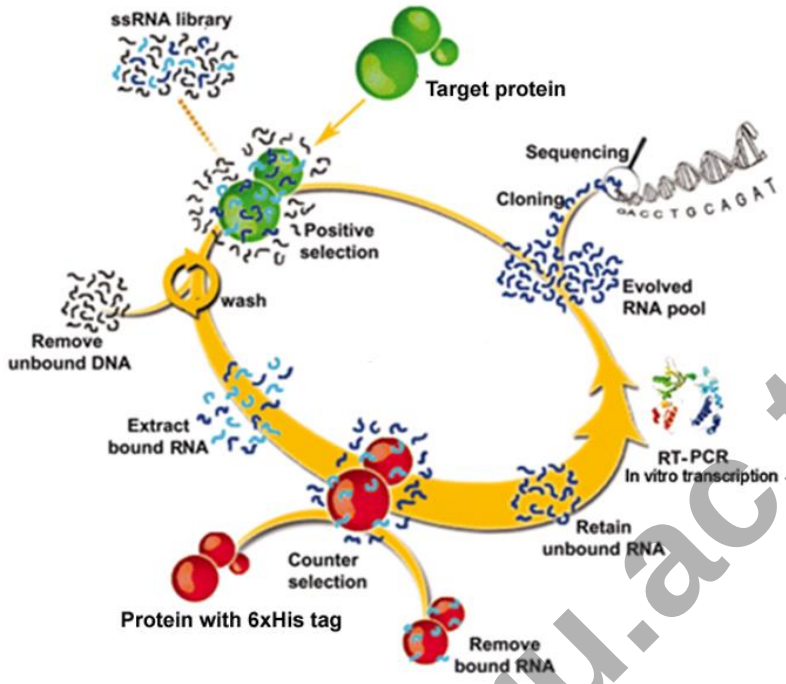
www.ncstru.ac.th

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความยุ่งยากมากในกระบวนการเตรียมต้องฉีดเชื้อเข้าหนู จากนั้นนำลิมโฟซัยท์จากม้ามหนูมาคัดเลือกหาโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้องานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดการสร้างสารเสมือนแอนติบอดี (Antibody-Like Substance) ต่อเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี Aptamer Technology (แอปตาเมอร์เทคโนโลยี) เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Aptamer กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี Aptamer มีข้อดีกว่า ดังนี้ สามารถเตรียมในห้องปฏิบัติการได้ แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีต้องเตรียมในหนู Aptamer มีความทนทานและมีคุณภาพคงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Aptamer เป็น DNA หรือ RNA ที่มีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถจับกับโมเลกุลของสารต่าง ๆ ได้อย่างจำเพาะ aptamer สามารถนำไปใช้ได้ในลักษณะเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในด้านการวิจัยและการวินิจฉัยโรค การผลิต aptamer ทุกขั้นตอนทำในหลอดทดลอง จึงไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง ใช้เวลาในการผลิตเร็วกว่า ราคาถูกกว่าและผลิตได้ง่ายกว่า จึงเป็นที่มาของแนวคิดที่จะพัฒนาการสังเคราะห์ RNA Aptamers ซึ่งสามารถทดแทนแอนติบอดีต่อเชื้อ โดยจับกับแอนติเจนของเชื้อได้ นับว่าเป็นการผสมผสานของวิธีการตรวจหาแอนติเจน วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ และวิธีการตรวจหาระดับโมเลกุล RNA Aptamers ที่ได้จากงานวิจัยสามารถใช้ในวิธีการตรวจหาแอนติเจน เพื่อวินิจฉัยในระยะต้นของโรคได้ ทำให้การวินิจฉัยโรคได้รวดเร็วขึ้น วิธีที่เลือกใช้สามารถกระทำได้ทั้งในและนอกห้องปฏิบัติการ รวมทั้งในภาคสนาม นอกจากนี้สามารถใช้เพื่อให้การวินิจฉัย ณ จุดตรวจและรักษาผู้ป่วย (Point-of-Care) ได้

กระบวนการของ Aptamer technology [6] เริ่มด้วยการการสังเคราะห์ Nuclease resistant RNA Library ซึ่งประกอบด้วย Single-stranded RNA oligonucleotides แต่ละเส้นจะมีลำดับเบสคงที่ ณ บริเวณปลาย 5’ และ 3’ ส่วนบริเวณตรงกลางมี Nucleotides แบบสุ่ม จำนวน 40 เบส ดังนี้ 5’AGTAATACGACTCACTATAGGGAGTCGACCGACCAGAA-(N40)-TATGTGCGTCTACATCTAGACTCAT3’ ลำดับเบสคงที่ 5’ และ 3’ ของปลายเส้น Nucleotides ทำหน้าที่เป็นบริเวณที่ให้ไพรเมอร์จับ เพื่อเป็นขั้นตอนแรกของปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction) จะได้ลำดับเบส RNA (RNA Sequences) จำนวนประมาณ 1-3 x 10^5 เส้น ลำดับเบส RNA เหล่านี้ใช้เป็นต้นแบบผลิต RNA Aptamers ต่อไป RNA จะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Polyacrylamide Gel Electrophoresis ขั้นตอนต่อมาคือการคัดเลือก RNA aptamers ต่อโปรตีนเป้าหมาย (Target Protein) จำเพาะที่ต้องการหาสารเสมือนแอนติบอดี โดยใช้เทคนิค SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) [6] นิยมใช้ Recombinant Protein (โปรตีนรีคอมบิแนนท์) เป็นขั้นตอน Positive Selection จากนั้นมีการล้าง DNA/RNA ที่ไม่ได้จับกับโปรตีนออกไป นำ RNA ที่คัดเลือกได้ ไปทำ Cloning และ Sequencing เพื่อทดสอบศักยภาพในการจับกับโปรตีนเป้าหมาย (Binding Activity to Target Protein) ต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 3

www.nest.rru.ac.th



ภาพที่ 3 Schematic Cycle for Selection of Specific Aptamers Using SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment)

งานวิจัยนี้ได้ใช้โปรตีน Electron Transfer Flavoprotein Subunit beta (ETF_beta) ซึ่งเหมาะสมเป็นโปรตีนเป้าหมาย เนื่องจากให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดี และเป็นโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาปฏิกิริยาทางอิมมูน ระหว่างโปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa กับแอนติบอดี ชนิด IgM ในซีรัมระยะแรกของโรค พบผลบวกในซีรัมทุกรายจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส และได้ผลลบในซีรัมทุกรายจากผู้ป่วยโรคอื่นที่ไม่ใช่เลปโตสไปโรสิส และซีรัมจากคนปกติ [7] จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมด้วยการแยกโปรตีนโมเลกุลต่ำ 25 kDa จากเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar autumnalis โดยสกัดโปรตีนด้วยวิธี Alkaline Plasmolysis จากนั้นนำโปรตีนสกัดไปแยกด้วยวิธี SDS-PAGE พร้อมกับย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 จากนั้นใช้วิธี Western Blotting และ Immunoblotting เพื่อดูแถบโปรตีนที่ต้องการ [8] ต่อมาได้สกัดโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดใหม่ยังไม่มีรายงานมาก่อน ได้ทดสอบด้วยวิธี Two-Dimensional Electrophoresis (2-DE) ร่วมกับ Immunoblot และการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอโนมิกส์ (Proteonomics Analysis) [9] และมีการศึกษาการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอโนมิกเปรียบเทียบระหว่างเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรค [10] ทำให้สามารถจำแนกโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ได้ ซึ่งได้ผลตรงกันว่าเป็นโปรตีน Electron Transfer Flavoprotein subunit beta (ETF_beta)

www.ncst.lru.ac.th

วิธีการดำเนินวิจัย

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย โดยใช้โปรตีน Electron Transfer Flavoprotein subunit beta (ETF_beta) ในการโคลนนิ่ง (Cloning) ให้ได้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ ETF_beta เพื่อใช้ในการคัดเลือก Aptamer ต่อไป

การผลิตโปรตีนเป้าหมายสังเคราะห์ Recombinant ETF_beta เพื่อใช้ในการคัดเลือก Aptamer ให้ได้สารเสมือนแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราซึ่งสามารถใช้ตรวจหาแอนติเจนจำเพาะในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสเพื่อยืนยันโปรตีน ETF_beta จึงทำการแยกโปรตีน ETF_beta จากเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis โดยสกัดโปรตีนด้วยวิธี Alkaline Plasmolysis จากนั้นนำโปรตีนสกัดไปแยกด้วยวิธี SDS-PAGE พร้อมกับย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 จากนั้นใช้วิธี Western blotting และ Immunoblotting เพื่อดูแถบโปรตีนที่ต้องการ โปรตีนสกัดที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE นำไปจำแนกด้วยวิธี Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Mascot Search Engine ผล MASCOT Search จากนั้นสังเคราะห์ Recombinant โปรตีน ETF_beta โดยการ Cloning และ Sequencing

ขั้นตอนการสังเคราะห์ recombinant โปรตีน ETF_beta

1. **การออกแบบไพร์เมอร์**ของ *etfB gene* ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน ETF_beta โดยได้มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 5’ (ขีดเส้นใต้เส้นเดียว) เพื่อช่วยในการจับของ Restriction Enzyme กับ PCR Product ที่ได้ และได้มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อการตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Xho*I (ขีดเส้นใต้สองเส้น) โดยไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5’<u>CCGCCG</u> <u>CATATG</u> ATGAAAATCATCGTATTAGT-3’ และ

5’<u>CCGCCG</u> <u>CTCGAG</u> TTATATAACCTTAGCTTCTT-3’

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน ETF_beta ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) แล้ว ทำการโคลนนิ่งตามวิธีในรายงานก่อนหน้านี้ [11] ทำการตัด PCR Product ที่ได้ด้วย Restriction Enzyme *Nde*I และ *Xho*I หลังจากนั้นทำการเชื่อมต่อเข้ากับ pET28a ที่ตัดด้วย Restriction Enzyme เดียวกัน แล้วทำการ Transform เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) ด้วยวิธี Heat-Shock Transformation ทำการคัดเลือก *E. coli* transformant และตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธีการ Sequencing

2. **การผลิตโปรตีน ETF_beta** ทำการเลี้ยงโคลน *E. coli* ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) + 50 μg/mL Kanamycin ที่ 37°C และทำการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที หลังจากนั้นวัด Optical Density (OD) ที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อวัด OD เท่ากับ 0.4 จึงชักนำให้สร้างโปรตีนที่ต้องการโดยการใส่ Isopropyl β- d-1-Thiogalactopyranoside หรือ IPTG (ความเข้มข้นสุดท้าย 1mM) แล้วทำการเลี้ยงเชื้อต่ออีก 16 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการกระจายเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอสเฟต และเก็บที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

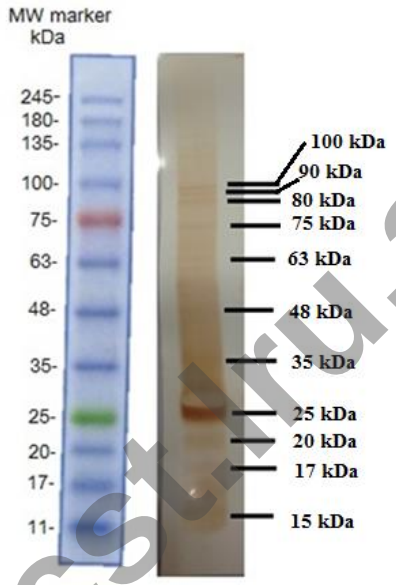
3. **การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์** กระทำการแตกเซลล์ที่ได้ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ทำการปั่นเอาตะกอนและล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ละลายตะกอนด้วยสารละลาย Denature Binding Buffer [8M urea + 20mM Na-P (pH 7.4) + 0.02% NaN_3] กรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.22 μM ก่อนนำไปเข้าเครื่องทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง (Äkta Protein Purification System) ซึ่งใช้คอลัมน์ 5mL HisTrap™ ชะล้างโปรตีนที่เกาะกับคอลัมน์ดังกล่าวด้วย Denature Elution Buffer [8M urea + 20mM Na-P (pH 7.4) + 0.5M imidazole + 0.02% NaN_3] ซึ่งโปรตีนที่ได้มีขนาด 29.49 kDa (คาดการณ์จากลำดับกรดอะมิโน

หลังจากการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์แล้ว ทำการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE เห็นได้ว่าโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 35 kDa (มากกว่าคาดการณ์ประมาณ 5 kDa) ซึ่งอาจเกิดจาก Post-Translational Modification ทำให้ขนาดของโปรตีนที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น ได้ทำ Western Bloting โดยให้โปรตีน ETF_beta ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ His Tag พบว่ามีแถบที่เกิดจากการจับกันระหว่าง His Tag ซึ่งติดอยู่กับโปรตีน ETF_beta กับแอนติบอดีต่อ His Tag

www.ncst.ru.ac.th

ผลการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย

นำโปรตีนสกัดจากเชื้อ *Leptospira interrogans* Serovar Autumnalis ด้วยวิธี Alkaline Plasmolysis ไปแยกด้วยวิธี SDS-PAGE พร้อมกับย้อมสี Coomassie Brilliant blue R-250 จากนั้นใช้วิธี Western Blotting แล้วให้ทำปฏิกิริยา Immunoblotting กับ Rabbit Polyclonal antibody ต่อ *L. interrogans* Serovar Autumnalis พบ แถบที่มีปฏิกิริยาอิมมูน ขนาด 5 17 20 25 35 48 63 75 80 90 และ 100 kDa แต่แถบขนาด 25 kDa ที่ต้องการจะมีลักษณะแถบเข้มของโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 Immunoblotting of the extractable antigens in pooled fraction (fractions 6 to 10) from pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis. Proteins were reacted with anti-*Leptospira interrogans* serovar Autumnalis from immunized rabbit. The protein concentration of pooled fraction was 0.9874 mg/ml. BLUeye prestained protein ladder as MW marker.

นำแถบโปรตีน 25 kDa จาก SDS-GAGE ไปประบุยืนยันโดย Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS) แล้ววิเคราะห์ผลด้วย Mascot Search Engine ผลของ MASCOT Search พบว่า โปรตีน 25 kDa ที่แยกได้ เป็น Putative Electron Transfer Flavoprotein subunit beta of *Leptospira wolffii* จริง High Score มีค่า 110 และ Mass Value มีค่า 27.103 ดังแสดงในภาพที่ 5

www.ncst.rru.ac.th

MATRIX SCIENCE **MASCOT Search Results**

Protein View: gi|514354863

putative electron transfer flavoprotein subunit beta [Leptospira wolffii]

Database:	NCBInr
Score:	110
Nominal mass (M_r):	27103
Calculated pI:	5.34
Taxonomy:	Leptospira wolffii

This protein sequence matches the following other entries:

- gi|514175575 from Leptospira wolffii serovar Khorat str. Khorat-H2

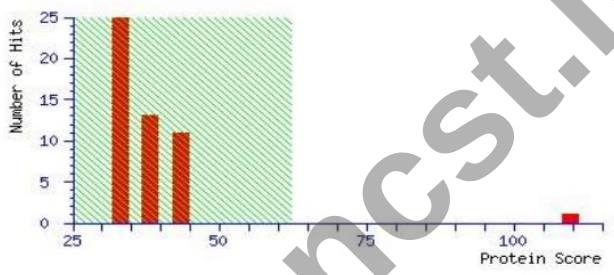
Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|514354863 against nr.

Search parameters

MS data file:	570124_LP1_D1_01_1341.mgf
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications:	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications:	Oxidation (M)

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 62 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



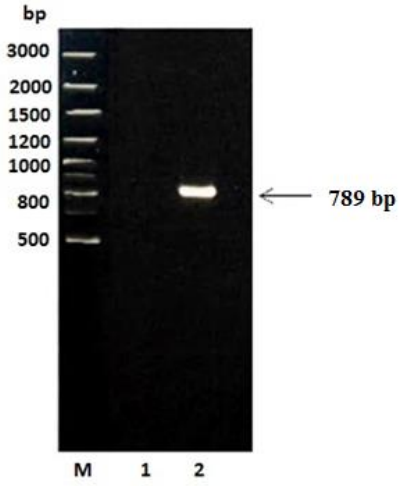
Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary		Help
	Significance threshold p< 0.05	Max. number of hits 50	
	Standard scoring / MudPIT scoring	Ions score or expect cut-off 0	Show sub-sets 0
	Show pop-ups / Suppress pop-ups	Sort unassigned Decreasing Score	Require bold red
	Preferred taxonomy All entries		

www.ncst.lru.ac.th

ภาพที่ 5 MASCOT Search Results from LC-MS/MS were analyzed by NCBI and MSDB Protein Databases

เมื่อยืนยันได้ว่าโปรตีน 25 kDa คือ โปรตีน ETF_beta จริง จึงได้ผลิต Recombinant ETF_beta โดยออกแบบไพร์เมอร์ของ *etf*B gene จากPutative Electrons Transfer Flavoprotein subunit beta Sequence of Pathogenic *L. interrogans* serovar Lai strain 56601 chromosome I (GeneBank accession number AE010300) ขนาดของ Amplification Product เท่ากับ 789 Base Pairs (bp) ซึ่งจะพบในเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคเท่านั้น (Pathogenic Leptospires) ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 PCR product of *etfB* gene from pathogenic *L. interrogans* serovar Autumnalis and saprophytic *L. biflexa* serovar Patoc. Lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1, saprophytic leptospiral DNA; lane 2, pathogenic leptospiral DNA.

การโคลนนิ่งและการแสดงออกของ *etf*B gene จึงนำ Recombinant ETF_beta เปรียบเทียบกับ *L. interrogans* serovar Lai from GeneBank accession number AE010300 พบว่า Nucleotide Sequence Alignment Showed 97% Identity ดังแสดงในรูปที่ 7 สำหรับ Deduced Amino Acid Sequence Alignment แสดงความเหมือนร้อยละ 96 จากการคำนวณด้วยโปรแกรม BioEdit recombinant ETF_beta protein มีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) เท่ากับ 27 kDa ดังแสดงในภาพที่ 8

ได้นำ Recombinant ETF_beta protein ไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ผลของ MASCOT Search พบว่า Recombinant ETF_beta Protein ตรงกับ ETF_subunit beta ของ *Leptospira interrogans* มีค่า Protein Score เท่ากับ 962 และมี Molecular weight เท่ากับ 27 kDa ดังแสดงในภาพที่ 9

การทดสอบ Recombinant ETF_beta protein ใช้วิธีแยกโปรตีนด้วย SDS-Page ดังแสดงในรูปที่ 10 และวิธี Western Blotting โดยให้โปรตีน ETF_beta ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ His Tag พบว่ามีแถบที่เกิดจากการจับกันระหว่าง His Tag ซึ่งติดอยู่กับโปรตีน ETF_beta กับแอนติบอดีต่อ His Tag ดังแสดงในภาพที่ 11

www.nest.ru.ac.th

ภาพที่ 7 The nucleotide sequence alignments of recombinant *etf*B gene and *etfB* gene of reference *L. interrogans* serovar Lai. The dots indicated identical bases.

www.ncst.lru.ac.th

```
                    10        20        30        40        50
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L Lai 56601  MKIIVLVKQVPDTETSIKVGDKSINETGIKWIISPYDEFAIEEGIRLREK
ETF_beta     ..................................................

                    60        70        80        90       100
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L Lai 56601  HGGEVIAVSLGPDRVVEALRTAYAMGADRAVHIKVDN-YVPFDTNNTAEL
ETF_beta     ...........................N..........

                   110       120       130       140       150
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L Lai 56601  ISNFAKAENADVIIGGRQSIDTDSSQVVIQVAELLGIPHIAFAINLEING
ETF_beta     ..................................................

                   160       170       180       190       200
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L Lai 56601  TAVKATKEVEGGTQTVETSTPVALTAQKGLNEPRYPSLKGIMTAKKKPVE
ETF_beta     ..................................................

                   210       220       230       240       250
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L Lai 56601  TKSAADLGSPASKIEIVGLEPPPPRIPGRKLEAADANAFASQLVKALREE
ETF_beta     ..................................L.VI.

          ....|..
L Lai 56601  AKVI---
ETF_beta     IEATGYI
```

ภาพที่ 8 The deduced amino acid sequence alignments of recombinant ETF_beta protein with that of reference *L. interrogans* serovar Lai. The dots indicated identical bases.

www.ncst.lru.ac.th

MATRIX SCIENCE **MASCOT Search Results**

Protein View: gi|514354863

putative electron transfer flavoprotein subunit beta [Leptospira wolffii]

Database:	NCBInr
Score:	110
Nominal mass (M_r):	27103
Calculated pI:	5.34
Taxonomy:	Leptospira wolffii

This protein sequence matches the following other entries:

- gi|514175575 from Leptospira wolffii serovar Khorat str. Khorat-H2

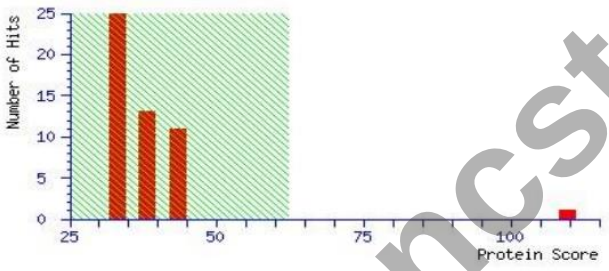
Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|514354863 against nr.

Search parameters

MS data file:	570124_LP1_D1_01_1341.mgf
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications:	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications:	Oxidation (M)

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 62 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

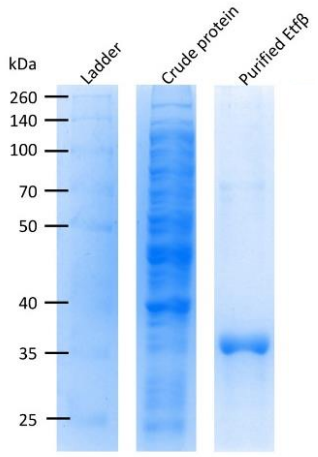


Peptide Summary Report

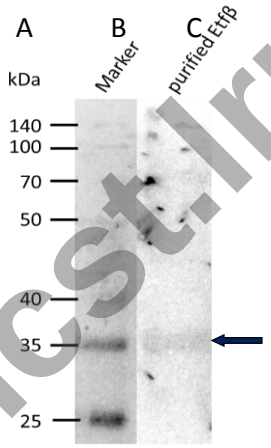
Format As	Peptide Summary		Help
	Significance threshold p< 0.05	Max. number of hits 50	
	Standard scoring / MudPIT scoring	Ions score or expect cut-off 0	Show sub-sets 0
	Show pop-ups / Suppress pop-ups	Sort unassigned Decreasing Score	Require bold red
	Preferred taxonomy All entries		

www.ncst.ifu.ac.th

ภาพที่ 9 MASCOT Search Results from LC-MS/MS of recombinant ETF protein were analyzed by NCBI and MSDB protein databases. The arrow indicates at the protein score of 962.



ภาพที่ 10 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression in *E. coli* BL21 (DE3) by staining with Coomassie brilliant blue R-250 staining solution



ภาพที่ 11 Immunoblotting analysis with anti-6X His tag antibody. Lane A, molecular mass; Lane B, molecular protein marker; Lane C, recombinant protein

วิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้รายงานคุณลักษณะของ Recombinant ETF_beta เมื่อเปรียบเทียบกับ *L. interrogans* Serovar Lai จาก GeneBank Accession Number AE010300 พบว่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับร้อยละ 97 และความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับร้อยละ 96 สำหรับน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 27 kDa การที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นจาก 25 kDa เนื่องจากกระบวนการทำโคลนนิ่งและการทำโปรตีนสังเคราะห์ให้บริสุทธิ์ [12]

www.nest.lru.ac.th

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จในการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย Recombinant Electron Transfer Flavoprotein subunit beta (ETF_beta) เพื่อใช้ในการคัดเลือก Aptamer ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund; FF) งบประมาณด้าน ววน.ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 รหัสโครงการ: 66088 และหน่วยวิจัยด้านจุลชีววิทยาสมัยใหม่และจีโนมสาธารณสุขแห่งมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

[1] Levett, P. N. 2001. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Review,** 14(2):296-232.

[2] Palaniappan, R. U., Ramanujam, S. and Chang, Y. F. 2007. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion Infectious Diseases**, 20(3):284-92.

[3] Picardeau, M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Medecine et Maladies Infectieuses,** 43(1):1–9.

[4] https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/14688/8258

[5] http://personal.sut.ac.th

[6] Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H. and Ruml, T. 2015. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. **Biotechnology Advances**, 33(6):1141-1161.

[7] Doungchawee, G., Kositanon,t U., Niwetpathomwat A., Inwisai, T., Sagarasaeranee, .P. and Haake, D. A. 2008. Early diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing. **Clinical and Vaccine Immunology,** 15(3):492-498.

[8] Sitthipunya, A. and Kositanont, U. 2011. Expression and characterization of low-molecular weight lipoproteins of *Leptospira interrogans* for early diagnosis of leptospirosis. M.Sc. Thesis, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

[9] Kositanont, U., Saetun, P., Krittanai, C., Doungchawee, G., Tribuddharat, C. and Thongboonkerd, V. Application of immunoproteomics to leptospirosis: towards clinical diagnostics and vaccine discovery. 2007. **Proteomics Clinical Application,** 1(4):400–409.

[10] Thongboonkerd, V., Chiangjong, W., Saetun, P., Sinchaikul, S., Chen, S. T. and Kositanont, U. 2009. Analysis of differential proteomes in pathogenic and non-pathogenic Leptospira: ability pathogenic and virulence factors. **Proteomics,** 9(13):3522-3534.

[11] Kositanont, U., Wanna, W., Duangchawee, G. and Tribuddharat, C. 2014. Characterization of recombinant flagellin B protein from Leptospira interrogans. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, 45(5):1080-1089.

[12] Huang, J. L., Huang, J. H., Shyu, R. H., Teng, C. W., Lin, Y. L. and Kuo, M. D. 2001. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. **Journal of Medical Virolology,** 65(3):553-560.

www.ncst.lru.ac.th