การโคลนและการแสดงออกในบริเวณที่มีความคงตัวของ Immunoglobulin-Like Protein ต่อเชื้อ *Leptospira kirschneri*

Cloning and Expression of Conserved Region of an Immunoglobulin-Like Protein Against *Leptospira kirschneri*

อัญชลี ละอาด[1] ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อร่าม[2*] วรวิทย์ วัชชวัลคุ[3] ปฐมาพร เอมะวิศิษฏ์[4]
Anchalee La-ard[1*] Thavajchai Sukpuaram[2] Worawidh Wajjwalku[3]
Patamaporn Amavisit[4]

บทคัดย่อ

โรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis) เป็นโรคที่ติดต่อจากสัตว์มาสู่คน (Zoonosis) เกิดจากแบคทีเรียชนิดเกลียว (Spirochete) genus *Leptospira* โรคนี้สามารถติดต่อไปยังสัตว์เลือดอุ่นที่มีกระดูกสันหลังได้เกือบทุกชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนในส่วนที่มีความคงตัวของยีน Leptospiral immunoglobulin like protein (*lig*) จากเชื้อ *Leptospira kirschneri* serovar grippotyposa strain Moskva V โดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน ทำการหาลำดับเบสและส่งเข้าฐานข้อมูลใน GenBank ได้ accession number คือ EF517920 ยีนนี้สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างการติดเชื้อตามธรรมชาติกับการฉีดวัคซีนได้ เวคเตอร์ pGEX-5X-3 ซึ่งเป็น fusion protein กับ glutathione-s-transferese (GST) ใช้เป็น expression vector และผลิตโปรตีน

คำสำคัญ: เลปโตสไปโรซิส, Leptospiral immunoglobulin-like protein (*lig*)
Keywords: Leptospirosis, Leptospiral immunoglobulin-like protein (*lig*)

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kamphaengsaen Campus, Kasetsart University, Nakhonpathom, 73140
[2] ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์และการบริการวินิจฉัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Veterinary Public Health and Diagnostic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kamphaengsaen Campus, Kasetsart University, Nakhonpathom, 73140
[3] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kamphaengsaen Campus, Kasetsart University, Nakhonpathom, 73140
[4] ภาควิชาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900
Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, 10900
* Corresponding author: T Sukpuaram : fvetths@ku.ac.th

ใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL 21 ซึ่ง Lig โปรตีนที่ผลิตได้สามารถกระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะได้ สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี Western blotting และ Dot blotting ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้อาจนำมาใช้ในการพัฒนาด้านวัคซีนและการวินิจฉัย เพื่อรักษาโรคเลปโตสไปโรซิสได้ต่อไป

Abstract

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by infection of spirochetes belong to the genus *Leptospira* that are invasive for a wide range of mammalian hosts. In this study, *Leptospira kirschneri* serovar grippotyposa strain Moskva V was chosen to be a target for cloning. The specific primer was designed for cloning the conserved region of Leptospiral immunoglobulin like protein (*lig*) by PCR. Sequence was deposited in GenBank and given accession number EF 517920. Lig gene can differentiate between vaccinated and naturally infected animals. The target gene has been cloned to pGEX-5x-3 vector as a fusion protein with glutathione-s-transferese (GST) and expressed in *Escherichia coli* strain BL 21. Specific antibody against Lig protein was determined by using Western blot and Dot blot analysis. The GST-Lig recombinant protein may provide new insights for developing strategies to improve vaccination, and diagnosis for treatment Leptospirosis.

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นกลุ่มอาการของโรค เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ติดต่อมาจากสัตว์หลายชนิด อาการที่พบมีความหลากหลายขึ้นกับชนิดและปริมาณเชื้อที่ได้รับ ซึ่งอาการที่พบมีได้ตั้งแต่ไม่ปรากฏอาการ อาการอย่างอ่อน อาการรุนแรง หรือจนถึงขั้นเสียชีวิต โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์มาสู่คนที่มีอันตรายสูงอีกโรคหนึ่ง สามารถพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศไทยที่อยู่ในเขตร้อนชื้น (Petkanchanapong et al., 2005) จัดว่าเป็นโรคประจำถิ่นและผันแปรไปตามฤดูกาล พบมากในช่วงปลายฤดูฝนต้นฤดูหนาว (Bharti et al., 2003) เกิดจากจากเชื้อแบคทีเรียชนิดเกลียว (spirochete) genus *Leptospira* หลังจากที่เชื้อเข้าสู่ร่างกายระบบภูมิคุ้มกันสามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ และเชื้อบางส่วนจะเข้าไปอยู่ที่ท่อหน่วยไตและถูกขับออกมากับปัสสาวะ (leptospiruria) ตลอดเวลาที่มีเชื้ออยู่ การติดเชื้อเลปโตสไปราเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับปัสสาวะของสัตว์ หรือการบริโภคน้ำ อาหาร ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ เชื้อจะไชเข้าสู่ร่างกายตามผิวหนังตามรอยแผลรอยขีดข่วน ผิวหนังที่เปียกชุ่มซึ่งเกิดจากการแช่น้ำเป็นเวลานาน เยื่อบุของปาก ตาและจมูก อาการในคนมีตั้งแต่อาการไม่รุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต ในขณะที่สัตว์ส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการของโรค

อย่างเด่นชัด (Levett, 2001) การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการยังคงใช้การตรวจหาแอนติบอดี เนื่องจากวิธี microscopic agglutination test (MAT) ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง ต้องใช้ตัวเชื้อเป็น และในการอ่านผลต้องอาศัยผู้มีความชำนาญ ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาวิธีการทางน้ำเหลืองวิทยาอื่นๆ เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคนี้

Palaniappan et al. (2000) ได้ค้นพบโปรตีนและยีนที่ควบคุมการสร้าง leptospiral immunoglobulin-like protein A (Lig A) จากเซรุ่มม้าที่แท้งจากการติดเชื้อเลปโตสไปราและศึกษาคุณสมบัติของยีนนี้พบว่าไม่มีการแสดงออกเมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองแต่มีการแสดงออกเฉพาะในร่างกายเท่านั้น ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างการติดเชื้อจากธรรมชาติและการฉีดวัคซีนได้ ต่อมา Matsunaga et al. (2003) ได้ศึกษา พบว่ายีนนี้ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ Lig A, Lig B และ Lig C (ซึ่ง Lig C ไม่มีการแสดงออกของยีนหลังขบวนการ transcribe) ส่วน Lig A และ Lig B มีความเหมือนกันบริเวณด้าน carboxy-terminal และ Lig B อยู่หน้า Lig A ประมาณ 1.5 กิโลเบส และมีทิศทาง transcribe เดียวกัน Lig A และ Lig B พบเฉพาะในเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคเท่านั้น นอกจากนี้ยังได้พิสูจน์ตำแหน่งของโปรตีน Lig พบว่าอยู่ที่บริเวณผิวของเชื้อเลปโตสไปรา (leptospiral surface-exposed proteins) และจากการใช้วิธี immunoblot ระหว่าง recombinant Lig protein กับเซรุ่มผู้ป่วย พบว่าโปรตีน Lig ทั้ง Lig A และ Lig B เป็นแอนติเจนหลักที่แสดงออกถึงความรุนแรงขณะมีการติดเชื้อ ทำให้เกิดการจับกลุ่มและการบุกรุกของเชื้อระหว่างการก่อโรคอีกด้วย และจากการศึกษาของ Koizumi and Watanabe (2004) ต่อ Lig protein พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายในหนูอีก ด้วยเหตุนี้โปรตีน Lig จึงเหมาะที่จะนำมาศึกษาการเป็นแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการโคลนยีน ผลิต recombinant protein และศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองต่อส่วนที่มีความคงตัวของ Lig gene ในส่วนที่มีความเหมือนกันทั้งใน Lig A และ Lig B (Figure 1) จากเชื้อ *Leptospira kirschneri* serovar grippotyposa strain Moskva V ซึ่งเป็นซีโรวาร์ที่นำมาใช้เป็นวัคซีนในการป้องกันโรค เป็นซีโรวาร์ที่มีการระบาดของสัตว์ในประเทศไทย (Niwetpathomwat et al., 2006) และมีฐานข้อมูลของยีนนี้เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ และเพื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปใช้ในการพัฒนาเพื่อตรวจสอบและวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสได้ต่อไป

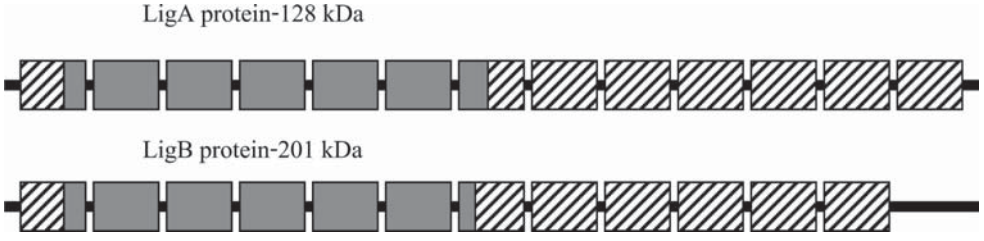

Figure 1 Genetic structure of the *lig AB* locus. The >2 kb segment of DNA sequence identity between 5′ portions of *lig A* and *lig B* is indicated in gray.

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษา

เชื้ออ้างอิง (reference strains) ของ *Leptospira* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ เชื้อ *Leptospira kirschneri* serovar grippotyposa strain Moskva V เชื้อจะถูกเลี้ยงในอาหาร Neo-peptone ที่อุณหภูมิ 28 °C ประมาณ 5-7 วัน นำเชื้อ *Leptospira* ที่มีการเจริญที่เหมาะสม (ประมาณ 10^8 cells/ml) และไม่ปนเปื้อน มาสกัด DNA ด้วยวิธี guanidine thiocyanate phenol chloroform DNA extraction method ของ Siebert and Chenchik (1993)

การทำ PCR

Primer ที่ใช้ในการทดลองแสดงใน Table 2 สารละลาย 100 ไมโครลิตร ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณยีนแต่ละชนิดประกอบด้วย 10x *Taq* buffer ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 12 ไมโครลิตร 25 m*M* $MgCl_2$ 12 ไมโครลิตร 10 m*M* dNTP 2 ไมโครลิตร primer อย่างละ 1.2 ไมโครลิตร distilled water 70.7 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร (Fermentas) และ DNA ของเชื้อ *Leptospira* 10 ไมโครลิตร ใช้เป็น template สำหรับการเพิ่มปริมาณ Lig ยีน และ primer คู่ 16S rRNA ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research) และปรับสภาวะอุณหภูมิในขั้นตอนที่ 1 Initial denature 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 Denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นตอนที่ 3 Annealing นาน 30 วินาที ขั้นตอนที่ 4 Extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ 16S rRNA ยีน และนาน 90 วินาที สำหรับ Lig ยีน ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 40 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย Final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยใช้ 1.5% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบขนาดภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel document

การโคลนยีน และการผลิต recombinant protein

นำ PCR ที่ได้ โคลนลงใน pGEM®-T Easy Vector (Promega) ได้เป็น recombinant พลาสมิด pGEM-Lig และเพิ่มปริมาณยีนใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 นำเชื้อที่ได้สกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis ของ Sambrook et al. (1989)

นำพลาสมิด pGEM-Lig ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I+*Xho*I และโคลนเข้าสู่ pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia Biotech) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ทำการ transform เข้า *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ตรวจสอบผลโคลนที่ได้โดยวิธี blue white colony และ PCR จากนั้นยืนยันผลการโคลนโดยการ sequencing จากนั้นนำโคโลนีที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีน Lig สอดแทรกอยู่มาเลี้ยงเพื่อสกัดพลาสมิด และ transform ลงใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Amersham Pharmacia Biotech) เพื่อกระตุ้นให้มีการผลิต recombinant protein นำโปรตีน GST-Lig มาตรวจสอบรูปแบบโปรตีนทำให้

บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) เพื่อนำไปกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง (John and Neel, 1993)

การประเมินความจำเพาะของ recombinant protein

ตรวจสอบกับเซรุ่มสุนัขโดยวิธีการ dot blot analysis โดยใช้เซรุ่มสุนัขที่ได้รับการวินิจฉัยในเบื้องต้นต่อลักษณะการแสดงออกของอาการต่อโรคเลปโตสไปโรซิสควบคู่กับการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี microscopic agglutination test (MAT) ซึ่งให้ค่า MAT titer ระหว่าง 1:400-1:800 และสุนัขปกติที่ไม่มีอาการต่อโรคและให้ผล MAT เป็นลบ โดยทำการหยด GST-Lig recombinant protein และ GST ซึ่งทำ partial purified แล้ว ที่ความเข้มข้น 40 μg/ml ปริมาตร 2 μl ลงบน nitrocellulose membrane ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นแช่ใน blocking solution 5% skimmed milk ใน PBST (1XPBS+0.05% tween 20) นาน 1 ชั่วโมง เติมเซรุ่มสุนัขที่ให้ผล MAT ลบ (MAT titer < 100) 2 ตัวอย่าง และบวก (MAT titer > 100) 7 ตัวอย่าง ที่เจือจาง 1:50 ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น nitrocellulose membrane ด้วย PBST 3 ครั้ง เติม anti dog-IgG (SIGMA) เจือจาง 1:1000 ใน PBST ที่มี 1% skimmed milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น nitrocellulose membrane ด้วย PBST แล้วเติมสารละลายสับสเตรท DAB ทิ้งไว้นาน 5-10 นาที จนเห็นจุดสี ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา (Harlow and Lane, 1988)

การกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูทดลองและตรวจสอบแอนติบอดีต่อ GST-Lig recombinant protein

ผสม GST-Lig recombinant protein 100 μg ด้วย Incomplete Freud's adjuvant (Sigma) อัตราส่วน 1:1 นำมาฉีดเข้าหนูบริเวณช่องท้องและฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำโดยห่างกัน 7 วัน หลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 3 เป็นเวลา 7 วัน จึงเก็บเซรุ่มหนูทดลองเพื่อนำมาตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อ GST-Lig recombinant protein ด้วยวิธี Western blotting และ dot blotting โดยใช้โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในการ blot ใช้ HRP-conjugated goat anti-mouse IgG เจือจางที่ 1:1000 (ZYMED) เป็น secondary antibody และใช้ DAB เป็นสับสเตรท

ผลการทดลอง

การโคลนยีน และการผลิต recombinant protein

ในการทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อส่วนคงตัวของยีน Lig นั้น product ที่ได้มีขนาด 1728 bp (Figure 2A) จากนั้น PCR product ที่ได้โคลนลงใน TA cloning kit และ transform ลงใน *E. coli* JM 109 ทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด โดยดูจากสีของโคโลนีที่ได้สีขาว (blue-white screening) และสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จากนั้นนำโคโลนีสีขาวนั้นมาตรวจสอบยืนยันว่ามียีน Lig แทรกอยู่จริง โดยทำ PCR เพื่อยืนยันผล และส่งหา

ลำดับโคลนที่ได้โดยตรวจสอบลำดับเบส พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR มีความจำเพาะต่อยีน Lig ของเชื้อเลปโตสไปรา โดยมีการยืนยันผลของ PCR product และเปรียบเทียบกับที่มีรายงานใน GenBank พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายคลึงประมาณ 92-96% ส่วน amino acid มีความคล้ายคลึงกันประมาณ 93-96% (Figure 3) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ผลิตขึ้นจำเพาะต่อยีน Lig ของเชื้อเลปโตสไปรา จากนั้นเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I+*Xho*I และโคลนเข้าสู่ pGEX-5X-3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ทำการ transform เข้า *E. coli* สายพันธุ์ JM109 และ subclone ลงใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนพบว่ามีการสร้างโปรตีนซึ่งมีขนาดประมาณ 96 kDa และ GST protein ขนาดประมาณ 26 kDa (Figure 2B) โปรตีนที่สร้างจาก *E. coli* ครั้งนี้ให้โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น inclusion body จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์บางส่วนและโปรตีนแยกละลายออกมาในส่วนใสเพื่อนำไปใช้ พบว่าที่ 4M Urea และที่ 1% sakosyl สามารถละลายโปรตีนออกมาได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

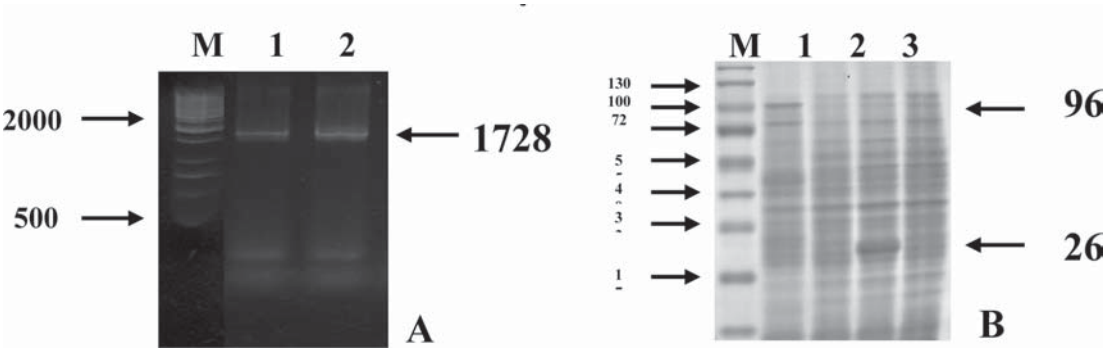

Figure 2 A. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of Lig gene: Lane M = standard marker (500 bp), lane1-2 = 1728 bp of Lig gene. B. SDS-PAGE analysis of recombinant Lig protein at 96 kDa: Lane M=Molecular weight standard, lane1 = expression of recombinant Lig protein, lane2 = non-expression of recombinant Lig protein, lane3 = expression of GST at 26 kDa, lane4 = non-expression of GST.

```
                         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L.kirschneri MoskvaV  KKIFCISIFLSMFFQGCMSWPLLTGLVGLTAGKKSNGLSFFHLLLGNSNPTITRIELSYQDSSIANGTSTTLGVTAIFDNGTNQNITDLTYIVPDSQSVV
AY190126              .RT.....L......S........S.A..A........P......S..D.V.........N....K......E...............S.S..S.A..I.
AB098517              ......................................................................E...............S...........
AB098516              .......................S.A..A...RGGDS...............................E...............S.S..S......

                        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L.kirschneri MoskvaV  TIEGNRVRGIASGSSIIKAEYNGLYSEQKITVTPAILNSIQVTSLESGILPKGTNRQFSAIGIFSDGSHQDISNDPLIVWSSSNPDLVQVDDSGLASGIN
AY190126              D.Q....................M...........TI........DD...........A.........................I...R...........
AB098517              ......................................................................E.........................
AB098516              ......................................................................E.........................

                        210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L.kirschneri MoskvaV  LGTAXIRASFQSKQGAEEMTVGDAVLSQIQVTSNNLNIPLGKKQRLTATGIYSDNSNRDISSSVIWNSSNSTIANIQNNGILETADTGIVTVSASSENII
AY190126              ....H.........AS..I........S......SP...................................................RG..N
AB098517              ....H...................I.............................................................
AB098516              ....H...................I.............................................................

                        310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L.kirschneri MoskvaV  GSVKLIVTPAALVSISVSPTNSTVAKGLQENFKATGIFTDNSNSDITGQVTWDSSNTDIFSISNASDSHGLASTLNQGNVKVTASIGGIQGSSDFTVTQA
AY190126              ..I...................A........................D........P..L...............................T..K...E
AB098517              ......................A........................D........K..L...............................T..K...E
AB098516              ......................A........................D........K..L...............................T.......

                        410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L.kirschneri MoskvaV  ALTSIEVSPTRTSIAKGLTQKFTAIGIFTDNSKKDITDQVTWNSSSAIVSVSNLDDNKGLGKAHAVGDTTITATLGKVSGNTWFTVVPAVLTSIQINPVN
AY190126              V........VLP.........................N..........A...............................K...................
AB098517              V........VLP.................................A...............................K...................
AB098516              ............................................A...............................K...................

                        510       520       530       540       550       560       570
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L.kirschneri MoskvaV  PSLAKGLTQKFTATGIYSDNSNKDISSAVTWFSSDSSIATISNAQKNQGNAYRAATGTTDIKATFGKVSSPVSTL
AY190126              .........................T.S................K.....S.G....A.................
AB098517              ........................S................K.......G....A.................
AB098516              ........................S................K.......G....A.................
```

Figure 3 Amino acid sequence alignment of the Lig gene from PCR amplification compared with the sequences accession no. AB098516, AB098517 and AY190126 from GenBank.

การประเมินความจำเพาะของ recombinant protein

หลังจากแยกโปรตีนได้แล้ว นำโปรตีนไปทดสอบกับเซรุ่มสุนัขที่ให้ผลลบและบวกกับ MAT ด้วยวิธี dot blot พบว่าจากตัวอย่างที่ให้ผล MAT ลบก็ให้ผลลบกับ dot blot ทั้ง 2 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ให้ผล MAT บวก 7 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับ dot blot เพียง 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 88.9%

การกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูทดลองและตรวจสอบแอนติบอดีต่อ GST-Lig recombinant protein

จากนั้นนำโปรตีนไปฉีดกระตุ้นในหนูและหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 3 เป็นเวลา 7 วัน เก็บเซรุ่มมาตรวจหาแอนติบอดีต่อ Lig ด้วยวิธี Western blotting (Figure 4A) พบแอนติบอดีจากหนูที่ได้ให้ตำแหน่งของโปรตีน Lig ที่ตำแหน่ง 96 kDa และตรวจสอบด้วยวิธี Dot blotting ผลที่ได้พบว่าตำแหน่งของ GST-Lig recombinant protein จะติดสีเข้ม ซึ่งแตกต่างจาก GST-protein พบว่าติดสีจางกว่าจนเกือบไม่ติดสี จากผลแสดงว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูทดลองได้ เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้จากเซรุ่มของหนูทดลองสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (GST-Lig recombinant protein) จากนั้นทำการทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างเซรุ่มกับตัวเจือจาง (diluent) ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับแอนติเจน (GST-Lig recombinant protein) เพื่อประเมินคุณภาพความเป็นอิมมูโนเจนของ recombinant protein ที่ได้ ในการกระตุ้นให้หนูผลิต

แอนติบอดีที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นต่อโปรตีนแอนติเจน ว่ามากหรือน้อยเพียงไร โดยเริ่มจาก 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 และ 1:3200 พบว่า แอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ทุกความเข้มข้น (Figure 4B)

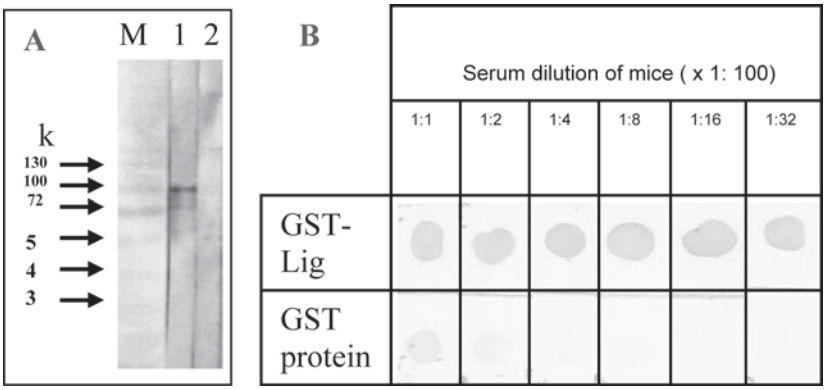

Figure 4 Immunoblot analysis of recombinant Lig protein. A.Western blot analysis showed activity of recombinant protein. The first lane (M) corresponded to molecular weight standard. The middle (1) and the last lanes (2) were probed with polyclonal antibody against GST-Lig recombinant protein and control normal mice serum, respectively. B. Dot blot analysis with various antibody titer against GST-Lig recombinant protein.

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study.

Primer	Primer sequence (5′---3′)	Gene location	Restriction endonuclease site	Tm (˚C)
LigF	CGTGTCGACGTGAAGAAAATATTTTGTATTT CGATTTTCC	Lig	*Sal*I	50
LigR	CCTCGAGGGGATAACGTAGAAACCGGACTAC		*Xho*I	
rrsF	GGCGGCGCGTCTTAAACATG	16S	-	55
rrsR	GTTCCCCCCATTGAGCAAGATT	rRNA	-	

Table 2 Results of leptospiral antibodies detected by using dot blot analysis and MAT.

Serum number	Result	
	MAT	Dot blot analysis
1	Negative	Negative
2	Positive titer 1:100	Negative
3	Positive titer 1:400	Positive
4	Positive titer 1:400	Positive
5	Positive titer 1:400	Positive
6	Positive titer 1:400	Positive
7	Positive titer 1:400	Positive
8	Positive titer 1:800	Positive
9	Negative	Negative

วิจารณ์และสรุป

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษายีนในส่วนที่มีความคงตัวของ Leptospiral immunoglobulin like protein (*lig*) จากเชื้อ *Leptospira kirschneri* serovar grippotyposa strain Moskva V เมื่อนำลำดับเบสและกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับที่มีรายงานใน GenBank (www.ncbi.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม ClustalW Multiple alignment และ BioEdit พบว่าลำดับเบสของ Lig gene มีความคล้ายคลึงกับยีนในซีโรวาร์ที่มีรายงานใน GenBank accession number AB098516, AB098517 และ AY190129 (Matsunaga et al., 2003; Koizumi and Watanabe, 2004) GST-Lig recombinant protein สามารถผลิตได้ในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยใช้ pGEX-5X-3 เป็น expression vector ซึ่งในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนนั้น ต้องคำนึงถึงสายพันธุ์ของเซลล์เจ้าบ้าน ชนิด และคุณสมบัติของเวคเตอร์ และสภาวะที่เหมาะสม *E. coli* system เป็นเซลล์ที่สามารถผลิตโปรตีนได้จำนวนมาก และทำได้สะดวกรวดเร็ว แต่ข้อเสียคือโปรตีนที่ผลิตได้มักไม่หลั่งออกนอกเซลล์ และไม่มีขบวนการ post-translation modification ต่างๆ ดังนั้นจากการใช้ plasmid ใน GST gene fusion system นั้น รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จะมีส่วนของโปรตีน GST สำหรับช่วยในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ โปรตีนที่ผลิตได้มีคุณสมบัติเป็น Inclusion bodies โดยใช้ 4M Urea และ 1% sacokyl ในการละลายโปรตีนก่อนที่จะทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (partial purification) เพื่อนำไปใช้ และจากการศึกษาของ Palaniappan et al. (2002) พบว่า การแสดงออกของ full-length ของ *lig A* นั้น เป็นพิษต่อเชื้อ *E. coli* เป็นอย่างมาก แต่จากการทดลองในครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกในส่วนที่มีความคงตัวของ Lig พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ไม่เป็นพิษต่อเชื้อ *E. coli* แต่อย่างใด

จากการทดลองได้นำ GST-Lig recombinant protein ที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบกับเซรุ่มสุนัขที่ติดเชื้อเลปโตสไปราได้ ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้นในครั้งนี้จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบอาจมีจำนวนน้อยเกินไป แต่อย่างไรก็ตามแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบโรคเลปโตสไปโรซิสได้ และจากการศึกษาเบื้องต้นด้วย Western blotting และ Dot blotting พบว่าโปรตีนที่ผลิตขึ้นได้ สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานในสัตว์ทดลองได้ Palaniappan et al. (2004) ได้ทำการโคลนยีนในส่วนที่มีความคงตัวของ Lig (Con) และในบริเวณที่มีความปรวนแปรของ Lig A และ Lig B (VarA และ VarB) และประเมินผลของ recombinant proteins ที่ได้ต่อการนำมาวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ด้วยวิธี kinetic ELISA (KELA) และ immunoblot analysis โดยใช้เซรุ่มสุนัขที่ได้รับวัคซีนและสุนัขที่ติดเชื้อซึ่งให้ค่า MAT titre ระหว่าง 400-12800 พบว่าเซรุ่มสุนัขที่ได้รับวัคซีนไม่ให้ผลใดๆ กับ recombinant proteins ซึ่งตรงข้ามกับสุนัขที่ติดเชื้อ แสดงให้เห็นว่าสัตว์ที่ได้รับวัคซีนจะไม่มีแอนติบอดีต่อ recombinant antigen ของ Lig และจากการศึกษาของ Croda et al. (2007) ได้โคลนยีน Lig B และนำมาใช้ตรวจสอบกับเซรุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อเลปโตสไปราที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธี immunoblot พบว่าการใช้ recombinant Lig protein ในการวินิจฉัยโรคทางเซรุ่มวิทยา สามารถช่วยในการค้นหาผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็วเพื่อให้สามารถรักษาได้อย่างทันที

งานวิจัยในครั้งนี้มีเป้าหมายหลักในการผลิต recombinant protein ที่จำเพาะต่อยีนที่แสดงออกถึงความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปรา เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรค ให้เกิดความรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ ลดความเสี่ยงของผู้ปฏิบัติงานต่อการสัมผัสเชื้อจากการเพาะเชื้อ อีกทั้ง recombinant protein ที่ได้ ยังสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณการผลิตเพื่อให้ได้ตามความต้องการ ดังนั้นจาก GST-Lig recombinant protein ที่ผลิตได้จาก *E. coli* นี้เหมาะสมที่จะนำไปใช้การตรวจสอบสัตว์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปรา เพื่อเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthaias, M.A., Diaz, M.M., Lovvet, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Weillig, M.R., Gotuzzo, E. and Vinetz, J.M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect. 3: 757-771.

Croda, J., Ramos, J.G.R., Matsunaga, J., Queiroz, A., Homma, A., Riley, L.W., Haake, D.A., Reis, M.G. and Ko, A.I. 2007. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute Leptospirosis. J Clin Microbiol. 45(5): 1528-1534.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 726 p.

John, V.F. and Neel, B.G. 1993. Solubilization and purification enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. Anal Biochem. 210: 179-187.

Koizumi, N. and Watanabe, H. 2004. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. Vaccine. 29;22(11-12): 1545-1552.

Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14: 236-326.

Matsunaga, J., Barocchi, M.A., Croda, J., Young, T.A., Sanchez, Y., Siqueira, I., Bolin, C.A., Reis, M.G., Riley, L.W., Haake, D.A. and Ko, A.I. 2003. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol. Microbiol. 49: 929-945.

Niwetpathomwat, A., Luengyosluechakul, S. and Geawduanglek, S. 2006. A serological investigation of Leptospirosis in sow from central Thailand. Sotheast Asian J Trop Med Public Health. 37(4): 716-719

Palaniappan, R.U.M., Chang, Y.F., Jusuf, S.S.D., Artiushin, S., Timoney, J.F., McDonough, S.P., Barr, SC. Diver, T.J., Simpson, K.W., McDonough, P.L. and Mohammed, H.O. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans.* Infect Immun. 70: 5924-5930.

Palaniappan, R.U.M., Chang, Y.F., Hassan, F., McDonough, S.P., Pough, M., Barr, SC., Simpson, KW., Mohammed, H.O., Shin, S., McDonough, P., Zuerner, R.L., Qu, J. and Roe, B. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. J Med Microbiol. 53: 975-984

Petkanchanapong, W., Sawanpanyalert, P., Naigowit, P., Dowell, S., Levett, P., Tangkanakul, W., Limpakarnjanarat, K., Wongjindan, W., Sutthirattana, S. and Fisk, T. 2005. Diagnostic Tools for Leptospirosis in Thailand: Evaluation of Rapid Tests. Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Extraction and purification of plasmid DNA. Molecular Cloning: A Laboratory Mannual. 2nd edition, New York Cold Spring Harbor Laboratory 1: 1.21-1.32.

Siebert, P.D. and Chenchik, A. 1993. Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloro-form RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination. Nucleic. Acids Res. 21: 2019-2020.