RESEARCH ARTICLE

Examining Putative Leucine-rich Repeat LBJ_2271 Ortholog Genes in *Leptospira borgpetersenii* Serovar Sejroe Genome

Supachai Nitipan[1,a], Jitiporn Prachumwan[1], Siriwan Prapong[1,2 *]

Abstract

Objective—To examine and characterize putative leucine-rich repeat LBJ_2271 ortholog genes in genome of *L. borgpetersenii* serovar Sejroe, which was also an important serovar found in bovine and buffalo Leptospira reserviors in Thailand.

Materials and Methods—Specific primers for amplifying putative leucine-rich repeat LBJ_2271 ortholog genes were designed from LBJ_2271 orthologs' conserved nucleotide sequences from serovar Hardjo-bovis strain LBJ197 and L550. DNA, as putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs, was amplified from *L. borgpetersenii* serovar Sejroe genomic DNA. Amplified DNA with preliminary confirmed as LBJ_2271 orthologs was cloned into plasmid pCR8/GW/TOPO to produce recombinant plasmid. The inserted gene and its predicted protein were analyzed using bioinformatics.

Results—A 630 bp DNA, as putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs, was amplified from *L. borgpetersenii* serovar Sejroe genomic DNA by using the designed primers. Amplified DNA with preliminary confirmed as LBJ_2271 ortholog was cloned to produce KU-pCR8-R21_2271 recombinant plasmid which contained inserted gene KU_SEJ_R21_2271. The KU_SEJ_R21_2271 gene has nucleotide sequence 98% identity to gene LBJ_2271, and it has predicted protein, KU_SEJ_LRR_2271, with deduced amino sequence as 98.5% identity to LBJ_2271 protein. Characterized by bioinformatics, the protein KU_SEJ_LRR_2271 was a LRR membrane protein containing a signal peptide domain, trans-membrane domains, an N-glycosylation site and LRR motiff of LRR typical subfamily as LXXLXLXXNXL. The study showed an existing of KU_SEJ_R21_2271 gene in serovar Sejroe genome as LBJ_2271 ortholog.

Conclusion—Gene KU_SEJ_R21_2271 was found in genome of *L. borgpetersenii* serovar Sejroe. It was a leucine-rich repeat LBJ_2271 ortholog and its predicted protein, KU_SEJ_LRR_2271, was characterized as LRR membrane protein.

KKU Vet J. 2013;23(1):1-14. http://vmj.kku.ac.th/

Keywords: Leucine-rich repeat (LRR); Leptospira; Nucleotide sequence; LBJ_2271 gene

[1]Genetic Engineering Interdisciplinary Graduate Program, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900.
[2]Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900.
[a]Current address: Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University Phatthalung campus, Phatthalung, 93110.
[*]**Corresponding author** E-mail: fvetsrp@ku.ac.th

การตรวจสอบยีน Putative Leucine-rich Repeat LBJ_2271 Orthologs ในจีโนมของเชื้อ *Leptospira borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe

ศุภชัย นิติพันธ์[1,a], จิติพร ประชุมวรรณ์[1], ศิริวรรณ พราพงษ์[1,2*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ ตรวจสอบการมีอยู่และทำนายคุณสมบัติของยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs ในจีโนมของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe อันเป็นซีโรวาร์สำคัญที่พบในโค-กระบือที่เป็นแหล่งรังโรคฉี่หนูในประเทศไทย

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ทำการออกแบบไพรเมอร์จากความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในกลุ่มยีน orthologs ของ LBJ_2271 ของเชื้อซีโรวาร์ Hardjo-bovis แต่ต่างสายพันธุ์คือสายพันธุ์ LBJ197 และ L550 สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs จากจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe ชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบเบื้องต้นว่าเป็น putative LBJ_2271 orthologs ถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR8/GW/TOPO สร้างพลาสมิดลูกผสม และใช้โปรแกรมไบโออินฟอร์เมติกส์ชีวสารสนเทศทำนายคุณสมบัติของยีน และของโปรตีนที่ทำนายได้

ผลการศึกษา ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 630 คู่เบสของ putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs ถูกเพิ่มปริมาณจากจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ เมื่อตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าเป็น putative LBJ_2271 orthologs จึงโคลนและได้พลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 ที่มียีน KU_SEJ_R21_2271 ซึ่งยีนนี้ มีความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นร้อยละ 98 เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LBJ_2271 และทำนายโปรตีนเป็น KU_SEJ_LRR_2271 มีความเหมือนในระดับกรดอะมิโนเท่ากับร้อยละ 98.5 เทียบกับโปรตีนของ LBJ_2271 ใช้โปรแกรมไบโออินฟอร์เมติกส์ชีวสารสนเทศทำนายได้ว่า KU_SEJ_LRR_2271 มีคุณสมบัติเป็น LRR โปรตีนพบบนผิวเซลล์มี signal peptide domain trans-membrane domains และตำแหน่ง N-glycosylation รูปแบบของ LRR motif จัดอยู่ในกลุ่ม LRR typical subfamily เป็น LXXLXLXXNXL ผลการศึกษาพบการมีอยู่ของยีน KU_SEJ_R21_2271 ในเชื้อซีโรวาร์ Sejroe และเป็น LBJ_2271 ortholog

ข้อสรุป พบยีน KU_SEJ_R21_2271 ในจีโนมของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe จัดเป็น leucine-rich repeat LBJ_2271 ortholog และทำนายคุณสมบัติโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 เป็น LRR โปรตีนบนผิวเซลล์

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2556;23(1):1-14. http://vmj.kku.ac.th/

คำสำคัญ: ความซ้ำของลิวซีน เลปโตสไปรา ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยีน LBJ_2271

[1]สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

[2]ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

[a]ที่อยู่ปัจจุบัน: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จ.พัทลุง 93110

[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ**: E-mail fvetsrp@ku.ac.th

บทนำ

โปรตีน leucine-rich repeat (LRR) คือโปรตีนที่ประกอบด้วยชุดซ้ำของกรดอะมิโนลิวซีน (Luecine) แต่ละชุดมีความยาว 20-29 กรดอะมิโน และมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) กระจายอยู่ในโครงสร้างของโปรตีนทำให้มีโปรตีนมีรูปร่างคล้ายกับรูปเกือกม้า [1] พบว่าโปรตีน leucine-rich repeat ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อโรคในแบคทีเรียบางชนิด เช่น โปรตีน internalin (Inl) ของเชื้อ *Listeria monocytogenes* [2-7] โปรตีน Yops ของเชื้อ *Yersinia pestis* [8, 9] และโปรตีน LRRA ของเชื้อ *Treponema denticola* [10] เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานในเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (GBS) มีนักวิจัยนำโปรตีน leucine rich repeat G (LRRG) ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์มาใช้สำหรับสร้างวัคซีนใช้สำหรับป้องกันโรคในหนูทดลองได้ และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจับยึดระหว่างเชื้อ *S. agalactiae* และเซลล์ของหนู CBA/ca อีกด้วย[11] จากข้อมูลรายงานข้างต้นแสดงว่าโปรตีนที่มีส่วน LRR เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคต่างๆ ดังนั้นสำหรับโรคเลปโตสไปโรซีส การที่มีจำนวนยีนที่ได้รับการทำนายว่าเป็นตัวกำหนดการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR แตกต่างกัน อาจจะส่งผลให้เชื้อเลปโตสไปราแต่ละซีโรวาร์มีลักษณะการก่อโรคในสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน มีรายงานข้อมูลพันธุกรรมของ *Leptospira interogans* ซีโรวาร์ Lai ถูกนำมาศึกษาและออกแบบชุดไพรเมอร์ เพื่อคัดเลือกยีนที่มีส่วน LRR สำหรับสร้างเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกกลุ่มของเชื้อ *Leptospira ssp*. สายพันธุ์ต่างๆ [12] รวมทั้งรายงานการกระจายของยีนที่ได้รับการทำนายว่าเป็นตัวกำหนดการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ของเชื้อ *L. interrogans* ซีโรกรุ๊ป Icterohaemorrhagiae ซีโรวาร์ Lai (AE010300 และ AE010301) โดย Hniman และ Prapong (2007) และพบว่าจีโนมของเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงซีโรวาร์ต่างๆ ทั้งสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ไม่ก่อโรคแสดงโอกาสการพบจำนวนยีนที่ควบคุมการสร้างของโปรตีน LRR ที่แตกต่างกัน [12] ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับความสามารถและความรุนแรงในการก่อโรคของซีโรวาร์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากพบว่าจำนวนยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน LRR ในสายพันธุ์ไม่ก่อโรคมีน้อยมากจนถึงไม่พบ[12] ทั้งนี้ตรงกับรายงานที่แสดงว่าสามารถตรวจพบจำนวนกลุ่มยีน ที่มีส่วน LRR จากจีโนมของ *L. interrogans* ซีโรวาร์ต่างๆ ได้มากกว่าและง่ายกว่าการตรวจหา ยีนที่มีส่วน LRR จากจีโนมของ *L. borgpetersenii* [10]

ในประเทศไทยพบว่ารายงานผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปสไปโรซีส หรือโรคฉี่หนู จำนวนมากในปี พ.ศ. 2543 พื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์ ต่อมามีรายงานว่าเชื้อเลปโตสไปราก่อโรคในเหตุการณ์ครั้งนั้นมีสาเหตุจากเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe ทั้งนี้สาเหตุจะมีความสัมพันธ์กับการปลดปล่อยเชื้อจากสัตว์ที่ปนเปื้อนมากับปัสสาวะ [13] โดยรายงานดังกล่าวระบุว่า โคและกระบือในพื้นที่สำรวจมีค่าภูมิคุ้มกันในระดับสูง ต่อเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Tarassovi และ Sejroe คิดเป็นร้อยละ 56 และ 37 ตามลำดับ [13] ซึ่งผลรายงานดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลการสำรวจแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราในโคและกระบือ พบว่าส่วนใหญ่แล้วโคจะเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Tarassovi และ Sejroe [14, 15] ปัจจุบันมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis สองสายพันธุ์ คือ JB197 และ L550 ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกับ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe จากข้อมูลดังกล่าว กลุ่มนักวิจัยในประเทศไทยได้รายงานและทำนายว่ายีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน LRR ชื่อยีน *LBJ_2271* (ABJ76745) ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์และมีส่วนของโปรตีนที่เมื่อคำนวณค่าการเป็นอิพิโทป์จะเป็นอิพิโทป์ที่ดีและจะสามารถแสดงศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ [16] ดังนั้นงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs จากเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุหลักของการเป็นแหล่งรังโรคของโคกระบือในประเทศไทย [14, 15] และทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้เทคนิคไบโออินฟอร์เมติกส์ชีวสารสนเทศวิเคราะห์คุณสมบัติของยีนดังกล่าว สำหรับใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาต่อยอดพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสสำหรับปศุสัตว์ในประเทศไทยต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs ในจีโนมของเชื้อ L. borgpeterseni ซีโรวาร์ Sejroe

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ถูกออกแบบจากการใช้ตำแหน่งบริเวณอนุรักษ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (conserve region) ของยีน LBJ_2271 ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis สายพันธุ์ JBL197 เนื่องจากรายงานโดย [16] ว่ายีน LBJ_2271 มีความเหมือน (identity) 100 เปอร์เซนต์กับยีน LBL_0836 (ABJ78391.1) จากจีโนมของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis สายพันธุ์ L550 ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *LBJ_2271* (ABJ76745) ถูกทำการตรวจหาความเหมือนโดยวิธี multiple sequence alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LBL_0836 (ABJ78391.1) โดยใช้โปรแกรมและข้อมูลจากฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวจากทั้งสองสายพันธุ์ นำตำแหน่งบริเวณอนุรักษ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาใช้เป็นต้นแบบ

เพื่อออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม MacVecter™ 7.2.3 ตั้งค่าพารามิเตอร์ตามที่โปรแกรมกำหนด เพื่อให้โปรแกรมเลือกตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ดีที่สุด ไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้จะถูกสังเคราะห์โดยบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) สำหรับใช้ในการตรวจสอบยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs จากจีโนมของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสต่อไป

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs จากจีโนมของเชื้อ L. borgpetersenii ซีโรวาร์ Sejroe โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสกับจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อ *L. borgpeterseni* ซีโรวาร์ Sejroe และจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อไม่ก่อโรค *L. biflexa* ซีโรวาร์ Patoc ที่สกัดตามวิธีที่ได้รายงานโดย Nitipan, *et al*. [17] และโดย Hniman and Prapong [12] ด้วยไพร์เมอร์ที่ออกแบบดังอธิบายข้างต้น ส่วนประกอบใน PCR reaction ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10 พิโคโมล ของไพรเมอร์แต่ละชนิด 0.8 มิลลิโมลาร์ ของ deoxynucleotid triphosphates (dNTPs) 1.5 มิลลิโมลาร์ ของ $MgCl_2$ และ 1U platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) ภายใต้อุณหภูมิดังนี้ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที แล้วตามปฏิกิริยาแบบทัชดาวน์ เริ่มจาก 95 องศาเซลเซียส เวลา 45 วินาที 55 องศาเซลเซียส เวลา 40 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เวลา 40 วินาที จนรอบที่ annealing เหลือ 52 องศาเซลเซียส เป็นจำนวน 15 รอบ โดยคงอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนอื่นไว้เช่นเดิม รอบสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส โดยการทำการเคลื่อนผ่านกระแสไฟฟ้าอิเลกโตรฟอร์เรซีสใน ร้อยละ 2 agarose gel ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่มีขนาดตามที่คาดหมายจะถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยชุด QIA-quick PCR Purification kit (QIAGEN, Germany) ก่อนส่งบริษัท Macrogen เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการตรวจสอบว่าเป็นยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs

การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs เข้าสู่ pCR8/GW/TOPO เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่มีความยาวมากที่สุดและได้รับการคาดหมายว่าเป็นยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs ถูกนำมาเชื่อมต่อกับ พลาสมิด pCR8/GW/TOPO ด้วยวิธี TA cloning ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัท Invitrogen โดยมีรายละเอียดโดยย่อดังนี้ ผสม PCR products 1 ไมโครกรัม พลาสมิด pCR8/GW/TOPO 1 ไมโครกรัม และ salt solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด PCR ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที นำพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับผลผลิต PCR นำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน One shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, USA) และเติมอาหาร S.O.C me-

dium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เมื่อครบเวลานำแบคทีเรียที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืนจึงได้โคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271

การวิเคราะห์ยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs ของเชื้อ L. borgpeterseni ซีโรวาร์ Sejroe ในพลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 ด้วยโปรแกรมไบโออินฟอร์เมติกส์

สกัดพลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 ที่เพิ่มจำนวนในแบคทีเรียเจ้าบ้านด้วยชุดทำบริสุทธิ์ Plasmid purification kit (QIAGEN, Germany) ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนเข้าสู่พลาสมิดโดยใช้ Universal primers ของพลาสมิด ส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอถูกตรวจสอบความเหมือนกับยีน LBJ_2271 โดยการใช้โปรแกรม Blast suite-2 sequences จาก NCBI เซอร์ฟเวอร์ (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อตรวจสอบร้อยละความเหมือนของยีน ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอถูกตรวจสอบซ้ำด้วยโปรแกรม DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) บน NCBI เซอร์ฟเวอร์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอถูกทำนายแปลงเป็นลำดับอะมิโนของสายโปรตีนด้วยโปรแกรม Translate ใน EXPASY เซอร์ฟเวอร์คุณสมบัติของสายโปรตีนที่แปลงได้ถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมไบโออินฟอร์เมติกส์ ด้วยชุดโปรแกรม InterProScan ประกอบด้วยโปรแกรม Smart (LRR) TMPred (Transmembran domain) SignalP (Signal peptide) และ NetNGlyc (N-glycosylation site) ซึ่งมีอยู่ใน EXPASY เซอร์ฟเวอร์

ผลการศึกษา

ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs ในจีโนมของเชื้อ L. borgpetersenii ซีโรวาร์ Sejroe โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจากไพรเมอร์จำเพาะที่ทำดูกออกแบบ

ผลจากการทำ multiple sequence alignment พบว่ายีน *LBJ_2271* ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis สายพันธุ์ JB197 มีร้อยละความเหมือนกันเท่ากับ 100 กับยีน LBL_0836 ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis สายพันธุ์ L550 ตามที่มีรายงานโดย Nitipan, *et al*. (2013) ดังนั้นโปรแกรม MacVecter™ 7.2.3 ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ตำแหน่งบริเวณอนุรักษ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *LBJ_2271* ได้ไพรเมอร์จำเพาะหลายคู่ แต่คัดเลือกไพรเมอร์จำเพาะมาเพียงสองคู่คือ คู่ไพรเมอร์ F2271_1 กับ ไพรเมอร์ B2271_1 และคู่ไพรเมอร์ F2271_2 และไพรเมอร์ B2271_2 (**Figure 1**) มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส กับจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์

Figure 1. The 648 Nucleotides of *LBJ_2271* Gene[a]

```
1    ATGAATTTTCCGTTATTAAAGGAATTTCTTGTGATTGGCTTCGTTTGTTTTACTGCGAGT
61   C TTCAACTGTAAAAAGAATGCGGAAGAGATTTTGGGAGAGGCAAAGGCAAAACCGGAATTG
121  GTTCAAACTTTGGATTTTGGAATGCAGAAGTTGTCCACGGTTCCGGAAGGAGTTTGCGGT
181  TTTCCGAATTTAACCAAGTTGGATCTTCGTTTAAACAGTTTGACTTTTCTTCCGGAATTT
241  CGATCGGAGAATGTAAACGCCTTGAACAACTTAATCTTTTCGGGAACGACCTTACGACATTT
301  CCGTCTACGTTTTCTAAATTAAAAAATCTGAAAGTGTTACTGGCGGGAAATAACGATTTTA
361  GCGATTCTACCTTCCGAACTTTTGTTTCTTCCATTGATCAAAATTTTATACGTAGATCGGA
421  TATAAATTAATTCTAACGGAAACGGATGTGGAAATTCTCGCTTCTCTTTCCTCCTTGGAGG
481  AATTGGATCTGAGTCTGAATTCGGGGATTAAGGCGCTTCCTTTTAATTACGAAAAACTTG
541  TGAATCTCATTAATTTAAAAAGATTGAATATTAAAAAAACATCATTAAAGGGAGAGGATG
601  CAGATAAATTGCAGGCGATTCTTCCAAATACCAAAATCGACTACTGA
```

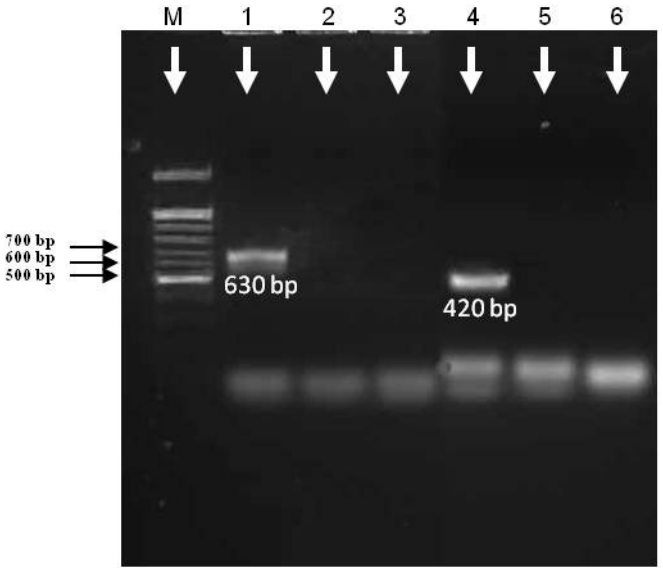
[a](Accession number ABJ76745), primer regions; dash right-arrow as F2271_1 and dash left-arrow as B2271_1, bold right-arrow as F2271_2 and bold left-arrow as B2271_2

Sejroe ให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดเช่นเดียวกับขนาดที่ทำนายได้คือ 630 คู่เบส และ 420 คู่เบส ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์จำเพาะทั้งสองคู่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส กับจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อไม่ก่อโรค *L. biflexa* ซีโรวาร์ Patoc ไม่ปรากฏผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ทั้งสองคู่ (**Figure 2**) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอผลผลิต PCR ขนาด 630 คู่เบส และ 420 คู่เบส ที่ได้รับการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้นด้วยไพรเมอร์ B2271_2 ตรวจสอบพบว่าผลผลิต PCR ทั้งสองขนาด มีลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้นจัดเป็นยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

พลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 ที่โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs จากเชื้อ L. borgpetersenii ซีโรวาร์ Sejroe เข้าสู่ pCR8/GW/TOPO

โคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 ที่มีพลาสมิดลูกผสม ที่เก็บจากอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ได้รับการตรวจสอบการว่ามีพลาสมิดลูกผสมของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต PCR ที่คาดหมายว่ายีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs เชื่อมต่ออยู่ เมื่อสกัดพลาสมิดแล้วทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสกับไพร์เมอร์คู่ผสมระหว่าง Universal primers ของพลาสมิดและไพร์เมอร์จำเพาะที่ออกแบบมาแล้วจะปรากฏผลผลิต PCR ขนาดใหญ่กว่า 630 คู่เบส แสดงว่าโคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 นั้นมีพลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 ที่เหมาะต่อการศึกษาต่อไป โดยเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 จากนั้นแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์เพื่อส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน putative leucine-

Figure 2. The 2% Agarose Gel Electrophoresis of Amplified from *L. borgpetersenii* Serovars Sejroe[a]



[a]Lane assignments: *L. borgpetersenii* serovars Sejroe (lanes 1 and 4), *L. biflexa* serovar Patoc I with F2271-1 and B2271-1 primers (lanes 1-3), and F2217-2 and B2271-2 primers (lanes 4-6) (Lane M was molecular weight marker, and lanes 3 and 6 were negative control.)

rich repeat LBJ_2271 orthologs ของเชื้อ *L. borgpeterseni* ซีโรวาร์ Sejroe อย่างละเอียดโดยใช้ Universal primers ของพลาสมิด ปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs มีความเหมือน (identity) เป็นร้อยละ 98 เมื่อตรวจสอบเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LBJ_2271 ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis สายพันธุ์ JB197 (**Figure 3**) ดังนั้น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในพลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 จึงมียีน KU_SEJ_R21_2271 เป็นยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 ortholog ที่พบใน *L. borgpeterseni* ซีโรวาร์ Sejroe คณะผู้วิจัยได้รายงานยีน KU_SEJ_R21_2271 ไว้บนฐานข้อมูล GenBank มีเลข accession เป็น JX522460

วิเคราะห์ยีน KU_SEJ_R21_2271 และโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 ของเชื้อ L. borgpeterseni ซีโรวาร์ Sejroe ด้วยโปรแกรมไบโออินฟอร์เมติกส์

ใช้โปรแกรม Blast suite-2 sequences จาก NCBI เซอร์ฟเวอร์ เพื่อตรวจสอบร้อยละความเหมือนของยีน (percent homology identity) ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายของยีน KU_SEJ_R21_2271 ถูกตรวจสอบซ้ำด้วยโปรแกรม DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) ณ NCBI เซอร์ฟเวอร์ ให้ผลดังแสดงใน **Figure 3** เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

Figure 3. The Multiple Sequence Alignment of LBJ_2271[a]

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment


LBJ_2271_Hardjo-bovis      ATGAATTTTCCGTTATTAAAGGAATTTCTTGTGATTGGCTTCGTTTGTTT 50
R21-2271_Sejroe_           ATGAATTTTCCGTTATTAAAGGAATTTCTTGTGATTGGCTTCGTTTGTTT 50
                           **************************************************

LBJ_2271_Hardjo-bovis      TACTGCGAGTTTCAACTGTAAAAAGAATGCGGAAGAGATTTTGGGAGAGG 100
R21-2271_Sejroe_           TACTGCGAGTTTCGACTGTAAAAAGAATGCGGAAGAGATTTTGGGAGAGG 100
                           ************* ***********************************

LBJ_2271_Hardjo-bovis      CAAAGGCAAAACCGGAATTGGTTCAAACTTTGGATTTTGGAATGCAGAAG 150
R21-2271_Sejroe_           CAAAGGCAAAACCGGAATTGGTTCAAACTTTGGATTTTGGAATGCAGAAG 150
                           **************************************************

LBJ_2271_Hardjo-bovis      TTGTCCACGGTTCCGGAAGGAGTTTGCGGTTTTCCGAATTTAACCAAGTT 200
R21-2271_Sejroe_           TTGTCCACGGTTCCGGAAGAAGTTTGCGGTTTTCCGAATTTAACCAAGTT 200
                           ******************* ****************************

LBJ_2271_Hardjo-bovis      GGATCTTCGTTTAAACAGTTTGACTTTTCTTCCGGAATTTATCGGAGAAT 250
R21-2271_Sejroe_           GGATCTTCGTTTAAACAGTTTGACTTTTCTTCCGGAATTTATCGGAGAAT 250
                           **************************************************

LBJ_2271_Hardjo-bovis      GTAAACGCCTTGAACAACTTAATCTTTTCGGGAACGACCTTACGACATTT 300
R21-2271_Sejroe_           GTAAACGCCTTGAACAACTTAATCTTTTCGGGAACGACCTTACAACATTT 300
                           ****************************************** ******

LBJ_2271_Hardjo-bovis      CCGTCTACGTTTTCTAAATTAAAAAATCTGAAAGTGTTACTGGCGGGAAA 350
R21-2271_Sejroe_           CCGTCTACGTTTTCTAAATTAAAAAATCTGAAAGTGTTACTGGCGGGAAA 350
                           **************************************************

LBJ_2271_Hardjo-bovis      TAACGATTTTACGATTCTACCTTCCGAACTTTTGTTTCTTCCATTGATCA 400
R21-2271_Sejroe_           TAACGATTTTACGATTCTACCCTCCGAACTTTTGTTTCTTCCGTTGATCA 400
                           ********************* ******************** *******

LBJ_2271_Hardjo-bovis      AAATTTTATACGTAGATCGGAATAAATTAATTCTAACGGAAACGGATGTG 450
R21-2271_Sejroe_           AAATTCTATACGTAGATCGGAATAAATTAACTCTAACGGAAACGGATGTG 450
                           ***** ************************ *******************

LBJ_2271_Hardjo-bovis      GAAATTCTCGCTTCTCTTTCCTCCTTGGAGGAATTGGATCTGAGTCTGAA 500
R21-2271_Sejroe_           GAAATTCTCGCTTCTCTTTCCTCCTTGGAGGAATTGGATCTGAGTCTGAA 500
                           **************************************************

LBJ_2271_Hardjo-bovis      TTCGGGGATTAAGGCGCTTCCTTTTAATTACGAAAAACTTGTGAATCTCA 550
R21-2271_Sejroe_           TTCGGGGATTAAGGCGCTCCCTTTTAATTACGAAAAACTTGTAAATCTCA 550
                           ****************** ********************** *******

LBJ_2271_Hardjo-bovis      TTAATTTAAAAAGATTGAATATTAAAAAAACATCATTAAAGGGAGAGGAT 600
R21-2271_Sejroe_           TTAATCTAAAAAGATTGAATATTAAAAAAACTTCATTAAAGGGAGAGGAT 600
                           ***** ************************ ******************

LBJ_2271_Hardjo-bovis      GCAGATAAATTGCAGGCGATTCTTCCAAATACCAAAATCGACTACTGA 648
R21-2271_Sejroe_           GCAGATAAATTGCAGGCGATTCTTCCAAATACCAAAATCGACTACTGA 648
                           ************************************************
```

[a](GenBank Accession No.: ABJ76745) of *L. borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis strain JB197 and KU_SEJ_R21_2271 gene (R21_2271_Sejroe) of *L. borgpetersenii* serovar Sejroe (GenBank Accession No.: JX522460)

KU_SEJ_R21_2271 ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe กับ ยีน LBJ-2271 ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis พบว่ามีร้อยละความเหมือนกัน 98 ผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน KU_SEJ_R21_2271 ให้เป็นลำดับอะมิโนของสายโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 ด้วยโปรแกรม Translate ใน EXPASY เซอร์ฟเวอร์ พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 เมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีน LRR_LBJ_2271 ของยีน *LBJ_2271* ในเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis มีร้อยละความเหมือนลำดับกรดอะมิโนถึงเท่ากับ 98.5 ดังแสดงใน **Figure 4**

วิเคราะห์คุณสมบัติของสายโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 ที่แปลงได้ด้วยโปรแกรมทางไบโออินฟอร์เมติกส์ ด้วยชุดโปรแกรม InterProScan ประกอบด้วยโปรแกรม Smart (LRR) TMPred (Transmembran domain) SignalP (Signal peptide) และ NetNGlyc (N-glycosylation site) ซึ่งมีอยู่ใน EXPASY เซอร์ฟเวอร์ผลการวิเคราะห์แสดงใน Figure 4 คือโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 มีความยาว 215 กรดอะมิโน มีตำแหน่ง LRR motifs จำนวน 4 แห่ง คือ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 61-84 85-106 107-130 และ 156-177 โปรตีนมีบริเวณเป็นตำแหน่งของ transmembrane domains สองตำแหน่ง คือ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 4-24 และ 120-138 และพบส่วนของ signal peptide ณ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1-20 แสดงว่าโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ และพบตำแหน่งสำหรับ N-glycosylation ณ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 63-66 ของโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 (**Figure 4**) ผลการวิเคราะห์ลำดับอะมิโนใน LRR motifs 4 ตำแหน่ง สรุปได้ว่ารูปแบบของ LRR motif ของโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 จัดอยู่ในกลุ่ม LRR typical subfamily เป็นแบบ LXXLXLXXNXL

Figure 4. The Multiple Sequence Alignment of KU_SEJ_LRR _2271 (R21_2271) Protein[a]

[a]The multiple sequence alignment of KU_SEJ_LRR _2271 (R21_2271) protein of *L. borgpetersenii* serovar Sejroe with LBJ_2271 protein of *L. borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis strain JB197, showed four LRR motifs, N-glycosylate site TM domains and Signal peptide sequence.

วิจารณ์

ไพรเมอร์จำเพาะสองคู่คือ คู่ไพรเมอร์ F2271_1 กับ ไพรเมอร์ B2271_1 และคู่ไพรเมอร์ F2271_2 และ ไพรเมอร์ B2271_2 ซึ่งออกแบบจากตำแหน่งบริเวณอนุรักษ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (conserve region) ของยีน LBJ_2271 (ABJ76745) ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis สายพันธ์ JBL197 สามารถสร้างชิ้นดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่มีขนาดเช่นเดียวกับขนาดที่ทำนายได้คือ 630 คู่เบส และ 420 คู่เบส จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) กับจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อ *L. borgpeterseni* ซีโรวาร์ Sejroe แต่ไม่ปรากฏผลผลิต PCR จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสด้วยไพรเมอร์ทั้งสองคู่กับจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อไม่ก่อโรค *L. biflexa* ซีโรวาร์ Patoc เมื่อโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอผลผลิต PCR ที่มีขนาด 630 คู่เบส ได้พลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 แล้วทำการตรวจสอบวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน putative leucine-rich repeat LBJ_2271 orthologs ในพลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 ปรากฏของร้อยละความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเท่ากับ 98 เมื่อตรวจสอบเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LBJ_2271 ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis สายพันธุ์ JB197 ดังนั้นพลาสมิดลูกผสม KU-pCR8-R21_2271 จึงมียีน KU_SEJ_R21_2271 เป็นยีน Leucine-rich repeat LBJ_2271 ortholog ที่พบใน *L. borgpeterseni* ซีโรวาร์ Sejroe ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค แต่ไม่พบในสายพันธุ์ไม่ก่อโรค เช่น *L. biflexa* ซีโรวาร์ Patoc จึงคาดหวังได้ว่ายีน KU_SEJ_R21_2271 มีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคเหมือนกับยีนอื่น ๆ เช่น ยีน *LigA* [18, 19] นอกจาก KU_SEJ_2271 จะมีคุณสมบัติความอนุรักษ์ยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายพันธุ์ก่อโรคแล้วโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 ซึ่งเป็นสายโปรตีนที่แปลงได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *KU_SEJ_R21_2271* ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe ยังถูกทำนายด้วยโปรแกรมไบโออินฟอร์เมติกส์ว่าเป็นโปรตีนบริเวณผิวเซลล์ มีการทำนายพบ signal peptide บริเวณปลาย N-terminal ของโปรตีน พบ transmembrane domain และพบตำแหน่ง N-glycosylation (Figure 4) รูปแบบ LRR motif ของโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 พบว่ามีรูปแบบเป็น LXXLXLXXNXL จัดอยู่ใน LRR typical subfamily ซึ่งผลการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนกับรายงานของโปรตีนจากยีน LBJ_2271 [16] รวมทั้งการมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับของโปรตีน LRR_LBJ_2271 ในเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis ถึงร้อยละ 98.5 จึงทำให้สรุปได้ว่ายีน KU_SEJ_R21_2271 ในจีโนมของ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe เป็นยีน Leucine-rich repeat LBJ_2271 ortholog ของเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo-bovis กำหนดการสร้างโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 ซึ่งจะแสดงคุณสมบัติในลักษณะเดียวกับโปรตีน LRR_LBJ_2271 ตามที่ได้รับการทำนายไว้ [16]

การที่รูปแบบ LRR motif ของโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 มีรูปแบบเป็น LXXLXLXXNXL จัดอยู่ใน LRR typical subfamily ซึ่งเป็นรูปแบบคล้ายคลึงพบในโปรตีนทำหน้าที่เป็นโปรตีนบนผิว

เซลล์บางชนิด เช่น โปรตีน GPIBA (glycoprotein Iba) [20] โปรตีน NOGO (Neurite outgrowth inhibitor) [21] โปรตีน DCN (decorin) [22] โปรตีน LINGO1 (Leucine rich repeat and Ig domain containing 1) [23] โปรตีน VLRA29 (variable lymphocyte receptor) [24] และ โปรตีน LRR_LBJ_2271 [16] โดยเฉพาะโปรตีน LRR_LBJ_2271 ได้รับการทำนายโดยโปรแกรมไบโออินฟอร์เมติกส์ ว่ามีอย่างน้อย 5 ตำแหน่งบนสายโปรตีนที่มีคุณสมบัติดีเยี่ยมที่จะแสดงศักยภาพในการเป็นแอนติเจน [16]

จากการศึกษาพบยีน KU_SEJ_R21_2271 ในจีโนมของ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Sejroe เป็นยีน Leucine-rich repeat LBJ_2271 ortholog ซึ่งเป็นยีนของ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjobovis ยีน KU_SEJ_R21_2271 กำหนดการสร้างโปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 ซึ่งจะแสดงคุณสมบัติในลักษณะเดียวกับโปรตีน LRR_LBJ_2271 ตามที่ได้รับการทำนายไว้ การศึกษายีน KU_SEJ_R21_2271 และ โปรตีน KU_SEJ_LRR_2271 ต่อไป จึงจะเป็นประโยชน์ต่อการหาทางป้องกันโรคฉี่หนูในสายพันธุ์ก่อโรคในประเทศไทย ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาต่อยอดพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรซีสสำหรับปศุสัตว์ในประเทศไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่สนับสนุนทุนศึกษาต่อระดับปริญญาเอกแก่ นายศุภชัย นิติพันธ์ และขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา เลขที่ทุน ภค./๒๕๕๓-พอ๘ แก่นายศุภชัย นิติพันธ์ ขอขอบคุณสาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ที่สนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนแก่ นายศุภชัย นิติพันธ์ และนางสาวจิติพร ประชุมวรรณ์ ขอขอบคุณภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Peters JW, Stowel MH, Rees DC. A leucine-rich repeat variant with a novel repetitive protein structural motif. *Nat Struct Biol*. 1996;3:1181-1187.
2. Gaillard J L, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell.* 1991;65:1127-1141.
3. Lingnau A, Domann E, Hudel M, Bock M, Nichterlein T, Wehland J, et al. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun.* 1995;63:3896-3903.
4. Lecuit M, Ohayon H, Braun L, Mengaud J, Cossart P. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun.* 1997;65:5309-5319.
5. Braun L, Ohayon H, Cossart P. The InIB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol.* 1998;27:1077-1087.

6. Parida S K, Domann E, Rohde M, Muller S, Darji A, Hain T, et al. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol.* 1998;28:81-93.

7. Sabet C, Lecuit M, Cabanes D, Cossart P. LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun.* 2005;73:6912-22.

8. McDonald C, Vacratsis PO, Bliska JB, Dixon JE. The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem.* 2003;278:18514-18523.

9. Ye Z, Kerschen EJ, Cohen DA, Kaplan AM, Rooijen N, Straley SC. Gr1 cells control growth of YopM-negative Yersinia pestis during systemic plague. *Infect Immun.* 2009;77:3791-3806.

10. Bulach DM, Zuerner RL,Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, et al. Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:14560-14565.

11. Seepersaud R, Hanniffy SB, Mayne P, Sizer P, Page RL, Wells JM. Characterization of a novel leucine rich repeat protein antigen from group B Streptococci that elicits protective immunity. *Infect Immun.* 2005;73:1671-1683.

12. Hniman A, Prapong S. Development of leptospira molecular markers by using bioinformation from predicted Leucine-Rich Repeat (LRR) protein genes. *J Thai Vet Med Assoc*. 2007;58:65-78.

13. Hinjoy S. *The survey of serological conditions and maintenance host of Leptospirosis in cattle around the outbreak area of human leptospirosis at Kumuang district, Burirum province*. M.S. thesis, Chulalongkorn University. Bangkok. 2001.

14. Prapong S, Suwanchareon D, Tohmee N. Genotyping survey the leptospira in bovine urine samples in Thailand by PCR-based methos: a non matching with the antibody titer by MAT, in:Thanawongnuwechoje, R. (Ed.), *The 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology*. The Thai Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Chulalongkorn University, Sofitel Central Plaza, Bangkok, Thailand. 2003a; pp. O 33-O 34.

15. Prapong S, Suwanchareon D, Tohmee N. PCR-Based and MAT combination methods for identifying leptospira reservoir cows. *The proceeding of 41st Kasetsart University Annual Conference*. ISBN 974-537-241-2. 2003b; pp. 668-677.

16. Nitipan S, Sritrakul T, Kunjantarachot A, Prapong S. Identification of epitopes in *Leptospira borgpetersenii* leucine-rich repeat protein. *Infec Genet Evol*. 2013;14:46-57.

17. Nitipan S, Khunthong S, Suwanchareon D, Prapong S. Molecular Markers from *LipL36* Gene and IS*1533* for Identifying Leptospires by Technique Polymerase Chain Reaction. *J Thai Vet Med Assoc.* 2005;56:11-22.

18. PalaniappanYF, Chang S, Jusuf SD, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, et al. Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans. Infect Immun.* 2002;70:5924-5930.

19. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, et al. Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol.* 2003; 49: 929-946.

20. Uff S, Clemetson JM, Harrison T, Clemetson KJ, Emsley J. Crystal structure of the platelet glycoprotein Iba

N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation. *J Biol Chem.* 2002;277:35657-35663.

21. Barton WA, Liu BP, Tzvetkova D, Jeffrey PD, Fournier AE, Sah D, et al. Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *EMBO J.* 2003;22:3291-3302.
22. Scott PG, McEwan PA, Dodd CM, Bergmann EM, Bishop PN, Bella J. Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine rich repeat proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2004;101:15633-15638.
23. Mosyak L, Wood A, Dwyer B, Buddha M, Johnson M, Aulabaugh A, et al. The structure of the Lingo-1 ectodomain, a module implicated in central nervous system repair inhibition. *J Biol Chem.* 2006;281:36378-36390.
24. Kim HM, Oh SC, Lim KJ, Kasamatsu J, Heo JY, Park BS, et al. Structural diversity of the hagfish variable lymphocyte receptors. *J Biol Chem.* 2007;282:6726-6732.