การโคลนและผลิตคอลลาจีเนสของเชื้อเลปโตสไปราสำหรับการศึกษาความเป็นเอ็นไซม์
และปฏิกิริยาอิมมูโน

นางสาววีณา เจนวิทยานันท์

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Leptospira collagenase gene cloning and protein production for enzymatic activity and immunoreactivity study

Miss Weena Janwitthayanan

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2015
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนและผลิตคอลลาจีเนสของเชื้อเลปโตสไปรา สำหรับการศึกษาความเป็นเอ็นไซม์และปฏิกิริยาอิมมูโน
โดย	นางสาววีณา เจนวิทยานันท์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปัทมา เอกโพธิ์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วีณา เจนวิทยานันท์ : การโคลนและผลิตคอลลาจีเนสของเชื้อเลปโตสไปราสำหรับการศึกษาความเป็นเอ็นไซม์และปฏิกิริยาอิมมูโน (*Leptospira* collagenase gene cloning and protein production for enzymatic activity and immunoreactivity study) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.จินตนา จิรถาวร, หน้า.

โรคเลปโตสไปโรซิสเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในจีนัสเลปโตสไปรา อาการของผู้ป่วยแสดงออกได้หลากหลาย บางรายอาจมีอาการรุนแรงเกี่ยวข้องกับอวัยวะหลายระบบและเสียชีวิตได้ กลไกการก่อโรคเลปโตสไปโรซิสยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด Ren และคณะ รายงานการศึกษาจีโนมของเชื้อเลปโตสไปราก่อโรคในปี ค.ศ. 2003 พบว่าเลปโตสไปรามีลำดับนิวคลีโอไทด์ LA0872 (*colA* gene) ที่น่าจะเป็นยีนสำหรับคอลลาจีเนส มีรายงานว่าคอลลาจีเนสเป็นเอ็นไซม์ที่พบว่ามีความสำคัญสำหรับเชื้อ *Clostridium histolyticum* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในการก่อพยาธิสภาพ และพบการแสดงออกของยีน *colA* ในสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา ผู้วิจัยจึงสนใจการโคลนยีนและเตรียมโปรตีน ColA และพบว่าเลปโตสไปราก่อโรคที่นำมาศึกษาทุก ซีโรวาร์มียีน *colA* จึงเลือกใช้ดีเอ็นเอของ *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes เป็นต้นแบบในการโคลนยีนและสร้างโปรตีน ColA โดยสามารถสร้างพลาสมิด pColA ที่นำมาใช้ในการผลิตโปรตีน ColA ได้ โปรตีน ColA ที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปราและซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมจากผู้ป่วยสครับไทฟัส ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต จากผลการทดสอบที่ได้สรุปได้ว่าโปรตีน ColA มีความไวและความจำเพาะสำหรับใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเลปโตสไปรา 100% และเมื่อทดสอบความเป็นเอ็นไซม์โดยทดสอบการย่อยคอลลาเจน พบว่าโปรตีน ColA ย่อยคอลลาเจนได้ และความสามารถในการย่อยคอลลาเจนถูกยับยั้งได้ด้วยสารยับยั้งคอลลาจีเนส

การศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าสามารถโคลนยีนและสร้างพลาสมิด pColA ที่นำมาใช้ผลิตโปรตีน ColA ได้ ผลการทดสอบโปรตีน ColA ที่ได้พบว่ามีคุณสมบัติเป็นคอลลาจีเนสและทำปฏิกิริยากับซีรัมเลปโตสไปโรซิสได้ ซึ่งสนับสนุนว่าโปรตีนนี้น่าสนใจที่จะนำไปใช้ศึกษากลไกการก่อพยาธิสภาพและพัฒนาการทดสอบเพื่อช่วยวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา 2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....

5574212830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS: LEPTOSPIROSIS / LEPTOSPIRA / COLLAGENASE

WEENA JANWITTHAYANAN: *Leptospira* collagenase gene cloning and protein production for enzymatic activity and immunoreactivity study. ADVISOR: ASSOC. PROF. CHINTANA CHIRATHAWORN, Ph.D., pp.

Leptospirosis is caused by bacteria in genus *Leptospira*. Leptospirosis patients present with a wide range of clinical manifestations. Some patients develop severe symptoms involving multiple organs which can be fatal. Mechanisms underlying leptospirosis are not clearly understood. *Leptospira* whole genome reported by Ren et al in 2003 suggested that LA0872 (*colA* gene) contains the nucleotide sequence coding for a collagenase. Collagenases of other bacteria such as *Clostridium histolyticum* and *Pseudomonas aeruginosa*e are involved in tissue damages. *Leptospira colA* gene was expressed in tissues of hamsters infected with *Leptospira*. In this study, *colA* gene and its gene product were investigated. All pathogenic *Leptospira* serovars tested in this study have *colA* gene. DNA from *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes was chosen for *colA* gene cloning. A plasmid containing *colA* gene (pColA) was constructed and ColA protein was produced. ColA protein could react with sera from *Leptospira*-infected hamsters and leptospirosis patients. However, sera from blood donors, patients with scrub typhus and dengue virus infection did not react with ColA protein. Data suggested that sensitivity and specificity of ColA protein for *Leptospira* antibody detection were 100%. ColA protein could hydrolyze collagen and its enzymatic activity was inhibited by a collagenase inhibitor.

In conclusion, cloning and protein production of *colA* gene were done. ColA protein has enzymatic activity and immunogenicity. These suggest that ColA protein is an interesting *Leptospira* protein for further study of its role in pathogenesis and laboratory diagnosis.

Field of Study: Medical Science Student's Signature ....

Academic Year: 2015 Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา จิรถาวร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่ง ซึ่งให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และความกรุณาในการช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธมงคล ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส และซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส ที่นำมาใช้ในการทดสอบ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ที่นำมาใช้ในการทดสอบ

ขอขอบพระคุณสภากาชาดไทย ที่กรุณาช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคเลือด

ขอขอบพระคุณสัตวแพทย์หญิงดวงใจ สุวรรณ์เจริญ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่กรุณาให้เชื้อเลปโตสไปราทั้ง 24 ซีโรวาร์เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ทุกท่านและเพื่อนนิสิตปริญญาโททุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำตลอดจนกำลังใจในการเขียนวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณมูลนิธิกระจกอาซาฮี (The Asahi Glass Foundation) และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัวของผู้วิจัย ที่ให้ความสนับสนุนและแรงผลักดันเพื่อให้ผู้วิจัยได้ทำการวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง .... ฌ

สารบัญรูปภาพ .... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ....ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.... 4

2.1 โรคเลปโตสไปโรซิส 4

2.2 ประวัติของโรคเลปโตสไปโรซิส.... 6

2.3 การจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา 7

2.4 อาการทางคลินิก 12

2.5 การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส.... 13

2.6 ส่วนประกอบของเชื้อเลปโตสไปรา.... 20

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย 31

3.1 เชื้อเลปโตสไปราและตัวอย่างซีรัม.... 31

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ 33

3.3 การตรวจหายีน 16S rRNA และ *colA* (LA0872) ด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction).... 33

3.4 การโคลนยีน *colA* 35

3.5 การเตรียมโปรตีน ColA 43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.6 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา ... 46
3.7 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส ... 47
3.8 การศึกษาความสามารถของโปรตีน ColA ในการย่อยเจลาตินในหลอดทดลอง ... 49
บทที่ 4 ผลการศึกษา ... 51
4.1 การตรวจสอบยีน 16S rRNA และ *colA* ของเชื้อเลปโตสไปรา ... 51
4.2 การโคลนยีน *colA* ... 54
4.3 การแสดงออกของโปรตีน ColA ... 60
4.4 ปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา ... 63
4.5 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส ... 66
4.6 การศึกษาความสามารถของ โปรตีน ColA ในการย่อยเจลาตินในหลอดทดลอง ... 74
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง ... 77
รายการอ้างอิง ... 81
ภาคผนวก ... 104
ภาคผนวก ก ... 105
ภาคผนวก ข ... 109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ... 122

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1: แสดงการจัดกลุ่มซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ของเชื้อ *L. interrogans* โดยใช้หลักการทางซีรัมวิทยา 9

ตารางที่ 2: แสดงการจัดกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมและทางซีรัมวิทยา 10

ตารางที่ 3: แสดงสปีชีส์ของเชื้อเลปโตสไปราที่พบในปัจจุบัน 11

ตารางที่ 4: รายชื่อเชื้อเลปโตสไปรา 24 ซีโรวาร์ 32

ตารางที่ 5: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา 42

ตารางที่ 6: ค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *colA* ใน pColA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank 59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1: แสดงการติดต่อของโรคเลปโตสไปโรซิส 5

รูปที่ 2: แสดงการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสที่ระยะเวลาต่างๆ 19

รูปที่ 3: แสดงบริเวณผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อเลปโตสไปรา 27

รูปที่ 4: แสดงผลการตรวจหา 16S rRNA ของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี PCR 52

รูปที่ 5: แสดงผลการตรวจหายีน *colA* ของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี PCR 53

รูปที่ 6: แสดงผลการตรวจหายีน *colA* ของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes 56

รูปที่ 7: แสดงผลการตรวจหารีคอมบิแนนท์พลาสมิดในโคโลนี *E. coli* 57

รูปที่ 8: แสดงผลการตรวจหายีน *colA* ในพลาสมิด pColA 58

รูปที่ 9: แสดงผลการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างโปรตีน ColA 61

รูปที่ 10: แสดงผลการทดสอบโปรตีน ColA หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วย nickel-charged resin affinity column 62

รูปที่ 11: แสดงผลจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา 64

รูปที่ 12: แสดงผลจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีน LipL32 กับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา 65

รูปที่ 13: การหาปริมาณโปรตีนและการเจือจางซีรัมที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับโปรตีน ColA และ LipL32 67

รูปที่ 14: การทำปฏิกิริยาของ ColA และ โปรตีน LipL32 กับซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส 69

รูปที่ 15: การทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA และ โปรตีน LipL32 กับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส 71

รูปที่ 16: การทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA และ LipL32 กับซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ 72

รูปที่ 17: การทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA และ LipL32 กับซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต 73

รูปที่ 18: การศึกษาความสามารถของ โปรตีน ColA ในการย่อยเจลาติน 75

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 19: การศึกษาการยับยั้งความสามารถของ โปรตีน ColA ในการย่อยเจลาตินโดยตัวยับยั้งคอลลาจีเนส 76

รูปที่ 20: แสดงแผนที่พลาสมิด pET100/D-TOPO 118

รูปที่ 21: แสดงระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนและระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye 120

รูปที่ 22: กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า log MW และค่า Rf 121

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	คู่เบส (Base pair)
dATP	=	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine triphosphate
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxynucleotides triphospates
dTTP	=	Deoxythymidine triphosphate
ECL	=	Enhanced chemiluminescence
Ex/Em	=	Excitation/ Emission
HRP	=	Horseradish peroxidase
IgG	=	Immunoglobulin G
IgM	=	Immunoglobulin M
IPTG	=	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
Kb	=	กิโลเบส (Kilobase)
kDa	=	กิโลดาลตัน (Kilodalton)
LB	=	Luria bertani
LEW	=	Lysis-equilibration-wash buffer
Ni^{2+}	=	นิกเกิลไอออน
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	=	Tris-buffered saline

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

โรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis) เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonosis) ที่พบได้ทั่วโลก เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในจีนัสเลปโตสไปรา (*Leptospira*) สามารถพบเชื้อนี้ได้ในสัตว์หลายชนิดทั้งสัตว์ฟันแทะ สัตว์ป่า และสัตว์เลี้ยง เชื้อเลปโตสไปราจะถูกปล่อยออกมากับปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อและปนเปื้อนอยู่ตามน้ำ ดินทรายที่เปียกชื้น หรือพืชผัก เชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายคนหรือสัตว์โดยการไชเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังตามรอยแผลหรือรอยขีดข่วน เยื่อบุของปาก ตา จมูก หรือผิวหนังที่เปียกชุ่มเนื่องจากแช่น้ำอยู่นาน ผู้ป่วยที่ติดเชื้อเลปโตสไปราอาจจะไม่มีอาการหรือมีอาการที่ไม่รุนแรงตั้งแต่มีไข้ ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ จนถึงมีอาการที่รุนแรงซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับอวัยวะต่างๆ เช่น เกิดภาวะตับและไตล้มเหลว หรือมีอาการเลือดออกในปอด ซึ่งในรายที่มีอาการรุนแรงมากอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ นอกจากนี้อาการเริ่มแรกของโรคโดยทั่วไปจะคล้ายกับอาการของผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่นๆ ดังนั้นการตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นมากในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคเลปโตสไปโรซิส เนื่องจากการเพาะเชื้อเลปโตสไปราจากสิ่งส่งตรวจใช้เวลาอย่างน้อย 1-2 สัปดาห์จึงจะสามารถตรวจพบเชื้อได้ การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยวินิจฉัยโรคจึงนิยมตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ (1-4) ซึ่งในปัจจุบันงานวิจัยเพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเน้นการเลือกโปรตีนเพื่อนำมาใช้เป็นแอนติเจนที่มีความไว เพื่อช่วยวินิจฉัยโรคได้ตั้งแต่ระยะแรกๆของการติดเชื้อ และมีความจำเพาะในการวินิจฉัยแยกโรคที่มีอาการคล้ายคลึงกับโรคเลปโตสไปโรซิส

สำหรับวัคซีนที่ใช้ป้องกันโรคที่มีในปัจจุบันใช้ตัวเชื้อทั้งตัวที่ทำให้ตาย แต่ภูมิคุ้มกันจากวัคซีนเหล่านี้อยู่ได้ไม่นานและไม่สามารถป้องกันข้ามกลุ่มได้ (5) ถึงแม้จะมีรายงานการศึกษาส่วนประกอบของเชื้อที่น่าจะเป็นปัจจัยก่อโรค (virulence factors) มากมาย เช่น hemolysin (6-8), lipopolysaccharide (9), glycolipoprotein (10), peptidoglycan (11), heat shock proteins(12) , flagella (13, 14), lipoproteins (15, 16), the mammalian cell entry (Mce) protein (17) และ catalase KatE (18) แต่ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเชื้อเลปโตสไปราก่อโรคได้อย่างไร เหตุใดผู้ป่วยบางรายจึงไม่มีอาการรุนแรง ในขณะที่บางรายมีอาการเกี่ยวข้องกับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย CHULALONGKORN UNIVERSITY

อวัยวะต่างๆและถึงแก่ชีวิตได้ และส่วนประกอบส่วนใดของเชื้อที่เหมาะสมในการใช้เป็นวัคซีนและสามารถสร้างภูมิคุ้มกันข้ามกลุ่มได้ ส่วนประกอบของเลปโตสไปราที่ถูกเลือกมาศึกษามักจะเป็นส่วนประกอบที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ เช่น LipL32, Loa22, LipL41, LipL46, LipL21, LigA, LigB, OmpL1 และ FlaB เป็นต้น (19-26)

LipL32 เป็น lipoprotein ที่พบบนผนังเซลล์ชั้นนอกที่มีรายงานการศึกษามากทั้งในแง่การเป็นปัจจัยก่อโรค การพัฒนาเป็นวัคซีน การเป็นแอนติเจนสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีเพื่อช่วยวินิจฉัยโรค เนื่องจากเป็นส่วนประกอบที่พบในปริมาณมากมีการแสดงออกทั้งในหลอดทดลองและในคนและสัตว์ที่ได้รับเชื้อ สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยและสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อ (27-33) เมื่อนำ LipL32 จากเชื้อเลปโตสไปรามาใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบพบว่า LipL32 ให้ผลบวกปลอมเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ และผู้ป่วยเมลิออยโดสิส (34) อย่างไรก็ดี การใช้ LipL32 เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในช่วงสัปดาห์แรกหลังการติดเชื้อนั้นยังมีความไวในการตรวจค่อนข้างต่ำ (30) นอกจากนี้จากรายงานการศึกษาการก่อพยาธิสภาพโดยใช้เชื้อเลปโตสไปราที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *lipL32* พบว่าเชื้อที่ไม่สามารถสร้าง LipL32 ยังสามารถทำให้แฮมสเตอร์เกิดโรคได้ (35)

จากรายงานการศึกษาจีโนมของเชื้อเลปโตสไปรา พบว่าเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคมียีน *colA* (LA0872) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สนับสนุนว่าน่าจะเป็นยีนที่สร้างคอลลาจีเนส (36) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การที่เชื้อสร้างคอลลาจีเนสออกมา นอกจากจะช่วยย่อยเนื้อเยื่อเพื่อเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อแล้ว เอ็นไซม์นี้ยังอาจเกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อและการแพร่กระจายของเชื้อด้วย มีรายงานการศึกษาเอ็นไซม์คอลลาจีเนสที่พบในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น คอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* พบว่าเมื่อนำกระดาษกรองซึ่งมีคอลลาจีเนสติดอยู่มาวางบนผิวของปอดสุนัข สามารถกระตุ้นให้บริเวณนั้นเกิดภาวะเลือดออกเกิดขึ้น (37) และคอลลาจีเนสจาก *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าเมื่อทำการฉีดคอลลาจีเนสจากเชื้อดังกล่าวให้กับหนู สามารถกระตุ้นให้เกิดเลือดออกในปอดและในช่องท้องของหนูได้ (38) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาบทบาทของคอลลาจีเนสในการเป็นวัคซีนเพื่อใช้ในโรคเท้าช้าง (lymphatic filariasis) โดยฉีดคอลลาจีเนสจาก *Setaria cervi* ให้กับสัตว์ทดลอง เมื่อนำซีรัมจากสัตว์ทดลอง

มาตรวจสอบ พบว่าสัตว์ทดลองมีการสร้างแอนติบอดีต่อคอลลาจีเนสจาก *Setaria cervi* และผลจากวัคซีนสามารถลด parasite burden ได้ (39)

เนื่องจากเลปโตสไปราสามารถก่อพยาธิสภาพที่อวัยวะต่างๆ เช่น ไต ตับและทำให้เกิดภาวะเลือดออกในปอดได้ ยีน *colA* จึงเป็นยีนที่น่าสนใจว่าจะเป็นยีนที่สร้างคอลลาจีเนสที่มีบทบาทเกี่ยวกับการเกิดพยาธิสภาพของเลปโตสไปโรซิสหรือไม่ นอกจากนี้โปรตีนที่สร้างจากยีน *colA* สามารถนำมาศึกษาต่อยอดเพื่อการพัฒนาวัคซีนและการพัฒนาการตรวจทางห้องปฏิบัติการหากโปรตีนที่สร้างจากยีน *colA* สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของคนหรือสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา

ในการศึกษาวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาคอลลาจีเนสของเชื้อเลปโตสไปราโดยการโคลนยีน *colA* ผลิตโปรตีน ColA จากยีนที่โคลนได้ และนำมาศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน ColA โดยทดสอบความสามารถในการเป็นเอ็นไซม์ย่อยคอลลาเจน และทดสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสและซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเตรียมคอลลาจีเนสของเชื้อเลปโตสไปราโดยการโคลนและการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *colA* และศึกษาความสามารถของโปรตีน ColA ในการย่อยเจลาตินและการทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยและแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

สามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยนำโปรตีน ColA ที่ได้จากเลปโตสไปรานี้ใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเลปโตสไปราได้ และนำโปรตีนที่เตรียมได้ไปศึกษาต่อยอดในแง่ของบทบาทการก่อพยาธิสภาพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเลปโตสไปโรซิส

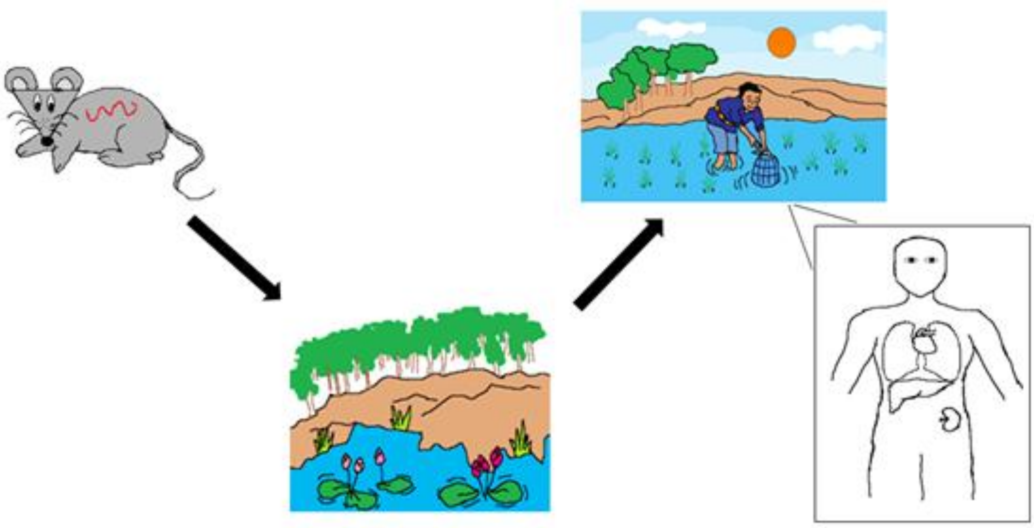
โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คน เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเลปโตสไปรา (*Leptospira*) เชื้อเลปโตสไปราเป็นแบคทีเรียชนิดสไปโรขีต (spirochete) มีลักษณะเป็นเส้นเกลียวบาง มีความกว้าง 0.1 ไมโครเมตร และยาว 6-20 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยการหมุน (spinning) หรือโค้งงอ (bending) โดยที่ปลายทั้ง 2 ด้านหรือด้านใดด้านหนึ่งจะโค้งงอเป็นตะขอ (hook) แต่อาจพบเชื้อที่เป็นเส้นตรงได้ เชื้อเลปโตสไปราเป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนเจริญได้ที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีขนาดที่บางมากจึงไม่สามารถดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาได้ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (dark field microscope) (1, 40-42)

เลปโตสไปโรซิสเป็นโรคที่มีความสำคัญเนื่องจากพบว่ามีการระบาดของโรคนี้ได้ทั่วไปและมีแนวโน้มการเกิดโรคเพิ่มขึ้นทั้งในประเทศที่กำลังพัฒนาและพัฒนาแล้ว มักจะเกิดในพื้นที่ที่มีเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้นโดยเฉพาะในเขตชนบท ประชากรที่มีความจำเป็นต้องสัมผัสกับดิน น้ำ ในการดำรงชีวิตจัดเป็นกลุ่มที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรา (3, 43) ซึ่งทั้งสัตว์ป่าและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดสามารถเป็นแหล่งรังโรค (reservoir) และนำเชื้อมาสู่คนได้ เช่น โค กระบือ ม้า แพะ แกะ สุนัข สุกรและหนู โดยเฉพาะหนูเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญ ซึ่งสัตว์ที่เป็นรังโรคอาจไม่แสดงอาการ แต่มีการติดเชื้อที่ท่อไตและสามารถปล่อยเชื้อออกมากับปัสสาวะได้เป็นเวลานานหลายสัปดาห์หลายเดือนหรืออาจนานตลอดชีวิตก็ได้ พบว่าเชื้อที่ถูกปล่อยออกมากับปัสสาวะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในดินที่ชื้นและในน้ำได้นานเป็นอาทิตย์หรือเป็นเดือน โดยจะพบเชื้ออยู่ในลักษณะรวมเป็นกลุ่ม (cell aggregation) (44) หรือมีลักษณะเป็น Biofilm (45) ซึ่งทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การติดต่อของโรคพบว่าเชื้อที่ถูกปล่อยออกมากับปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อจะปนเปื้อนอยู่ตามดิน น้ำ หรือพืชผัก โดยเชื้อสามารถไชเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังผ่านทางบาดแผลและรอยขีดข่วน เยื่อบุช่องปาก ตา จมูก และยังสามารถไชเข้าทางผิวหนังที่เปียกชุ่ม เนื่องจากแช่น้ำอยู่นาน

โดยมนุษย์มักจะติดเชื้อโดยทางอ้อมขณะที่ย่ำดินโคลน แช่ในน้ำท่วมหรือว่ายน้ำ หรืออาจติดโรคโดยตรงจากการสัมผัสกับปัสสาวะสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อ โดยคนที่เสี่ยงต่อการติดโรคสูงได้แก่ เกษตรกร ผู้เลี้ยงสัตว์ ชาวนา ชาวไร่ คนงานโรงงานฆ่าสัตว์ กรรมกรขุดลอกคูคลอง สัตวแพทย์ เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีโอกาสสัมผัสสัตว์หรือปัสสาวะสัตว์อยู่เสมอ (รูปที่ 1) (1-3, 42)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 1: แสดงการติดต่อของโรคเลปโตสไปโรซิส

การติดเชื้อเลปโตสไปราในคนอาจติดเชื้อโดยตรงจากการสัมผัสกับปัสสาวะที่มีเชื้อของสัตว์นำโรคหรือติดต่อทางอ้อมโดยเชื้อไชเข้าทางผิวหนังหรือเยื่อบุที่มีรอยแผล เมื่อมนุษย์ไปสัมผัสกับน้ำหรือดินที่ปนเปื้อนเชื้อจากปัสสาวะของสัตว์ เชื้อเลปโตสไปราสามารถแพร่ไปที่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆได้ เช่น ปอด ตับ ไต เป็นต้น แล้วส่งผลให้เกิดความผิดปกติที่อวัยวะเหล่านั้น

2.2 ประวัติของโรคเลปโตสไปโรซิส

โรคเลปโตสไปโรซิสถูกค้นพบและรายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1886 โดยนายแพทย์ชาวเยอรมันมีชื่อว่า Adolf Weil โดยพบว่าผู้ป่วยโรคนี้มักจะมีอาการม้ามโต ตัวเหลืองและอาการไตอักเสบ ก่อนหน้าการรายงานของ Adolf Weil เคยมีรายงานผู้ป่วยอาการคล้ายๆกันในคนที่ทำงานเกี่ยวกับท่อระบายน้ำทิ้ง ต่อมาในปี ค.ศ. 1907 Stimson เป็นคนแรกที่ได้รายงานพบเชื้อเลปโตสไปราเป็นครั้งแรก จากเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคไข้เหลือง (yellow fever) พบกลุ่มของเชื้อหลายตัวซึ่งมีขนาดยาวขดม้วนในหลอดไต จึงตั้งชื่อเชื้อดังกล่าวว่า *Spirochaeta interrogans* เนื่องจากเชื้อมีรูปร่างเป็นเส้นเกลียว ปลายขดงอเหมือนเครื่องหมายคำถาม แต่ยังไม่สามารถเพาะแยกเชื้อออกมาได้ ในปี ค.ศ.1915 Inada และคณะ สามารถแยกเชื้อนี้ได้สำเร็จที่ประเทศญี่ปุ่นและพบแอนติบอดีต่อเชื้อนี้ในเลือดของคนงานเหมืองแร่ที่แสดงอาการภาวะดีซ่าน และเรียกเชื้อนี้ว่า *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* และมีรายงานการศึกษาออกมาต่อเนื่อง โดยได้รายงานถึง วิธีการติดต่อของโรค ลักษณะของเชื้อ อาการของโรคและพยาธิสภาพของโรค รวมถึงการรักษา การค้นพบของ Inada และคณะยังไม่เป็นที่แพร่หลายไปทางยุโรป ส่งผลให้ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 พบผู้ป่วย Weil’s disease เป็นจำนวนมาก (46) และในเวลาใกล้เคียงกับการรายงานการค้นพบของ Inada และคณะ พบว่า Uhlenhuth & Fromme และ Hubener & Reiter ซึ่งเป็นชาวเยอรมัน 2 กลุ่ม ค้นพบแบคทีเรียนี้เช่นเดียวกันจากเลือดของหนูตะเภาที่ฉีดด้วยเลือดของทหารที่ป่วยเป็นโรค French disease หลังจากนั้นต่อมาในปี ค.ศ.1990 มีการจัดอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของเชื้อเลปโตสไปรา โดยให้ Ictero No.1 เป็นสายพันธุ์แรกที่พบใน *Leptospira interrogans* (1, 46)

ในประเทศไทยพบผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสเป็นครั้งแรก คือ นายแพทย์ใช้ ยูนิพันธ์ เมื่อ ปี ค.ศ. 1942 ซึ่งเกิดภาวะน้ำท่วมครั้งใหญ่ในกรุงเทพมหานคร โดยรายงานว่ามีผู้ป่วย 4 ราย มารับการรักษาที่โรงพยาบาลศิริราชและเสียชีวิต 2 ราย หลังจากนั้นก็มีการรายงานผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสจากทั่วทุกภาคของประเทศไทย (47) โดยพบว่าการเกิดโรคพบมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งอาจเกิดจากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบจำนวนหนูที่ติดเชื้อมากกว่าในภาคอื่นๆ (48, 49) ซึ่งการเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสจะขึ้นตามฤดูกาลโดยพบสูงสุดในช่วงฤดูฝน

รวมถึงหลังจากเกิดอุทกภัย การเกิดน้ำท่วมหรือฝนตกหนักทำให้หนูอพยพหนีน้ำท่วมเข้ามาในนาข้าว หรือในแหล่งน้ำที่ชาวบ้านจับปลาหรือเข้ามาในเมือง ทำให้คนมีโอกาสติดเชื้อจากการสัมผัสน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปราที่มาจากหนูในช่วงฤดูฝนได้มากขึ้น (50)

2.3 การจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา

เชื้อเลปโตสไปราเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในชั้น (Class): Schizomycetes ตระกูล (Order): Spirochaetales วงศ์ (Family): Spirochaetaceae สกุล (Genus): *Leptospira*

2.3.1 การจัดกลุ่มโดยใช้หลักการทางซีรัมวิทยา (Serological classification)

ในช่วงก่อนปี ค.ศ.1989 มีการจัดแบ่งกลุ่มเชื้อเลปโตสไปราออกเป็น 2 สปีชีส์ (species) คือ *Leptospira biflexa* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคและดำรงชีวิตอย่างอิสระในสภาวะแวดล้อม (free-living saprophyte) และ *Leptospira interrogans* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic strains) โดยใช้การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อในการแบ่งกลุ่ม พบว่าเชื้อ *L. biflexa* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 8-azaguanine (225 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *L. biflexa* ไม่สามารถเกิด spherical cells ในโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

โดยทั้งเชื้อ *L. interrogans* และ *L. biflexa* จะถูกแบ่งออกเป็นซีโรวาร์ต่างๆ อาศัยหลักการของปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) โดยนำเชื้อเลปโตสไปรามาทำปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับแอนติบอดีมาตรฐาน (rabbit hyperimmune sera) แล้วเก็บส่วนน้ำใส (absorbed serum) มาทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม อีกครั้งกับ homologous และ heterologous antigen โดยการจัดแบ่งกลุ่มทางซีรัมวิทยาขึ้นกับ Lipopolysaccharide (LPS) ที่อยู่บนผนังเซลล์ชั้นนอกของตัวเชื้อ การเรียงตัวของโมเลกุลน้ำตาลใน LPS จะมีการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งเชื้อนี้ออกได้เป็นหลายซีโรวาร์ โดยซีโรวาร์ที่มีลักษณะแอนติเจนใกล้เคียงกันยังจัดเป็นซีโรกรุ๊ป (serogroups) เดียวกัน ในปัจจุบันมีรายงานพบ *L. bifelxa* มากกว่า 60 ซีโรวาร์ และ *L. interrogans* กว่า 250 ซีโรวาร์ (ตารางที่ 1) (1, 41, 51)

2.3.2 การจัดกลุ่มโดยใช้หลักการทางจีโนไทป์ (Genotypic classification)

เป็นการจัดกลุ่มเชื้อตามลักษณะทางพันธุกรรมหรือจีโนไทป์จะถูกแบ่งเป็น genomospecies โดยใช้เทคนิค DNA hybridization ทำให้การจัดกลุ่มโดยวิธีนี้จะแตกต่างจากการจัดกลุ่มทางซีรัมวิทยา จึงทำให้เชื้อเลปโตสไปราในซีโรวาร์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคจัดอยู่ใน genomospecies เดียวกัน (ตารางที่ 2) และการจัดกลุ่มด้วยวิธีนี้ไม่สอดคล้องกับซีโรกรุ๊ปซึ่งใช้ในด้านระบาดวิทยา พบว่าสามารถจำแนกได้ 22 สปีชีส์ เป็นกลุ่มเชื้อที่ก่อโรค 10 สปีชีส์ กลุ่มเชื้อที่ไม่ก่อโรค 7 สปีชีส์ ซึ่งนอกจากแบ่งเชื้อออกเป็นกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคและเชื้อที่ไม่ก่อโรคแล้วยังพบว่ามีเชื้อบางสปีชีส์ที่ยังไม่สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจนจึงจัดอยู่ในกลุ่ม intermediate สามารถจำแนกได้ 5 สปีชีส์ (ตารางที่ 3) (52)

จากการประชุมระดับนานาชาติ (International Committee on Systematics of Prokaryotes: Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospiraceae*) ในปี ค.ศ. 2007 ที่เมืองกีโต (Quito) ประเทศเอกวาดอร์ ได้พิจารณาการระบุชื่อของ genomospecies 1, 3, 4 และ 5 เป็น *Leptospira alstonii*, *Leptospira vanthielii*, *Leptospira terpstrae* และ *Leptospira yanagawae* ตามลำดับ (53, 54) ในปี ค.ศ. 2013 ที่เมืองฟุกุโอะกะ (Fukuoka) ประเทศญี่ปุ่น ได้ระบุให้ *Leptospira idonii* เป็นสปีชีส์ใหม่ในกลุ่มไม่ก่อโรค ค้นพบโดย Saito และคณะ ซึ่งแยกเชื้อได้จากแหล่งน้ำในมหาวิทยาลัยคีวชู (Kyushu University) (55, 56) และล่าสุดในปี ค.ศ. 2015 ที่เมืองเซอมารัง (Semarang) ประเทศอินโดนิเซีย ได้ระบุให้ *Leptospira mayottensis* เป็นสปีชีส์ใหม่ในกลุ่มก่อโรค ค้นพบโดย Bourhy และคณะ โดยแยกเชื้อได้จากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสในมายอต (Mayotte) ซึ่งตั้งอยู่ทางเหนือของช่องแคบโมซัมบิกในมหาสมุทรอินเดียภายใต้เขตอำนาจของประเทศฝรั่งเศส (ตารางที่ 3) (57, 58)

ตารางที่ 1: แสดงการจัดกลุ่มซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ของเชื้อ *L. interrogans* โดยใช้หลักการทางซีรัมวิทยา (1)

Serogroup	Serovar (s)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Panama	Panama, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Georgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, Aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, Lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani

ตารางที่ 2: แสดงการจัดกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมและทางซีรัมวิทยา (1)

Species	Serogroups
L. interrogans	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
L. noguchii	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona
L. santarosai	Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopte
L. meyeri	Ranarum, Semaranga, Sejroe, Mini, Javanica
L. wolbachii	Codice
L. biflexa	Semaranga, Andamana
L. fainei	Hurstbridge
L. borgpetersenii	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
L. kirschneri	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae
L. weilii	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe
L. inadai	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica
L. parva	Turneria

ตารางที่ 3: แสดงสปีชีส์ของเชื้อเลปโตสไปราที่พบในปัจจุบัน (52)

Species	Groups
L. alexanderi	Pathogenics
L. weilii	
L. borgpetersenii	
L. santarosai	
L. kmetyi	
L. alstonii (genomospecies 1)	
L. interrogans	
L. kirschneri	
L. noguchii	
L. mayottensis	
L. licerasiae	Intermediate
L. wolffii	
L. fainei	
L. inadai	
L. broomii	
L. idonii	Non-pathogenics
L. vanthielii (genomospecies 3)	
L. biflexa	
L. wolbachii	
L. terpstrae (genomospecies 4)	
L. meyeri	
L. yanagawae (genomospecies 5)	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.4 อาการทางคลินิก

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อเลปโตสไปราจะมีอาการที่แสดงออกแตกต่างกันออกไป โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงอาการไม่รุนแรงจะมีอาการคล้ายเป็นหวัด (flu-like illness) เช่น มีไข้เฉียบพลัน ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ เป็นต้น โดยพบว่าอาการทางคลินิกในช่วงแรกมีความหลากหลายคล้ายกับโรคติดเชื้ออื่นๆ เช่น ไวรัสตับอักเสบ ไข้หวัดใหญ่ (influenza) โรคไข้เลือดออกเดงกี่ โรคสครับไทฟัส (59) เป็นต้น ในผู้ป่วยที่แสดงอาการรุนแรง (Weli's disease) มีภาวะดีซ่าน เกิดภาวะแทรกซ้อนที่มีความเกี่ยวข้องกับอวัยวะต่างๆ เช่น เกิดภาวะตับและไตล้มเหลว มีอาการเลือดออกในปอด อาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (1, 2, 41, 60-62) ซึ่งผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสร้อยละ 90 มักจะแสดงอาการไม่รุนแรง (63)

ระยะฟักตัวของโรค (incubation phase) อยู่ระหว่าง 2-30 วันหลังสัมผัสเชื้อ โดยส่วนใหญ่เฉลี่ยใช้เวลาประมาณ 7-14 วัน ในช่วงแรกเป็นช่วงที่เชื้อจะแพร่เข้าสู่กระแสเลือด (leptospiremia phase) มีระยะเวลาประมาณ 4-7 วัน ในระยะนี้สามารถตรวจพบเชื้อได้จากเลือดและน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid) ได้ หลังจากนั้นผู้ป่วยจะมีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา (immune phase) ในระยะนี้เชื้อเลปโตสไปราจะแพร่เข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อตามอวัยวะต่างๆที่เกี่ยวข้อง ทำให้พบเชื้อในกระแสเลือดลดลง โดยระยะนี้จะเริ่มต้นในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และในช่วงนี้สามารถตรวจพบแอนติบอดีที่สร้างขึ้นรวมถึงสามารถพบเชื้อออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วยได้ (1, 4, 51)

อาการทางคลินิกของผู้ที่ติดเชื้อเลปโตสไปรา สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มอาการ ได้แก่

2.4.1 Anicteric leptospirosis

เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่พบได้บ่อย ผู้ป่วยมีอาการไม่รุนแรงหรือไม่มีอาการตัวเหลือง จะมีอาการทางคลินิกมีลักษณะเป็น biphasic คือผู้ป่วยมีไข้ติดต่อกันหลายวันสลับกับระยะไข้ลด โดยเริ่มจาก leptospiremia phase อาการเริ่มต้นของผู้ป่วยจะแสดงอาการคล้ายเป็นหวัด คือ มีไข้สูงเฉียบพลัน (38-40 องศาเซลเซียส) หนาวสั่น ปวดศีรษะ ท้องเสีย เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ปวดกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะโคนขา กล้ามเนื้อน่อง กล้ามเนื้อหลังและท้องซึ่งเป็นลักษณะสำคัญ

ของโรคนี้ (1, 4, 63) ผู้ป่วยอาจมีผื่นขึ้นตามผิวหนัง ซึ่งถ้ามีผื่นขึ้นจะเป็นเพียงชั่วคราว (1, 64) นอกจากนี้ผู้ป่วยอาจมีอาการเยื่อบุตาแดงหรือมีเลือดออกใต้เยื่อบุตา หลังจากนั้นผู้ป่วยจะมีไข้ลดลงประมาณ 2-3 วันซึ่งเริ่มเข้าสู่ immune phase จะมีอาการคล้ายกับใน leptospiremia phase แต่ผู้ป่วยจะมีอาการรุนแรงน้อยกว่า โดยผู้ป่วยอาจจะมีไข้กลับมา อาการที่พบได้ในช่วงนี้ คือ มีภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบแบบไร้เชื้อ (aseptic meningitis) อาจพบผู้ป่วยมีอาการนี้ ≤25% ซึ่งส่วนใหญ่มักพบในเด็ก ผู้ป่วยในกลุ่มนี้สามารถหายจากโรคได้และไม่ค่อยพบการเสียชีวิตของผู้ป่วยในกลุ่มนี้ (1, 63, 64)

2.4.2 Icteric leptospirosis (Weil's Syndrome)

เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงหรือมีอาการตัวเหลือง พบได้ประมาณ 5-10% ของผู้ป่วยโรคนี้ อาการเริ่มแรกจะคล้ายกับผู้ป่วยในกลุ่ม anicteric leptospirosis แต่ระยะ biphasic ในผู้ป่วยกลุ่ม icteric leptospirosis จะแบ่งออกเป็นสองระยะได้ไม่ชัดเจน โดยเมื่อสิ้นสุดระยะ leptospiremia phase จะเข้าระยะ immune phase โดยจะมีไข้ต่อเนื่องและมีอาการเหลืองเพิ่มขึ้น ซึ่งจะพบเชื้อเลปโตสไปราแพร่กระจายเข้าสู่อวัยวะต่างๆของร่างกาย ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่มีความเกี่ยวข้องกับอวัยวะต่างๆซึ่งแตกต่างกันแล้วแต่บุคคล เช่น เกิดไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) (65, 66) ตับวายเฉียบพลัน (acute liver injury) (67) เกิดภาวะเลือดออกที่ตา หัวใจ ปอด (68) และผู้ป่วยในกลุ่มนี้อาจเสียชีวิตได้

2.5 การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

เนื่องจากผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสมีอาการหลากหลายและคล้ายโรคติดเชื้ออื่นๆ การวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องจึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีความจำเพาะที่สามารถช่วยวินิจฉัยแยกโรคได้ การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการทำได้โดยการตรวจหาตัวเชื้อเลปโตสไปรา เช่น การตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเชื้อ การตรวจหาสารพันธุกรรมหรือส่วนประกอบของเชื้อเลปโตสไปราจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ หรือการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อเลปโตสไปราซึ่งสามารถตรวจได้หลายวิธี (3) โดยขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

จากผู้ป่วยเพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยโรคและการเลือกใช้วิธีตรวจโรคทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมตามระยะเวลาของการป่วยเป็นขั้นตอนที่สำคัญ (รูปที่ 2)

2.5.1 การเพาะเชื้อเลปโตสไปรา

สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราในกระแสเลือด (leptospiremia phase) ได้ตั้งแต่ระยะแรกก่อนที่ผู้ป่วยจะแสดงอาการไปจนถึงประมาณช่วงปลายสัปดาห์แรกหลังจากที่แสดงอาการ การตรวจหาเชื้อทำโดยการนำเลือดของผู้ป่วยประมาณ 1-2 หยดมาหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราชนิดเหลว (liquid medium) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง (semisolid medium) ที่เติม 5-fluorouracil ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น (69, 70) ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืดทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2-3 เดือน

ส่วนการเพาะเชื้อจากปัสสาวะ สามารถเก็บปัสสาวะจากผู้ป่วยในช่วงสัปดาห์ที่ 2 หลังจากที่มีอาการ ระยะเวลาที่สามารถพบเชื้อในปัสสาวะนั้นแตกต่างกันออกไปแต่ก็อาจพบเชื้อในปัสสาวะของผู้ป่วยได้นานหลายสัปดาห์ (71) เชื้อเลปโตสไปราที่อยู่ในปัสสาวะนั้นจะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นาน ดังนั้นปัสสาวะที่เก็บมาจากผู้ป่วยควรรีบนำมาปั่นล้างตะกอนด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) (70) แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 5-fluorouracil นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจดูการเจริญของเชื้อทุกสัปดาห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืด และหากเกิดการปนเปื้อนให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมากรองโดยใช้แผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร หรือ 0.45 ไมโครเมตร ก่อนการเปลี่ยนอาหารใหม่ (72)

มีการศึกษาก่อนหน้านี้โดยนำสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสมาเพาะแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อของผู้ป่วย พบว่าวิธีนี้มีความไวเพียง 3% (73) และการเพาะเชื้อจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยพบว่ามีความไว 48% (74) วิธีการเพาะเชื้อเลปโตสไปราจากตัวอย่างผู้ป่วยทำให้ได้เชื้อที่สามารถนำไปทดสอบซีโรวาร์ของเชื้อที่ได้ แต่เชื้อเลปโตสไปราเจริญเติบโตช้า จึงต้องใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นข้อเสียของวิธีนี้

2.5.2 การตรวจทางซีรัมวิทยา

การตรวจทางซีรัมวิทยาเป็นการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมจากผู้ป่วย โดยแอนติบอดีชนิด IgM สามารถพบได้ในเลือดประมาณ 5-7 วันหลังจากที่มีอาการ

Microscopic Agglutination Test (MAT)

เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซีโรกรุ๊ป/ซีโรวาร์ ของเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการอ้างอิง เพื่อใช้ในการยืนยันผลการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยใช้ตัวเชื้อเลปโตสไปราเป็นแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย ตรวจดูการทำปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืด โดยผลบวกจะเกิดการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรามีลักษณะเป็น lysis balls (75) โดยจะนำตัวอย่างซีรัมที่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มตั้งแต่ 50% ขึ้นไปโดยจะเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปราที่เกาะกลุ่มกับเชื้อเลปโตสไปราที่เป็นอิสระ ไปหาค่าไตเตอร์ต่อเชื้อซีโรวาร์นั้น (MAT titer) อ่านผลการเกาะกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืดเช่นเดียวกัน โดยซีรัมที่เจือจางสูงสุดที่ให้ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มถือเป็นค่า end point ซึ่งโดยทั่วไปถ้าพบค่าไตเตอร์ ≥400 จากตัวอย่างเลือดที่เก็บครั้งแรก หรือพบค่าไตเตอร์เพิ่มขึ้น ≥4 เท่า จากการเก็บตัวอย่างเลือดในครั้งที่ 2 (paired sera) โดยจะทำการเจาะเลือดห่างกันประมาณ 1-2 สัปดาห์ สนับสนุนว่าผู้ป่วยกำลังมีการติดเชื้อเลปโตสไปรา

CHULALONGKORN UNIVERSITY

การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสโดยใช้วิธี MAT มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น เนื่องจากค่าไตเตอร์ของซีรัมที่ได้จะมีค่าสูงขึ้นก็ต่อเมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อมากกว่า 2 สัปดาห์ ซึ่งทำให้ผู้ป่วยในระยะเฉียบพลันอาจตรวจไม่พบด้วยวิธีนี้ (76, 77) ในผู้ป่วยที่มีอาการของโรครุนแรง วิธี MAT จะไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยได้ เนื่องจากเมื่อผู้ป่วยมีค่าไตเตอร์สูงขึ้น ก็อาจทำให้การตัดสินใจให้การรักษาเกิดความล่าช้า และยังพบว่าเชื้อบางตัวสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ (cross reactions) (1, 78, 79) นอกจากนี้ยังเกิด paradoxical reactions คือ ซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปราที่พบให้ค่าไตเตอร์สูง แต่ซีโรวาร์ที่พบนั้นไม่สัมพันธ์กับซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปราที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในปัจจุบัน (1, 4) รวมถึงการทดสอบต้องใช้เชื้อที่ยังมีชีวิตทำให้ต้องมีการเลี้ยงเชื้อและการเปลี่ยน

อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบ การอ่านผลและแปลผลซึ่งมีความซับซ้อนต้องการผู้ที่มีประสบการณ์และมีความชำนาญในการอ่านและแปลผล

2.5.2.1 การตรวจทางซีรัมวิทยาด้วยวิธีอื่นๆ

เนื่องจากการตรวจทางซีรัมด้วยวิธี MAT มีขั้นตอนที่ซับซ้อนรวมถึงความไวในการตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อในช่วงแรกของการติดเชื้อยังมีความไวไม่มาก จึงมีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา เช่น

- Indirect Hemagglutination Assay (IHA)

การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี IHA โดยการนำเชื้อเลปโตสไปรามาเคลือบไว้บนเม็ดเลือดแดงและนำซีรัมผู้ป่วยที่ต้องการทดสอบมาทำปฏิกิริยา ถ้าในซีรัมมีแอนติบอดีที่จำเพาะก็จะเกิดตะกอนขึ้นจากปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม ซึ่งเห็นได้ด้วยตาเปล่า จากการศึกษาก่อนหน้านี้โดยศึกษาในพื้นที่ที่พบการเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคประจำถิ่น ซึ่งใช้วิธี IHA เพื่อดูความไวในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรัมผู้ป่วย พบว่าผลการศึกษาที่ได้นั้นหลากหลาย โดยในปี ค.ศ.1998 Levett และคณะ ใช้วิธี IHA ตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมที่เก็บครั้งแรก (acute serum) ซึ่งพบว่ามีความไวและความจำเพาะ 100 และ 94% ตามลำดับ (80) ในขณะที่ Effler และคณะ ได้ทำการศึกษาในปี ค.ศ.2000 โดยใช้วิธี IHA ตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยเช่นเดียวกัน แต่พบว่าความไวในการตรวจที่ได้ต่ำกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยซีรัมที่ทำการเก็บในช่วง 0-6 วันหลังจากผู้ป่วยแสดงอาการ ตรวจพบได้น้อยกว่า 20% ซีรัมที่ทำการเก็บในช่วง 7-13 วันหลังจากผู้ป่วยแสดงอาการ ตรวจพบได้น้อยกว่า 40% แต่เมื่อทำการเก็บซีรัมในช่วง 14-20 วันหลังจากผู้ป่วยแสดงอาการ สามารถตรวจพบได้ 80% (81) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆที่ใช้วิธี IHA ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา แต่ยังพบว่ามีความไวต่ำกว่าเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆที่มีการพัฒนาใช้ในการตรวจ (82, 83)

- **Immunofluorescence Assay**

เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดี โดยนำเชื้อเลปโตสไปราเคลือบไว้บนสไลด์แล้วนำซีรัมผู้ป่วยที่เจือจางแล้วมาหยดลงบนสไลด์ ติดตามผลโดยการนำไปย้อมด้วยคอนจูเกตซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของคนที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เมื่อนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence microscope) จะพบการเรืองแสงเป็นสีเขียวบนตัวเชื้อ (84) สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราจากซีรัมผู้ป่วยได้ในช่วงปลายสัปดาห์แรกหลังจากแสดงอาการ โดยพบว่าวิธีนี้มีความไว 48% และความจำเพาะ 97% (85) การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Immunofluorescence นี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากการอ่านผลต้องดูปฏิกิริยาฟลูออเรสเซนต์ จึงต้องมีกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการอ่านผลโดยเฉพาะและต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการอ่านผลและแปลผลที่ได้ และความไวในการตรวจของช่วงสัปดาห์แรกหลังจากแสดงอาการยังมีความไวไม่มาก

- **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM โดยใช้วิธี ELISA ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรัมผู้ป่วยที่ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงสัปดาห์แรกที่แสดงอาการ พบว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อด้วยวิธี IgM-ELISA มีความไวในการตรวจมากกว่าวิธี MAT (4, 86) จากการศึกษาในปี ค.ศ.1999 Cumberland P และคณะ ได้ทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส 3 ครั้ง โดยในครั้งแรกเก็บตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล ประมาณ 5 วันหลังจากแสดงอาการ ครั้งที่ 2 เก็บตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยห่างจากครั้งแรกประมาณ 4-5 วัน โดยการเก็บตัวอย่างซีรัมทั้ง 2 ครั้งนี้เป็นระยะ acute phase และในครั้งสุดท้ายทำการเก็บตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยประมาณ 28 วันหลังแสดงอาการ ซึ่งเป็นระยะ convalescent phase นำไปทำปฏิกิริยากับเชื้อเลปโตสไปราซึ่งเป็นแอนติเจน พบว่าวิธี IgM-ELISA มีความไวที่ 52, 89 และ 93% ตามลำดับ และมีความจำเพาะ ≥94% ในขณะที่วิธี MAT มีความไว 30, 63 และ 76% ตามลำดับ และมีความจำเพาะ ≥97% (76)

มีการพัฒนาเทคนิคนี้เป็นชุดตรวจสำเร็จรูป เมื่อใช้วิธี IgM-ELISA ที่เป็นชุดตรวจสำเร็จรูปในการตรวจหาแอนติบอดีจากซีรัมผู้ป่วยพบว่าชุดทดสอบนี้มีความไว 48.7% สำหรับการตรวจซีรัมผู้ป่วยที่เป็น acute phase และ 75% สำหรับการตรวจซีรัมผู้ป่วยที่เป็น convalescent phase มีความจำเพาะ 97% (87)

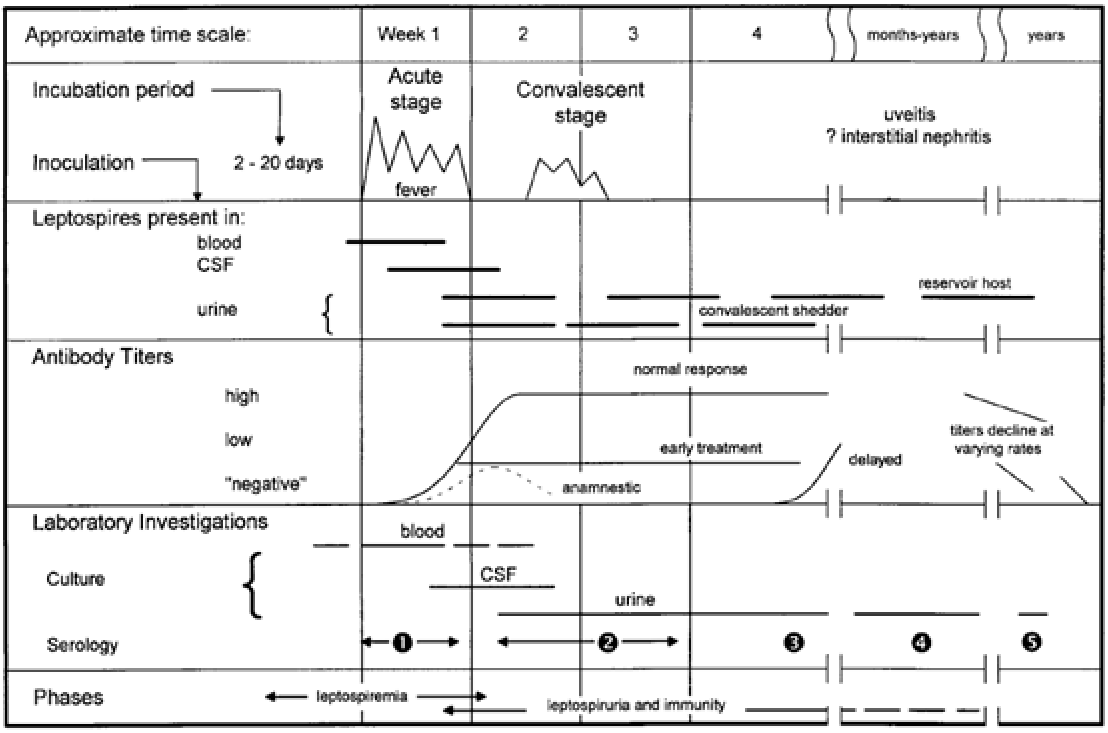
จะเห็นได้ว่าในช่วงสัปดาห์แรกที่แสดงอาการนั้นความไวในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อนั้นยังมีความไวไม่มาก และความไวในการตรวจจะเพิ่มขึ้นหลังจากผ่านสัปดาห์แรกที่แสดงอาการ วิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่กล่าวมาข้างต้นใช้ตัวเชื้อทั้งตัว หรือสารสกัดจากเชื้อเป็นแอนติเจนในการทดสอบ ในปัจจุบันมีรายงานการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant proteins) ซึ่งส่วนประกอบของเชื้อเลปโตสไปราที่นิยมใช้มาเตรียมเป็นแอนติเจนมักเป็นโปรตีนส่วนนอกของเชื้อ เช่น โปรตีน LipL32 มาใช้ในการตรวจ พบว่าเมื่อใช้โปรตีน LipL32 มาเป็นแอนติเจนสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้วิธี ELISA พบว่ามีความไวในการตรวจ 0, 43 และ 86% โดยตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่นำมาทดสอบได้ทำการเก็บในระหว่างวันที่ 2-4, 5-7 และ 8-23 วันหลังจากแสดงอาการ (30) ถึงแม้ว่าใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนมาเป็นแอนติเจนเพื่อช่วยเพิ่มความไวในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อแต่ก็ยังพบว่าความไวในการตรวจในช่วงสัปดาห์แรกหลังจากมีการติดเชื้อยังมีความไวไม่มาก โดยปกติการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM จากซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสจะสามารถตรวจได้ภายใน 5-7 วันหลังจากมีการติดเชื้อ และยังสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้หลังจากมีการติดเชื้อ 20 วัน (88, 89)

2.5.3 การตรวจหาสารพันธุกรรม

เนื่องจากการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรามีข้อเสียในเรื่องของความไวที่ต่ำในการตรวจพบตั้งแต่ช่วงแรกของการติดเชื้อดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมจากเชื้อเลปโตสไปราในช่วงที่พบเชื้อเลปโตสไปราได้ในกระแสเลือด (leptospiremia phase) เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคตั้งแต่ช่วงแรก ซึ่งสามารถตรวจหาได้ในตัวอย่างจากเลือด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง ซีรัม (90) สามารถทำได้หลายวิธี เช่น Polymerase chain reaction (PCR) (71, 91, 92) , quantitative PCR assays (93-98) โดยพบว่าเมื่อนำปัสสาวะจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสมาทำ

PCR ซึ่งได้เก็บปัสสาวะก่อนผู้ป่วยมีการแสดงอาการ 8 วัน พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมจากเชื้อเลปโตสไปราได้ 26 ราย จาก 29 ราย (90%) (71) มีการพัฒนาเทคนิคในการทำปฏิกิริยา PCR หรือ real-time PCR เพื่อใช้ในการตรวจหายีนจากเชื้อเลปโตสไปรา เช่น การเพิ่มจำนวนที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA, *lipl32* และ *flab* (99, 100)

ถึงแม้ว่าการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี PCR จะมีความไวในการตรวจสูง แต่ก็พบว่าหากผู้ป่วยมีการติดเชื้อนานกว่า 1 สัปดาห์ พบว่าการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจจะมีความไวลดลงเมื่อเทียบกับการตรวจทางซีรัมวิทยา (101)



รูปที่ 2: แสดงการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสที่ระยะเวลาต่างๆ

การเก็บตัวอย่างของผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสเพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจทางซีรัมวิทยา ตัวอย่างที่ 1 และ 2 เป็นการเก็บตัวอย่างในระยะ acute phase ตัวอย่าง ที่ 3 เป็นระยะ convalescent phase ตัวอย่างที่ 4 และ 5 เป็นช่วงการติดตามผู้ป่วยเพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยา เช่น ข้อมูลทางซีโรกรุ๊ปของเชื้อที่ทำให้เกิดการระบาด (1)

2.6 ส่วนประกอบของเชื้อเลปโตสไปรา

ถึงแม้จะมีการค้นพบเชื้อที่เป็นสาเหตุของเลปโตสไปโรซิสมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1989 และมีรายงานการค้นพบและการศึกษาส่วนประกอบต่างๆของเชื้อเลปโตสไปราจำนวนมาก แต่ในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการก่อโรคที่แน่ชัดว่าเชื้อเลปโตสไปราก่อโรคได้อย่างไรเหตุใดผู้ป่วยบางรายจึงไม่มีอาการหรือมีอาการไม่รุนแรง ในขณะที่ผู้ป่วยบางรายมีอาการรุนแรงหรือมีอาการเกี่ยวข้องกับอวัยวะต่างๆและถึงแก่ชีวิตได้

การศึกษาส่วนประกอบต่างๆที่พบเฉพาะในเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรค นอกจากมีประโยชน์ในการศึกษากลไกการก่อพยาธิสภาพแล้ว ยังมีความสำคัญในการนำมาใช้พัฒนาเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันโรคและพัฒนาการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยวินิจฉัยโรคด้วย

2.6.1 โปรตีนบริเวณผนังเซลล์ชั้นนอก (Outer Membrane Proteins; OMPs)

ส่วนประกอบของจุลชีพที่อยู่บริเวณผิวหรืออยู่ด้านนอกมักเป็นส่วนที่นิยมนำมาศึกษามากเนื่องจากอาจมีบทบาทในการเกาะยึดกับเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการทำให้เกิดการติดเชื้อและก่อพยาธิสภาพ และเป็นส่วนที่ถูกรับรู้โดยระบบภูมิคุ้มกันได้ดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนหรือใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดี (รูปที่ 3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- *Leptospira* lipoprotein 32 kDa (LipL32)

เป็นโปรตีนที่มีขนาด 32 kDa มีการแสดงออกมากที่สุด (19) พบ LipL32 เฉพาะในเชื้อชนิดที่ก่อโรคเท่านั้น (60, 102-105) พบว่ามีความอนุรักษ์สูง เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อเลปโตสไปราหลายสายพันธุ์ พบว่ามีความเหมือนกัน 97.8 % เมื่อค้นหาจากฐานข้อมูล GenBank ก็ไม่พบว่ามีโปรตีนชนิดอื่นที่คล้ายกับ LipL32 แสดงให้เห็นว่า LipL32 เป็นโปรตีนที่จำเพาะในเชื้อเลปโตสไปราเท่านั้น (29) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการสกัดผนังเซลล์ชั้นนอกของตัวเชื้อด้วย Triton X-114 (19) เพื่อศึกษาบริเวณที่อยู่ของโปรตีน และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่บริเวณผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ ทำการสกัดแยกผนังเซลล์ด้วยวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation (106, 107) จากผลการศึกษาที่ได้ทำให้ทราบว่า LipL32

เป็น lipoprotein ที่พบบริเวณผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อเลปโตสไปราและพบในปริมาณมาก จึงทำให้ LipL32 เป็นโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษา แต่จากการศึกษาของ Pinne และ Haake ในปี ค.ศ.2013 ทำให้ทราบว่า LipL32 ไม่ได้อยู่ที่บริเวณผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ แต่ LipL32 เป็นโปรตีนพบได้ที่บริเวณใต้ผนังเซลล์ชั้นนอก (subsurface membrane lipoprotein) (108)

โปรตีน LipL32 มีการแสดงออกทั้งในหลอดทดลองและระหว่างที่มีการติดเชื้อทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง สามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีน LipL32 ในไตของแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วยเชื้อเลปโตสไปรา (19, 109) พบว่าผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน LipL32 (19, 102, 110) และยังมีรายงานว่าโปรตีน LipL32 สามารถจับกับเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix; ECM) ของโฮสต์ เช่น ลามินินและคอลลาเจนได้ (111, 112) นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาการตรวจหาแอนติบอดีจากสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้โปรตีน LipL32 ที่ถูกทำให้มีขนาดเล็กลง (truncated LipL32; tLipL32) โดยมีการแสดงออกของโปรตีนใน *Pichia pastoris* เปรียบเทียบกับ tLipL32 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนใน *Escherichia coli* พบว่า tLipL32 ที่แสดงออกใน *Pichia pastoris* เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะได้น้อยกว่า tLipL32 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนใน *Escherichia coli* เมื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมจากสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อ (113)

การใช้โปรตีน LipL32 เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราพบว่าความไวในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในช่วงสัปดาห์แรกหลังการติดเชื้อนั้นมีความไวในการตรวจต่ำ (30) จากการศึกษาโดยสังเคราะห์เปปไทด์จาก Hap1/LipL32 เพื่อนำมาใช้เพิ่มความไวในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้วิธี ELISA เปรียบเทียบกับวิธี MAT พบว่าการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM จากทั้งสองวิธียังมีความไวในการตรวจต่ำ แต่ความไวในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG มีความไวในการตรวจเพิ่มขึ้น (114) และยังพบว่าโปรตีน LipL32 เกิดผลบวกปลอมจากการใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบ เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่และผู้ป่วยเมลิออยโดสิส (34) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการทำ mutation ของยีน *lipL32* แล้วนำมาฉีดให้กับแฮมสเตอร์โดยนำมาเปรียบเทียบกับแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วยเชื้อ *L. interrogans* ที่เป็น wide type ทำการศึกษาทั้งการติดเชื้อในระยะเฉียบพลัน

(acute infection) และการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) พบว่าแฮมสเตอร์ยังสามารถเกิดโรคและแสดงอาการของโรคได้ทั้งระยะ acute infection และ chronic infection แสดงให้เห็นว่า LipL32 ไม่มีบทบาทในการเกิดพยาธิสภาพ (35)

- Leptospiral immunoglobulin-like proteins (Lig proteins)

โปรตีน Lig เป็น lipoproteins พบที่ผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี immunoelectron microscopy (24) ในปี ค.ศ. 2002 Palaniappan และคณะ ได้ค้นพบโปรตีนและยีนที่ควบคุมการสร้าง LigA เป็นครั้งแรก จากซีรัมม้าที่แท้งจากการติดเชื้อเลปโตสไปรา และพบว่า LigA มีการแสดงออกในไตจากแฮมสเตอร์ขณะที่มีการติดเชื้อเลปโตสไปราแต่เมื่อนำเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาทดสอบกับ LigA-specific polyclonal rabbit serum พบว่าไม่มีการแสดงออกของ LigA ในหลอดทดลอง (115) ต่อมาใน ปี ค.ศ.2003 Matsunaga และคณะได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยนำ genomic DNA libraries จาก *L. interrogans* และ *L. kirschneri* มาคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตโปรตีนที่มีความเป็นแอนติเจนที่จำเพาะกับเชื้อ โดยใช้ซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสมาคัดเลือก พบว่ามียีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน Lig ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ LigA, LigB และ LigC โดย LigC จะไม่มีการแสดงออกของยีนหลังกระบวนการ transcription โดยทั้ง Lig A และ Lig B ใช้กรดอะมิโนทางด้ายปลาย N (N-terminal) ในการยึดกับผนังเซลล์ตามด้วยบริเวณที่เป็น Big repeat domains ส่วนทางด้านปลาย carboxy (C-terminal) เฉพาะใน LigB พบ domains ขนาดใหญ่อยู่ต่อจากบริเวณ Big repeat domains โดยตำแหน่งของ ยีน *ligB* จะอยู่ทางด้าน downstream ของยีน *ligA* มีทิศทาง transcribed ไปทางเดียวกัน และพบเฉพาะในเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคเท่านั้น และเมื่อทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราหลายครั้ง พบว่าไม่มีการแสดงออกทั้ง LigA และ LigB (24)

มีการศึกษาในหนูไมซ์ (mice) พบว่าทั้ง LigA และ LigB สามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการสร้างภูมิคุ้มกันออกมาเพื่อป้องกันโรคเมื่อได้รับเชื้อซ้ำอีก (protective immunity) จากการฉีด LigA และ LigB ให้หนูไมซ์ แล้ว challenge ด้วยเชื้อเลปโตสไปรา (116) และเมื่อศึกษาในแฮมสเตอร์พบว่า LigA สามารถกระตุ้นให้เกิด protective immunity ในแฮมสเตอร์ได้

เช่นเดียวกัน (117) และพบว่าผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทั้ง LigA และ LigB (24, 118, 119)

มีรายงานการศึกษาพบว่าบริเวณ Big repeat domains ใน LigA ลำดับที่ 7–13 ของ Big domains และใน LigB ลำดับที่ 7–12 ของ Big domains เป็นบริเวณที่มีความแตกต่างกันและมีความหลากหลาย (120) ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับการจับกับ ECM เพื่อช่วยในการแพร่กระจายของเชื้อได้ โดยพบว่า LigA และ LigB สามารถจับกับ ECM ของโฮสต์ได้ เช่น ไฟโบรเนกทิน ลามินินและคอลลาเจน (121) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำยีน *ligA* เข้าสู่เซลล์ของ *L. biflexa* ซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ไม่ก่อโรค พบว่า *L. biflexa* มีการแสดงออกของ LigA ทำให้เชื้อสามารถจับกับเซลล์ Madin Darby canine kidney (MDCK) ซึ่งเป็นเซลล์ไตได้มากขึ้น (122)

มีการศึกษาบทบาทของยีน *ligB* โดยเมื่อทำ mutation ของยีน *ligB* แล้วฉีดให้แฮมสเตอร์เพื่อศึกษาการติดเชื้อในระยะ acute infection และในหนูขาว (Wistar rats) เพื่อศึกษาการติดเชื้อในระยะ chronic infection พบว่าพยาธิสภาพที่ไตและตับของสัตว์ทดลองที่ฉีดด้วย mutation ของยีน *ligB* ไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองที่ฉีดด้วยเชื้อเลปโตสไปราที่เป็น wide type และเชื้อเลปโตสไปราที่มี mutation ของยีน *ligB* ยังสามารถจับกับเซลล์ MDCK ได้ไม่แตกต่างกับเชื้อเลปโตสไปราที่เป็น wide type เช่นกัน (123)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

- **Loa22**

เป็น lipoprotein ถูกค้นพบครั้งแรกในเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรค พบว่ามีส่วนของ OmpA (Outer membrane protein A) domain อยู่ทางด้านปลาย carboxy มีขนาด 22 kDa จึงให้ชื่อว่า Loa22 (*Leptospira* lipoprotein with OmpA domain 22 kDa) โดย Loa22 สามารถจับกับ peptidoglycan ได้โดยใช้ส่วนของ OmpA domain ช่วยยึดระหว่างส่วนผนังเซลล์ด้านนอกกับ peptidoglycan ไว้ (20) พบว่าเมื่อทำ mutation ของยีน *loa22* (*loa22*$^-$) แล้วนำมาฉีดให้หนูตะเภา เมื่อนำชิ้นเนื้อส่วนตับ ไต ปอดและม้าม มาตรวจสอบพบว่าในชิ้นเนื้อส่วนต่างๆที่ได้จากหนูตะเภาที่ฉีดด้วยเชื้อเลปโตสไปรานี้มีพยาธิสภาพของโรคลดลง

เมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อที่ได้จากหนูตะเภาที่ฉีดด้วยเชื้อเลปโตสไปราที่เป็น wide type และเมื่อฉีดด้วยเชื้อเลปโตสไปราที่เป็น complemented strain (mutant *loa22*⁻ complemented with wide type *loa22*) ก็พบว่าในชิ้นเนื้อจากหนูตะเภาที่ได้รับเชื้อนี้ก็เกิดพยาธิสภาพของโรคมากขึ้น และจากการทำ surface immunofluorescence assay ก็พบว่า Loa22 เป็นโปรตีนที่พบอยู่ที่ผิวเซลล์ของเชื้อ (15) และยังพบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนนี้ในซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส (124) นอกจากนี้มีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากเชื้อเลปโตสไปราในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง พบว่ามีการแสดงออกของ Loa22 ในหนูตะเภาที่ติดเชื้อเลปโตสไปรามากกว่าในหลอดทดลอง (31)

จากการศึกษาความสามารถของโปรตีนจากเชื้อเลปโตสไปราในการจับกับ ECM ได้แก่ ลามินิน คอลลาเจนและไฟโบรเนกติน พบว่า Loa22 สามารถจับกับ ECM ได้ไม่ดี (125) มีการศึกษาจีโนม ใน *L. biflexa* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคเปรียบเทียบกับจีโนมของเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรค พบว่าใน *L. biflexa* ก็พบยีน *loa22* เช่นเดียวกัน (orthologous gene) ซึ่งมีความเหมือน 73% การที่พบ Loa22 ในเชื้อชนิดที่ไม่ก่อโรคแสดงให้เห็นว่า Loa22 มีความเกี่ยวข้องทางวิวัฒนาการเพื่อให้เชื้ออยู่รอดมากกว่าที่จะเป็นปัจจัยโดยตรงที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรค (126)

- *Leptospira* lipoprotein 41 kDa (LipL41)

เป็น lipoprotein ที่พบอยู่ผนังเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปรามีรายงานการศึกษาในปี ค.ศ. 1991 โดย Haake และคณะ ได้ทำการศึกษาโดยทำ surface immunoprecipitation technique ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบหาแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์ของเชื้อ *L. interrogans* serovar Grippotyphosa ทำให้พบโปรตีนหลายขนาดรวมถึงโปรตีนที่มีขนาด 41 kDa (127) ซึ่งในเวลาต่อมา พบว่าโปรตีนที่มีขนาด 41 kDa เป็น lipoprotein ที่พบในเฉพาะเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคและให้ชื่อว่า LipL41 (21)

การศึกษาการแสดงออกของ Lipl41 ในสัตว์ทดลอง เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนในระหว่างที่มีการติดเชื้อ โดยนำเชื้อเลปโตสไปราฉีดให้แฮมสเตอร์ จากการทำ immunohistochemistry พบว่าชิ้นเนื้อส่วนไตที่ได้จากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรามีการ

แสดงออกของ LPS, OmpL1 และ LipL41 แต่ไม่พบการแสดงออกของ LipL36 (128) พบว่าเมื่อฉีดโปรตีน LipL41 และ OmpL1 ให้แฮมสเตอร์ แล้ว challenge ด้วยเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรคให้กับแฮมสเตอร์ พบว่าแฮมสเตอร์มีเปอร์เซ็นต์อยู่รอด (71%) มากกว่าแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วย LipL41 (23%) หรือ OmpL1 (42%) แสดงให้เห็นว่า LipL41 และ OmpL1 มีการทำงานร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรค (129)

- **OmpL1**

เป็น transmembrane protein ชนิดแรกที่ถูกค้นพบในเชื้อเลปโตสไปรา (25) จากการศึกษาก่อนหน้านี้โดยใช้เทคนิค surface immunoprecipitation ของเชื้อ *L. interrogans* serovar Grippotyphosa ทำให้พบโปรตีนหลายขนาดบนผิวเซลล์ (127) ต่อมามีการศึกษาโปรตีนที่มีขนาด 33 kDa ซึ่งได้จากการทำ surface immunoprecipitation โดยลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ถูกนำมาออกแบบเป็น oligonucleotide probes เพื่อใช้ในการตรวจสอบหายีนสำหรับโปรตีนนี้ ซึ่งพบว่าก็คือยีน *ompL1* (25) และพบว่า OmpL1 มีคุณสมบัติเป็น porin protein (25, 130) นอกจากนี้ยังพบว่ามีคุณสมบัติอื่นๆอีก เช่น heat modifiable จากการทำ electrophoretic mobility, cross-linkable trimers และสามารถ form เป็น channel ในฟอสโฟลิพิดที่เรียงตัวเป็น 2 ชั้น (lipid bilayers) (130)

มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนนี้ในระหว่างที่มีการติดเชื้อในสัตว์ จากการทำ immunohistochemistry พบว่าชิ้นเนื้อส่วนไตที่ได้จากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรามีการแสดงออกของ OmpL1 (128) และพบว่า OmpL1 มีการทำงานร่วมกับ LipL41 ในการทำหน้าที่เป็น Immunoprotective (129) นอกจากนี้ยังพบว่า OmpL1 สามารถจับกับลามินินและไฟโบรเนกตินของโฮสต์ได้ (131)

มีการค้นพบ transmembrane OMPs ชนิดอื่นๆอีก ได้แก่ OmpL36, OmpL37, OmpL47 และ OmpL54 (132) ได้ศึกษาบทบาทหน้าที่ของ OmpL36, OmpL37 และ OmpL47 พบว่า OmpL37 สามารถจับกับไฟบริโนเจน อีลาสตินและ fibrinogen fragment D ได้ดี แต่พบว่าจับกับลามินินและไฟโบรเนกทินได้น้อย ส่วนใน OmpL47 สามารถจับกับลามินิน

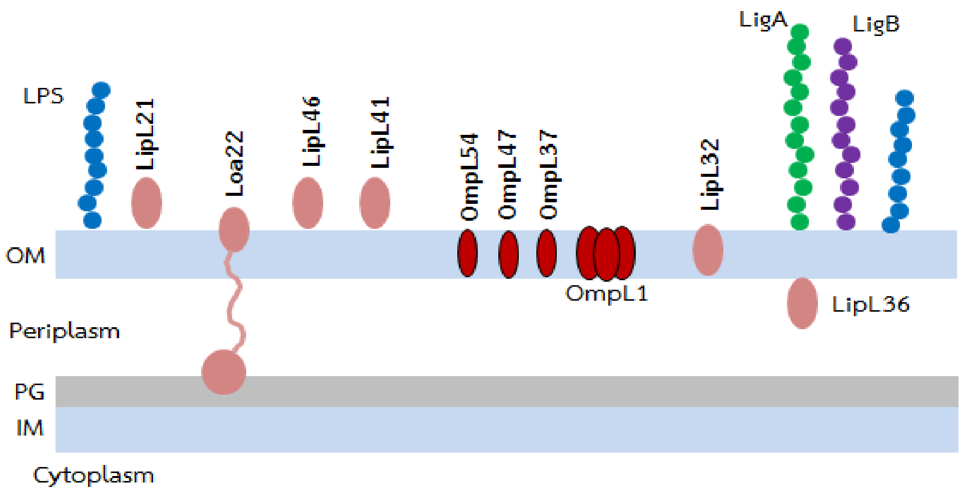
ไฟโบรเนกทิน ไฟบริโนเจน คอลลาเจนและอีลาสตินได้เช่นเดียวกัน ในขณะที่ OmpL36 ไม่สามารถจับกับ ECM ได้เลย นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกของ OmpL37 ในซีรัมผู้ป่วยและแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปรา (133)

- ***Leptospira*** **lipoprotein ชนิดอื่นๆ**

จากการศึกษาทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics) ของเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรค โดยใช้เทคนิค matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) พบว่า LipL32, Loa22 และ LipL41 เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในเชื้อเลปโตสไปรา โดย LipL32 เป็นโปรตีนที่พบปริมาณมากที่สุด โปรตีนที่พบมากเป็นลำดับที่ 2 และ 3 คือ Loa22 และ LipL41 ตามลำดับ และโปรตีนที่พบในลำดับต่อมา คือ LipL36, LipL21 และ LipL46 (105, 134) โดยพบว่า LipL36 ไม่ใช่โปรตีนที่พบได้ที่ด้านนอกของผนังเซลล์เชื้อเลปโตสไปราแต่พบได้ที่ด้านในของผนังเซลล์ (21, 135) และในระหว่างที่มีการติดเชื้อในสัตว์ทดลองพบว่าการแสดงออกของ LipL36 มีการแสดงออกลดลง (135) เมื่อนำชิ้นเนื้อจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรามาทำ immunohistochemistry พบว่าชิ้นเนื้อส่วนไตไม่พบการแสดงออกของ LipL36 (128) แต่พบการแสดงออกของ LipL21 (23) และ LipL46 (22) ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ และเป็นโปรตีนพบที่ผนังเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนต่างๆที่พบในเชื้อเลปโตสไปรา ผลการศึกษาที่ได้พบว่า LipL21 มีการแสดงออกในหนูตะเภาที่ติดเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้วิธี immunoblot analysis (31) และจากการทำ immunohistochemistry โดยนำชิ้นเนื้อส่วนตับของแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปรามาตรวจสอบก็พบการแสดงออกของ LipL21 ได้เช่นกัน (136) ส่วนใน LipL46 ยังพบการแสดงออกได้ในชิ้นเนื้อส่วนปอด ตับ ม้ามและไตจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา (22)

จากการศึกษาพบว่าเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรคสามารถจับกับ factor H และ factor H-related protein-1 ซึ่งเป็นองค์ประกอบในระบบคอมพลีเมนท์ได้ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ โดยเชื้อจะสร้างโปรตีนที่สามารถจับกับ factor H (factor H-binding proteins) ได้ 2 ชนิด ซึ่งมีขนาด 25 และ 50 kDa โดย factor H-binding proteins ที่มีขนาด 25 kDa เป็นโปรตีนชนิดแรกที่พบและให้ชื่อว่า LfhA (leptospiral factor H-binding

protein) เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสและซีรัมจากม้าที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนนี้ทั้งในซีรัมจากผู้ป่วยและจากม้าที่ป่วยเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (137) ในเวลาต่อมาพบว่ามีโปรตีนที่สามารถจับกับลามินินของโฮสต์ได้ ซึ่งมีขนาด 24 kDa และได้ให้ชื่อว่า Lsa24 (leptospiral surface adhesin 24-kDa) (125) ในปี ค.ศ. 2007 Stevenson และคณะ พบว่าใน LfhA/Lsa24 มีโครงสร้างที่คล้ายกับ endostatin จึงจัดให้อยู่ในกลุ่ม leptospiral endostatin-like protein (Len) family และให้ชื่อว่า LenA (138) นอกจากนี้ยังพบว่า LenA สามารถจับกับพลาสมิโนเจนของโฮสต์ได้ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นพลาสมิโนเจนให้เป็นพลาสมิน ทำให้เกิดการย่อยไฟรบิโนเจน ซึ่งอาจช่วยให้เชื้อแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆได้ (139) และยังพบโปรตีนอื่นๆที่อยู่ในกลุ่มนี้ (LenB, C, D, E และ F) โดยทุกชนิดสามารถจับกับลามินินได้ พบว่า LenB สามารถจับกับ factor H ของคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบในระบบคอมพลีเมนท์ ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ได้ (138) มีการศึกษาโดยทำ mutation ของยีน *lenB* และ *lenE* แต่ยังพบลักษณะอาการของโรคที่รุนแรงในแฮมสเตอร์ได้ (140)



รูปที่ 3: แสดงบริเวณผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อเลปโตสไปรา

บริเวณผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อเลปโตสไปรา ประกอบด้วย Lipopolysaccharide (LPS) , Lipoproteins เช่น LipL32, LigA, LigB, LipL41, Loa22, LipL21, LipL46 และ LipL36 เป็นต้น และ transmembrane proteins เช่น OmpL1, OmpL37, OmpL47 และ OmpL54 เป็นต้น โดย OM= Outer membrane proteins; PG= Peptidoglycan; IM= Inner membrane

2.6.2 Sphingomyelinase

Sphingomyelinase เป็นเอ็นไซม์ที่สามารถย่อย sphingomyelin เป็น ceramide และ phosphorylcholine โดย sphingomyelinase เป็นที่สนใจนำมาศึกษา เนื่องจากอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพ รวมถึงการแพร่กระจายของเชื้อไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ พบว่าในเชื้อเลปโตสไปราหลายสายพันธุ์สามารถสร้างและปล่อย hemolysins และ sphingomyelinases ออกมาได้ในหลอดทดลอง โดย hemolysins บางชนิดก็เป็น sphingomyelinases ซึ่งมีเป้าหมายคือ sphingomyelin ที่พบบนเยื้อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ (1, 2)

จากการศึกษาจีโนมของเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรค โดยใช้สายพันธุ์ Lai, Copenhageni, Manilae และ Pomona พบ 5 ยีนที่สามารถแสดงออกเป็น sphingomyelinases ได้ คือ *sph1, sph2, sph3, sph4* และ *sphH* (3-5) และมีเฉพาะใน Sph2 ที่ทราบลำดับกรดอะมิโนบริเวณเร่ง (active site) ของเอ็นไซม์ โดยพบยีน *sph* เฉพาะเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคเท่านั้น ในขณะที่ใช้ *L. borgpetersenii* สองสายพันธุ์มาเปรียบเทียบ พบเพียง 3 ยีนที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีนนี้ได้ คือ *sphA, sphB* และ *sph4* (141)

- Sphingomyelinase C

จากการศึกษาของ Berheimer และ Bey ในปี ค.ศ. 1986 ได้ทำการทดสอบ sphingomyelinase C activity จาก *L. interrogans* serovar Pomona ก็พบว่าสามารถทำให้เกิดการสลายของเม็ดเลือดแดงจากแกะได้ (142) ในปี ค.ศ. 1989 Del Real G และคณะได้ทำการโคลนยีน sphingomyelinase C (*sphA*) จาก *L. interrogans* serovar Hardjo พบว่า sphingomyelinase C จาก *L. interrogans* serovar Hardjo สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกได้เช่นกัน (8) จากการศึกษาของ Segers และคณะ ในปี ค.ศ. 1992 ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรคในหลายสายพันธุ์ โดยใช้ *sphA* จาก *L. borgpetersenii* เป็น probe พบว่ามีการแสดงออกของยีนต่ำในหลายสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปรา (143)

- SphH

ในปี ค.ศ. 2000 Lee และคณะได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของ hemolysin อีกชนิด คือ SphH จาก *L. interrogans* serovar Lai พบว่า hemolysin SphH มี homology กับ sphingomyelinase C จาก *L. borgpetersenii* serovar Hardjo ที่ได้มีการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์มาก่อนหน้านี้ จากการศึกษาโดยการโคลนยีน *sphH* แล้ว transform เข้าสู่ *E. coli* พบว่าเมื่อนำมาทดสอบ hemolytic activity ก็พบว่าสามารถทำให้เกิดการสลายของเม็ดเลือดแดงจากแกะได้ แต่พบว่า hemolysin SphH นี้ไม่สามารถย่อย sphingomyelin และยังพบว่า hemolysin SphH มีแนวโน้มในการทำหน้าที่ในการทำให้เกิดรูบนผนังเซลล์ (pore-forming protein) (6)

ในปี ค.ศ. 2002 Lee และคณะ ได้ทำการศึกษาต่อเนื่องมาจากการศึกษาใน ปี ค.ศ. 2000 โดยทำการศึกษา hemolytic และ cytotoxic activities ของ hemolysin SphH จาก *L. interrogans* serovar Lai โดยทำการโคลนยีน *sphH* หลังจากนั้นนำ hemolysin SphH มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาทดสอบกับเม็ดเลือดแดงของแกะเมื่อนำไปดูด้วยกล้อง transmission electron microscopy ก็พบว่า SphH สามารถทำให้เกิดรูบนผนังเซลล์ (pore-forming protein) จึงทำให้เม็ดเลือดแดงจากแกะถูกทำลายอย่างต่อเนื่อง จนทำให้เกิดเซลล์บวมจากการที่มีน้ำเข้าไปในเซลล์ ซึ่งเป็นการยืนยันผลจากการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงหน้าที่ของ hemolysin SphH ในการทำให้เกิด รูบนผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังทำการทดสอบ cytotoxicity ของ hemolysin SphH กับ mammalian cell lines ซึ่งผลการทดสอบที่ได้ก็พบว่า hemolysin SphH สามารถทำให้ mammalian cell เกิดความเสียหายได้เช่นเดียวกัน และจากการทดสอบ neutralization ของ hemolysin SphH โดยนำ SphH มาผสมกับ rabbit anti-His-SphH serum หลังจากนั้นก็นำมาผสมกับเม็ดเลือดแดงของแกะและ Vero cells พบว่าทั้ง hemolytic และ cytotoxic activities ของ hemolysin SphHสามารถถูก neutralized ได้โดย rabbit anti-His-SphH serum ได้ (7)

- **Sph2**

จากการศึกษาของ Artiushin และคณะ ในปี ค.ศ. 2004 พบการแสดงออกของ Sph2 จากซีรัมม้าที่ฉีดด้วยเชื้อเลปโตสไปรา *L. interrogans* serovar Pomona (144) และพบว่าซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสมีการแสดงออกของ Sph2 ในขณะที่ Sph1, Sph4 และ SphH ไม่พบการแสดงออกในซีรัมผู้ป่วย นอกจากนี้ยังพบการแสดงของ Sph2 ในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปรา (145)

จากการศึกษาของ Zhang และคณะในปี ค.ศ. 2005 ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่สร้างจากยีน hemolysin ต่างๆ พบว่าโปรตีนที่สร้างจากยีนกลุ่มนี้สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงใน blood agar plate ได้ hemolytic zone แตกต่างกันและเมื่อนำมาทดสอบ sphingomyelinase activity พบว่าโปรตีนที่สร้างจากยีน LA1027, LA1029, LA4004 และ LA3050 สามารถย่อย sphingomyelin ได้โดยพบว่าโปรตีน LA1029 ย่อย sphingomyelin ได้ดีที่สุดจากการศึกษานี้ก็ทำให้มีการแบ่งประเภทของ hemolysin ออกเป็น 2 กลุ่มคือ sphingomyelinase และ non-sphingomyelinase hemolysin โดยแบ่งตามความสามารถในการย่อย sphingomyelin ซึ่งเป็นสารตั้งต้น ของ sphingomyelinase (146) ในปี ค.ศ. 2008 Zhang และคณะได้ทำการศึกษาต่อเนื่องมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในปี ค.ศ. 2005 ที่ได้ทำการจำแนกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ sphingomyelinase และ non-sphingomyelinase hemolysin จากการศึกษาในครั้งนั้นพบว่า Sph2/LA1029 สามารถย่อยสารตั้งต้นได้มากที่สุด (146) จึงได้เลือก Sph2/LA1029 มาศึกษาต่อในการศึกษานี้ซึ่งก็พบว่า hemolysin Sph2 สามารถทำให้เกิด cytotoxic activity ใน lymphocytes ของหนู mouse, macrophages และเซลล์ตับของมนุษย์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำเซลล์ตับของมนุษย์ไปบ่มร่วมกับ Sph2 พบว่า Sph2 ทำให้เซลล์ตับเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis (147)

จากการศึกษาของ Narayanavari และคณะ ในปี ค.ศ. 2015 พบว่ายีน *sph2* มีการแสดงออกน้อย เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH แต่จะมีการแสดงเพิ่มมากขึ้นเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง hemolytic และ sphingomyelinase activities ลดลงเมื่อทำ mutation ของยีน *sph2* (141)

มีรายงานการศึกษาจีโนมของเชื้อเลปโตสไปราพบว่ายีน LA0872 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนับสนุนว่าน่าจะเป็นยีนสำหรับการสร้างคอลลาจีเนสซึ่งเป็นเอ็นไซม์ ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ โดยมีรายงานพบคอลลาจีเนสในแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งมีบทบาทในการทำให้เกิดภาวะเลือดออกในปอด ในปี ค.ศ. 1973 Diener และคณะได้ศึกษาการทำงานของคอลลาจีเนสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ในสัตว์ทดลอง ทำการฉีดคอลลาจีเนสให้กับหนู พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดเลือดออกในปอดและในช่องท้องของหนูได้ (38)

ในปี ค.ศ. 1976 Vargaftig และคณะ ได้ศึกษาคอลลาจีเนส จาก *Clostridium histolyticum* ซึ่งพบว่าคอลลาจีเนสสามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเลือดออกที่บริเวณปอดของสุนัขได้ เมื่อทดสอบโดยการนำกระดาษกรองซึ่งมีคอลลาจีเนสติดอยู่มาวางบนที่ผิวของปอดสุนัข พบว่าสามารถกระตุ้นให้บริเวณนั้นมีเลือดออกเกิดขึ้น ซึ่งผลการทดสอบในหนูก็ได้ผลเช่นเดียวกันเมื่อฉีดคอลลาจีเนสทาง intrathoracically ให้กับหนู (37) ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 Hara-Kudo และคณะได้ทำการแยก *Clostridium sporogenes* มาจากกระต่ายที่เป็นโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากยาปฏิชีวนะ (antibiotic-associated hemorrhagic diarrhea) หลังจากนั้นนำมา purified hemorrhagic toxin จากส่วน supernatant แล้วนำมาทดสอบ พบว่าคอลลาจีเนสจาก *Clostridium sporogenes* สามารถย่อยคอลลาเจนชนิดที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็นองค์ประกอบในชั้น tunica intima และ tunica media ของหลอดเลือดได้ (148)

ในปี ค.ศ. 2006 Pokharel และคณะได้ทำการศึกษาบทบาทของคอลลาจีเนสในการเป็นวัคซีนเพื่อใช้ในโรคเท้าช้างโดยนำคอลลาจีเนสจาก *Setaria cervi* มาฉีดให้กับสัตว์ทดลอง เมื่อนำซีรัมจากสัตว์ทดลองมาตรวจสอบการตอบสนองการสร้างแอนติบอดีก็พบว่าสัตว์ทดลองมีการสร้างแอนติบอดีต่อคอลลาจีเนสและวัคซีนสามารถลด parasite burden ได้ (39)

ซึ่งในขณะที่ทำการศึกษานี้ ยังไม่มีรายงานการศึกษาของคอลลาจีเนสจากเชื้อเลปโตสไปรา ผู้วิจัยจึงมีความสนใจการโคลนยีนและการเตรียมโปรตีน เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์และการทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยและแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เชื้อเลปโตสไปราและตัวอย่างซีรัม

เชื้อเลปโตสไปรา 24 ซีโรวาร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จากสัตวแพทย์หญิงดวงใจ สุวรรณ์เจริญ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ รายชื่อของเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 24 ซีโรวาร์แสดงในตารางที่ 4 โดยเชื้อเลปโตสไปราเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris, Modified by Johnson and Harris (EMJH) ชนิดเหลวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่นำมาใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ได้แก่ ซีรัมจากผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 30 ราย แต่ละรายจะทำการเก็บซีรัม 2 ครั้งโดยตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสได้รับการตรวจยืนยันว่ามีการติดเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี indirect immunofluorescent assay (IFA) ซีรัมจากผู้ป่วยสครับไทฟัส จำนวน 20 ราย ได้รับการตรวจยืนยันว่าติดเชื้อโดยใช้วิธี IFA ซีรัมจากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ จำนวน 20 ราย ได้รับการตรวจยืนยันว่ามีการติดเชื้อโดยใช้วิธี IgM ELISA และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิตที่สภากาชาดไทย จำนวน 20 ราย โดยตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสและซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัสได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์แพทย์หญิงยุพิน ศุพุทธมงคล ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล และซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปราเป็นซีรัมที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการซึ่งได้มาจากการฉีดเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes ปริมาณ $1x10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตรเข้าไปใน Golden Syrian Hamsters (*Mesocrietu sauratus*) อายุ 4–6 สัปดาห์ จำนวน 12 ตัว (109) โดยแบ่งแฮมสเตอร์เป็น 3 กลุ่มๆละ 4 ตัวเพื่อเก็บซีรัมในวันที่ 3, 5 และ 7 วัน หลังจากแฮมสเตอร์ได้รับเชื้อ โดยเชื้อเลปโตสไปราที่นำมาฉีดให้กับแฮมสเตอร์ได้รับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.ปัทมา เอกโพธิ์ ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ตารางที่ 4: รายชื่อเชื้อเลปโตสไปรา 24 ซีโรวาร์

No.	Species	Serogroup	Serovar
1	*L. interrogans*	Australis	Bratislava
2	*L. interrogans*	Autumnalis	Autumnalis
3	*L.borgpetersenii*	Ballum	Ballum
4	*L. interrogans*	Bataviae	Battaviae
5	*L. interrogans*	Canicola	Canicola
6	*L. weilii*	Cellidoni	Cellodoni
7	*L. kirshneri*	Cynopteri	Cynopteri
8	*L. interrogans*	Djasiman	Djasiman
9	*L. kirshneri*	Grippotyphosa	Grippotyphosa
10	*L. interrogans*	Hebdomadis	Hebdomadis
11	*L. interrogans*	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagia
12	*L. borgpetersenii*	Javanica	Javanica
13	*L. noguchii*	Louisiana	Louisiana
14	*L. alexanderi*	Manhao	Manhao
15	*L. borgpetersenii*	Mini	Mini
16	*L. noguchii*	Panama	Panama
17	*L. interrogans*	Pomona	Pomona
18	*L. interrogans*	Pyrogenes	Pyrogenes
19	*L. meyeri*	Ranarum	Ranarum
20	*L. weilli*	Sarmin	Sarmin
21	*L. borgpetersenii*	Sejore	Sejroe
22	*L. santarosai*	Shermani	Shermani
23	*L. borgpetersenii*	Tarassovi	Tarassovi
24*	*L. biflexa*	Semaranga	Patoc

* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (Non-pathogenic strain)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อเลปโตสไปราทำโดยนำเชื้อเลปโตสไปราที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตะกอนของเชื้อจะตกอยู่ที่ด้านล่างของหลอด ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง หลังจากนั้นเติม DNAzol reagent (Invitrogen, USA) 500 ไมโครลิตร สำหรับสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย แล้วใช้ปิเปตดูดเซลล์ขึ้นลงจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมเอทานอลความเข้มข้น 70% หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 90% นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายด้านบนทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งเป็นเวลา5 นาที แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นนำไป heat ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nano drop รุ่น ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3 การตรวจหายีน 16S rRNA และ *colA* (LA0872) ด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

ดีเอ็นเอจากเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 24 ซีโรวาร์ ที่สกัดได้จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน16S rRNA (149) และ *colA* (LA0872) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 5

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ 16S rRNA ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer (Minus $MgCl_2$), dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์แต่ละเส้นความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1ยูนิต/ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อเลปโตสไปราที่สกัดได้ปริมาณ 50 นาโนกรัม นำส่วนประกอบทั้งหมดไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Thermocycler รุ่น T-Gradient Thermoblock (Biometra, Germany) รายละเอียด

ของอุณหภูมิต่างๆที่ใช้ในแต่ละรอบมีดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นกำหนด denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อช่วยให้การสร้างสายของผลผลิต PCR (PCR product) เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide นำ agarose gel ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอและถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation system รุ่น QUANTUM ST4 (Vilber Lourmat, France)

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *colA* (LA0872) ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer (Minus $MgCl_2$), dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์แต่ละเส้นความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต/ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมดีเอ็นเอจากเชื้อเลปโตสไปราที่สกัดได้ปริมาณ 50 นาโนกรัม นำส่วนประกอบทั้งหมดไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Thermocycler รายละเอียดของอุณหภูมิต่างๆที่ใช้ในแต่ละรอบมีดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นกำหนด denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide นำ agarose gel ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอและถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation system

3.4 การโคลนยีน *colA*

3.4.1 การเตรียมชิ้นส่วนยีน *colA*

นำดีเอ็นเอจากเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes ที่สกัดได้มาเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *colA* ทั้งยีน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 5

ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer (Minus $MgCl_2$), dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์แต่ละเส้นมีความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *Pfu* DNA polymerase 1 ยูนิต/ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมดีเอ็นเอของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes ที่สกัดได้ปริมาณ 50 นาโนกรัม นำส่วนประกอบทั้งหมดไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Thermocycler รายละเอียดของอุณหภูมิต่างๆที่ใช้ในแต่ละรอบมีดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นกำหนด denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบผลด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide นำ agarose gel ไปตรวจดูขนาดแถบดีเอ็นเอและตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพื่อนำไปทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลต่อไป

3.4.2 การสกัด *colA* ดีเอ็นเอออกจากเจล

นำ PCR product ที่ตรวจดูขนาดแถบดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis มาตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยนำเจลมาดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Ultraviolet transilluminator รุ่น TFX 20M (Vilber Lourmat, France) แล้วใช้ใบมีดที่สะอาดปราศจากเชื้อตัดลงบนเจลตรงบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกมา โดยพยายามตัดให้มีเจลส่วนเกินน้อยที่สุด หลังจากนั้นนำเจล ที่ตัดออกมาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลเพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาด้วยชุดสกัด FavorPrep^{TM}Gel/PCR Purification mini kit (Favorgen, Taiwan) โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิตดังนี้ ทำการชั่งน้ำหนักเจลและบันทึกน้ำหนักเจลไว้โดยน้ำหนักเจลไม่ควรเกิน 300 มิลลิกรัม เติม FADF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไป แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เจลละลาย เมื่อเจลละลายหมดแล้วให้นำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้อุณหภูมิลดลง หลังจากนั้นดูดสารละลายลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง เติม Wash buffer ที่ผสมเอทานอลลงไปแล้ว ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วเท่าเดิม เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column matrix แห้ง หลังจากนั้นย้ายคอลัมน์ลงหลอดเซนตริฟิวจ์ เติม Elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที จะได้ดีเอ็นเอที่เป็น PCR product ที่ต้องการ นำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nano drop โดย PCR product ที่ได้นี้จะนำไปใช้เชื่อมกับพลาสมิดในขั้นตอนต่อไป

3.4.3 การเชื่อมชิ้นส่วนยีน *colA* กับพลาสมิด

นำ PCR product ที่เตรียมได้ในข้อ 3.4.2 มาเชื่อมกับพลาสมิด pET100/D-TOPO (Invitrogen, USA) (แสดงแผนที่พลาสมิดในภาคผนวก) โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิต อัตราส่วนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ: พลาสมิด ที่ใช้ คือ 10:1 ซึ่งปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ในการเชื่อมกับพลาสมิดนั้นสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ng of insert} = \frac{\text{ng of vector} \times \text{Kb size of insert}}{\text{Kb size of vector}} \times \text{molar ratio of insert / vector}$$

เมื่อแทนค่าจะได้

$$\text{ng of insert} = \frac{15\ \text{ng} \times 2.6\ \text{Kb} \times 10/1}{5.764\ \text{Kb}}$$

$$= 67.66\ \text{ng of insert}$$

ดังนั้น ปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ คือ 67.66 นาโนกรัม

การเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (ยีน *colA* จากเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes) กับพลาสมิด ซึ่งประกอบด้วย ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ปริมาตร 4.4 ไมโครลิตร, Salt Solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และพลาสมิด ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หลังจากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง

3.4.4 การนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

- การเตรียม competent cell โดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์

เตรียม competent cell โดยเขี่ยเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ C43 (DE3) จาก stock ลงบนอาหารแข็ง LB agar (Luria Bertani Agar) บ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนเชื้อเจริญเติบโตในระยะ log phase โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.2-0.4 จากนั้นนำขวดเลี้ยงเชื้อไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เทเชื้อที่เตรียมไว้ลงในหลอดใหม่ขนาด 50 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่เย็นปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปแช่ในน้ำแข็งต่ออีก 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% ผสมให้เข้ากัน จะได้ competent cell ที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอจากภายนอก หลังจากนั้นแบ่ง competent cell ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

- การนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าเซลล์ *Escherichia coli* (Transformation)

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าเซลล์ *E. coli* โดยใช้วิธี heat shock transformation โดยนำ competent cell และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมไว้แช่บนน้ำแข็ง และนำ pipette tips ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าเซลล์ *E. coli* โดยใช้พลาสมิด ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นให้

ความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งต่อทันที เป็นเวลา 2 นาที เติม SOC medium ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมา spread ลงบนอาหารแข็ง LB agar ที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.4.5 การคัดเลือกและตรวจสอบโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

การทดสอบว่าโคโลนีของเซลล์ *E. coli* ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมพิซิลลิน มีชิ้นส่วนของยีน *colA* ที่โคลนเข้าพลาสมิดหรือไม่ โดยใช้วิธี PCR และไพรเมอร์ที่ใช้คือ T7 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 5

ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer (Minus $MgCl_2$), dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์แต่ละเส้นความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต/ไมโครลิตร หลังจากนั้นเลือกโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวลงไปในหลอดสำหรับทำ PCR นำส่วนประกอบทั้งหมดไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่อง Thermocycler รายละเอียดของอุณหภูมิต่างๆที่ใช้ในแต่ละรอบมีดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นกำหนด denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เป็นจำนวน 40 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide นำ agarose gel ไปตรวจดูขนาดแถบดีเอ็นเอและถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation system

3.4.6 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรีย

สกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุดสกัด Nucleospin plasmid (Macherey Nagel, Germany) ทำตามวิธีการของผู้ผลิต โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากโคโลนีที่ตรวจสอบว่าพบแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแบคทีเรียใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลานาน 1 นาที จากนั้น เทส่วนใสทิ้ง เติม Buffer A1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่ 1 แล้วใช้ปิเปตดูดเซลล์ขึ้นลง เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หลังจากนั้นดูดเซลล์จากหลอดเซนตริฟิวจ์ที่ 1 ใส่ลงในหลอดที่ 2 แล้วทำซ้ำด้วยวิธีการเดิมจนครบ 5 หลอด จากนั้นทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยเติม Buffer A2 โดยก่อนนำ Buffer A2 มาใช้ให้ตรวจสอบดูว่ามีตะกอนสีขาวปรากฏหรือไม่ หากมีตะกอนสีขาวเกิดขึ้นให้นำ Buffer A2 ไปต้มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อละลายตะกอนให้หมด แล้วนำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้คลายความร้อนก่อนนำมาใช้ เติม Buffer A2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งหลอดเซนตริฟิวจ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม Buffer A3 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสลงใน Nucleospin column ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายใน collection tube ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้งหากยังเหลือ lysate อยู่ หลังจากนั้นเติม Wash Buffer A4 ที่เติมเอทานอลลงไปแล้ว ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 2 นาทีอีกครั้งแล้วย้าย Nucleospin column ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ เติม Elution Buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที จะได้พลาสมิดจาก *E. coli* แล้วนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nano drop ทำการวิเคราะห์พลาสมิดที่สกัดได้ต่อไป

3.4.7 การยืนยันผลการคัดเลือกโคโลนีด้วยปฏิกิริยา PCR

นำพลาสมิดที่สกัดออกจากเซลล์ *E. coli* มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *colA* ทั้งยีน เพื่อยืนยันว่าโคโลนีของเซลล์ *E. coli* ที่คัดเลือกมามีชิ้นส่วนของยีน *colA* อยู่ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 5

ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer (Minus $MgCl_2$), dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์แต่ละเส้นมีความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต/ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมพลาสมิดที่สกัดได้ ปริมาณ 50 นาโนกรัม นำส่วนประกอบทั้งหมดไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Thermocycler รายละเอียดของอุณหภูมิต่างๆที่ใช้ในแต่ละรอบมีดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นกำหนด denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบผลด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide นำ agarose gel ไปตรวจดูขนาดแถบดีเอ็นเอและถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation system

- การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) และการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่ามีชิ้นส่วนของยีน *colA* อยู่ โดยใช้พลาสมิดที่สกัดออกมาจากเซลล์ *E. coli* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้แสดงในตารางที่ 5 โดยส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทแปซิฟิคไซเอ็นซ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อได้ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาตัดบริเวณของพลาสมิดออกโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.2 หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) โดยใช้โปรแกรม Blastn

ตารางที่ 5: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primer name	Primer sequences (5’ ⟶ 3’)
1) 16S rRNA-F 16S rRNA-R	5’-CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA-3’ 5’-CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA-3’
2) Col F Col R	5’-TCGACAACAGTAAGCGTTAGC-3’ 5’-CGTGCAACGTAACTTCCATTAC-3’
3) Full-colA F Full-colA R	5’-CACCATGATAACGAATATAAAGTATAAGC-3’ 5’-GAAATTACAACTTGAATTCGCAG-3’
4) T7 forward T7 reverse	5’-TAATACGACTCACTATAGGG-3’ 5’-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3’
5) ColA_F1 ColA_R1	5’-GGAATTACGATCAGTATTCGG-3’ 5’-CGTGCAACGTAACTTCCATTAC-3’
6) ColA_F2 ColA_R2	5’-CAAGTCTCAACACAGATTCTC-3’ 5’-CGTGGATAAATCGTATGCCC-3’
7) ColA_F3 ColA_R3	5’-ACATATCAACGTACTCCTGC-3’ 5’-TATGTATTTGACAAAACCGCC-3’
8) ColA_F4 ColA_R4	5’-GACCCGAAAGTCATTCGATCT-3’ 5’-GAAATCTCCATAACGAGCCG-3’

* สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ใช้ไพรเมอร์หมายเลข 4-8

3.5 การเตรียมโปรตีน ColA

3.5.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นการสร้างโปรตีน ColA (Kinetic of protein expression)

หลังจากทำการโคลนยีน *colA* เข้าพลาสมิด pET100/D-TOPO และนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* ได้แล้ว การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ColA ทำโดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากโคลนที่พบชิ้นส่วนของยีน *colA* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเตรียมอาหารเหลว LB ใหม่ที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด ติดป้ายชื่อที่ขวดให้เรียบร้อย โดยกำหนดให้ขวดที่ 1 ไม่เติม IPTG และขวดที่ 2 เติม IPTG แล้วเติมอาหารเหลว LB ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมาแล้วเป็นเวลา16 ชั่วโมง ลงไปในอาหารเหลว LB ขวดใหม่ที่เตรียมไว้ โดยปริมาตรที่ใส่ขวดละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.2-0.4 จึงเติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ลงไปเฉพาะขวดที่ 2 แล้วทำการเก็บอาหารเหลว LB ออกมาขวดละ 1 มิลลิลิตร (ที่ 0 ชั่วโมง) นำอาหารเหลว LB ทั้ง 2 ขวดไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมจนครบเวลา 5 ชั่วโมง โดยเก็บอาหารเหลว LB ที่เวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ หลังจากนั้นนำอาหารเหลว LB ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เก็บ pellet ไว้ นำ pellet ที่ได้มา resuspend ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปผสมกับ SDS-PAGE sample buffer หลังจากนั้นนำไป heat ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลโดย 8% SDS-PAGE

3.5.2 การเตรียมโปรตีน ColA

ทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากโคลนที่พบชิ้นส่วนของยีน *colA* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB ขวดใหม่ที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด โดยเติมอาหารเหลว LB ที่บ่มครบระยะเวลาดังกล่าวลงไปขวดละ 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.2 -0.4 จึงเติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ลงไปทั้ง 2 ขวด แล้วนำไปบ่มต่อโดยเลือกใช้ระยะเวลาในการกระตุ้นโปรตีนตามการศึกษาในข้อ 3.5.1 หลังจากครบระยะเวลาแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเทส่วนสารละลายทิ้งจะเหลือแต่ pellet ของเซลล์แบคทีเรีย ให้นำมา resuspend ด้วย 1X LEW ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงโดยเติม lysozyme ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยเครื่อง Ultrasonic sonicator (Sonics & Materials, USA) โดยใช้ amplitude 40%, pulse on เป็นเวลา 10 วินาที สลับกับ pulse off เป็นเวลา 5 วินาที นาน 3 นาที หรือจนกระทั่งสารละลายใสขึ้น นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกส่วนเศษเซลล์แบคทีเรียออก แล้วดูดส่วนใสเก็บไว้ จะได้ *E. coli* lysate นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.5.3 การทำโปรตีน ColA ให้บริสุทธิ์

เนื่องจากในพลาสมิด pET100/D-TOPO มีส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ polyhistidine tag (6xHis tag) ดังนั้นโปรตีน ColA ที่ถูกกระตุ้นออกมาจะมีส่วนของ 6xHis tag ติดมาด้วย โดย 6xHis tag สามารถจับกับ Ni^{2+} ที่ติดกับ resin ได้ทำให้สามารถแยกโปรตีน ColA ออกมาได้

นำ *E. coli* lysate มาแยกเอาเฉพาะ โปรตีน ColA โดยใช้ nickel-charged resin affinity column (Macherey Nagel, Germany) โดยผสมระหว่าง lysate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับ resin ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสออก แล้วนำมาปั่นล้างโดยเติม 1X LEW ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 1X LEW ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดอีกครั้งทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 2 ครั้งหลังจากนั้นเติม 1X LEW ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วย้าย resin ลงหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม elution buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้ แล้วเติม elution buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 2 ครั้ง จะได้โปรตีน ColA ทั้งหมด 3 fractions แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปตรวจสอบผลโดย 8% SDS-PAGE และย้อมสีเจลด้วย Coomassie blue

3.5.4 การกำจัดเกลือออกจากโปรตีนโดยวิธี Dialysis

นำโปรตีน ColA ที่ได้มากำจัดเกลือออกโดยนำถุงสำหรับทำ dialysis มาแช่ใน 1X LEW หลังจากนั้นหนีบปลายถุงด้านล่างไว้ ตรวจสอบว่ามีการรั่วไหลของสารละลายที่ใส่ในถุงหรือไม่ โดยการดูด 1X LEW ลงในถุง เมื่อตรวจสอบเรียบร้อยให้ดูดเอา 1X LEW ออก แล้วดูดโปรตีน ColA ใส่ลงในถุงสำหรับทำ dialysis หนีบปลายถุงด้านบนไว้ นำถุงสำหรับทำ dialysis ที่ภายในบรรจุโปรตีน ColA ไว้แช่ลงใน 1X LEW ที่มีแท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic stirrer bar) อยู่ในบีกเกอร์ นำไป dialyze บนเครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดย dialyze ไว้ข้ามคืน นำโปรตีน ColA ที่ทำ dialysis แล้วมาทำให้โปรตีนเข้มข้น

ขึ้นโดยใช้ Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Merck Millipore, Germany) หลังจากนั้นนำโปรตีนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.5.5 การหาความเข้มข้นของโปรตีน

วัดความเข้มข้นของ โปรตีน ColA โดยใช้ Pierce® BCA protein assay kit (Thermo Scientific, USA) ดำเนินตามวิธีการของผู้ผลิตโดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน ทำโดยเตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 0, 5, 25, 50, 125, และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเตรียม working reagent โดยเตรียมจาก reagent A และ reagent B โดยใช้อัตราส่วน reagent A: reagent B = 50: 1 นำ working reagent ผสมกับสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆรวมถึง โปรตีน ColA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำมาตั้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น SmartSpec 3000 (Bio-Rad, USA)

3.6 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา

นำโปรตีน ColA มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา โดยใช้วิธี Western Blot เพื่อดูความสามารถของโปรตีน ColA ในการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะกับภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้น เปรียบเทียบกับโปรตีน LipL32

โดยนำโปรตีน ColA และ LipL32 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (8% และ10% gel ตามลำดับ) จากนั้นย้ายแถบโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane ด้วยเครื่องเคลื่อนย้ายโมเลกุลของโปรตีนชนิดกึ่งแห้ง รุ่น Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 25 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ blot ที่ได้มา block ด้วย 10% non-fat milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง blot ด้วย TBST buffer (0.05% Tween20 ใน TBS) จำนวน 3 ครั้ง นำมา probe ด้วยซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่

ได้รับเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 12 ตัวโดยทำการเก็บซีรัมในวันที่ 3, 5 และ 7 หลังจากที่ได้รับเชื้อ โดยใช้ซีรัมเจือจาง 1:200 นำไปบ่มไว้ข้ามคืนตามด้วย peroxidase labeled goat anti hamster IgG ใช้ซีรัมเจือจาง 1:500 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนำ blot ไปล้างด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำ blot ไปตรวจสอบขนาดโปรตีนที่ได้โดยใช้ Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, USA) กับฟิล์มเอ็กซเรย์ (AGFA, China)

3.7 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส

3.7.1 การศึกษาหาปริมาณโปรตีนและความเข้มข้นของซีรัมที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

นำโปรตีน ColA และ LipL32 มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสและผู้ป่วยสครับไทฟัสด้วยวิธี Slot Blot โดยนำ nitrocellulose membrane แช่ใน 1X TBS เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ membrane มาวางบนเครื่อง Slot blot รุ่น Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (Bio-Rad, USA) หลังจากนั้นนำโปรตีน ColA และ LipL32 ปริมาณ 10, 20 และ 50 นาโนกรัม ใส่ลงในแต่ละหลุม แล้วเปิด vacuum เพื่อให้โปรตีนค่อยๆไหลผ่านลงมาที่ nitrocellulose membrane หลังจากนั้นนำ blot มา block ด้วย 10% non-fat milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ blot ล้างด้วย TBST buffer จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมา probe ด้วยซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสและผู้ป่วยสครับไทฟัส ใช้ซีรัมเจือจาง 1:200, 1:400 และ 1:800 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ blot มาล้างด้วย TBST buffer จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำ blot ไป probe ด้วย anti human IgM-HRP ใช้ซีรัมเจือจาง 1:2000 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำ blot ไปล้างด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง ตรวจสอบขนาดโปรตีนที่ได้โดยใช้ Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent กับฟิล์มเอ็กซเรย์

3.7.2 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส

นำโปรตีน ColA มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสที่เป็น acute sera และ convalescent sera จำนวนละ 30 ราย โดยเปรียบเทียบกับโปรตีน LipL32 ด้วยวิธี Slot Blot โดยนำ nitrocellulose membrane แช่ใน 1X TBS เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ membrane มาวางบนเครื่อง Slot blot หลังจากนั้นนำโปรตีน ColA และ LipL32 โดยใช้ปริมาณโปรตีนจากผลการศึกษาในข้อ 3.7.1 ใส่ลงในแต่ละหลุมแล้วเปิด vacuum เพื่อให้โปรตีนค่อยๆไหลผ่านลงมาที่ nitrocellulose membrane นำ blot มา block ด้วย 10% non-fat milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ blot ที่ได้มาล้างด้วย TBST buffer จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมา probe ด้วยซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสที่เป็น acute sera และ convalescent sera โดยใช้ซีรัมเจือจางจากผลการศึกษาในข้อ 3.7.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วย anti human IgM-HRP ใช้ซีรัมเจือจางที่ 1:2000 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ blot ไปล้างด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง ตรวจสอบขนาดโปรตีนที่ได้โดยใช้ Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent กับฟิล์มเอ็กซเรย์

3.7.3 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต

นำโปรตีน ColA มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับซีรัมจากผู้ป่วยสครับไทฟัส ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต โดยใช้จำนวนซีรัมกลุ่มละ 20 ราย เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับ LipL32 ด้วยวิธี Slot Blot โดยนำ nitrocellulose membrane แช่ใน 1X TBS เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ membrane มาวางบนเครื่อง Slot blot หลังจากนั้นนำโปรตีน ColA และ LipL32 โดยใช้ปริมาณโปรตีนจากผลการศึกษาในข้อ 3.7.1 ใส่ลงในแต่ละหลุมแล้วเปิด vacuum เพื่อให้โปรตีนค่อยๆไหลผ่านลงมาที่ nitrocellulose membrane แล้วนำ blot มา block ด้วย 10% non-fat milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ blot ที่ได้มาล้างด้วย TBST buffer จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมา probe ด้วยซีรัมจากผู้ป่วยสครับไทฟัส ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต โดยใช้ซีรัมเจือจางจากผลการศึกษาในข้อ 3.7.1 หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วย anti human IgM-HRP ใช้ซีรัมเจือจางที่ 1:2000 นำไปบ่ม

ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำ blot ไปล้างด้วย TBST จำนวน3 ครั้ง ตรวจสอบขนาดโปรตีนที่ได้โดยใช้ Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent กับฟิล์มเอ็กซเรย์

3.8 การศึกษาความสามารถของโปรตีน ColA ในการย่อยเจลาตินในหลอดทดลอง

3.8.1 การศึกษาความสามารถของ โปรตีน ColA ในการย่อยคอลลาเจน (collagenase activity)

ในการศึกษาความสามารถในการย่อยเจลาตินในหลอดทดลองใช้ชุดทดสอบ EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit (Thermo Scientific, USA) โดยใส่ 1X Reaction buffer ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในหลุมหลังจากนั้นเติมเจลาตินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ติดด้วยสารเรืองแสงปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นผสมกับโปรตีน ColA ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้คอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* เป็นตัวควบคุมบวก นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเมื่อครบเวลาที่ 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวัดการย่อยเจลาตินด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader รุ่น Varioskan Flash (Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น Ex/Em 482/528 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.8.2 การใช้สารยับยั้งคอลลาจีเนสยับยั้งความเป็นเอ็นไซม์ของโปรตีน ColA

ความสามารถในการย่อยคอลลาเจนของโปรตีน ColA ยืนยันโดยการศึกษาการยับยั้งการทำงานของโปรตีน ColA โดยมี 1,10-Phenanthroline monohydrate เป็นตัวยับยั้งเอ็นไซม์ (Inhibitor) ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เติมเจลาตินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ติดด้วยสารเรืองแสงปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นและใช้โปรตีน ColA ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีคอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* เป็นตัวควบคุมบวก นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง

เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเมื่อครบเวลาที่ 8, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปวัดการย่อยเจลาตินด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader ที่ความยาวคลื่น Ex/Em 482/528 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

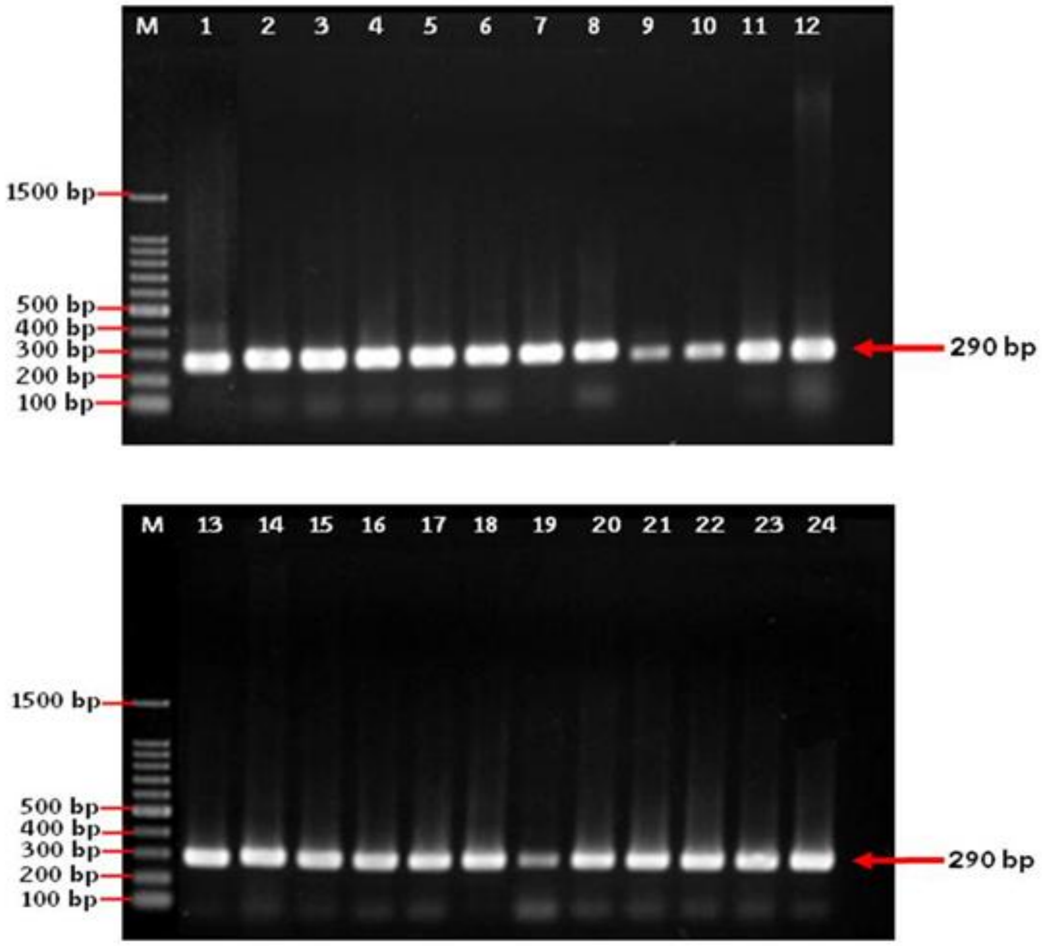
ผลการศึกษา

4.1 การตรวจสอบยีน 16S rRNA และ *colA* ของเชื้อเลปโตสไปรา

จากการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรารวมทั้งสิ้น 24 ซีโรวาร์ (แสดงในตารางที่ 4) และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจหายีน 16S rRNA และ *colA* ผลแสดงในรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16s rRNA ของเชื้อเลปโตสไปราตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 290 bp (รูปที่ 4) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอจากเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 24 ซีโรวาร์

เมื่อนำดีเอ็นเอจากเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 24 ซีโรวาร์ มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *colA* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 209 bp โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะเมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอจากเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรค 23 ซีโรวาร์ (รูปที่ 5; Lane 1-23) ส่วนใน *L. biflexa* serovar Patoc ซึ่งเป็นเลปโตสไปราชนิดที่ไม่ก่อโรค (รูปที่ 5; Lane 24) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าพบยีน *colA* เฉพาะในเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรคเท่านั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

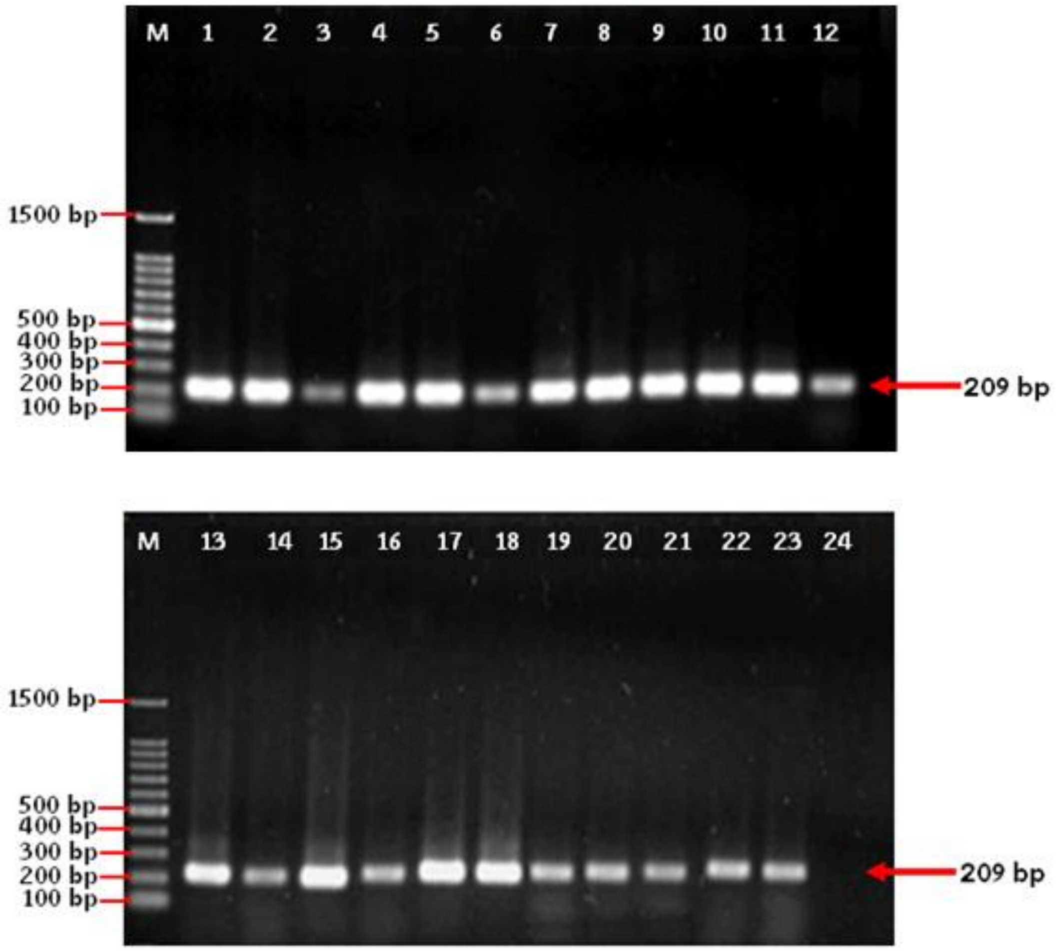


รูปที่ 4: แสดงผลการตรวจหา 16S rRNA ของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี PCR

ดีเอ็นเอสกัดจากเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 24 ซีโรวาร์นำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ 16S rRNA ตรวจสอบผลด้วยการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis

1: Bratislava, 2: Autumnalis, 3: Ballum, 4: Battaviae,
5: Canicola, 6: Cellodoni, 7: Cynopteri, 8: Djasiman,
9: Grippotyphosa, 10: Hebdomadis, 11: Icterohaemorrhagia, 12: Javanica,
13: Louisiana, 14: Manhao, 15: Mini, 16: Panama,
17: Pomona, 18: Pyrogenes, 19: Ranarum, 20: Sarmin,
21: Sejroe, 22: Shermani, 23: Tarassovi, 24: Patoc

เครื่องหมายลูกศรแสดงขนาด PCR product ที่ได้ซึ่งมีขนาด 290 bp; M=100 bp DNA Ladder



รูปที่ 5: แสดงผลการตรวจหายีน *colA* ของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี PCR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดีเอ็นเอสกัดจากเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 24 ซีโรวาร์ นำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *colA* ตรวจสอบผลด้วยการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis

1: Bratislava, 2: Autumnalis, 3: Ballum, 4: Battaviae,
5: Canicola, 6: Cellodoni, 7: Cynopteri, 8: Djasiman,
9: Grippotyphosa, 10: Hebdomadis, 11: Icterohaemorrhagia, 12: Javanica,
13: Louisiana, 14: Manhao, 15: Mini, 16: Panama,
17: Pomona, 18: Pyrogenes, 19: Ranarum, 20: Sarmin,
21: Sejroe, 22: Shermani, 23: Tarassovi, 24: Patoc

เครื่องหมายลูกศรแสดงขนาด PCR product ที่ได้ซึ่งมีขนาด 209 bp; M=100 bp DNA Ladder

4.2 การโคลนยีน *colA*

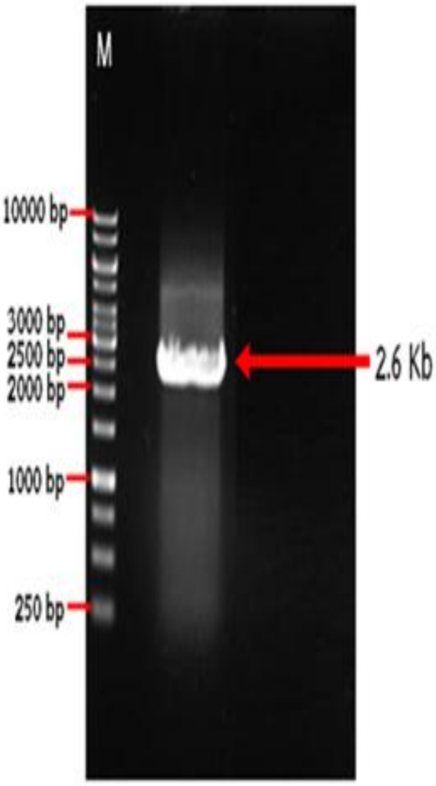
การเพิ่มจำนวนยีน *colA* ทำโดยนำดีเอ็นเอของเชื้อ *L. interrogans* serovar Pyrogenes มาทำ PCR ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มจำนวนยีน *colA* ทั้งยีน เมื่อนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis เมื่อเทียบขนาด PCR product ที่ได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 2.6 Kb (รูปที่ 6) ซึ่งเป็นขนาดที่คาดของยีน *colA*

จากการสกัด PCR product ออกจากเจล นำไปทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปเชื่อมกับพลาสมิด pET100/D-TOPO คาดว่าจะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *colA* (ในที่นี้เรียก pColA) อยู่ ซึ่งทดสอบโดยนำเข้าเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ C43 (DE3) พบโคโลนีจำนวน 27 โคโลนี สุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทดสอบว่ามีพลาสมิดที่มียีน *colA* หรือไม่ จำนวน 15 โคโลนี ด้วยวิธี Colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7 เมื่อนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis เมื่อเทียบขนาด PCR product ที่ได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder พบแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดประมาณ 2.876 Kb ซึ่งเป็นขนาดที่คาดคือเป็นขนาดของยีน *colA* 2.6 Kb รวมกับขนาดของไพรเมอร์ T7 276 bp (รูปที่ 7) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอจาก 5 โคโลนี (Lane 4, 6, 9, 14 และ 15) เลือกโคโลนีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ มาทำการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ *E. coli* การยืนยันผลว่า pColA ที่เตรียมได้มียีน *colA* โดยการนำ pColA มาเป็นต้นแบบในการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *colA* และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pColA ผลของการนำ pColA ไปทำ PCR โดยใช้ไพรเมอรที่จำเพาะต่อยีน *colA* ทั้งยีน พบ PCR product ขนาด 2.6 Kb (รูปที่ 8) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่สกัดจากเซลล์ *E. coli* ที่คัดเลือกมานั้นมีชิ้นส่วนของยีน *colA* อยู่ภายในพลาสมิด

จากผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pColA (แสดงในภาคผนวก) เมื่อนำมาตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 6) พบว่ามีความเหมือนกับ *L. interrogans* serovar Hardjo-prajitno strain Hardjoprajitno (Accession number CP013147.1), *L. interrogans* serovar Hardjo strain Norma (Accession number CP012603.1), *L. interrogans* serovar Bratislava strain PigK151(Accession number CP011410.1), *L. interrogans* serovar Linhai strain 56609 (Accession number CP006723.1), *L. interrogans* serovar Lai strain IPAV (Accession

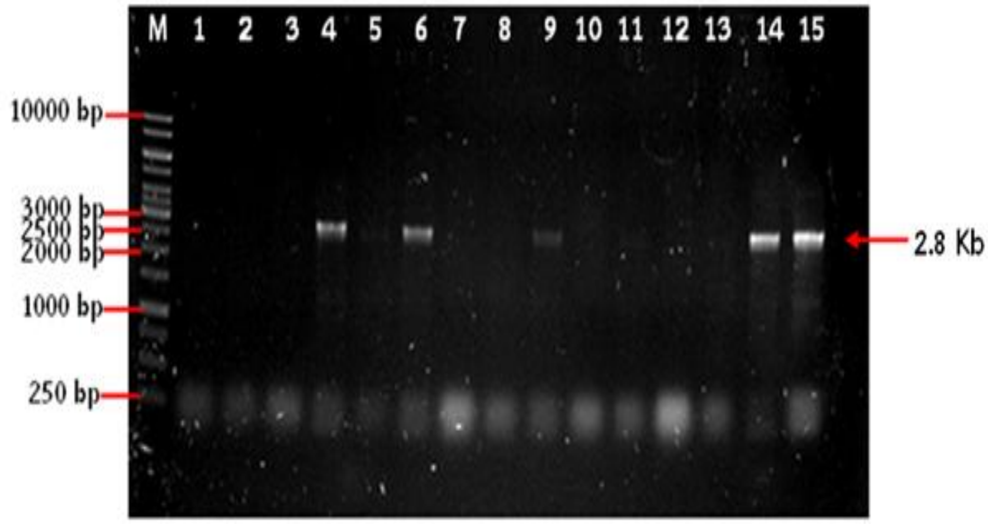
number CP001221.1), *L. interrogans* serovar Lai strain 56601 (Accession number AE010300.2), *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 (Accession number AE016823.1) มีความเหมือน 99% *L. interrogans* serovar Manilae strain UP-MMC-NIID HP (Accession number CP011934.1), *L. interrogans* serovar Manilae strain UP-MMC-NIID LP HP (Accession number CP011931.1) มีความเหมือน 97% *L. borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis strain L550 (Accession number CP000348.1) มีความเหมือน 88% *L. borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis strain JB197 (Accession number CP000350.1), *L. borgpetersenii* serovar Ballum strain 56604 (Accession number CP012029.1) มีความเหมือน 87% และ *L. borgpetersenii* serovar Tarassovi strain Perepelicyn (Accession number JN630476.1) มีความเหมือน 86% เป็นการยืนยันได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนของ *E. coli* ที่คัดเลือกมามีชิ้นส่วนของยีน *colA* ที่มาจากเชื้อเลปโตสไปรา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 6: แสดงผลการตรวจหายีน *colA* ของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes

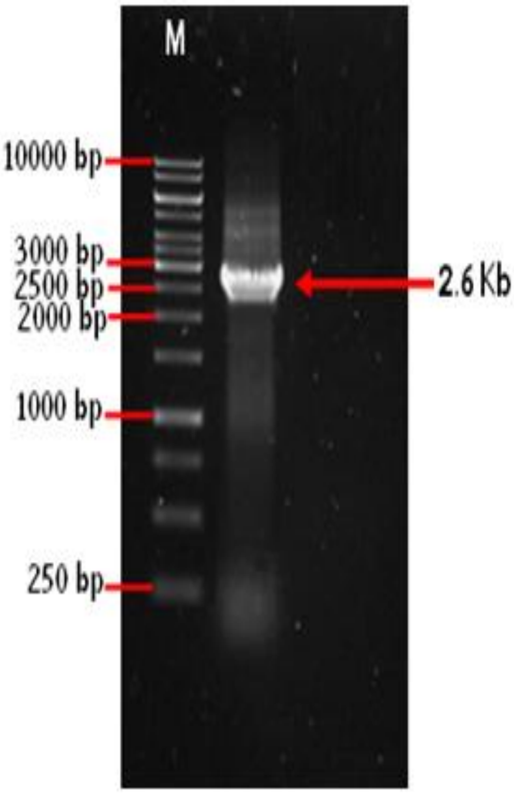
นำดีเอ็นเอของเชื้อ *L. interrogans* serovar Pyrogenes มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *colA* ทั้งยีน ตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis เครื่องหมายลูกศรแสดงขนาด PCR product ซึ่งมีขนาด 2.6 Kb; M= 1Kb DNA Ladder



รูปที่ 7: แสดงผลการตรวจหารีคอมบิแนนท์พลาสมิดในโคโลนี *E. coli*

นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E .coli* จำนวน 15 โคโลนี มาทดสอบโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7 ตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis; Lane 1-15 = จากโคโลนีเดี่ยวที่ขึ้นบนอาหารแข็ง LB agar ที่มีแอมพิซิลลิน เครื่องหมายลูกศรแสดงขนาด PCR product ซึ่งมีขนาดประมาณ 2.8 Kb; M= 1Kb DNA Ladder

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 8: แสดงผลการตรวจหายีน *colA* ในพลาสมิด pColA

นำพลาสมิด pColA ที่เตรียมได้มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *colA* ทั้งยีน ตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis พบ PCR product ขนาดประมาณ 2.6 Kb เครื่องหมายลูกศรแสดงขนาด PCR product ซึ่งมีขนาด 2.6 Kb; M=1Kb DNA Ladder

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

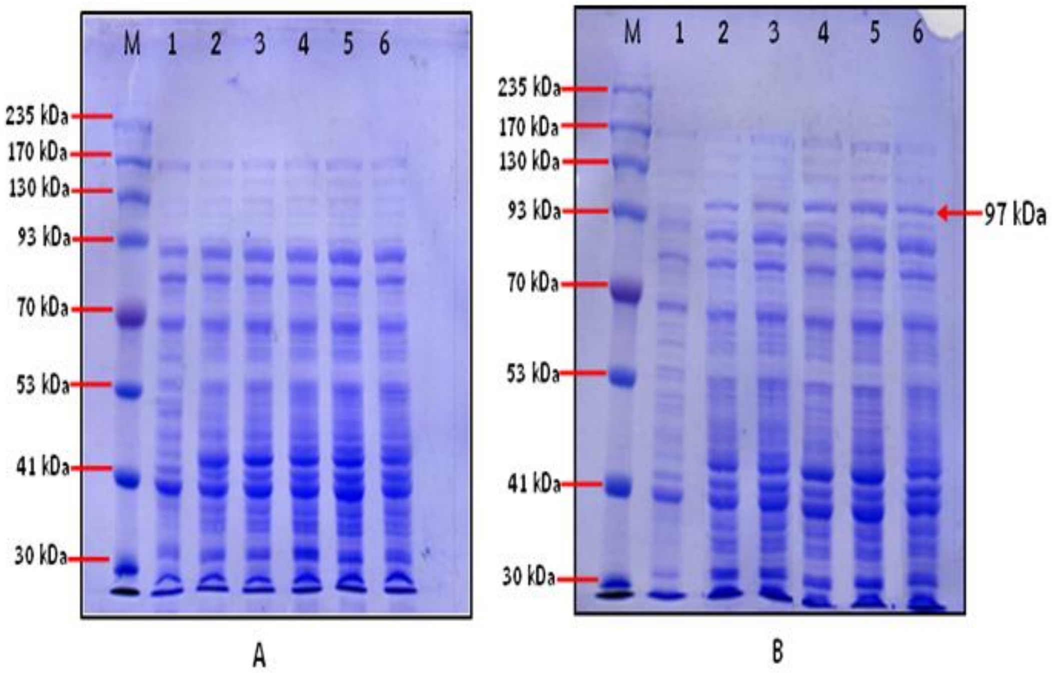
ตารางที่ 6: ค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *colA* ใน pColA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

Description	Identities (%)
1. *Leptospira interrogans* serovar Hardjo-prajitno strain Hardjoprajitno chromosome 1 sequence	99
2. *Leptospira interrogans* serovar Hardjo strain Norma chromosome 1, complete sequence	99
3. *Leptospira interrogans* serovar Bratislava strain PigK151 chromosome 1, complete sequence	99
4. *Leptospira interrogans* serovar Linhaistrain 56609 chromosome 1, complete sequence	99
5. *Leptospira interrogans* serovar Lai strain IPAV chromosome 1, complete sequence	99
6. *Leptospira interrogans* serovar Lai strain 56601 chromosome 1, complete sequence	99
7. *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, chromosome 1, complete sequence	99
8. *Leptospira interrogans* serovar Manilae strain UP-MMC-NIID HP chromosome 1, complete sequence	97
9. *Leptospira interrogans* serovar Manilae strain UP-MMC-NIID LP chromosome 1, complete sequence	97
10. *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis strain L550 chromosome 1, complete sequence	88
11. *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis strain JB197 chromosome 1, complete sequence	87
12. *Leptospira borgpetersenii* serovar Ballum strain 56604 chromosome 1, complete sequence	87
13. *Leptospira borgpetersenii* serovar Tarassovi strain Perepelicyn microbial collagenase (*colA*) gene, partial cds	86

4.3 การแสดงออกของโปรตีน ColA

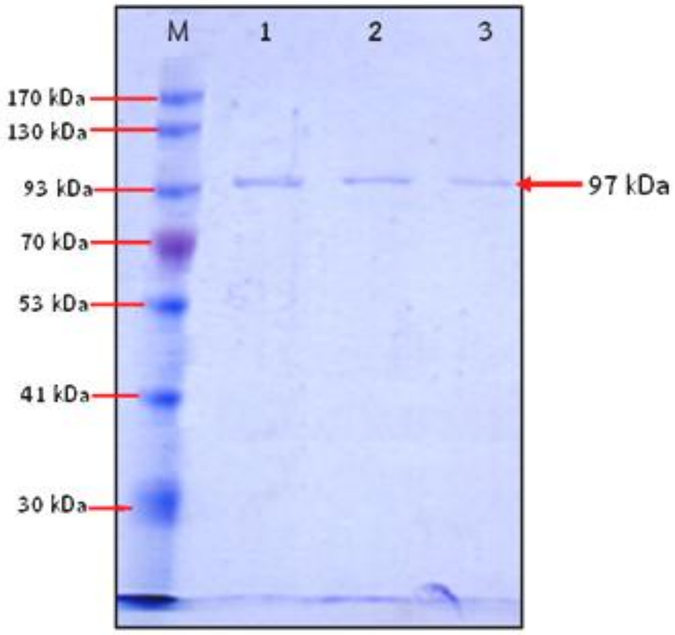
เมื่อเตรียมและทดสอบแล้วว่าพลาสมิด pColA มีชิ้นส่วนของยีน *colA* ลำดับต่อไปคือการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน ColA จากพลาสมิด pColA ที่ได้ โดยกระตุ้นด้วย IPTG ขั้นตอนแรกเป็นการหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นการสร้างโปรตีน โดยนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิด pColA (ในที่นี้จะเรียก pColA *E.coli*) มากระตุ้นการสร้างโปรตีน โดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวกระตุ้น เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่ได้มาตรวจสอบผลโดย 8% SDS-PAGE (รูปที่ 9) พบแถบโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นโปรตีน ColA ซึ่งปรากฏขึ้นเมื่อมีการเติม IPTG ลงไปกระตุ้น (รูปที่ 9B; Lane 2-6) ในขณะที่เมื่อไม่มีการเติม IPTG ลงไปกระตุ้นจะไม่พบแถบโปรตีนปรากฏขึ้น (รูปที่ 9A) เมื่อเทียบขนาดของแถบโปรตีนที่ได้กับแถบโปรตีนมาตรฐานพบว่าแถบโปรตีนมีขนาดประมาณ 97 kDa ซึ่งเป็นขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่ได้จากการทำนายลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง แถบโปรตีนที่ได้จะมีขนาดหนากว่าที่ระเวลาอื่นๆ (รูปที่ 9B; Lane 5) และเมื่อกระตุ้นโปรตีนเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แถบโปรตีนที่ได้จะมีขนาดบางลง (รูปที่ 9B; Lane 6) จึงเลือกระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่ 4 ชั่วโมง ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีน ColA

เมื่อทราบระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นการสร้างโปรตีน ColA แล้ว หลังจากนั้นเตรียมการกระตุ้นโปรตีนในปริมาณมาก (large scale) โดยนำ pColA *E.coli* มากระตุ้นการสร้างโปรตีนโดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวกระตุ้น ทำโปรตีนที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยใช้ nickel-charged resin affinity column ตรวจสอบผลโปรตีนที่เตรียมได้ด้วย 8% SDS-PAGE ในรูปที่ 10 แสดงผลการทดสอบโปรตีนที่ได้จากการ elute คอลัมน์จำนวน 3 fractions พบแถบของ โปรตีน ColA ปรากฏขึ้นทั้ง 3 fractions เมื่อเทียบขนาดของแถบโปรตีนที่ได้กับแถบโปรตีนมาตรฐาน พบว่าแถบโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 97 kDa (การหาขนาดโปรตีนจาก SDS-PAGE แสดงในภาคผนวก) นำโปรตีนที่ได้ไปตรวจหาปริมาณโปรตีนได้โปรตีนความเข้มข้น 148 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 9: แสดงผลการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างโปรตีน ColA

นำ pColA *E.coli* มาเลี้ยงในภาวะที่ไม่มี (A) และมี IPTG (B) เก็บเชื้อที่ 0 และทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 5 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมาทดสอบด้วย 8% SDS-PAGE ย้อมสีเจลด้วย Coomassie blue จะเห็นได้ว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี IPTG (B) จะมีการสร้างโปรตีนขนาดประมาณ 97 kDa ซึ่งไม่พบเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยไม่มี IPTG (A) Lane 1= 0 ชั่วโมง, Lane 2= 1 ชั่วโมง, Lane 3 =2 ชั่วโมง, Lane 4= 3 ชั่วโมง, Lane 5= 4 ชั่วโมง และ Lane 6=5 ชั่วโมง เครื่องหมายลูกศรแสดงขนาดของโปรตีน ColA ซึ่งมีขนาดประมาณ 97 kDa; M= Protein molecular weight markers



รูปที่ 10: แสดงผลการทดสอบโปรตีน ColA หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วย nickel-charged resin affinity column

นำโปรตีนที่ได้หลังจากการผ่าน nickel-charged resin affinity column จำนวน 3 fractions มาตรวจสอบด้วย 8% SDS-PAGE แล้วย้อมสีเจลด้วย Coomassie blue พบแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 97 kDa Lane 1-3 = โปรตีนที่ถูก eluted ออกมาในรอบที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เครื่องหมายลูกศรแสดงขนาดของโปรตีน ColA ซึ่งมีขนาดประมาณ 97 kDa; M= Protein molecular weight markers

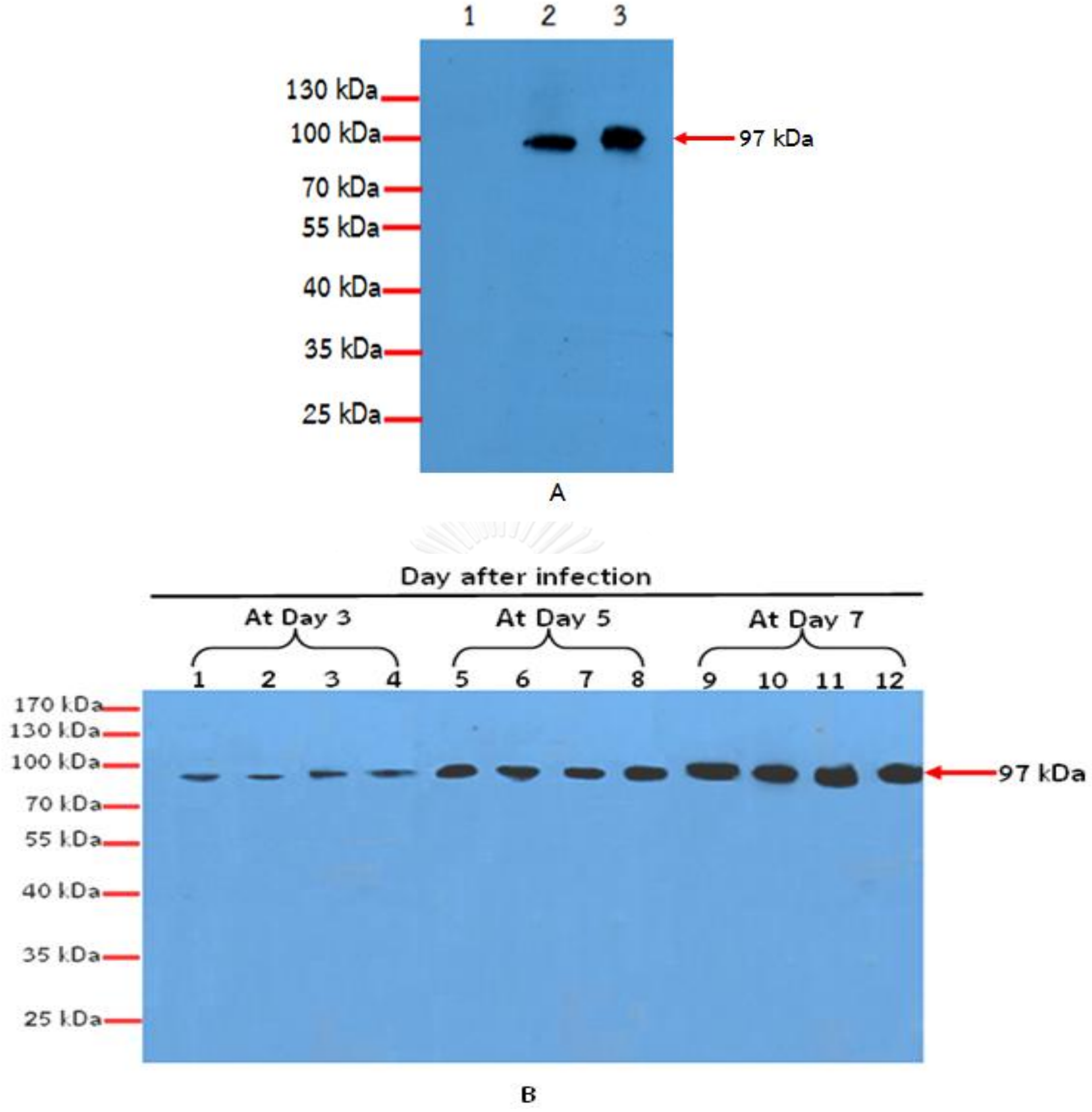
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.4 ปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา

ขั้นตอนต่อไปเป็นการทดสอบว่าโปรตีน ColA ที่เตรียมได้สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมของแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อหรือไม่ ซีรัมแฮมสเตอร์ได้จากงานวิจัยของ Lowanitchapat A และคณะ (109) โดยนำโปรตีน ColA ที่เตรียมได้มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อด้วยวิธี Western blot

รูปที่ 11A แสดงผลการทดสอบโปรตีน ColA กับซีรัมแฮมสเตอร์ที่ไม่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา แฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปราและซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 97 kDa ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับโปรตีน ColA ที่เตรียมได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อและซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส แต่ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวเมื่อทดสอบกับซีรัมแฮมสเตอร์ที่ไม่ได้รับเชื้อ เมื่อนำโปรตีน ColA มาทดสอบกับซีรัมแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปราเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน (รูปที่ 11B) พบว่าโปรตีน ColA สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปราตั้งแต่ในวันที่ 3 หลังจากที่ได้รับเชื้อ (รูปที่ 11B; Lane 1-4) ความเข้มและความหนาของแถบโปรตีนมากขึ้นเมื่อทดสอบกับซีรัมที่เก็บ 5 และ 7 วันหลังได้รับเชื้อ (รูปที่ 11B; Lane 5-12)

เนื่องจาก LipL32 เป็นโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่มีการศึกษามาก (27) จึงเลือกมาทดสอบในการศึกษานี้ด้วย จากการทดสอบโปรตีน LipL32 ปริมาณที่เท่ากันคือ 100 นาโนกรัม เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปราพบว่าแถบโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 32 kDa ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีน LipL32 เมื่อทดสอบกับซีรัมแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อ 5 และ 7 วัน (รูปที่ 12; Lane 5-12) แต่ไม่พบแถบโปรตีนของ LipL32 เมื่อทดสอบด้วยซีรัมจากแฮมเตอร์ที่ได้รับเชื้อ 3 วัน (รูปที่ 12; Lane 1-4)

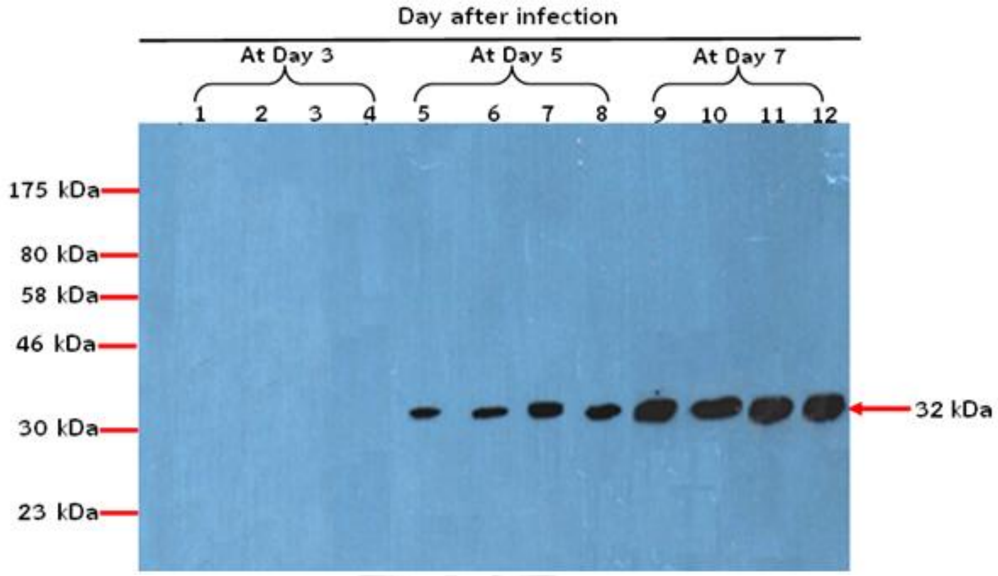


รูปที่ 11: แสดงผลจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา

(A) Western blot จากการนำโปรตีน ColA มาทดสอบกับซีรัมแฮมสเตอร์ที่ไม่ได้รับเชื้อ (Lane 1) ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา (Lane 2) และซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส (Lane 3)

(B) Western blot จากการนำโปรตีน ColA มาทำปฏิกิริยากับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่เก็บ 3 วันหลังจากรับเชื้อเลปโตสไปรา Lane 1-4; 5 วันหลังจากรับเชื้อเลปโตสไปรา Lane 5-8; และ 7 วันหลังจากรับเชื้อเลปโตสไปรา Lane 9-12

เครื่องหมายลูกศรแสดงขนาดของโปรตีน ColA ซึ่งมีขนาดประมาณ 97 kDa; M= Protein molecular weight markers



รูปที่ 12: แสดงผลจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีน LipL32 กับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา

Western blot จากการนำโปรตีน LipL32 มาทำปฏิกิริยากับซีรัมจากแฮมสเตอร์ที่เก็บ 3 วันหลังจากรับเชื้อเลปโตสไปรา Lane 1-4; 5 วันหลังจากรับเชื้อเลปโตสไปรา Lane 5-8; และ 7 วันหลังจากรับเชื้อเลปโตสไปรา Lane 9-12

เครื่องหมายลูกศรแสดงขนาดของโปรตีน LipL32 ซึ่งมีขนาดประมาณ 32 kDa; M= Protein molecular weight markers

4.5 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส

ขั้นตอนต่อไปเป็นการทดสอบปฏิกิริยาของโปรตีน ColA ที่เตรียมได้กับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส

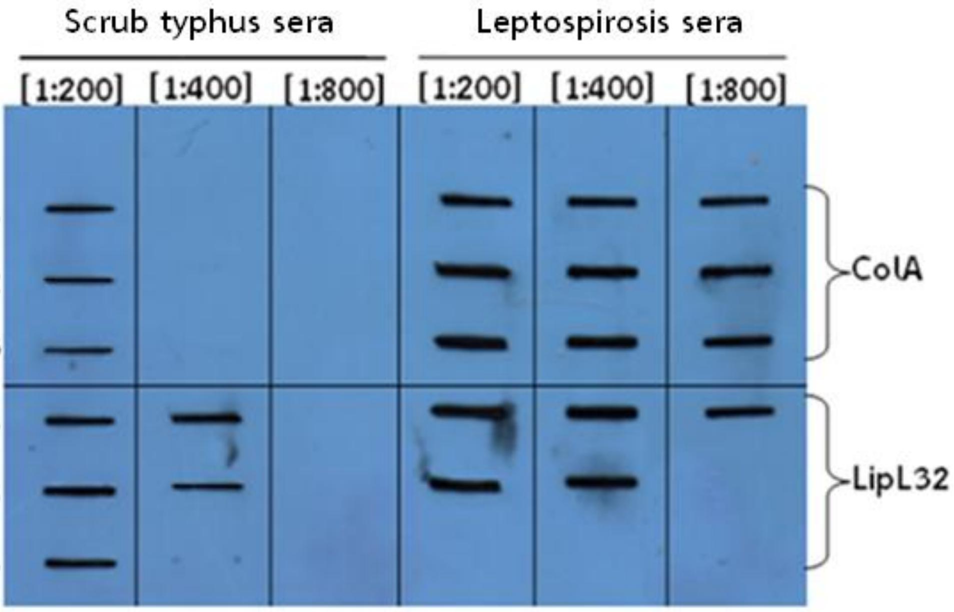
4.5.1 การศึกษาหาปริมาณโปรตีนและความเข้มข้นของซีรัมที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

จากการหาปริมาณโปรตีนและความเข้มข้นของซีรัมที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา โดยนำโปรตีน ColA และ LipL32 ปริมาณ 10, 20 และ 50 นาโนกรัม มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสและผู้ป่วยสครับไทฟัส ที่เจือจาง 1:200, 1:400 และ 1:800 โดยใช้วิธี Slot Blot พบว่าโปรตีน ColA ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 50 นาโนกรัม พบแถบโปรตีนปรากฏขึ้นเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส ที่เจือจาง 1:200, 1:400 และ 1:800 ในขณะที่โปรตีน LipL32 พบแถบโปรตีนปรากฏเมื่อใช้โปรตีน 20 และ 50 นาโนกรัม เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสที่เจือจาง 1:200 และ 1:400 ส่วนเมื่อใช้ซีรัมที่เจือจาง 1:800 พบแถบโปรตีนเฉพาะเมื่อทดสอบกับโปรตีน 50 นาโนกรัมเท่านั้น ในขณะที่ 10 นาโนกรัม ไม่พบแถบโปรตีนปรากฏขึ้นเลยไม่ว่าจะใช้ซีรัมที่เจือจาง 1:200, 1:400 และ 1:800 (รูปที่ 13)

เมื่อนำโปรตีน ColA และ LipL32 มาทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส โดยใช้โปรตีนปริมาณ 10, 20 และ 50 นาโนกรัม และซีรัมเจือจาง 1:200, 1:400 และ 1:800 พบว่าโปรตีน ColA 10, 20 และ 50 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัสที่เจือจาง 1:200 เท่านั้น ในขณะที่โปรตีน LipL32 10, 20 และ 50 นาโนกรัมทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัสที่เจือจาง 1:200 เช่นเดียวกัน แต่ซีรัมที่เจือจาง 1:400 ก็เกิดปฏิกิริยากับ LipL32 20 และ 50 นาโนกรัมเช่นกัน โดยโปรตีน 50 นาโนกรัมให้แถบโปรตีนเข้มกว่าเมื่อใช้โปรตีน 20 นาโนกรัม (รูปที่ 13)

จากผลการศึกษาที่ได้จึงเลือกใช้โปรตีน ColA และ LipL32 ปริมาณ 20 นาโนกรัม และซีรัมเจือจาง 1:400 มาใช้ในการศึกษาต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



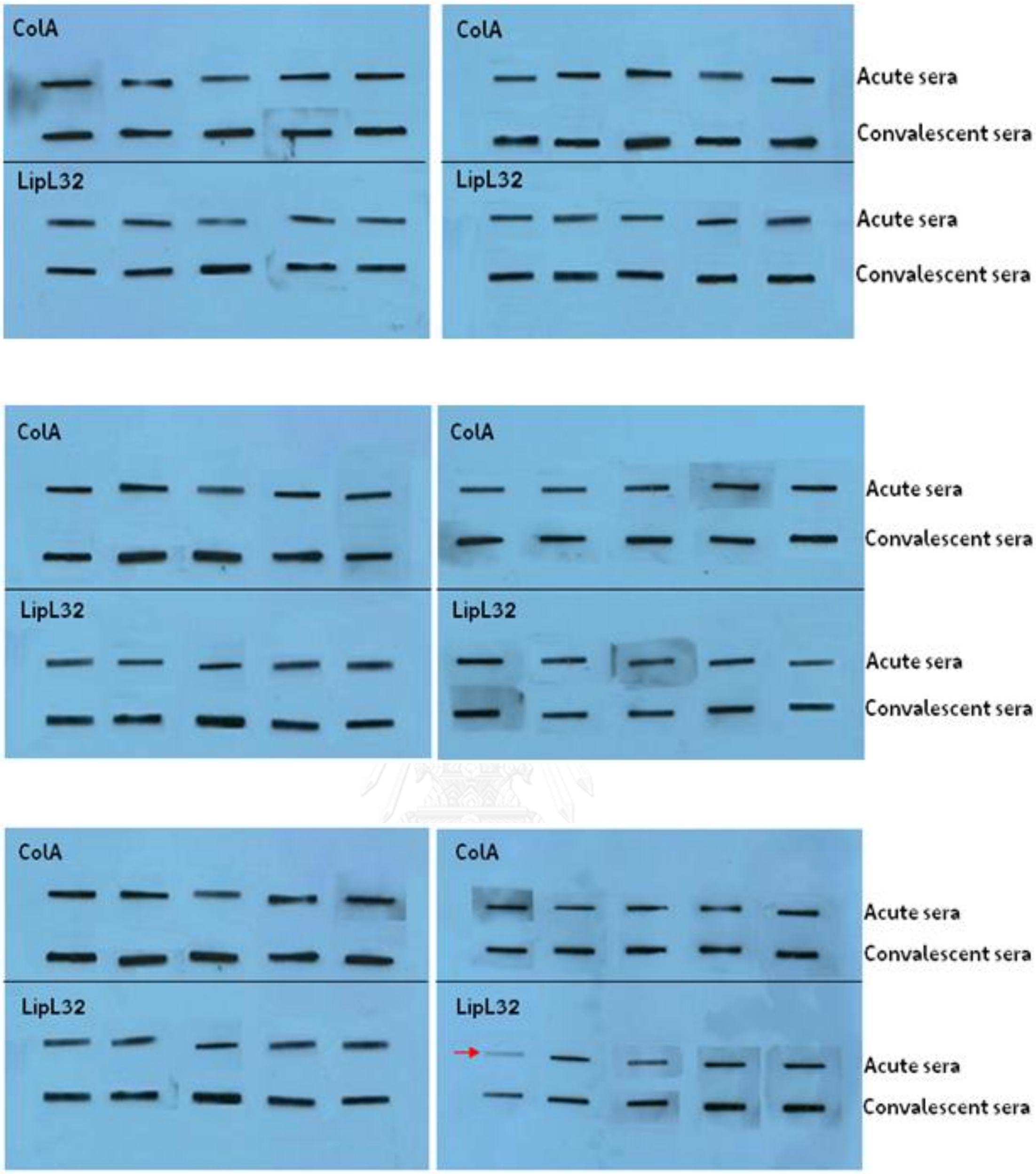
รูปที่ 13: การหาปริมาณโปรตีนและการเจือจางซีรัมที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับโปรตีน ColA และ LipL32

นำโปรตีน ColA และ LipL32 มาทดสอบปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัสและผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส ด้วยวิธี Slot blot แถวที่ 1-3 = โปรตีน ColA 50, 20, 10 นาโนกรัมตามลำดับ แถวที่ 4-6 = โปรตีน LipL32 50, 20, 10 นาโนกรัมตามลำดับ ใช้ซีรัมจากผู้ป่วยสครับไทฟัสและซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสที่เจือจาง 1: 200, 1: 400 และ 1: 800 โดยใช้เวลาในการประกบฟิล์ม 10 วินาที จากผลการศึกษานี้ได้เลือกปริมาณของโปรตีนที่ 20 นาโนกรัม และซีรัมเจือจางที่ 1: 400

4.5.2 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส

เมื่อได้ปริมาณของโปรตีน คือ 20 นาโนกรัม และการเจือจางซีรัมที่เหมาะสม คือ 1:400 แล้ว ขั้นตอนต่อไปจะนำโปรตีน ColA และ LipL32 มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสโดยในการศึกษานี้ใช้ acute sera และ convalescent sera จากผู้ป่วยจำนวนละ 30 ราย นำมาทดสอบด้วยวิธี Slot Blot ผลแสดงในรูปที่ 14 พบว่าทั้งโปรตีน ColA และ LipL32 สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสได้ โดยพบแถบโปรตีนเมื่อทดสอบกับ acute sera และ convalescent sera จากผู้ป่วยทั้ง 30 ราย acute sera จากผู้ป่วย 1 ราย (เครื่องหมายลูกศร) เมื่อทดสอบกับโปรตีน LipL32 พบแถบโปรตีนมีความเข้มน้อยกว่าแถบโปรตีนจากโปรตีน ColA อย่างเห็นได้ชัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 14: การทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA และ LipL32 กับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส

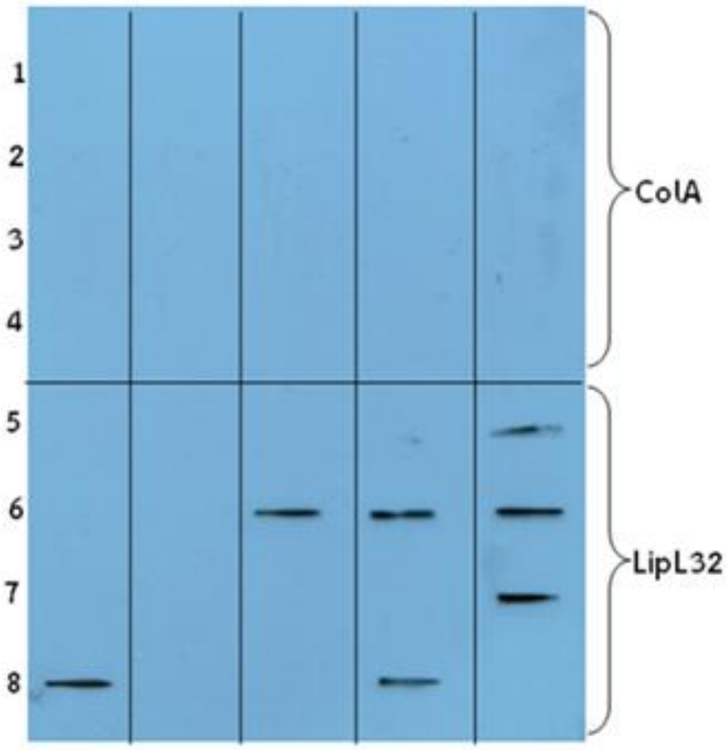
นำโปรตีน ColA และ LipL32 20 นาโนกรัม มาทดสอบกับ acute sera และ convalescent sera จากผู้ป่วยเลปโตสโรซิส จำนวนละ 30 ราย ที่ซีรัมเจือจาง 1:400 โดยใช้วิธี Slot blot ใช้เวลาในการประกบฟิล์ม 10 วินาที เครื่องหมายลูกศรชี้ผลจากการทดสอบกับ acute serum ของผู้ป่วย 1 ราย ที่เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีน LipL32 แถบโปรตีนที่ได้จะมีความเข้มน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนที่ได้จากโปรตีน ColA

4.5.3 การศึกษาปฏิกิริยาของโปรตีน ColA กับซีรัมจากผู้ป่วยสครับไทฟัส ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต

ขั้นตอนต่อไปเป็นการทดสอบความจำเพาะของโปรตีน ColA และ LipL32 โดยนำมาทดสอบกับซีรัมจากผู้ป่วยสครับไทฟัส ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต โดยใช้จำนวนซีรัมกลุ่มละ 20 ราย ทดสอบด้วยวิธี Slot Blot ใช้โปรตีน ColA 20 นาโนกรัม ซีรัมเจือจาง 1:400 พบว่าเมื่อใช้โปรตีน ColA ไม่พบแถบโปรตีนปรากฏขึ้นเมื่อทดสอบกับซีรัมจากผู้ป่วยสครับไทฟัส ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต (รูปที่ 15, 16, และ 17 ตามลำดับ)

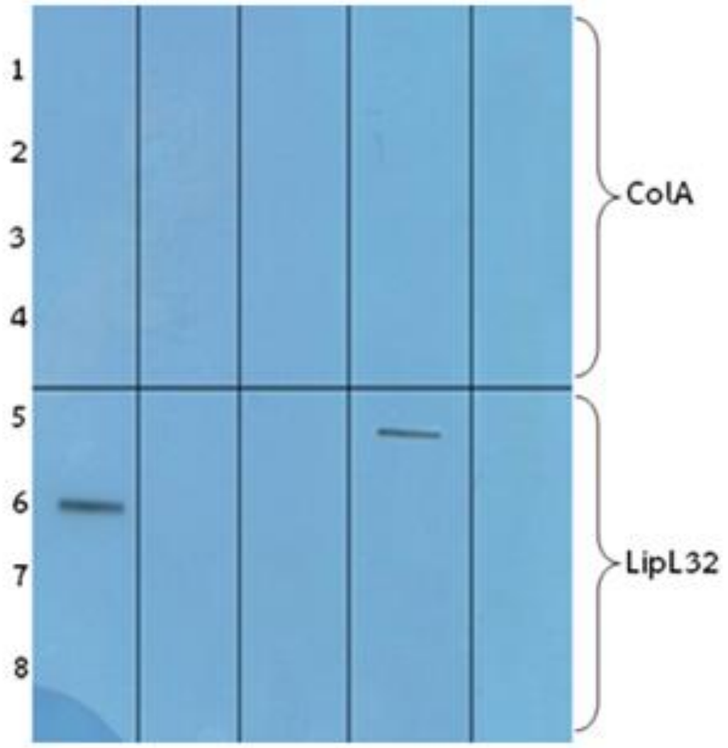
เมื่อนำโปรตีน LipL32 ปริมาณเท่ากันคือ 20 นาโนกรัม มาทดสอบกับซีรัมทั้ง 3 กลุ่ม ที่เจือจาง 1:400 พบแถบโปรตีนปรากฏขึ้น เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส จำนวน 7 ราย (รูปที่ 15) และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ จำนวน 2 ราย (รูปที่ 16) และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต จำนวน 2 ราย (รูปที่ 17) จากผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน ColA มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยามากกว่าโปรตีน LipL32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



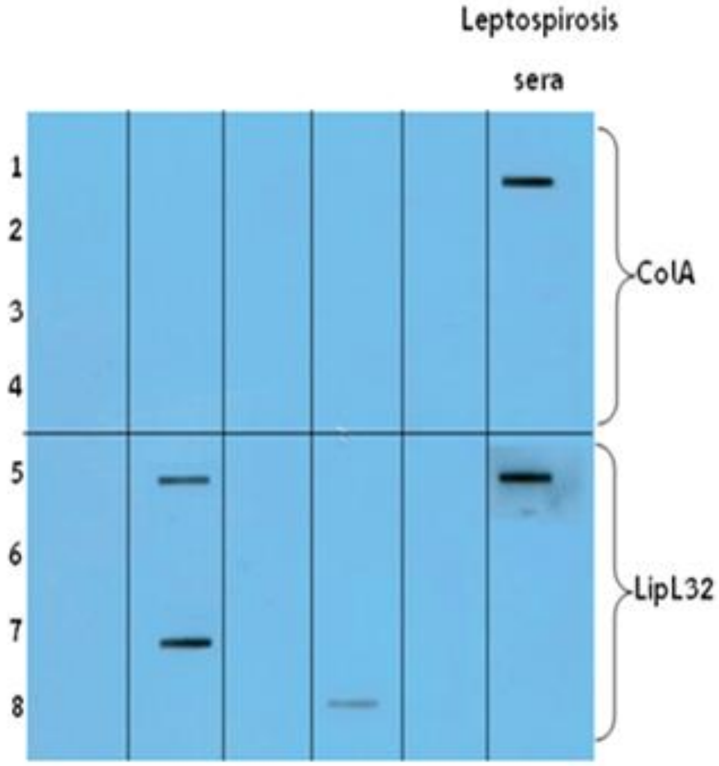
รูปที่ 15: การทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA และ LipL32 กับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส

นำโปรตีน ColA และ LipL32 มาทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัสจำนวน 20 ราย โดยใช้วิธี Slot blot แถวที่ 1-4 = โปรตีน ColA และแถวที่ 5-8= โปรตีน LipL32 ปริมาณโปรตีนที่ใช้ คือ 20 นาโนกรัม และซีรัมเจือจางที่ 1:400 พบแถบโปรตีนเมื่อใช้โปรตีน LipL32 ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส 7 ราย



รูปที่ 16: การทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA และ LipL32 กับซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่

นำโปรตีน ColA และ LipL32 มาทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ จำนวน 20 ราย โดยใช้วิธี Slot blot แถวที่ 1-4 = โปรตีน ColA และแถวที่ 5-8= โปรตีน LipL32 ปริมาณโปรตีนที่ใช้ คือ 20 นาโนกรัม และซีรัมเจือจางที่ 1:400 พบแถบโปรตีนเมื่อใช้โปรตีน LipL32 ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ 2 ราย



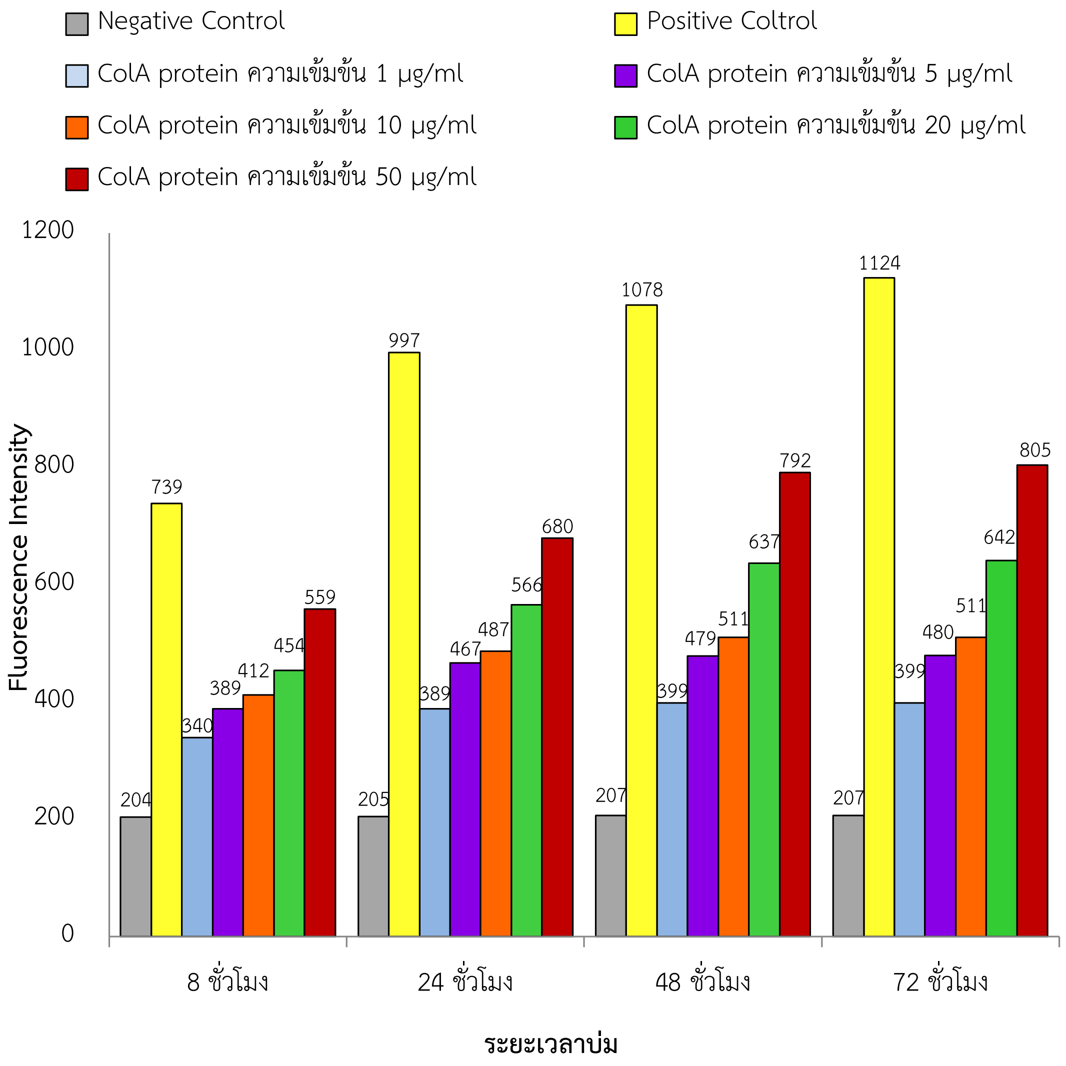
รูปที่ 17: การทำปฏิกิริยาของโปรตีน ColA และ LipL32 กับซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต

นำโปรตีน ColA และ LipL32 มาทดสอบกับซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต จำนวน 20 ราย โดยใช้วิธี Slot blot แถวที่ 1-4 = โปรตีน ColA และแถวที่ 5-8= โปรตีน LipL32 ปริมาณโปรตีนที่ใช้ คือ 20 นาโนกรัม และซีรัมเจือจางที่ 1:400 พบแถบโปรตีนเมื่อใช้โปรตีน LipL32 ทำปฏิกิริยากับซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต 3 ราย

4.6 การศึกษาความสามารถของ โปรตีน ColA ในการย่อยเจลาตินในหลอดทดลอง

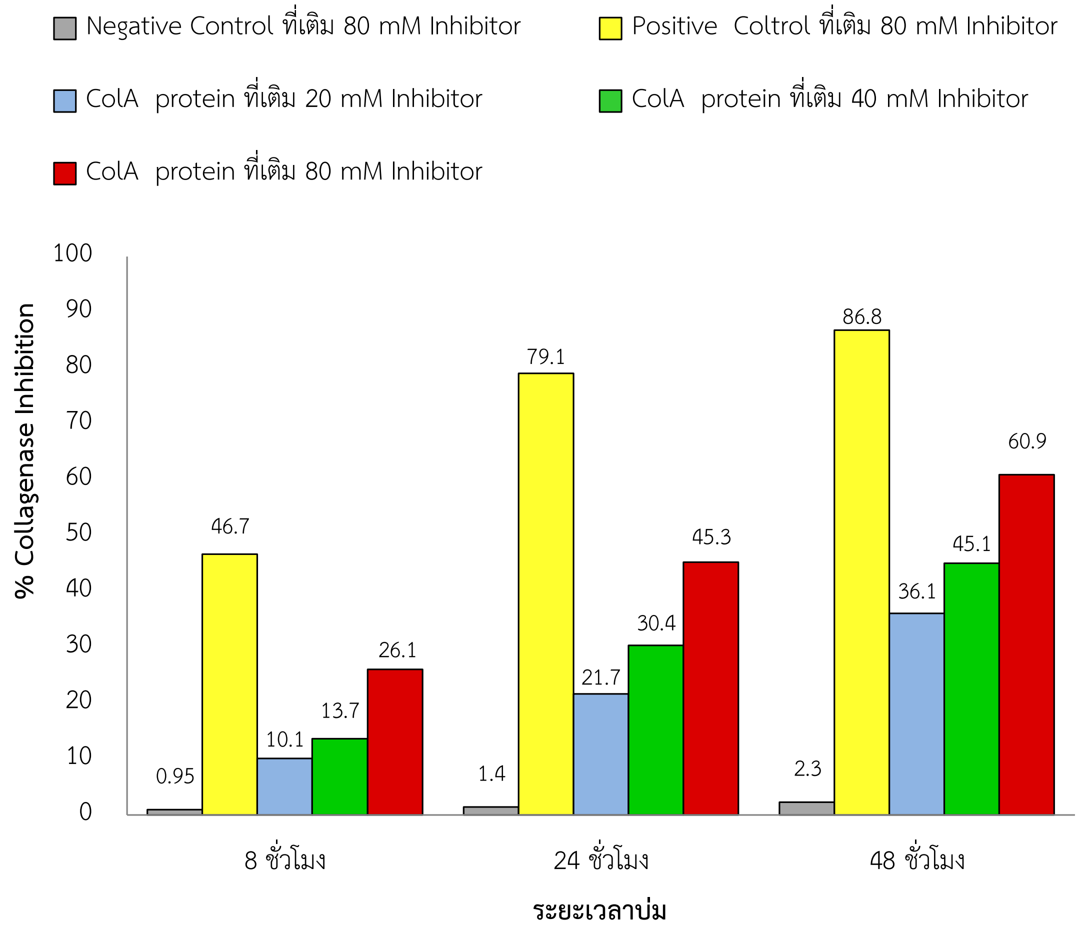
ผลการทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสแสดงว่าโปรตีน ColA สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยได้และสนับสนุนว่าน่าจะสามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ เนื่องจากรายงานการพบยีน *colA* สันนิษฐานว่าเป็นยีนสำหรับเอ็นไซม์คอลลาจีเนส ขั้นตอนต่อไปจึงทดลองความเป็นเอ็นไซม์ของโปรตีน ColA ที่เตรียมได้โดยทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน จากการนำโปรตีน ColA ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับเจลาตินที่ติดด้วยสารเรืองแสง 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำไปวัดการย่อยเจลาตินโดยการวัดความเข้มการเรืองแสงด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader พบว่าโปรตีน ColA ที่เตรียมได้มีความสามารถในการย่อยเจลาตินได้ (รูปที่ 18) โดยพบว่าโปรตีน ColA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถย่อยเจลาตินได้และสามารถย่อยได้เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีน ColA เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีการบ่มนานขึ้นค่าที่วัดได้ก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน แต่เมื่อบ่มครบที่ 72 ชั่วโมง พบว่าค่าที่วัดได้มีค่าแตกต่างเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับบ่มครบที่ 48 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ใช้คอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* 0.2 ยูนิต/มิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมบวก ซึ่งก็พบว่าเมื่อมีการบ่มนานขึ้นก็มีความสามารถในการย่อยเจลาตินเพิ่มขึ้นเช่นกัน

การทดสอบยืนยันความสามารถในการเป็นเอ็นไซม์คอลลาจีเนสของโปรตีน ColA ทำโดยใช้ 1,10-Phenanthroline monohydrate ซึ่งเป็นตัวยับยั้งคอลลาจีเนสเมื่อใช้โปรตีน ColA ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและความเข้มข้นของตัวยับยั้งเอ็นไซม์ที่ 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เมื่อนำไปวัดค่าความเข้มการเรืองแสง พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ได้ (รูปที่ 19) โดยเมื่อปริมาณของตัวยับยั้งเอ็นไซม์เพิ่มขึ้นก็สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน ColA ได้เพิ่มมากขึ้น และเมื่อใช้เวลาในการบ่มนานขึ้นก็สามารถยับยั้งการย่อยเจลาตินได้มากขึ้นเช่นกัน โดยเมื่อเทียบกับการยับยั้งการทำงานของคอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* พบว่าตัวยับยั้งเอ็นไซม์ที่ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ เกิดการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์เช่นเดียวกัน และสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการบ่มนานขึ้น



รูปที่ 18: การศึกษาความสามารถของ โปรตีน ColA ในการย่อยเจลาติน

นำโปรตีน ColA ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาบ่มกับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจลาตินที่ติดด้วยสารเรืองแสง ทำการวัดค่าความเข้มการเรืองแสง เมื่อบ่มครบเวลาที่ 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้คอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* เป็นตัวควบคุมบวก



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 19: การศึกษาการยับยั้งความสามารถของ โปรตีน ColA ในการย่อยเจลาตินโดยตัวยับยั้งคอลลาจีเนส

นำโปรตีน ColA 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาบ่มกับเจลาตินที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 100 ไมโครกรัม/มิลิลิตร ในภาวะที่มีตัวยับยั้งคอลลาจีเนส 1, 10-Phenanthroline monohydrate ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความเข้มการเรืองแสงเมื่อบ่มครบเวลาที่ 8, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้คอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* เป็นตัวควบคุมบวก

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ พบการเกิดโรคเพิ่มขึ้นทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศที่กำลังพัฒนา (43) เนื่องจากอาการที่แสดงออกของโรคคล้ายคลึงกับโรคติดเชื้อชนิดอื่น ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการรุนแรงเกี่ยวข้องกับอวัยวะต่างๆ และอาจถึงแก่ชีวิตได้ หากไม่ได้รับการวินิจฉัยและรักษาที่ถูกต้องรวดเร็ว (150) งานวิจัยเลปโตสไปโรซิสในปัจจุบันจึงเน้นในแง่การศึกษากลไกการก่อพยาธิสภาพ การพัฒนาวัคซีนที่สามารถป้องกันการติดเชื้อแบบข้ามกลุ่มและการพัฒนาการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยวินิจฉัยได้ถูกต้องและรวดเร็ว

จุลชีพอาศัยส่วนประกอบของจุลชีพในการทำให้โฮสต์ติดเชื้อและเกิดพยาธิสภาพ เช่น ใช้ในการเกาะยึด การบุกรุก การทำลายเนื้อเยื่อของโฮสต์ ข้อมูลการศึกษาส่วนประกอบของเลปโตสไปราทั้งวิธีทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล จึงมีประโยชน์มากในการนำมาศึกษาต่อยอดทั้งในด้านการก่อพยาธิสภาพ การพัฒนาวัคซีนและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ จากรายงานจีโนมของเชื้อเลปโตสไปรา พบว่ามียีนที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างปัจจัยก่อโรค (virulence factors) ส่วนประกอบของเลปโตสไปราที่ได้รับการสนใจศึกษา มักเป็นส่วนที่อยู่ส่วนนอกของเชื้อ หรือหลั่งออกมาจากเชื้อ และมีการแสดงออกเมื่อเชื้ออยู่ในโฮสต์ เพราะนอกจากอาจจะเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะยึดกับเซลล์ของโฮสต์ หรือเป็นสารพิษที่ทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อของโฮสต์แล้วยังเป็นส่วนที่รับรู้ได้โดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ง่าย เหมาะในการเป็นเป้าหมายในการพัฒนาวัคซีนและการตรวจทางห้อปฏิบัติการ

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยสนใจศึกษายีน LA0872 ที่รายงานโดย Ren และคณะ (36) ว่าน่าจะเป็นยีนสำหรับการสร้างคอลลาจีเนส เนื่องจากเลปโตสไปราก่อโรคสามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพของทั้งคนและสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อ และยังมีรายงานว่าคอลลาจีเนสของแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Clostridium histolyticum* และ *Pseudomonas aeruginosa* มีบทบาทสำคัญในการก่อพยาธิสภาพ (37, 38) จากผลการศึกษาพบว่าเลปโตสไปราก่อโรคมีการแสดงออกของยีน *colA*

ในปอดของแฮมเสตอร์ที่ได้รับเชื้อ โดยสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *colA* ได้ตั้งแต่ในวันที่ 3 หลังจากที่ติดเชื้อพบปริมาณการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 และมีปริมาณการแสดงออกของยีนลดลงในวันที่ 7 หลังจากที่ติดเชื้อ เมื่อนำมาตรวจพยาธิสภาพที่ปอดพบมีเลือดออกที่ปอดขั้นรุนแรงในวันที่ 5 หลังจากที่ติดเชื้อ นอกจากนี้การตรวจหายีน *colA* โดยวิธี PCR พบว่าสามารถตรวจพบยีน *colA* ในเชื้อเลปโตสไปราก่อโรคทั้ง 23 ซีโรวาร์ แต่ไม่พบในเชื้อ *Leptospira biflexa* serovar Patoc ซึ่งเป็นเชื้อไม่ก่อโรค

ผู้วิจัยสามารถโคลนยีน *colA* และสามารถสร้างพลาสมิด pColA ที่นำมาใช้ในการผลิตโปรตีน ColA ได้ โดยโปรตีน ColA ที่ได้มีคุณสมบัติเป็นเอ็นไซม์ที่สามารถย่อยคอลลาเจน Kassegne และคณะ (151) ซึ่งศึกษายีน *colA* เช่นเดียวกัน โดยนำเชื้อเลปโตสไปรามาบ่มกับเซลล์ HUVEC และ HEK293 พบว่าเชื้อมีการแสดงออกของ *colA* mRNA และโปรตีน ColA มากขึ้น แสดงว่าเมื่อเชื้อเข้าไปอยู่ในเซลล์โฮสต์จะมีการสร้าง ColA มากขึ้น และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบก็พบว่ามีการหลั่งโปรตีน ColA ออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์มากขึ้น แสดงให้เห็นว่าในเชื้อเลปโตสไปรามีการแสดงออกยีน *colA* ออกมาในระหว่างติดเชื้อ และเมื่อเชื้อเกิด interaction กับเซลล์ก็พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของคอลลาจีเนสออกมา นอกจากนี้ยังพบว่าคอลลาจีเนสจากเชื้อเลปโตสไปรามีบทบาทในการช่วยให้เชื้อสามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆได้ โดยจากการทำการกลายพันธุ์ยีน *colA* (Δ*colA* mutant) แล้วนำมาฉีดให้กับแฮมสเตอร์พบว่า Δ*colA* mutant มีความสามารถในการผ่านชั้นของเซลล์ HEK293 และ HUVEC ลดลง เมื่อนำเชื้อกลายพันธุ์ไปฉีดให้แฮมสเตอร์พบว่าตรวจพบเชื้อในเลือด ปัสสาวะและอวัยวะของแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อน้อยกว่าแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และแฮมสเตอร์ที่ได้รับ Δ*colA* mutant เกิดพยาธิสภาพน้อยกว่ากลุ่มที่รับเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนว่ายีน *colA* เป็นยีนที่สร้างปัจจัยก่อโรคที่น่าสนใจในการศึกษากลไกก่อโรคและการป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิส

นอกจากคุณสมบัติในการก่อพยาธิสภาพแล้วส่วนประกอบของเลปโตสไปราที่พบเฉพาะในเชื้อชนิดก่อโรคและมีการแสดงออกในสัตว์หรือคนที่ติดเชื้อยังเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการนำมาใช้พัฒนาชุดทดสอบเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ วิธี Microscopic agglutination test (MAT) เป็นวิธีที่ใช้ในการอ้างอิงการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อจำกัด คือ มีความไวในการตรวจต่ำและมีความยุ่งยาก เนื่องจากต้องใช้เชื้อซีโรวาร์ต่างๆที่ยังเป็นเชื้อเป็น

รวมถึงการอ่านผลต้องมีความชำนาญ ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธี PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา (91, 101) ถึงแม้ PCR เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะในการตรวจสูง แต่มีรายงานว่า PCR มีความไวในการตรวจเฉพาะในช่วงแรกที่พบเชื้อในกระแสเลือด ความไวในการตรวจด้วยวิธี PCR จะลดลงในสัปดาห์ที่ 2-3 ในขณะที่การตรวจหาแอนติบอดีมีความไวเพิ่มขึ้น (101) ดังนั้นการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรายังคงมีความจำเป็นในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

ในปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้หลักการทดสอบอื่นๆ เช่น indirect immunofluorescence test (152) , enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (30, 33), macroscopic agglutination test (77) และ immunochromatography test (153) ชุดทดสอบที่มีในปัจจุบันเป็นชุดทดสอบที่ใช้ตัวเชื้อทั้งตัวหรือสารสกัดจากตัวเชื้อเป็นแอนติเจน รายงานการศึกษายีนและส่วนประกอบที่พบเฉพาะในเชื้อเลปโตสไปราก่อโรคจึงเป็นข้อมูลสำคัญในการนำมาใช้คัดเลือกแอนติเจนเพื่อพัฒนาชุดทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะมากขึ้น ส่วนประกอบของเลปโตสไปราก่อโรคที่มีรายงานการนำมาใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีได้แก่ LipL32, LigA, LigB, OmpL1, LipL41, LipL21 และ Loa22 ซึ่งพบว่ามีความไวและมีความจำเพาะ 96.4 และ 90.4%, 69.5 และ 98%, 75.65 และ 91.27%, 91.1 และ 86.5%, 89.3 และ 89.2%, 99.5 และ 84.3% , 89.7 และ 81.4% ตามลำดับ (33, 154-157)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากการศึกษาพบว่าโปรตีน ColA ที่เตรียมได้สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสและซีรัมของแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปรา เป็นข้อมูลสนับสนุนว่าโปรตีนชนิดนี้มีการแสดงออกในโฮสต์และกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ การทดลองเปรียบเทียบกับโปรตีน LipL32 ที่มีรายงานการศึกษาจำนวนมาก พบว่าโปรตีน ColA มีความไว 100% เท่ากับโปรตีน LipL32 ในการตรวจหาแอนติบอดี คือสามารถตรวจพบแอนติบอดีในตัวอย่างผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสทุกรายที่นำมาศึกษาในการวิจัยนี้ และทั้งโปรตีน ColA และ LipL32 ให้ผลบวกกับตัวอย่างที่เจาะครั้งแรกและครั้งที่ 2 (acute และ convalescent sera) พบซีรัมผู้ป่วยเพียงรายเดียวที่เห็นความแตกต่างกันใน acute sera ซึ่งเมื่อใช้ LipL32 มาทดสอบพบว่าแถบโปรตีนที่ได้มีความเข้มน้อยกว่าแถบโปรตีนจาก ColA อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 14) อย่างไรก็ดี จากการทดสอบกับซีรัมแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเลปโตสไปราเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน พบว่าโปรตีน ColA มีความไว

มากกว่า คือสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อเพียง 3 วัน แต่โปรตีน LipL32 ทำปฏิกิริยากับซีรัมที่เก็บจากแฮมสเตอร์ 5 และ 7 วันหลังจากได้รับเชื้อ (รูปที่ 11B และ 12) ซึ่งการศึกษาความไวในการช่วยวินิจฉัยโรคควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยนำโปรตีน ColA และ LipL32 มาทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยที่เก็บในช่วงวันแรกๆหลังติดเชื้อ

ในการทดสอบความจำเพาะของโปรตีน ColA ในการศึกษานี้เลือกทดสอบกับซีรัมคนปกติ โดยใช้ซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต และซีรัมจากผู้ป่วยสครับไทฟัสและผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่พบมากในประเทศไทยและประเทศเขตร้อน และเป็นโรคติดเชื้อที่การตรวจทางห้องปฏิบัติการมีความจำเป็นในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคจากโรคเลปโตสไปโรซิส ผลการทดสอบพบว่า ColA ไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมจากทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง ในขณะที่ LipL32 ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยสครับไทฟัส 7 ราย ซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ไวรัส 2 ราย และซีรัมจากผู้บริจาคโลหิต 3 ราย (รูปที่ 15, 16, และ17 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้โปรตีน ColA และ LipL32 มีความจำเพาะ 100% และ 80% ตามลำดับ

ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า LA0872 เป็นยีนของเลปโตสไปราที่สร้างโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นคอลลาจีเนสและพลาสมิด pColA ที่สร้างในการวิจัยนี้ สามารถนำมาใช้ในการเตรียมคอลลาจีเนสของเลปโตสไปรา ซึ่งสามารถนำมาใช้พัฒนาการทดสอบเพื่อช่วยวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสได้ เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส ผลการศึกษาสนับสนุนว่าโปรตีน ColA มีความไวและความจำเพาะในการตรวจหาแอนติบอดีสูงกว่าโปรตีน LipL32 นอกจากนี้โปรตีน ColA ที่เตรียมได้ยังมีคุณสมบัติเป็นเอ็นไซม์คอลลาจีเนส ซึ่งมีความน่าสนใจในการนำมาใช้ศึกษากลไกการก่อพยาธิสภาพและการพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Levett PN. Leptospirosis. Clinical microbiology reviews. 2001;14(2):296-326.

2. Vinetz JM. Leptospirosis. Current opinion in infectious diseases. 2001;14(5): 527-38.

3. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011;17(4): 494-501.

4. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. Current topics in microbiology and immunology. 2015;387:65-97.

5. Adler B. Vaccines against leptospirosis. Current topics in microbiology and immunology. 2015;387:251-72.

6. Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from Leptospira interrogans serovar lai. Gene. 2000;254(1-2):19-28.

7. Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ. Cytotoxic activities of Leptospira interrogans hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. Infection and immunity. 2002;70(1):315-22.

8. del Real G, Segers RP, van der Zeijst BA, Gaastra W. Cloning of a hemolysin gene from Leptospira interrogans serovar hardjo. Infection and immunity. 1989;57(8):2588-90.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

9. Murray GL, Srikram A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswan RW, Adler B. Mutations affecting Leptospira interrogans lipopolysaccharide attenuate virulence. Molecular microbiology. 2010;78(3):701-9.

10. Vinh T, Adler B, Faine S. Glycolipoprotein cytotoxin from Leptospira interrogans serovar copenhageni. Journal of general microbiology. 1986;132(1):111-23.

11. Cinco M, Perticarari S, Presani G, Dobrina A, Liut F. Biological activity of a peptidoglycan extracted from Leptospira interrogans: in vitro studies. Journal of general microbiology. 1993;139(12):2959-64.

12. Nally JE, Artiushin S, Timoney JF. Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 and Hsp15 of Leptospira interrogans. Infection and immunity. 2001;69(12):7616-24.

13. Chang A, Faine S. Effect of anti-cell and anti-axial filament sera on Leptospira. Aust J Exp Biol Med. 1973;51(6):847-56.

14. Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in Leptospira spp. Inactivation of L. biflexa flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. Molecular microbiology. 2001;40(1):189-99.

15. Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. PLoS pathogens. 2007;3(7):e97.

16. Zhang K, Murray GL, Seemann T, Srikram A, Bartpho T, Sermswan RW, et al. Leptospiral LruA is required for virulence and modulates an interaction with mammalian apolipoprotein AI. Infection and immunity. 2013;81(10):3872-9.

17. Zhang L, Zhang C, Ojcius DM, Sun D, Zhao J, Lin X, et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic Leptospira species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. Molecular microbiology. 2012;83(5):1006-23.

18. Eshghi A, Lourdault K, Murray GL, Bartpho T, Sermswan RW, Picardeau M, et al. Leptospira interrogans catalase is required for resistance to H2O2 and for virulence. Infection and immunity. 2012;80(11):3892-9.

19. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infection and immunity. 2000;68(4):2276-85.

20. Koizumi N, Watanabe H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. FEMS microbiology letters. 2003;226(2):215-9.

21. Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic Leptospira species. Infection and immunity. 1996;64(6):2322-30.

22. Matsunaga J, Werneid K, Zuerner RL, Frank A, Haake DA. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. Microbiology (Reading, England). 2006;152(Pt 12):3777-86.

23. Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic Leptospira species. Infection and immunity. 2003;71(5):2414-21.

24. 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. Molecular microbiology. 2003;49(4):929-45.

25. Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic Leptospira spp. Journal of bacteriology. 1993;175(13):4225-34.

26. Lin M, Surujballi O, Nielsen K, Nadin-Davis S, Randall G. Identification of a 35-kilodalton serovar-cross-reactive flagellar protein, FlaB, from Leptospira interrogans by N-terminal sequencing, gene cloning, and sequence analysis. Infection and immunity. 1997;65(10):4355-9.

27. Boonyod D, Poovorawan Y, Bhattarakosol P, Chirathaworn C. LipL32, an outer membrane protein of Leptospira, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand. 2005;23(2-3):133-41.

28. Dey S, Madhan Mohan C, Ramadass P, Nachimuthu K. Recombinant antigen-based latex agglutination test for rapid serodiagnosis of leptospirosis. Veterinary research communications. 2007;31(1):9-15.

29. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao Reis M, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infection and immunity. 2001;69(8):4958-68.

30. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, et al. Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. Journal of clinical microbiology. 2001;39(9):3303-10.

31. Nally JE, Whitelegge JP, Bassilian S, Blanco DR, Lovett MA. Characterization of the outer membrane proteome of Leptospira interrogans expressed during acute lethal infection. Infection and immunity. 2007;75(2):766-73.

32. Maneewatch S, Sakolvaree Y, Saengjaruk P, Srimanote P, Tapchaisri P, Tongtawe P, et al. Monoclonal antibodies to LipL32 protect against heterologous Leptospira spp. challenge. Hybridoma (2005). 2008;27(6):453-65.

33. Vedhagiri K, Velineni S, Timoney JF, Shanmughapriya S, Vijayachari P, Narayanan R, et al. Detection of LipL32-specific IgM by ELISA in sera of patients with a clinical diagnosis of leptospirosis. Pathogens and global health. 2013;107(3):130-5.

34. Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, Kalambaheti T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2011;105(5):289-97.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

35. Murray GL, Srikram A, Hoke DE, Wunder EA, Jr., Henry R, Lo M, et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with Leptospira interrogans. Infection and immunity. 2009;77(3):952-8.

36. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, et al. Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. Nature. 2003;422(6934):888-93.

37. Vargaftig BB, Lefort J, Giroux EL. Haemorrhagic and inflammatory properties of collagenase from C. histolyticum. Agents and actions. 1976;6(5):627-35.

38. Diener B, Carrick L, Jr., Berk RS. In vivo studies with collagenase from Pseudomonas aeruginosa. Infection and immunity. 1973;7(2):212-7.

39. Pokharel DR, Rai R, Nandakumar Kodumudi K, Reddy MV, Rathaur S. Vaccination with Setaria cervi 175 kDa collagenase induces high level of protection against Brugia malayi infection in jirds. Vaccine. 2006;24(37-39):6208-15.

40. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature reviews Microbiology. 2009;7.

41. Evangelista KV, Coburn J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future microbiology. 2010;5(9):1413-25.

42. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet infectious diseases. 2003;3(12):757-71.

43. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. Journal of biosciences. 2008;33(4):557-69.

44. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic Leptospira to survive in fresh water. International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology. 2004;7(1):35-40.

45. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lilenbaum W, et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. Microbiology (Reading, England). 2008;154(Pt 5):1309-17.

46. Adler B. History of leptospirosis and leptospira. Current topics in microbiology and immunology. 2015;387:1-9.

47. Yunibandhu J. First report of Weil's disease in Thailand. J Med Assoc Thai. 1943;26:83-139.

48. 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.

49. Doungchawee G, Phulsuksombat D, Naigowit P, Khoaprasert Y, Sangjun N, Kongtim S, et al. Survey of leptospirosis of small mammals in Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 2005;36(6):1516-22.

50. Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C, Goarant C. Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia. PLoS neglected tropical diseases. 2011;5(10):e1361.

51. Adler B, de la Pena Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. Veterinary microbiology. 2010;140(3-4):287-96.

52. Levett PN. Systematics of leptospiraceae. Current topics in microbiology and immunology. 2015;387:11-20.

53. Smythe L, Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY, Levett PN, et al. Classification of Leptospira genomospecies 1, 3, 4 and 5 as Leptospira alstonii sp. nov., Leptospira vanthielii sp. nov., Leptospira terpstrae sp. nov. and Leptospira yanagawae sp. nov., respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2013;63(5):1859-62.

54. Levett PN, Smythe L. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008;58(4):1049-50.

55. Saito M, Villanueva SY, Kawamura Y, Iida K, Tomida J, Kanemaru T, et al. Leptospira idonii sp. nov., isolated from environmental water. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63(Pt 7):2457-62.

56. Levett PN, Smythe L. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014;64(3):1071-2.

57. Bourhy P, Collet L, Brisse S, Picardeau M. Leptospira mayottensis sp. nov., a pathogenic species of the genus Leptospira isolated from humans. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64(Pt 12):4061-7.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

58. Levett PN, Picardeau M. International Committee on Systematics of ProkaryotesSubcommittee on the taxonomy of LeptospiraceaeMinutes of the closed meeting, 8 October 2015, Semarang, Indonesia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016;66(1):523-.

59. World Health Organization. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control [Internet]. 2003 [cited 2016 April 3]. Available from: http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf.

60. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature reviews Microbiology. 2009;7(10):736-47.

61. Turner LH. Leptospirosis. British medical journal. 1969;1(5638):231-5.

62. Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. Current opinion in infectious diseases. 2007;20(3):284-92.

63. Levett PN, Haake DA. Leptospira species (leptospirosis). Principles and practice of infectious diseases, Churchill Livingtsone Elsevier, Philadelphia. 2010:3059-65.

64. Levett PN. Leptospirosis. Clinical microbiology reviews. 2001;14.

65. Winearls CG, Chan L, Coghlan JD, Ledingham JG, Oliver DO. Acute renal failure due to leptospirosis: clinical features and outcome in six cases. The Quarterly journal of medicine. 1984;53(212):487-95.

66. Sitprija V, Evans H. The kidney in human leptospirosis. Am J Med. 1970;49(6):780-8.

67. Wysocki J, Liu Y, Shores N. Leptospirosis with acute liver injury. Proceedings (Baylor University Medical Center). 2014;27(3):257-8.

68. Arean VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). The American journal of pathology. 1962;40:393-423.

69. Farr RW. Leptospirosis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1995;21(1):1-6; quiz 7-8.

70. Turner LH. Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1970;64(4):623-46.

71. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. Journal of clinical microbiology. 1994;32(8):1894-8.

72. Rittenberg MB, Linscott WD, Ball MG. Simple method for separating leptospirae from contaminating microorganisms. Journal of bacteriology. 1958;76(6):669-70.

73. Brown PD, Carrington DG, Gravekamp C, van de Kemp H, Edwards CN, Jones SR, et al. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. Research in microbiology. 2003;154(8):581-6.

74. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. Journal of medical microbiology. 1995;43(2):110-4.

75. Turner LH. Leptospirosis. II. Serology. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1968;62(6):880-99.

76. Cumberland P, Everard CO, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1999;61(5):731-4.

77. Brandao AP, Camargo ED, da Silva ED, Silva MV, Abrao RV. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. Journal of clinical microbiology. 1998;36(11):3138-42.

78. Palmer MF, Waitkins SA, Wanyangu SW. A comparison of live and formalised leptospiral microscopic agglutination test. Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology. 1987;265(1-2):151-9.

79. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO offset publication. 1982(67):1-171.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

80. Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. Journal of clinical microbiology. 1998;36(1):11-4.

81. Effler PV, Domen HY, Bragg SL, Aye T, Sasaki DM. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. Journal of clinical microbiology. 2000;38(3):1081-4.

82. Yersin C, Bovet P, Smits HL, Perolat P. Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles. Tropical medicine & international health : TM & IH. 1999;4(1):38-45.

83. Levett PN, Branch SL, Whittington CU, Edwards CN, Paxton H. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2001;8(2):349-51.

84. Torten M, Shenberg E, Van der Hoeden J. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus-specific antigen. The Journal of infectious diseases. 1966;116(5):537-43.

85. Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Woodtayakorn J. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1995;52(4):340-3.

86. Ribeiro MA, Assis CSN, Romero EC. Serodiagnosis of human leptospirosis employing immunodominant antigen. Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease. 1994;6(3):140-4.

87. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. Journal of clinical microbiology. 2003;41(2):803-9.

88. Slack A. Leptospirosis. Australian family physician. 2010;39(7):495-8.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

89. Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2014;78(1): 1-8.

90. Levett PN. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? Clinical and Applied Immunology Reviews. 2004;4(6):435-48.

91. Fonseca Cde A, Teixeira MM, Romero EC, Tengan FM, Silva MV, Shikanai-Yasuda MA. Leptospira DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. The Journal of infection. 2006;52(1):15-22.

92. Romero EC, Billerbeck AE, Lando VS, Camargo ED, Souza CC, Yasuda PH. Detection of Leptospira DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. Journal of clinical microbiology. 1998;36(5):1453-5.

93. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. PloS one. 2009;4(9):e7093.

94. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of Leptospira species in human leptospirosis. FEMS microbiology letters. 2005;249(1):139-47.

95. Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Molecular and cellular probes. 2005;19(2): 111-7.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

96. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic Leptospira spp. BMC infectious diseases. 2002;2:13.

97. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic Leptospira spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2009;64(3):247-55.

98. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic Leptospira spp. in blood and identification of variations in target sequences. Journal of clinical microbiology. 2011;49(6):2154-60.

99. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Vedhagiri K, Selvin J, et al. FlaB PCR-based identification of pathogenic leptospiral isolates. Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi. 2010;43(1):62-9.

100. Thaipadungpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, et al. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. PloS one. 2011;6(1):e16236.

101. de Abreu Fonseca C, Teixeira de Freitas VL, Calo Romero E, Spinosa C, Arroyo Sanches MC, da Silva MV, et al. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. Tropical medicine & international health : TM & IH. 2006;11(11):1699-707.

102. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, et al. Surfaceome of Leptospira spp. Infection and immunity. 2005;73(8):4853-63.

103. Murray GL. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. Veterinary microbiology. 2013;162(2-4):305-14.

104. Vieira ML, Fernandes LG, Domingos RF, Oliveira R, Siqueira GH, Souza NM, et al. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. FEMS microbiology letters. 2014;352(2):129-39.

105. Haake DA, Zückert WR. The Leptospiral Outer Membrane. In: Adler B, editor. Leptospira and Leptospirosis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 187-221.

106. Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. Infection and immunity. 2002;70(9):4936-45.

107. Nally JE, Whitelegge JP, Aguilera R, Pereira MM, Blanco DR, Lovett MA. Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of Leptospira interrogans serovar Copenhageni. Proteomics. 2005;5(1):144-52.

108. Pinne M, Haake DA. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of Leptospira interrogans: presentation of new data and reevaluation of previous studies. PloS one. 2013;8(1):e51025.

109. Lowanitchapat A, Payungporn S, Sereemaspun A, Ekpo P, Phulsuksombati D, Poovorawan Y, et al. Expression of TNF-alpha, TGF-beta, IP-10 and IL-10 mRNA in kidneys of hamsters infected with pathogenic Leptospira. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 2010;33(5):423-34.

110. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from Leptospira interrogans serovar Lai. Infection and immunity. 2002;70(5):2311-8.

111. Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of Leptospira spp. and Pseudoalteromonas tunicata. Infection and immunity. 2008;76(5):2063-9.

112. Hauk P, Macedo F, Romero EC, Vasconcellos SA, de Morais ZM, Barbosa AS, et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. Infection and immunity. 2008;76(6):2642-50.

113. Shiokawa K, Gamage CD, Koizumi N, Sakoda Y, Shimizu K, Tsuda Y, et al. Evaluation of truncated LipL32 expressed by Escherichia coli and Pichia pastoris for serodiagnosis of Leptospira infection in rodents. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science. 2016;78(2):221-30.

114. Aviat F, Rochereau-Roulet S, Branger C, Estavoyer JM, Chatrenet B, Orsonneau JL, et al. Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 2010;33(5):375-87.

115. Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SS, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of Leptospira interrogans. Infection and immunity. 2002;70(11):5924-30.

116. Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. Vaccine. 2004;22(11-12):1545-52.

117. Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, Matsunaga J, Esteves GS, Ramos JG, et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. Vaccine. 2007;25(33):6277-86.

118. Croda J, Ramos JG, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW, et al. Leptospira immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. Journal of clinical microbiology. 2007;45(5):1528-34.

119. Srimanote P, Wongdeethai N, Jieanampunkul P, Samonkiert S, Leepiyasakulchai C, Kalambaheti T, et al. Recombinant LigA for leptospirosis diagnosis and ligA among the Leptospira spp. clinical isolates. J Microbiol Methods. 2008;72.

120. McBride AJ, Cerqueira GM, Suchard MA, Moreira AN, Zuerner RL, Reis MG, et al. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic Leptospira spp. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2009;9(2):196-205.

121. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. Infection and immunity. 2007;75(5):2441-50.

122. Figueira CP, Croda J, Choy HA, Haake DA, Reis MG, Ko AI, et al. Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte Leptospira biflexaconfers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. BMC Microbiology. 2011;11(1):1-9.

123. Croda J, Figueira CP, Wunder EA, Jr., Santos CS, Reis MG, Ko AI, et al. Targeted mutagenesis in pathogenic Leptospira species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. Infection and immunity. 2008;76(12):5826-33.

124. Gamberini M, Gomez RM, Atzingen MV, Martins EA, Vasconcellos SA, Romero EC, et al. Whole-genome analysis of Leptospira interrogans to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. FEMS microbiology letters. 2005;244(2):305-13.

125. Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. Infection and immunity. 2006;74(11):6356-64.

126. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, et al. Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. PloS one. 2008;3(2):e1607.

127. Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller MN, Lovett MA. Changes in the surface of Leptospira interrogans serovar grippotyphosa during in vitro cultivation. Infection and immunity. 1991;59(3):1131-40.

128. Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. Infection and immunity. 1999;67(2):853-61.

129. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. Infection and immunity. 1999;67(12): 6572-82.

130. Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic Leptospira species is a heat-modifiable porin. Infection and immunity. 1995;63(8):3174-81.

131. Fernandes LG, Vieira ML, Kirchgatter K, Alves IJ, de Morais ZM, Vasconcellos SA, et al. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of Leptospira spp. Infection and immunity. 2012;80(10):3679-92.

132. Pinne M, Haake DA. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of Leptospira interrogans. PloS one. 2009;4(6):e6071.

133. Pinne M, Choy HA, Haake DA. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic Leptospira during infection and binds skin and vascular elastin. PLoS neglected tropical diseases. 2010;4(9):e815.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

134. Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen Leptospira interrogans. Nature. 2009;460(7256):762-5.

135. Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, McCoy AM, et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. Infection and immunity. 1998;66(4):1579-87.

136. Eshghi A, Cullen PA, Cowen L, Zuerner RL, Cameron CE. Global proteome analysis of Leptospira interrogans. Journal of proteome research. 2009;8(10):4564-78.

137. 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.

138. 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.

139. Verma A, Brissette CA, Bowman AA, Shah ST, Zipfel PF, Stevenson B. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. Infection and immunity. 2010;78(5):2053-9.

140. Murray GL, Morel V, Cerqueira GM, Croda J, Srikram A, Henry R, et al. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic Leptospira species. Infection and immunity. 2009;77(2):810-6.

141. Narayanavari SA, Lourdault K, Sritharan M, Haake DA, Matsunaga J. Role of sph2 Gene Regulation in Hemolytic and Sphingomyelinase Activities Produced by Leptospira interrogans. PLoS neglected tropical diseases. 2015;9(8):e0003952.

142. Bernheimer AW, Bey RF. Copurification of Leptospira interrogans serovar pomona hemolysin and sphingomyelinase C. Infection and immunity. 1986;54(1):262-4.

143. Segers RP, van Gestel JA, van Eys GJ, van der Zeijst BA, Gaastra W. Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family Leptospiraceae. Infection and immunity. 1992;60(4):1707-10.

144. Artiushin S, Timoney JF, Nally J, Verma A. Host-inducible immunogenic sphingomyelinase-like protein, Lk73.5, of Leptospira interrogans. Infection and immunity. 2004;72(2):742-9.

145. Carvalho E, Barbosa AS, Gomez RM, Oliveira ML, Romero EC, Goncales AP, et al. Evaluation of the expression and protective potential of Leptospiral sphingomyelinases. Current microbiology. 2010;60(2):134-42.

146. Zhang YX, Geng Y, Bi B, He JY, Wu CF, Guo XK, et al. Identification and classification of all potential hemolysin encoding genes and their products from Leptospira interrogans serogroup Icterohae-morrhagiae serovar Lai. Acta pharmacologica Sinica. 2005;26(4):453-61.

147. Zhang YX, Geng Y, Yang JW, Guo XK, Zhao GP. Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphigomyelinase hemolysin from Leptospira interrogans strain Lai. BMB reports. 2008;41(2):119-25.

148. Hara-Kudo Y, Yamakawa Y, Kumagai S. Purification and some properties of Clostridium sporogenes hemorrhagic toxin. Biochemical and biophysical research communications. 1996;227(2):413-8.

149. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples. Journal of clinical microbiology. 1992;30(9):2219-24.

150. World Health Organization. Leptospirosis factsheet [Internet]. [cited 2016 April 5]. Available from: http://www.searo.who.int/about/administration_structure/cds/CDS_leptospirosis-Fact_Sheet.pdf.

151. Kassegne K, Hu W, Ojcius DM, Sun D, Ge Y, Zhao J, et al. Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic Leptospira species. The Journal of infectious diseases. 2014;209(7):1105-15.

152. Pradutkanchana S, Pradutkanchana J, Khuntikij P. Detection of IgM specific antibody using indirect immunofluorescent assay for diagnosis of acute leptospirosis. Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet. 2003;86(7):641-6.

153. Chirathaworn C, Janwitthayanan W, Sereemaspun A, Lertpocasombat K, Rungpanich U, Ekpo P, et al. Development of an immunochromatographic test with anti-LipL32-coupled gold nanoparticles for Leptospira detection. The new microbiologica. 2014;37(2):201-7.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

154. Kitashoji E, Koizumi N, Lacuesta TL, Usuda D, Ribo MR, Tria ES, et al. Diagnostic Accuracy of Recombinant Immunoglobulin-like Protein A-Based IgM ELISA for the Early Diagnosis of Leptospirosis in the Philippines. PLoS neglected tropical diseases. 2015;9(6):e0003879.

155. Nagalingam M, Thirumalesh SR, Kalleshamurthy T, Niharika N, Balamurugan V, Shome R, et al. Comparative evaluation of recombinant LigB protein and heat-killed antigen-based latex agglutination test with microscopic agglutination test for diagnosis of bovine leptospirosis. Tropical animal health and production. 2015;47(7):1329-35.

156. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Selvin J, Sehgal SC. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of Leptospira interrogans serovar autumnalis. Annals of tropical medicine and parasitology. 2008;102(8):699-708.

157. Ye C, Yan W, Xiang H, He H, Yang M, Ijaz M, et al. Recombinant antigens rLipL21, rLoa22, rLipL32 and rLigACon4-8 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays in dogs. PloS one. 2014;9(12):e111367.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2-Mercaptoethanol (Bio Basic, Canada)

6X DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific, USA)

Acrylamide (Bio Basic, Canada)

Agarose gel (Sigma, USA)

Ammonium persulphate; APS (Bio Basic, Canada)

Ampicillin (Bio Basic, Canada)

Anti-human IgM conjugate with horseradish peroxidase (Dako, Denmark)

Bis-Acrylamide (Bio Basic, Canada)

Bovine serum albumin (Sigma, USA)

Calcium chloride (Merck, Germany)

Disodium ethylenediaminetetraacetate dehydrate; $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (Bio Basic, Canada)

DNA ladder (100 bp และ 1kb) (Thermo Scientific, USA)

Glacial acetic acid (Merck, Germany)

Glycine (Sigma, USA)

Imidazole (Bio Basic, Canada)

Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside; IPTG (Bio Basic, Canada)

LB broth (Difco, USA)

Leptospira medium base EMJH (Difco, USA)

Lysozyme (Bio Basic, Canada)

Magnesium chloride; $MgCl_2$ (Merck, Germany)

Magnesium sulphate; $MgSO_4$ (Merck, Germany)

Methanol (Merck, Germany)

PCR reagent (Invitrogen, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Peroxidase labeled goat anti hamster IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, USA)

Pfu DNA polymerase (Invitrogen, USA)

Potassium chloride; KCl (Bio Basic, Canada)

Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)

Sodium chloride; NaCl (Merck, Germany)

Sodium Dihydrogen Phosphate; NaH_2PO_4 (Merck, Germany)

Sodium dodecyl sulfate; SDS (Bio Basic, Canada)

Sodium hydroxide; NaOH (Merck, Germany)

Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA)

Tetramethylethylenediamine; TEMED (Sigma, USA)

Tris base (Sigma, USA)

Tween 20 (Merck, Germany)

น้ำยาล้างฟิล์มดีเวลลอปเปอร์ (Developer) (Carestream Health, China)

น้ำยาล้างฟิล์มฟิกเซอร์ (Fixer) (Carestream Health, China)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

บีกเกอร์

กระบอกตวง

กระบอกฉีดน้ำกลั่น

หลอดแก้วพร้อมฝาเกลียว

ขวดแก้วพร้อมฝาเกลียว

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)

จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)

แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader Glass)

ปิเปตต์แบบใช้ตวง (Measuring Pipette)

ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)

ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

เครื่องเขย่าสารและควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง แบบตั้งโต๊ะ

เครื่องชั่งดิจิตอล

เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer)

เครื่องปั่นเหวี่ยง

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืด

เครื่อง Ultrasonic sonicator รุ่น VCX 500-VCX 750 (Sonics & Materials, USA)

ชุดอุปกรณ์สำหรับ Agarose gel electrophoresis

รุ่น MJ-105-S Mini Horizontal (Major Science, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ SDS-PAGE

รุ่น SE 250 Mini-Vertical Unit (GE Healthcare Life Sciences, USA)

Power Supply สำหรับชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE

รุ่น PS500XT (Hoefer Scientific Instruments, USA)

ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ Slot blot รุ่น Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (Bio-Rad, USA)

เครื่องเคลื่อนย้ายโมเลกุลของโปรตีนชนิดกึ่งแห้ง

รุ่น Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA)

Power Supply สำหรับเครื่องเคลื่อนย้ายโมเลกุลของโปรตีนชนิดกึ่งแห้ง

รุ่น PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปรา EMJH medium

EMJH medium ประกอบด้วย Albumin fatty acid supplement และ Basal medium

1.1 การเตรียม Stock solution สำหรับ EMJH medium

Reagent	ปริมาณของสาร (กรัม) ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
$CaCl_2 \cdot 2H_2O + MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.0
$ZnSO4 \cdot 7H_2O$	0.4
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.3
Vitamin B12	0.02
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
Sodium pyruvate	10.0
Tween 80	10.0

<u>ส่วน A</u>: การเตรียม Albumin fatty acid supplement

ละลาย Bovine serum albumin 10 กรัม ใน น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วเติม Stock solution ที่เตรียมไว้ดังนี้

$CaCl_2 \cdot 2H_2O + MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.5 มิลลิลิตร

$ZnSO4 \cdot 7H_2O$ 1.0 มิลลิลิตร

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.1 มิลลิลิตร

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10.0 มิลลิลิตร

Vitamin B12 1.0 มิลลิลิตร

Tween 80 12.5 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ปรับ pH เป็น 7..4 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

<u>ส่วน B</u>: การเตรียม Basal medium

ละลาย *Leptospira* medium base EMJH 2.3 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติม Stock solution ที่เตรียมไว้ดังนี้

Sodium pyruvate	1 มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	1 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.4 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 EMJH medium

ผสมส่วน A ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และส่วน B ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2. การเตรียม SOC medium (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

Tryptone		0.20 กรัม
Yeast Extract		0.05 กรัม
NaCl	ความเข้มข้น 5 โมลาร์	0.02 มิลลิลิตร
KCl	ความเข้มข้น 1 โมลาร์	0.025 มิลลิลิตร
$MgCl_2$	ความเข้มข้น 1 โมลาร์	0.10 มิลลิลิตร
$MgSO_4$	ความเข้มข้น 1 โมลาร์	0.10 มิลลิลิตร
กลูโคส	ความเข้มข้น 1 โมลาร์	0.20 มิลลิลิตร

ผสมส่วนต่างๆยกเว้นกลูโคส โดยหลังจากทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็นลง จึงเติมกลูโคสที่ปราศจากเชื้อโดยการกรองลงไป

3. การเตรียมสารสำหรับ competent cell

3.1 $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลาย $CaCl_2$ 11.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

3.2 $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ผสมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

3.3 $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15%

ผสมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล ความเข้มข้น 100% ที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารสำหรับการศึกษาแสดงออกของ ColA protein

4.1 8X Lysis-Equilibration-Wash Buffer (LEW)

$NaH_2PO_4{\cdot}H_2O$	27.6 กรัม
NaCl	70.1 กรัม

ปรับ pH เป็น 8.0 โดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 10 นอร์มอล เติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

4.2 Elution buffer

8X LEW	10 มิลลิลิตร
Imidazole ความเข้มข้น 1 โมลาร์	20 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 80 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. การเตรียมสารสำหรับทำการแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

5.1 การเตรียม Acrylamide ความเข้มข้น 40% (29:1)

Acrylamide	38.67 กรัม
Bisacrylamide	1.33 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

5.2 การเตรียม Separating gel ความเข้มข้น 8%

น้ำกลั่น	5.3 มิลลิลิตร
Acrylamide ความเข้มข้น 40%	2.0 มิลลิลิตร
Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (pH 8.8)	2.5 มิลลิลิตร
SDS ความเข้มข้น 10%	0.1 มิลลิลิตร
APS ความเข้มข้น 10%	0.1 มิลลิลิตร
TEMED	0.006 มิลลิลิตร

5.3 การเตรียม Separating gel ความเข้มข้น 10%

น้ำกลั่น	4.8 มิลลิลิตร
Acrylamide ความเข้มข้น 40%	2.5 มิลลิลิตร
Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (pH 8.8)	2.5 มิลลิลิตร
SDS ความเข้มข้น 10%	0.1 มิลลิลิตร
APS ความเข้มข้น 10%	0.1 มิลลิลิตร
TEMED	0.004 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.4 การเตรียม Stacking gel ความเข้มข้น 5%

น้ำกลั่น	2.87 มิลลิลิตร
Acrylamide ความเข้มข้น 40%	0.50 มิลลิลิตร
Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ (pH 6.8)	0.50 มิลลิลิตร
SDS ความเข้มข้น 10%	0.04 มิลลิลิตร
APS ความเข้มข้น 10%	0.04 มิลลิลิตร
TEMED	0.004 มิลลิลิตร

5.5 การเตรียม 5X SDS-PAGE Sample buffer

Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 6.8)	1.25 มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	1.50 มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	250 ไมโครลิตร
SDS	0.50 กรัม
Bromophenol blue ความเข้มข้น 1%	100 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	1.90 มิลลิลิตร

5.6 การเตรียม 10X Running buffer pH 8.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Tris base	30.3 กรัม
Glycine	144.0 กรัม
SDS	10.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

5.7 การเตรียม Coomassie brilliant blue สำหรับย้อมสีเจล

Coomassie Brilliant Blue R-250	0.2 กรัม
Destaining I	100 มิลลิลิตร

5.8 การเตรียม Destaining I

Methanol	400 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	530 มิลลิลิตร

5.9 การเตรียม Destaining II

Methanol	50 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	880 มิลลิลิตร

6. การเตรียมสารสำหรับทำ Western Blot และ Slot Blot

6.1 10X Transfer buffer pH 8.3

Tris base	30.3 กรัม
Glycine	144.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

6.2 1X Transfer buffer ที่ผสม 20% Methanol

ผสม 10X Transfer buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ Methanol 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร

6.3 10X TBS

Tris base	15 กรัม
NaCl	40 กรัม
KCl	1 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

6.4 1X TBST (0.05% Tween20 ใน TBS; Washing buffer)

10X TBS	100 มิลลิลิตร
Tween20 ความเข้มข้น 10%	5 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

7. การเตรียม Stock reagent

7.1 NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์

ละลาย NaCl 29.2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

7.2 KCL ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลาย KCL 7.46 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

7.3 $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลาย $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 20.3 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

7.4 MgSO4 ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลาย $MgSO4 \cdot 7H_2O$ 24.6 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

7.5 กลูโคส ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลายกลูโคส 18 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

7.6 แอมพิซิลลินความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลายแอมพิซิลลิน 2 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

7.7 IPTG ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลาย IPTG 1.19 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

7.8 Lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย Lysozyme 200 มิลลิกรัม ใน TEN buffer 20 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

7.9 Tris-EDTA-NaCl (TEN) buffer

Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 7.5)	1.00 มิลลิลิตร
EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	40.00 ไมโครลิตร
NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์	600.00 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	18.36 มิลลิลิตร

7.10 Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (pH 6.8, 8.8)

ละลาย Tris base 54.49 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่าที่ต้องการด้วย HCl แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 300 มิลลิลิตร

7.11 Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ (pH 6.8)

ละลาย Tris base 36.33 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย HCl แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 300 มิลลิลิตร

7.12 Sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 10%

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยละลายสารในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

7.13 Ammonium persulphate (APS) ความเข้มข้น 10%

ละลาย Ammonium persulphate 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

7.14 NaOH ความเข้มข้น 10 นอร์มอล

ละลาย NaOH 40 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

7.15 NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

ผสม NaOH ความเข้มข้น 10 นอร์มอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร

7.16 EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0)

ละลาย $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$ 18.61กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 10 นอร์มอล แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

7.17 Ethidium bromide ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย Ethidium bromide 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

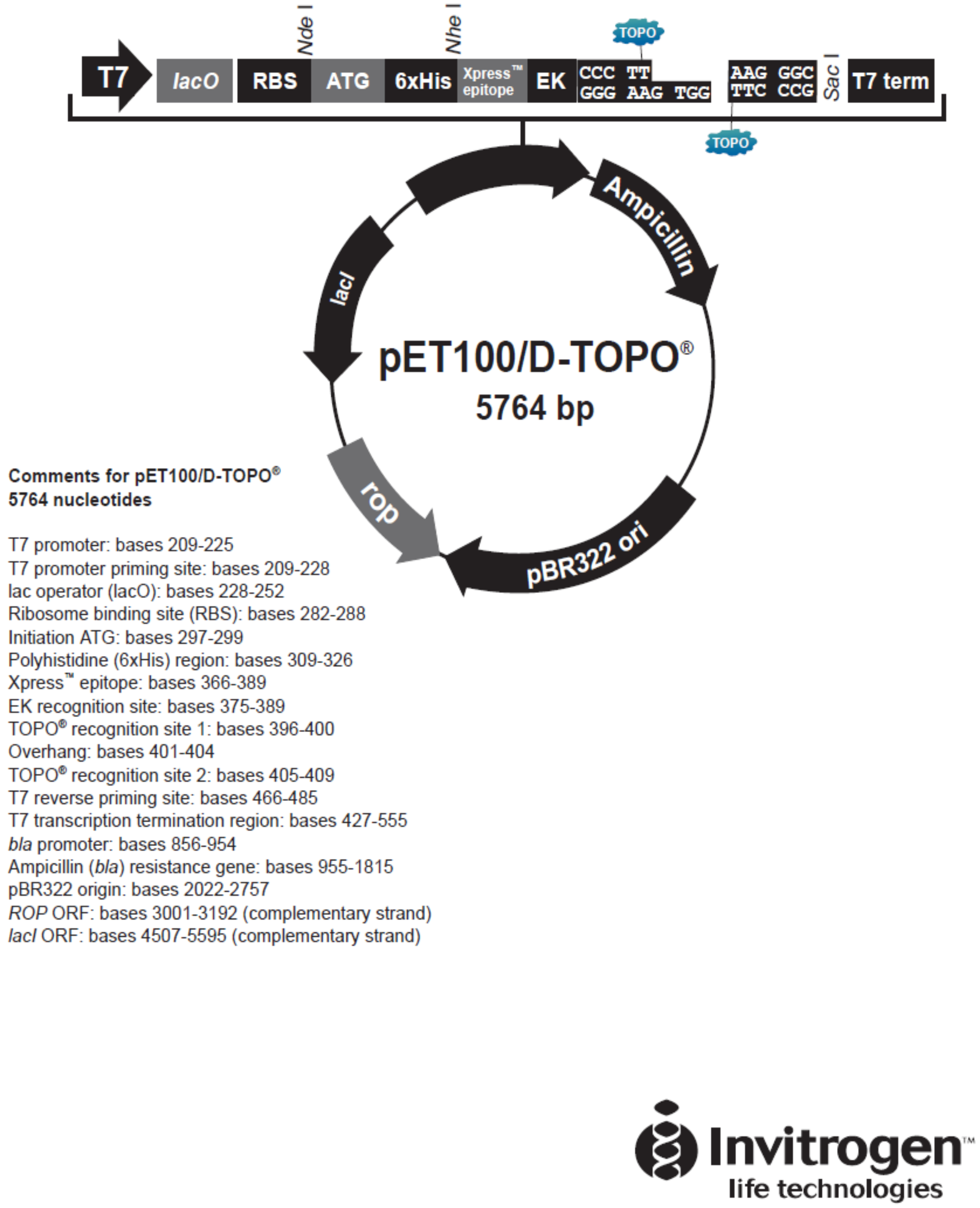
7.18 50X TAE buffer

Tris base	242.0 กรัม
Glacial acetic acid	57.1 กรัม
EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0)	100.0 มิลลิลิตร

เติมน้ำให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

8. แผนที่พลาสมิด pET100/D-TOPO



รูปที่ 20: แสดงแผนที่พลาสมิด pET100/D-TOPO

9. ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้พลาสมิดที่สกัดออกมาจากเซลล์ *E. coli* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

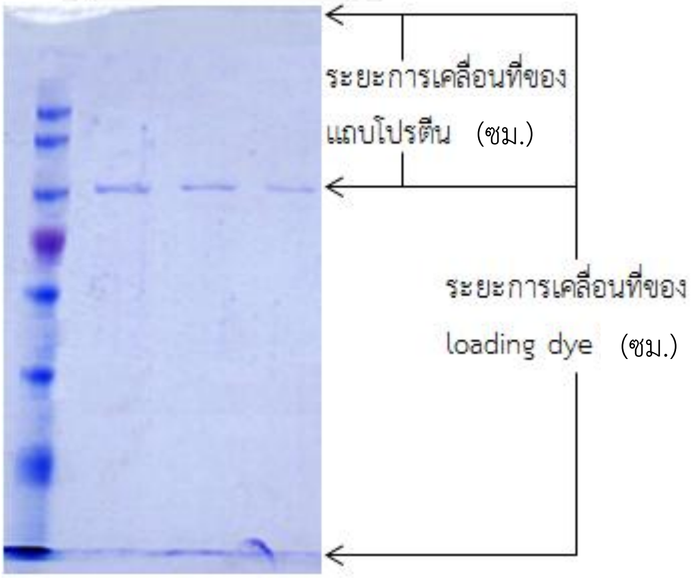
```
   1 ATGATAACGA ATATAAAAAG TATA-A-GC- TA-G-CAA-T AA-C-GTTAA -GT-GTTC-T
  61 TGT-AA-CC- TTTTCGTTA- GGATGTAA-- -TAGCCAAAA TAATGGCTCT -AAAAATGAT
 121 CTT-AGTTTG TTTGCAACAA TGTTTGCTCA GGCTACACAA CAAACTACAA TGAGATCGAC
 181 AACAGTAAGC GTTAGCTCGT TAAACGAACT GATAGGTTTT AAACCTATTC AAGTAGAAAA
 241 CGAGCAAGAC TTTGACAGAA TCGCAGATGG AAAAAAAAGA ATTCTTGTTC CGTCGGTTAT
 301 GACTTTCGGA CCAAGTAATT CTTATTCGAA TGGAACTGCA CAAAATATAA CTTCAAATAA
 361 TTGTAATGGA AGTTACGTTG CACGTTTAAA ACCGAAAGAA TTCGTCAGAT TCTTGGAAAC
 421 ACATGATATA AATTGTGTGG ATAAATTTGT TTGGAATTAC GATCAGTATT CGGAC-TATA
 481 TTTATTCACA AGAGAACATG CTTG-AAGTA GTCAATCGAC TAAACGATCT TGCTCCTTTT
 541 TACAACGGTA ACAACGATTT GAACTTTATA CAATTGTTCA GAA---TG-- TTTT-GGG-C
 601 C-GGA-TA-T T----AT--G -TAAAAC--A TTCTC-ACCC TT--CCC-TC CCA-TTT-GA
 661 -TAC-AAACC -AAATCTCTC -AGG-CT-TT -A--GTT-AC TCCAATGCAG AA------TT
 721 TTT-GCAA-G TAGTGCACAC -TT-CTTAGA TGGAACCAA- CGATGCCGG- AAAA-GTTTT
 781 -AGAGTT-C- -TTCT---TT -ACAG-TAGC -GGATAGTAC AAAAA-TTGG -ACATACGA-
 841 TTTATCC-AC GTATCCTTTC TTTT-CTTGA AGCTACTATA AACGATCCAC AAA-GATTAA
 901 GAAA-CAATC TTTTCTCAGG CCATCGCTTT -GAATGCTGT TTTTAGA-TT GTTTCAAC-G
 961 TCATA-TCCA TTCAAACAGC AACGAATTCC TTACAATGAT CGATTATAGA TTGATTAGTA
1021 AACTGAGAAG ACTTGCTCTT GATACAAGTC TCAACACAGA TTCTCAAGTC TGGATCATCA
1081 ACAATGC--G --A--TATTT GGTTTGGATA GGATTTATGA ATATCTTCCT AGCTTTCAAC
1141 CAGTGATTGC TTCAGTTATG ACTGATGTTT TAGAAACGTA TCCATACATT TCTGAACCGT
1201 ATCTTCTAGG AATCAAAGCG TT-AACTCGA CATT-CGGAC T-GTGCGAAT TTACGGATCG
1261 GACGAATTTG TTTGAGCGAT ATCAAAGAAA C--TGTGAAA AAGGCGGTTT TGTCAAATAC
1321 ATATTATTTT GACGATAAAA CACAAATCG- TACACACAGC TCTATCAATC GATGAAATTC
1381 AACCT-CTAT ATCACGCTCT TAAACAGGTA GAATCTCAAT TTTTCCGTTT GATAGGAATT
1441 CATGCTCCCG TGTCTGGAGA TACGACGGAT TCAATTACCA TGTATGTGTA TAAATCTAGA
1501 AA-GGATTAC GAAACTTTTC ATCCTTTT-C TATTCGATCT TTCTACAGAT AATGGTGGG-
1561 ATCTACATAG AA-CGAGACA AAA-CGCTCT ATACATAT-C AACGTAC-TC CTGCAGAAA-
1621 GTAT-ATATA C---TCTCGA -AGAA-TTAC T-ACGCCAC- GAA-TATAGT CATTATCTTG
1681 TAGG-CAGA- TTT-ATAA-T T-CCAGG-TT TATGGTC-TC -AAACTT-CT G--CTCACGA
1741 TAATGAAAGA CTCACTTGGT TTGAAGAA-- GGAA-TT-GC A-GAA--TTT CT--AACCGG
1801 -TAGTTCTT- CA-A-GAGAA A-TTCAT-CC GCG-TAAAA- G-TTTGATTT -C-TGAAATT
1861 AAAA-GAGA- TGGTTCTTC- ---T-AGAA- TGGACGTTT- CAAAAATCCT AACGGCT-CG
1921 TTATGGAGAT TT-CAAATTT T-ATAGATAC TCGGGTAATT TCTTCAATTA TCTTT-ACAC
1981 CTATAAAAAA GATACCCTGA AAGATTTAAT TAGCGCATTA CGTGATTCTA ATATTCAAAC
2041 ATTTGATTTT TTAATTGATC AAACGTCTCA CGACACAGGG CTTAATACTT CGTTTCAGGC
2101 ATATTTAGAT TACCTAGTTA GCAACGTAGA CAATCTTACA GATCCATCTA CGCCTGCTCC
2161 AGATTTAACA AATTTGTCTA CCAATGATCC GAAAGTCATT CGATCTTTTT TTAGAAA-GA
2221 C-CGAAACAG GACTTAAGGC AAAATGTA-C AACCG-CCGC ATTCGG-A-C TCAACAGT-C
2281 GTTTT--TC- -TTG-TA-GA -GGTTTGA-T -ATTT-GG-A AAC-GC-TA- CC--TATAGT
2341 ----CC-AGA -CTGGAA-C- T--CTGCGTG GTCTGATTTC AATTCAAGGA TCAACGATCT
2401 TATGTCTACC TTGGAAAGCA GCGGTGTGAA TAACTTTCAG AGTATGAATT GTAGAATAGG
2461 AGAGATTCGT TTTGATAAAC A-TT--TGAA TCTAGTTCGA CCTTTTACAA TTTGATTCTT
2521 GTGAAGGACC AAATCTCTCA GGGCGATACC GTTACTCGAA TGCAGAATTT CCCTTCTTAT
2581 AGACATCCAC AACGGGG-TC AAACTGATTT TCGAAACACA AGAATAGGTA TACATTCTAC
2641 TTGTTTTGCA ACTCCATCTA ATGG-ATCAA GCACAACTTG TAACACTCCA ATAGTTACGA
2701 ATG-TATTTT CGAA-TACAG CTAC-TTATG AAGAAA-TGT ATCAAAAA-C TAAA-C-GGA
2761 GAATTGAATG AA-TTGAAGT CGGAAGTCTA TACAATGAGA CCTTCATTTT ATAAAAAACT
2821 CGATTGCAAT TTCGATTCTA TTGATACAAT CCATTTACCA GACGGTAGAA AGTATTTAGC
2881 TGCGAAGGCG AAGTTGTAAT TTC
```

10. การคำนวณหาขนาดโมเลกุล (Molecular Weight) ของโปรตีนจากการทำ SDS-PAGE

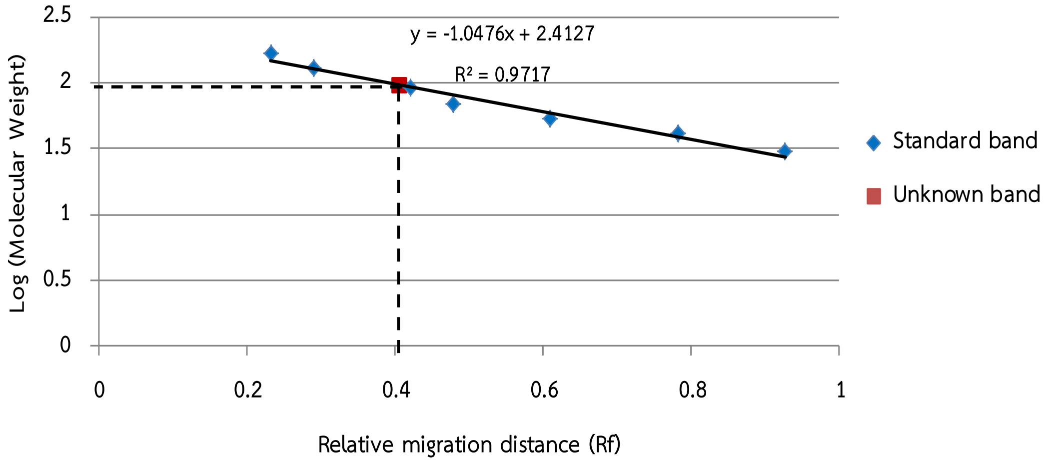
นำโปรตีนมาแยกตามขนาดของโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE และ standard protein (เป็นโปรตีนที่ทราบขนาดโมเลกุลอยู่แล้ว) ในเจลเดียวกัน เมื่อแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE เสร็จ ทำการย้อมด้วย coomassie blue จนเห็นแถบโปรตีน คำนวณค่า Rf ของแต่ละแถบโปรตีน แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่าง ขนาดโมเลกุล (MW) กับค่า relative migration distance (Rf) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

Rf = ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน / ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye

โดยระยะทางที่วัดเริ่มตั้งแต่ด้านบนสุดของ separating gel แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างค่า log MW และ Rf โดยทำเป็น MW standard curve จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า log MW และค่า Rf จะได้สมการ $y = mx + b$ โดย y = log MW, m= slope ของกราฟ, x = Rf, b = จุดตัดแกน y ความถูกต้องของการคำนวณ MW ขึ้นอยู่กับ ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity of the relationship) ระหว่างค่า log MW และ Rf โดยดูจากค่า R^2 ต้องมีค่าใกล้เคียง 1.0



รูปที่ 21: แสดงระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนและระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye



รูปที่ 22: กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่า log MW และค่า Rf

คำนวณหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนจากสมการเส้นตรง y = mx + b

ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน = 2.8 ซ.ม.

ระยะการเคลื่อนที่ของ loading dye = 6.9 ซ.ม.

ดังนั้น Rf = 0.405797101

จากกราฟ y = -1.0476x + 2.4127

x = Rf = 0.405797101

y = log MW

จะได้ ขนาดโมเลกุล = $10^{y} = 10^{-1.0476(0.405797101) + 2.4127} = 10^{1.987636421}$ = 97.1 kDa

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล วีณา เจนวิทยานันท์ เพศ หญิง

เกิดเมื่อวันที่ 24 มิถุนายน 2534

ที่อยู่ 309 หมู่ 2 ตำบลระแงง อำเภอศีขรภูมิ จังหวัดสุรินทร์ 32110

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อปีการศึกษา 2550-2553

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555

ผลงานที่ตีพิมพ์

Janwitthayanan W, Keelawat S, Payungporn S, Lowanitchapat A, Suwancharoen D, Poovorawan Y, et al. In vivo gene expression and immunoreactivity of Leptospira collagenase. Microbiological research. 2013;168(5):268-72

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University