การสร้างรีคอมบิแนนต์โปรตีนแฟลกเจลลินของเชื้อ *Leptospira interrogans*

PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN FlaB OF *Leptospira interrogans*

เกศรินทร์ เลิศวัฒนวานิช

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN FlaB OF *Leptospira interrogans*

KETSARIN LERDVATANAVANICH

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN

PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การสร้างรีคอมบิแนนต์โปรตีนแฟลกเจลลินของเชื้อ *Leptospira interrogans* Production of recombinant flagellin protein of *Leptospira interrogans*
ชื่อนักศึกษา	นางสาว เกศรินทร์ เลิศวัฒนวานิช รหัสนักศึกษา 63050375
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร.ปฏิมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ผศ.ดร.ปฏิมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา การสร้างรีคอมบิแนนต์โปรตีนแฟลกเจลลินของเชื้อ *Leptospira interrogans*
ชื่อนักศึกษา นางสาว เกศรินทร์ เลิศวัฒนวานิช รหัสนักศึกษา 63050375
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2566
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.ปฏิมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์

บทคัดย่อ

โรคฉี่หนู (Leptospirosis) เป็นโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira interrogans* ซึ่งมีการแสดงอาการที่ไม่จำเพาะทำให้การวินิจฉัยแยกโรคเป็นไปได้ยาก การวินิจฉัยโดยทั่วไปมักใช้การตรวจหาแอนติเจน หรือ แอนติบอดีในตัวอย่าง ซึ่งการตรวจหาแอนติเจนนั้นมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ปริมาณเชื้อในสิ่งส่งตรวจมีน้อย การเพาะเชื้อใช้เวลานาน เครื่องมือที่ใช้ตรวจระดับโมเลกุลวินิจฉัยมีราคาแพง จึงทำให้การตรวจหาแอนติบอดีเป็นที่นิยมและเป็นวิธีมาตรฐาน การศึกษาก่อนหน้านี้คาดการณ์ว่าโปรตีนแฟลกเจลลินน่าจะเป็นแอนติเจนสำคัญที่สามารถนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยได้ เนื่องจากพบการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนแฟลกเจลลินในซีรั่มของผู้ป่วยโรคฉี่หนู ในการศึกษานี้ จึงได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนแฟลกเจลลิน และทดสอบความจำเพาะกับซีรั่มผู้ป่วยโรคฉี่หนู โดยทำการโคลนยีนและสร้างโปรตีนใน *E. coli* จากนั้นเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ แล้วตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot ผลการศึกษาพบการแสดงออกของยีน *fla*B มีขนาด 160 bp ที่มีขนาดโปรตีน 10 kDa และผลการทดสอบความจำเพาะของโปรตีนกับซีรั่มผู้ป่วย พบว่าโปรตีนแฟลกเจลลินสามารถทำปฏิกิริยากับซีรั่มของผู้ป่วยโรคฉี่หนูได้

คำสำคัญ : โรคฉี่หนู, *Leptospira interrogans*, รีคอมบิแนนต์โปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Production of recombinant protein FlaB of *Leptospira interrogans*
Students	Miss Ketsarin Lerdvatanavanich Student ID 63050375
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Saranya Phunpruch
Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Patimaporn Wongprompitak

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by *Leptospira interrogans*. Its nonspecific symptoms make it difficult to distinguish it from other diseases. Diagnosis relies on antigen and antibody detection, but antigen testing is limited by the small number of bacteria in serum, long cultivation times, and the expensive machinery required for molecular diagnosis. Therefore, serodiagnosis serves as the gold standard for leptospirosis. Previous studies have reported the potential of flagellin protein as an antigen for serodiagnosis development based on the findings of flagellin antibodies in leptospirosis patients. In this study, we synthesized recombinant flagellin protein and tested it with patient sera. The flagellin gene was cloned and expressed in *E. coli*. The expressed flagellin was then purified using affinity column chromatography and examined via SDS-PAGE and Western blotting. The results revealed a 160-bp gene encoding a 10 kDa protein. Finally, the specificity of the flagellin protein was confirmed by testing it with sera from leptospirosis patients.

Keywords : Leptospirosis, *Leptospira interrogans*, Recombinant protein

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

สหกิจศึกษาในระดับปริญญาตรีเล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงด้วยดีได้ เนื่องจากได้รับการสนับสนุนและความช่วยเหลือจากทางสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้โอกาสออกมาปฏิบัติสหกิจศึกษานอกรั้วมหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฏิมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์ ที่ให้โอกาสเข้ามาทำสหกิจศึกษา กับทางภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล รวมถึงให้ทรัพยากร อุปกรณ์เครื่องมือ ห้องปฏิบัติการ สิ่งอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ข้อมูลเชิงลึก และการมีส่วนร่วมในงานวิจัยที่จำเป็นต่อการทำสหกิจศึกษา ขอขอบพระคุณนางสาวณหฤทัย อินต๊ะสิน, นางสาวณัฐวรรณ ขัสเกตุ, นางสาวจินตภา เสือสวย, นายรวิภาศ สายสุวรรณ, และพี่ ๆ นักศึกษาระดับปริญญาโท สหกิจศึกษาครั้งนี้ไม่อาจดำเนินไปอย่างราบรื่นและสำเร็จได้หากขาดคำชี้แนะจากบุคคลากรทุกท่าน

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว และเพื่อน ๆ ทุกคนที่มีส่วนร่วมในการทำสหกิจศึกษาตลอดระยะเวลา 4 เดือนนี้ไม่อาจสำเร็จลงได้หากปราศจากความช่วยเหลือ กำลังใจ และการสนับสนุนจากทุก ๆ ท่าน

เกศรินทร์ เลิศวัฒนวานิช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญรูป ..... ฉ
คำย่อ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 2
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 โรคฉี่หนู (Leptospirosis) 3
2.1.1 การแพร่เชื้อและลักษณะอาการของโรค (Transmission and Clinical Manifestation) 4
2.1.2 วิธีการวินิจฉัย (Diagnosis of Leptospirosis) 4
2.1.3 วิธีการป้องกันการติดเชื้อ (Protection) 5
2.2 *Leptospira interrogans* 5
2.3 โปรตีนแฟลกเจลลิน (Flagellin protein) 6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 7
3.1 Single Colony PCR 7
3.2 Inoculation and IPTG induction 9
3.3 SDS-PAGE and Western blot 10
3.4 Sonication and purification 13
3.5 Dot blot 15
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 17
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 20
เอกสารอ้างอิง 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 แสดงส่วนประกอบและปริมาตรของ PCR reaction mixture 8
สำหรับ Single colony PCR
1.2 แสดง Thermal cycling condition สำหรับ Single colony PCR 8
1.3 แสดงส่วนผสมของ 15% Resolving gel และ 5% Stacking gel 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1.1 ลักษณะอาการของโรคฉี่หนู 3
1.2 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ *Leptospira interrogans* 6
1.3 แสดงลักษณะการจัดเรียง Western blot 12
1.4 แสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity purification 15
1.5 แสดงผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาด 160 bp ด้วยวิธี colony PCR 17
1.6 แสดงผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้น 18
ด้วย IPTG ด้วยวิธี SDS-PAGE
1.7 แสดงผลการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และความจำเพาะ 18
ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อ mouse Anti-His tag monoclonal antibody ด้วยวิธี
Western Blot
1.8 แสดงผลการทดสอบความไวของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้แอนติบอดีต่อ 19
เชื้อ *Leptospira* ผ่านการทำ Dot blot
1.9 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีต่อซีรั่มของคนไข้โรคฉี่หนู 19
เปรียบเทียบกับซีรั่มของคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคอื่นด้วยการทำ Dot blot

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
bp	Base pair (หน่วย)
mL	มิลลิลิตร (หน่วย)
µL	ไมโครลิตร (หน่วย)
µL	ไมโครกรัม (หน่วย)
°C	องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคฉี่หนู (Leptospirosis) เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนชนิดหนึ่งที่มักมีการแพร่ระบาดในช่วงฤดูฝนที่มีแหล่งน้ำขัง พบในประเทศเขตร้อนเป็นส่วนใหญ่ โดยเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira interrogans* ที่อยู่ในปัสสาวะของสัตว์พาหะ เช่น หนู สุนัข วัว ม้า ผ่านการสัมผัสกับสัตว์พาหะโดยตรง หรือผ่านการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมซึ่งดินและน้ำมีการปนเปื้อนเชื้ออยู่ หลังจากได้รับเชื้อคนไข้อาจมีอาการแสดงออกมา หรือไม่มีอาการใด ๆ แสดงออกมาเลย ซึ่งลักษณะอาการของโรคฉี่หนูสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรก (acute phase) คนไข้จะมีอาการ ปวดศีรษะรุนแรง, มีไข้สูง, หนาวสั่น, ปวดท้อง, ท้องเสีย, คลื่นไส้, อาเจียน, ปวดกล้ามเนื้อ, ตาแดง, ตัวเหลือง และ มีผื่นคัน ส่วนในระยะที่สอง (immune phase) ร่างกายจะเริ่มสร้างโปรตีนที่จำเพาะต่อเชื้อขึ้นมา ทำให้หลังจากไข้ลดลงประมาณ 1-2 วัน จะกลับมามีไข้อีกแต่อาการเบาลงจากครั้งแรกมาก อาจพบอาการแทรกซ้อนรุนแรง เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบ, ตับและไตวายเฉียบพลัน, เลือดออกในปอด, และมีภาวะหายใจลำบาก เป็นต้น หากรักษาไม่ทันท่วงทีอาจทำให้เสียชีวิตได้ ในปัจจุบันมีวิธีในการตรวจโรคฉี่หนูหลากหลายวิธีมาก วิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับทั่วโลก (gold standard test) คือ Microscopic agglutination test (MAT) เป็นการตรวจดูการจับกันระหว่างแอนติบอดีในซีรั่มและแอนติเจนของเชื้อ แต่ข้อเสียคือ ควบคุมยาก และเจ้าหน้าที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง

Leptospira interrogans เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่มสไปโรขีต มีลักษณะเป็นเกลียวยาว บาง ปลายโค้งงอคล้ายตะขอ มีความสามารถโดดเด่นในเรื่องการเคลื่อนที่และการก่อโรค เป็นสาเหตุให้สามารถแพร่เชื้อเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งความสามารถนี้เป็นผลมาจากแฟลกเจลลา หรือ periplasmic flagella ของเชื้อ ที่เป็นอวัยวะสำหรับการเคลื่อนที่ ภายในมีโปรตีนแฟลกเจลลินที่เป็น immunoreactive protein ที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immune response) นำไปสู่การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน ทำให้แอนติเจนอย่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนแฟลกเจลลินสามารถจับกับ IgM (Immunoglobulin M) ในซีรั่มของคนไข้โรคฉี่หนูได้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการวินิจฉัยโรคด้วยการใช้ซีรั่มเป็นอย่างมาก เพราะสามารถใช้เพื่อทดสอบการแสดงออกของโปรตีนและการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้

เนื่องจากลักษณะอาการของโรคฉี่หนูไม่มีความเฉพาะเจาะจงเหมือนโรคอื่น ๆ จึงทำให้ตรวจพบได้ช้า ซึ่งนำไปสู่การวินิจฉัยผิดพลาด รักษาไม่ตรงจุด และรักษาไม่ทันท่วงที ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการสังเคราะห์รีคอมบิแนนต์โปรตีนขึ้นมาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับซีรั่มคนไข้ในการทดสอบการติดเชื้อโรคฉี่หนูในระยะแรก (acute phase) นับว่ามีความสำคัญในทางการแพทย์เป็นอย่างมาก เพราะทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ในระยะแรก และทำให้สามารถจำแนกโรคได้เฉพาะเจาะจงขึ้นรวมถึงวินิจฉัยโรคได้ถูกต้องแม่นยำขึ้นอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

สังเคราะห์รีคอมบิแนนต์โปรตีนแฟลกเจลลิน FlaB เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรั่มของคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคฉี่หนู

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ด้านเนื้อหา
   - ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนต์เวกเตอร์บรรจุยีน *flaB* และเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นด้วย IPTG เพื่อให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน FlaB
   - ทำให้โปรตีนแฟลกเจลลินหลุดออกจากเซลล์ของ *E. coli* ด้วยวิธี sonication
   - ทำโปรตีนแฟลกเจลลินให้เข้มข้นขึ้น protein sample concentration
   - วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ SDS-PAGE และการทำปฏิกิริยากับ anti-6xHis antibody ด้วยวิธี Western blot, และ Dot blot
   - ศึกษาการจับกันระหว่างแอนติบอดีในซีรั่มคนไข้กับโปรตีน FlaB ด้วยการทำ ELISA
2) ด้านสถานที่
   - ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน อาคารศูนย์วิจัยการแพทย์ศิริราช (SiMR) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
3) ด้านระยะเวลา
   - ทำสหกิจศึกษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้รับความรู้และเทคนิคในการสังเคราะห์รีคอมบิแนนต์โปรตีน การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ และการวิเคราะห์โปรตีนด้วยหลักการทางภูมิคุ้มกัน
2) ได้ประสบการณ์การทำงานในห้องปฏิบัติการ รวมถึงเทคนิคในการใช้เครื่องมือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคฉี่หนู (Leptospirosis)

โรคฉี่หนู (Leptospirosis) เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีชื่อว่า *Leptospira interrogans* ถึงแม้โรคนี้จะเป็นที่รู้จักในชื่อว่า โรคฉี่หนู แต่หนูไม่ได้เป็นสัตว์เพียงชนิดเดียวที่เป็นสัตว์พาหะ ไม่ว่าจะเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม, สัตว์ฟันแทะ, สัตว์เลี้ยงที่เราคุ้นเคย อย่าง สุนัข แมว, สัตว์เศรษฐกิจอย่างช้าง ม้า วัว ควาย รวมถึงสัตว์ป่า หากสัตว์เหล่านี้ติดเชื้อล้วนสามารถเป็นสัตว์พาหะได้ทั้งนั้น มักพบการแพร่ระบาดสูงที่สุดในช่วงฤดูฝน ที่มีฝนตกหนัก ๆ น้ำท่วมขัง อากาศชื้นแฉะ และพบมากที่สุดในประเทศเขตร้อน นอกจากสภาพแวดล้อมน้ำท่วมขังที่ทำให้ผู้ประสบภัยหรือผู้ที่ต้องเดินย่ำน้ำไปมาเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคฉี่หนูแล้ว ปัจจัยเสี่ยงอย่างอาชีพและกิจกรรมบางประเภทก็เป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ทำให้เสี่ยงต่อการเป็นโรคฉี่หนูเช่นกัน โดยเฉพาะผู้ที่ต้องทำงานสัมผัสกับสัตว์ ดิน หรือน้ำที่อาจมีการปนเปื้อนเชื้ออยู่เป็นประจำ เช่น เกษตรกร นักปศุสัตว์ คนงานขุดลอกท่อระบายน้ำ พนักงานเก็บขยะ ผู้ที่ทำงานในโรงฆ่าสัตว์ และผู้ที่ทำงานในเหมือง เป็นต้น ในส่วนของกิจกรรม ได้แก่ กิจกรรมเดินป่า และกีฬาทางน้ำตามแหล่งน้ำธรรมชาติ Antony V. Samrot *et al*. พบว่าอัตราการป่วยและอัตราการเสียชีวิตจากโรคฉี่หนูเป็นจำนวนมากในทุก ๆ ปี ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการขาดความรู้ความเข้าใจ การรักษาความสะอาด และวิธีในการป้องกันโรคที่เพียงพอ

รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะอาการของโรคฉี่หนู

ที่มา: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978032355512800079X]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 การแพร่เชื้อและลักษณะอาการของโรค (Transmission and Clinical Manifestation)

เชื้อก่อโรค *Leptospira* สะสมอยู่ในหลอดไตส่วนต้นของเจ้าบ้าน (host) โดยสามารถอาศัยอยู่ได้เป็นระยะเวลานานและสามารถถูกขับออกมาได้ผ่านทางปัสสาวะ โรคฉี่หนูสามารถติดต่อได้ผ่านทางการสัมผัสกับสัตว์พาหะโดยตรง หรือสัมผัสกับสภาพแวดล้อมที่ดินและน้ำมีการปนเปื้อนปัสสาวะของสัตว์พาหะผ่านทางบาดแผลหรือรอยถลอกบริเวณผิวหนัง ตา เนื้อเยื่อบุผิว หรือผ่านการรับประทานเข้าไป ถึงแม้ว่าจะไม่ค่อยมีการแพร่เชื้อจากคนสู่คน แต่ก็มีความเป็นไปได้ว่าเด็กทารกสามารถได้รับเชื้อผ่านทางน้ำนมของแม่ที่ติดเชื้อ หรือมีโอกาสแต่น้อยมาก ๆ ที่คู่นอนสามารถได้รับเชื้อจากการมีเพศสัมพันธ์กับผู้ที่ติดเชื้อ

หลังจากได้รับเชื้อและใช้ระยะเวลาในการฟักตัวประมาณ 1-3 สัปดาห์แล้ว จะมีทั้งผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการใด ๆ และผู้ที่แสดงอาการ โดยสามารถแบ่งลักษณะอาการของโรคได้เป็น 2 ระยะดังนี้ ระยะแรก (acute phase) มีอาการ ไข้สูง หนาวสั่น ปวดหัวรุนแรง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้อาเจียน มีผื่นคัน ตัวเหลือง และมีตาแดง สามารถตรวจเจอเชื้อ *Leptospira* ได้ในเลือดและน้ำไขสันหลัง ส่วนระยะที่สอง (immune phase) จะเกิดขึ้นในช่วงที่กลับมามีไข้ใหม่หลังจากไข้ลด มีลักษณะอาการคือ คลื่นไส้ ปวดศีรษะ มีไข้ต่ำ อาจพบอาการแทรกซ้อนอย่างเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ตับและไตวายเฉียบพลัน หายใจลำบาก เป็นต้น สามารถตรวจเจอเชื้อ Leptospira ได้ในปัสสาวะ หรือในเนื้อเยื่อ

2.1.2 วิธีการวินิจฉัย (Diagnosis of Leptospirosis)

ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคฉี่หนูหลากหลายวิธีมาก โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธีหลัก ดังนี้

- **การตรวจทางคลินิก (clinical finding)** เป็นการตรวจวัดระดับเอนไซม์หรือเม็ดเลือดจากเลือด, น้ำไขสันหลัง และปัสสาวะ เช่น การวัดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง, ตรวจการทำงานของตับ, ตรวจค่าไต และการตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะ
- **การตรวจทางอ้อม (serological and indirection diagnostic)** เป็นการตรวจการจับกันระหว่างแอนติบอดีที่จำเพาะ (specific antibody) กับแอนติเจนจากเชื้อ *Leptospira*
    - MAT (microscopic agglutination test) เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ที่ดีที่สุด เป็นมาตรฐานสูงสุด และเป็นที่ยอมรับในระดับสากลทั่วโลก (gold standard test) เนื่องจากวิธีนี้สามารถทำได้รวดเร็วและสามารถตรวจหาแอนติบอดีเฉพาะกลุ่มได้ แต่มีข้อจำกัดคือ ซับซ้อน ควบคุมยาก ต้องคอยตรวจสอบเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นระยะ ๆ อีกทั้งยังเป็น -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันตรายต่อเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการ

- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ตรวจดูความจำเพาะของแอนติเจนในเชื้อ *Leptospira* ที่มีต่อ IgM หรือ IgG ในซีรั่มของผู้ป่วยโรคฉี่หนู

- **การตรวจทางตรง (direct diagnostic)**
  - Microscopic techniques เป็นการตรวจดูเชื้อ *Leptospira* จากตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะของผู้ป่วยโรคฉี่หนูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (dark field microscopy)
  - PCR (polymerase chain reaction) สามารถตรวจหาเชื้อ *Leptospira* จากตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะได้ตั้งแต่การป่วยในระยะแรก สามารถใช้ทั้งการตรวจแบบ RT-PCR และ nested PCR ข้อดีคือ คุ้มค่า รวดเร็ว และความแม่นยำสูง
  - LFA (lateral flow assay) เป็นการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อบนแผ่นเมมเบรน ข้อดีคือ ราคาถูก รวดเร็ว ใช้ง่ายไม่ยุ่งยากซับซ้อน

2.1.3 วิธีการป้องกันการติดเชื้อ (Protection)

เพื่อป้องกันการระบาดของโรคฉี่หนูในช่วงฤดูฝนแล้ว ควรปฏิบัติดังนี้

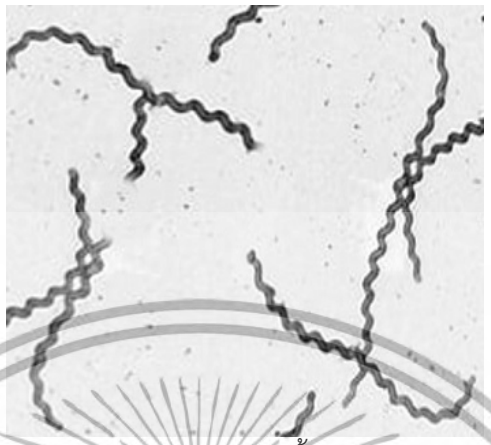
- หลีกเลี่ยงการเดินหรือสัมผัสกับแหล่งน้ำขัง หากเลี่ยงไม่ได้ควรสวมรองเท้าบูททุกครั้งเมื่อต้องเดินในแหล่งน้ำขัง หลังจากนั้นควรรีบล้างมือล้างเท้าด้วยผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคโดยเร็ว
- รักษาความสะอาดภายในบ้าน
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับสัตว์พาหะ และต้องล้างมือล้างเท้าให้สะอาดทุกครั้งหากสัมผัสภาชนะบรรจุของเสียของสัตว์
- ไม่ตัดเล็บเท้าสั้นเกินไปจนเกิดบาดแผล เนื่องจากเชื้อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายผ่านทางเท้าได้ง่าย

2.2 Leptospira interrogans

Leptospira interrogans เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่มสไปโรขีต อยู่ในจีนัส *Leptospira* มีลักษณะเป็นเกลียว บาง ยาวประมาณ 6-20 ไมโครเมตร ปลายคล้ายตะขอ หนาประมาณ 0.1-0.15 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-37°C นอกจากจะโตช้าแล้ว ยังอ่อนไหวต่อสภาพแวดล้อมมาก ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก 2 ส่วน เยื่อหุ้มชั้นนอกที่ช่วยให้เชื้อสามารถก่อโรคอย่างรุนแรงได้ มีส่วนประกอบหลักคือ lipopolysaccharide (LPS) และ periplasmic flagella มีความสามารถในการเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำคัญที่เชื้อใช้ในการเคลื่อนที่เข้าสู่เจ้าบ้าน มีส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน คือ filament, hook, และ basal body ภายใน flagellar filament มีโปรตีนแฟลกเจลลินที่เราสนใจเป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 1.2 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ *Leptospira interrogans*

ที่มา: [https://studymicrobio.com/leptospira-interrogans-complex-lab-diagnosis-antibiotic-treatment/]

2.3 โปรตีนแฟลกเจลลิน (Flagellin protein)

โปรตีนแฟลกเจลลิน เป็นโปรตีนที่อยู่ใน filament ของ periplasmic flagella มีความสามารถในการเคลื่อนที่และมีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจาก periplasmic flagella เป็นตัวการนำพาให้เชื้อเคลื่อนที่ไปเกาะบนเซลล์ของ นอกจากนี้ยังเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะมาก ๆ สามารถพบได้แค่ในเชื้อที่อยู่ใน serovars เดียวกัน (highly conserved protein) ในกลุ่มสไปโรชีต อีกทั้งยังเป็น immunoreactive protein หรือแอนติเจนที่สามารถจับกับ IgM และ IgG ในซีรั่มของคนไข้ได้ แต่เนื่องจาก epitope ฝังอยู่ด้านในทำให้แอนติบอดีในร่างกายของเราจับและกำจัดไม่ได้ จึงนำไปสู่การติดเชื้อโรคฉี่หนูในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ในส่วนของวิธีดำเนินการสหกิจศึกษาเพื่อสังเคราะห์รีคอมบิแนนต์โปรตีนแฟลกเจลลินขึ้นมา จะเริ่มจากการทำการโคลนยีน (gene cloning) โดยทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ยีนที่ต้องการโคลนขึ้นมา โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ของ *Leptospira interrogans* เมื่อได้ยีนที่ต้องการแล้วจึงทำการเชื่อม (ligation) ยีนเข้ากับเวกเตอร์ เกิดเป็นรีคอมบิแนนต์เวกเตอร์ แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 หลังจากทำการ spread plate และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 คืน แล้ว จึงเลือกโคโลนีมาทำ PCR เพื่อตรวจสอบว่าโคโลนีที่เลือกมามีเวกเตอร์และยีนที่เราต้องการหรือไม่ ต่อมาจึงทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย (plasmid DNA isolation) แล้วใส่เข้าไปในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 สำหรับสร้างโปรตีนต่อไป

3.1 Single colony PCR

ขั้นตอนการทำ single colony PCR เป็นการทำเพื่อตรวจสอบว่ารีคอมบิแนนต์เวกเตอร์ที่ได้ทำการโคลนเข้าไปในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มียีนที่เราสนใจอยู่ในเชื้อนั้นจริงหรือไม่

วัสดุอุปกรณ์

1. ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ
2. Autopipette และ tip
3. PCR tube
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin-down centrifuge)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler PCR))
6. เครื่องวิเคราะห์ระบบภาพเจล (Gel Imaging Analysis System)

สารเคมี

1. เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21
2. อาหารแข็ง (LB agar)
3. Ampicillin
4. น้ำกลั่น
5. 5X PCR reaction buffer
6. 25 mM $MgCl_2$
7. 10 mM dNTR
8. Tag DNA Polymerase, 5 U/µL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. Forward primer
10. Reverse primer
11. 2% Agarose gel
12. 1X TBE buffer

วิธีการทดลอง

ทำการแยกเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) ด้วยวิธีการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาแอมพิซิลลิน (ampicillin) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มเลือกโคโลนีเดี่ยวมาจุ่มใน PCR reaction mixture เมื่อผสมจนเข้ากันแล้วนำหลอด PCR tube ใส่ลงไปในเครื่องเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler PCR)) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่เราต้องการ เมื่อครบเวลาจึงทำการวิเคราะห์ขนาด DNA ด้วยวิธีการ Gel electrophoresis สุดท้ายถ่ายภาพเจลด้วยเครื่องเคราะห์ระบบภาพเจล (Gel Imagine Analysis System)

ตารางที่ 1.1 แสดงส่วนประกอบและปริมาตรของ PCR reaction mixture สำหรับ Single colony PCR

Components	Quantity in µL
Distilled water	13
5X PCR reaction buffer	5
25 mM $MgCl_2$	3
10 mM dNTR	1
Tag DNA Polymerase, 5 U/µL	0.2
Forward primer	1
Reverse primer	1

ตารางที่ 1.2 แสดง Thermal cycling condition สำหรับ Single colony PCR

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial denaturation	94°C	10 min	1
Denaturation	94°C	30 sec	34
Annealing	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Final Extension	72°C	2 min	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 Inoculation and IPTG induction

วัสดุอุปกรณ์

1. ฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 250 mL
2. หลอดเซนติฟิวก์ (Centrifuge tube)
3. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Micro-centrifuge tube)
4. Autopipette และ tip
5. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
7. ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabinet)
8. เครื่องวัดความทึบแสง (Spectrophotometer)

สารเคมี

1. เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21
2. Luria-Bertani broth (LB broth)
3. Ampicillin
4. IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)

วิธีการทดลอง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวไปจุ่มลงในหลอด centrifuge ที่มีอาหารเหลว LB broth ที่ผ่านการเติมยาปฏิชีวนะ Ampicillin แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ข้ามคืน จากนั้นแบ่งเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ปริมาตร 4 mL ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 100 mL ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin นำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเห็นว่าขุ่นแล้วจึงนำไปวัดค่าความขุ่น (OD) ที่ความ ยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ค่า OD อยู่ในช่วง 0.6-0.8 จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 1000 µL แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บ pellet ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 1000 x*g* เป็นเวลา 1 นาที ส่วนที่เหลือนำไปเติม 1 mM IPTG ปริมาตร 100 µL แล้วบ่มแบบเขย่าต่อที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm แล้วแบ่งเก็บตัวอย่างที่ 3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, และ 24 ชั่วโมง เสร็จแล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บ pellet ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 1000 x*g* เป็นเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 SDS-PAGE and Western blot

วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดเซนติฟิวก์ (Centrifuge tube)
2. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Micro-centrifuge tube)
3. Autopipette และ tip
4. เครื่องอุ่นหลอดทดลอง (Heating block)
5. เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin-down centrifuge)
7. เครื่องเขย่าสารละลายแบบโยก (Rocking shaker)
8. Microplate reader
9. กระจก (Spacer plate และ Short plate)
10. Casting frames
11. Casting stand with gray gaskets
12. Lid
13. Mini tank
14. Electrode assembly
15. Clamping frame
16. Combs
17. Power supply
18. Gel releaser
19. Gel holder cassette and foam pad
20. Forceps
21. Western blot blotting tank
22. Sponge
23. Filter paper stack
24. Nitrocellulose membrane
25. 96 well plate

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. 30% Acrylamide solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
4. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.0
5. 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
6. 10% APS (Ammonium Persulfate)
7. TEMED (Tetramethylethylenediamine)
8. 6X Laemmli sample loading buffer
9. 1X Running buffer
10. Coomassie brilliant blue
11. High methanol
12. Low methanol
13. 10X Towbin buffer
14. 1X Phosphate-Buffered Saline, 0.1% Tween 20 (PBST)
15. Mouse Anti-His tag monoclonal antibody
16. ALP conjugated rabbit anti-mouse Ig
17. BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium)
18. Bovine serum albumin (BSA)
19. Bradford dye reagent

วิธีการทดลอง

เริ่มจากการทำขั้นตอน SDS-PAGE เพื่อดูขนาดและการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน หลังจากทำความสะอาดและประกอบอุปกรณ์เรียบร้อยแล้ว ทำการเตรียมเจลโดยใช้ 15% Resolving gel และ 5% Stacking gel ซึ่งมีส่วนผสมตามตาราง ดังนี้

ตารางที่ 1.3 แสดงส่วนผสมของ 15% Resolving gel และ 5% Stacking gel

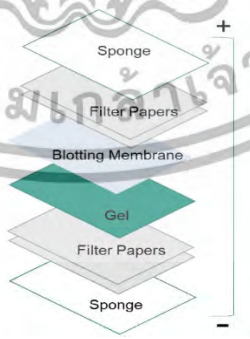
15% Resolving gel	For 1 gel	5% Stacking gel	For 1 gel
Distilled water	1100 µL	Distilled water	700 µL
30% Acrylamide mix	2500 µL	30% Acrylamide mix	168 µL
1.5 Tris-HCL, pH 8.8	1300 µL	1.5 Tris-HCL, pH 6.0	125 µL
10% SDS	50 µL	10% SDS	10 µL
10% APS	50 µL	10% APS	10 µL
TEMED	5 µL	TEMED	2.5 µL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากใส่ 15% resolving gel ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ค่อยๆเติม Isopropanol เพื่อไม่ให้เกิดฟองแล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา polymerize กับ Isopropanol เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งแล้วเท Isopropanol ออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 2-3 ครั้ง จากนั้นจึงเติม 5% stacking gel ลงไปในพื้นที่ที่เหลือ สอดหวี เมื่อเจลแข็งแล้วประกอบอุปกรณ์เข้าด้วยกัน นำแผ่นกระจกพร้อมที่วางเจลใส่ลงไปใน electrophoresis chamber เติม 1X running buffer แล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก จากนั้นเตรียมตัวอย่างรีคอมบิแนนต์โปรตีนของเรา หลังจากใส่ marker และตัวอย่างรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่มีการผสม loading dye เรียบร้อยแล้วลงไปในหลุมแล้ว ปิดฝาครอบ tank แล้วต่อเข้ากับเครื่อง electrophoresis โดยใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 100 V ค่ากระแสไฟฟ้า 200 mA ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ครึ่ง เมื่อครบเวลานำเจลมาตัด stacking gel และบริเวณที่นอกเหนือจากตัวอย่างและ marker ออก ย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา แช่ high methanol เป็นเวลา 30 นาที จนกว่าจะใส สุดท้ายแช่ด้วย low methanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงทำการตรึงเจล

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford's method โดยใช้ BSA เป็นสารละลายมาตรฐาน เจือจางที่ 500 , 250, 125, 62.5, และ 31.25 µg/mL หลังจากโหลดสารละลายมาตรฐานที่ความเจืองจางดังกล่าว ตัวอย่างโปรตีน และ blank ลงใน 96 well plate หลุมละ 10 µL แล้ว เติมสี Bradford dye reagent ใส่หลุมที่ทำการเติมสารละลายลงไปหลุมละ 200 µL นำไปโยกบนเครื่อง Rocking shaker เมื่อครบเวลานำไปวัดค่า OD ที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

ต่อมาดูการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot หลังจากรันเจลด้วยวิธี SDS-PAGE แล้ว ตัดเจลที่รันไว้สำหรับทำ Western blot มาประกอบกับอุปกรณ์อื่น ๆ ในลักษณะคล้ายแซนด์วิช ดังรูป



รูปที่ 1.3 แสดงลักษณะการจัดเรียง Western blot

ที่มา: https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/the-principle-and-procedure-of-western-blot/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำไปติดตั้งเครื่องเพื่อย้ายโมเลกุลโปรตีนจากเจลไปสู่แผ่นเมมเบรน โดยใช้ค่ากระแสไฟฟ้าที่ 200 mA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนที่มีโปรตีนไป block ด้วย 5% BSA ใน PBST (blocking solution) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมโยกด้วยเครื่อง Rocking shaker เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปบ่มกับ Mouse Anti-His tag monoclonal antibody (primary antibody) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วจึงนำไปบ่มกับ ALP conjugated rabbit anti-mouse Ig (secondary antibody) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที สุดท้ายเติม BCIP/NBT substrate ทำการโยกด้วยมือเป็นเวลาไม่เกิน 15 นาที พร้อมกับสังเกตการเปลี่ยนแปลง เมื่อตำแหน่งของโปรตีนบนเมมเบรนเปลี่ยนเป็นสีม่วงแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปกลิ้งด้วยน้ำเปล่าจนกว่า BCIP/NBT substrate จะหมดไป แล้วนำไปตากจนแห้ง

3.4 Sonication and purification

วัสดุอุปกรณ์

1. บีกเกอร์
2. หลอดเซนติฟิวก์ (Centrifuge tube)
3. น้ำแข็ง
4. 95% แอลกอฮอล์
5. กระดาษทิชชู
6. คอลัมน์
7. เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer)
8. เครื่องเขย่าสารละลายแบบโยก (Rocking shaker)
9. เครื่อง Ultrasonic Processor
10. เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Tube rotator)

สารเคมี

1. Guanidium lysis buffer, pH 7.8
2. Binding buffer
3. ProBond Resin (50% resin in 20% ethanol)
4. Denaturing binding buffer, pH 7.8
5. Denaturing wash buffer, pH 6.0
6. Denaturing wash buffer, pH 5.3

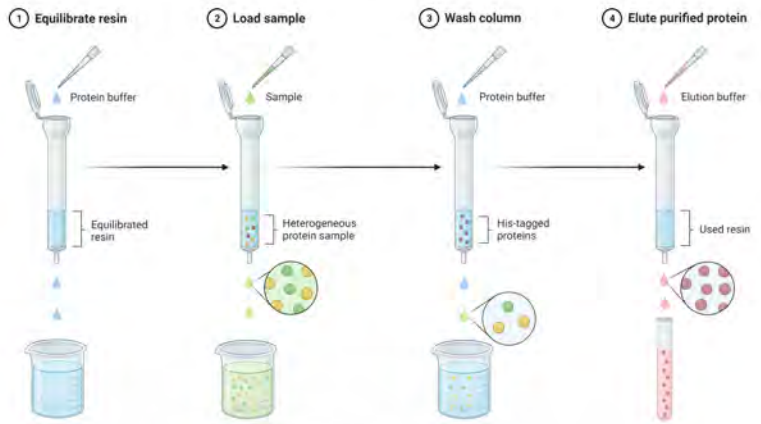
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Denaturing elution buffer, pH 4.0

ขั้นแรกเป็นการทำให้เซลล์แตกเพื่อให้โปรตีนที่เราต้องการหลุดออกมาโดยเริ่มจากใส่ guanidium lysis buffer ลงไปในหลอดเซนติฟิวก์ที่มี cell pellet นำไป vortex แล้วนำไป rotate ด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง (tube rotator) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไป sonicate ด้วยเครื่อง Ultrasonic Processor ที่ Amplitude 110%, pulse on 10 วินาที, pulse off 10 วินาที, เป็นเวลา 5 นาที (ทำจนกว่าจะใส) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 3000 x*g* เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาเก็บ pellet และ supernatant ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

นำ supernatant ที่ได้จากการ sonicate มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity Chromatography โดยเริ่มจากการเตรียมคอลัมน์และเรซิ่น ใส่ ProBond Resin (50% resin in 20% ethanol) ปริมาตร 2 mL และน้ำกลั่นปริมาตร 6 mL ลงในคอลัมน์ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 800 x*g* เป็นเวลา 1 นาที ตั้งรอจนกว่าน้ำจะผ่านคอลัมน์ออกมาหมด จากนั้นใส่ binding buffer ปริมาตร 6 mL เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 800 x*g* เป็นเวลา 1 นาที ตั้งรอจนกว่าสารละลายจะผ่านคอลัมน์ออกมาหมดจนเหลือแต่เรซิ่น (ทำ 2 ครั้ง) ใส่ supernatant ลงในคอลัมน์ เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป rotate ที่ความเร็วรอบ 20 rpm เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 800 x*g* เป็นเวลา 2 นาที (ทำ 2 ครั้ง) ตั้งรอจนกว่าสารละลายจะผ่านคอลัมน์ออกมาหมด ใส่ denature binding buffer, pH 7.8 ปริมาตร 4 mL ลงในคอลัมน์ เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป rotate ที่ความเร็วรอบ 20 rpm เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 800 x*g* เป็นเวลา 2 นาที ตั้งรอจนกว่าสารละลายจะผ่านคอลัมน์ออกมาหมด ใส่ denature wash buffer, pH 6.0 ปริมาตร 4 mL ลงในคอลัมน์ เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป rotate ที่ความเร็วรอบ 20 rpm เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 800 x*g* เป็นเวลา 2 นาที ตั้งรอจนกว่าสารละลายจะผ่านคอลัมน์ออกมาหมด ใส่ denature wash buffer, pH 5.3 ปริมาตร 4 mL ลงในคอลัมน์ เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป rotate ที่ความเร็วรอบ 20 rpm เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 800 x*g* เป็นเวลา 2 นาที ตั้งรอจนกว่าสารละลายจะผ่านคอลัมน์ออกมาหมด (ทำ 2 ครั้ง) สุดท้ายใส่ denature elution buffer, pH 4.0 ปริมาตร 5 mL ลงในคอลัมน์ ตั้งรอจนกว่าสารละลายจะผ่านคอลัมน์ออกมาหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.4 แสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity purification
ที่มา: https://www.aatbio.com/catalog/affinity-purification

3.5 Dot blot

วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Micro-centrifuge tube)
2. Autopipette และ tip
3. เครื่องสำหรับ Dot blot
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin-down centrifuge)
5. เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer)
6. Nitrocellulose membrane

สารเคมี

1. 1X Phosphate-Buffered Saline, 0.1% Tween 20 (PBST)
2. 7A5A11 culture supernatant
3. HRP anti-mouse
4. Anti-human IgM-AP
5. BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium)
6. Bovine serum albumin (BSA)
7. ซีรั่มคนไข้โรคฉี่หนู

เตรียมอุปกรณ์สำหรับ dot blot แล้วเตรียมตัวอย่างโปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5 และ 0.25 µg จากนั้นหยดลงในหลุม หลุมละ 10 µL รอจนกว่าแผ่นเมมเบรนจะแห้ง นำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาทีนำแผ่นเมมเบรนไป block ด้วย 3% BSA ใน PBST (blocking

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

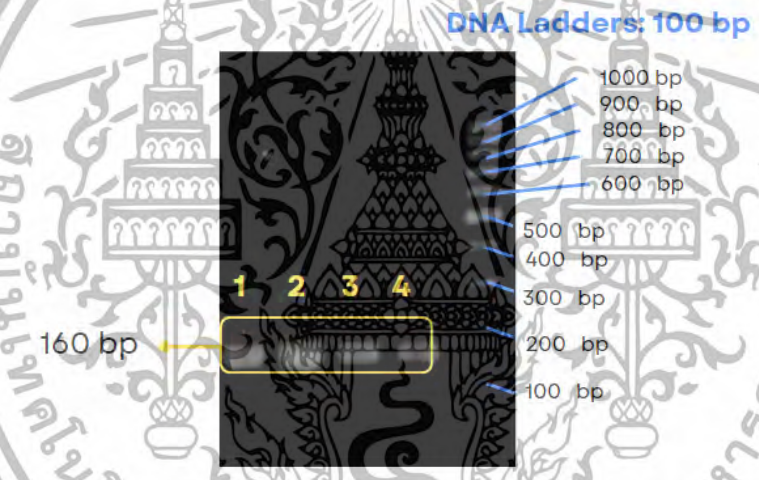
solution) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมโยกด้วยเครื่อง Rocking shaker เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปบ่มกับ 7A5A11 culture supernatant (primary antibody) ข้ามคืน เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วจึงนำไปบ่มกับ HRP anti-mouse (secondary antibody) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที สุดท้ายเติม BCIP/NBT substrate ทำการโยกด้วยมือเป็นเวลาไม่เกิน 15 นาที พร้อมกับสังเกตการเปลี่ยนแปลง เมื่อตำแหน่งของโปรตีนบนเมมเบรนเปลี่ยนเป็นสีม่วงแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปล้างในน้ำเปล่าจนกว่า BCIP/NBT substrate จะหมดไป แล้วนำไปตากจนแห้ง

หลังจากเตรียมอุปกรณ์สำหรับ dot blot เรียบร้อยแล้ว เตรียมตัวอย่างโปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่ความเข้มข้น 2 µg จากนั้นหยดลงในหลุม หลุมละ 10 µL รอจนกว่าแผ่นเมมเบรนจะแห้ง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เมื่อครบเวลานำไป block ด้วย 1% BSA ใน PBST (blocking solution) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมโยกด้วยเครื่อง Rocking shaker เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปบ่มกับซีรั่มคนไข้โรคฉี่หนูที่ความเจือจาง 1/200 (primary antibody) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วจึงนำไปบ่มกับ anti-human IgM-AP (conjugated antibody) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST ครั้ง ครั้งละ 5 นาที สุดท้ายเติม BCIP/NBT substrate ทำการโยกด้วยมือเป็นเวลาไม่เกิน 15 นาที พร้อมกับสังเกตการเปลี่ยนแปลง เมื่อตำแหน่งของโปรตีนบนเมมเบรนเปลี่ยนเป็นสีม่วงแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปกลิ้งด้วยน้ำเปล่าจนกว่า BCIP/NBT substrate จะหมดไป แล้วนำไปตากจนแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

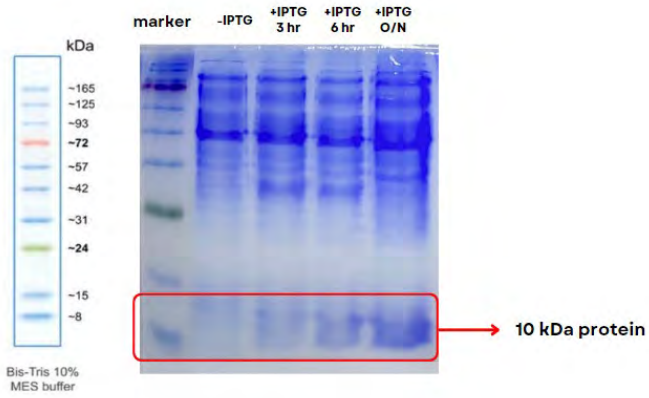
ผลการวิจัยจากการปฏิบัติสหกิจศึกษาเพื่อสังเคราะห์รีคอมบิแนนต์โปรตีนแฟลกเจลลินขึ้นมา จะเริ่มจากการทำการโคลน (gene cloning) เพื่อสร้างยีนที่ต้องการโคลนขึ้นมา และทำการสกัด - พลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียใส่เข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 จากการตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนต์โปรตีนโดยการทำ Colony PCR แสดงผลผ่านการทำ gel electrophoresis และวิเคราะห์ผลออกมาโดยใช้เครื่อง gel imaging analysis พบว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีนที่สนใจมีขนาด 160 bp ต่อมาจึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 แล้วกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน



รูปที่ 1.5 แสดงผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาด 160 bp ด้วยวิธี Colony PCR

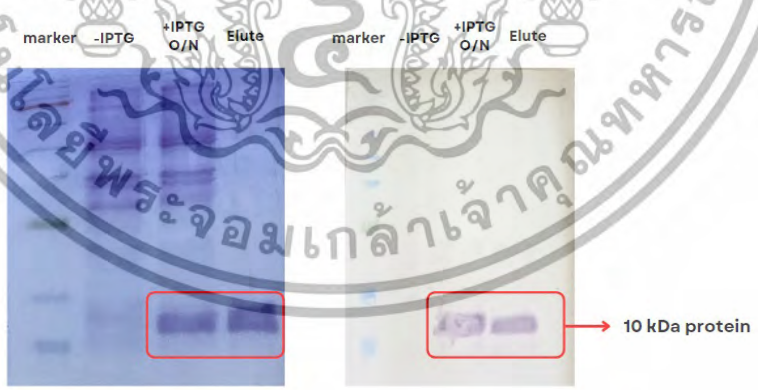
ต่อมาจึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 แล้วกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนด้วย IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) เมื่อวัดค่าความขุ่นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ที่ความยาวคลื่น 600 nm มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0.6-0.8 จึงนำตัวอย่างที่แบ่งเก็บไว้ที่ 3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, และ 24 ชั่วโมง มาตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกระหว่างรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้รับการกระตุ้นด้วย IPTG ที่ชั่วโมงต่าง ๆ และการแสดงออกของโปรตีนที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วย IPTG พบว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 10 kDa และมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนชัดเจนที่สุดที่ประมาณ 24 ชั่วโมง ส่วนโปรตีนที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ไม่เกิดการแสดงออกของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.6 แสดงผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ด้วยวิธี SDS-PAGE

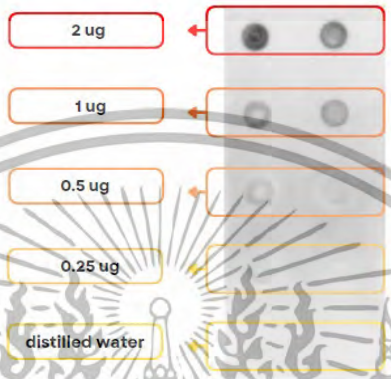
เนื่องมาจากโปรตีนสนใจฝังอยู่ด้านในเซลล์ จึงจำเป็นต้องทำวิธีการ sonication เพื่อให้เซลล์แตกออกก่อน รีคอมบิแนนต์โปรตีนจึงจะหลุดออกมาได้ เมื่อทำการ sonicate ให้เซลล์แตกจนกระทั่งตัวอย่างใสแล้วหรือเซลล์แตกแล้ว จึงนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography หลังจากได้รีคอมบิแนนต์โปรตีนที่บริสุทธิ์หรือ purified protein แล้วจึงตรวจสอบความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนต์โปรตีนผ่านการทำ SDS-PAGE และตรวจสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนต์โปรตีนต่อ Mouse Anti-His tag monoclonal antibody ผ่านการทำ Western Blot พบว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีนที่สนใจมีความบริสุทธิ์ มีขนาดประมาณ 10 kDa และมีความจำเพาะต่อ Mouse Anti-His tag monoclonal antibody จากการที่มีการแสดงแถบสีม่วงขึ้นมาบนแผ่นเมมเบรน



รูปที่ 1.7 แสดงผลการทำให้รีคอมบิแนนต์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อ mouse Anti-His tag monoclonal antibody ด้วยวิธี Western Blot

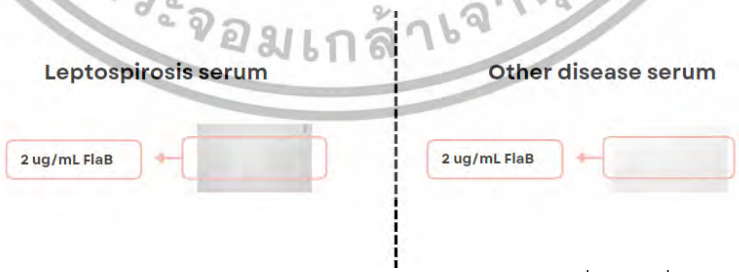
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อทดสอบความไว (Sensitivity testing) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ด้วยวิธี Dot blot โดยใช้ *Leptospira* monoclonal antibody (mAb) เพื่อดูความการจับกันระหว่างรีคอมบิแนนต์โปรตีนกับแอนติบอดีของเชื้อ *Leptospira* โดยใช้ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ 2, 1, 0.5 และ 0.25 µg แล้วนำไปทดสอบกับ *Leptospira* mAb พบว่าปริมาณรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่น้อยที่สุดที่สามารถจับกับ Leptospiral mAb ได้ คือที่ปริมาณ 0.5 µg



รูปที่ 1.8 แสดงผลการทดสอบความไวของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่มีต่อแอนติบอดีของเชื้อ *Leptospira* ด้วยการทำ Dot blot

ทำการทดสอบความจำเพาะ (Specificity testing) ของรีคอมบิแนนต์โปรตีน เพื่อดูความสามารถในการจับกับซีรั่มของคนไข้โรคฉี่หนู โดยใช้ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ 2 µg แล้วนำไปทดสอบกับซีรั่มของคนไข้โรคฉี่หนู เปรียบเทียบกับซีรั่มของคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคอื่น ใช้ความเข้มข้นซีรั่มที่ 1:200 พบว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีนสามารถจับกับซีรั่มของคนไข้โรคฉี่หนู และไม่จับกับซีรั่มของคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคอื่น นั่นหมายความว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีนของเรามีความจำเพาะต่อซีรั่มคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคฉี่หนู



รูปที่ 1.9 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่มีต่อซีรั่มของคนไข้โรคฉี่หนูเปรียบเทียบกับซีรั่มของคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคอื่นด้วยการทำ Dot blot

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

รีคอมบิแนนต์โปรตีนแฟลกเจลลินที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นมานั้น มีความจำเพาะกับ *Leptospira* mAb และสามารถทำปฏิกิริยากับซีรั่มของคนไข้โรคฉี่หนูได้ โดยไม่จับกับซีรั่มคนไข้โรคอื่น ซึ่งจากผลการทดลองเหล่านี้สามารถบ่งชี้ได้ว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีนแฟลกเจลลินนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้และต่อยอดในการพัฒนาชุดตรวจแอนติบอดีเพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคฉี่หนูในอนาคตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. นายแพทย์ทศพล มีน่วม. 2021. แถบทดสอบ Lateral flow assay หรือ Immunochromatographic assay. [Online]. http://www.med.nu.ac.th/dpMed/fileKnowledge/345_2022-01-31.pdf
2. โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน. 2022. โรคฉี่หนู (Leptospirosis). [Online]. https://www.tropmedhospital.com/uncategorized-th/leptospirosis-3.html
3. โรงพยาบาลศิริราชปิยมหาการุณย์. 2022. โรคฉี่หนูภัยที่มากับหน้าฝน. [Online]. https://www.siphhospital.com/th/news/article/share/leptospirosis
4. Antony V. Samrot et al., 2021. Leptospiral Infection, Pathogenesis and Its Diadgnosis-A Review. Pathogens. 10, 145
5. Kimberley H Gibson et al., 2020. An asymmetric sheath controls flagellar supercoiling and motility in the leptospira spirochete. eLife. 9:e53672
6. Min Lin, Narsreen Bughino, and OM Surujballi. 1999. Expression in *Escherichia coli* of *flaB*, the gene coding for a periplasmic flagellin of *Leptospira interrogans* serovar Pomona. J. Med. Microbiol. 48, 997-982
7. Min Lin et al., 1997. Identification of a 35-Kilodalton Serovar-Cross-Reactive Flagellar Protein, FlaB, from Leptospira interrogans by N-Terminal Sequencing, Gene Cloning, and Sequence Analysis. Intection and immunity. P. 4355-4359
8. Rama channel. 2017. วิธีป้องกันตัวเองจากโรคฉี่หนู. [Online]. Available. https://www.rama.mahidol.ac.th/ramachannel/gallery/%E0%B8%A7%E0%B8%B4%E0%B8%98%E0%B8%B5%E0%B8%9B%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%81%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%95%E0%B8%B1%E0%B8%A7%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%88%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B9%82%E0%B8%A3/
9. Uraiwan Kositanont et al., 2007. Application of immunoproteomics to leptospirosis: towards clinical diagnostics and vaccine discovery. Proteomics Clin. Appl. 1, 400-409

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีเตรียม Reagent สำหรับย้อมสี SDS-PAGE

1. Coomassie Brillian Blue Solution

   • Coomassie Brillian Blue R250 0.25 g

   • Absolute methanol 45 mL

   • Glacial acetic acid 10 mL

   • Dissolved water 45 mL

   - ชั่ง Coomassie Brillian Blue R250 ในฟลาสก์
   - เติม Absolutely methanol จากนั้นคนจนละลายเข้ากัน
   - เติม Dissolved water และ Glacial acetic acid จากนั้นผสมให้เข้ากัน
   - กรองด้วยกระดาษกรอง Whitman

2. High Methanol Destaining Solution

   • Absolute methanol 475 mL

   • Glacial acetic acid 75 mL

   • Glycerol 25 mL

   • Dissolved water 425 mL

   - ผสมให้เข้ากัน ใส่ขวดสีชา สุดท้ายเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. Low Methanol Destaining Solution

   • Absolute methanol 50 mL

   • Glacial acetic acid 75 mL

   • Glycerol 25 mL

   • Dissolved water 850 mL

   - ผสมให้เข้ากัน ใส่ขวดสีชา สุดท้ายเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีเตรียม Reagent สำหรับ SDS-PAGE

1. 5X Running buffer

   • Tris base 15.1 g

   • Glycine 72 g

   • Sodium dodecyl sulphate 5 g

   - เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 mL

2. 1X Running buffer

   • 5X Running buffer 200 mL

   - เติมน้ำกลั่น 800 mL

3. 1.5 Tris-HCL, pH 8.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ละลาย Tris base (MW 121.26) 36.3 g ใน Dissolved water, pH 8.8
- เติมน้ำกลั่นจนครบ 200 mL

4. 1.5 Tris-HCL, pH 6.8
   - ละลาย Tris base (MW 121.26) 12 g ใน Dissolved water, pH 6.8
   - เติมน้ำกลั่นจนครบ 200 mL
5. 10% SDS (100 mL)
   - Sodium dodecyl sulphate 10 g
   - เติมน้ำกลั่น 100 mL
6. 10X Towbin buffer
   - Tris base (25 mM) 30 g
   - Glycine (192 mM) 144 g
   - SDS (3.5 mM) 10 g
   - เติมน้ำกลั่น 1000 mL
7. 1X Towbin buffer
   - 10X Towbin buffer 100 mL
   - เติมน้ำกลั่น 900 mL
   - เติม methanol ให้เป็น 15%
8. 0.1% PBST
   - 1X PBS 100 ml
   - Tween 20 0.1 ml
9. 0.15 M PBS, pH 7.4 (10X)
   - Sodium chloride (NaCl) 80 g
   - Potassium chloride (KCl) 2 g
   - Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) 14.4 g
   - Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 2.4 g
   - ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย HCl
   - เติมน้ำกลั่น 1000 ml

วิธีเตรียม Guanidium lysis buffer

- Dissolved water 60 mL
- Stock Solution A (10X) 0.58 mL
- Stock Solution B (10X) 9.42 mL
- Guanidine Hydrochloride 57.3 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ปรับ pH ให้เป็น 7.8
- เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 mL

วิธีเตรียม Reagent สำหรับ Purification

1. Denaturing Binding Buffer, pH 7.8
   - ปรับ pH ให้เป็น 7.8
2. Denaturing Wash Buffer, pH 6.0
   - ปรับ pH ให้เป็น 6.0
3. Denaturing Elution Buffer, pH 4.0
   - ปรับ pH ให้เป็น 4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มสหกิจศึกษา

วันที่ 28 เดือน เมษายน พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นางสาวเกศรินทร์ เลิศวัฒนวานิช รหัสประจำตัว 63050375 นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่า สหกิจศึกษา เรื่องการสร้างรีคอมบิแนนต์โปรตีนแฟลกเจลลินของเชื้อ *Leptospira interrogans* (Production of recombinant flagellin protein of *Leptospira interrogans*) ปีการศึกษา 2566 เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.43%

ลงชื่อ.....เกศรินทร์ เลิศวัฒนวานิช.....
(นางสาวเกศรินทร์ เลิศวัฒนวานิช)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ผศ.ดร.ปฏิมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมสหกิจศึกษาได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้