รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การค้นหาโปรตีนชนิดใหม่ของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคที่จับกับ Factor H complement regulator เพื่อนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิส

Identification of novel Factor H-binding proteins of pathogenic *Leptospira* for development of leptospirosis vaccine

รายนามคณะผู้วิจัย

(1) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(3) Associate professor Alain Jacquet

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(4) ดร. ธีรสิทธิ์ เตชาวิวัฒนบูลย์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(5) พันโท นสพ. นพดล แสงจันทร์

แผนกสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นพ.เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ผู้ช่วยวิจัยและนิสิตปริญญาโท-เอกของกลุ่มวิจัยโรคเลปโตสไปโรซิสทุกคน รวมทั้งขอบคุณเจ้าหน้าฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ ที่ช่วยประสานงานด้วยดีมาโดยตลอด

เอชหมู่
เลขทะเบียน 017632
วัน, เดือน, ปี 8 มี.ค. 61

127895385

บทคัดย่อภาษาไทย

โรคเลปโตสไปโรซิสเกิดจากการติดเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (*Leptospira interrogans*) เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่พบได้ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย ยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีประสิทธิภาพในคน ปัจจุบันวัคซีนที่ใช้ในสัตว์ผลิตจากเชื้อตาย วัคซีนชนิดนี้มีข้อจำกัดคือแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นอยู่ได้ไม่นานเนื่องจากไม่กระตุ้นให้เกิด memory B cell ไม่สามารถป้องกันข้าม serovars ได้ และทำให้เกิดอาการข้างเคียงสูง ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคต่างจากสายพันธุ์ก่อโรคคือสามารถมีชีวิตอยู่ในซีรัมที่มี complement ได้ กลไกหลักกลไกหนึ่งที่สำคัญคือเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคมีโปรตีนที่จับกับ Factor H บนผิวเซลล์ การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานโปรตีนหลายชนิดที่สามารถจับกับ Factor H ได้ เช่น LenA, LigA, LigB, Lsa23, และ LcpA โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหา Factor H-binding protein ที่จำเพาะของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค *Leptospira interrogans* serovar Pomona ซึ่งเป็นเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในโครงการวิจัย เพื่อนำมาเป็นส่วนประกอบร่วมของวัคซีนและทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันโรค

ผู้วิจัยใช้เทคนิค Western blot overlay เพื่อค้นหา Factor H-binding protein โดยปรับสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ได้แก่ จำนวนของเชื้อ ชนิดและความเข้มข้น blocking buffers ชนิด (monoclonal และ polyclonal) และแหล่งของแอนติบอดีต่อ human Factor H และแอนติบอดีที่เป็น horse radish peroxidase (HRP)-conjugated อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถค้นพบโปรตีนที่จำเพาะที่จับกับ Factor H ในสภาวะที่ทดลองใช้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกวิธีใหม่เป็น co-immunoprecipitation ในการนี้จะเลือกเฉพาะโปรตีนที่ยื่นออกมาที่ผิวเซลล์เท่านั้น ผู้วิจัยจึงติดฉลาก surface biotinylation ของโปรตีนบนผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราและสกัดออกมาด้วย avidin columnขั้นตอนต่อไปจะนำมาบ่มร่วมกับ purified Factor H และ co-immunoprecipitation ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Factor H เพื่อแยกโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่จับกับ Factor H แล้วนำไปหาชนิดของโปรตีนด้วยวิธี mass spectrometry

โปรตีนที่เป็น Factor H-binding proteins ที่ค้นพบจากโครงการวิจัยนี้จะนำไปใช้เป็นวัคซีนแอนติเจนชนิดใหม่และทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันโรคเลปโตสไปซิสในสัตว์ทดลองต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Leptospirosis, caused by a spirochete called *Leptospira interrogans*, is a zoonosis with worldwide distribution including Thailand. No potent leptospirosis vaccine is available for humans. Current vaccines for animals are killed whole cell vaccines. Limitations of this type of vaccine are inducing short-term immunity due to inability to induce memory B cells, failure to cross-protect against heterologous serovars, and causing several adverse reactions. Subunit vaccines containing leptospiral outer membrane proteins have been tested in animal models. However, none has shown complete protection without target organ involvement.

In contrast to saprophytic leptospires, pathogenic *Leptospira* is able to survive in complement serum. One major mechanism of complement resistance is mediated by Factor H-binding proteins on pathogenic leptospires. Previous studies demonstrated several outer membrane proteins as Factor H-binding proteins such as LenA, LigA, LigB, Lsa23, and LcpA. Our project aims to identify new Factor H-binding proteins in our *Leptospira interrogans* serovar Pomona to be used as vaccine candidates.

We used Western blot overlay technique to identify Factor H-binding proteins. Several conditions and reagents had been tested for optimization including the number of leptospires, types and concentrations of blocking buffers, types (monoclonal vs polyclonal) and sources of anti-human Factor H and secondary horse radish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies. However, no specific Factor H-binding proteins of pathogen leptospires were identified under these conditions. Therefore, co-immunoprecipitation technique will be used as an alternative method to identify Factor H-binding proteins. To identify only surface-exposed proteins as Factor H-binding protein, surface biotinylation of pathogenic leptospires was performed and biotinylated proteins were extracted with avidin column. The next step is to use the purified surface proteins for co-immuniprecipitation with a Factor H-specific antibody. Factor H-binding proteins obtained from this technique will be identified with mass spectrometry.

The Factor H-binding proteins will be used as new vaccine candidates against leptospirosis and further test its protective efficacy in animal models.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญภาพ	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย	7
บทนำ	8
วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	10
อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	20
บรรณานุกรม	21
ประวัติคณะผู้วิจัย	24

สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1. ผลแสดง Western blot overlay	11
รูปที่ 2. ผลแสดง Western blot overlay	12
รูปที่ 3. ผลแสดง Western blot overlay	12
รูปที่ 4. ผลแสดง Western blot overlay	13
รูปที่ 5. ผลแสดง Western blot overlay	14
รูปที่ 6. ผลแสดง Western blot overlay	15
รูปที่ 7. ผลแสดง surface biotinylation	17

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

BSA: bovine serum albumin

Da: dalton

DNA: deoxyribonucleic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorben assay

HRP: Horse-radish peroxidase

H+L: heavy and light chain (of immunoglobulin)

Ig: Immunoglobulin

IP: immunoprecipitation

NHS: normal human serum

OMP หรือ Omp: Outer membrane protein

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

บทนำ (Introduction)

โรคเลปโตสไปโรซิสเกิดจากการติดเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (*Leptospira interrogans*) (1, 2) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิด spirochete ที่มีลักษณะเป็นเกลียวบาง ขนาดกว้างประมาณ 0.1 ไมโครเมตร ยาว 6-20 ไมโครเมตร เคลื่อนไหวโดยการหมุนหรือการโค้งงอ สามารถก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ ส่วนเชื้อ *L. biflexa* เป็นเชื้อเลปโตสไปรา ที่พบในสิ่งแวดล้อมและไม่ก่อโรค (saprophytes) เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคมีรายงานทั้งหมดทั่วโลกมากกว่า 250 serovars แตกต่างกันตามภูมิศาสตร์และสัตว์ที่เป็น reservoir host (3, 4) ซึ่ง serovars ที่มีรายงานว่าระบาดในประเทศไทยแตกต่างจากที่เคยมีรายงานในต่างประเทศ (5, 6) ปัจจุบันมีการใช้วิธีทางชีวโมเลกุลเพื่อดูความใกล้เคียงของลำดับเบสของ DNA ในการใช้แยก species ออกเป็นอย่างน้อย 17 species (7, 8) ซึ่งไม่สัมพันธ์กับวิธีทาง serology

เชื้อเลปโตสไปราสามารถติดต่อได้จากการสัมผัสสิ่งขับถ่ายโดยเฉพาะปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อซึ่งปนเปื้อนอยู่ตามน้ำ ดินทรายเปียกชื้น หรือ พืช ผัก สำหรับประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อในหนู สุนัข โค กระบือ สุกร และแมว ส่วนใหญ่พบการระบาดของโรคในช่วงปลายฤดูฝนต่อฤดูหนาว (ตุลาคม-ธันวาคม) เชื้อสามารถไชเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังตามรอยแผลและเยื่อบุของปาก ตา จมูก หรือทางผิวหนังปกติที่เปียกชุ่มเนื่องจากแช่น้ำอยู่นาน เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะเข้าสู่กระแสเลือดแล้วกระจายไปตามอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต ลำไส้ เยื่อหุ้มสมอง ปอด หัวใจ ทำให้เกิดการอักเสบของอวัยวะเหล่านั้น ผู้ติดเชื้ออาจไม่ปรากฏอาการ จนถึงมีอาการรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ อาการและอาการแสดงที่พบได้แก่ ไข้เฉียบพลัน ปวดศีรษะรุนแรง หนาวสั่น ปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง ตาแดง ตาอักเสบrecurrent uveitis เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เหลือง โลหิตจาง ตับและไตวาย จุดเลือดออกตามผิวหนังและเยื่อบุ เลือดออกในปอด (1, 2, 9)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบ humoral หรือแอนติบอดีมีความสำคัญต่อภูมิต้านทานต่อโรคเลปโตสไปโรซิส เนื่องจากภูมิต้านทานต่อเชื้อเลปโตสไปราที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติหลังการติดเชื้อและสามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำเป็นภูมิคุ้มกันแบบ humoral และการเกิด passive immunity อาศัยแอนติบอดีเป็นหลัก (10-12) ส่วนระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (cell-mediated immunity) ยังมีการศึกษาน้อยแต่มีรายงานที่บ่งชี้ว่ามีความสำคัญในการป้องกันโรค เช่น การป้องกันการติดเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar Hardjoโดยใช้ killed vaccine กระตุ้น Th1 immunity (13) และกระตุ้นให้เกิดการสร้าง WC1+ gammadelta T cell memory population (14) (14) การกระตุ้นเม็ดเลือดขาวด้วยเชื้อเลปโตสไปรา *in vitro* พบว่าทำให้มีการสร้าง TCR$\gamma\delta$+ T cell ซึ่งหลั่ง interferon (IFN)-γ (15)

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าระบบคอมพลีเมนต์เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อเลปโตสไปรา เนื่องจากเมื่อบ่มกับ normal human serum กับเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ไม่ก่อโรค จะทำให้เชื้อตายภายในเวลาไม่กี่นาที แต่เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคยังมีชีวิตอยู่ได้ (16) ดังนั้น เชื้อเลป

โตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคจึงมีกลไกในการป้องกันกันถูกทำลายด้วยระบบคอมพลีเมนต์ โดยพบว่าเชื้อมีโปรตีนที่ผนังด้านนอกของเซลล์ที่สามารถจับกับ Factor H และ C4BP ซึ่งเป็น complement regulator ใน alternative pathway และ classic/lectin pathway ของโฮสท์ตามลำดับ เมื่อ Factor H หรือ C4BP จับอยู่บนผนังเซลล์ของเชื้อ จะยับยั้งการเกิด C3 convertase ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ขั้นตอนที่ตามมา จึงยับยั้งการเกิด membrane attack complex ที่ทำลายเชื้อ (16-18)

ตัวอย่างของโปรตีนของเชื้อเลปโตสปราที่มีรายงานว่าสามารถจับกับ Factor H เช่น LfhA (หรือ LenA), LenB, LigA, LigB, Lsa23 (19-23) และโปรตีนที่จับกับ C4BP เช่น LigA, LigB, Lsa33, Lsa25 (20-25) โปรตีนเหล่านี้พบในเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคแต่ไม่พบในสายพันธุ์ไม่ก่อโรค และมีการแสดงออกขณะเกิดการติดเชื้อในคนหรือสัตว์ทดลอง แสดงว่าอาจเป็นปัจจัยก่อโรคและมีความสำคัญขณะที่มีการติดเชื้อ นอกจากนี้ โปรตีนเหล่านี้มักมีหน้าที่มากกว่าการจับกับ complement regulators เนื่องจากพบว่าสามารถจับกับโปรตีนอื่นๆของโฮสท์ได้ด้วย เช่น laminin, fibronectin, collagen, plasminogen อย่างไรก็ตาม อาจมีโปรตีนบนผนังเซลล์อื่นๆอีกที่สามารถจับกับ complement regulators เหล่านี้ได้ โปรตีนเหล่านี้บางชนิดได้มีการนำมาทดสอบเป็นวัคซีนในรูปแบบที่เป็น recombinant protein หรือ DNA vaccine เช่น LigA และ LigB (26-28) แต่ยังไม่มีโปรตีนที่สามารถใช้ป้องกันการการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ในสัตว์ทดลอง แม้จะป้องกันการตายได้บ้างแต่ยังพบพยาธิสภาพและการบุกรุกของเชื้อในอวัยวะเป้าหมาย เช่น ไตและตับ

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การยับยั้ง alternative pathway คือ โปรตีนที่จับกับ Factor H ซึ่งเป็น complement regulator ของ alternative pathway ที่สำคัญในโฮสท์ เนื่องจากการกระตุ้น alternative pathway เกิดได้โดยไม่ต้องมี antigen-antibody complex จึงมีความสำคัญต่อการกำจัดเชื้อแม้ว่าโฮสท์ยังไม่เคยได้รับเชื้อและไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อมาก่อน เมื่อเชื้อเลปโตสไปราเข้าสู่กระแสเลือดจะจับกับ Factor H ของโฮสท์โดยอาศัย Factor H-binding protein ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์และยับยั้งการทำลายเชื้อด้วยระบบ complement

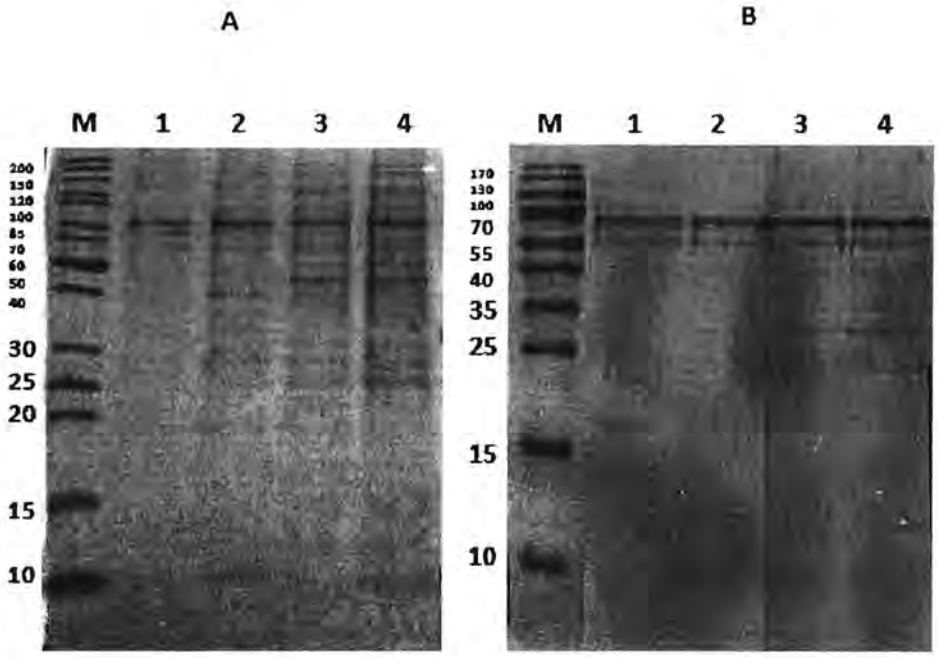
การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรามากกว่า 1 ชนิดที่สามารถจับกับ Factor H ได้ (19-23) โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการค้นหาโปรตีน Factor H-binding protein ตัวใหม่ที่จำเพาะของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค *Leptospira interrogans* serovar Pomona ซึ่งเป็นเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในโครงการวิจัย เพื่อนำมาเป็นส่วนประกอบร่วมของวัคซีนและทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันโรค ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้ถือเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาวัคซีนสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิส อันจะนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนที่สามารถเหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันให้ป้องกันการเกิดโรคได้อย่างสมบูรณ์ และได้วัคซีนสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods) และผลการวิจัย (Results)

1. การค้นหาโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่สามารถจับกับ Factor H โดยวิธี Western blot overlay

เป็นการตรวจหา Factor H-binding protein ของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค โดยนำโปรตีนของเชื้อมาแยกด้วย Sodium dodecyl sulphate agarose gel electrophoresis (SDS-PAGE) แล้ว transfer ลงบน membrane นำมาบ่มกับ normal human serum (NHS) ซึ่งเป็นแหล่งของ Factor H โดย Factor H ใน NHS จะจับกับโปรตีนของเชื้อที่ตำแหน่งของโปรตีนบน membrane เมื่อนำมาบ่มกับ primary antibody ที่เป็นแอนติบอดีที่จับกับ Factor H แล้วตามด้วย secondary antibody ซึ่งเป็น Horse-radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-IgG ที่จับกับ primary antibody ทำให้ตรวจหาตำแหน่งของโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่จับกับ Factor H ได้เมื่อใส่ chemiluminescence substrate แล้วจึงตัดส่วนของโปรตีนบน SDS-PAGE ที่ตำแหน่งตรงกันไปทำ mass spectrometry เพื่อหาชนิดของโปรตีนต่อไป มีวิธีการทดลองดังนี้

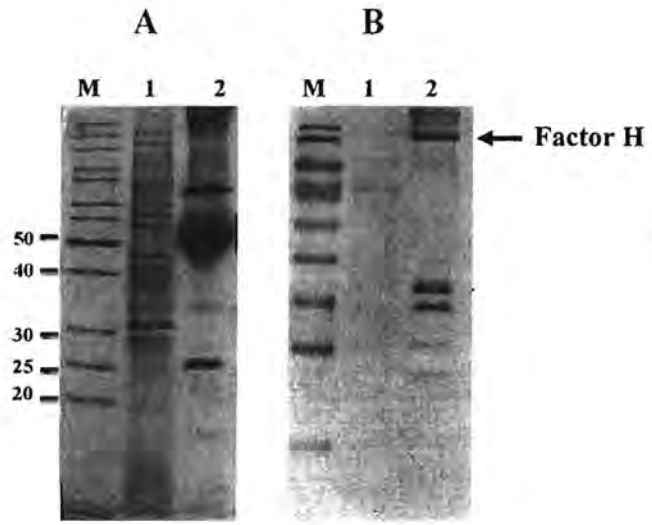
- นำเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค serovar Pomona เจริญที่ log-phase จำนวน $1x10^5$ เซลล์/lane และ $1x10^7$ เซลล์/lane มาแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ส่วนเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ไม่ก่อโรค serovar Patoc ใช้เป็นตัวอย่างควบคุม ย้อมด้วยสี Coomassie blue ผลดังรูปที่ 1A
- ย้ายโปรตีนจาก gel ลงบน nitrocellulose membrane
- บ่ม membrane กับ 10% NHS ซึ่งเป็นแหล่งของ human Factor H ใน blocking agent (phosphate buffer saline with 0.1% Tween 20, PBST+5% bovine serum albumin, BSA) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างออกด้วย PBST
- บ่ม membrane กับ polyclonal antibody 1:5,000 goat anti-human Factor H (บริษัท Abcam) นาน 1 ชั่วโมงแล้วล้างออกด้วย PBST ตามด้วย secondary antibody 1:5,000 HRP-conjugated sheep anti-goat IgG บ่มนาน 30 นาทีแล้วล้างออกด้วย PBST ตรวจหาตำแหน่งของโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่จับกับ Factor H ด้วย chemiluminescence substrate แล้วตรวจสัญญาณและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Chemidoc ผลดังรูปที่ 1B



รูปที่ 1 (A) โปรตีนของ whole cell lysate ของเชื้อ pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Pomona จำนวน $1x10^5$ เซลล์/lane (lane 1) และ $1x10^7$ เซลล์/lane (lane 2) และเชื้อ non-pathogenic *Leptospira biflexa* serovar Patoc จำนวน $1x10^5$ เซลล์/lane (lane 3) และ $1x10^7$ เซลล์/lane (lane 4) แยกด้วย 15% SDS-PAGE ตามด้วยย้อมสี Coomasie blue (B) ผลของ Western blot overlay โปรตีนของ whole cell lysate pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Pomona จำนวน $1x10^5$ เซลล์/lane (lane 1) และ $1x10^7$ เซลล์/lane (lane 2) และเชื้อ non-pathogenic *Leptospira biflexa* serovar Patoc จำนวน $1x10^5$ เซลล์/lane (lane 3) และ $1x10^7$ เซลล์/lane (lane 4) บน nitrocellulose membrane ภายหลังบ่มด้วย 10% NHS, goat anti-human Factor Hและ HRP-conjugated secondary antibody ตามลำดับ ตรวจหาสัญญาณด้วยระบบ chemiluminescence

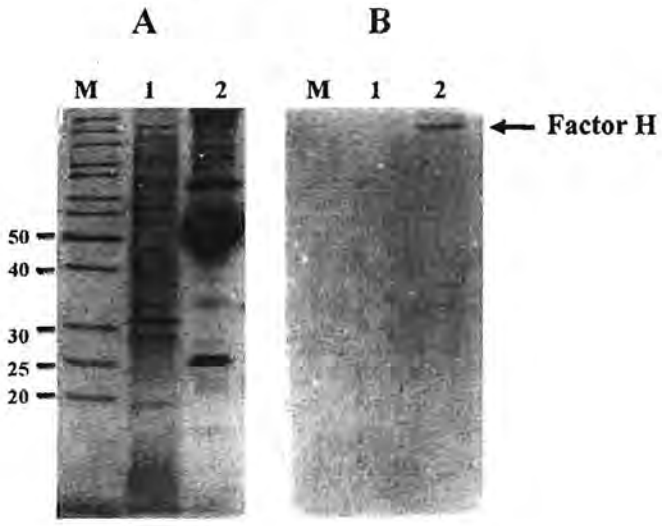
เนื่องจากผลการทดลองข้างต้นยังตรวจไม่พบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค serovar Pomona ที่สามารถจับกับ Factor H จึงทำการทดสอบเพื่อค้นหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธี Western blot overlay ได้แก่ ปริมาณเชื้อ blocking buffer ชนิดและแหล่งที่มาของแอนติบอดีต่อ Factor H และ secondary antibody โดยใช้ normal human serum (NHS) เป็นแหล่งของ human Factor H (ตำแหน่งแสดงดังลูกศรชี้ ในรูปที่ 2B) และเป็นตัวควบคุมบวกของระบบ Western blot โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ ยกเว้นเปลี่ยนแปลงสภาวะในการทดลองดังต่อไปนี้

1) ใช้ปริมาณเชื้อเป็น $1x10^8$ เซลล์/lane และปรับ blocking buffer เป็น 1% BSA ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 (A) แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี Coomasie blue และ (B) ตรวจหา Factor H binding protein ด้วยวิธี Western blot overlay โดยใช้เชื้อ pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Pomona จำนวน $1x10^8$ เซลล์/lane (lane 1), NHS 0.5 ไมโครลิตร/lane (lane 2) และใช้ 1% BSA เป็น blocking buffer บ่มด้วย 10% NHS, goat anti-human Factor H และ HRP-conjugated secondary antibody ตามลำดับ ตรวจหาสัญญาณด้วยระบบ chemiluminescence

2) ใช้ปริมาณเชื้อ serovar Pomona เป็น $1x10^8$ เซลล์/lane และใช้ 10% skimmed milk เป็น blocking buffer ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3

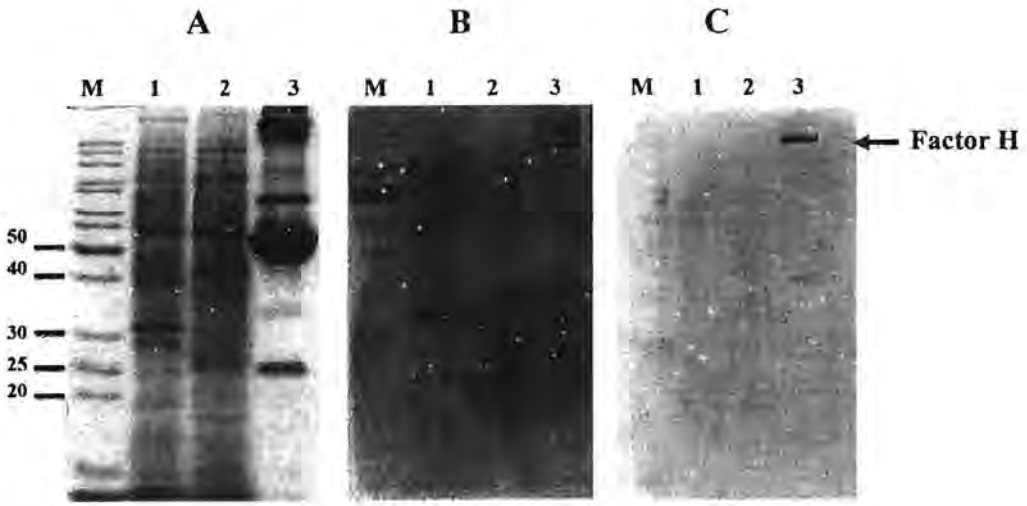


รูปที่ 3 (A) แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี Coomasie blue และ (B) ตรวจหา Factor H binding protein ด้วยวิธี Western blot overlay โดยใช้เชื้อ pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Pomona จำนวน $1x10^8$ เซลล์/lane (lane 1), NHS 0.5 ไมโครลิตร/lane (lane 2) และใช้ 10%

skimmed milk เป็น blocking buffer บ่มด้วย 10% NHS, goat anti-human Factor H และ HRP-conjugated secondary antibody ตามลำดับ ตรวจหาสัญญาณด้วยระบบ chemiluminescence

จากผลการทดลองรูปที่ 2 และ 3 พบว่าเมื่อใช้ 10% skimmed milk เป็น blocking buffer ทำให้ผล Western blot overlay มี background น้อยที่สุด และไม่เห็น molecular weight marker ซึ่งไม่ได้ติดฉลาก ตามที่ควรจะเป็น จึงใช้ 10% skimmed milk เป็น blocking buffer ในการทดลองต่อๆไป

3) ใช้ปริมาณเชื้อเป็น 2 x 10^8 เซลล์/lane และเปรียบเทียบ primary antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ human Factor H ระหว่าง polyclonal antibody (บริษัท Abcam และ บริษัท Quidel) กับ monoclonal antibody (บริษัท Thermo Scientific) ในการทำ Western blot overlay โดยผลของการใช้ polyclonal antibody บริษัท Abcam และ บริษัท Quidel ไม่แตกต่างกัน จึงแสดงผลการทดลองเมื่อใช้ polyclonal antibody ของบริษัท Abcam เป็นตัวแทนเปรียบเทียบกับผลการทดลองเมื่อใช้ monoclonal antibody เป็น primary antibody ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4



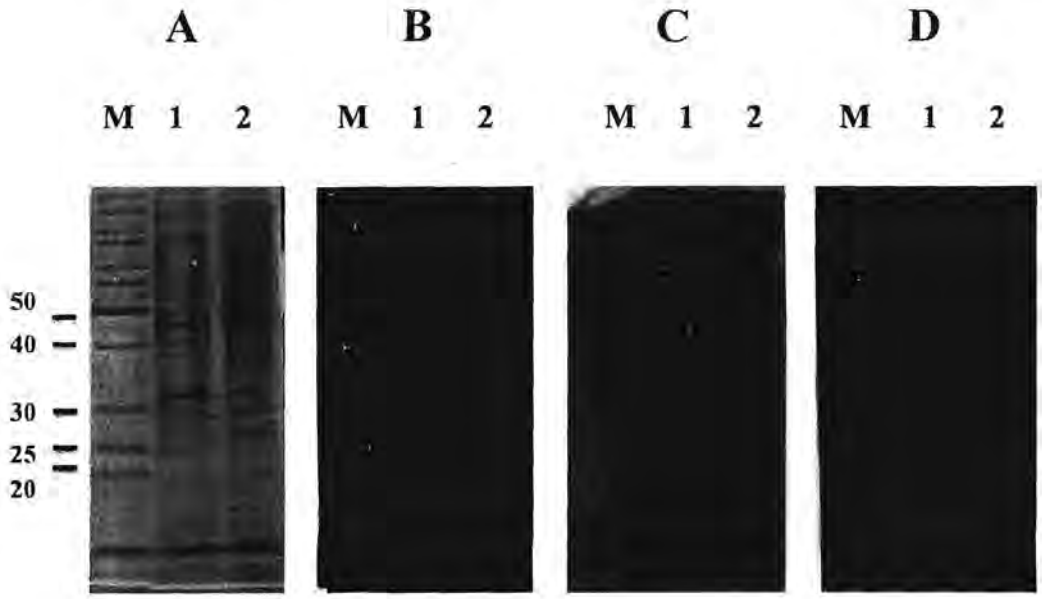
รูปที่ 4 (A) แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี Coomasie blue โดยใช้เชื้อ pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Pomona จำนวน 2x10^8 เซลล์/lane (lane 1), เชื้อ non-pathogenic *Leptospira biflexa* serovar Patoc จำนวน 2 x 10^8 เซลล์/lane (lane 2) และ NHS 0.5 ไมโครลิตร/lane (lane 3) และ (B และ C) ตรวจหา Factor H binding protein ด้วยวิธี Western blot overlay บ่มด้วย 10% NHS โดยใช้ primary antibody แอนติบอดีต่อ human Factor H เป็น (B) ชนิด polyclonal antibody ที่ 1:5,000 (บริษัท Abcam) และ (C) ชนิด monoclonal antibody ที่ 1:5,000 (บริษัท Thermo

Scientific) ตามด้วย HRP-conjugated secondary antibody ตามลำดับ ตรวจหาสัญญาณด้วยระบบ chemiluminescence

จากผลการทดลองรูปที่ 4 บน Western blot overlay พบว่า primary antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ human Factor H เมื่อใช้เป็น polyclonal antibody ตรวจพบโปรตีน (เห็น band) ของ serovar Pomona (รูป 4B lane 1) แต่เมื่อใช้ monoclonal antibody (บริษัท Thermo Scientific) ตรวจไม่พบโปรตีน (ไม่เห็น band) (รูป 4C lane 1) ดังนั้น polyclonal antibody ที่ใช้จึงเหมาะสมกับการทำ Western blot overlay มากกว่า monoclonal antibody จึงจะเลือก primary antibody เป็นชนิด polyclonal antibodyในการทดลองต่อๆไป

เนื่องจากโปรตีนที่ตรวจพบในการทำ Western blot overlay อาจการเกิดจาก cross-reaction ของ primary หรือ secondary antibody กับโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราบน membrane โดยตรง แต่ไม่ใช่เป็นผลจาก Factor H ไปจับกับโปรตีนของเชื้อจริงก็ได้ การทดลองถัดไปจึงเปรียบเทียบผลของ Western blot overlay (รูปที่ 5A) กับผลเมื่อไม่ได้บ่ม membrane กับ 10% NHS ซึ่งเป็นแหล่งของ Factor H ก่อน แต่บ่มเฉพาะกับ primary และ secondary antibody (รูปที่ 5B) หรือบ่มเฉพาะกับ secondary antibody เท่านั้น (รูปที่ 5C)

4) ใช้ปริมาณเชื้อเป็น $1x10^8$ เซลล์/lane ทำ Western blot overlay และทำการทดลองควบคุมเพื่อตรวจสอบการเกิด cross-reaction ของ primary antibody และ secondary antibody ต่อเชื้อเลปโตสไปรา ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5

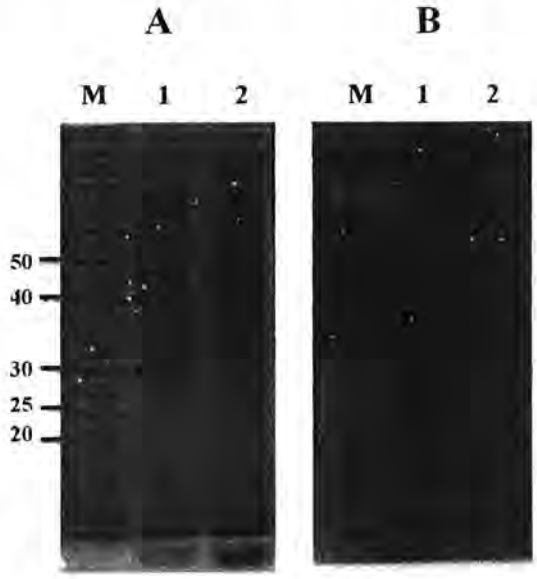


รูปที่ 5 (A) แยกโปรตีนของ whole cell lysate ของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจหาด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี Coomasie blue โดยใช้เชื้อ pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Pomona จำนวน $1x10^8$ เซลล์/lane (lane 1), เชื้อ non-pathogenic *Leptospira biflexa* serovar Patoc จำนวน $1x10^8$ เซลล์/lane (lane 2) (B) ตรวจหา Factor H binding protein ด้วยวิธี Western blot overlay โดยบ่มกับ 10% NHS ตามด้วย primary และ secondary antibody (C) ไม่ได้บ่มกับ 10% NHS (no Factor H) แต่บ่มกับ primary antibody (1:5,000) Goat IgG Polyclonal Human Factor H และ secondary antibody และ (D) บ่มด้วย secondary antibody (1:5,000) rabbit anti goat IgG (H+L) conjugated HRP) เท่านั้น แล้วตรวจหาสัญญาณด้วยระบบ chemiluminescence

ผลการทดลองพบว่าโปรตีนขนาดเดียวกันที่พบใน Western blot overlay (รูปที่ 5B lane 1) ตรวจพบได้แม้จะไม่ได้บ่มกับ Factor H (10% NHS) (รูปที่ 5C lane 1) และไม่ได้บ่มกับทั้ง Factor H และ primary antibody (รูปที่ 5D lane 1) จึงอาจเกิดจากโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรา cross-reaction กับ primary antibody และ secondary antibody ที่ใช้ ตามลำดับ

ดังนั้น การทดลองถัดไปจึงพยายามลดการเกิด cross-reaction ของ secondary antibody ด้วยการ pre-adsorption ด้วยเชื้อเลปโตสไปราก่อนนำไปใช้

5) ทำการ pre-adsorption ของ secondary antibody ด้วยเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pomona จำนวน $3x10^8$ เซลล์เพื่อลดการเกิด cross-reaction ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 (A) แยกโปรตีนของ whole cell lysate ของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจหาด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี Coomasie blue โดยใช้เชื้อ pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Pomona จำนวน

123895385

$1x10^8$ เซลล์/lane (lane 1) และเชื้อ non-pathogenic *Leptospira biflexa* serovar Patoc จำนวน $1x10^8$ เซลล์/lane (lane 2) และ (B) ทำ Western blotting โดยใช้ secondary antibody (1:5,000) rabbit anti goat IgG (H+L) conjugated-HRP ที่ผ่านการ pre-adsorption ด้วยเชื้อเลปโตสไปรา ตรวจหาสัญญาณด้วยระบบ chemiluminescence

จากผลการทดลองพบว่าแม้จะทำการ preadsorption ของ secondary antibody ด้วยเชื้อเลปโตสไปราก่อนนำมาใช้แล้ว ก็ยังพบการจับของ secondary antibody ที่ไม่จำเพาะกับโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราบน membrane จึงจำเป็นต้องทำการหาสภาวะและแอนติบอดีที่เหมาะสมต่อไป

เนื่องจากวิธี Western blot overlay ยังไม่สามารถค้นหา Factor H-binding protein ได้ ผู้วิจัยจึงวางแผนใช้วิธีอื่นมาตรวจหา ได้แก่ co-immunoprecipitation (co-IP)

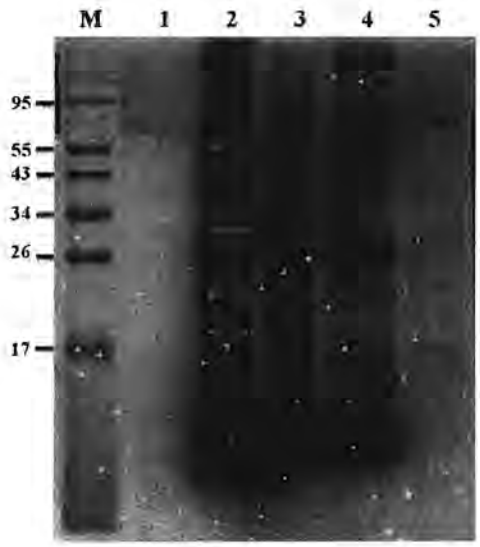
2. การค้นหาโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราที่สามารถจับกับ Factor H ด้วยวิธี co-immunoprecipitation (co-IP)

เป็นวิธีการตรวจหา protein-protein interaction วิธีหนึ่งที่มีความไวและความจำเพาะสูง ผู้วิจัยจึงนำมาเป็นวิธีทางเลือกใหม่ในการค้นหา Factor H-binding protein ของเชื้อเลปโตสไปรา เนื่องจากต้องการค้นหาเฉพาะ surface-exposed protein ของเชื้อที่สามารถจับกับ Factor H เพื่อนำมาเป็นวัคซีนแอนติเจน ผู้วิจัยจึงทำ surface biotinylation โดยการติดฉลากเชื้อเลปโตสไปราด้วย Sulfo-NHS-LC-Biotin ซึ่งเป็น biotin ชนิดที่มีคุณสมบัติ membrane impermeable แล้วจึงสกัดแยกส่วนที่เป็น surface-exposed protein ออกมา นำมาบ่มกับ purified human factor H และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Factor H และ protein G coated bead ทำให้โปรตีนของเชื้อที่จับกับ Factor H เกิด co-IP ลงมาพร้อมกับ Factor H แล้ว elute นำไปตรวจชนิดของโปรตีนด้วยวิธี mass spectrometry ได้เริ่มดำเนินการทดลองแล้วในส่วนของ surface biotinylation ดังนี้

- เพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (*Leptospira interrogan* serovar Pomona) ให้ได้ระยะ log-phase ทำการปั่นล้างเพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000xg จำนวน 3 ครั้ง แบ่งเชื้อเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เป็นเซลล์ที่ไม่แตก (intact cells) กล่าวคือไม่ได้รับการ sonication ส่วนที่ 2 และ 3 นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication (sonicated cells) แต่ละส่วนมีเชื้อจำนวน $2x10^9$ เซลล์
- การทำ surface biotinylation โดยทำการติดฉลากโปรตีนที่ผิวเซลล์ (surface-exposed protein) โดยบ่มเซลล์ ส่วนที่ 1 (intact cells) กับ EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo scientific) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นกำจัด biotin ส่วนเกินออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 xg จำนวน 3 ครั้ง ส่วนที่ 2 เป็นเซลล์ที่ทำให้แตก (sonicated cells) แต่ไม่ได้ติดฉลากกับ biotin เป็นตัวควบคุมแบบ negative control

ส่วนที่ 3 เป็นโปรตีนของเชื้อที่ถูกทำให้เซลล์แตก (sonicated cell) ก่อนติดฉลากกับ biotin จึงเป็นตัวควบคุมการติดฉลากโปรตีนทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ทั้งหมด

- คัดแยกโปรตีนที่ถูกติดฉลาก ส่วนที่ 1 และ 3 ด้วย biotin ให้บริสุทธิ์ด้วย Monomeric Avidin column (Thermo scientific)
- แยกโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate agarose gel electrophoresis (SDS-PAGE)
- ตรวจหาโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย biotin ด้วยวิธี Western blotting โดยย้ายโปรตีนที่ถูกแยกบน SDS-PAGE ลงบน nitrocellulose membrane จากนั้นบ่ม membrane กับ 1% bovine serum albumin (BSA) ที่ละลายใน 0.05% Phosphate buffer saline with Tween 20 (PBST) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อลดการจับของโปรตีนแบบไม่จำเพาะบ่ม membrane กับ 1:5,000 Streptavidin HRP (BD Pharmingen) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและตรวจหาตำแหน่งของโปรตีนด้วย chemiluminescence substrate ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 โปรตีนของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pomona เชื้อจำนวน $1x10^9$ เซลล์ที่ถูกติดฉลากด้วย biotin และตรวจหาด้วยวิธี Western blotting โปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่ไม่ถูกติดฉลากด้วย biotin (lane 1), โปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่ถูกทำให้เซลล์แตก (sonicated cell) ก่อนติดฉลากด้วย biotin (lane 2), โปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เซลล์ไม่แตก (intact cell) ถูกติดฉลากด้วย biotin (lane 3), โปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่ถูกทำให้เซลล์แตกและติดฉลากด้วย biotin แล้วสกัดแยกด้วย avidin column (lane 4) และโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เซลล์ไม่แตก (intact cell) ถูกติดฉลากด้วย biotin และสกัดแยกด้วย avidin column (lane 5)

ผลการทดลองพบว่าโปรตีนของเซลล์ที่ไม่แตกและได้รับการติดฉลากด้วย biotin และสกัดแยกได้ที่คาดว่าเป็นเฉพาะโปรตีนที่ surface-exposed (รูป 6 lane 5) มีปริมาณสัดส่วนที่น้อยกว่าโปรตีนทั้งหมดที่ถูกติดฉลากทั้งนอกและที่ผิวเซลล์ (รูป 6 lane 4) อย่างชัดเจนตามที่คาดไว้ ขั้นตอนต่อไปจะนำส่วน surface-exposed protein ที่สกัดได้ ไปทำ co-immunoprecipitation กับ human Factor H เพื่อหาโปรตีนของเชื้อที่จับกับ Factor H-binding protein ต่อไป

อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

เนื่องจากรายงานก่อนหน้านี้ (16) พบว่าเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคเมื่อบ่มกับ complement human sera พบว่าเชื้อยังมีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ไม่ก่อโรคจะตรวจพบว่าส่วนใหญ่เชื้อตาย แสดงว่าสายพันธุ์ก่อโรคสามารถหลบหลีก complement-mediated killing ได้ โดยหนึ่งในกลไกสำคัญคือเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคมี Factor H-binding protein ซึ่งสามารถจับกับ complement regulator Factor H ทำให้ไปยับยั้งการเกิด C3 convertase บนเชื้อเลปโตสไปราและไม่เกิดการกระตุ้น complement cascade ตามมา

การตรวจหา Factor H-binding protein ของเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้วิธี Western blot overlay โดยให้โปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราบน Western blot จับกับ Factor H ใน normal human sera และตรวจหาตำแหน่งโปรตีนที่ต้องการด้วย anti-human Factor H โดยจะเลือกหาโปรตีนที่ตรวจพบในเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคแต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม คือ เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ไม่ก่อโรค ผลการทดลองโดยใช้วิธี Western blot overlay ยังไม่พบโปรตีนที่มีความจำเพาะ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบสภาวะต่างๆ ได้แก่ เพิ่มจำนวนของเชื้อเป็น $2x10^8$ เซลล์ การใช้ blocking buffer โดยใช้ BSA มี background ที่สูงกว่าเมื่อใช้ 10% skimmed milk (รูปที่ 3) การใช้ primary antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ Factor H ชนิด polyclonal antibody ทำให้ตรวจพบโปรตีน band ที่มากกว่าเมื่อใช้เป็นชนิด monoclonal antibody (รูปที่ 4) นอกจากนั้น ยังพบว่าแอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot overlay มีการเกิด cross-reaction กับโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราเนื่องจากแม้ไม่ได้บ่มกับ NHS (แหล่งของ Factor H) และ primary antibody (anti-human Factor H) ก็เห็น band ของโปรตีนไม่ต่างจากเมื่อบ่มกับ NHS และ primary antibody (รูปที่ 5) ดังนั้น เพื่อลดการเกิด cross-reaction จึงทำการ pre-adsorption ของ secondary antibody กับเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pomona ก่อนนำมาใช้ พบว่ายังสามารถเห็นบาง band ได้ (รูปที่ 6) ดังนั้นโปรตีนที่ตรวจพบบน Western blot overlay อาจไม่ใช่ Factor H-binding protein แต่เกิดจาก cross-reaction ของแอนติบอดีที่ใช้กับโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรา วิธี Western blot overlay จึงยังไม่สามารถหา Factor H-binding protein ที่จำเพาะของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคได้ ต้องทำการค้นหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้วางแผนใช้วิธี co-immunoprecipitation ในการค้นหาโปรตีน Factor H-binding protein โดยผู้วิจัยได้วางแผนทำการคัดเลือกเฉพาะโปรตีนในกลุ่มที่เป็น surface-exposed protein เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเชื้อที่สามารถจับกับ Factor H ในระบบไหลเวียนโลหิตได้จริง ในเบื้องต้น ผู้วิจัยได้ทำการติดฉลากโปรตีนที่ผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราด้วย Sulfo-NHS-LC-Biotin ซึ่งเป็น biotin ที่มีคุณสมบัติ hydrophilic และไม่สามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (membrane impermeable) จึงใช้ในการติดฉลาก biotin เฉพาะโปรตีนในกลุ่ม surface-exposed protein (surface biotinylation) นอกจากนั้น เพื่อลดการติดฉลาก biotin ของโปรตีนที่ปนเปื้อนอื่นๆ เช่น โปรตีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โปรตีนจากภายในเซลล์หรือจากโครงสร้างส่วนอื่นของเชื้อเลปโตสไปรา ผู้วิจัยได้ทำการปั่นล้างตัวอย่างเชื้อด้วยความเร็วรอบต่ำเพื่อป้องกันการแตกของเซลล์ ทำการทดลองในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำเพื่อลดการเกิด endocytosis และคัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย avidin column โดยมีโปรตีนที่ทำให้เซลล์แตก (sonicated cells) ซึ่ง biotin จะติดฉลากโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ทั้งที่อยู่ภายในและที่ผิวเซลล์เป็นการทดลองควบคุม

จากผลการทดลองในรูปที่ 7 พบว่า เมื่อตรวจหา biotin ด้วยวิธี Western blotting สามารถตรวจพบโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย biotin ในตัวอย่างที่เป็นเซลล์แตกและเซลล์ตัวเต็ม (lane 2 และ 3) แต่ไม่พบ biotinในเซลล์ที่ไม่ถูกติดฉลากด้วย biotin (lane 1) และเมื่อทำการสกัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย avidin column ซึ่ง avidin สามารถจับกับ biotin ได้อย่างแข็งแรง พบว่าสามารถตรวจพบโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย biotin ทั้งในตัวอย่างที่เป็นเซลล์ตัวเต็มและเซลล์ที่ถูกทำให้แตกก่อนติดฉลากด้วย biotin (lane 4และ 5) จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยสามารถนำตัวอย่างโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น surface-exposed protein โดยนำไปบ่มกับ human Factor H แล้วทำ co-immunoprecipitation ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Factor H ก่อนนำมาหาชนิดของโปรตีนที่เป็น Factor H-binding protein ด้วย mass spectrometry ต่อไป

นอกจากนี้ ขณะนี้ผู้วิจัยได้เลือกโปรตีนที่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเป็น Factor-H binding protein ของเชื้อเลปโตสไปรา เช่น โปรตีน LenA (เดิมชื่อ LfhA หรือ Lsa24) (19) โปรตีนLsa23 (23) และโปรตีน LcpA (24) และทดสอบแล้วว่าพบในเชื้อเลปโตสไปรา serovar Pomona ที่ใช้ในการทดสอบวัคซีน ขณะนี้อยู่ในระหว่างดำเนินการสร้างและสกัด recombinant protein ของโปรตีนดังกล่าวเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของวัคซีนแอนติเจนร่วมกับโปรตีนที่อาจค้นพบใหม่ในโครงการวิจัยนี้ และทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในปีที่ 2 ต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยใช้วิธี Western blot overlay เพื่อหา Factor H-binding protein ที่จำเพาะของเชื้อเลปโตสไปรา สายพันธุ์ก่อโรค ในที่นี้คือ *Leptospira interrogans* serovar Pomona ซึ่งเป็นเชื้อตัวเดียวกับที่จะใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน โดยพยายามค้นหาสภาวะเหมาะสมที่ Factor H จับกับโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคอย่างจำเพาะ อย่างไรก็ตาม สภาวะและสารที่ใช้ในการทดลองยังมีปัญหาโดยเฉพาะแอนติบอดีที่ใช้มีการจับอย่างไม่จำเพาะ เกิด cross-reaction กับโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรา แม้ว่าจะเปลี่ยนชนิดและแหล่งที่มาแล้วก็ตาม จึงได้เลือกวิธีใหม่เป็น co-immunoprecipitation โดยเริ่มจากการติดฉลาก surface biotinylation ของโปรตีนบนผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปรา ขั้นตอนต่อไปจะนำมาบ่มร่วมกับ purified Factor H และ co-immunoprecipitation เพื่อแยกโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่จับกับ Factor H แล้วนำไปหาชนิดของโปรตีนด้วยวิธี mass spectrometry

หากมีอุปสรรคที่ไม่สามารถค้นหาโปรตีนที่จับกับ Factor H ชนิดใหม่ได้ ผู้วิจัยได้เลือก Factor H-binding protein ของเชื้อเลปโตสไปราที่มีรายงานก่อนหน้านี้ เช่น LenA, LcpA และ Lsa23 มาสร้างและสกัดเป็น recombinant protein เพื่อจะนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของวัคซีนแอนติเจนและทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันโรคในสัตว์ทดลองซึ่งเป็นแผนงานของโครงการวิจัยในปีที่ 2 ต่อไป

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Vinetz JM. Leptospirosis. Current opinion in infectious diseases. 2001 Oct;14(5):527-38.
2. McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. Current opinion in infectious diseases. 2005 Oct;18(5): 376-86.
3. Adler B, de la Pena Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. Veterinary microbiology. 2009 Mar 13.
4. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. Journal of biosciences. 2008 Nov;33(4):557-69.
5. Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, et al. *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008 Oct;58(Pt 10):2305-8.
6. 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 Jan;13(1):124-6.
7. Levett PN. Sequence-based typing of leptospira: epidemiology in the genomic era. PLoS neglected tropical diseases. 2007;1(2):e120.
8. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006 Mar;56(Pt 3):671-3.
9. Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. Veterinary microbiology. 2010 Jan 27;140(3-4):287-96.
10. Adler B, Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. Infection and immunity. 1977 Jul;17(1):67-72.
11. Adler B, Faine S. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. Journal of medical microbiology. 1978 Nov;11(4):387-400.
12. Levett PN. Leptospirosis. Clinical microbiology reviews. 2001 Apr;14(2):296-326.
13. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. Infection and immunity. 2001 Dec;69(12):7550-8.

14. Blumerman SL, Herzig CT, Baldwin CL. WC1+ gammadelta T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. European journal of immunology. 2007 May;37(5):1204-16.
15. Klimpel GR, Matthias MA, Vinetz JM. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. J Immunol. 2003 Aug 1;171(3):1447-55.
16. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. Microb Pathog 2005; 39:139–47.
17. Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. Infect Immun 2009; 77:1137–43.
18. Fraga TR, Barbosa AS and Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. Scandinavian Journal of Immunology 2011; 73: 408–419.
19. Verma A, Hellwage J, Artiushin S, et al. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. Infect Immun 2006; 74:2659–66.
20. Stevenson B, Choy HA, Pinne M, et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. PLoS One 2007; 2:e1188.
21. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, da Silva LB, et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. The Journal of infectious diseases 2012, 205: 995-1004.
22. Choy H (2012). Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: Inhibition of alternative and classical pathways of complement. PLoS ONE, 7 (7) e41566. doi:10.1371/journal.pone.0041566.
23. Siqueira GH, Atzingen MV, de Souza GO, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Leptospira interrogans Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from human serum and mediates C3b and C4b degradation. Microbiology. 2016. Feb;162(2):295-308.
24. Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. Infect Immun 2010; 78:3207–16.

25. Domingos RF, Vieira ML, Romero EC, et al. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. BMC Microbiology 2012; 12:50.
26. Faisal SM, Yan W, Chen CS, Palaniappan RU, McDonough SP, Chang YF: Evaluation of protective immunity of Leptospira immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine* 2008, 26(2):277-287.
27. Coutinho ML, Choy HA, Kelley MM, Matsunaga J, Babbitt JT, Lewis MS, Aleixo JA, Haake DA: A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. PLoS neglected tropical diseases 2011, 5(12):e1422.
28. Cao Y, Faisal SM, Yan W, et al. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. Vaccine. 2011; 29:7379-86.

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. (ภาษาไทย) แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล

   (ภาษาอังกฤษ) Dr.Kanitha Patarakul

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 2499 00005 28 0

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงาน และสถานที่ติดต่อ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 0-2256-4132 โทรศัพท์มือถือ 08-1344-5909 โทรสาร 0-2252-5952

   E-mail: kpatarakul@gmail.com และ Kanitha.Pa@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	2536
Georgetown University, USA	PhD	Microbiology	2542
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วุฒิบัตรแพทยสภา	อายุรศาสตร์	2546

การอบรมและเพิ่มความชำนาญ

1. ทุนเพิ่มพูนความรู้ ณ ต่างประเทศ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็น visiting professor ที่ Monash University เมือง Melbourne ประเทศออสเตรเลีย ปี พ.ศ. 2552
2. ทุนเพิ่มพูนความรู้ ณ ต่างประเทศระยะสั้น คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Fondation Mérieux เพื่อเข้าร่วมอบรมในหลักสูตร "15th Advanced Course of Vaccinology (ADVAC) 2014 " ณ สถาบัน Fondation Mérieux และ Université de Genève ที่เมือง Annecy ประเทศ ฝรั่งเศส ปี พ.ศ. 2557
3. ทุนจาก European Commission FP7 project (Advanced Immunization Technologies) ADITEC และ World Health Organization (WHO) เพื่อเข้ารับการอบรมเชิงปฏิบัติการ "4th WHO training course on adjuvants and vaccine formulation" ณ Vaccine Formulation Laboratory ที่ University of Lausanne, เมือง Lausanne สมาพันธรัฐสวิส ปี พ.ศ. 2558

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

   แบคทีเรียวิทยา อณูชีววิทยา วัคซีนวิทยา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย:

โครงการวิจัยเรื่องดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์ทดลองแบบจำลอง (DNA vaccine for leptospirosis in animal model) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2553-2555 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2.1 การศึกษากระบวนการเกิดออโต้ฟาจีโดยเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคในเซลล์แมคโครฟาจของมนุษย์และหนู กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2555

7.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดซับยูนิตในการป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิส โครงการยุทธศาสตร์การวิจัยเชิงลึก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช คลัสเตอร์ สุขภาพ ประจำปีงบประมาณ 2556

7.2.3 การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยหาแอนติเจนของ เลปโตสไปโรซีส และไข้เด็งกี่ แบบอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่ตรวจได้ทั้งสองโรคในชุดตรวจชุดเดียว ทุนวิจัยมุ่งเป้าด้านสุขภาพและชีวเวชศาสตร์ สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข ประจำปี 2556-2557

7.2.4 การค้นหาโปรตีนชนิดใหม่ของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคที่จับกับ Factor H complement regulator เพื่อนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิส ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ .ศ.2558-2559

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. **Patarakul** K, Lo M, Adler B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* upon exposure to serum. BMC Microbiology 2010 Jan 29;10(1):31.
2. Chaemchuen S, Rungpragayphan S, Poovorawan Y, **Patarakul K.** Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic Leptospira, by random phage display peptide library. Vet Microbiol. 2011 Nov 21;153(1-2):178-85.
3. Buaklin A, Palaga T, Hannaman D, Kerdkaew R, **Patarakul K***, Jacquet A*. Optimization of the immunogenicity of a DNA vaccine encoding a bacterial outer membrane lipoprotein. Mol Biotechnol. 2014 Oct;56(10):903-10. *co-corresponding authors
4. Umthong S, Buaklin A, Jacquet A, Sangjun N, Kerdkaew R, **Patarakul K***, Palaga T* Immunogenicity of a DNA and Recombinant Protein Vaccine Combining LipL32 and Loa22 for Leptospirosis Using Chitosan as a Delivery System. J Microbiol Biotechnol. 2015 Apr 28;25(4):526-36. *co-corresponding authors

ผู้ร่วมวิจัย

NAME: Associate Professor Dr.Alain Jacquet

WORK ADDRESS: Chulalongkorn University,
Vaccine Research Center
Department of Medicine, Faculty of Medicine,
Pattayapat Building, 8th floor, Room # 807
1873 Rama IV Road, Pathumwan,
Bangkok 10330, Thailand.
Phone: 02 2564579 Fax: 02 6523100
E-mail: alain.j@chula.ac.th

CITIZENSHIP: Belgian

EDUCATIONS:

1986-1989 Ph. D. in Chemistry. Option Biochemistry
Mention "Grande Distinction".
Université Libre de Bruxelles, Department of General Chemistry

1982-1986 Licence in chemistry. Option Biochemistry
Mention "Grande Distinction".
A belgian licence degree is roughly equivalent to a master's degree in chemistry, Université Libre de Bruxelles

APPOINTMENTS:

From 1989 to march 2009:

- Principal investigator of the Laboratory of Experimental Allergy (formerly Department of Applied Genetics).
- Associate Professor at ULB. Université Libre de Bruxelles, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires, Laboratoire d'Allergologie Expérimentale
- Design of recombinant vaccines against infectious diseases and since 1999, against house dust mite allergy.

Since april 2009:

- Associate Professor at Chulalongkorn University. Principal investigator and Group leader of the Recombinant Vaccine Unit of the Division of Allergy and Clinical Immunology (Prof. Kiat Ruxrungtham, M.D.)

- Design of recombinant vaccine against house dust mite allergy.

TECHNOLOGICAL EXPERTISE Protein biochemistry (SDS-PAGE, Western blot, Glycosylation characterization, enzymatic digestion, protein assays), Protein purification (any type of liquid chromatography including FPLC, ultrafiltration, precipitation, concentration), Recombinant protein expression (in E.coli, yeast, insect and mammalian cells), animal cell culture (mammalian cell lines as well as primary immune cells), large scale cell culture in bioreactors, Recombinant DNA technology (cloning, PCR, sequencing), Immune assays: ELISA for antibody titer determinations, competition ELISA, Cytokine assays, T-cell reactivity, Dendritic cell activation, Basophil activation, Animal model of allergy, Airway hyperresponsiveness measurement, Bronchoalveolar lavage, Protein and naked DNA vaccination (formulation with adjuvants)

PUBLICATIONS

1. E. Adam, L. Delbrassine, C. Bouillot, V. Reynders, AC. Mailleux, E. Muraille and **A. Jacquet**. Probiotic E.coli Nissle 1917 activates dendritic cells and prevents house dust mite allergy through toll-like receptor 4-dependent pathway. European Journal of Immunology 2010;40:1995-2005.
2. A. Chevigné, M.E. Dumez, M. Dumoulin, A. Matagne, **A. Jacquet** and M. Galleni. Comparative study of mature and zymogen mite cysteine protease stability and pH unfolding. Biochim Biophys Acta. 2010;1800:937-945.
3. **A. Jacquet**. The role of the house dust mite-induced innate immunity in development of allergic response. International Archives Allergy Immunol, 2010, 155:95-105
4. P. Pulsawat, S. Piboonpocanun, S. Sirivichayakul, S. Buranapraditkun, **A Jacquet**, M Shimada, O Kenji, K Ruxrungtham. Production and Immunogenicity of Hypoallergenic Codon-Optimized DNA Vaccine Encoding Mature Der p 1 Allergen. J Investig Allergol Clin Immunol, 2010;20:582-90
5. M Lejeune, JM Miró, E De Lazzari, F Garcia, X Claramonte, E Martinez, E Ribera, J Arrizabalaga, JR Arribas, P Domingo, E Ferrer, M Plana, ME Valls, D Podzamczer, T Pumarola, **A Jacquet**, J Mallolas, JM Gatell, T Gallart; the Spanish Toxoplasma gondii Study Group. Restoration of T Cell Responses to Toxoplasma gondii after Successful Combined Antiretroviral Therapy in Patients with AIDS with Previous Toxoplasmic Encephalitis. Clin Infect Dis. 2011;52:662-670

6. A.Jacquet. Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response. Clin Exp Allergy. 2011 Mar;41(3):305-11
7. A.Jacquet. The role of innate immunity activation in house dust mite allergy.Trends Mol Med. 2011;17(10):604-11.
8. S Tourdot, S Airouche, N Berjont, A Da Silveira,L Mascarell, A Jacquet, L Caplier, M Langelot, V Baron-Bodo, P Moingeon. Evaluation of therapeutic sublingual vaccines in a murine model of chronic house dust mite allergic airway inflammation. Clin Exp Allergy. 2011 Dec;41(12):1784-92.
9. K. Chokeshai-u-saha, S. Buranapraditkun, A. Jacquet, C. Nguyen and K. Ruxrungtham. A two-step non-flow cytometry-based naïve B cell isolation method and its application in Staphylococcal enterotoxin B (SEB) presentation. Asian Pac J Allergy Immunol. 2012, 30(3):214-23
10. A. Jacquet. Innate immune responses in house dust mite allergy. ISRN Allergy. 2013, ;2013:735031
11. A.Jacquet. Probiotic-derived factors: efficient treatment for allergic asthma? Clin Exp. Allergy. 2013, 43(3):268-70
12. P. Pulsawat, P. Pitakpolrat, E. Prompetchara, T. Kaewamatawong, S. Sirivichayakul, S. Buranapraditkun, D. Hannaman, K. Ruxrungtham, A. Jacquet. Optimization of a Der p 2-based prophylactic DNA vaccine against house dust mite allergy. Immunol Letters. 2013 151:23-30.
13. P. Pulsawat, A. Jacquet. Is electroporation decisive for the efficacy of DNA vaccine against house dust mite allergy?. Exp Review Vaccines, 2013, 12:977-9.
14. M.E. Dumez, J. Herman, V. Campizi, M. Galleni, A. Jacquet, A. Chevigné. Orchestration of an Uncommon Maturation Cascade of the House Dust Mite Protease Allergen Quartet. Front Immunol. 2014;5:138.
15. P. Pulsawat M. Theeraapisakkun, E. Nony, M. Le Mignon, K. Jain, A. Buaklin, J. Wongpiyabovorn, K. Ruxrungtham, A. Jacquet. Characterization of the house dust mite allergen Der p 21 produced in Pichia pastoris. Protein Expr Purif. 2014; 101C:8-13.

16. A. Buaklin, T. Palaga, D. Hannaman, R. Kerdkaew, K. Patarakul K, A. Jacquet. Optimization of the Immunogenicity of a DNA Vaccine Encoding a Bacterial Outer Membrane Lipoprotein. Mol Biotechnol.;56(10):903-10
17. S. Umthong, A. Buaklin, A Jacquet, N. Sangjun, R. Kerdkaew, K. Patarakul, T. Palaga.Immunogenicity of a DNA and Recombinant Protein Vaccine Combining LipL32 and Loa22 for Leptospirosis Using Chitosan as a Delivery System. J Microbiol Biotechnol. 2015;25(4):526-36
18. A. Bouaziz, D. Walgraffe, C. Bouillot, J. Herman, J. Foguenne, A. Gothot, R. Louis, F. Hentges, A. Jacquet, AC. Mailleux, A. Chevigné, M. Galleni, E. Adam E, M.E. Dumez. Development of recombinant stable house dust mite allergen Der p 3 molecules for component-resolved diagnosis and specific immunotherapy. Clin Exp Allergy. 2015;45(4):823-34.

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายธนาภัทร ปาลกะ
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Tanapat Palaga
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100602876498
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม. 10330 โทรศัพท์ 02-218-5070 โทรศัพท์มือถือ 081-454-9295 โทรสาร 02-252-7576 และ e-mail: tanapat.p@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษาต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
Tokyo Institute of Technology	B. Eng.	Bioengineering	2534
Tokyo Institute of Technology	M. Eng.	Biotechnology	2536
University of Massachusetts at Amherst	Ph.D.	Microbiology/ Immunology	2545

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   ภูมิคุ้มกันวิทยาระดับเซลล์และโมเลกุลและจุลชีววิทยา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอก

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

- โครงการ วิถีสัญญาณ Notch ในแมคโครฝาจและผลต่อการตอบสนองของทีลิมโฟไซท์ (แหล่งทุน สกว.)
- โครงการ การเปลี่ยนแปลงทางอิพิเจเนติกส์จากสัญญาณน็อทช์เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่รวดเร็วและเป้าหมายในการบำบัดสำหรับมะเร็งตับ (แหล่งทุนสวทช.)
- โครงการ Notch and TLR crosspath in innate immune cells (Fogarty International Research Collaboration Award, NIH, USA)
- โครงการ Dendritic Cell-specific Autophagy-inducing DNA Delivery (The Bill & Melinda Gates Foundation, USA)

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ย้อนหลัง 5 ปี)

(1) Kueanjinda, P, Roytrakul, S, **Palaga, T.** A Novel Role of Numb as ARegulator of Pro-inflammatory Cytokine Production in Macrophages in Response to Toll-likeReceptor 4. Sci. Rep. (2015) In Press (IF=5.578) แหล่งทุนNIH (USA) และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) Umthong, S, Buaklin, A, Jacquet, A, Sangjun, N, Kerdkaew, R, Patarakul, K, and **Palaga, T.** (2015) Immunogenicity of a DNA and Recombinant Protein Vaccine Combining LipL32 and Loa22 for Leptospirosis Using Chitosan as a Delivery System. *J Microbiol Biotechnol*25, 526-536 (IF=1.32)แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

(3) Sarigaputi, C, Sangpech, N, **Palaga, T**, Pudhom, K. Suppression of Inducible Nitric Oxide Synthase Pathway by 7-Deacetylgedunin, a Limonoid from Xylocarpus sp. (2015) *Planta Med.* 81, 312-319. (IF=2.36)แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(4) Buaklin, A, **Palaga, T**, Hannaman, D, Kerdkaew, R, Patarakul, K, Jacquet A. Optimization of the immunogenicity of a DNA vaccine encoding a bacterial outer membrane lipoprotein. *Mol. Biotech.*56, 903-910 (IF=2.262) แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

(5) Faksri, K, Chaiprasert, A, Pardieu, C, Casali, N, **Palaga, T**, Prammananan, T, Palittapongarnpim, P, Prayoonwiwat, N and Drobniewski, F. (2014) Heterogeneity of phenotypic characteristics of the modern and ancestral Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 32, 124-132. (IF=1.25) แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

(6) Anuleejun, S, **Palaga, T**, Katakura, Y, Kuroki, M, Kuroki M and Napathorn, SC. (2014) Optimal production of a fusion protein consisting of a single-chain variable fragment

antibody against a tumor-associated antigen and interleukin-2 in fed-batch culture of Pichia pastoris. *Anticancer Res.* 34, 3925-35. (IF=1.872) แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(7) Sangphech, N, Osborne, BA, **Palaga, T.** (2014) Notch signaling regulates the phosphorylation of Akt and survival of lipopolysaccharide-activated macrophages via regulator of G protein signaling 19 (RGS19). 219, 653-660. *Immunobiology* (IF=3.180) แหล่งทุน:NIH (USA)

(8) Sangthong, S, Sangphech, N, **Palaga, T**, Ngamrojanavanich, N, Puthong, S, Vilaivan, T, Muangsin, N. (2014) Anthracene-9, 10-dione derivatives induced apoptosis in human cervical cancer cell line (CaSki) by interfering with HPV E6 expression. *Eur. J. Med. Chem.* 77, 334-342. (IF=3.499) แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(9) Wongtangprasert, T, Natakuathung, W, Pimpitak, U, Buakeaw, A, **Palaga, T**, Komolpis, K, Khongchareonporn, N. (2014) Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. *J Zhejiang Univ Sci B.* 15, 165-72. (IF=1.108) แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

(10) **Palaga, T**, Ratanabunyong, S, Pattarakankul, T, Sangphech, N, Wongchana, W, Hadae, Y, Kuenjinda, P. (2013) Notch signaling regulates expression of Mcl-1 and apoptosis in PPD-treated macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 444-52. (IF=4.185) แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(11) Chadseesuwan, U, Puthong, S, Gajanandana, O, **Palaga, T**, Komolpis, K. (2013) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 1-aminohydantoin detection. *J. AOAC Int.* 96, 1-8. (IF=1.199) แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

(12) Osathanon, T, Manokawinchoke, J, Nowwarote, N, Aguilar, P, **Palaga, T**, Pavasant, P. (2013) Notch signaling is involved in neurogenic commitment of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 22, 1220-1231. (IF=4.459) แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(13) Meerak, J, Wanichwecharungruang, SP, **Palaga, T**. (2013) Enhancement of immune response to a DNA vaccine against Mycobacterium tuberculosis Ag85B by incorporation of an autophagy inducing system. *Vaccine* 31, 784-790. (IF=3.485) แหล่งทุน:Bill & Melinda Gates Foundation

(14) Chusri, M, Wongphanit, P, **Palaga**, T, Puthong, S, Sooksai, S, Komolpis, K. (2013) Production and characterization of a monoclonal antibody against enrofloxacin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 65-75. (IF=1.399) **แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน**

(15) Arayachukeat S, **Palaga, T**, Wanichwecharungruang SP. (2012) Clusters of carbon nanospheres derived from graphene oxide. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 4, 6808-15. (IF=4.525) **แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

(16) Boonyatecha, N, Sangphech, N, Wongchana, W, Kueanjinda, P, **Palaga, T.** (2012) Involvement of Notch signaling pathway in regulating IL-12 expression via c-Rel in activated macrophages. Mol. Immunol. 51, 255-62. (IF=3.003) **แหล่งทุน: สกว.**

(17) Wisutsitthiwong, C, Buranaruk, C, Pudhom, K, **Palaga, T.** (2011) The plant limonoid 7-oxo-deacetoxygedunin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing activation of the NF-kB and MAPK pathways. Biochem. Biophys. Res. Commun. 415, 361-366. (IF=2.281) **แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

(18) Wongchana, W, **Palaga, T.** (2011) Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. Cell. Mol. Immunol. 8, 1-8. (IF=4.185) **แหล่งทุน: สกว.**

(19) Yorsangsukkamol, J, Chaiprasert, A, **Palaga**, T, Prammananan, T, Faksri, K, Palittapongarnpim, P, Prayoonwiwat, N. (2011) Apoptosis, production of MMP9, VEGF, TNF-alpha and intracellular growth of M. tuberculosis for different genotypes and different pks15/1 genes. Asia. Pac. J. Aller. Immunol. 29, 1-13. (IF=0.76) **แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ**

(20) Kuncharin, Y, Sangphech, N, Kueanjinda, P, Bhattarakosol, P, **Palaga, T.** (2011) MAML1 regulates cell viability via the NF-kB pathway in cervical cancer cell lines. *Exp. Cell Res.*317, 1830-1840. (IF=3.372) **แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

ผู้ร่วมวิจัย

1. ดร. ธีรสิทธิ์ เตชาวิวัฒนบูลย์

   Dr. Teerasit Techawiwattanaboon

2.ตำแหน่ง

   นักวิจัยทุนโครงการหลังปริญญาเอก

   อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.พญ.ดร.กนิษฐา ภัทรกุล

3. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 0-2256-4132 โทรสาร 02252-5952
E-mail teerasit.kku@gmail.com

4. ประวัติการศึกษา

2007-2014	Ph.D. in Medical Microbiology
	Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
2003-2006	B.Sc. in Microbiology (GPA: 2.85)
	Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

RESEARCH AND TEACHING EXPERIENCES

2014-Present Research assistant at Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

2010 Teaching assistant at Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University (Courses: Microbiology for Nurses (362212))

2006 Research trainee at Mitr Phol Sugarcane Research Centre Co.,Ltd. Phukieo, Chaiyaphum 36110 Thailand (Research title: Preliminary study of *Metarhizium* sp. survival and biocontrol in sugarcane plot

TRAININGS

2013 The American Society for Microbiology (ASM) virtual workshop on Scientific Writing and Publishing organized by The American Society for Microbiology

2009 The Molecular Cloning Technique organized by Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

2005 The formal training program on ISO 9001:2000, GMP/HACCP, ISO 14001, ISO/IEC 17025, OH&S 18001, Documentation and Auditing organized by Faculty of Science, Khon Kaen University and QMI-Quest (Thailand) Co.,Ltd.

5. ผลงานตีพิมพ์

1. **Techawiwattanaboon T**, Bartpho T, Sermswan RW, Chareonsudjai S. Transcription level analysis of intracellular *Burkholderia pseudomallei* illustrates the role of BPSL1502 during bacterial interaction with human lung epithelial cells. J Microbiol. 2015 Feb;53(2):134-40.

2. Techawiwattanaboon T, Chareonsudjai S. The multiple roles of a cation transporter protein, BPSS1228 of *Burkholderia pseudomallei* in human lung epithelium cells. (Manuscript in preparation)

ผู้ร่วมวิจัย

1. (ภาษาไทย) พันโท น.สพ. นพดล แสงจันทร์
   (ภาษาอังกฤษ) LTC Noppadon Sangjun
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3869900092543
3. ตำแหน่งปัจจุบัน หัวหน้าแผนก
4. หน่วยงาน และสถานที่ติดต่อ
   แผนกสัตว์ทดลอง กองวิเคราะห์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร
   โทรศัพท์ 0 2644 8074 โทรศัพท์มือถือ 08 9888 6502 โทรสาร 0 2644 8074
   E-mail noppadon625@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต		2537
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์	2551

6.สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

พิษวิทยา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย:

- การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของผงชูรส และแป้งข้าวเจ้า กับวัสดุห้ามเลือด Celox® ต่อการห้ามเลือดเฉพาะที่ในหนูแรท

7.2 ผู้ร่วมวิจัย:

- การทดสอบความปลอดภัยและสมบัติการย่อยสลายทางชีวภาพของวัสดุห้ามเลือดสำหรับใช้ภายในร่างกายในหนู Mice

- การศึกษาตัวชี้วัดชีวภาพ นิวโทรฟิล จีเล็กทิเนส แอสโซซิเอทเต็ด ไลโปคาลินในการตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ชักนำให้เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส

- ดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์ทดลองแบบจำลอง

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีที่ผ่านมา)

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่

1. Umthong S, Buaklin A, Jacquet A, **Sangjun N**, Kerdkaew R, Patarakul K, Palaga T. 2015. Immunogenicity of a DNA and Recombinant Protein Vaccine Combining LipL32 and Loa22 for Leptospirosis Using Chitosan as a Delivery System. J Microbiol Biotechnol. 25(4):526-36.
2. Pilakasiri K, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Pilakasiri C, Chaipunko S. Koedpuech K and Pudgerd A. 2014. Detection of Leptospiral Antigen in the Lung of Hamster Infected with Leptospira interrogans, Serovar Pyrogenes by Immunoperoxidase Technique. Siriraj Med J. 66(6) (Suppl):56-62.
3. Pilakasiri K, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Pilakasiri C, Pudgerd A, Koedpuech K and Chaipunko S. 2014. Immunoperoxidase Localization of the Leptospiral antigen in The Kidney of The Infected Hamsters with Leptospira interrogans Serovar Pyrogenes. Siriraj Med J. 66(6) (Suppl):174-179.
4. Pilakasiri K, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Pilakasiri C, Koedpuech K. and Pudgerd A. 2014. Localization of Leptospiral Antigen in the Hamster Liver Infected with Leptospira interrogans Serovar Pyrogenes by Immunoperoxidase Technique. Siriraj Med J. 66 (6) (Suppl):168-173.
5. Pilakasiri K, Parichatikanond P, Thakerngpol K, Pilakasiri C, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Koedpuech K and Tachaw A. 2014. The Ultrastructural Study of the Hamster Liver Infected with Leptospira interrogans. Siriraj Med J. 66(6) (Suppl): 50-55.
6. Pilakasiri K, Thakerngpol K, Parichatikanond P, Phulsuksombati D, **Sangjan N**, Koedpuech K and Panmark P. 2014. The Ultrastructural Study of the Hamster Kidneys Infected with Leptospira interrogans. Siriraj Med J. 66(6) (Suppl):180-186.
7. Kumpunya S, Patarakul K, **Sangjun N**, Komanee P, Srisawat N. 2014. Development of animal models for the study of Leptospirosis associated acute kidney injury. J Nephro Soc Thai. 20(3):53-58.

8. Rodkvamtook W, Gaywee J, Kanjanavanit S, Ruangareerate T, Richards AL, **Sangjun N**, Jeamwattanalert P, Sirisopana N. 2013. Scrub typhus outbreak, northern Thailand, 2006-2007. Emerg Infect Dis. 19(5):774-777.
9. Kositanont U, Prasajaka P, Trakulsomboon S, **Sangjun N**, Phulsuksombati D. 2012. Fingerprints by pulsed-field gel electrophoresis of leptospires isolated from field rats and comparison with reference *Leptospira* serovars. Asian Biomedicine. 6(4):557–564.
10. Janvikul W, Ngamviriyavong P, Uppanun P, Tanjak P, **Sangjun N**. 2012. Antibacterial Wound Healing Gels from Oligochitosan Salts. Advanced Materials Research. 506:31-34.
11. Pilakasiri K, Molee P, Sringernyuang D, **Sangjun N**, Channasanon S, Tanodekaew S. 2011. Efficacy of chitin-PAA-GTMAC gel in promoting wound healing: animal study. J Mater Sci: Mater Med. 22(11):2497-2504.
12. Rodkvamtook W, Ruang-areerate T, Gaywee J, Richards A L, Jeamwattanalert P, Bodhidatta D, **Sangjun N**, Prasartvit A, Jatisatienr A and Jatisatienr C. 2011. Isolation and Characterization of Orientia tsutsugamushi from Rodents Captured followinga Scrub Typhus Outbreak at a Military Training Base, Bothong District,Chonburi Province, Central Thailand. Am J Trop Med Hyg. 84(4):599–607.