สัญญาเลขที่ R2565B2048

สำนักหอสมุด

อภินันทนาการ

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาระบบ Flagella type III secretion system ของเชื้อ Salmonella Typhimurium เพื่อใช้ในการสร้างโปรตีนลูกผสมให้หลั่งออกมานอกเซลล์

Development of flagella type III secretion system from *Salmonella* Typhimurium for recombinant protein through extracellular secretion system

ผู้วิจัย

ดร.เริงวิทย์ บุญโยม ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 14 มิ.ย. 2565
เลขทะเบียน 1052976
เลขเรียกหนังสือ ว QA 201 .S25 ร7988 2563

สนับสนุนโดย เงินรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร

หัวข้อวิจัย **การพัฒนาระบบ Flagella type III secretion system ของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium เพื่อใช้ในการสร้างโปรตีนลูกผสมให้หลั่งออกมานอกเซลล์**

ชื่อผู้วิจัย ดร.เริงวิทย์ บุญโยม

หน่วยงาน ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2559

การสร้างโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) มักนิยมใช้ *Escherichia coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเป็นระบบแรกที่ใช้ในการสร้างโปรตีนลูกผสมชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตาม การสร้างโปรตีนจาก *Escherichia coli* มักพบว่า ได้ผลผลิตโปรตีนลูกผสมที่ไม่สมบูรณ์ และยังมีโอกาสที่โปรตีนบางชนิดจะรวมตัวกันทำให้เกิดการตกตะกอนภายในเซลล์ หรือที่เรียกว่า inclusion bodies ด้วยเหตุผลเหล่านี้ การศึกษาก่อนหน้าจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาระบบสำหรับการสร้างโปรตีนลูกผสมแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular) สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ใช้ *Salmonella* Typhimurium เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการสร้างโปรตีนลูกผสมให้หลั่งออกมาสู่อาหารเลี้ยงภายนอกเซลล์ผ่านทาง Type III secretion system (T3SS) ซึ่งระบบนี้ มีความจำเป็นในการสร้าง flagellar และใช้ขนส่งโปรตีนของแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยทางคณะผู้วิจัยได้ทำการเชื่อมยีน *lipL41* ที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีน LipL41 ของเชื้อ Leptospira spp. โดยต่อ เข้าทางด้านหลังยีน GST ที่อยู่บนพลาสมิด pBNFRB โดยพลาสมิดนี้ประกอบด้วยยีนที่แสดงออกเป็น Flagellin (FliC) ที่มีส่วนของ secretion signal อยู่ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 26-47 ทางด้าน N-terminal และยีน Glutathione S-transferase โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีนลูกผสม LipL41 ไม่สามารถหลั่งออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อโดย *S.* Typhimurium ได้ ทางคณะผู้วิจัยได้สันนิษฐานว่าโปรตีนนี้อาจรวมตัวกันเกิดเป็น inclusion bodies ภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดการขัดขวางการหลั่งโปรตีนผ่านทาง T3SS คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่า ควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนาการสร้างโปรตีนลูกผสม LipL41 ด้วย T3SS ต่อไป

คำสำคัญ : โปรตีนลูกผสม ระบบการหลั่งโปรตีนชนิดที่ 3 *Salmonella* Typhimurium

Title: **Development of flagella type III secretion system from *Salmonella* Typhimurium for recombinant protein through extracellular secretion system**

Researcher: Rerngwit Boonyom, Ph.D.

ABSTRACT

Escherichia coli (E. coli) is a workhorse for expressing recombinant protein. This microorganism is often first system for heterologous protein production. However, protein produces from *E. coli* showed incomplete recombinant peptide and some proteins could aggregate into insoluble intracellular complexes as inclusion bodies. Therefore, the previous studies were aimed to develop a novel system for extracellular protein production. In this study, we used *Salmonella* Typhimurium as a host for secreting recombinant protein into culture media *via* Type III secretion system (T3SS). This system is necessary for flagellar assembly and transporting bacterial protein into host cell. Gene encoded Leptospiral LipL41 protein was ligated with recombinant plasmid, pBNFRB downstream GST gene. This plasmid contains gene encoded for secretion signal of flagellin, residue 26 to 47 and glutathione S-transferase gene. The results of this study showed that LipL41 recombinant protein cannot be secreted into culture media by *S.* Typhimurium. We assume that this protein form inclusion bodies inside bacterial cell resulting inhibition for T3SS. Further study is required for developing of LipL41 recombinant protein production with T3SS.

Key words : recombinant protein, Type III secretion system, *Salmonella* Typhimurium

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ช
สารบัญ.....ค
สารบัญตาราง.....ง
สารบัญภาพ.....ง
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย
1 รูปแบบการวิจัย 13
2. สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย 13
3. พลาสมิดและ Primers 13
4.เครื่องมือในการวิจัย 14
5. วิธีการทดลอง 15
บทที่ 4 ผลการวิจัย
ผลการวิจัย 22
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 30
ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป 34
บรรณานุกรม 35

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 : แสดงรายละเอียดไพรเมอร์	14
ตารางที่ 2 :แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	16

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	แสดงลักษณะของเชื้อ *Leptospira* spp. โดยใช้กล้อง transmission electron microscopy (TEM)	4
2	ลักษณะของแฟลกเจลลาแบบ peritrichous flagellar ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้กล้อง transmission electron microscopy (TEM) กำลังขยาย 13,250 เท่า	6
3	โครงสร้างหลังของแฟลกเจลลาและองค์ประกอบอื่นๆ	7
4	ขั้นตอนการสร้างแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย	9
5	โครงสร้างของ Flagellar type III secretion system	10
6	กระบวนการขนส่งโปรตีนผ่านทาง Flagella type III secretion system	11
7	การเปรียบเทียบกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal ของ FliC จากแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆ โดยในแถบสีดำคือกรดอะมิโนที่เป็น export signal ของ FliC ซึ่งอยู่ตรงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26-47 ใน *S.* Typhimurium	12
8	ส่วนประกอบพื้นฐานของพลาสมิด pBNFRB ที่ใช้ในการวิจัย	13
9	ขั้นตอนการ digestion โดยใช้เอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI จากนั้นทำการเชื่อยีน*lipL41* เข้ากับพลาสมิด pBNFRB จนได้พลาสมิด pMCRB41	17
10	ส่วนประกอบพื้นฐานของพลาสมิด pMCRB41 ที่ได้จากการเชื่อมชิ้นส่วนยีน *lipL41* เข้ากับพลาสมิด pBNFRB	17
11	ขนาดชิ้นส่วนยีน *lipL41* ที่ทำการเพิ่มจำนวนจาก Genomic DNA ของเชื้อ *Leptospira* spp. ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วดูภายใต้แสง Ultraviolet	22
12	PCR product จากการทำ Colony PCR และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วดูภายใต้แสง Ultraviolet	23
14	แสดงการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *E. coli* เมื่อนำมาทำ Western blot กับ Anti-His	25
15	แสดง การสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *S.* Typhimurium โดยการกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG ในระยะเวลาต่างๆ และตรวจสอบโปรตีนโดยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-His	26
16	แสดง การสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *S.* Typhimurium ให้หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจสอบโปรตีนโดยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-His	27
17	แสดงการตรวจสอบการแตกของเซลล์ในการสร้างโปรตีนของเชื้อ *S.* Typhimurium ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-DnaK	28
18	แสดงการตรวจสอบ soluble protein และ insoluble protein ในการสร้างโปรตีนของเชื้อ *S.* Typhimurium ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-His	29

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การสร้างโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) เกิดจากการนำชิ้นส่วนพันธุกรรมที่สนใจมาตัดต่อดัดแปลงเข้าด้วยกันกับเวคเตอร์ และกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกเป็นโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งโปรตีนลูกผสมนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัย รักษาและงานวิจัยด้านต่างๆ โดยส่วนใหญ่เซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้คือ *Escherichia coli* (1) ซึ่งทราบลำดับพันธุกรรมครบถ้วนสมบูรณ์ สามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย และในปัจจุบันถือว่าเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้ในการแสดงออกและสร้างโปรตีนลูกผสม แต่เนื่องจากการสร้างโปรตีนไว้ภายในเซลล์ (intracellular) ที่ต้องใช้วิธีทำให้เซลล์แตกเพื่อให้ได้โปรตีนลูกผสมออกมานั้น ทำให้ได้ผลผลิตโปรตีนลูกผสมที่ไม่สมบูรณ์ และยังมีโอกาสที่โปรตีนบางชนิดจะรวมตัวกันทำให้เกิดการตกตะกอนภายในเซลล์ หรือที่เรียกว่า inclusion bodies จึงมีการพัฒนาการสร้างโปรตีนลูกผสมแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular) (2)

การสร้างโปรตีนลูกผสมแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์ เป็นการสร้างโปรตีนในแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ให้หลั่งโปรตีนที่สนใจออกมานอกเซลล์สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการสร้างโปรตีนในลักษณะนี้สามารถทำได้ในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium เป็นต้น (3) ซึ่งใน *S.* Typhimurium เป็นแบคทีเรียที่มีระบบการขนส่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ผ่านทาง Type III secretion system (T3SS) เพื่อสร้างเป็นแฟลกเจลลา หรือเพื่อขนส่งโปรตีนก่อโรคเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่ง T3SS เป็นระบบการขนส่งโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ เพื่อใช้ในการสร้างแฟลกเจลลา (4) โดยอาศัยพลังงานจาก proton motive force (PMF) (5) ในการขนส่งโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของแฟลกเจลลา

Flagellin (FliC) เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของฟิลาเมนต์ที่สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์และหลั่งออกนอกเซลล์ผ่านทางระบบ T3SS โดยมีตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 26-47 ทางด้าน N-terminal เป็น export signal ที่สำคัญในการขนส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ (6) ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำ FliC มาสร้างเป็นโปรตีนลูกผสม

LipL41 เป็น lipoprotein ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังชั้นนอก (outer membrane) ของ *Leptospira* spp. ที่มีการแสดงออกมากและเป็นแอนติเจนที่ใช้ในการวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยา (7) แต่เนื่องจากการสร้างโปรตีนลูกผสม LipL41 แบบสร้างไว้ภายในเซลล์ (Intracellular) โดยใช้ *E. coli* นั้นทำให้เกิด inclusion bodies ภายในเซลล์ และส่งผลให้การสกัดเพื่อให้ได้โปรตีน LipL41 ที่บริสุทธิ์นั้นทำได้ยาก (8)

ดังที่กล่าวมา ทางคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคการสร้างโปรตีนลูกผสม LipL41 ให้มีการขนส่งโปรตีนลูกผสมออกสู่นอกเซลล์แทนวิธีการทำให้เซลล์แตก โดยอาศัยพลาสมิด pBNFRB ที่มีส่วนประกอบของ Glutathione S-Transferase (GST) และ FliC ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่ง 14-133 ซึ่งครอบคลุมส่วน export signal (ตำแหน่ง 26-47) โดยทำการตัดต่อชิ้นส่วนของยีน *lipL41* ที่ด้าน หลังของยีนที่สร้าง GST จากนั้นนำเข้าสู่ *S.* Typhimurium และตรวจสอบการหลั่งโปรตีนออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสร้างโปรตีนลูกผสม LipL41 ให้หลั่งออกมานอกเซลล์ผ่านทางระบบ flagellar type III secretion system ของเชื้อ *S.* Typhimurium

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการสร้างพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีน *lipL41* โดยนำมาตัดต่อเข้ากับพลาสมิด pBNFRB เพื่อให้สามารถหลั่งออกมานอกเซลล์ได้โดยอาศัยโปรตีน FliC ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนที่ครอบคลุมส่วนที่เป็น export signal ในการชักนำ GST-LipL41-6xHis ให้หลั่งออกมานอกเซลล์ และทำการทดสอบการหลั่งของโปรตีน FliC- GST-LipL41-6xHis ที่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านทางระบบ fT3SS ของเชื้อ *S.* Typhimurium

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. Leptospirosis

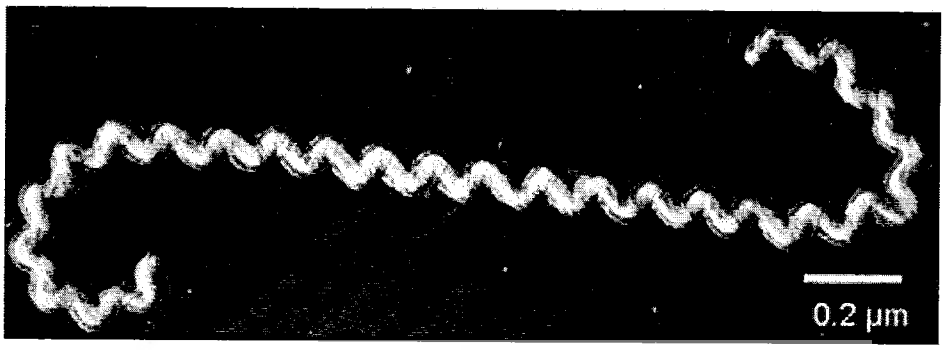
Leptospirosis เป็นโรคติดต่อที่ติดจากสัตว์สู่คนโดยสาเหตุของการเกิดโรคเกิดจากเชื้อ *Leptospira* spp. ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงและสามารถเกิดได้ทั่วโลก โดยการแพร่กระจายของโรคเกี่ยวข้องกับวงจรชีวิตของเชื้อ *Leptospira* spp. โดยมีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นพาหะ (9) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หนูและสัตว์ฟันแทะชนิดอื่นๆ จัดเป็นแหล่งพาหะนาเชื้อที่มีความสำคัญมากที่สุดสาหรับการติดเชื้อในมนุษย์ โดยหากสัตว์มีการติดเชื้อจะไม่มีอาการแสดงแต่จะหลั่งเชื้อโรคออกทางปัสสาวะไปตลอดชีวิต สัตว์อื่นๆ อย่างเช่น สุนัข ที่ได้รับวัคซีนป้องกันเชื้อ *Leptospira* spp. สามารถหลั่งเชื้อโรคออกทางปัสสาวะได้เช่นกัน จึงเป็นผลให้เกิดการติดต่อสู่มนุษย์ได้ ซึ่งการติดต่อสู่มนุษย์สามารถติดต่อได้ทางดินหรือน้าที่ปนเปื้อนเชื้อ เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ หรือโดนหนูกัดโดยตรง ดังนั้น ชาวนา คนงานวางท่อระบายน้า คนงานเหมืองแร่ ชาวประมง และอาชีพที่เกี่ยวกับปศุสัตว์แบบดั้งเดิม จัดเป็นกลุ่มอาชีพที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมากที่สุด โดยอาการของโรคฉี่หนูจะแสดงภายใน 1 วัน หรือ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับเชื้อ

การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการปฏิสัมพันธ์ของมนุษย์กับสภาพแวดล้อมในปัจจุบัน ทาให้เพิ่มเส้นทางการสัมผัสและการติดเชื้อตามมา และในหลายๆประเทศที่พัฒนาที่มีกิจกรรมพักผ่อนนอกบ้านก็มีโอกาสที่จะติดเชื้อได้ ซึ่งการสัมผัสเกิดได้จากกิจกรรมต่างๆ เช่น การลุยน้า ว่ายน้า และการล่องแพ โดยเฉพาะในหมู่ของนักเดินทางที่ท่องเที่ยวผจญภัย และกิจกรรมเกี่ยวข้องกับน้าในประเทศท้องถิ่น (10)

โดยเชื้อจะเข้าไปแพร่กระจายอยู่ภายในไตของหนูจากนั้นจะปล่อยเชื้อระยะติดต่อออกมาในปัสสาวะของหนู โดยจะติดเชื้อได้จากการสัมผัสกับน้าที่ปนเปื้อนเชื้อ เชื้อจะเข้าทางผิวหนัง หรือเยื่อบุทางตา ปาก จมูก แม้ว่าอาการของโรคจะค่อนข้างหลากหลายโดยอาจมีอาการเด่นของอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งที่ถูกทาลายไม่ว่าจะเป็นไต ตับ โดยอาการของโรคในคนอาจแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดและปริมาณของเชื้อ อาการที่พบบ่อยได้แก่ ไข้เฉียบพลัน ปวดศีรษะรุนแรง หนาวสั่น ปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง ตาแดง อาจมีไข้ติดต่อกันหลายวัน และมีเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โดยโรคนี้มักพบมากโดยเฉพาะในช่วงฤดูร้อนและฤดูใบไม้ร่วง ซึ่งในภูมิอากาศเขตร้อนจะพบโรคได้บ่อยในช่วงฤดูฝน การระบาดมักเกิดหลังจากการเกิดน้าท่วม เชื้อ *Leptospira* spp. มีความสำคัญและก่อโรคในสัตว์จาพวกสัตว์ฟันแทะ สัตว์เลี้ยง และปศุสัตว์ รวมถึงส่งผลกระทบต่อชีวิตมนุษย์โดยมีความรุนแรงของโรคจากระดับน้อยจนถึงเสียชีวิต (9)

1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Leptospira* spp.

Leptospira spp. เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเฉพาะเป็นลักษณะเกลียวยาว จัดอยู่ในวงศ์ Leptospiraceae โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1 µm และความยาวประมาณ 6-20 µm ดังที่แสดงในภาพที่ 1 รวมถึงเป็นทั้ง saprophytic ซึ่งสามารถหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์และก่อให้เกิดโรคฉี่หนู (Leptospirosis) ได้ (11)



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Leptospira* spp. โดยใช้กล้อง transmission electron microscopy (TEM) (11)

Leptospira จะเจริญเติบโตได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน (aerobic spirochetes) โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ ซึ่งล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกที่มี porin ที่ช่วยในการแลกเปลี่ยนตัวละลาย ระหว่าง periplasmic space กับสิ่งแวดล้อม (10) และมีส่วนประกอบของ Lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นแอนติเจนหลักของเชื้อ Leptospira โดยมีโครงสร้างและการตอบสนองทาง ภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีในส่วนของโปรตีนที่เป็น lipoprotein ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื้อ หุ้มเซลล์ชั้นนอก เช่น LipL32 LipL21 LipL41 และ OmpL1 (11) Leptospira ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้ และในธรรมชาติจะสืบพันธุ์ได้ในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น สัตว์เท่านั้น ซึ่งเชื้อนี้ชอบความอุ่น และสภาพแวดล้อมที่เป็นกลาง หรือเป็นด่างเล็กน้อย สามารถ อยู่ในน้ำจืดหรือดินที่ชื้นได้เป็นเวลาหลายเดือน

1.2 LipL41

LipL41 เป็น lipoprotein ที่เป็นส่วนประกอบหลักของผนังชั้นนอกของเชื้อ *Leptospira interrogans* (12) โดย LipL41 เป็นส่วนที่มีการอนุรักษ์สูงในเชื้อ *Leptospira* spp. ที่ทำให้เกิดโรค และเป็นแอนติเจนที่ใช้ในการตรวจทางซีรั่มวิทยา โดยหน้าที่ของ LipL41 (13) ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ LipL41 ไม่ได้เป็นส่วนที่ทำให้เกิดการอักเสบ และเป็นส่วนที่ไม่ทำให้เกิดโรค leptospirosis แบบเฉียบพลัน (14)

ยีน *lipl41* มีลำดับเบสประมาณ 1,068 คู่เบส สร้างโปรตีนที่มีขนาด 355 กรดอะมิโน และมีน้ำหนักประมาณ 36.8 kDa มีส่วนควบคุมการสร้างโปรตีนของยีน คือ ตำแหน่ง –35 (TTGACA) และ –10 (TTAAAT) เป็นส่วนของโปรโมเตอร์ (promoter) และส่วน ribosome binding site (AGGA) ส่วนตำแหน่งที่ทำหน้าที่ควบคุมการหยุดกระบวนการสร้างโปรตีน คือ ส่วนstop codon (TAA) และส่วน invert repeat ทำหน้าที่เป็น rho-independent transcription terminator โดยโปรตีน LipL41 ประกอบด้วย signal peptide ที่เป็นชนิด Leu-Arg-Lys-Cys ซึ่งเป็นโปรตีน transmembrane cytoplasmic membrane (15)

ในปี 2011 งานวิจัยของ Piyanart Chalayon และคณะ (16) ได้ทำการศึกษาการวินิฉัยโรค Leptospirosis ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ outer membrane protein LipL21, LipL32, LipL41 และ Loa22

จากเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni แล้วดูว่าโปรตีนใดที่มีความสำคัญในการวินิจฉัยมากที่สุด โดยการผลิต outer membrane protein ต่างๆ โดยตัดต่อยีนที่ใช้สร้างโปรตีนเข้าสู่พลาสมิด pRSET จากนั้นนำเข้าสู่ *E. coli* แล้วกระตุ้นด้วย IPTG 1 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกเพื่อแยกเอาโปรตีนออกมา พบว่าโปรตีน LipL32 และ Loa22 มีความ soluble อยู่ในไซโตพาสซึม แต่โปรตีน LipL21 และ LipL41 มีการรวมตัวกันเป็น inclusion bodies จึงทำการละลาย inclusion bodies ด้วย 8 M urea buffer จากนั้นจึงไปทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ต่อไป ต่อมาในปี 2013 งานวิจัยของ Ming-Hsing Lin และคณะ (17) ได้ทำการผลิตโปรตีน LipL41 เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถของโปรตีน LipL41 โดยการตัดต่อยีน *lipL41* เข้าสู่พลาสมิด pRSET จากนั้นนำเข้าสู่ *E. coli* แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และกระตุ้นด้วย IPTG 1 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกเพื่อแยกเอาโปรตีนออกมา แต่พบว่าเกิด inclusion bodies ขนาดใหญ่อยู่ในส่วนที่เป็น soluble ของ *E. coli* จึงได้ทำการแก้ไขโดยการใส่ chaperone และ Lep เข้าไป และนำ plasmid เข้าสู่ *E. coli* เหมือนเดิมแต่ลดอุณหภูมิการบ่มลงให้เหลือ 20 °C ลดความเข้มข้นของ IPTG ลงเหลือ 0.5 mM และเพิ่มระยะเวลาในการกระตุ้นเป็น 16 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณโปรตีน LipL41 ที่เป็น soluble เพิ่มมากขึ้นจากเดิมในแบบที่สร้างไว้ภายในเซลล์ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้มีแนวคิดที่จะนำการสร้างโปรตีนลูกผสม LipL41 แบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์โดยอาศัยระบบการขนส่งโปรตีนผ่านทาง type III secretion system

1.3 Vaccine

วัคซีนป้องกันโรค Leptospirosis ที่มีอยู่ในปัจจุบัน เตรียมจากทั้งเซลล์ของแบคทีเรีย โดยนำมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ *Leptospira* spp. หลายๆสายพันธุ์ รวมถึง *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa* และ *L. Pomona* แต่ในปัจจุบันพบว่าวัคซีนที่เตรียมจากทั้งเซลล์ของแบคทีเรียนี้ ล้มเหลวในการกระตุ้นภูมิคุ้นกันในระยะยาวที่จะต่อต้านโรค Leptospirosis และยังไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ Leptospira ที่มีมากกว่า 250 สายพันธุ์ วัคซีนนี้คือ ป้องกันได้เพียงระยะต่ำๆหรือสร้างภูมิคุ้มกันในระยะสั้นๆ และไม่ปลอดสารพิษ ไม่มีศักยภาพพอในการส่งเสริมภูมิคุ้มกัน (18)

2. การสร้างโปรตีนลูกผสม

การสร้างโปรตีนลูกผสม เป็นการนำยีนที่สนใจมาตัดต่อดัดแปลงเข้ากับเวคเตอร์ แล้วถ่ายฝากเข้าไปในแบคทีเรียเจ้าบ้าน ซึ่งสายพันธุ์ที่นิยมใช้คือเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทราบลำดับพันธุกรรมครบถ้วนสมบูรณ์ สามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย และนิยมใช้ในการแสดงออกและสร้างโปรตีนลูกผสม เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจและกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน โดยมีการสร้างโปรตีนไว้ภายในเซลล์ (Intracellular) จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีต่างๆ เช่นการใช้คลื่นเสียง (sonication) หรือการใช้สารละลายด่างในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (alkaline lysis) เพื่อให้ได้โปรตีนที่สนใจออกมา ก่อนจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งการทำให้เซลล์แตกนั้น ส่งผลให้การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์นั้นทำได้ยากและซับซ้อน เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากโปรตีน เอนไซม์และสารต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์เจ้าบ้านเอง และมีโอกาสที่โปรตีนบางชนิดจะรวมตัวกันเกิดการตกตะกอนภายในเซลล์ (inclusion bodies) และนอกจากนี้โปรตีนลูกผสมที่สร้างขึ้นอาจถูกทำลายโดยเอนไซม์ protease ทำให้ได้ผลผลิตไม่สมบูรณ์ (19)

สำหรับการสร้างโปรตีนแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular) มีระบบการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ 6 ระบบ ซึ่งมีความแตกต่างกันในส่วนองค์ประกอบของระบบ โดยระบบการหลั่งโปรตีน type V จะประกอบไปด้วย 1 หรือ 2 องค์ประกอบเท่านั้น ในขณะที่ระบบอื่น (type II, III, IV) ประกอบไปด้วยโปรตีน

หลายชนิด และได้เคยมีการนำระบบการหลั่งโปรตีนแบบต่างๆ มาใช้ในการสร้างโปรตีนลูกผสมที่ต้องการจะศึกษาอย่างแพร่หลาย (20) ซึ่งงานวิจัยนี้จะเน้นไปในส่วนของระบบการหลั่งโปรตีน type III (T3SS) โดยอาศัยกลไกการหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์เพื่อใช้ในการสร้างแฟลกเจลลา นำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างโปรตีนลูกผสมแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์ โดยนำส่วนของ signal sequence (export signal) ซึ่งอยู่ในสายของแฟลกเจลลิน (FliC) มาตัดต่อเข้ากับโปรตีนที่สนใจ จากนั้นกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์โดยไม่มีการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน การสร้างโปรตีนลูกผสมแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์จึงมีประโยชน์มากมายเมื่อเปรียบเทียบกับแบบที่สร้างไว้ภายในเซลล์ และจากที่กล่าวมานี้ การสร้างโปรตีนแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์จึงสามารถหลีกเลี่ยงไม่ให้มีการปนเปื้อนและถูกทำลายจากโปรตีนภายในเซลล์ lipopolysaccharide กรดนิวคลิอิก หรือเอนไซม์ชนิดต่างๆได้ ทำให้โปรตีนที่ได้ออกมานั้นมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น สามารถตรวจพบได้ง่าย และทำให้ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ จึงเป็นเหตุผลที่นำการสร้างโปรตีนแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์ซึ่งมีข้อดีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบบที่สร้างไว้ภายในเซลล์มาใช้แทน (21)

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium

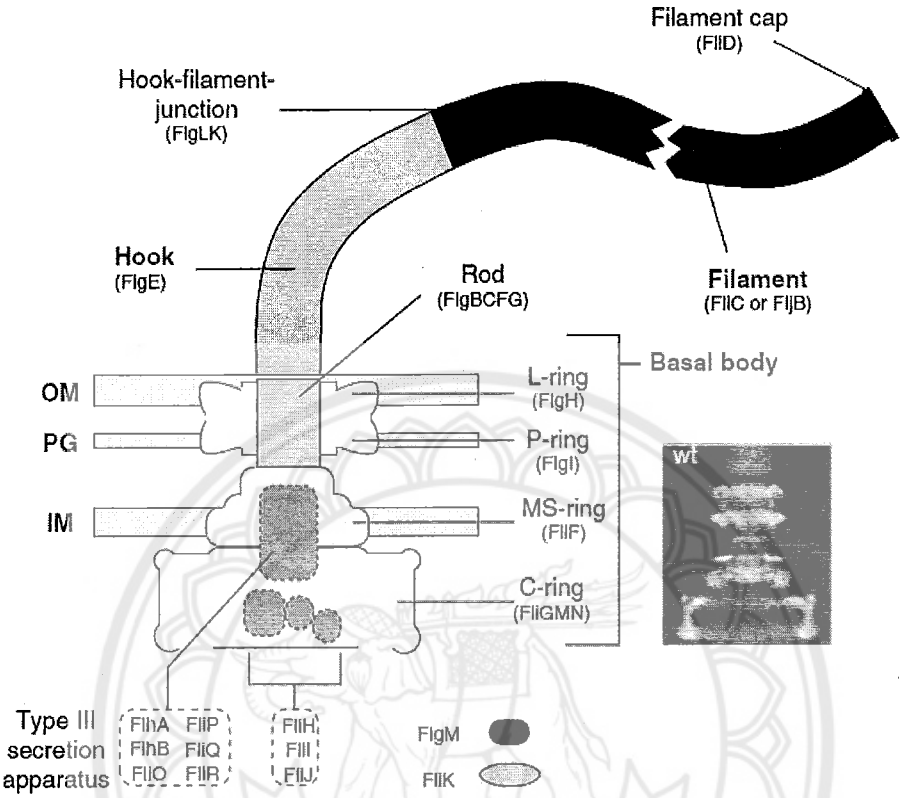
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium) จัดเป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae มีรูปร่างลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod shape) ติดสีแกรมลบ มีขนาดประมาณ 0.7-1.5 μm x 2-5 μm สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultative anaerobe) อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 37 องศาเซลเซียส pH 4-8 สามารถเคลื่อนไหวได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัวเรียกว่า peritrichous flagellar (22) ดังแสดงในภาพที่ 2 *S.* Typhimurium มีความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ลำไส้ของร่างกาย เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (Salmonellosis) ทำให้เกิดอาการทางระบบอาหารทั้งในคนและสัตว์ (23)

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของแฟลกเจลลาแบบ peritrichous flagellar ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้กล้อง transmission electron microscopy (TEM) กำลังขยาย 13,250 เท่า (24)

2.2 ลักษณะทั่วไปของแฟลกเจลลา

แฟลกเจลลา (flagellar) เป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย มีลักษณะเป็นท่อยื่นออกภายนอกเซลล์ประกอบกันด้วยโปรตีนที่แตกต่างกันประมาณ 25 ชนิด (25) โดยโปรตีนที่ใช้ในการสร้าง

แฟลกเจลลาของเชื้อ *S.* Typhimurium โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบจะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์และส่งออกมาภายนอกเซลล์ผ่านทาง T3SS ซึ่งการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียจะเกิดจากการหมุนของแฟลกเจลลาโดยได้รับแรงหมุนจากมอเตอร์ที่ผนังเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้ (26) แฟลกเจลลาประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 3 ส่วนคือ basal body, hook และ filament (27) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างหลังของแฟลกเจลลาและองค์ประกอบอื่นๆ (28)

2.3 โครงสร้างหลักของแฟลกเจลลา

1) Basal body มีโครงสร้างเป็นลักษณะทรงกระบอกประกอบด้วย MS ring, rod, L ring, P ring และ C ring โดย C ring จะเป็นส่วนมอเตอร์ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมติดกับ MS ring โดยมี Mot complexes อยู่ล้อมรอบ MS ring และ C ring และส่วนของ basal body ยังมีส่วนที่สำคัญคือ type III flagellar protein export apparatus หรือ T3SS apparatus ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการส่งออกโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของแฟลกเจลลา (26)

2) Hook มีลักษณะเป็นเส้นโค้งประกอบด้วยโปรตีน FlgE ประมาณ 120 หน่วย มีความยาวประมาณ 55 นาโนเมตร (28) ทำหน้าที่เหมือนเป็นข้อต่อเชื่อมระหว่างแกนหมุนกับ filament โดย hook มีความยืดหยุ่นสูงกว่า filament จะส่งแรงหมุนจากมอเตอร์ตรงผนังเซลล์ไปยัง filament ทำให้เกิดการหมุนของ filament ทำให้แบคทีเรียมีการเคลื่อนที่ (30)

3) Filament เป็นโครงสร้างที่สำคัญในแฟลกเจลลามีลักษณะเป็นท่อเกลียว ทำหน้าที่ในการหมุนและจำเป็นในการเปลี่ยนทิศทางในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย ซึ่งส่วนนี้มีความยาวกว่าขนาดของแบคทีเรีย โดยมีความยาวประมาณ 15 µm ประกอบด้วยโปรตีนแฟลกเจลลิน (FliC) ประมาณ 30,000

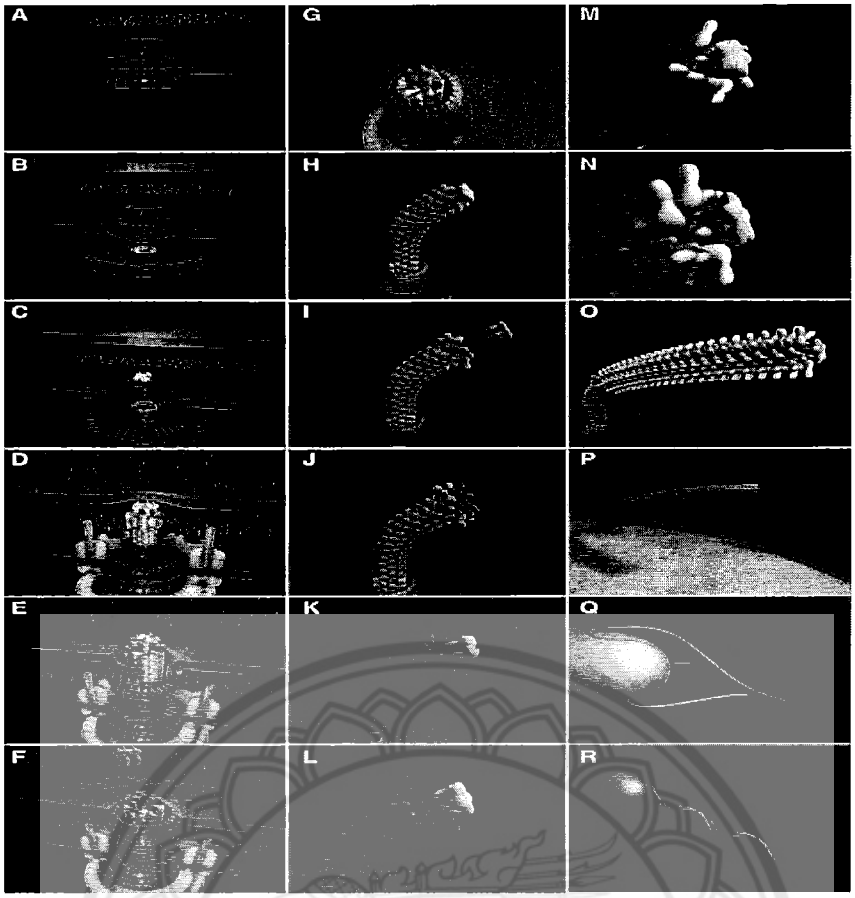
โมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นพอลิเมอร์ ซึ่งโมเลกุลแฟลกเจลลินจะถูกส่งผ่านมาภายในช่องแคบที่อยู่ในตำแหน่งใจกลางของแฟลกเจลลา โดยส่งออกมาในทิศทางจากภายในเซลล์ไปสู่ทางด้านส่วนปลายของสายแฟลกเจลลา (31)

2.4 การสร้างแฟลกเจลลา

การสร้างแฟลกเจลลามีขั้นตอนการสร้าง ดังแสดงในภาพที่ 4 เริ่มจากการสร้าง MS ring ในผนังชั้นในขึ้นมาก่อนจากนั้นจะตามด้วยการรวมตัวของ C ring protein ได้แก่ FliG, FliM และ FliN โดยจะรวมตัวกันเป็น C ring อยู่ในไซโตพลาสซึม ซึ่งติดกับส่วนของ MS ring เมื่อมีการสร้าง C ring เสร็จแล้ว mot protein MotA และ MotB จะเข้ามารวมตัวกันในผนังชั้นใน โดย MotA และ MotB ประกอบกันเป็น stator complex ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เป็นเส้นทางการไหลผ่านของโปรตอน (28) และ MotB ในส่วนของ C-terminal จะเป็นตำแหน่งที่ติดกับชั้นของ peptidoglycan (32)

หลังจากมีการสร้าง C ring จะมีการรวมตัวกันของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ flagellar type III secretion system (fT3SS) ได้แก่ FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliJ, FliO, FliQ และ FliR ซึ่งจะรวมตัวกันอยู่ที่ basal body ภายในช่องตรงกลางของ MS ring (33) จากนั้น fT3SS จะอาศัยพลังงานจาก proton motive force (PMF) เพื่อใช้ในการขนส่งโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบต่างๆของ แฟลกเจลลา (34) จากนั้นจะมีการขนส่งส่วนประกอบของ rod ได้แก่ FliE, FlgB, FlgC, FlgF และ FlgG ผ่านทาง type III secretion apparatus และรวมตัวกันเป็น rod (35) เมื่อสร้าง rod เสร็จจะมีการสร้าง P-ring และ L-ring ภายในผนังชั้นนอกโดยอาศัยโครงสร้างของ rod

หลังจากที่มีการสร้าง rod และ ring ต่างๆเสร็จแล้ว ต่อมาจะมีการสร้าง hook (FlgE) ซึ่งมีความยาวประมาณ 55 นาโนเมตร โดยความยาวของ hook จะถูกควบคุมโดย FliK (36) จากนั้นจะมีการสร้าง hook-associated protein ได้แก่ FlgK, FlgL และ FliD (37) และในขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างแฟลกเจลลาจะมีการกระตุ้นการหลั่ง anti- σ^{28} factor ซึ่งจะมีผลให้เกิดการแสดงออกของ flagellar gene จากนั้นแฟลกเจลลินจะถูกส่งผ่านทาง fT3SS ไปในส่วนปลายของสายแฟลกเจลลา โดยมี cap (FliD) ซึ่งเป็นโครงสร้างรูปร่างห้าเหลี่ยม ประกอบด้วยฐาน 1 ฐานและขา 5 ขา จะช่วยในการจัดเรียง FliC เพื่อสร้างเป็น filament โดยใน 1 filament จะประกอบไปด้วย flagellin ประมาณ 20,000 – 30,000 subunit (25,26)



ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการสร้างแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย (38)

S. Typhimurium มีระบบการขนส่งโปรตีนแบบที่ 3 ที่เรียกว่า Type III secretion system โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1. Flagellar type III secretion system (fT3SS)

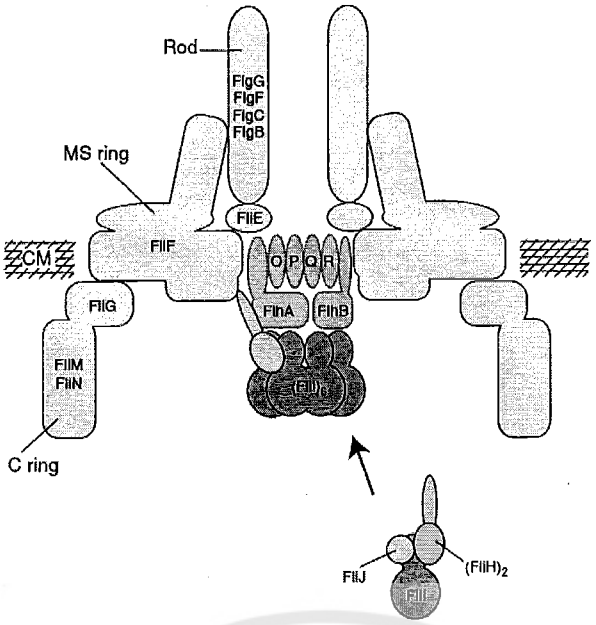
เป็นระบบการขนส่งโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของแฟลกเจลลาออกสู่นอกเซลล์ โดยขนส่งผ่านทางช่องของส่วน basal body เพื่อไปสร้างเป็นแฟลกเจลลานอกเซลล์

2. Type III secretion needle complex

เป็นระบบที่ใช้ในการขนส่งโปรตีนก่อโรคบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ผ่านทาง needle complex โดยมีรูปร่างคล้ายกับส่วนของ basal body ของแฟลกเจลลา (39)

3. Flagellar type III secretion system (fT3SS)

fT3SS เป็นกลไกที่จำเป็นต่อการขนส่งโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ rod, hook และ filament เพื่อใช้สร้างเป็นแฟลกเจลลา (4) โดยผ่านทาง fT3SS ซึ่งอยู่ภายใน MS ring ของ basal body โดยความกว้างของช่องที่ผ่านมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.0 นาโนเมตร (40) fT3SS apparatus ประกอบไปด้วย ชนิดที่จัดเป็น membrane protein 6 ชนิด ได้แก่ FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ และ FliR และชนิดที่จัดเป็น soluble protein 3 ชนิด ได้แก่ FliH, FliI, FliJ (41) ดังที่แสดงในภาพที่ 5

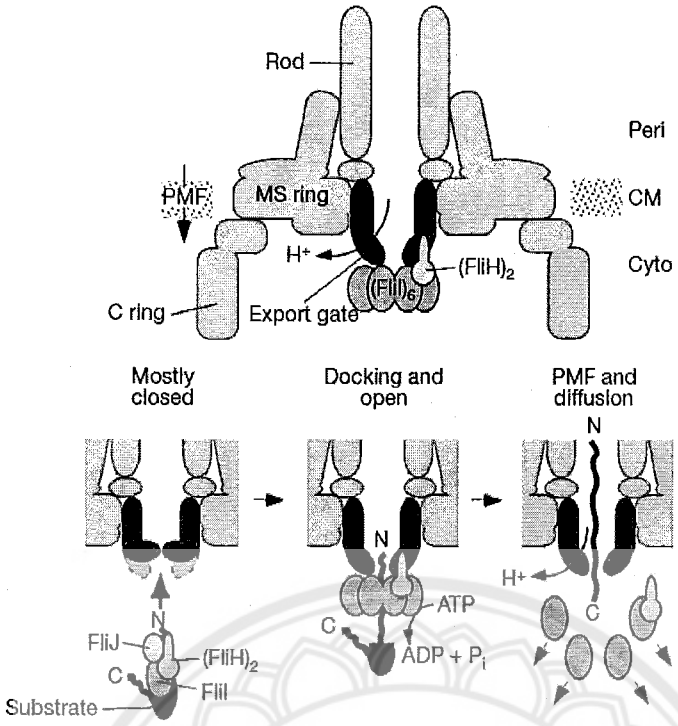


ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างของ Flagellar type III secretion system (4)

Soluble protein (FliH, FliI, FliJ) จะเป็นส่วนที่ช่วยในการขนส่งโปนตีนและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนเพื่อส่งออกนอกเซลล์ผ่านทาง export apparatus (31) โดย FliI จะรวมตัวกัน 6 subunit กลายเป็นโครงสร้างวงแหวน (42) ทำหน้าที่เป็น ATPase เพื่อใช้ในการสลาย ATP (43)

Membrane protein FliO, FliP, FliQ และ FliR เป็นโครงสร้างโปรตีนขนาดเล็กที่รวมตัวกันอยู่ตรงกลางของ fT3SS apparatus และส่วนของ FihA, FihB จะเป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ โดยมีส่วนที่ยื่นออกไปอยู่ในไซโตพลาสซึม ส่วนนี้จะทำปฏิกิริยากับ FliH, FliI, FliJ (34) นอกจากนั้น FihB ยังทำหน้าที่ในการเปิดปิดช่องที่ใช้ในการส่งออกโปรตีนต่างๆผ่านทาง fT3SS apparatus อีกด้วย (44)

ในส่วนของกระบวนการขนส่งโปรตีนผ่านทาง fT3SS ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาพบว่า FliH-FliI complex จะมีบทบาทในการจับกับโปรตีนที่จะส่งออก จากนั้นนำโปรตีนมายังส่วนของ export apparatus และจะมีการสลาย ATP เพื่อให้ได้พลังงานมากระตุ้น ทำให้เกิดการแยกของ FliH-FliI complex จากนั้นจะอาศัยพลังงานจาก proton motive force (PMF) ในการส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกไปสู่ไซโตพลาสซึมผ่านทาง fT3SS (45) ดังที่แสดงในภาพ ที่ 6

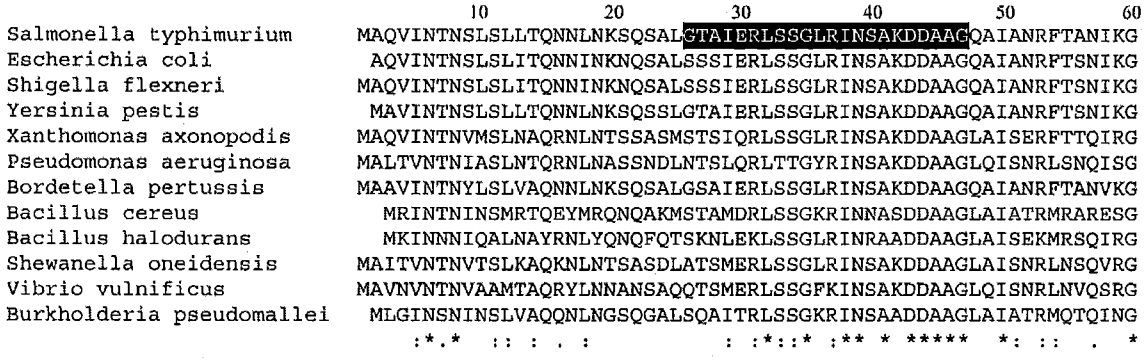


ภาพที่ 6 แสดงกระบวนการขนส่งโปรตีนผ่านทาง Flagellar type III secretion system (45)

3.1 Flagellin (FliC)

แฟลกเจลลิน หรือ FliC เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของฟิลาเมนท์ ประกอบไปด้วย 4 domain ได้แก่ D0, D1, D2 และ D3 (46) โดยที่ D0 เป็น domain ที่อยู่ภายในสุด ติดกับส่วนที่เป็นช่องว่างของฟิลาเมนท์ ส่วน D3 เป็น domain ที่อยู่นอกสุดที่ผิวของฟิลาเมนท์ ในส่วนของ D0 และ D1 จะประกอบกันอยู่ในรูปของ α- helical ตรงแกนกลางของฟิลาเมนท์ ในส่วนของ D2 และ D3 จะประกอบกันอยู่ในรูปของ β-sheet ตรงผิวด้านนอกของฟิลาเมนท์ (47)

FliC ในเชื้อ *S.* Typhimurium เป็นโปรตีนที่มีขนาด 51 kDa สร้างจากยีน *fliC* ประกอบด้วย 495 กรดอะมิโน โดยส่วนของทางด้าน N-terminal มี 207 กรดอะมิโน และ C-terminal มี 50 กรดอะมิโน (48) โดยจะถูกขนส่งออกสู่นอกเซลล์ผ่านทาง T3SS โดยมีส่วนของ export signal เป็นส่วนสำคัญในการขนส่ง FliC ออกสู่นอกเซลล์ ใน *S.* Typhimurium ซึ่งพบว่าส่วนของ export signal ดังกล่าวอยู่ตรงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26-47 ทางด้าน N-terminal ของ FliC ดังแสดงในภาพที่ 7 ซึ่งเป็นส่วนที่มีบทบาทสำคัญในการขนส่งโปรตีน (49)



ภาพที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal ของ FliC จากแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆ โดยในแถบสีดำคือกรดอะมิโนที่เป็น export signal ของ FliC ซึ่งอยู่ตรงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26-47 ใน *S.* Typhimurium (49)

ในปี 2010 Dobo J และคณะ (50) ได้ทำการนำส่วนของ N-terminal ของโปรตีน FliC ในขนาดที่ไม่เท่ากัน จากนั้นนำมาตัดต่อกับโปรตีนชนิดต่างๆ เพื่อที่จะศึกษาว่าในส่วนของ N-terminal ของโปรตีน FliC จะสามารถชักนำให้มีการส่งออกโปรตีนชนิดอื่นได้หรือไม่ และค้นหาตำแหน่งของ N-terminal ของโปรตีน FliC ที่เหมาะสมต่อการส่งออกโปรตีนออกเซลล์ โดยนำยีนการสร้างโปรตีนต่างๆตัดต่อเข้ากับพลาสมิด pGFP แล้วนำเข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium จากนั้นกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม 0.4 mM IPTG และพบว่าสามารถส่งออกโปรตีนออกมาสู่นอกเซลล์ได้ในบางโปรตีน โดยในส่วนของ N-terminal ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 26-47 มีการขนส่งโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ในปริมาณมาก ต่อมาในปี 2012 งานวิจัยของณัฐพล ทิสยากร, ดารารัตน์ วันขวา และ นุสรา ศรีแสงอ่อน (51) ได้พัฒนาวิธีการสร้างโปรตีนลูกผสมให้หลั่งออกนอกเซลล์ผ่านทาง fT3SS ในเชื้อ *S.* Typhimurium โดยการนำส่วนของยีน *fliC* ที่มีส่วนของ Export signal มาตัดต่อเข้ากับพลาสมิด pGEX-2T แล้วนำเข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium จากนั้นกระตุ้นด้วย IPTG 1 mM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วตรวจดูโปรตีนที่สร้างขึ้นด้วยวิธี Western blot ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีโปรตีน FliC-GST อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ดังเช่นที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำมาพัฒนาวิธีการสร้างโปรตีนลูกผสม LipL41 ให้หลั่งออกมานอกเซลล์ได้ เนื่องมาจากในส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนของ Export signal ของโปรตีน FliC ซึ่งจะถูกจดจำโดยส่วนของ T3S apparatus ทำให้มีการชักนำและส่งโปรตีนออกไปนอกเซลล์ เพื่อใช้ในการสร้างแฟลกเจลลาโดยไม่ต้องทำให้เซลล์แตก จึงได้นำส่วนของ *lipL41* มาเชื่อมต่อเข้ากับด้านหลังของ GST ที่เชื่อมด้านหน้าด้วย *fliC* ในพลาสมิด pBNFRB เพื่อสังเกตการณ์ชักนำของ FliC ว่าจะสามารถชักนำโปรตีน LipL41 ออกมานอกเซลล์ โดยผ่านทางแฟลกเจลลาของเชื้อ *S.* Typhimurium ซึ่งหากสามารถทำได้ จะนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างโปรตีนลูกผสม LipL41 โดยให้หลั่งออกมานอกเซลล์ และนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์ที่มี Glutathione และตัดด้วย Thrombin เพื่อให้ได้โปรตีน LipL41 บริสุทธิ์ออกมาใช้ประโยชน์ทางด้านซีรั่มวิทยา หรือนำวิธีการสร้างโปรตีนให้หลั่งออกภายนอกเซลล์นี้ ไปประยุกต์ใช้ในการสร้างโปรตีนชนิดอื่น

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

1. รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยและพัฒนา

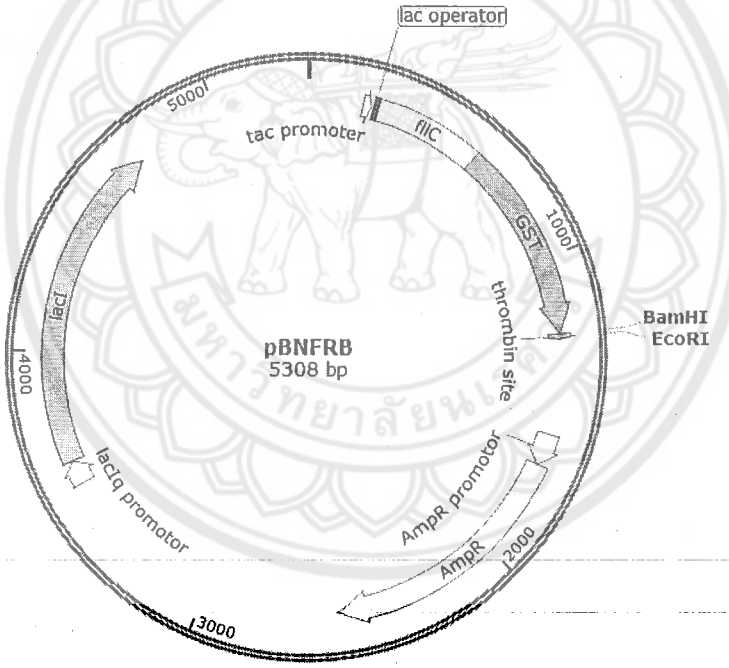
2. สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

1. เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21
2. เชื้อ *Salmonella* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344

3. พลาสมิดและ Primers

พลาสมิด

pBNFRB เป็นพลาสมิดที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ณัฐพล ทิสยากร, ดารารัตน์ วันขวา และ นุสรา ศรีแสงอ่อน เป็นพลาสมิดชนิด expression vector ประกอบด้วยยีน *fliC* และยีนสร้างโปรตีน GST โดยสามารถแสดงออกภายใต้การควบคุมของ *tac* promoter โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของ IPTG มียีนดื้อยา ampicillin (51) โดยมีรายละเอียดของพลาสมิดดังที่แสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงส่วนประกอบพื้นฐานของพลาสมิด pBNFRB ที่ใช้ในการวิจัย

Primers

- Cloning primers

Primers	Oligonucleotide sequence
LipL41 Bam F	CGTGGATCCAGAAAATTATCTTCCTAATTTCTG
LipL41 HIS Eco R	ATGAATTCTTAATGATGATGATGATGATGCTTGCGTTGCTTTCGTCA ACGGCGAAAG

- Colony checking primers

Primers	Oligonucleotide sequence
GST F	GCCACGTTTGGTGGTGGCGACC
His Eco R	TGAATTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG

4. เครื่องมือในการวิจัย

4.1 ครุภัณฑ์

1. เครื่อง orbital incubator Shaker รุ่น GYROMAX^{TM}737 บริษัท Amerex Instrumentsประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่อง Centrifuge บริษัท Heraeus ประเทศเยอรมัน
3. เครื่อง PCR รุ่น Major cycler บริษัท Major Science ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่อง Electrophoresis (Power supply) รุ่น EC250-90 บริษัท E-C Apparatus ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. เครื่อง Electrophoresis (Power supply) รุ่น POWER PAC 300 บริษัท BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่อง Electroporation system รุ่น ECM 399 บริษัท BTX HARVARD APPARATUS ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. ชุดแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าชนิดแนวตั้ง รุ่น Mini-PROTEAN® 3 cell บริษัท BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. ชุด Electroblotter รุ่น V10-EB10 บริษัท SCIE-PLAS ประเทศสหราชอาณาจักร
9. เครื่อง Mini Horizontal Gel Electrophoresis System บริษัท Major Science ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่อง ChemiDoc™ XRS+ System บริษัท BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. เครื่อง Gel documentation รุ่น Platinum D55 บริษัท UVITEC Cambridge ประเทศสหราชอาณาจักร
12. เครื่อง Vortex Mixer รุ่น Vortex genie-2 ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. เครื่อง High-speed Mini-centrifuge รุ่น Microspin 12 บริษัท Biosan ประเทศลัตเวีย
14. เครื่อง Thermo-Block บริษัท Biosan ประเทศลัตเวีย
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางความเร็วสูงแบบตั้งโต๊ะ รุ่น 2070 ยี่ห้อ Hettich บริษัท เบคไทย กรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์จำกัด

4.2 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องแก้วพื้นฐาน
2. Sterile tips
3. Auto pipette
4. Hockey stick
5. Loop
6. จานเพาะเชื้อ
7. Test tube, Collection tube, Falcon tube และ Eppendorf tube

4.3 สารเคมี

1. Polyacrylamide
2. 1X Tris-glycine buffer
3. T4 DNA ligase และ buffer บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. ประเทศ สหรัฐอเมริกา
4. Skim milk บริษัท Hardydiagnostics ประเทศ สหรัฐอเมริกา
5. *Bam*H I restriction enzyme บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. ประเทศ สหรัฐอเมริกา
6. *Eco*R I restriction enzyme บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. ประเทศ สหรัฐอเมริกา
7. Ampicillin บริษัท Bio Basic inc. ประเทศแคนาดา
8. Ammonium per sulfate บริษัท Darmstadt ประเทศเยอรมัน
9. IPTG
10. ชุดสกัดพลาสมิด Mini Plus™ Plasmid DNA Extraction System บริษัท Viogene ประเทศไต้หวัน
11. ชุดสกัด PCR product จากเจล HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit บริษัท RBC Bioscience ประเทศไต้หวัน

5. วิธีการทดลอง

5.1 การเตรียมชิ้นส่วนยีน *lipL41*

5.1.1) การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *lipL41* (52)

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *lipL41* โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ genomic ของเชื้อ *Leptospira* spp. เป็นแม่แบบ ซึ่งส่วนผสมของ Master mix 1x ประกอบไปด้วย 200 µM dNTPs, 0.2 µM Forward Primer, 0.2 µM Reverse Primer, Template DNA, 1.25 U Taq DNA Polymerase และเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 µl ซึ่งเป็นปริมาตรที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาของ PCR โดย primer ที่ใช้นั้น ได้มีการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน *lipL41* จากนั้นนำเข้า PCR thermocycle โดยใช้จำนวน 30 รอบ ดังแสดงในตาราง และนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตารางแสดงอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	
Pre-denaturation	95	5 นาที	
Denaturation	95	30 วินาที	30
Annealing	53	30 วินาที	
Extension	68	90 วินาที	
Final extension	68	5 นาที	

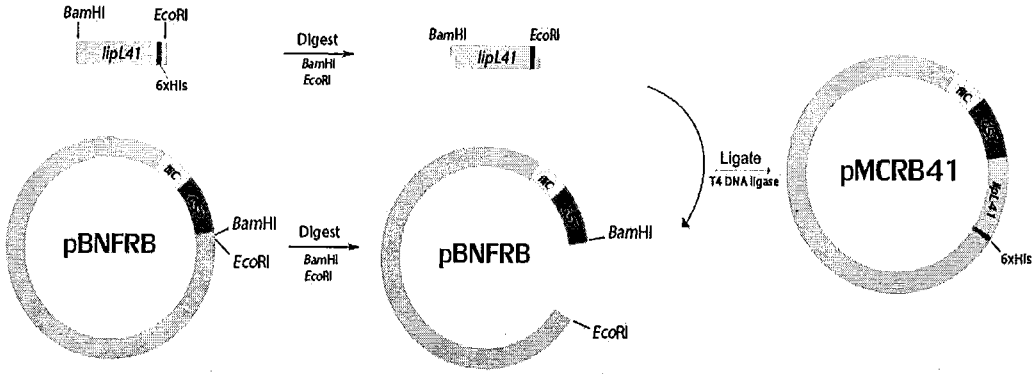
5.1.2) การตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (53)

เตรียมเจลโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.6% ซึ่งมีส่วนผสมของ Ethidium bromide จากนั้นเติม 1x TAE buffer จนท่วมเจล แล้วนำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR มาผสมกับ loading dye และหยดลงในช่องบนเจลที่เตรียมไว้ ประกอบอุปกรณ์เข้ากับสายไฟฟ้า โดยให้ด้านของ PCR product อยู่ขั้วลบ ใช้ความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปตรวจสอบภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transillumitor

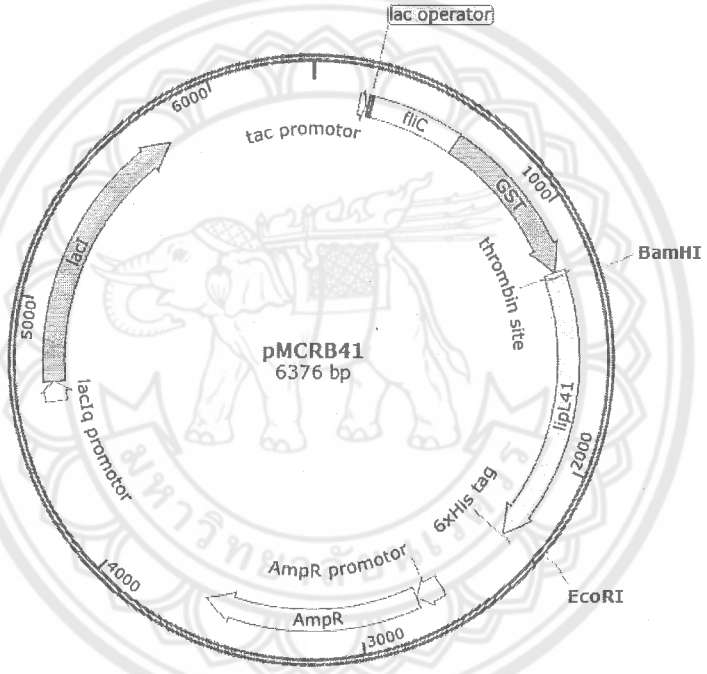
5.2) การเชื่อมชิ้นส่วนยีน *lipL41* เข้ากับพลาสมิด pBNFRB (54)

เตรียมพลาสมิด pBNFRB และชิ้นส่วนยีน *lipL41* โดยนำมาตัดด้วย restriction enzyme *Eco*RI และ *Bam*HI บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดการทำงานของเอนไซม์โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเชื่อมชิ้นส่วนยีน *lipL41* เข้ากับพลาสมิด pBNFRB โดยนำส่วนของยีน *lipL41* ต่อเข้าทางด้านหลังของยีน GST ดังที่แสดงในภาพที่ 9 จากนั้นนำมาทำ ligation โดยมีส่วนผสมของ Ligation reaction ประกอบไปด้วย 1x DNA ligase buffer, พลาสมิด pBNFRB, ชิ้นส่วนยีน *lipL41*, 1 U T4 DNA ligase และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 20 µl ใส่ลงใน microcentrifuge tube และผสมโดยใช้ Auto pipette ดูดขึ้นลง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเรียกพลาสมิดที่ได้

จากการเชื่อมชิ้นส่วนยีน *lipL41* เข้ากับพลาสมิด pBNFRB ว่าพลาสมิด pMCRB41 โดยมีขนาดและรายละเอียด ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 9 แสดงขั้นตอนการ digestion โดยใช้เอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI จากนั้นทำการเชื่อมยีน *lipL41* เข้ากับพลาสมิด pBNFRB จนได้พลาสมิดใหม่ที่มีชื่อว่า pMCRB41



ภาพที่ 10 แสดงส่วนประกอบพื้นฐานของพลาสมิด pMCRB41 ที่ได้จากการเชื่อมชิ้นส่วนยีน *lipL41* เข้ากับพลาสมิด pBNFRB

5.3) การคัดเลือกพลาสมิด

5.3.1) การเตรียม competent cell จาก *E. coli* (55)

เลี้ยง *E. coli* สายพันธ์ BL 21 ปริมาตร 0.5 ml ใน LB broth ปริมาตร 50 ml บ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นเทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดทดลอง นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใส่ด้านบนทิ้ง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 10 ml และนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ จากนั้น

เติม Glycerol ลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 100 µl และเก็บเซลล์ที่ -80 องศาเซลเซียส

5.3.2) การนำ ligation product เข้าสู่ competent cell

ผสม competent cell ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 µl กับ ligation product จำนวน 8 µl ลงใน microcentrifuge tube แล้วนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาใส่ลงใน water bath ทันทีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที นำไปแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำ LB broth ปริมาตร 0.9 ml ใส่ลงใน microcentrifuge tube แล้วนำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูด competent cell ปริมาตร 200 µl ลงใน LB agar ที่มีส่วนผสมของ 100 µg/ml Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

5.3.3) Colony PCR

เลือกโคโลนีของแบคทีเรีย ที่เจริญบน LB agar plate ที่ผสมด้วยยา Amplicilin แล้วเขี่ยโคโลนีใส่ PCR tube และเติม master mix โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับส่วนของ GST และ 6xHis จากนั้นนำไปทำ PCR จำนวน 20 รอบ นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis และสังเกต band ที่เกิดขึ้น ถ้าหากมี band เกิดขึ้น ให้ทำการเขี่ยโคโลนีนั้นมาเลี้ยงใน LB broth ที่ผสมด้วยยา Amplicilin และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นให้มีแสดงออกเป็นโปรตีนด้วย 1 mM IPTG ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปทำ SDS-PAGE ต่อไป

5.4) การตรวจสอบพลาสมิดที่สามารถแสดงออกเป็นโปนตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag

5.4.1) SDS-PAGE (56)

เตรียม Polyacrylamide gel ได้แก่ separating และ stacking gel จากนั้นนำไปประกบที่เครื่อง run electrophoresis ใส่ SDS running buffer แล้วนำเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้นด้วย IPTG มาผสมกับ 2X sample loading buffer นำไปต้มที่ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นที่ 14,000 rpm 10 นาที นำ cell lysate ใส่ลงในแต่ละหลุม ใช้กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ เวลา 10 นาที เพื่อให้โปรตีนเข้าสู่ separating gel จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 180 โวลต์ เวลา 30 นาที และนำไปทำ Western blot ต่อไป

5.4.2) Western blot (57)

เตรียม Tris-glycine-methanol (TGM) buffer ตัดแผ่น nitrocellulose membrane ให้เท่ากับขนาดของเจลแล้วจุ่ม membrane ลงใน TGM buffer เปิด Gel holder cassette จุ่ม fiber pad กับ TGM buffer และวางให้อยู่ตรงกลางของ black slide นำ filter paper 1 แผ่น จุ่มลงใน TGM buffer วางบน fiber pad นำเจลวางบน filter paper แล้ววางmembrane ลงบนเจล นำ filter paper อีก 2 แผ่นวางบน membrane จากนั้นปิด Gel holder cassette วางลงใน tank แล้วเติม TGM buffer ลงใน tank นำ tank ใส่ Styrofoam box ที่ประกบด้วย ice แล้ว run ด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่น membrane ที่มีโปรตีนซึ่งถูกย้ายมาจากเจล มาบ่มด้วย 5% skim milk ซึ่งใช้เป็น blocking buffer ที่อุณหภูมิห้องโดยการเขย่าเบาๆ 15 นาที จากนั้น incubate membrane กับ primary antibody ที่จำเพาะต่อ 6xHis tag บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย TBS-T 5 นาที 3 ครั้ง ทำการเติม secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase

antibody บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย TBS-T 5 นาที 3 ครั้ง นำแผ่น membrane มาสังเกต band โดยการใส่ substrate แล้วดูด้วยเครื่อง ChemiDoc เพื่อดูว่าโคโลนีใดสามารถแสดงออกเป็นโปรตีนที่สนใจได้

5.5) การสกัดพลาสมิดโดยใช้ HiYield™ Plasmid mini Kits (58)

เลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag มาเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติม PD1 buffer ปริมาตร 400 µl ผสมโดยใช้ Auto pipette ดูดขึ้นลง จนตะกอนละลายหมด ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน microcentrifuge tube จากนั้นเติม PD2 buffer ปริมาตร 400 µl ผสมแบบ invert 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เติม PD3 buffer ปริมาตร 600 µl ผสมแบบ invert 10 ครั้ง นำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำ PD column ใส่ลงใน collection tube ดูดส่วนใสจาก microcentrifuge tube ใส่ลงใน column นำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ใน collection tube ออก เติม WN Buffer ปริมาตร 500 µl ลงใน PD column นำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ใน collection tube ออก เติม WS buffer 700 µl นำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ใน collection tube ออก จากนั้นนำไปปั่นอีกครั้งที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำให้แห้ง นำ PD column ใส่ลงใน microcentrifuge tube เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 µl ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ก็จะได้พลาสมิดที่เราต้องการนำเข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium

5.6) การทดสอบการหลั่งโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *S.* Typhimurium (59)

5.6.1) การเตรียม competent cell จากเชื้อ *S.* Typhimurium

นำเชื้อ *S.* Typhimurium จาก stock มา streak บน LB plate แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ต่อมานำ single colony ที่ขึ้นมาเลี้ยงที่ LB broth ใน flask และเลี้ยงไว้ใน shaking incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำไปเก็บไว้ในน้ำแข็ง นำเชื้อที่ได้มาไปปั่นที่ 6,000 rpm เวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสออกแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นที่ 6,000 rpm เวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสออก (ล้าง 2 ครั้ง) จากนั้นเติม 10% glycerol 5 ml นำไปปั่นที่ 10,000 rpm เวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเทส่วนใสออก (ทำ 2 ครั้ง) จากนั้นทำการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

5.6.2) การนำพลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium

สกัดพลาสมิด pMCRB41ที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *E. coli* ด้วย HiYield™ Plasmid mini Kits แล้วนำเข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 หรือ Wild type และ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagella นำพลาสมิด pMCRB41 เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี electroporation โดยผสม electrocompetent cell กับ พลาสมิดแล้วนำไปวางในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปใส่ใน electroporation cuvette ด้วยกระแสไฟฟ้า 2.5 kV เติม LB broth 1 ml แล้วย้ายไปใส่ใน microcentrifuge tube บ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ

นำเซลล์ที่ได้มาคัดเลือกโดยเลี้ยงบน LB plate ที่มีส่วนผสมของยา Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

5.6.3) การหาเวลากระตุ้นการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ใน *S.* Typhimurium

เลือก single colony บน LB agar ที่มี Ampicillin มาเลี้ยงใน LB broth แล้วบ่มไว้ใน shaking incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 0.1 ml เลี้ยงใน Flask ในอาหาร LB broth 20 ml ที่มี Ampicillin ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1 mM IPTG เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยจะแบ่งเวลากระตุ้นการสร้างโปรตีนออกเป็น 1, 2, 3, 4 ชั่วโมง และข้ามคืน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ตามเวลาที่กำหนด โดยการวัดค่า OD ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.3 เพื่อปรับเซลล์ให้เท่ากัน จากนั้นนำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

5.6.4) การตรวจสอบเวลาที่เหมาะสมในการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag

ทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot โดยนำเซลล์ที่เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ผสมกับน้ำกลั่นและ 2X sample loading buffer อย่างละ 100 µl ผสมกันและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 14,000 rpm เวลา 10 นาที จากนั้นนำไปทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ antibody ต่อ His จากนั้นนำไปสังเกต band ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Chemi-Doc แล้วเลือกเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างโปรตีน

5.6.5) การกระตุ้นการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ใน *S.* Typhimurium

เลือก single colony บน LB agar ที่มี Ampicillin มาเลี้ยงใน LB broth แล้วบ่มไว้ใน shaking incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 0.1 ml เลี้ยงใน LB broth 1 ml ที่มี Ampicillin ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1 mM IPTG เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาการกระตุ้นการสร้างโปรตีนจากการทดลองที่ 5.6.4 แล้วทำการเก็บแยกในส่วนของเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยในส่วนของเซลล์ทำการวัดค่า OD ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.3 () เพื่อปรับเซลล์ให้เท่ากัน และทำการเก็บในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นที่ 3000 rpm เวลา 45 นาที จากนั้นนำส่วนของเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot เพื่อดูการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์

5.6.6) การตรวจสอบการหลั่งโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนด้วย 10% TCA เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อและแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำไปปั่นเพื่อเอา TCA และอาหารเลี้ยงเชื้อออกโดยเทส่วนใสทิ้งรอจนตะกอนแห้ง ทำให้เป็นกลางโดยใส่ Tris pH 8.0 จากนั้นนำไปทำตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ Western blot โดยการใช้ antibody ต่อ His เพื่อติดตามโปรตีนที่สร้างขึ้น และใช้ antibody ต่อ DnaK เพื่อดูว่าผลผลิตโปรตีนที่หลั่งออกมานอกเซลล์ไม่ได้เกิดจากการแตกของเซลล์ เนื่องจาก DnaK เป็น chaperone protein ที่อยู่ภายในเซลล์ เพื่อยืนยันว่าโปรตีนที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้เกิดจากการแตกของเซลล์ สังเกต band ที่เกิดขึ้น

5.7) การตรวจสอบ soluble protein และ insoluble protein

5.7.1) การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี ultrasound treatment

เลือก single colony บน LB agar ที่มี Ampicillin มาเลี้ยงใน LB broth แล้วบ่มไว้ในshaking incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 0.1 ml เลี้ยงใน Flask ในอาหาร LB broth 20 ml ที่มี 1 mM Ampicillin ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1 mM IPTG เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag แล้วทำการเก็บเซลล์ โดยทำการปั่นที่ 3000 rpm เวลา 45 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและทำการเติม TBS-T 1 ml จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator ในน้ำแข็ง จากนั้นทำการปั่นแยกส่วนใสกับส่วนตะกอน ทำการล้างตะกอนด้วย TBS-T อีก 2 ครั้งเพื่อกำจัดส่วนของโปรตีนบางส่วนที่อาจจะหลงเหลืออยู่

5.7.2) การตรวจสอบ soluble protein และ insoluble protein

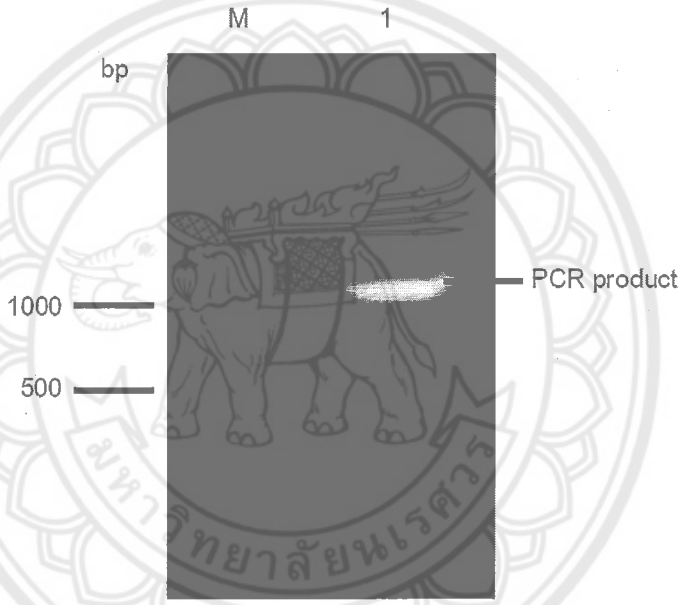
นำส่วนของตะกอนและส่วนใสนำมาตรวจสอบความเป็น soluble protein และ insoluble protein โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Western blot โดยการใช้ antibody ต่อ His เพื่อติดตามโปรตีนที่สร้างขึ้นโดยตะกอนก็คือ insoluble protein หรือ inclusion bodies และส่วนใส คือ soluble protein จากนั้นนำสังเกต band ที่เกิดขึ้นที่เครื่อง Chemi-Doc เพื่อสังเกตว่าโปรตีนที่ สร้างออกมาเป็น inclusion bodies หรือไม่

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การเตรียมชิ้นส่วนยีน *lipL41*

งานวิจัยนี้ได้นำ Genomic ของเชื้อ *Leptospira* spp. ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *lipL41* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกเป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *Leptospira* spp. โดยการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ซึ่ง primer ที่ใช้จะจำเพาะกับส่วนของยีน *lipL41* และมีส่วนของ *Bam*HI restriction site อยู่ที่ส่วนต้น และส่วนของ *Eco*RI restriction site และโปรตีน histidine 6 ตัว อยู่ที่ส่วนท้าย โดยมีลำดับเบสของ primer ดังที่แสดงในบทที่ 3

หลังจากทำการเพิ่มจำนวนยีน *liplL41* โดยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งพบว่าชิ้นส่วนยีน *liplL41* มีขนาดประมาณ 1100 bp ดังที่แสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงขนาดชิ้นส่วนยีน *lipL41* ที่ทำการเพิ่มจำนวนจาก Genomic DNA ของเชื้อ *Leptospira* spp. ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วดูภายใต้แสง Ultraviolet

โดย lane M คือ DNA marker

lane 1 คือ PCR product ที่เกิดขึ้นซึ่งมีขนาดประมาณ 1100 bp

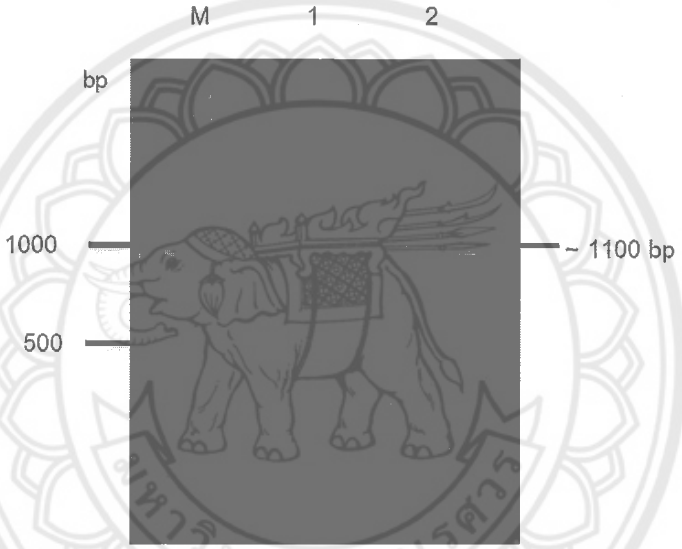
2. การเชื่อมชิ้นส่วนยีน *lipL41* เข้ากับพลาสมิด pBNFRB

หลังจากทำการเพิ่มจำนวนยีน *lipL41* จากนั้นนำยีน *lipL41* เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pBNFRB โดยการตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI และ*Eco*RI โดยส่วนของยีน *lipL41* จะถูกต่อเข้าทางด้านหลังของยีน GST ดังที่แสดงในภาพที่ 9 จากนั้นทำการเชื่อมกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ซึ่งจะทำให้ได้พลาสมิดใหม่ที่มีชื่อว่า pMCRB41 โดยมีขนาดประมาณ 6,376 bp โดยมีรายละเอียด ดังที่แสดงในภาพที่ 10

3. การคัดเลือกพลาสมิด pMCRB41 ใน *E. coli*

เมื่อได้พลาสมิด pMCRB41 ซึ่งสามารถแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6x His tag โดยมีส่วนของโปรตีน FliC ที่ใช้เป็นโปรตีนที่ช่วยในการหลั่งโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ผ่านทาง T3SS ของเชื้อ *S.* Typhimurium โดยทำการคัดเลือกพลาสมิดในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 โดยนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี heat shock แล้วนำไปเลี้ยงบน LB agar ที่มียา Ampicillin นำไปบ่มเป็นเวลาข้ามคืน โดยพบว่ามีโคโลนีขึ้นบนอาหารทั้งหมด 2 โคโลนี จากนั้นนำโคโลนีทั้งหมดมาตรวจสอบหาพลาสมิด pMCRB41 ด้วยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะ โดย forward primer จำเพาะกับส่วนของ GST ของพลามิด pMCRB41 และ reverse primer จะจำเพาะกับ 6xHis ของชิ้นส่วนยีน *lipL41* โดยลำดับเบสดังที่แสดงในบทที่ 3

จากนั้นนำ PCR product มาทำ agarose gel electrophoresis พบว่าโคโลนีที่ 2 มี band เกิดขึ้น โดยมีขนาดประมาณ 1100 bp ดังที่แสดงในภาพที่ 12 จึงคาดว่าเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิด pMCRB41



ภาพที่ 12 แสดงผลผลิต PCR จากการทำ Colony PCR และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วดูภายใต้แสง Ultraviolet

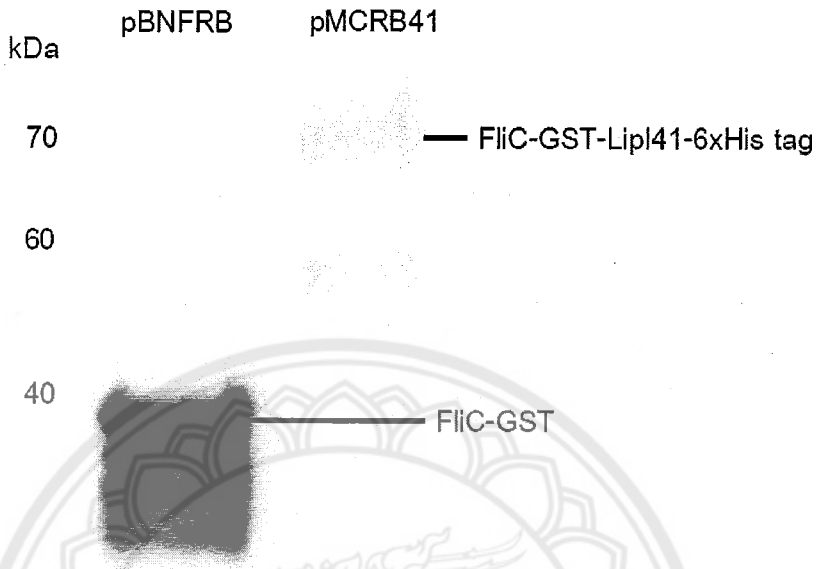
โดย lane M คือ DNA marker

lane 1-2 คือ โคโลนีหมายเลข 1-2 ตามลำดับ

4. การตรวจสอบพลาสมิด ที่สามารถแสดงออกเป็นโปนตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag

เมื่อพบโคโลนีที่ 2 ที่คาดว่ามีพลาสมิด pMCRB41 จึงนำโคโลนีดังกล่าวมาทดสอบการแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *E. coli* โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG จากนั้นนำไปตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot โดยใช้ antibody ต่อ GTS และ Histidine โดยทำการตรวจสอบเปรียบเทียบกับพลาสมิด pBNFRB โดยผลของการใช้ antibody ต่อ GST ในพลาสมิด pBNFRB พบ band ของโปรตีน FliC-GST เกิดขึ้นโดยมีน้ำหนักประมาณ 40 kDa และมีลักษณะเป็น multiple band ในส่วนของพลาสมิด pMCRB41 พบ band เกิดขึ้น 3 band โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 kDa, 60 kDa

และ 40 kDa และคาดว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 kDa น่าจะเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ดังที่แสดงในภาพที่ 13 ส่วนผลของการใช้ antibody ต่อ Histidine ในพลาสมิด pBNFRB พบว่าไม่มี band เกิดขึ้น ในส่วนของพลาสมิด pMCRB41 พบ band เกิดขึ้น 2 band โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 kDa และ 60 kDa โดยคาดว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 kDa น่าจะเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ดังที่แสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 13 แสดงการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *E. coli* เมื่อนำมาทำ Western blot โดยใช้ Anti-GST

โดย lane pBNFRB คือ *E. coli* ที่มีพลาสมิต pBNFRB
lane pMCRB41 คือ *E. coli* ที่มีพลาสมิต pMCRB41

2 QR
901
.S45
3795
2561
1052776

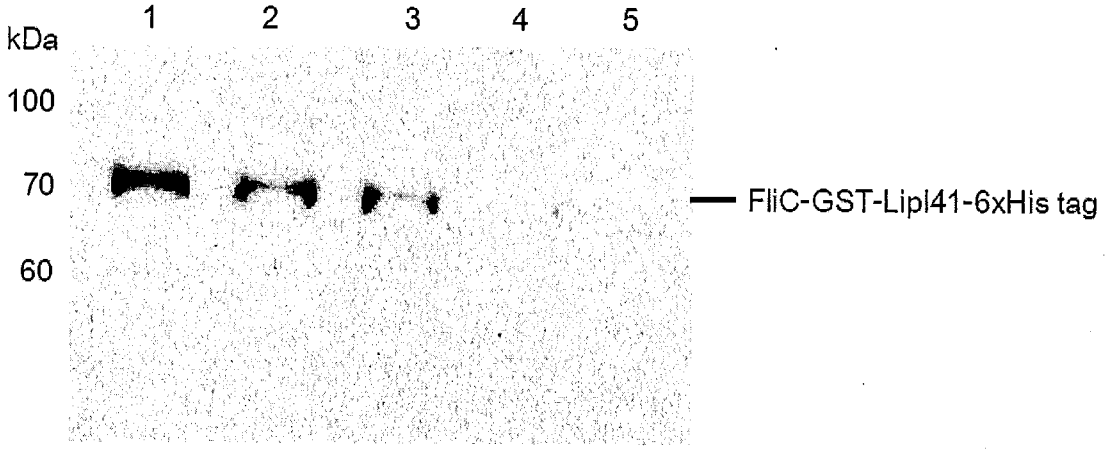
สำนักหอสมุด
14 มิย. 2565

ภาพที่ 14 แสดงการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *E. coli* เมื่อนำมาทำ Western blot โดยใช้ Anti-His

โดย lane pBNFRB คือ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBNFRB
lane pMCRB41 คือ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pMCRB41

5. การทดสอบการหลั่งโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *S.* Typhimurium

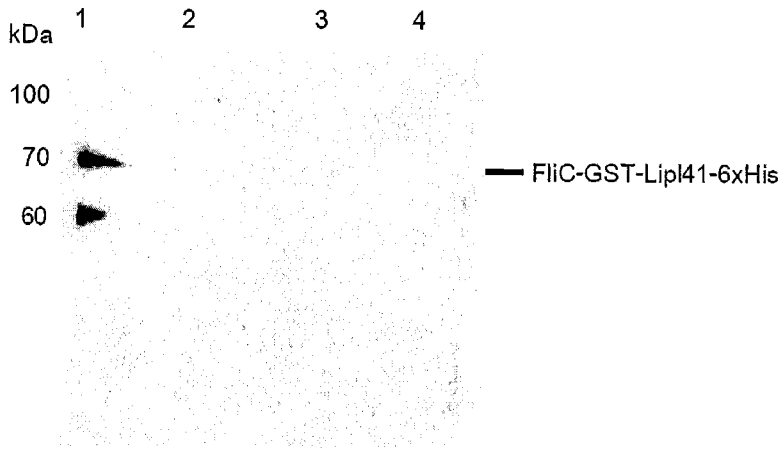
เมื่อทราบแล้วว่าโคโลนีที่นำมาสามารถแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ได้ จึงทำการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีดังกล่าว เพื่อนำพลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 หรือ Wild type ด้วยวิธี electroporation และนำเซลล์ที่ได้มาคัดเลือกโดยเลี้ยงบน LB plate ที่มีส่วนผสมของยา Ampicillin และนำ single colony มากระตุ้นการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ด้วย 1 mM IPTG โดยจะแบ่งเวลากระตุ้นการสร้างโปรตีนออกเป็น 1, 2, 3, 4 ชั่วโมง และข้ามคืน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ตามเวลาที่กำหนด โดยการวัดค่า OD ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.3 เพื่อปรับเซลล์ให้เท่ากัน และนำมาตรวจสอบการสร้างโปรตีนด้วย เทคนิค SDS-PAGE และ Western blot โดยใช้ antibody ต่อ His พบว่ามี band เกิดขึ้น โดยมีน้ำหนักประมาณ 75 kDa ที่เวลา 1, 2, 3, 4 ชั่วโมง แต่ไม่พบที่เวลาข้ามคืน และจากการสังเกตพบว่าความเข้มของ band จะเริ่มจางลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังที่แสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 แสดงการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *S.* Typhimurium โดยการกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG ในระยะเวลาต่างๆ และตรวจสอบโปรตีนโดยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-His

โดย lane 1 คือ กระตุ้นการสร้างโปรตีนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
lane 2 คือ กระตุ้นการสร้างโปรตีนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
lane 3 คือ กระตุ้นการสร้างโปรตีนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
lane 4 คือ กระตุ้นการสร้างโปรตีนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
lane 5 คือ กระตุ้นการสร้างโปรตีนเป็นเวลาข้ามคืน

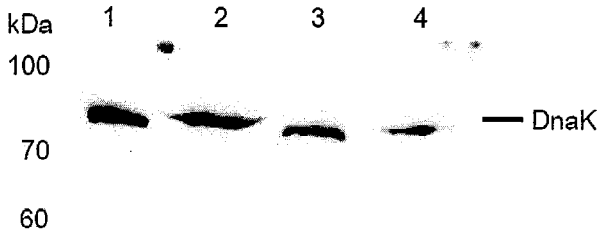
จากนั้นเลือกเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างโปรตีน เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนแล้ว นำ single colony บน LB agar ที่มี Ampicillin ที่มีพลาสมิด pMCRB41 นำเข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 และ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar มากระตุ้นการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ด้วย IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ตามเวลาที่กำหนด โดยการวัดค่า OD ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.3 นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ml มาตกตะกอนด้วย 10% TCA เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำส่วนของเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot โดยการใช้ antibody ต่อ Histidine และ DnaK โดยพบว่า antibody ต่อ Histidine พบ band เกิดขึ้นที่ส่วนของเซลล์ใน *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 และ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar โดยมีน้ำหนักประมาณ 70 kDa คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag แต่ไม่พบ band ที่ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อดังที่แสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดงการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *S.* Typhimurium ให้หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจสอบโปรตีนโดยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-His

โดย lane 1 คือ ส่วนเซลล์ของเชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344
lane 2 คือ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344
lane 3 คือ ส่วนเซลล์ของเชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar
lane 4 คือ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar

ในส่วนของการตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag โดยใช้ antibody ต่อ DnaK พบว่ามี band เกิดขึ้นทั้งในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีขนาดประมาณ 80 kDa ทั้งใน *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 และ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar ดังที่แสดงในภาพที่ 17

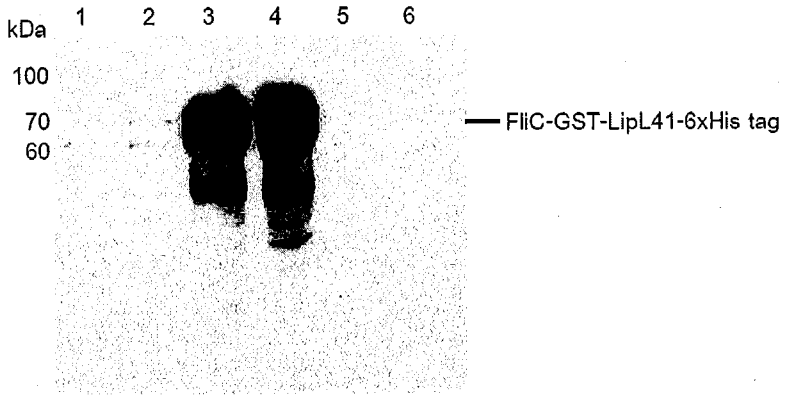


ภาพที่ 17 แสดงการตรวจสอบการแตกของเซลล์ในการสร้างโปรตีนของเชื้อ *S.* Typhimurium ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-DnaK

โดย lane 1 คือ ส่วนเซลล์ของเชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344
lane 2 คือ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344
lane 3 คือ ส่วนเซลล์ของเชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar
lane 4 คือ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar

6. การตรวจสอบ soluble protein และ insoluble protein

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าไม่มีการหลั่งโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทางคณะผู้วิจัยจึงทำการตรวจสอบโปรตีนที่สร้างว่าเป็น soluble protein หรือ insoluble protein โดยนำพลาสมิด pMCRB41 เข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 และ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar กระตุ้นการสร้างโปรตีน ทำการเก็บเซลล์ และทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator ทำการปั่นเพื่อแยกส่วนของเซลล์ และ cytoplasm ออกจากกัน โดยในส่วนของตะกอนนั้นจะเป็นส่วนที่มี insoluble protein หรือ inclusion bodies อยู่ และส่วนใสเป็นส่วนที่มี soluble protein นำส่วนของ whole cell, insoluble protein และ soluble protein มาตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ antibody ต่อ Histidine โดยผลจากการทดลองพบว่า ในส่วนของ whole cell พบว่ามี band เกิดขึ้น 2 band ทั้งใน *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 และ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 70 kDa และ 60 kDa ซึ่งน้ำหนัก 70 kDa คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ผลในส่วนของ insoluble protein พบว่ามี band เกิดขึ้นหลาย band ทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งคาดว่าน่าเป็นโปรตีนที่เกาะกลุ่มกันเกิดเป็น inclusion bodies และผลของ soluble protein พบว่าไม่มี band เกิดขึ้นในทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังที่แสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แสดงการตรวจสอบ soluble protein และ insoluble protein ในการสร้างโปรตีนของเชื้อ *S.* Typhimurium ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-His

โดย lane 1 คือ ส่วน whole cell ของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344

lane 2 คือ ส่วน whole cell ของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar

lane 3 คือ ส่วน insoluble protein ของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344

lane 4 คือ ส่วน insoluble protein ของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar

lane 5 คือ ส่วน soluble protein ของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344

lane 6 คือ ส่วน soluble protein ของ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้นำ Genomic ของเชื้อ *Leptospira* spp. ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *lipL41* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกเป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *Leptospira* spp. โดยนำชิ้นส่วนยีน *lipL41* ตัดต่อเข้ากับพลาสมิด pBNFRB ซึ่งมีส่วนของ FliC ที่มีส่วนของ export signal ในการชักนำโปรตีนลูกผสมให้หลั่งออกนอกเซลล์ผ่านทางระบบ Type III secretion system ของเชื้อ *S.* Typhimurium จากนั้นนำพลาสมิดที่สร้างขึ้นเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อเพิ่มจำนวนและคัดเลือกพลาสมิดที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ได้ ก่อนนำเข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium เพื่อทดสอบการหลั่งโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการตรวจสอบโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *lipL41* จาก Genomic DNA ของเชื้อ *Leptospira* spp. โดยใช้เทคนิค PCR การเพิ่มจำนวนนั้น ในส่วนของ Reverse primer จะมีส่วนของโปรตีน Histidine 6 ตัว ซึ่งใช้ในการตรวจติดตามโปรตีน LipL41 เมื่อมีการแสดงออก ผลจากการเพิ่มจำนวนที่ตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้น มีขนาดประมาณ 1,100 bps จากนั้นนำผลผลิต PCR มาตัดต่อเข้ากับพลาสมิด pBNFRB โดยนำชิ้นส่วนยีน *lipL41-6xHis* tag ต่อเข้าทางด้านหลังของ GST ซึ่งเป็น Protein tag ในการติดตามโปรตีนที่สนใจและมีส่วนของ Thrombin recognition site เพื่อใช้แยกโปรตีนที่สนใจออกจาก GSTนอกจากนี้ยังสามารถทำบริสุทธิ์โปรตีนที่สนใจโดยใช้ column ที่มี Glutathione ได้อีกด้วย (60) นอกจากนี้ในส่วนของพลาสมิด pBNFRB ยังมีส่วนของยีน *fliC* ซึ่งเป็น export signal ในการชักนำโปรตีนลูกผสมให้หลั่งออกนอกเซลล์ผ่านทางระบบ Type III secretion system ของเชื้อ *S.* Typhimurium

เมื่อทำการเชื่อมยีน *lipL41-6xHis* tag และพลาสมิด pBNFRB จะได้พลาสมิดชนิดใหม่ที่มีชื่อว่า pMCRB41 โดยทำการคัดเลือกพลาสมิดที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยนำพลาสมิด pMCRB41 เข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธี heat shock จากนั้นนำเชื้อไปเลี้ยงใน LB agar ที่มียา Ampicillin เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag โดยจากผลพบว่ามีโคโลนีขึ้นบน LB agar เพียง 2 โคโลนี ซึ่งอาจจะเกิดได้จากปัจจัยต่างๆ เช่น ขั้นตอนการเตรียม competent cell หรือ ขั้นตอนในกระบวนการ ligation ซึ่งปัจจัยทางด้าน competent cell ทางคณะผู้วิจัยคาดว่าเกิดจากเซลล์ที่ทำการเตรียมเซลล์ไว้เป็นเวลานาน ซึ่งอาจต้องทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของ competent cell โดยใช้พลาสมิดที่ทราบความเข้มข้นนำเข้าสู่ competent cell ที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หาประสิทธิภาพของการ transformation โดยคำนวณจากจำนวนโคโลนีที่พบและปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดที่นำเข้าสู่เซลล์ โดยประสิทธิภาพที่ดีจะอยู่ในช่วงประมาณ 10^6 - 10^8 cfu/µg (61) ในส่วนของกระบวนการ ligation คาดว่าเกิดจากขั้นตอนการปฏิบัติการหรือคุณภาพของเอนไซม์และบัฟเฟอร์ โดยอาจทำการตรวจสอบคุณภาพของเอนไซม์และบัฟเฟอร์โดยนำ DNA leader มาทำการ ligation จากน้ำยาชุดที่ต้องการตรวจสอบและนำไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis โดยเทียบกับ DNA leader ปกติ โดยถ้าประสิทธิภาพของ ligation ยังมีประสิทธิภาพดี DNA leader เกิดเป็น smear ขึ้นมา (62)

โดยทางคณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกพลาสมิดจากโคโลนีที่ขึ้นบน LB agar โดยอาศัยเทคนิค colony PCR ซึ่งใช้ primer ที่จำเพาะกับพลาสมิด pMCRB41 และชิ้นส่วนยีน *lipL41*-6xHis tag เป็น colony checking primer โดยส่วนของ Forward primer จะจำเพาะกับบางส่วนของชิ้นส่วน GST และ Reverse primer จำเพาะกับส่วนของ 6xHis tag โดยผลจากการเพิ่มจำนวนพบว่ามี 1 โคโลนีที่มีผลผลิต PCR เกิดขึ้น จึงนำโคโลนีดังกล่าวมาทดสอบการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ GST และ Histidine โดยทางคณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีนของโคโลนีที่มีพลาสมิด pMCRB41 และ pBNFRB เพื่อเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนที่สร้างขึ้น โดยคาดว่าพลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่ต้องมีขนาดที่ใหญ่กว่าโปรตีนที่สร้างจากพลาสมิด pBNFRB และในส่วนของแอนติบอดีต่อ Histidine ต้องไม่พบ band เกิดขึ้น ซึ่งผลจากการทำ Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ GST พบว่ามี band เกิดขึ้นทั้งในส่วนของพลาสมิด pMCRB41 และ pBNFRB โดยในส่วนของพลาสมิด pBNFRB พบว่า band มีน้ำหนักประมาณ 39 kDa โดยมีลักษณะเป็น multiple band ซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายของโปรตีน FliC-GST จากเอนไซม์ Protease ของเชื้อ (63) โดยจากการสังเกต ยังพบ band ในตำแหน่งที่ต่ำลงมา และจากการใช้แอนติบอดีต่อ GST คาดว่าเป็นการย่อยสลายในส่วนของโปรตีน FliC ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่โปรตีน FliC เป็นโปรตีนภายนอกเซลล์ที่ต้องหลั่งออกมานอกเซลล์ของเชื้อ *S.* Typhimurium ดังนั้นเมื่อมีการสร้างโปรตีน FliC ขึ้นภายในเซลล์ของเชื้อ *E. coli* จึงมีโอกาสที่จะถูกทำลายจากเอนไซม์ Protease ของ *E. coli* ได้ ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ คุณณัฐพล ทิสยากร, ดารารัตน์ วันขวา และ นุสรา ศรีแสงอ่อน (51) ซึ่งทำการสร้างโปรตีน FliC-GST แล้วพบว่ามีการย่อยสลายของโปรตีน FliC เช่นกัน ในส่วนของพลาสมิด pMCRB41 พบว่ามี band เกิดขึ้น 3 band โดยมีขนาดประมาณ 70 kDa ,60 kDa และ 40 kDa โดยโปรตีนขนาดประมาณ 70 kDa คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis เนื่องจากการคำนวณโปรตีน FliC-GST มีขนาดประมาณ 39 kDa และ LipL41 มีขนาดประมาณ 36 kDa ซึ่งเมื่อนำมารวมกันมีขนาดประมาณ 75 kDa และโปรตีนที่ขนาดประมาณ 60 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน GST-LipL41-6xHis เนื่องจากโปรตีน FliC นั้นถูกย่อยสลายไป ซึ่งโปรตีน FliC นั้นมีขนาดประมาณ 13 kDa และ band ที่มีขนาดประมาณ 40 kDa ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน FliC-GST เนื่องจากมี band มีขนาดตรงกับพลาสมิด pBNFRB โดยคาดว่าเกิดจากการย่อยสลายของโปรตีน LipL41-6xHis ซึ่งเป็นไปได้ว่าโปรตีน LipL41 ที่สร้างนั้นเป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *Leptospira* spp. เมื่อมาสร้างภายในเซลล์ของเชื้อ *E. coli* อาจทำให้โปรตีนถูกทำลายได้จากเอนไซม์ protease และผลจากการตรวจสอบการสร้างโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ antibody ต่อ histidine ผลปรากฏว่าไม่พบ band เกิดขึ้นที่พลาสมิด pBNFRB เนื่องจากโปรตีนที่สร้างไม่มีโปรตีน histidine ทำให้ไม่พบ band เกิดขึ้น ส่วนในพลาสมิด pMCRB41 พบว่ามี band เกิดขึ้น 2 band ซึ่งในส่วนของ band ที่มีขนาดประมาณ 70 kDa น่าจะเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis และ band ที่มีขนาดประมาณ 60 kDa น่าจะเป็นโปรตีน GST-LipL41-6xHis เนื่องจากมีการย่อยสลายไปของโปรตีน FliC สำหรับการย่อยสลายโปรตีน แม้จะเป็นปัญหาที่เกิดขึ้น แต่ในการทดลองครั้งนี้เป็นเพียงแค่การคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิด pMCRB41 ที่สามารถสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis และนำเข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium เพื่อให้หลั่งโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis ออกมานอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการสร้างโปรตีนให้หลั่งออกมานอกเซลล์นั้น มีข้อจำกัดในด้านของปริมาณอยู่ กล่าวคือ ในการสร้างโปรตีนให้หลั่งออกมานอกเซลล์มักพบว่ามีปริมาณของโปรตีนน้อย (64) ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงต้องการหาเวลาที่กระตุ้นการสร้างโปรตีนได้ดีที่สุดเพื่อที่จะได้โปรตีนในปริมาณมากและหลีกเลี่ยงปัญหาการย่อยสลายของโปรตีน โดยทำการสกัดพลาสมิด pMCRB41 ที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis

จากเชื้อ *E. coli* จากนั้นนำพลาสมิดเข้าสู่ *S.* Typhimurium ด้วยวิธี electroporation เนื่องจาก *S.* Typhimurium ไม่สามารถนำพลาสมิดเข้าสู่เชื้อด้วยวิธี heat shock เพราะมีชั้นของ lipopolysaccharides หนา จึงต้องนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี electroporation จากนั้นทำการกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG โดยใช้เวลาในการกระตุ้นที่แตกต่างกันคือ 1, 2, 3, 4 ชั่วโมง และข้ามคืน เพื่อหาว่าระยะเวลาใดที่เชื้อสามารถสร้างโปรตีนออกมาได้มากที่สุด โดยเมื่อครบเวลาในการกระตุ้นจะทำการเก็บเซลล์โดยทำการวัดค่า OD ให้เท่ากับ 0.3 หรือประมาณ 3.0×10^8 cell/ml เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของเซลล์ที่นำมาทดสอบให้มีปริมาณที่เท่ากัน จากนั้นนำมาตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ Western blot โดยใช้ antibody ต่อ histidine โดยผลพบว่ามี band เกิดขึ้นที่ขนาดประมาณ 70 kDa ในระยะเวลาที่ 1, 2, 3, 4 ชั่วโมง แต่การกระตุ้นด้วยระยะเวลาข้ามคืนไม่พบ band เกิดขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่า band มีความเข้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไป จากผลการทดลองนี้จึงสามารถบอกได้ว่า การสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis โดยใช้ *S.* Typhimurium พบว่าโปรตีนมีการถูกย่อยสลายภายในเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการเลือกเวลาในการกระตุ้นด้วย IPTG เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่พบการสร้างโปรตีน และจากงานวิจัยก่อนหน้าของคุณณัฐพล ทิสยากร และคณะ (51) ได้ใช้เวลาที่ 3 ชั่วโมงในการกระตุ้นการหลั่งโปรตีน GST-FliC ในเชื้อ *S.* Typhimurium และพบว่าสามารถหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์สู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทางคณะผู้วิจัยจึงเลือกการกระตุ้นด้วย IPTG เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

จากนั้นทำการทดสอบการหลั่งโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis ให้ออกมานอกเซลล์ โดยนำ pMCRB41 เข้าสู่เชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 และ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar ด้วยวิธี electroporation โดยเชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene นี้ถูกใช้เป็น negative control กล่าวคือ ในการทดลองครั้งนี้อาศัยการหลั่งโปรตีนผ่านทาง flagellar ในเมื่อไม่มียีนที่ใช้สร้าง flagellar ดังนั้น จะต้องไม่พบโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้น ทำการกระตุ้นการสร้างโปรตีนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บในส่วนของเซลล์โดยวัดค่า OD ให้ได้เท่ากับ 0.3 และปั่นเพื่อแยกส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบการหลั่งโปรตีน โดยทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย TCA จากนั้นนำมาทดสอบในปริมาณ 1 ml และทำการตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ antibody ต่อ histidine และ DnaK โดย DnaK นั้นเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในเซลล์ (65) จึงใช้ในการบ่งชี้การแตกของเซลล์ได้ โดยจากผลการทดลองของการใช้ antibody ต่อ histidine พบว่า มี band เกิดขึ้นในส่วนในเซลล์ของทั้ง *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 และ*S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar โดยมีขนาดของโปรตีนอยู่ที่ประมาณ 70 kDa ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis และจากการสังเกตจะพบว่าความเข้มของ band ใน *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 มีความเข้มมากกว่า เป็นไปได้ว่าการสร้างโปรตีนโดยใช้ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar มีการย่อยสลายโปรตีนได้เร็วกว่า เนื่องจากการสร้างโปรตีนครั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยได้นำพลาสมิดเข้าสู่ตัวเชื้อเพื่อทำการแสดงออกเป็นโปรตีนออกมา ซึ่งไม่มีส่วนเกี่ยวของกับการสร้างโปรตีนของเชื้อ *S.* Typhimurium ดังนั้น คาดว่าเกี่ยวของกับการย่อยสลายของโปรตีนที่มากกว่า และจากผลการทดลองพบว่าไม่มี band เกิดขึ้นในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อในเลนที่ 2 และ 4 ของทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งอาจจะสรุปได้ว่าโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ได้แต่ไม่สามารถหลั่งออกมานอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่อย่างไรก็ตามผลของการใช้ antibody ต่อ DnaK พบว่ามี band เกิดขึ้นทั้ง 4 เลน ซึ่งบ่งบอกว่าในเลนที่ 2 และ 4 ต้องมีการแตกของเซลล์เกิดขึ้น แต่จากการใช้ antibody ต่อ histidine ซึ่งคาดว่าควรจะพบ band เกิดขึ้น ดังนั้นการที่ไม่พบโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจเกิดจากสาเหตุของโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis ที่ถูกสร้างขึ้นนั้น เกิดการเกาะกลุ่มกันทำให้เกิดเป็น inclusion bodies ซึ่งโปรตีนที่อยู่ในรูปของ inclusion bodies นี้ อาจเป็นเหตุผล

ที่ไม่สามารถหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์ได้ โดยการเกิด inclusion bodies อาจเกิดจากสาเหตุที่โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นไม่ใช่โปรตีนที่อยู่ในสิ่งมีชีวิตนั้น เมื่อสร้างโปรตีนออกมาอาจทำให้ไม่มีการ folding ของโปรตีนที่สมบูรณ์ ทำให้โปรตีนเกาะกลุ่มกันเกิดเป็น inclusion bodies ได้ (66) และอีกเหตุผลหนึ่งของการที่ไม่พบโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์และถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์อาจถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ Protease จึงทำให้ไม่พบโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในปี 2011 งานวิจัยของ Piyanart Chalayon และคณะ (16) ได้ทำการศึกษาการวินิฉัยโรค Leptospirosis ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ outer membrane protein LipL21, LipL32, LipL41 และ Loa22 จากเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni พบว่าในการสร้างโปรตีน LipL41 มีการรวมตัวกันเป็น inclusion bodies จึงทำการละลาย inclusion bodies ด้วย 8 M urea buffer จากนั้นจึงไปทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ต่อไป ต่อมาในปี 2013 งานวิจัยของ Ming-Hsing Lin และคณะ (17) ได้ทำการผลิตโปรตีน LipL41 เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถของโปรตีน LipL41 โดยการตัดต่อยีน *lipL41* เข้าสู่พลาสมิด pRSET จากนั้นนำเข้าสู่ *E. coli* แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และกระตุ้นด้วย IPTG 1 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกเพื่อแยกเอาโปรตีนออกมา แต่พบว่าเกิด inclusion bodies ขนาดใหญ่อยู่ในส่วนที่เป็น soluble ของ *E. coli* จึงได้ทำการแก้ไขโดยการใส่ chaperone และ Lep เข้าไป และนำ plasmid เข้าสู่ *E. coli* แต่ลดอุณหภูมิการบ่มลงให้เหลือ 20 °C ลดความเข้มข้นของ IPTG ลงเหลือ 0.5 mM และเพิ่มระยะเวลาในการกระตุ้นเป็น 16 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณโปรตีน LipL41 ที่เป็น soluble เพิ่มมากขึ้น

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทำให้ทางคณะผู้วิจัยคิดว่า โปรตีน LipL41 ที่สร้างขึ้นมานั้น อาจเกิดเป็น inclusion bodies ขึ้นภายในเซลล์ของเชื้อ *S.* Typhimurium ส่งผลให้ไม่สามารถที่จะหลั่งโปรตีนออกมายังนอกเซลล์ผ่านทาง T3SS ในปี 2010 Dobo J และคณะ (50) ได้ทำการนำส่วนของ N-terminal ของโปรตีน FliC ในขนาดที่ไม่เท่ากัน จากนั้นนำมาต่อกับโปรตีนชนิดต่างๆ เพื่อที่จะศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพในส่วนของ N-terminal ของโปรตีน FliC ในการชักนำให้มีการหลั่งออกโปรตีนชนิดอื่นๆ ออกนอกเซลล์ และในการทดลองพบว่าโปรตีน GST ที่นำไปต่อกับส่วนของ FliC นั้นเกิดเป็น inclusion bodies ส่งผลให้มีการหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์น้อย จึงทำการพิสูจน์โปรตีน GST ว่าเป็น insoluble protein หรือ inclusion bodies หรือไม่ โดยทำการแยก inclusion bodies ออกจาก soluble protein ด้วยวิธี ultrasound treatment โดยใช้เครื่อง sonicator และทำการปั่นแยกในส่วนของ soluble protein และ insoluble protein ออกจากกัน หากโปรตีนเกิดเป็น inclusion bodies เมื่อทำการปั่นจะทำให้ตกไปอยู่ในส่วนของตะกอน แต่หากโปรตีนอยู่ในรูปของ soluble protein จะแยกอยู่ในส่วนของ supernatant จากการทดลองนี้สามารถพิสูจน์ได้ว่าเกิด inclusion bodies ของโปรตีน GST

ดังที่กล่าวมา ทางคณะผู้วิจัยจึงต้องการพิสูจน์ว่า โปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis เกิด inclusion bodies ขึ้นในเซลล์ของ *S.* Typhimurium หรือไม่ จึงนำ pMCRB41 เข้าสู่ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 และ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar จากนั้นทำการกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG ทำการเก็บเซลล์และทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator จากนั้นทำการปั่นแยกส่วนของ insoluble protein และ soluble protein ออกจากกัน และทำการตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ histidine โดยทำการตรวจสอบใน 3 ตัวอย่างคือ whole cell, ตะกอน หรือ insoluble และในส่วนของ soluble ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ในส่วนของ whole cell มี band เกิดขึ้น 2 band ทั้งใน *S.* Typhimurium สายพันธุ์ SL 1344 และ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ถูก knockout gene ที่สร้าง flagellar ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 70 kDa และ 60 kDa ซึ่งน้ำหนัก 70 kDa คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ผลในส่วนของ insoluble พบว่ามี band เกิดขึ้นหลาย band

ทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนที่เกาะกลุ่มกันเกิดเป็น inclusion bodies จึงทำให้เห็นเป็น band ขนาดใหญ่และมีความเข้มของแบนมาก ซึ่งคาดว่าเกิดจากโปรตีน LipL41 เป็นโปรตีนที่อยู่ในส่วนของ เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *Leptospira* spp. เมื่อนำมาสร้างภายในเซลล์จึงเกิดเป็น insoluble protein และเกาะกลุ่มกันเกิดเป็น inclusion bodies และผลในส่วนของ soluble พบว่าไม่มี band เกิดขึ้นในทั้ง 2 สายพันธุ์ จึงสามารถสรุปได้ว่าโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ที่ถูกสร้างขึ้นนั้นสามารถที่จะสร้างขึ้นมาภายในเซลล์ได้แต่ไม่ถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากโปรตีนเกิดเป็น inclusion bodies ขึ้นภายในเซลล์

ดังนั้นจากการวิจัยนี้ไม่สามารถที่จะสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ให้หลั่งออกมานอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาศัยโปรตีน FliC ในการชักนำโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ผ่านทาง T3SS ของเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ เนื่องจากโปรตีนที่สร้างขึ้นเกิดเป็น inclusion bodies ภายในเซลล์ ดังนั้นอาจต้องทำการแก้ปัญหาในส่วนของการเกิด inclusion bodies โดยอาจทำการปรับเปลี่ยนในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนเช่น การลดอุณหภูมิในการบ่ม และปรับลดความเข้มข้นของ IPTG แล้วเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม (17) เพื่อที่จะได้โปรตีนในส่วนของ soluble โปรตีนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการแก้ไขปัญหาอาจทำให้ได้ปริมาณของโปรตีนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะสามารถนำโปรตีนที่สร้างไปใช้ประโยชน์ต่อไปหรือนำวิธีการดังกล่าวใช้ในการสร้างโปรตีนชนิดอื่นที่มีปัญหาเช่นเดียวกันได้

ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป

งานวิจัยนี้สามารถสร้างพลาสมิดลูกผสม pMCRB41 ที่สามารถสร้างโปรตีนลูกผสม FliC-GST-LipL41 สำเร็จ แต่พบอุปสรรคคือ ตรวจพบมีการหลั่งออกมานอกเซลล์ในปริมาณที่น้อยมาก ทำให้ผู้วิจัยมองว่าไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนรูปแบบในการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่ไม่มียีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน GST ทำการกระตุ้นการสร้างโปรตีน FliC-LipL41 แล้วทำการตรวจสอบความสามารถในการหลั่งโปรตีนดังกล่าวในน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย

บรรณานุกรม

1. Choi JH, Keum KC, Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chemical Engineering Science. 2006;61(3):876-85.

2. Huang CJ, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. J Ind Microbiol Biotechnol. 2012 Mar;39(3):383-99.

3. Mergulhao FJ, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in Escherichia coli. Biotechnol Adv. 2005 May;23(3):177-202.

4. Minamino T, Imada K, Namba K. Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. Mol Biosyst. 2008 Nov;4(11):1105-15.

5. Minamino T, Namba K. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. Nature. 2008 Jan 24;451(7177):485-8.

6. Vegh BM, Gal P, Dobo J, Zavodszky P, Vonderviszt F. Localization of the flagellum-specific secretion signal in *Salmonella* flagellin. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jun 23;345(1):93-8.

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

8. Lin MH, Chang YC, Hsiao CD, Huang SH, Wang MS, Ko YC, et al. LipL41, a hemin binding protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. PLoS One. 2013;8(12):e83246.

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

10. Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. Microbes Infect. 2000 Aug;2(10):1265-76.

11. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. Veterinary Microbiology. 2010;140(3–4):287-96.

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

13. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Selvin J, Sehgal SC. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of *Leptospira interrogans* serovar autumnalis. Ann Trop Med Parasitol. 2008 Dec;102(8):699-708.

14. King AM, Bartpho T, Sermswan RW, Bulach DM, Eshghi A, Picardeau M, et al. Leptospiral outer membrane protein LipL41 is not essential for acute leptospirosis but requires a small chaperone protein, lep, for stable expression. Infect Immun. 2013 Aug;81(8):2768-76.

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

16. Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, Kalambaheti T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011 May;105(5):289-97.

17. Lin MH, Chang YC, Hsiao CD, Huang SH, Wang MS, Ko YC, et al. LipL41, a hemin binding protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. PLoS One. 2013;8(12):e83246.

18. Feng CY, Li QT, Zhang XY, Dong K, Hu BY, Guo XK. Immune strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32-41-OmpL1 vaccines against leptospira. Braz J Med Biol Res. 2009 Sep;42(9):796-803.

19. Vonderviszt F, Sajó R, Dobó J, Závodszky P. The use of a flagellar export signal for the secretion of recombinant proteins in *Salmonella*. 2012.

20. Ni Y, Chen R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. Biotechnology Letters. 2009;31(11):1661-70.

21. Dobo J, Varga J, Sajo R, Vegh BM, Gal P, Zavodszky P, et al. Application of a Short, Disordered N-Terminal Flagellin Segment, a Fully Functional Flagellar Type III Export Signal, to Expression of Secreted Proteins. Applied and Environmental Microbiology. 2009;76(3):891-9.

22. Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals / Pedro N. Acha, Boris Szyfres: Washington, D.C., : Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization, 2003. 3rd ed.; 2003.

23. Ibarra JA, Steele-Mortimer O. *Salmonella* – the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. Cellular Microbiology. [Article]. 2009;11(11):1579-86.

24. Scientifica. *Salmonella*. [10 June 2014]. Available from: http://visualsunLimited. photoshelter.comv/gallery-image/Salmonella/G0000vLM7YclS QG0/I0000kz1dpQ0ZLZ4.

25. Chevance FF, Hughes KT. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. Nat Rev Microbiol. 2008 Jun;6(6):455-65.

26. Macnab RM. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 11;1694(1-3):207-17.

27. Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G. Flagella and bacterial pathogenicity. J Basic Microbiol. 2013 Jan;53(1):1-8.

28. Erhardt M, Namba K, Hughes KT. Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Nov;2(11):a000299.

29. Chevance FF, Hughes KT. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. Nat Rev Microbiol. 2008 Jun;6(6):455-65.

30. Berg HC, Anderson RA. Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. Nature. 1973 Oct 19;245(5425):380-2.

31. Macnab RM. How bacteria assemble flagella. Annu Rev Microbiol. 2003;57:77-100.

32. Kojima S, Furukawa Y, Matsunami H, Minamino T, Namba K. Characterization of the periplasmic domain of MotB and implications for its role in the stator assembly of the bacterial flagellar motor. J Bacteriol. 2008 May;190(9):3314-22.

33. Aizawa SI. Flagellar assembly in *Salmonella* Typhimurium. Mol Microbiol. 1996 Jan;19(1):1-5.

34. Paul K, Erhardt M, Hirano T, Blair DF, Hughes KT. Energy source of flagellar type III secretion. Nature. 2008 Jan 24;451(7177):489-92.

35. Minamino T, MacNab RM. FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of Salmonella, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. Mol Microbiol. 2000 Sep;37(6):1494-503.

36. Hirano T, Yamaguchi S, Oosawa K, Aizawa S. Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella* Typhimurium. J Bacteriol. 1994 Sep;176(17):5439-49.

37. Homma M, DeRosier DJ, Macnab RM. Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella* Typhimurium and their relationship to other axial components of the flagellum. J Mol Biol. 1990 Jun 20;213(4):819-32.

38. Minamino T, Namba K. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. Nature. 2008 Jan 24;451(7177):485-8.

39. Komoriya K, Shibano N, Higano T, Azuma N, Yamaguchi S, Aizawa S-I. Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella* Typhimurium. Molecular Microbiology. 1999;34 (4) :767-79.

40. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. Nature. 2003 Aug 7;424 (6949) :643-50.

41. Minamino T, Macnab RM. Components of the Salmonella flagellar export apparatus and classification of export substrates. J Bacteriol. 1999 Mar;181(5):1388-94.

42. Claret L, Calder SR, Higgins M, Hughes C. Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. Mol Microbiol. 2003 Jun;48(5):1349-55.

43. Fan F, Macnab RM. Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella* Typhimurium. J Biol Chem. 1996 Dec 13;271 (50): 31981-8.

44. Ferris HU, Minamino T. Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. Trends Microbiol. 2006 Dec;14(12):519-26.

45. Minamino T, Namba K. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. Nature. 2008 Jan 24;451(7177):485-8.

46. Terashima H, Kojima S, Homma M. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. Int Rev Cell Mol Biol. 2008;270:39-85.

47. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends Microbiol. 2004 Nov;12(11):509-17.

48. Lin MH, Chang YC, Hsiao CD, Huang SH, Wang MS, Ko YC, et al. LipL41, a hemin binding protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. PLoS One. 2013;8(12):e83246.

49. Vegh BM, Gal P, Dobo J, Zavodszky P, Vonderviszt F. Localization of the flagellum-specific secretion signal in *Salmonella* flagellin. Biochem Biophys Res Commun . 2006 Jun 23;345(1):93-8.

50. Dobo J, Varga J, Sajo R, Vegh BM, Gal P, Zavodszky P, et al. Application of a short, disordered N-terminal flagellin segment, a fully functional flagellar type III export signal, to expression of secreted proteins. Appl Environ Microbiol. 2010 Feb;76(3):891-9.

51. ณัฐพล ทิสยากร, ดารารัตน์ วันขวา, นุสรา ศรีแสงอ่อน. การพัฒนาวิธีการสร้างโปรตีนลูกผสมให้หลั่งออกมานอกเซลล์ผ่านทางระบบ Flagellar type III secretion system ของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium.2012.

52. Biolabs NE. PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (M0273). [16 June 2014]; Available from: https://www.neb.com/protocols/1/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273?device=pdf.

53. Protocol for agarose gel electrophoresis. [16 June 2014]; Available from: http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/bryophytes/agarose.pdf.

54. Biolabs NE. Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202). [16 June 2014]. Available from: https://www.neb.com/protocols/1/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202?device=pdf.

55. E. coli Calcium Chloride competent cell protocol. [16 June 2014]. Available from: http://www.med.nyu.edu/medicine/labs/blaserlab/Protocols/E-coli_competent_cells_protocol_ &_transformation.pdf.

56. Thermoscientific. General Protocol for SDS-PAGE. [16 June 2014]. Available from: http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/general-protocol-for-sds-page.pdf.

57. Bio-Rad. General Protocol for Western Blotting. [16 June 2014]. Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6376.pdf.

58. Real-Genomics. HiYield™Plasmid Mini Kit/Protocol Book. [16 June 2014]. Available from: http://bioamerica-inc.com/files/pdf/rbc_protocol_ypd100_ypd300.pdf.

59. Biolabs NE. Electroporation Protocol (C2986). [16 June 2014]. Available from: https://www.neb.com/protocols/1/01/01/electroporation-protocol-c2986.

60. Biotech P. GST gene fusion system. In: 3, edition. 1997.

61. Origene. Transformation Protocol. [29 June 2014]. Available from:http://www.origene.com/assets/Documents/Other/CompetentCells/TransformationProtocolAlphagold.pdf

62. New England Biolab Inc. Ligation Efficiencies Protocol. [29 June 2014].Available from: https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/tips-for-maximizing-ligation-efficiencies?device=pdf

63. Murby M, Uhlen M, Stahl S. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 1996 Mar;7(2):129-36.

64. Ni Y, Chen R. Extracellular recombinant protein production from Escherichia coli. Biotechnol Lett. 2009 Nov;31(11):1661-70.

65. Kohler S, Teyssier J, Cloeckaert A, Rouot B, Liautard JP. Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of Brucella suis within U937-derived phagocytes. Mol Microbiol. 1996 May;20(4):701-12.

66. Strandberg L, Enfors SO. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 1991 Jun;57(6):1669-74.