

โครงการย่อยที่ 2

เรื่อง

การศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นบ้านสายพันธุ์
Dermatophagoides pteronyssinus
และการผลิตสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นโดยพันธุวิศวกรรม

(Allergenomics of House Dust Mites,
Dermatophagoides pteronyssinus and
Production of Recombinant House Dust Mite Allergen)

คณะผู้วิจัย

รศ.พญ.อัญชลี ตั้งตรงจิตร
ศ.เกียรติคุณ ดร.วันเพ็ญ ชัยคำภา
ผศ.ดร.นิทัศน์ สุขรุ่ง
ผศ.ดร.ณัฐ มาลัยนวล
ผศ.ดร.นิตยา อินทรวัดนา
ศ.เกียรติคุณ พญ.ฉวีวรรณ บุณนาค
รศ.พญ.อรทัย พิบูลโกคานันท์

ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
ประจำปีงบประมาณ 2553 และ 2555

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ชื่อโครงการ : การศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นบ้านสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* และการผลิตสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นโดยพันธุวิศวกรรม
(Allergenomics of House Dust Mites, *Dermatophagoides pteronyssinus* and Production of Recombinant House Dust Mite Allergen)

รายนามหัวหน้าโครงการวิจัยและคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด โทรศัพท์และโทรสาร

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ	รศ. พญ.อัญชลี ตั้งตรงจิตร
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 2 ถนนวิภาวดี แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 โทรศัพท์ 02-4196468 โทรสาร 02-4112084

คณะผู้วิจัย

ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 1 :	ศ.เกียรติคุณ ดร.วันเพ็ญ ชัยคำภา
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 2 ถนนวิภาวดี แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 โทรศัพท์ 02-4196497 โทรสาร 02-4112084 E-mail : wanpen.cha@mahidol.ac.th , tmwcc@yahoo.com
ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 2 :	ผศ.ดร. นิทัศน์ สุขรุ่ง
หน่วยงานที่สังกัด	หน่วยเครื่องมือพิเศษเพื่อการวิจัย สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 2 ถนนวิภาวดี แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 โทรศัพท์ 02-4196621 โทรสาร 02-4196644 โทรศัพท์มือถือ 081 664 8287 E-mail : nitat.soo@mahidol.ac.th

- ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 3 :** ผศ. ดร. ณัฐ มาลัยนวล
 หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาปรสิตวิทยา
 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
 2 ถนนวังหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
 โทรศัพท์ 086-7833324 โทรสาร 02-4112084
 E-mail : nat.mal@mahidol.ac.th
- ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 4 :** ผศ. ดร. นิตยา อินทรวัดนา
 หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี
 คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
 420/6 ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
- ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 5 :** ศ.เกียรติคุณ พญ. ฉวีวรรณ บุณนาค
 หน่วยงานที่สังกัด หน่วยโรคภูมิแพ้ ภาควิชาโสต นาสิก ลาริงซ์วิทยา
 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
 2 ถนนวังหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
 โทรศัพท์ 02-4195941 โทรสาร 02-4184223
 E-mail : chaweewan.bun@mahidol.ac.th
- ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 6 :** รศ.พญ.อรทัย พิบูลโกคานันท์
 หน่วยงานที่สังกัด หน่วยโรคภูมิแพ้ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์
 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
 2 ถนนวังหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
 โทรศัพท์ 02-4195670, 02-415942 โทรสาร 02-4184223
 E-mail : jirapongo@yahoo.com

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย : จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
 ประจำปีงบประมาณ 2553 และ 2555

ระยะเวลาการวิจัย : 2 ปี

บทคัดย่อ

ไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) เป็นตัวผลิตสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้หลักในบ้านและเป็นสาเหตุของโรคภูมิแพ้ที่มีอุบัติการณ์เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก แม้จะมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจำนวนมาก แต่ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างระดับโมเลกุลของสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ในประเทศไทยยังมีจำกัด ดังนั้น การศึกษาอัลเลอร์จีโนม (allergenome) ของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น ย่อมทำให้ต้องรู้ความรู้อย่างใหม่ ๆ ที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย การดูแลผู้ป่วย และการรักษาด้วยวัคซีนที่มีความเที่ยงตรงมากยิ่งขึ้น การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์ เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่กลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทยที่ทำการการศึกษา

สารสกัดหยาบจากตัวไรฝุ่นบริสุทธิ์สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ถูกนำมาแยกโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ที่มีการแยกแบบสองทิศทาง ตามความแตกต่างกันของ pH ในช่วง 3-10 และขนาดโมเลกุลของแต่ละโปรตีน นำโปรตีนที่ผ่านการแยกแบบสองทิศทางที่อยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทยที่ทำการศึกษด้วยวิธีอิมมูโนมิกส์ โดยทำ 2DE-IgE immunoblotting สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นคือ โปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับไอจีอี (IgE) ในซีรัมของผู้ป่วย แล้วนำไปจำแนกชนิดโดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) ในการศึกษาพบ โปรตีนจากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ที่ทำปฏิกิริยากับไอจีอี 22 จุด เมื่อส่งไปจำแนกชนิดพบโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของไรฝุ่นคือ Der p 1 และ Der p 2 และสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่มีรายงานแล้ว ได้แก่ Der p 3, Der p 11 และ Der p 14 ส่วนสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิดใหม่ที่ค้นพบ คือ myosin heavy chain และ Triosephosphate Isomerase ดังนั้น ในการศึกษาปีที่ 2 ได้เลือกที่จะผลิตสารก่อภูมิแพ้หลักชนิด Der p 1 และ Der p 2 โดยใช้เทคนิค affinity column chromatography ในการผลิตสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ (native allergen) ส่วนสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นรีคอมบิแนนท์ โปรตีน (recombinant protein) ผลิตด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรม โดยคณะผู้วิจัยเลือกใช้ pET 20b⁺ vector เป็น protein expression vector และพบว่า รีคอมบิแนนท์ โปรตีน ที่ผลิตได้อยู่ในส่วนที่เป็นสารละลายตามที่ต้องการ ผลจากการตรวจสอบลักษณะรูปแบบของโปรตีนและ amino acid sequencing สรุปได้ว่า สารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์ โปรตีนที่ผลิตได้เป็น Der p 1 และ Der p 2 จริง โดยมีขนาดโมเลกุลเป็น 24 และ 16 กิโลดัลตัน ตามลำดับใกล้เคียงกับผลการศึกษาที่เคยมีรายงานไว้

การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติและรีคอมบิแนนท์ โปรตีน ที่ผลิตขึ้นมาด้วยวิธี IgE-ELISA พบว่า IgE binding activity ของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นตามธรรมชาติ Der p 1 และ Der p 2 คิดเป็น 96.67% และ 83.33% ตาม ลำดับ แสดงว่าสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นตามธรรมชาติ Der p 1 และ Der p 2 ที่ผลิตได้เป็น สารก่อภูมิแพ้หลัก แต่สารก่อภูมิแพ้ recombinant Der p 1 ที่ผลิตได้เป็นสารก่อภูมิแพ้รอง เนื่องจากมี IgE binding activity เพียง 43.33% ขณะที่ IgE binding activity ของ recombinant Der p 2 ที่ผลิตได้คิดเป็น 73.33% จึงจัดเป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก

ในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยพบว่าการศึกษาสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ด้วยเทคนิคโปรตีนโอมิกส์ร่วมกับอิมมูโนมิกส์สามารถแยกโปรตีนได้ดีกว่า และสามารถทำการผลิตสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ชนิด Der p 1 และ Der p 2 ได้ทั้งที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ และรีคอมบิแนนท์โปรตีน และพบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น Der p 2 ที่ผลิตได้เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก จึงน่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นน้ำยาวินิจฉัยภาวะแพ้ไรฝุ่น และเป็นวัคซีนรักษาโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น ส่วนรีคอมบิแนนท์โปรตีนของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น Der p 1 สามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานของชุดทดสอบเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นชนิด Der p 1 ในฝุ่นบ้านด้วยวิธี sandwich ELISA ได้

Summary

House dust mites (HDM), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) and *D. farinae* (Df), have been accounted as major sources of indoor allergens causing type-1 allergic diseases with increasing incidence worldwide. Although extensive research on several attributes of the disease has been carried out, information on the molecular characteristics of the allergenic components of these mites is still limited. Complete knowledge on their allergenome will lead, not only to improvement of the accuracy of patients' screening and disease status monitoring, but also to appropriate immunotherapeutic vaccine design. Therefore, in this study, high-resolution two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)-based-proteomics, 2DE-IgE immunoblotting and database search were used to characterize the proteomes and allergenomes of the *D. pteronyssinus*.

Whole body extracts of 99% purity of *D. pteronyssinus* was subjected to a nonlinear pH 3-10 first dimensional electrophoresis followed by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel. 2DE-IgE immunoblotting was carried out using a pool of sera of Dp allergic Thai patients. The IgE-reactive proteins were excised from the 2DE-gel and analyzed by matching the peptide mass maps generated after mass spectrometry with the protein database. Twenty two IgE-binding protein spots of *D. pteronyssinus* were subjected to LC/MS for protein identification. Most protein spots were the major allergen namely Der p 1, and Der p 2 and established allergens such as Der p 3, Der p 11, Der p 14. The novel allergen discovered was myosin heavy chain and Triosephosphate Isomerase, which should be further study for IgE binding reactivity in allergic Thai patients. From the result of allergenomes of the *D. pteronyssinus*, therefore, the major allergen; Der p1 and Der p 2 in the forms native and recombinant protein were selected to produced by affinity column chromatography and genetic engineering, respectively.

In the process of production of recombinant Der p 1 and Der p 2; pET 20b⁺ vector was used as protein expression vector. The recombinant product was detected in soluble part of bacterial lysate as expected. From protein profiles and amino acid sequencing indicated that the generated proteins were Der p 1 and Der p 2 having molecular weight of 24 and 16 kDa, respectively.

The allergenicities of native and recombinant of Der p 1 and Der p 2 were compared by IgE-ELISA. IgE binding activities of native Der p 1 and Der p 2 were 96.67% and 83.33%, respectively. Thus, both produced native allergens were major allergen. Recombinant Der p 1 could bind to IgE only 43.33% of atopic patients' sera tested; indicated that this recombinant Der p 1 was minor allergen. Recombinant Der

p 2 was major allergen as it could elicit IgE reactivity in 73.33% of patients' sera tested.

In conclusion, the repertoire of *D. pteronyssinus* allergens was well defined by the high-resolution 2-D technique combined with IgE immunodetection as the 2-D map of *D. pteronyssinus* allergens. We successfully produced native and recombinant of *D. pteronyssinus* allergens namely Der p 1 and Der p 2. Recombinant Der p 2 was major allergen which might be developed for using as diagnostic and therapeutic allergen. While the recombinant Der p 1 would be applied for standard allergen in a diagnostic kit for determination Der p 1 level in the house dust by sandwich ELISA.