

ผลการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การวางแผนปฏิบัติการวิจัย

ดำเนินการทบทวนผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นบ้านเพื่อให้ทราบถึงสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิดต่างๆที่มีรายงานและตีพิมพ์แล้ว รวมถึงเทคนิควิธีการที่ใช้ในการจำแนก (identification) การศึกษาคุณสมบัติ (characterization) ของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น

ได้ประชุมนักวิจัยและผู้เกี่ยวข้องเพื่อชี้แจงขั้นตอนการทำงาน ร่วมกันวางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้นในการเก็บข้อมูล มอบหมายงาน การจัดเตรียมและจัดซื้อ น้ำยา สารเคมี สีนเปื้อน วัสดุ อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับห้องปฏิบัติการสำหรับการสกัดและการแยกโปรตีน ได้แก่ IPG strips & Tris buffer, Acrylamide/Bis solution, BSA, Ammonium persulfate, TEMED, Coomassie Blue stain, nitrocellulose membrane, Bradford reagent อุปกรณ์เครื่องแก้วและพลาสติก Centriprep, microtubes, dialysis bags, centrifuge tubes เป็นต้น เพื่อให้มีน้ำยา สารเคมี สีนเปื้อนและวัสดุ อุปกรณ์ต่างๆสำหรับห้องปฏิบัติการพร้อมใช้งานในการดำเนินงานวิจัย

กิจกรรมที่ 2 การเก็บชีรั่มเพื่อนำมาใช้ในการงานวิจัย

1. การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ โดยพิจารณาจากประวัติ อาการทางคลินิก และการทดสอบ skin test ต่อสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ตามเกณฑ์ข้อกำหนด เพื่อทำการเก็บชีรั่ม และนำมาใช้ในการดำเนินงานวิจัย

ผลการดำเนินงาน โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล (หมายเลข SI 224/2010) มีมติรับรองให้ดำเนินการได้ ทำการเก็บชีรั่มผู้เข้าร่วมโครงการที่มารับการตรวจรักษาที่ห้องตรวจโรคภูมิแพ้ ภาควิชาโสต นาสิก ลาริงซ์วิทยา และภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราชได้ทั้งหมด 60 รายโดยจัดผู้เข้าร่วมการวิจัยเข้ากลุ่ม

กลุ่มเป้าหมาย (skin prick test ให้ผลบวก) จำนวน 45 ราย

กลุ่มควบคุม (skin prick test ให้ผลลบ) จำนวน 15 ราย

2. การวิเคราะห์ specific IgE

ได้ส่งชีรั่มผู้เข้าร่วมโครงการทั้งหมด 60 รายไปตรวจหาค่า specific IgE level ที่หน่วยโรคภูมิแพ้ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล และได้ผลการตรวจวิเคราะห์มาเรียบร้อยแล้ว ดังแสดงผลในภาคผนวก (ตารางที่ 3.2 และ ตารางที่ 3.3)



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

หมายเลข Si 224/2010

ชื่อโครงการภาษาไทย : การศึกษานำร่องสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นบ้าน; *Dermatophagoides pteronyssinus* (D.p) และ *D. farinae* (D.f) ที่คนไทยแพ้ และการผลิตสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญ โดยพันธุวิศวกรรม

รหัสโครงการ : 662/2552(EC1)

หัวหน้าโครงการ / หน่วยงานที่สังกัด : รศ.ดร.พญ.อัญชลี ตั้งตรงจิตร / ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

สถานที่ทำวิจัย : คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

เอกสารที่รับรอง :

1. แบบเสนอโครงการวิจัยเพื่อขอรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
2. เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย
3. หนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย สำหรับผู้ใหญ่
4. หนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย สำหรับเด็ก
5. หนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย สำหรับผู้ปกครอง
6. แบบบันทึกข้อมูล
7. ประกาศรับอาสาสมัคร
8. ใบแจ้งผลการตรวจวิเคราะห์
9. ประวัติผู้วิจัย

วันที่รับรอง : 28 เมษายน 2553

วันหมดอายุ : 27 เมษายน 2554

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP).

ลงนาม
(ศาสตราจารย์แพทย์หญิงจริยา เลิศอรธรรมณี)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

30 เมษายน 2553

วันที่

ลงนาม
(ศาสตราจารย์คลินิกนายแพทย์ธีรวัฒน์ กุลทนันทน์)
คณบดี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

6 พฤษภาคม 2553

วันที่

Page 1 of 2

ตารางที่ 3.2 Characteristics of the 45 allergic patients.

Patient/ Code No.	Sex	Age (years)	Diagnosis	Skin prick test positive to crude extract of Dp. (whealxflare)	Specific IgE to Dp (KAU/L)
001	M	33	Allergic rhinitis	10x11/45x35	30.7
002	F	54	Anaphylaxis	7x8/20x12	0.53
003	M	43	ND	9x10/28x20	8.91
004	M	19	Allergic rhinitis	12x14/34x27	39.2
005	M	24	ND	7x9/25x17	1.19
006	F	63	Asthma	12x14/35x28	3.88
007	M	30	ND	8x20/34x25	42.1
008	F	60	ND	3x3/15x10	<0.35
009	M	32	ND	8x12/28x20	>100
010	F	41	ND	7x12/26x23	31.7
011	M	23	Early wheeze	9x13/39x30	59.8
012	M	23	Asthma	10x11/41x30	63.0
013	M	28	Allergic rhinitis	10x4/38x25	46.4
014	M	42	Allergic rhinitis	6x7/28x20	0.76
015	F	19	ND	10x11/42x35	10.4
016	F	46	Allergic rhinitis	4x5/17x15	0.70
017	F	23	Allergic rhinitis	6x7/23x18	0.38
018	F	27	Allergic rhinitis	7x12/35x27	>100
019	F	22	ND	4x5/20x18	0.42
020	F	20	ND	4x6/42x35	>100
021	M	39	ND	5x6/22x16	2.20
022	M	27	ND	4x4/15x12	0.59
023	M	44	Allergic rhinitis	4x4/14x10	<0.35
024	F	47	Allergic rhinitis	5x6/23x17	<0.35
025	F	36	Allergic rhinitis	7x8	<0.35

Abbreviation: D.f., *Dermatophagoides farinae*; D.p., *Dermatophagoides pteronyssinus*; F, Female; KAU/L, Kilo Allergy Unit/Liter; M, Male; ND, No Data; P, Patient.

ตารางที่ 3.2 Characteristics of the 45 allergic patients. (ต่อ)

Patient/ Code No.	Sex	Age (years)	Diagnosis	Skin prick test positive to crude extract of Dp (wheal/flare)	Specific IgE to Dp (KAU/L)
026	M	33	Allergic rhinitis	5x5/50x35	0.37
027	F	54	ND	3x3/30x12	<0.35
028	M	43	ND	15x14/35x30	59.4
029	M	19	Allergic rhinitis	60x40/90x70	21.8
030	M	24	Allergic rhinitis	5x5/35x25	3.49
031	F	63	Asthma	4x3/20x17	1.56
032	M	30	Allergic rhinitis	7x5/20x20	0.53
033	F	60	ND	10x10/50x45	1.61
034	M	12	Allergic rhinitis	8x7/17x20	17.4
035	F	41	ND	12x7/40x25	10.8
036	M	13	wheezing	4x4/35x30	14.8
037	M	23	Asthma	20x18/67x50	7.87
038	M	28	Allergic rhinitis	4x3/24x22	<0.35
039	M	42	Allergic rhinitis	7x5/20x18	<0.35
040	F	19	ND	5x5/22x20	<0.35
041	F	46	Allergic rhinitis	4x3/20x16	<0.35
042	F	23	Allergic rhinitis	12x10/45x35	6.17
043	F	27	Allergic rhinitis	4x3/24x22	<0.35
044	F	22	ND	4x3/15x10	0.37
045	F	20	ND	5x5/50x35	<0.35

Abbreviation: D.f., *Dermatophagoides farinae*; D.p., *Dermatophagoides pteronyssinus*; F, Female; KAU/L, Kilo Allergy Unit/Liter; M, Male; ND, No Data; P, Patient.

ตารางที่ 3.3 Characteristics of the 15 non allergic patients (normal controls).

Patient/ Code No.	Sex	Age (years)	Diagnosis	Skin prick test negative to crude extract of Dp.	Specific IgE to Dp (KAU/L)
101	M	21	ND	control	<0.35
102	M	22	ND	control	<0.35
103	F	33	Allergic rhinitis	control	0.71
104	M	22	ND	control	<0.35
105	F	12	ND	control	<0.35
106	M	15	thallasemia	control	0.49
107	M	52	hypertension	control	<0.35
108	M	21	ND	control	<0.35
109	M	26	ND	control	0.38
110	M	30	ND	control	<0.35
111	F	14	ND	control	<0.35
112	M	12	Allergic rhinitis	control	<0.35
113	F	11	Allergic rhinitis	control	<0.35
114	M	30	Thyroid nodule	control	0.42
115	F	29	ND	control	0.55

Abbreviation: D.f., *Dermatophagoides farinae*; D.p., *Dermatophagoides pteronyssinus*; F, Female; KAU/L, Kilo Allergy Unit/Liter; M, Male; ND, No Data; P, Patient.

กิจกรรมที่ 3 การสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่นบริสุทธ์สายพันธุ์ *D. pteronyssinus*

1. จัดหาไรฝุ่นบริสุทธ์สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ให้ได้ 99% pure mites เพื่อใช้ในการเตรียม crude extract นำไรฝุ่นบริสุทธ์สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการบดตัวไรฝุ่นบริสุทธ์ด้วยตัวบด (tissue grinding) ในไนโตรเจนเหลว แล้ว solubilize โปรตีนใน lysis buffer ซึ่งมี proteinase inhibitors และไม่มี proteinase inhibitors เพื่อศึกษาเปรียบเทียบหาภาวะเหมาะสมว่าโปรตีนจากตัวไรฝุ่นที่สกัดได้จะใช้ในการวิจัยควรจะใช้ proteinase inhibitors หรือไม่ ต่อจากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่อง Ultra sonicator (Labsonic P, Sartorius, Germany) หลังจากนั้นทำการปั่นแยกกากเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำสารละลายใสส่วนบนมาทำการ dialysis ในสารละลาย starting buffer (0.01 M phosphate buffer, pH 7.0) เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

หมายเหตุ : Proteinase inhibitors ที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ complete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASY pack ผลิตโดยบริษัท Roache Applied Science ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มี proteinase inhibitors หลายชนิด นำมารวมกันแล้วทำเป็นเม็ด (inhibitor cocktail tablets) พร้อมใช้งาน และสะดวกในการใช้มากเพียงนำ tablet มาละลายในน้ำกลั่น และผสมส่วนผสมนี้ในสารละลาย lysis buffer ส่วนประกอบสำคัญ ได้แก่ serine, cysteine, and acidic proteases และ inhibitors อื่นๆ อีกหลายชนิดที่ไม่ได้ระบุรายละเอียด และบริษัทมีข้อมูลรับรองผลการใช้งาน เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้แพร่หลาย จากประสบการณ์ที่เคยใช้ผลิตภัณฑ์นี้ที่ผ่านมานับว่าได้ผลเป็นที่พอใจ จึงเลือกใช้ผลิตภัณฑ์นี้ในการศึกษานี้

2. ทำการวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ด้วยวิธี Bradford ได้สารสกัดจากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ที่ทราบปริมาณโปรตีน ซึ่งปริมาณโปรตีนของไรฝุ่นบริสุทธ์สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ในการสกัดแต่ละครั้งจะอยู่ในช่วง 3.00 - 6.5 µg/ml

กิจกรรมที่ 4 การศึกษาหาภาวะเหมาะสมในการแยกสารสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus*

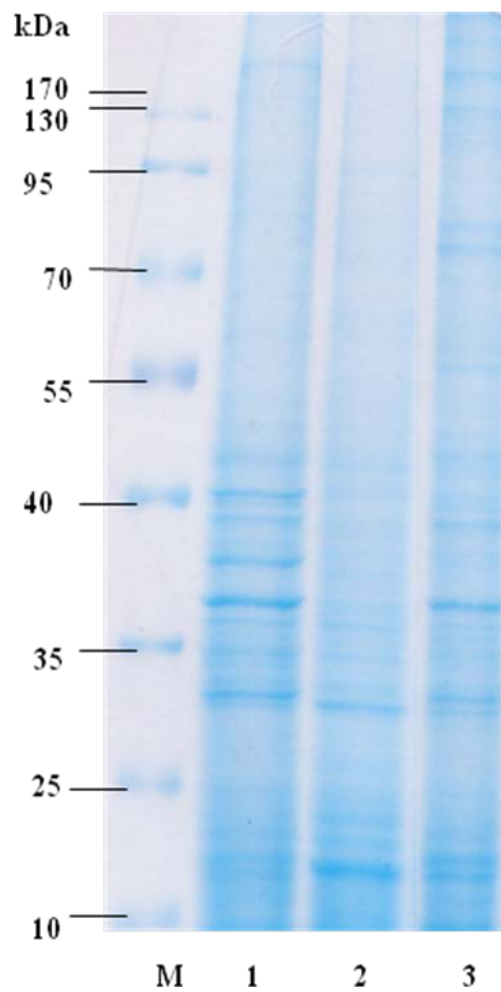
ในเบื้องต้นได้นำสารสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่นที่สกัดได้ข้างต้น (ซึ่งใช้ proteinase inhibitors และไม่ใช่ proteinase inhibitors) มาทำการแยกแบบทิศทางเดียวด้วยวิธี SDS-PAGE โดยมีความหลากหลายของ percentage of acrylamide gel ที่ใช้ตั้งแต่ 8% และ 12% รวมทั้งการมีความแตกต่างของปริมาณโปรตีนจากตัวไรฝุ่นที่สกัดได้ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น 5 µg, 7.5 µg และ 10 µg เพื่อศึกษาหาภาวะเหมาะสมในการนำมาทำการแยกสารสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่นข้างต้นแบบสองทิศทางด้วยวิธี two dimensional gel electrophoresis (2DE)

ผลการดำเนินงาน ในการศึกษาหาภาวะเหมาะสมในการแยกสารสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่น โดยทำการแยกแบบทิศทางเดียวด้วยวิธี SDS-PAGE นั้นพบว่า ควรใส่ proteinase inhibitors ในขั้นตอนการสารสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่น แต่เนื่องจากสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่สามารถแยกได้เกือบ 20 ชนิดนั้น บางชนิดเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น enzyme เช่น Cysteine protease, Collagenolytic serine protease และ Glutathione S-transferase เป็นต้น ซึ่ง enzyme เหล่านี้อาจไปย่อยโปรตีนหรือสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นอื่นๆ ทำให้สูญเสียโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นบางชนิดไปได้ การใส่ proteinase inhibitors ย่อมมีผลไปยังยับยั้งขบวนการย่อยสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นอื่นๆ ได้ ในการศึกษา (รูปที่ 3.4) พบว่าการใส่ proteinase inhibitors ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนให้ผลที่ดีกว่าการไม่ใส่ proteinase inhibitors (รูปที่ 3.5) แต่อย่างไรก็ตาม ในการตรวจหาโปรตีนที่สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นนั้น ต้องนำสารสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่นมาทำปฏิกิริยากับ antibody (IgE) ในซีรัมของผู้ป่วย การใส่ proteinase inhibitors นั้นก็อาจมีผลต่อสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นบางชนิดที่เป็น enzyme เหล่านั้นได้ โดยอาจไปยังยับยั้งการทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้ ดังนั้น ในการศึกษา เพื่อป้องกันการสูญเสียโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นทุกชนิด ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนจึงจะทำการสกัดทั้งแบบที่ใส่ proteinase inhibitors และแบบที่ไม่ใส่ proteinase inhibitors ทั้งสองภาวะจะทำการสกัดโปรตีนในภาวะที่มีความเย็นทุกขั้นตอน เพื่อลดการสลายตัวของโปรตีน โดยเฉพาะในการสกัดแบบที่ไม่ใส่ proteinase inhibitors และใช้สารสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่นที่เตรียมทันที (freshly prepared crude extract)

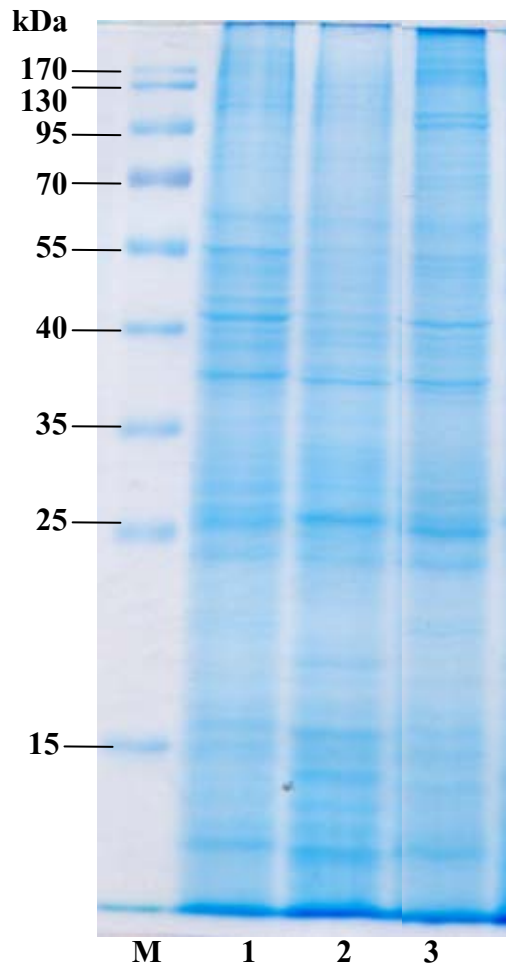
สำหรับ percentage of acrylamide gel ที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่นแบบสองทิศทางนั้นพบว่า 12.5% ให้ผลที่ดีกว่า (รูปที่ 3.4 และ 3.5) และเมื่อทำการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมในการทำ electrophoresis ที่จะใช้การทดลองได้ใช้ปริมาณโปรตีน 5 µg, 7.5 µg และ 10 µg จากตัวไรฝุ่นที่สกัดได้ พบว่า 5 µg และ 7.5 µg (รูปที่ 3.6 และ 3.7) ก็สามารถให้ผลการทดลองที่ดีได้เช่นเดียวกับปริมาณโปรตีน 10 µg ในการศึกษา จึงเลือกใช้ปริมาณโปรตีนที่ 6 µg เพราะสามารถประหยัด allergen ได้

ในเบื้องต้นจะทำ Immunoblot analysis ก่อน โดยหลังจาก transfer โปรตีนลงบนแผ่น membrane แล้วนำแผ่น membrane ที่ blot ด้วยโปรตีนไว้แล้วไปทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยแต่ละรายและ pooled serum ของกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุม เพื่อตรวจหาโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น (ที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น) โดยคัดเลือกซีรัมของผู้ป่วย 5 รายที่มีค่า specific IgE (>0.35 kUA/L) เพื่อหากลุ่มโปรตีนเป้าหมายว่าอยู่ในช่วงใด รูปที่ 3.8 เป็น

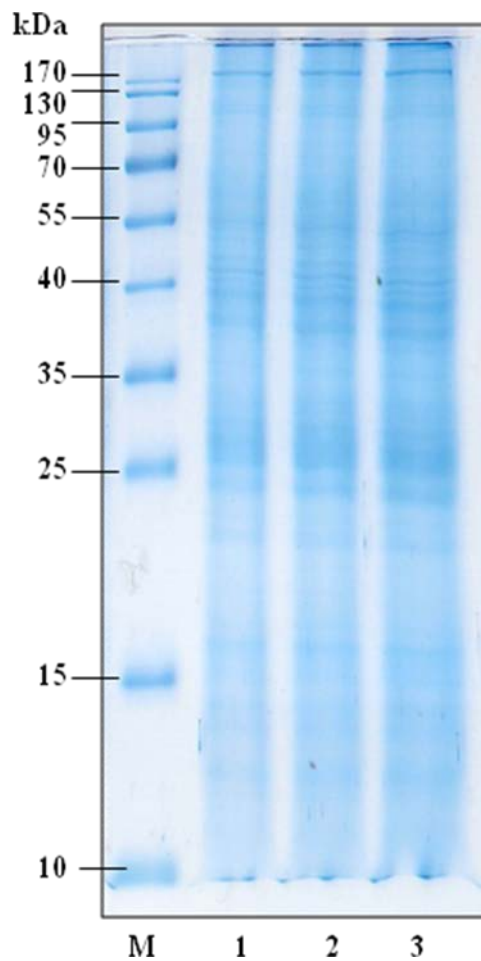
Immunoblot analysis พบว่า reactive band หลายช่วง แสดงว่า โปรตีนเป้าหมายมีหลายกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลหลายช่วง และในกลุ่มควบคุมไม่พบ reactive band ตามที่ควรจะเป็น ซึ่งจะดำเนินการวิเคราะห์ละเอียดต่อไปด้วยวิธี Two Dimensional Gel Electrophoresis (2DE) และ 2 DE-IgE immunoblotting ต่อไป



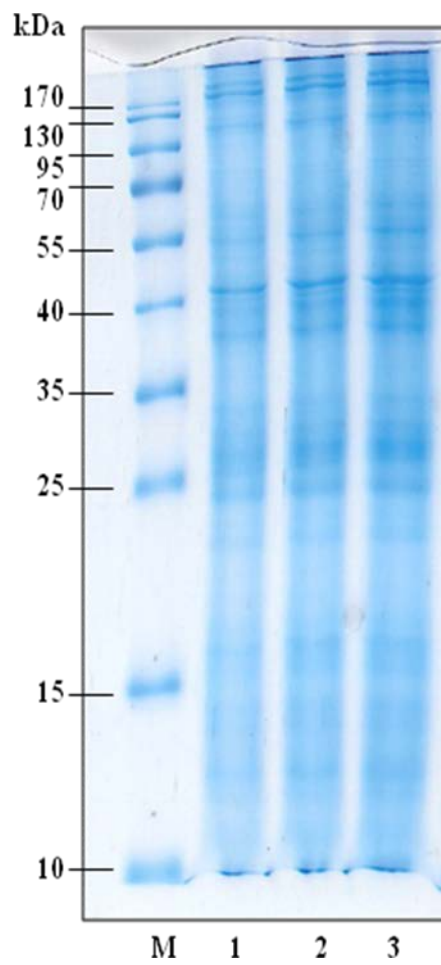
รูปที่ 3.4 Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE analysis of 10 μ g of crude extract of *D. pteronyssinus* from 8% separating gel. Lanes M: molecular weight markers, Lane 1: freshly prepared crude extract of *D. pteronyssinus* with using protease inhibitor. Lane 2: freshly prepared crude extract of *D. pteronyssinus* without using protease inhibitor. Lane 3: preserved crude extract of *D. pteronyssinus*.



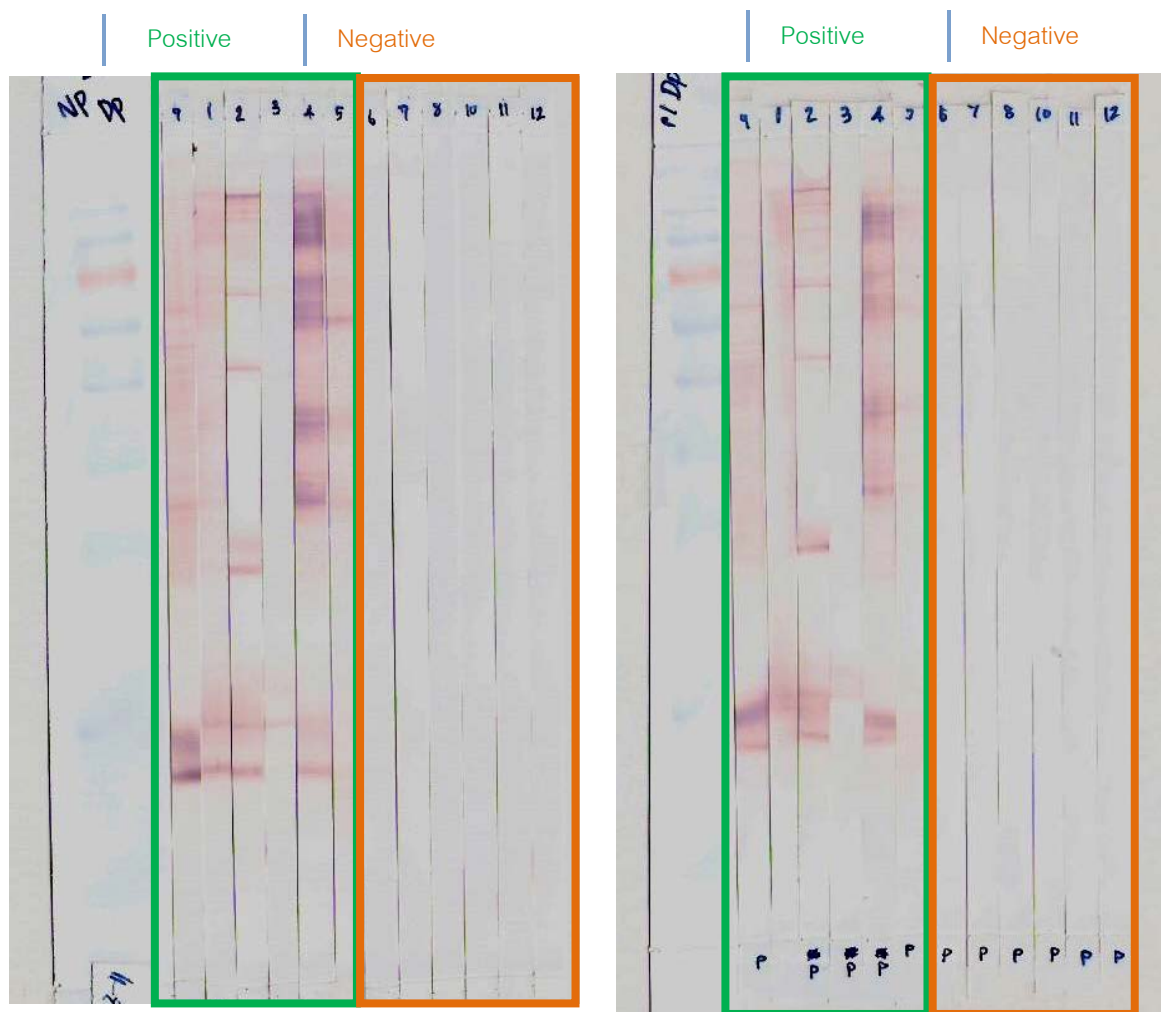
รูปที่ 3.5 Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE analysis of 10 μ g of crude extract of *D. pteronyssinus* from 12% separating gel. Lanes M: molecular weight markers, Lane 1: freshly prepared crude extract of *D. pteronyssinus* with using protease inhibitor. Lane 2: freshly prepared crude extract of *D. pteronyssinus* without using protease inhibitor. Lane 3: preserved crude extract of *D. pteronyssinus*.



รูปที่ 3.6 Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE analysis of various amount of crude extract of *D. pteronyssinus* without using protease inhibitor from 12% separating gel. Lane M: molecular weight markers, Lane 1-3: 5 μ g, 7.5 μ g, 10 μ g of protein in extract used, respectively



รูปที่ 3.7 Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE analysis of various amount of crude extract of *D. pteronyssinus* with using protease inhibitor from 12% separating gel. Lane M: molecular weight markers, Lane 1-3: 5 μ g, 7.5 μ g, 10 μ g of protein in extract used, respectively



(A)

(B)

รูปที่ 3.8 Immunoblot patterns of crude extract of *D. pteronyssinus* using protease inhibitor (A) and without using protease inhibitor (B) from 12.5% separating gel showing reactive component with antibodies of allergic patients compare with those of normal controls. Lanes 1-4 & 9: allergic patients, Lanes 6: pooled serum allergic patients while Lanes 6-8, 10-12: normal control.

กิจกรรมที่ 5 การศึกษาหาสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นด้วยวิธี 2DE Gel Electrophoresis และ 2 DE-IgE immunoblotting

นำโปรตีนจากสารสกัดหยาบจากตัวไรฝุ่นบริสุทธ์สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ที่ผ่านการแยกแบบสองทิศทางในช่วง pH range กว้าง (3-10) จากเจลสองแผ่นแรกมาด้วยสีย้อมโปรตีน silver stain (รูปที่ 3.9 A) และสี Coomassie Brilliant Blue (รูปที่ 3.9 B) เพื่อให้เห็น protein spots จะเห็นได้ว่า มีจุดโปรตีนที่น่าจะเป็นสารก่อภูมิแพ้ในช่วงต่างๆ แต่จะระบุได้ว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้จะต้องเป็นโปรตีนที่ปฏิกิริยากับ IgE ใน serum ของผู้ป่วย ดังนั้น โปรตีนจากสารสกัดหยาบจากตัวไรฝุ่นบริสุทธ์สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ในเจลแผ่นที่ 3 & 4 นำมา transfer โปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose membrane นำแผ่น membrane ที่ blot ด้วยโปรตีนไว้แล้วไปทำปฏิกิริยากับ pooled serum ของผู้ป่วย (กลุ่มเป้าหมาย, รูปที่ 3.10 A) และ pooled serum ของกลุ่มควบคุม (normal control, รูปที่ 3.10 B) แล้วตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ใน pooled serum ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ไม่พบในกลุ่มควบคุม

ผลที่ได้จากกิจกรรมนี้จะเห็นว่า แผ่น membrane ที่ blot ด้วยโปรตีนไว้แล้วไปทำปฏิกิริยากับ pooled serum ของผู้ป่วย (กลุ่มเป้าหมาย) มีจุดโปรตีนมากกว่า ในแผ่น membrane ที่ blot ด้วยโปรตีนไว้แล้วไปทำปฏิกิริยากับ pooled serum ของกลุ่มควบคุม (normal control) แต่เนื่องจากในช่วง pH range 3-10 เป็นช่วงกว้างจึงต้องดำเนินการวิเคราะห์ซ้ำให้ละเอียดขึ้นโดยทำการแยกโปรตีนในช่วง pH range ต่างๆ กันต่อไป เพื่อให้ได้ผลการทดลองดีขึ้น

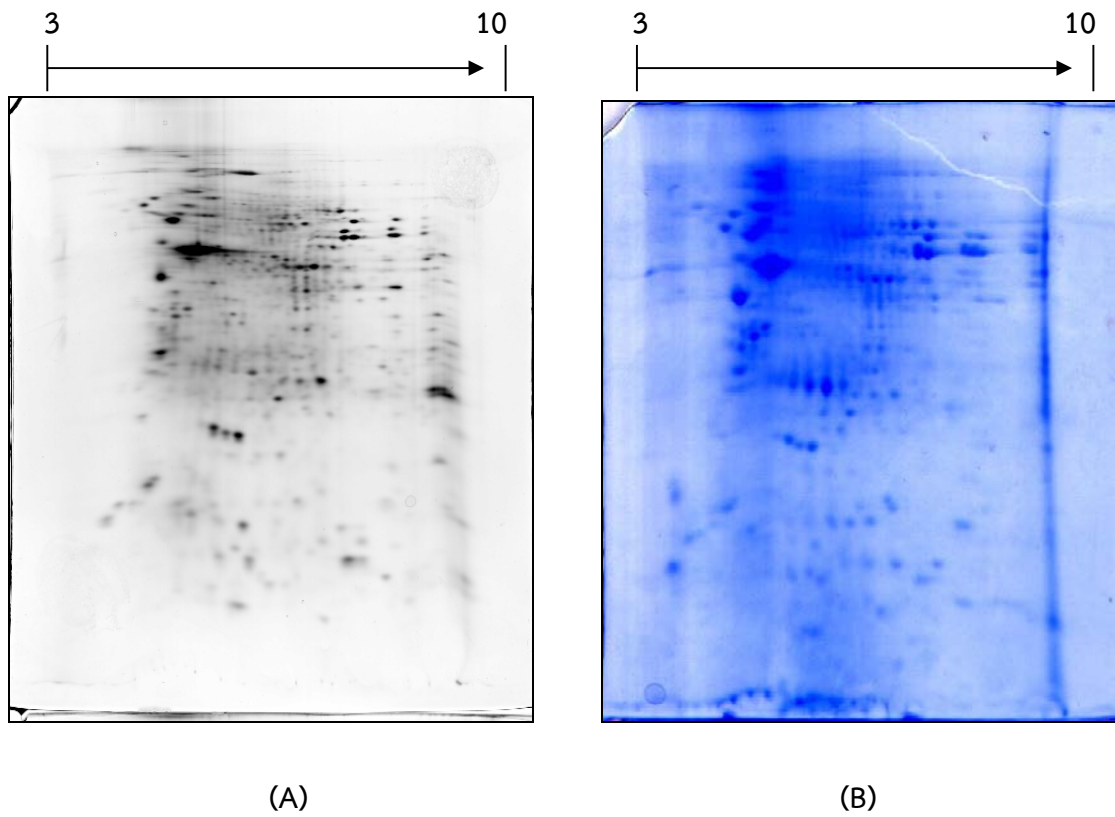
จากรูปที่ 3.11 เป็นภาพรวมของการวิเคราะห์หาจุดโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ใน pooled serum ของกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทยที่ทำการศึกษเปรียบเทียบกับจุดโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ใน pooled serum ของกลุ่มควบคุม เพื่อคัดเลือกหาจุดโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ที่ไม่พบในกลุ่มควบคุม และได้ศึกษารายละเอียดของแต่ละ pH range แยกเป็น pH range 5.0-6.5, 6.2-7.5 และ 7.0-11.

ในรูปที่ 3.12 เป็นการแยกโปรตีนในช่วง pH range 5.0-6.5 พบว่า จุดโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ที่ไม่พบในกลุ่มควบคุมที่คัดเลือก เพื่อนำไปจำแนกชนิด (identify) โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectro-metry) มีจำนวน 7 จุด (No. 1-7) ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับแผนที่สายโปรตีน (peptide mass maps) ในแฟ้มข้อมูล (database) แล้ว โปรตีนนี้คือ Myosin heavy chain, Paramyosin allergen [*Blomia tropicalis*], Paramyosin allergen [*B. tropicalis*], Paramyosin allergen [*B. tropicalis*], Group 14 allergen protein [*D. pteronyssinus*], A Chain A, Crystal structure of the major house dust mite allergen Der P 1 และ Glutathione transferase mu class Dp7019C10 [*D. p*] ดังแสดงในตารางที่ 3.4

การแยกโปรตีนในช่วง pH range 6.2-7.5 แสดงผลในรูปที่ 3.13 พบว่า จุดโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ที่ไม่พบในกลุ่มควบคุมที่คัดเลือก เพื่อนำไปจำแนกชนิด (identify) โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectro-metry) มีจำนวน 5 จุด (No. 8-12) ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับแผนที่สายโปรตีน (peptide mass maps) ในแฟ้มข้อมูล (database) แล้ว โปรตีนนี้คือ glutathione transferase delta-like Dp7018E11 [*D. p*], glutathione transferase delta-like Dp7018E11 [*D. p*] beta-galactosidase [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)] –new, Triosephosphate

Isomerase (E.C.5.3.1.1) Mutant With 15 Residues (68 - 82) Replaced By 8 Residues, 0905238A keratin subunit, epidermal, B Chain B, Porcine E-Trypsin (E.C.3.4.21.4) ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ซึ่งจุดโปรตีน No. 10-12 นั้นน่าจะเป็นการปนเปื้อนมากกว่า

การแยกโปรตีนในช่วง pH range 7-11 แสดงผลในรูปที่ 3.14 พบว่า จุดโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ที่ไม่พบในกลุ่มควบคุมที่คัดเลือก เพื่อนำไปจำแนกชนิด (identify) โดยวิธีแมสสเปคโตรเมตรี (mass spectrometry) มีจำนวน 10 จุด (No. 13-22) ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับแผนที่สายโปรตีน (peptide mass maps) ในแฟ้มข้อมูล (database) แล้ว โปรตีนเหล่านี้ส่วนใหญ่คือ keratin หรือ epidermal ดังแสดงในตารางที่ 3.4 ซึ่งจุดโปรตีน No. 13-22 นั้นน่าจะเป็นการปนเปื้อนมากกว่า



รูปที่ 3.9 2-DE maps of soluble proteins from crude extract of *D. pteronyssinus* at the pH 3-10, NL stained by silver (A) and Coomassie Brilliant Blue (B).