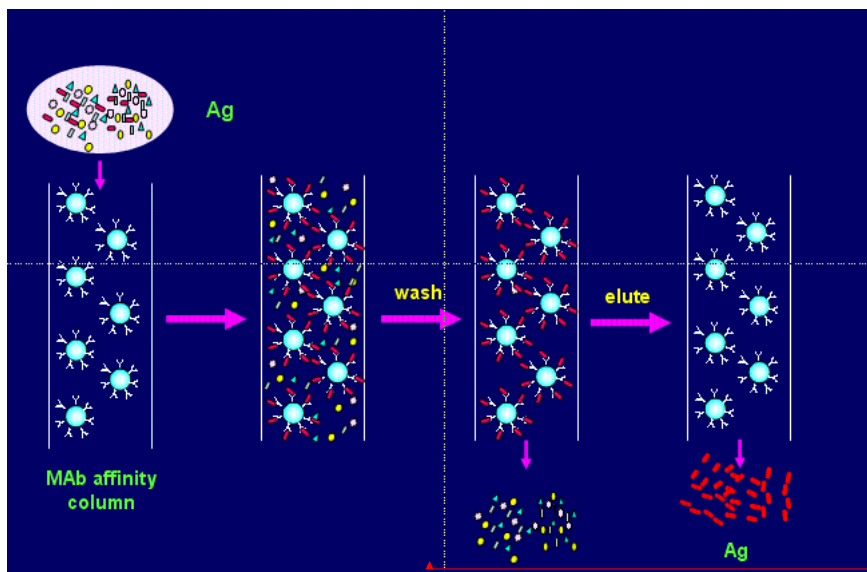


กิจกรรมที่ 6 การคัดเลือกชนิดของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่จะผลิต

ในปีที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ร่วมกับอิมมูโนมิกส์ ได้พบโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของไรฝุ่น จึงได้ทำการคัดเลือกโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) ที่สำคัญที่จะศึกษาต่อคือ Der p 1 และ Der p 2 โดยจะทำการผลิตทั้งที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ (native allergen) ได้แก่ native Der p 1 (nDer p 1) และ native Der p 2 (nDer p 2) และรีคอมบิแนนท์ โปรตีน (recombinant protein) ได้แก่ recombinant Der p 1 (rDer p 1) และ recombinant Der p 2 (rDer p 2)



ที่จัดรูปแบบ: ระยะห่างของท้ายกระดาษจากขอบ: 1.52 ซม.

ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: อัดโนมัติ, ไม่เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่เน้น

รูปที่ 3.2011 การ Purify native protein โดยใช้เทคนิค affinity column chromatography

ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: อัดโนมัติ, ไม่เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่เน้น

ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: อัดโนมัติ, ไม่เน้น

กิจกรรมที่ 7 การผลิตสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติของไรฝุ่นชนิด Der p 1 และ Der p 2 (native Der p 1 & Der p 2)

ผู้วิจัยได้สกัดสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติของไรฝุ่นจากตัวไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค affinity column chromatography (รูปที่ 3.2012) โดยทำการเตรียมสารสกัดหยาบจากตัวไรฝุ่น (crude extract) ตามขั้นตอนดังที่กล่าวมาแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในขั้นตอนการ purify สารก่อภูมิแพ้ต่อไป

ทำการเตรียม affinity column โดยการนำ CNBr-activated Sepharose 4B resin ผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิด Der p 1 และ Der p 2 (ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา) ผสมแบบ end over end บนเครื่อง Test-tube-rotator (Snijders scientific, Holland) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

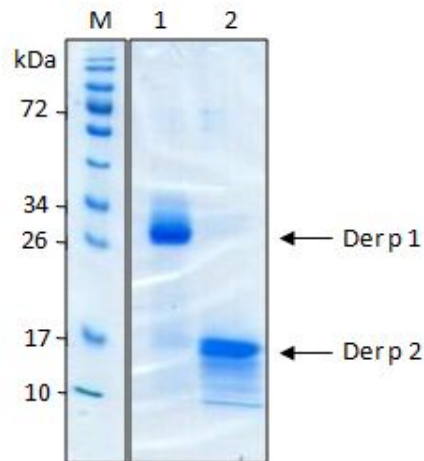
ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: อัดโนมัติ, ไม่เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่เน้น

ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: อัดโนมัติ, ไม่เน้น

ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้โมโนโคลนัลแอนติบอดีจับบน resin ทำการล้าง unbound โปรตีนออก และ re-equilibrated ในสารละลาย starting buffer

การผลิตสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติของไรฝุ่นชนิด Der p 1 และ Der p 2 โดยการนำสารสกัดหยาบจากไรฝุ่น (crude extract) มาผสมกับ CNBr-activated Sepharose 4B linked with MAb แบบ end over end บนเครื่อง Test-tube-rotator (Snijders scientific, Holland) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C —เพื่อให้สารสกัดจากไรฝุ่น (crude extract) จับกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่อยู่บน resin —ทำการล้าง—unbound โปรตีนออกจนหมด นำไปบรรจุใน affinity column เพื่อทำการชะ (elute) สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิด Der p 1 และ Der p 2 ออกมา ได้เป็นสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติของไรฝุ่นชนิด Der p 1 และ Der p 2 ตามที่ต้องการ ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า native Der p 1 & native Der p 2



รูปที่ 3.21+2 SDS-PAGE-separated purify Der p1 (lane 1) and Der p2 (lane 2) allergens

ผลการทดลอง

เก็บสารละลาย (soluble fraction) ที่ผ่านการชะ (elute) ออกมาจาก affinity column ซึ่งคือ native Der p 1 & native Der p 2 ไปตรวจสอบว่าเป็น native Der p 1 & native Der p 2 จริง โดยใช้วิธี SDS-PAGE ดังแสดงผลในรูปที่ 3.21+2 โปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 26 kDa และ 17 kDa ตามลำดับ แสดงว่า โปรตีนที่ purify ได้นี้ เป็น native Der p 1 & native Der p 2 จริงตามที่ต้องการ

ที่จัดรูปแบบ: การเยื้อง: บรรทัดแรก: 1.27 ซม.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: อัตโนมัติ, ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: อัตโนมัติ, ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา

กิจกรรมที่ 8 การผลิตสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นที่เป็นรีคอมบิแนนท์ โปรตีนชนิด Der p 1 และ Der p 2 (recombinant Der p 1 & Der p 2)

8.1 การออกแบบและสังเคราะห์ oligonucleotide primers สำหรับ amplify ยีนของสารก่อภูมิแพ้ที่คัดเลือก

การผลิตสารก่อภูมิแพ้ชนิด Der p 1 และ Der p 2 ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม เริ่มต้นจากคณะผู้วิจัยได้ออกแบบ oligonucleotide primers สำหรับ genes ที่ encode Der p 1 and Der p 2 gene ดังแสดงในตารางที่ 3.52.2 ซึ่งผู้วิจัยพบว่า Der p 1 gene จะมีขนาดประมาณ 963 bp (full length) และ Der p 2 gene มีขนาดประมาณ 438 bp (full length)

ตารางที่ 3.52.2 แสดง oligonucleotide primers สำหรับการ amplify Der p 1 and Der p 2 gene ในการศึกษาค้นคว้า

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'-3')
Forward Der p 1 F-EcoRV	5'-CGG ATA TCA TGA AAA TTG TTT TGG CCA T-3'
Reverse Der p 1 R-XhoI	5'-CGC TCG AGG AGA ATG ACA ACA TAT GGA T-3'
Forward Der p 2 F-EcoRV	5'-CGG ATA TCA TGT ACA AAA TTT TGT GTC T-3'
Reverse Der p 2 R-XhoI	5'-CGC TCG AGT TAA TCG CGG ATT TTA GCA T-3'

8.2 การสกัด Total RNA จากไผ่ฝุ่น และเตรียม first stand cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR

คณะผู้วิจัยได้สกัด Total RNA จากไผ่ฝุ่นที่เพาะเลี้ยงไว้ โดยใช้ RNA extraction kit (Flavogen) ตามคำแนะนำในคู่มือที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา ตามรายละเอียดดังนี้ ซึ่งไผ่ฝุ่นบริสุทธิ์ (99%) สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ปริมาณ 0.25 กรัม ผสมกับ Trizol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติมน้ำ Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ย้ายส่วน supernatant ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ แล้วเติมน้ำ isopropyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใส (supernatant) ทิ้ง แล้วเติมน้ำ 75% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใส (supernatant) ทิ้ง และทิ้งไว้ให้แห้ง เติมน้ำ DEPC water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex total RNA จะอยู่ในส่วนน้ำใสในหลอดทดลอง ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เมื่อพบว่า total RNA มีคุณภาพดีตามต้องการ จึงนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา Revert AidTM H Minus First Strand

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: การเยื้อง: ซ้าย: 0.32 ซม., หน้าลอย: 0.95 ซม., แท็บหยุด: 1.27 ซม., ซ้าย + ไม่ที่: 1.5 ซม. + 2.25 ซม.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ตารางที่จัดรูปแบบแล้ว

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 5 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 5 พ.

cDNA synthesis (Fermentas) ซึ่งประกอบด้วยการเตรียม PCR mixture และ Thermal cycles ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนการทำ cDNA ด้วย RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit

1. Oligo primer 1 μ l
2. Template RNA 3.78 μ l
3. DEPC water 7.22 μ l

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาทีแล้วเติมสารเคมีเพิ่มเติม ดังนี้

4. 5x reaction buffer ————— 4 μ l
5. RiboLock™ RNase inhibitor ——— 1 μ l
- ~~6.~~ 10 mM dNTP ————— 2 μ l
- ~~6.~~
7. H Minus M-MuLr Reverse Transcriptase ——— 1 μ l

ที่จัดรูปแบบ: แท็บหยุด: 8.25 ซม., ซ้าย

นำส่วนประกอบดังกล่าวไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที ผู้วิจัยจึงนำ cDNA ที่เตรียมขึ้นไปใช้ในการ amplify Der p 1 and Der p 2 gene ต่อไป

8.3 ทำการศึกษา PCR conditions ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณ gene(s)

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ gene(s) ผู้วิจัยได้ใช้ gradient PCR เพื่อหาอุณหภูมิสำหรับ annealing ที่เหมาะสมที่สุด ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ของแต่ละ gene ประกอบด้วยการเตรียม PCR mixture และ Thermal cycles ดังต่อไปนี้

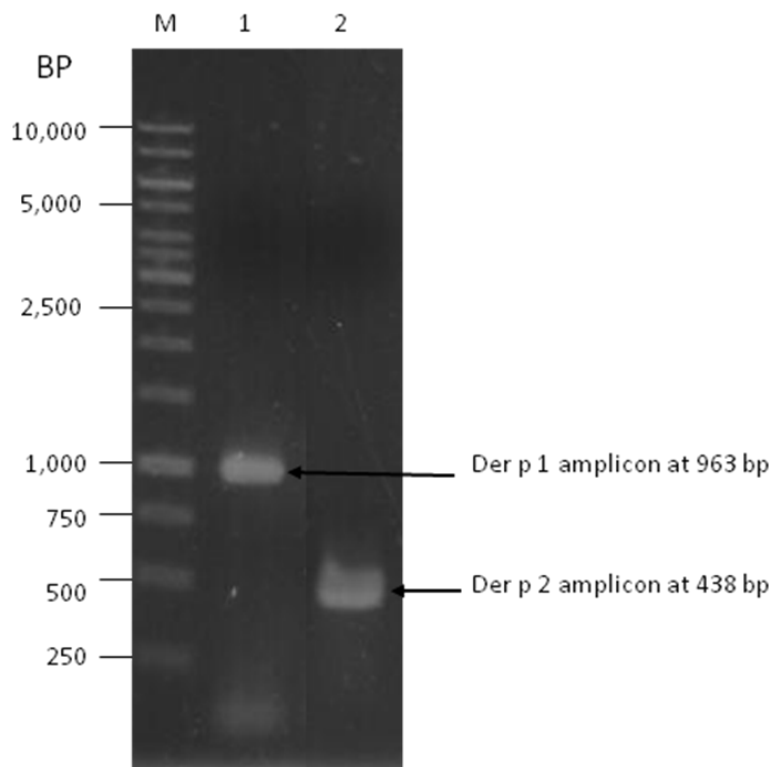
A. PCR mixture (25 µl)		
Ingredient	Volume (µl)	Final concentration
Sterile ultra-pure distilled water (UDW)	16.8	-
10x PCR buffer	2.5	1x
25 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
2.5 mM dNTP (each)	2.0	0.2 mM
Primer F (20 µM)	0.5	0.4 µM
Primer R (20 µM)	0.5	0.4 µM
cDNA	1.0	-
DNA polymerase (5 units / µl)	0.2	1 unit

B. Thermal cycles		
First Denaturation	at 94°C for 4 minutes	
30 Cycles of Denaturation,	at 94°C for 30 seconds	
Annealing,	at 50°C - 60°C for 30 seconds	
Extension	at 72°C for 40 seconds	
Final Extension	at 72°C for 7 minutes	

ผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ—Annealing ที่ให้ PCR amplicons มากที่สุด ผลจากการทดสอบพบว่า ที่อุณหภูมิ 50°C สามารถเพิ่มปริมาณ Der p 1 and Der p 2 gene ได้สูงสุด ดังแสดงผลในรูปที่ 3.214

- ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา
- ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่
- ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่
- ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น
- ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่
- ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา



รูปที่ 3.224 PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ Der p 1 and Der p 2 -coding sequence

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder
 Lane 1, Der p 1 gene amplicon
 Lane 2, Der p 2 gene amplicon

วิเคราะห์โดย 1% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (BP)

ลูกศรชี้ Der p 1 and Der p 2 gene amplicon ที่ขนาด Dp1 963 bp, Dp2 438 bp

ที่จัดรูปแบบ: ไม่เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ช่าย, การเยื้อง: หน้าลอย: 1.9 ซม.

ที่จัดรูปแบบ: ช่าย

8.4 การ clone เข้าสู่ cloning vector และทำการตรวจสอบความถูกต้องของ gene sequence(s) แล้วจึง clone gene(s) ดังกล่าวเข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม

การ clone Der p 1 and Der p 2 gene amplicon เข้าสู่ cloning vector และนำ recombinant vector เข้าสู่ *E. coli* host เพื่อเก็บเป็น gene stock มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

การ clone เข้าสู่ pGem-T Easy Vector

นำ amplified DNA ที่ได้จากกิจกรรมที่ 5 มาเชื่อมต่อกับ cloning vector (pGem-T easy vector) โดยใช้เอนไซม์ ligase และ incubated ที่ 4°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง ได้เป็น ligation mixture

การเตรียม Competent *E. coli* host cells

นำ Culture *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน LB broth 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชม. แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 600 nm ให้ค่า OD อยู่ในช่วง 0.2 – 0.4 นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการ resuspension ด้วย 0.1M MgCl₂ 5 มิลลิลิตรแล้วนำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที จึงปั่นตกตะกอนเซลล์อีกครั้งที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำซ้ำขั้นตอน resuspension อีกครั้ง ได้ competent *E. coli* host cells นำ ligation mixture ไป transformed เข้าสู่ competent *E. coli* host cells โดยใช้วิธี heat shock transformation จากนั้นนำ transformed *E. coli* preparation ไป spread บน selective agar plate (LB agar ที่เติม ampicillin) และ incubated ที่ 37°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

Screened หา transformed *E. coli* clones ที่ carry recombinant plasmid ที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ Der p 1 and Der p 2 gene พบว่า transformed *E. coli* ที่เลือกมา มี genes เป้าหมายทุก clones

จากนั้นสกัด recombinant plasmid ออกจาก transformed *E. coli* clone โดยวิธี alkaline lysis และตรวจลำดับ nucleotides ด้วยการทำ DNA sequencing ทั้งนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของ PCR amplified-DNA sequence ว่าเป็น sequences ของ gene เป้าหมายจริง คือ Der p 1 and Der p 2 gene (รูปที่ 3.235)

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 8 พ., แบบ
อักษรภาษาที่ซับซ้อน: 8 พ.

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา,
แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา,
แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

(A)

ACTAACGCCTGCAGTATCAATGGAATGCTCCAGCTGAAATCGATTTGCGACAAATGCGAACTGTCACT
 T N A C S I N G N A P A E I D L R Q M R T V T
 CCCATTTCGTATGCAAGGAGGCTGTGGTTCATGTTGGGCTTTCCCTGGTGTGCGCAACTGAATCAGCT
 P I R M Q G G C G S C W A F P G V A A T E S A
 TATTTGGCTTACCGTAATCAATCATTGGATCTTGCTGAACAAGAATTAGTCGATTGTGCTTCCCAACAC
 Y L A Y R N Q S L D L A E Q E L V D C A S Q H
 GGTGTGTCATGGTGATACCATTCACGTGGTATTGAATACATCCAACATAATGGTGTGTCGTCCAAGAAAGC
 G C H G D T I P R G I E Y I Q H N G V V Q E S
 TACTATCGATACGTTGCACGAGAACAATCATGCCGACGACCAATGCACAACGTTTCGGTATCTCAAAAC
 Y Y R Y V A R E Q S C R R P N A Q R F G I S N
 TATTGCCAAATTTACCCACCAAATGCAAAACAAAATTCGTGAAGCTTTGGCTCAAACCCACAGCGCTATT
 Y C Q I Y P P N A N K I R E A L A Q T H S A I
 GCCGTCATTATTGGCATCAAAGATTTAGACGCATTCCGTCATTATGATGGCCGAACAATCATTCAACGC
 A V I I G I K D L D A F R H Y D G R T I I Q R
 GATAATGGTTACCAACCAAACTATCACGCTGTCAACATTGTTGGTTACAGTAACGCACAAGGTGTGCGAT
 D N G Y Q P N Y H A V N I V G Y S N A Q G V D
 TATTGGATCGTACGAAACAGTTGGGATACCAATTGGGGTGATAATGGTTACGGTTATTTTGCTGCCAAC
 Y W I V R N S W D T N W G D N G Y G Y F A A N
 ATCGATTTGATGATGATTGAAGAATATCCATATGTTGTCATTCTC
 I D L M M I E E Y P Y V V I L

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

(B)

ATGTACAAATTTTGTGTCTTTCATTGTTGGTTCGACGCCGTTGCTGCTGATCAAGTCGATGTCAAAGAT
 M Y K I L C L S L L V A A V A A D Q V D V K D
 TGTGCCAATCATGAAATCAAAAAAGTTTTGGTACCAGGATGCCATGGTTCAGAACCATGTATCATTCAT
 C A N H E I K K V L V P G C H G S E P C I I H
 CGTGGTAAACCATTCGAATTGGAAGCTTTATTCGAAGCCAATCAAACTCAAAAACAGCTAAAATTGAA
 R G K P F Q L E A L F E A N Q N S K T A K I E
 ATCAAAGCTTCAATCGATGGTTTAGAAGTTGATGTTCCCGGTATCGATCCAAATGCATGCCATTATATG
 I K A S I D G L E V D V P G I D P N A C H Y M
 AAATGTCCATTGGTTAAAGGACAACAATATGATATTAAATATACATGGAATGTTCCAAAAATTGCACCA
 K C P L V K G Q Q Y D I K Y T W N V P K I A P
 AAATCTGAAAATGTTGTCGTCAGTGTCAAAGTTTTGGGTGATAATGGTGTGTTTGGCCTGTGCTATTGCT
 K S E N V V V T V K V L G D N G V L A C A I A
 ACTCATGCTAAAATCCGCGAT
 T H A K I R D

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

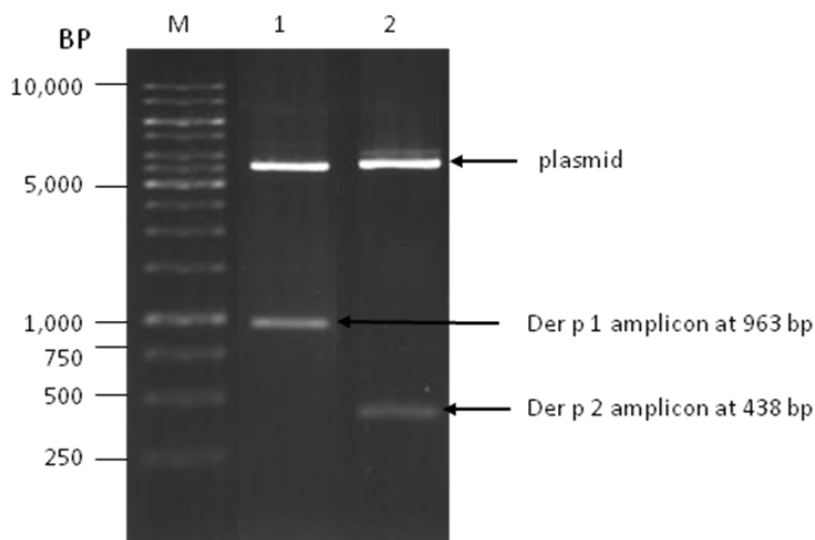
รูปที่ 3.235-แสดง Nucleotide and deduced amino acid sequences of Der p 1 (A)
 and Der p 2 (B) gene of this study

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ซ้าย, แท็บหยุด: 1.9 ซม.,
 ซ้าย

8.5 การ transfect *E. coli* ด้วย expression vector และคัดเลือก transformant(s) ที่เหมาะสม

นำ recombinant plasmid จาก transformed *E. coli* clone ที่เลือกได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ XhoI (สำหรับ Der p 1 plasmid) และใช้เอนไซม์ EcoRV และ XhoI (สำหรับ Der p 2 plasmid) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonucleases) ทำการ subclone เข้าสู่ pET 20b⁺ vector (protein expression vector) (รูปที่ 3.246) จากนั้นนำ recombinant plasmids ไปใส่ใน competent *E. coli* (สายพันธุ์ -BL21(DE3)) หลังจากนั้นเลือก *E. coli* transformants ที่เหมาะสม นำไปเพาะเลี้ยงแล้วทำการ induced ให้สร้างโปรตีนเป้าหมายต่อไป (รูปที่ 3.257)



รูปที่ 3.246 Recombinant plasmid ที่สกัดจาก transformed *E. coli* clone ที่ carry gene coding for Der p 1 and Der p 2 หลังตัดด้วย restriction endonucleases วิเคราะห์โดย run amplified products ใน 1 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lane 1, 2 DNA ของ plasmid (band บน) และ Der p 1 and Der p 2 gene insert (band ล่าง)

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

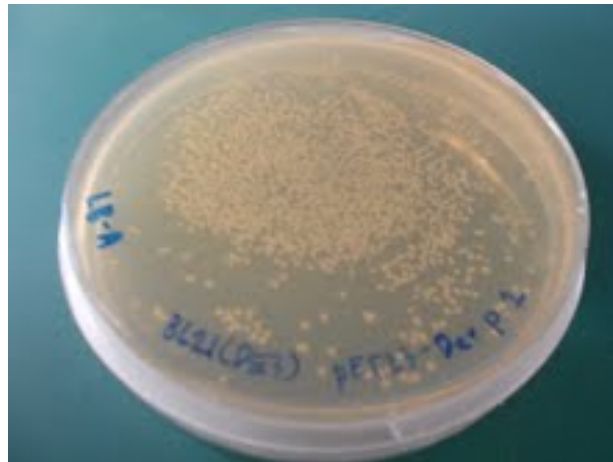
ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

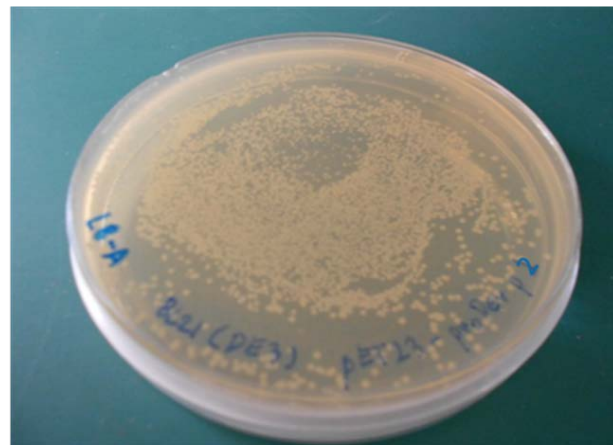
ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา, ไม่

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น



A



B

รูปที่ 3.257 — แสดงผลการนำ recombinant plasmid ที่คัดเลือกได้ว่ามี Der p 1 (A) and Der p 2 (B) เข้าสู่ protein expression host, i.e. BL21DE3 *E. coli*

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: การเยื้อง: หนาลอย: 1.75 ซม., แท็บหยุด: 1.27 ซม., ซ้าย

8.6 การ Transformation เข้า *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

การเตรียม Competent *E.coli* host cells

Culture *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) 150 ไมโครลิตร ลงใน LB broth 10 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชม. นำไปวัดค่า OD ที่ 600 nm ให้ค่าอยู่ในช่วง 0.2 – 0.4 ปั่นตกเซลล์ที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C Resuspend ด้วย 0.1M MgCl₂ 5 ml แช่น้ำแข็ง นาน 30 นาที ปั่นตกเซลล์อีกครั้งที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C Resuspend ด้วย 0.1M CaCl₂ 1 ml แช่น้ำแข็งนาน 30 นาที

การ Transformation

Competent cell 100 ไมโครลิตร+ plasmid DNA 2.5 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็ง 20 นาที โดยใช้วิธี heat shock transformation ที่ 42°C จากนั้นนำ transformed *E. coli* cell ทั้งหมดไปเลี้ยงใน LB broth ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชม. และปั่นตกเซลล์ที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำไป spread บน selective agar plate (LB agar ที่เติม ampicillin) และ incubated ที่ 37°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

จากการ transformation ได้ตรวจสอบ transformed *E. coli* clone ที่ carry gene coding for Der p 1 ทั้งหมด 6 clones และ *E. coli* clone ที่ carry gene coding for Der p 2 ทั้งหมด 9 clones พบว่าเมื่อคณะผู้วิจัยได้นำไปตรวจสอบ Der p 1 และ Der p 2 plasmid ใน transformed *E. coli* clone ที่เลือกมานั้นด้วยวิธี PCR และ agarose gel electrophoresis พบ Der p 1 plasmid ใน transformed *E. coli* clone จำนวน 5 clones (Clone No.1-5) และ Der p 2 plasmid ใน transformed *E. coli* clone 7 clones (Clone No. 7-9 และ Clone No.11-14-) ดังแสดงผลใน-รูปที่ 3.268

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 8 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 8 พ.

ที่จัดรูปแบบ: การเยื้อง: บรรทัดแรก: 1.25 ซม.

ที่จัดรูปแบบ: การเยื้อง: บรรทัดแรก: 1.27 ซม.

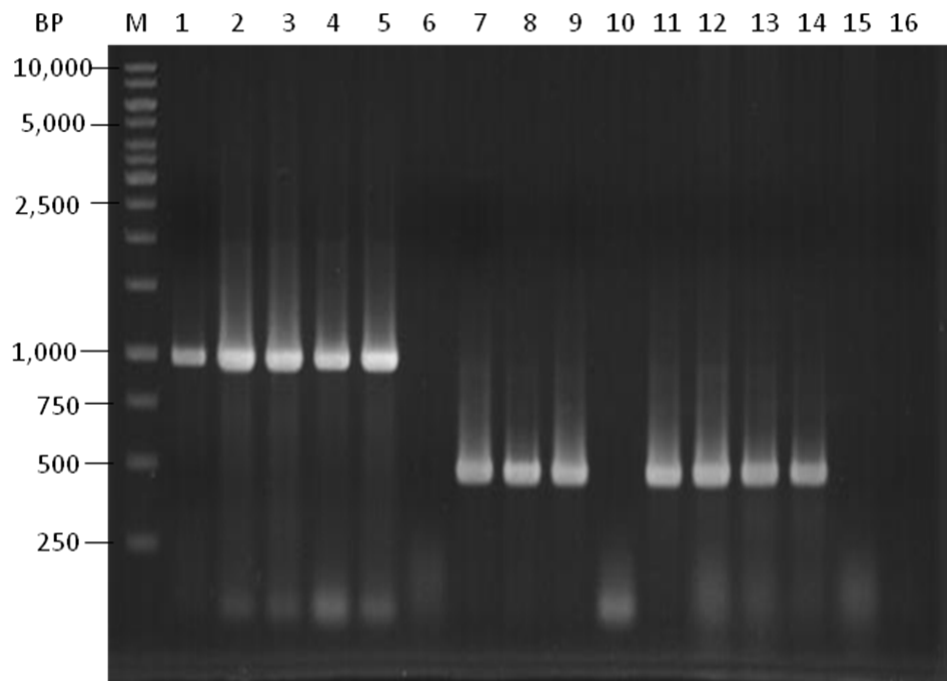
ที่จัดรูปแบบ: การเยื้อง: บรรทัดแรก: 1.27 ซม.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา



รูปที่ 3.268 Recombinant plasmid ที่สกัดจาก transformed *E. coli* clone ที่ carry gene coding for Der p 1 and Der p 2 วิเคราะห์โดย run amplified products ใน 1 % agarose gel electrophoresis และ ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lanes 1-6, Der p 1 DNA of transformed Der p 1 plasmid in *E. coli* BL21

Lanes 7-15, Der p 2 DNA of transformed Der p 2 plasmid in *E. coli* BL21

Lane 16, Negative control

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: การเยื้อง: ซ้าย: 0.32 ซม.,
หน้าลอย: 0.63 ซม.

8.7 กิจกรรมที่ 8 – ทำการ express protein(s) จาก transformant(s) และทำการ purify โปรตีน (recombinant allergen[s])

ที่จัดรูปแบบ: นอร์เวย์ (บ็อกมัล)

Induce การผลิต recombinant Der p 1 และ Der p 2 protein ใน *E. coli* host

ที่จัดรูปแบบ: นอร์เวย์ (บ็อกมัล)

ในการเตรียม recombinant Der p 1 และ Der p 2 protein คณะผู้วิจัยได้นำ *E. coli* clone ซึ่ง carry recombinant protein expression vector ซึ่งมี recombinant gene insert ไปเพาะเลี้ยงใน medium ที่เหมาะสมซึ่งมียาปฏิชีวนะผสมอยู่แล้ว incubated with shaking ที่ 37°C จนได้ log phase ของ *E. coli* culture จากนั้นเติม IPTG ลงไปเพื่อกระตุ้น *E. coli* cells ให้เกิดการ express โปรตีนที่ต้องการ ทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* cells ต่อไปอีก 4 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ *E. coli* cells โดยการทำการปั่นที่ความเร็วรอบ 4,000 x g เป็นเวลา 20 นาที

สกัด recombinant Der p 1 และ Der p 2 protein ออกจาก whole cell homogenate ของ *E. coli* cells

นำ *E. coli* pellet ของ Der p 1 และ Der p 2 protein ที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง ultrasonic disintegrator ซึ่งจะเรียก preparation ที่ได้ว่า *E. coli* homogenate จากนั้นนำ *E. coli* homogenate ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 20 นาที นำโปรตีนที่ได้ทั้งสองส่วน (soluble & insoluble fraction) ไปตรวจสอบหา recombinant protein โดยใช้วิธี SDS-PAGE ดังแสดงผลในรูปที่ 3.279 และ 3.284 ตามลำดับ

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

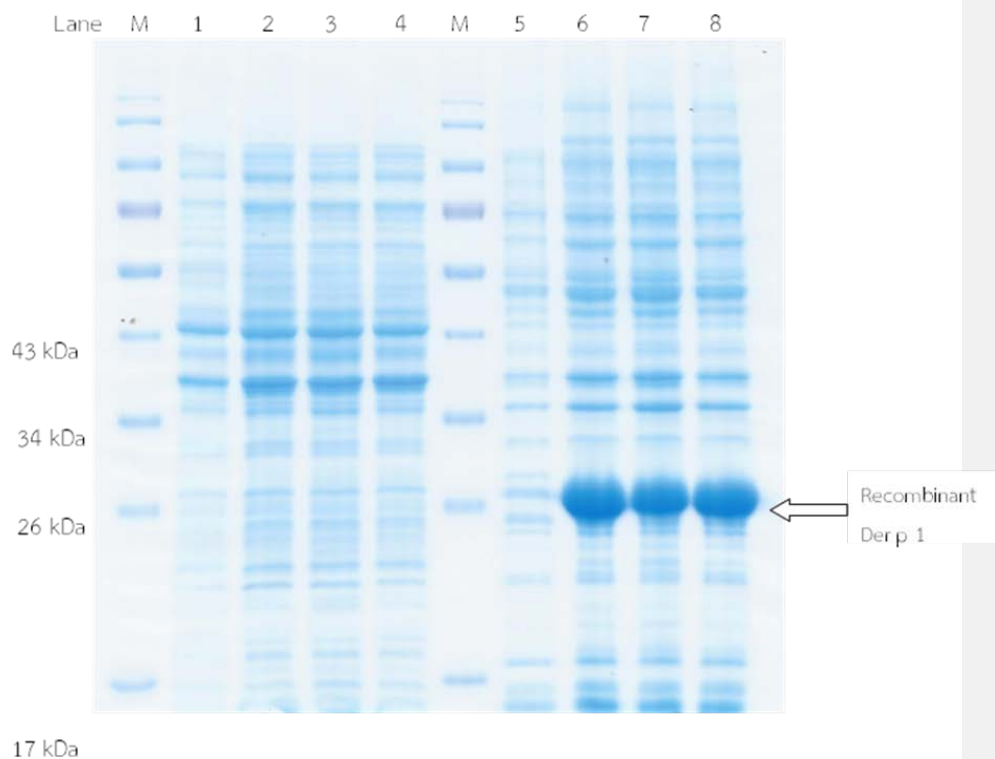
ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

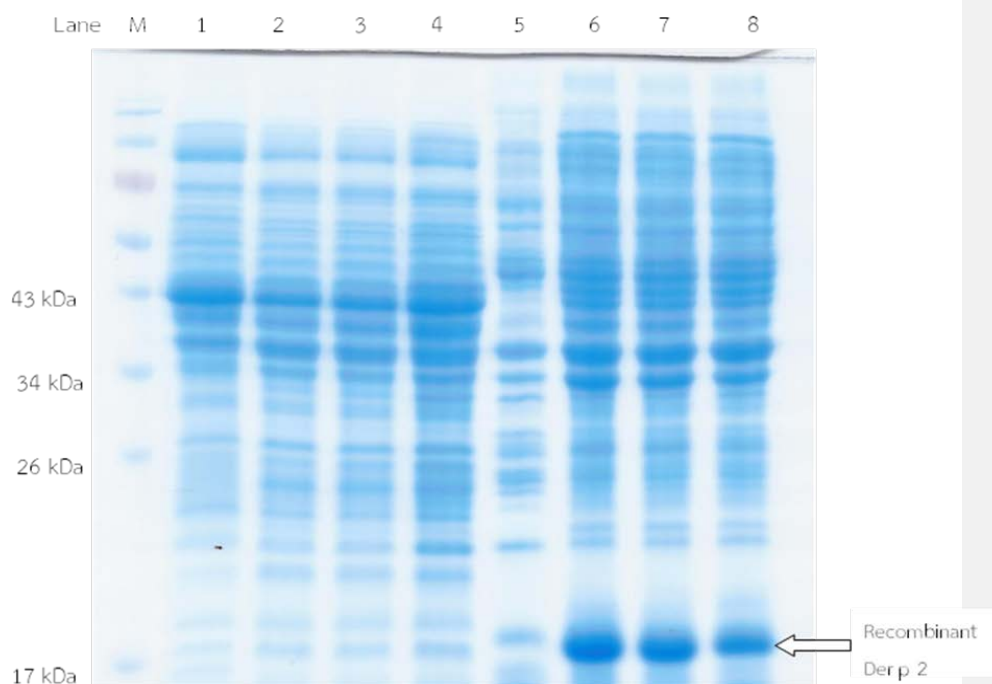
ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ไม่ ตัวหนา



รูปที่ 3.279- SDS-PAGE pattern ของ Recombinant Der p 1 allergen expression

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

- Lane M: Prestrained Protein Ladder
- Lane 1: Soluble fraction of BL21(DE3) containing pET23b+
- Lane 2: Soluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 1 clone 1
- Lane 3: Soluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 1 clone 2
- Lane 4: Soluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 1 clone 3
- Lane 5: Insoluble fraction of BL21(DE3) containing pET23b+
- Lane 6: Insoluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 1 clone 1
- Lane 7: Insoluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 1 clone 2
- Lane 8: Insoluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 1 clone 3



รูปที่ 3.28+0 SDS-PAGE pattern ของ Recombinant Der p 2 allergen expression

Lane M: Prestrained Protein Ladder

Lane 1-: Soluble fraction of BL21(DE3) containing pET23b+

Lane 2-: Soluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 2 clone 1

Lane 3-: Soluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 2 clone 2

Lane 4-: Soluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 2 clone 3

Lane 5-: Insoluble fraction of BL21(DE3) containing pET23b+

Lane 6-: Insoluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 2 clone 1

Lane 7-: Insoluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 2 clone 2

Lane 8-: Insoluble fraction of BL21(DE3) containing pET23-Der p 2 clone 3

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

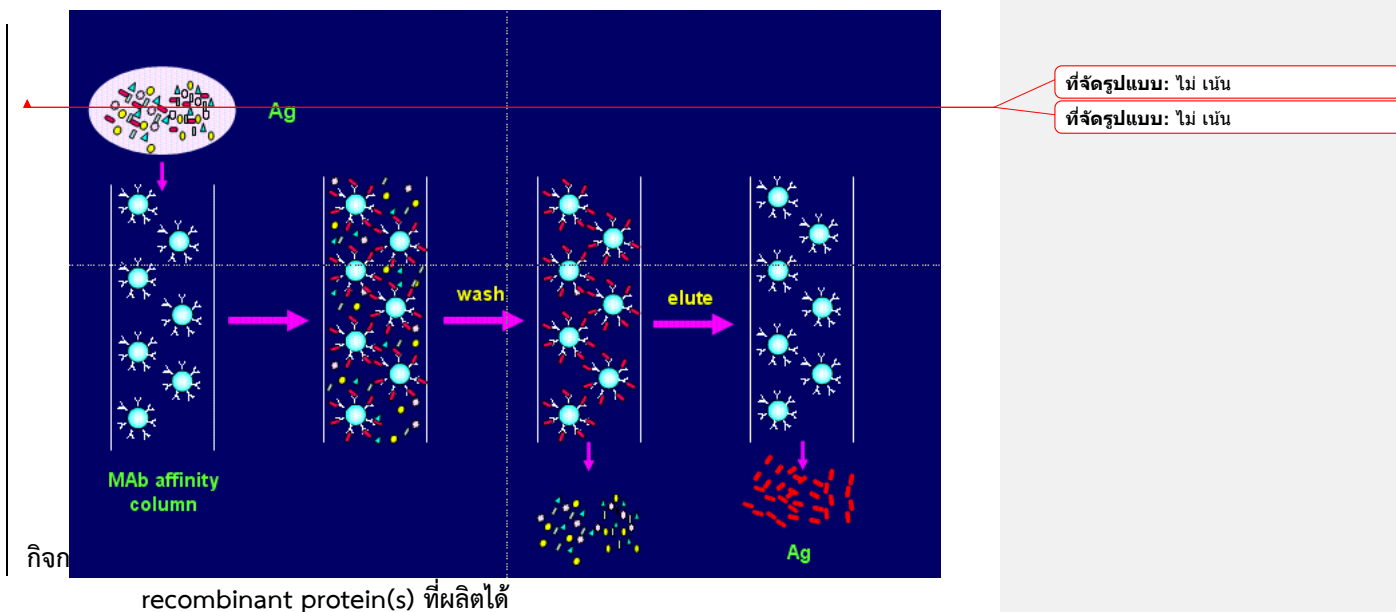
8.8 การ Purify recombinant protein ออกจาก *E. coli* homogenate โดยใช้ affinity resin

ผู้วิจัยทำการ purify recombinant Der p 1 และ Der p 2 protein โดยใช้ affinity resin และสามารถ purify recombinant Der p 1 และ Der p 2 protein ซึ่งมีขนาดประมาณ 26 kDa และ 17 kDa ตามลำดับ

ที่จัดรูปแบบ: การเยื้อง: บรรทัดแรก: 0.32 ซม.

ที่จัดรูปแบบ: การเยื้อง: ซ้าย: 0.32 ซม.,
หน้าลอย: 0.63 ซม.

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น



นำ native และ recombinant protein(s) คือ ~~native~~-Der p 1, ~~recombinant~~-Der p 1, ~~native~~-Der p 2 และ ~~recombinant~~-Der p 2 ที่ผลิตได้ไป ทำการทดสอบความเป็นสารก่อภูมิแพ้ ด้วยวิธี IgE-ELISA โดยการทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น (กลุ่มเป้าหมาย) และกลุ่มควบคุม (normal control) แต่ละราย โดยมีขั้นตอนการทำ IgE-ELISA ดังนี้

วิธีการตรวจหา IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ Der p 1 and Der p 2 ที่ผลิตได้ในซีรัม

1. เคลือบสารสกัดภูมิแพ้ (native และ recombinant Der p 1 & Der P 2 ที่ผลิตได้) ลงในหลุมทดลอง 100 ไมโครลิตร (ปริมาณสารสกัดภูมิแพ้ 0.5 ไมโครกรัมต่อหลุมทดลอง) บ่มในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง โดยทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง (triplicate)
2. ล้างหลุมทดลองด้วย 0.05% Tween PBS buffer (PBS-T) หลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง
3. เติม 2% BSA-PBS-T หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ล้างหลุมทดลองด้วย 0.05% Tween PBS buffer (PBS-T) หลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง
5. เติมตัวอย่างลงในหลุมทดลอง หลุมละ 100 ไมโครลิตร ดังนี้
 - 5.1 ตัวอย่างซีรัมที่ต้องการทดสอบ : เจือจางตัวอย่างซีรัมที่ทำการทดลองอัตราส่วน 1 ต่อ 4 (ซีรัม 1 ส่วนผสมกับ 1% BSA-PBS-T 3 ส่วน)
 - 5.2 ตัวควบคุมผลบวก (Positive control) : โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารสกัดภูมิแพ้ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- 5.3 ตัวควบคุมผลลบ (Negative control) : 1% BSA-PBS-T แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. ล้างหลุมทดลองด้วย 0.05% Tween PBS buffer (PBS-T) หลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง
7. เติมสารละลายเจือจางของ Biotin Conjugated Goat anti-Human IgE (1:500) ลงในหลุมตัวอย่างและตัวควบคุมผลลบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร
เติมสารละลายเจือจางของ Biotin Conjugated Goat anti-Mouse Ig (1:1000) ลงในหลุมตัวควบคุมผลบวก หลุมละ 100 ไมโครลิตร
และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
8. ล้างหลุมทดลองด้วย 0.05% Tween PBS buffer (PBS-T) หลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง
9. เติมสารละลายเจือจางของ Streptavidin-AP (1:2000) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
10. ล้างหลุมทดลองด้วย 0.05% Tween PBS buffer (PBS-T) หลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง
11. เติมสารละลายซับสเตรต (5X Substrate solution 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 4 มิลลิลิตรและเติม PNPP Tablet 1 เม็ด ละลายให้เข้ากัน) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที (ถึง 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะเกิดสี)
12. อ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร (ค่าอ้างอิง 630 นาโนเมตร)

บันทึกผลของค่า Optical density (OD) ในแต่ละหลุม แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยของ OD ในแต่ละราย แล้วจึงนำค่าเฉลี่ยของ OD ในแต่ละราย มาหาค่าเฉลี่ยกลาง (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) เพื่อใช้คำนวณหาค่า cut off ต่อไป โดยค่า OD ของ mean+2SD ที่อ่านได้ของกลุ่มควบคุม เป็นค่า cut off ใช้ในการแยกระหว่างกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุม

ผลการทดลอง

ในการศึกษาหาความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ ~~native~~-Der p 1 ที่ผลิตได้ คำนวณได้ค่า cut off (mean+ 2SD) สำหรับสารก่อภูมิแพ้ ~~native~~-Der p 1 ที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.215 หลังจากตัด cut off แล้ว พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะภูมิแพ้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจากการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนัง (skin prick test ให้ผลบวกกับสารสกัดหยาบจากไรฝุ่น [crude extract of house dust mite]) จำนวน 30 ราย ให้ผลบวกกับ ~~native~~-Der p 1 ที่ผลิตได้จำนวน 29 ราย คิดเป็น 96.67% (ดังแสดงใน-ตารางที่ 3.652.3) แสดงว่า สารก่อภูมิแพ้ ~~native~~-Der p 1 ที่ผลิตได้จัดเป็น-สารก่อภูมิแพ้หลัก-(major allergen) ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทยที่ทำการทดสอบ เพราะมีค่า IgE binding activity มากกว่า 50% ของกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ทำการทดสอบ

ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: น้ำเงิน
ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: น้ำเงิน, ไม่
ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: น้ำเงิน, ไม่
ที่จัดรูปแบบ: สีแบบอักษร: น้ำเงิน

ในการศึกษาหาความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ recombinant-Der p 1 ที่ผลิตได้ คำนวณได้ค่า cut off (mean+2SD) สำหรับสารก่อภูมิแพ้ recombinant-Der p 1 ที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.125 หลังจากตัด cut off แล้ว พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะภูมิแพ้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจากการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนัง (skin prick test ให้ผลบวกกับสารสกัดหยาบจากไรฝุ่น [crude extract of house dust mite]) จำนวน 30 ราย ให้ผลบวกกับ recombinant-Der p 1 ที่ผลิตได้จำนวน 13 ราย คิดเป็น 43.33% (ดังแสดงในตารางที่ 3.762-4) แสดงว่า สารก่อภูมิแพ้ recombinant-Der p 1 ที่ผลิตได้ จัดเป็นสารก่อภูมิแพ้รอง (minor allergen) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทยที่ทำการทดสอบ และมีความเป็นสารก่อภูมิแพ้ต่ำกว่า native-Der p 1 ที่ผลิตได้

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ในการศึกษาหาความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ native-Der p 2 ที่ผลิตได้ คำนวณได้ค่า cut off (mean+ 2SD = 0.191) สำหรับสารก่อภูมิแพ้ ของ nDer p 2 ที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.191 หลังจากตัด cut off แล้ว พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะภูมิแพ้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจากการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนัง (skin prick test ให้ผลบวกกับสารสกัดหยาบจากไรฝุ่น [crude extract of house dust mite]) จำนวน 30 ราย ให้ผลบวกกับ native-Der p 2 ที่ผลิตได้จำนวน 25 ราย คิดเป็น 83.33% (ดังแสดงในตารางที่ 3.2.875) แสดงว่า สารก่อภูมิแพ้ nDer p 2 ที่ผลิตได้จัดเป็น สารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทยที่ทำการทดสอบ เพราะมีค่า IgE binding activity มากกว่า 50% ของกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ทำการทดสอบ

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ในการศึกษาหาความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ recombinant-Der p 2 ที่ผลิตได้ คำนวณได้ค่า cut off (mean+2SD) สำหรับสารก่อภูมิแพ้ recombinant-Der p 2 ที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.188 หลังจากตัด cut off แล้ว พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะภูมิแพ้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจากการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนัง (skin prick test ให้ผลบวกกับสารสกัดหยาบจากไรฝุ่น [crude extract of house dust mite]) จำนวน 30 ราย ให้ผลบวกกับ recombinant-Der p 2 ที่ผลิตได้จำนวน 22 ราย คิดเป็น 73.33% (ดังแสดงในตารางที่ 3.982-6) แสดงว่า สารก่อภูมิแพ้ recombinant-Der p 2 ที่ผลิตได้ จัดเป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทยที่ทำการทดสอบ -และมีความเป็นสารก่อภูมิแพ้ใกล้เคียงกับ native-Der p 2 ที่ผลิตได้

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: 10 พ., แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: 10 พ.

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

หมายเหตุ: - สารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) = สารก่อภูมิแพ้ที่เมื่อทำการทดสอบแล้วมากกว่า 50% ของกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการทดสอบมีการแพ้เกิดขึ้น
- สารก่อภูมิแพ้รอง (minor allergen) = สารก่อภูมิแพ้ที่เมื่อทำการทดสอบแล้วน้อยกว่า 50% ของกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการทดสอบมีการแพ้เกิดขึ้น

ที่จัดรูปแบบ: ช้าย

ตารางที่ 3.652.3 - Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ native Der p 1 ที่ผลิตได้

Case No.	OD1	OD2	OD3	Mean	Standard deviation	2 SD	Mean $\pm$ 2 SD
IgE binding activity of normal control (n=10)							
1	0.223	0.175	0.169	0.189	0.030	0.059	0.248
2	0.207	0.163	0.147	0.172	0.031	0.062	0.234
3	0.184	0.148	0.143	0.158	0.022	0.045	0.203
4	0.202	0.171	0.166	0.180	0.020	0.039	0.219
5	0.182	0.141	0.151	0.158	0.021	0.043	0.201
6	0.223	0.168	0.178	0.190	0.029	0.059	0.248
7	0.177	0.161	0.166	0.168	0.008	0.016	0.184
8	0.169	0.169	0.184	0.174	0.009	0.017	0.191
9	0.160	0.153	0.157	0.157	0.004	0.007	0.164
10	0.192	0.180	0.183	0.185	0.006	0.012	0.197
IgE binding activity of allergic cases (n=30)							
1	0.727	0.669	0.690	0.695	0.029	0.059	0.754
2	0.736	0.725	0.708	0.723	0.014	0.028	0.751
3	0.441	0.420	0.383	0.415	0.029	0.059	0.473
4	0.172	0.163	0.175	0.170	0.006	0.012	0.182
5	0.385	0.349	0.339	0.358	0.024	0.048	0.406
6	0.454	0.442	0.407	0.434	0.024	0.049	0.483
7	0.502	0.535	0.567	0.535	0.033	0.065	0.600
8	1.042	1.031	0.959	1.011	0.045	0.090	1.101
9	0.337	0.321	0.298	0.319	0.020	0.039	0.358
10	0.311	0.305	0.283	0.300	0.015	0.029	0.329
11	0.770	0.732	0.745	0.749	0.019	0.039	0.788
12	0.326	0.264	0.316	0.302	0.033	0.067	0.369
13	0.325	0.302	0.293	0.307	0.017	0.033	0.340
14	0.285	0.318	0.289	0.297	0.018	0.036	0.333

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ

ตารางที่ 3.652.3 Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ native Der p 1 ที่ผลิตได้ (ต่อ)

Case No.	OD1	OD2	OD3	Mean	Standard deviation	2 SD	Mean $\pm$ 2 SD
15	0.313	0.284	0.295	0.297	0.015	0.029	0.327
16	0.291	0.309	0.320	0.307	0.015	0.029	0.336
17	1.784	1.798	1.852	1.811	0.036	0.072	1.883
18	0.994	0.991	1.006	0.997	0.008	0.016	1.013
19	0.724	0.739	0.800	0.754	0.040	0.081	0.835
20	0.373	0.408	0.361	0.381	0.024	0.049	0.430
21	0.255	0.284	0.278	0.272	0.015	0.031	0.303
22	0.249	0.254	0.231	0.245	0.012	0.024	0.269
23	0.496	0.544	0.520	0.520	0.024	0.048	0.568
24	0.486	0.531	0.491	0.503	0.025	0.049	0.552
25	0.291	0.318	0.303	0.304	0.014	0.027	0.331
26	0.224	0.249	0.260	0.244	0.018	0.037	0.281
27	1.240	1.358	1.477	1.358	0.119	0.237	1.595
28	0.485	0.537	0.568	0.530	0.042	0.084	0.614
29	0.594	0.650	0.708	0.651	0.057	0.114	0.765
30	0.181	0.204	0.281	0.222	0.052	0.105	0.327
Positive control	1.420	1.464	1.652	1.512	0.123	0.246	1.758
Negative control (1% BSA)	0.081	0.080	0.079	0.080	0.001	0.002	0.082

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ชื่นชอบ: ตัวหนา

ตารางที่ ~~3.762-4~~ ^{3.762-4} Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ recombinant Der p 1 ที่ผลิตได้

Case No.	OD1	OD2	Mean	Standard deviation	2 SD	Mean + 2 SD
IgE binding activity of normal control (n=10)						
1	0.096	0.089	0.093	0.005	0.010	0.102
2	0.121	0.107	0.114	0.010	0.020	0.134
3	0.086	0.085	0.086	0.001	0.001	0.087
4	0.074	0.076	0.075	0.001	0.003	0.078
5	0.097	0.099	0.098	0.001	0.003	0.101
6	0.083	0.086	0.085	0.002	0.004	0.089
7	0.083	0.085	0.084	0.001	0.003	0.087
8	0.082	0.080	0.081	0.001	0.003	0.084
9	0.093	0.107	0.100	0.010	0.020	0.120
10	0.111	0.137	0.124	0.018	0.037	0.161
IgE binding activity of allergic cases (n=30)						
1	0.218	0.342	0.280	0.088	0.175	0.455
2	0.167	0.212	0.190	0.032	0.064	0.253
3	0.105	0.112	0.109	0.005	0.010	0.118
4	0.129	0.115	0.122	0.010	0.020	0.142
5	0.123	0.102	0.113	0.015	0.030	0.142
6	0.242	0.234	0.238	0.006	0.011	0.249
7	0.155	0.200	0.178	0.032	0.064	0.241
8	0.270	0.249	0.260	0.015	0.030	0.289
9	0.100	0.131	0.116	0.022	0.044	0.159
10	0.126	0.113	0.120	0.009	0.018	0.138

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ตารางที่ ~~3.762.4~~ Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ recombinant Der p 1 ที่ผลิตได้ (ต่อ)

Case No.	OD1	OD2	Mean	Standard deviation	2 SD	Mean + 2 SD
11	0.090	0.086	0.088	0.003	0.006	0.094
12	0.103	0.115	0.109	0.008	0.017	0.126
13	0.255	0.343	0.299	0.062	0.124	0.423
14	0.092	0.112	0.102	0.014	0.028	0.130
15	0.120	0.152	0.136	0.023	0.045	0.181
16	0.124	0.172	0.148	0.034	0.068	0.216
17	0.095	0.101	0.098	0.004	0.008	0.106
18	0.105	0.110	0.108	0.004	0.007	0.115
19	0.085	0.088	0.087	0.002	0.004	0.091
20	0.089	0.098	0.094	0.006	0.013	0.106
21	0.116	0.117	0.117	0.001	0.001	0.118
22	0.205	0.275	0.240	0.049	0.099	0.339
23	0.192	0.198	0.195	0.004	0.008	0.203
24	0.288	0.265	0.277	0.016	0.033	0.309
25	0.101	0.090	0.096	0.008	0.016	0.111
26	0.162	0.161	0.162	0.001	0.001	0.163
27	0.115	0.117	0.116	0.001	0.003	0.119
28	0.117	0.107	0.112	0.007	0.014	0.126
29	0.078	0.078	0.078	0.000	0.000	0.078
30	0.124	0.129	0.127	0.004	0.007	0.134
Positive control	4.314	4.289	4.302	0.018	0.035	4.337
Negative control (1% BSA)	0.100	0.097	0.099	0.002	0.004	0.103

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบ
อักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ตารางที่ 3.872.5 Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ native Der p 2 ที่ผลิตได้

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

Case No.	OD1	OD2	OD3	Mean	Standard deviation	2 SD	Mean $\pm$ 2 SD
IgE binding activity of normal control (n=10)							
1	0.200	0.170	0.156	0.175	0.022	0.045	0.220
2	0.117	0.085	0.090	0.097	0.017	0.034	0.132
3	0.135	0.109	0.105	0.116	0.016	0.033	0.149
4	0.195	0.152	0.142	0.163	0.028	0.056	0.219
5	0.119	0.100	0.090	0.103	0.015	0.029	0.132
6	0.122	0.105	0.098	0.108	0.012	0.025	0.133
7	0.140	0.127	0.139	0.135	0.007	0.014	0.150
8	0.155	0.146	0.153	0.151	0.005	0.009	0.161
9	0.099	0.104	0.101	0.101	0.003	0.005	0.106
10	0.150	0.155	0.151	0.152	0.003	0.005	0.157
IgE binding activity of allergic cases (n=30)							
1	0.931	0.892	0.883	0.902	0.026	0.051	0.953
2	2.344	2.328	2.318	2.330	0.013	0.026	2.356
3	0.886	0.888	0.857	0.877	0.017	0.035	0.912
4	0.097	0.083	0.096	0.092	0.008	0.016	0.108
5	0.193	0.184	0.197	0.191	0.007	0.013	0.205
6	0.595	0.606	0.632	0.611	0.019	0.038	0.649
7	1.306	1.363	1.384	1.351	0.040	0.081	1.432
8	0.206	0.173	0.184	0.188	0.017	0.034	0.221
9	0.456	0.454	0.448	0.453	0.004	0.008	0.461
10	0.628	0.557	0.599	0.595	0.036	0.071	0.666
11	0.123	0.119	0.125	0.122	0.003	0.006	0.128
12	0.274	0.296	0.316	0.295	0.021	0.042	0.337
13	0.973	0.883	0.904	0.920	0.047	0.094	1.014
14	0.287	0.283	0.276	0.282	0.006	0.011	0.293

ตารางที่ ~~3.872.5~~ Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ native Der p 2 ที่ผลิตได้ (ต่อ)

Case No.	OD1	OD2	OD3	Mean	Standard deviation	2 SD	Mean $\pm$ 2 SD
15	0.379	0.362	0.386	0.376	0.012	0.025	0.400
16	0.129	0.123	0.119	0.124	0.005	0.010	0.134
17	4.228	4.037	4.384	4.216	0.174	0.348	4.564
18	2.384	2.499	2.527	2.470	0.076	0.152	2.622
19	2.016	1.855	1.948	1.940	0.081	0.162	2.101
20	0.569	0.588	0.593	0.583	0.013	0.025	0.609
21	0.444	0.392	0.347	0.394	0.049	0.097	0.491
22	0.312	0.265	0.312	0.296	0.027	0.054	0.351
23	1.466	1.502	1.488	1.485	0.018	0.036	1.522
24	0.859	0.862	0.861	0.861	0.002	0.003	0.864
25	0.399	0.399	0.444	0.414	0.026	0.052	0.466
26	0.218	0.235	0.264	0.239	0.023	0.047	0.286
27	2.465	2.432	2.594	2.497	0.086	0.171	2.668
28	0.898	0.863	0.921	0.894	0.029	0.058	0.952
29	0.909	0.881	0.893	0.894	0.014	0.028	0.922
30	0.296	0.314	0.300	0.303	0.009	0.019	0.322
Positive control	0.100	0.102	0.099	0.100	0.002	0.003	0.103
Negative control (1% BSA)	0.094	0.102	0.087	0.094	0.008	0.015	0.109

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบอักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ตารางที่ 3.982-6 –Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ recombinant Der p 2 ที่ผลิตได้

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

Case No.	OD1	OD2	Mean	Standard deviation	2 SD	Mean + 2 SD
IgE binding activity of normal control (n=10)						
1	0.128	0.131	0.130	0.002	0.004	0.134
2	0.117	0.118	0.118	0.001	0.001	0.119
3	0.105	0.104	0.105	0.001	0.001	0.106
4	0.131	0.135	0.133	0.003	0.006	0.139
5	0.162	0.161	0.162	0.001	0.001	0.163
6	0.106	0.113	0.110	0.005	0.010	0.119
7	0.115	0.119	0.117	0.003	0.006	0.123
8	0.144	0.137	0.141	0.005	0.010	0.150
9	0.176	0.189	0.183	0.009	0.018	0.201
10	0.157	0.178	0.168	0.015	0.030	0.197
IgE binding activity of allergic cases (n=30)						
1	0.648	0.808	0.728	0.113	0.226	0.954
2	0.358	0.337	0.348	0.015	0.030	0.377
3	0.166	0.175	0.171	0.006	0.013	0.183
4	0.150	0.143	0.147	0.005	0.010	0.156
5	0.189	0.219	0.204	0.021	0.042	0.246
6	0.423	0.498	0.461	0.053	0.106	0.567
7	0.278	0.306	0.292	0.020	0.040	0.332
8	0.511	0.513	0.512	0.001	0.003	0.515
9	0.339	0.375	0.357	0.025	0.051	0.408
10	0.327	0.444	0.386	0.083	0.165	0.551
11	0.143	0.154	0.149	0.008	0.016	0.164
12	0.159	0.248	0.204	0.063	0.126	0.329
13	0.529	0.645	0.587	0.082	0.164	0.751
14	0.131	0.152	0.142	0.015	0.030	0.171

ตารางที่ 3.982-6 Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ recombinant Der p 2 ที่ผลิตได้ (ต่อ)

Case No.	OD1	OD2	Mean	Standard deviation	2 SD	Mean + 2 SD
15	0.163	0.154	0.159	0.006	0.013	0.171
16	0.268	0.347	0.308	0.056	0.112	0.419
17	0.148	0.148	0.148	0.000	0.000	0.148
18	0.212	0.213	0.213	0.001	0.001	0.214
19	0.274	0.207	0.241	0.047	0.095	0.335
20	0.208	0.195	0.202	0.009	0.018	0.220
21	0.187	0.189	0.188	0.001	0.003	0.191
22	0.722	0.546	0.634	0.124	0.249	0.883
23	0.739	0.781	0.760	0.030	0.059	0.819
24	0.613	0.532	0.573	0.057	0.115	0.687
25	0.233	0.208	0.221	0.018	0.035	0.256
26	0.279	0.297	0.288	0.013	0.025	0.313
27	0.214	0.205	0.210	0.006	0.013	0.222
28	0.410	0.404	0.407	0.004	0.008	0.415
29	0.146	0.140	0.143	0.004	0.008	0.151
30	0.191	0.188	0.190	0.002	0.004	0.194
Positive control	4.417	4.243	4.330	0.123	0.246	4.576
Negative control (1% BSA)	0.165	0.155	0.160	0.007	0.014	0.174

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: ไม่ เน้น

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบ
อักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา

ที่จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ตัวหนา, แบบ
อักษรภาษาที่ซับซ้อน: ตัวหนา