

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญเรื่อง	ii
สารบัญตาราง	iv
สารบัญภาพ	v
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	xi
บทคัดย่อรวมภาษาไทย	xviii
บทคัดย่อรวมภาษาอังกฤษ	xxi
บทนำรวม	xxiv
โครงการย่อยที่ 1 การจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา	
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
บทนำ	5
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	12
อภิปรายและวิจารณ์ผล	59
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	63
บรรณานุกรม	64
โครงการย่อยที่ 2 การศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นบ้านสายพันธุ์ <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> และการผลิตสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นโดยพันธุ์วิศวกรรม	
บทคัดย่อภาษาไทย	69
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	71
บทนำ	73
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	80
ผลการวิจัย	85
อภิปรายและวิจารณ์ผล	137
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	143
บรรณานุกรม	144

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
โครงการย่อยที่ 3 การเตรียมแอนบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่สามารถยับยั้ง การทำงานของโปรตีนไทมิก สโตรมอล ลิมโฟพอยอิตินสำหรับรักษาโรคมะเร็งไทรไธรอยด์	
บทคัดย่อภาษาไทย	149
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	150
บทนำ	151
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	155
ผลการวิจัย	159
อภิปรายและวิจารณ์ผล	187
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	189
บรรณานุกรม	191
ประวัติผู้วิจัย	192

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 เป้าหมายของผลผลิต (output) และตัวชี้วัดของแผนงานวิจัย	xxix
ตารางที่ 2.1 รายละเอียดของ primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น	12
ตารางที่ 2.2 ผลสรุปของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ primers คู่ต่างๆ กับ gDNA ของไรฝุ่น 3 สายพันธุ์	16
ตารางที่ 2.3 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง	30
ตารางที่ 2.4 ผลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR สำหรับตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 124 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการตรวจ 3 ซ้ำ	41
ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบข้อมูลการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น ระหว่างวิธี flotation +กล้องจุลทรรศน์ กับ วิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นที่จับคู่ได้จำนวน 98 ตัวอย่าง	52
ตารางที่ 2.6 จำนวนตัวอย่างฝุ่นที่ให้ผลต่างๆ จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น ด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ และวิธี multiplex PCR	57
ตารางที่ 2.7 ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR และ วิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์	58
ตารางที่ 2.8 เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียระหว่างการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่น ด้วยวิธี Multiplex PCR และวิธี Flotation+กล้องจุลทรรศน์ โดยวิเคราะห์ข้อมูลจากการตรวจตัวอย่างฝุ่นจากที่อยู่อาศัยจำนวน 98 ตัวอย่าง	62
ตารางที่ 3.1 House dust mites; <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> and <i>D. farina</i>	74
ตารางที่ 3.2 Characteristics of the 45 allergic patients	87
ตารางที่ 3.3 Characteristics of the 15 non allergic patients (normal controls)	89
ตารางที่ 3.4 The molecular mass and <i>pI</i> of the IgE-reactive proteins spots from the 2DE-gel after analyzing by mass spectrometry with the protein	106
ตารางที่ 3.5 แสดง oligonucleotide primers สำหรับการ amplify Der p 1 and Der p 2 gene	114
ตารางที่ 3.6 Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ native Der p 1 ที่ผลิตได้	126
ตารางที่ 3.7 Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ recombinant Der p 1 ที่ผลิตได้	131
ตารางที่ 3.8 Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ native Der p 2 ที่ผลิตได้	133
ตารางที่ 3.9 Optical density (OD) แสดงค่า IgE binding activity ต่อสารสกัดภูมิแพ้ recombinant Der p 2 ที่ผลิตได้	135
ตารางที่ 4.1 แสดง oligonucleotide primers สำหรับการ amplify human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) gene	159

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1	xxviii
รูปที่ 2.1	14
รูปที่ 2.2	14
รูปที่ 2.3	15
รูปที่ 2.4	15
รูปที่ 2.5	17
รูปที่ 2.6	18
รูปที่ 2.7	18
รูปที่ 2.8	19
รูปที่ 2.9	20
รูปที่ 2.10	21
รูปที่ 2.11	22
รูปที่ 2.12	23

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 2.13 ผลของปฏิกิริยา Triplex PCR ซึ่งใช้ primers ที่ออกแบบจากยีน internal transcribe spacer 2 (ITS2) และยีน Cytochrome oxidase (CoxI) กับ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ หลังการเปลี่ยน primer ITS2-107_F เป็น ITS2-166_F	24
รูปที่ 2.14 ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) ของปฏิกิริยา PCR ของ primer ITS2-199_F/ITS2_R2 (DF); ITS2-166_F/ITS2_R2 (DP); CoxI_F3/CoxI_R2 (BT) โดยการใช้ two-fold serial dilutions ของ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ (<i>D. pteronyssinus</i> , <i>D. farinae</i> , <i>B. tropicalis</i>)	25
รูปที่ 2.15 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Multiplex PCR ซึ่งใช้ส่วนผสมของชุด primers และ gDNA ของไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ (<i>D. pteronyssinus</i> , <i>D. farinae</i> , <i>B. tropicalis</i>) ที่ปริมาณต่างกัน	26
รูปที่ 2.16 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Multiplex PCR ซึ่งใช้ส่วนผสมของชุด primers ที่จำเพาะกับไรฝุ่นสามสายพันธุ์ (DP, DF, BT) กับ gDNA ของยุงรำคาญ (<i>Culex quinquefasciatus</i> sp.), แมลงสาบอเมริกัน (<i>Periplaneta americana</i>), เหาหนังสือ (<i>Liposcelis</i> sp.), ไรโรงเก็บ (<i>Tyrophagus</i> sp.) และไรตัวห้ำ (<i>Cheyletus</i> sp.)	27
รูปที่ 2.17 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Multiplex PCR ซึ่งใช้ส่วนผสมของชุด primers ที่จำเพาะกับ gDNA สกัดได้จากตัวอย่างฝุ่นจริง ซึ่งผสมไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ (DP, DF, BT) ที่จำนวนต่างๆ	28
รูปที่ 2.18 รูปร่างลักษณะของไรฝุ่นสายพันธุ์ <i>D. pteronyssinus</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์	37
รูปที่ 2.19 รูปร่างลักษณะของไรฝุ่นสายพันธุ์ <i>D. farinae</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์	38
รูปที่ 2.20 รูปร่างลักษณะของไรฝุ่นสายพันธุ์อื่นๆ และชิ้นส่วนของแมลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างฝุ่นด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์	39
รูปที่ 2.21 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร	47
รูปที่ 2.22 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดสมุทรปราการ	48
รูปที่ 2.23 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดปทุมธานี	48
รูปที่ 2.24 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดนครสวรรค์	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 2.25 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดสุพรรณบุรี	49
รูปที่ 2.26 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดอ่างทอง	50
รูปที่ 2.27 Agarose electrophoresis แสดงผลผลิต DNA ซึ่งได้จากการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างฝุ่นจากจังหวัดขอนแก่น	50
รูปที่ 3.1 Nomenclature of house dust mite allergen; <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> and <i>D. farinae</i> allergens and their biochemical properties	75
รูปที่ 3.2 Process of house dust mite extraction	83
รูปที่ 3.3 Conceptual framework	84
รูปที่ 3.4 Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE analysis of 10 µg of crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> from 8% separating gel	93
รูปที่ 3.5 Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE analysis of 10 µg of crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> from 12% separating gel	94
รูปที่ 3.6 Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE analysis of various amount of crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> without using protease inhibitor from 12% separating gel	95
รูปที่ 3.7 Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE analysis of various amount of crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> with using protease inhibitor from 12% separating gel	96
รูปที่ 3.8 Immunoblot patterns of crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> 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	97
รูปที่ 3.9 2-DE maps of soluble proteins from crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> at the pH 3-10, NL stained by silver (A) and Coomassie Brilliant Blue (B)	100
รูปที่ 3.10 Two dimensional immunoblot analysis from crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> at the pH 3-10, NL; the blot probed with the allergic serum pool (A) compare with non-allergic serum pool (B)	101
รูปที่ 3.11 Two dimensional immunoblot analysis for identification of main <i>D. pteronyssinus</i> allergens in various pH ranges probed with allergic serum pool compare with non-allergic serum pool	102

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.12 Two dimensional immunoblot analysis from crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> at the pH 5.0-6.5 the blot probed with the allergic serum pool (A) compare with non-allergic serum pool (B). Circles and the indicated numbers in A are protein spots which were subjected to LC/MS	103
รูปที่ 3.13 Two dimensional immunoblot analysis from crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> at the pH 6.2-7.5; the blot probed with the allergic serum pool (A) compare with non-allergic serum pool (B). Circles and the indicated numbers in A are protein spots which were subjected to LC/MS	104
รูปที่ 3.14 Two dimensional immunoblot analysis from crude extract of <i>D. pteronyssinus</i> at the pH 7-11; the blot probed with the allergic serum pool (A) compare with the non-allergic serum pool (B) Circles and the indicated numbers in A are protein spots which were subjected to LC/MS	105
รูปที่ 3.15 2-DE maps of proteins from crude extract of <i>Dermatophagoides farinae</i> stained by silver	107
รูปที่ 3.16 Two dimensional immunoblot analysis from crude extract of <i>D. farinae</i> at the pH 3-10, NL; the blot probed with the allergic serum pool (A) compare with non-allergic serum pool (B)	108
รูปที่ 3.17 Two dimensional immunoblot analysis from crude extract of <i>D. farinae</i> at the pH 5.0-6.5 the blot probed with the allergic serum pool (A) compare with non-allergic serum pool (B)	109
รูปที่ 3.18 Two dimensional immunoblot analysis from crude extract of <i>D. farinae</i> at the pH 6.2-7.5 the blot probed with the allergic serum pool (A) compare with non-allergic serum pool (B)	110
รูปที่ 3.19 Two dimensional immunoblot analysis from crude extract of <i>D. farinae</i> at the pH 7.0-11 the blot probed with the allergic serum pool (A) compare with non-allergic serum pool (B)	111
รูปที่ 3.20 การ Purify native protein โดยใช้เทคนิค affinity column chromatography	112
รูปที่ 3.21 SDS-PAGE-separated purify Der p1 (lane 1) and Der p2 (lane 2) allergens	113
รูปที่ 3.22 PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ Der p 1 and Der p 2 -coding sequence	116
รูปที่ 3.23 แสดง Nucleotide and deduced amino acid sequences of Der p 1 (A) and Der p 2 (B) gene of this study	118

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.24 Recombinant plasmid ที่สกัดจาก transformed <i>E. coli</i> 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 และ ย้อมด้วย ethidium bromide	119
รูปที่ 3.25 แสดงผลการนำ recombinant plasmid ที่คัดเลือกได้ว่ามี Der p 1 (A) and Der p 2 (B) เข้าสู่ protein expression host, <i>i.e.</i> BL21DE3 <i>E. coli</i>	120
รูปที่ 3.26 Recombinant plasmid ที่สกัดจาก transformed <i>E. coli</i> 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	122
รูปที่ 3.27 SDS-PAGE pattern ของ Recombinant Der p 1 allergen expression	124
รูปที่ 3.28 SDS-PAGE pattern ของ Recombinant Der p 2 allergen expression	125
รูปที่ 4.1 แสดง nucleotide sequences ของ human thymic stromal lymphopoietin gene ที่มีรายงานในฐานข้อมูล	160
รูปที่ 4.2 แสดงขั้นตอนการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับในการสังเกตลักษณะของเซลล์ (A) และขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ (B)	162
รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของ human lung epithelial cell line (A549) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X (A) และ 40X (B)	163
รูปที่ 4.4 PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ human β -actin-coding sequence ในการ amplify gene เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ cDNA ที่ผลิตขึ้น	165
รูปที่ 4.5 PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ human TSLP-coding sequence ในการ amplify gene ให้ได้ปริมาณมากพอ	167
รูปที่ 4.6 แสดง Nucleotide and deduced amino acid sequences of TSLP of this study	169
รูปที่ 4.7 Recombinant plasmid ที่สกัดจาก transformed <i>E. coli</i> clone ที่ carry gene coding for TSLP หลังตัดด้วย restriction endonucleases วิเคราะห์โดย run amplified products ใน 1 % agarose gel electrophoresis และ ย้อมด้วย ethidium bromide	170
รูปที่ 4.8 แสดงผลการนำ recombinant plasmid ที่คัดเลือกได้ว่ามี TSLP เข้าสู่ protein expression host, <i>i.e.</i> BL21DE3 <i>E. coli</i>	171
รูปที่ 4.9 SDS-PAGE pattern ของ affinity column purified-recombinant TSLP ที่เตรียมจาก transformed <i>E. coli</i> ย้อมด้วยสี CBB G250	173

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.10 แสดงตัวอย่างผลการเพิ่มจำนวน <i>huscfv</i> ใน recombinant phagemids ที่คัดเลือก โคลน no. 2, 4, 5, 7, 8, 11, 13-15 แสดง transfected <i>E. coli</i> ที่มี <i>huscfv</i> gene อยู่ (ขนาด 1,000 bp)	175
รูปที่ 4.11 แสดงตัวอย่าง Western blot analysis ของ HuScFv จาก HB2151 <i>E. coli</i> clones	178
รูปที่ 4.12 แสดงค่า OD _{405nm} ของ ELISA ของ HuScFv ใน lysates ของ <i>E. coli</i> 20 clones ต่อ TSLP-(test antigen) coated wells เปรียบเทียบกับ BSA-(antigen control) coated wells พบว่ามี 10 clones ให้ผลบวกในการทดสอบ คือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16	180
รูปที่ 4.13 แสดง Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ <i>huscfv</i> sequences ที่ได้จากการทำ bio-panning โดยใช้ TSLP เป็น panning antigen จำนวนทั้งหมด 3 patterns	182
รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณเซลล์ที่มี CD11c ⁺ (เส้นสีน้ำเงิน) เมื่อเปรียบเทียบกับ isotype control (เส้นสีแดง)	184
รูปที่ 4.15 แสดง Mean fluorescence intensity ของ OX40L ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TSLP เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น	184
รูปที่ 4.16 แสดงประสิทธิภาพของ human monoclonal antibodies clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ในการยับยั้งหน้าที่ของ TSLP เปรียบเทียบกับ กลุ่ม control (Medium alone)	186