โครงการย่อย A

การโคลนนิ่งแสดงออก และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ตัวใหม่จากยางพารา

ปัจจุบันหลายประเทศทั้งในยุโรปและอเมริกา ได้ตระหนักถึงอันตรายจากอาการแพ้ที่เกิดจากโปรตีนในน้ำยางพาราที่ใช้ในการผลิตวัสดุภัณฑ์ต่างๆ โดยผู้แพ้จะมีอาการแพ้แบบเฉียบพลัน (type I) ซึ่งมีบางรายที่อาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต เนื่องจากโปรตีนของน้ำยางพารามีเป็นร้อยๆ ชนิด แต่ปัจจุบันได้มีผู้รายงานการค้นพบโปรตีนที่สามารถทำให้เกิดอาการแพ้แล้ว 13 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงตั้งแต่ 5-115 kD โปรตีนดังกล่าวได้แก่ Hev b1 (Rubber elongation factor); Hev b2 (β-1,3 Glucanase); Hev b3 (Small rubber particle protein); Hev b4 (Microhelix component); Hev b5 (Acidic latex protein); Hev b6.01 (Prehevein); Hev b6.02 (Mature hevein) ; Hev b6.03 (C-domain of prohevein); Hev b7 (Patin-like protein); Hev b8 (Latex profilin); Hev b9 (latex enolase); Hev b10 (Manganese superoxide dismutase); Hev b 11 (class I endochitinase) , Hev b12 (lipid transfer protein) Hev b 13 (latex esterase) ในจำนวนโปรตีนที่ได้มีการรายแล้วว่าทำให้เกิดการแพ้นั้น มีเพียง Hev b1 และ Hev b3 ที่เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ และเคลือบอยู่บนผิวของอนุภาคยาง

โดยปัจจุบันยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ใดๆทางคลินิคที่ให้ผลแม่นยำ 100% เพื่อวินิจฉัยว่าผู้ป่วยมีการแพ้โปรตีนจากยางหรือไม่ วิธีที่เสี่ยงมากที่สุดแต่ดีที่สุดและได้ผลแม่นยำในระดับ 95% และ 99% คือการทำ skin prick test โดยใช้สารละลายโปรตีนที่เตรียมจากน้ำยางสดที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับสำหรับการ prick ลงบนผิวหนังของผู้ที่แพ้โดยตรง โดยเมื่อเร็วๆ (J. Allergy and Clin. Immuno.109, 2002) ได้มีการนำชุด allergens ผสม 8 ชนิด ที่ทำบริสุทธิ์จากน้ำยางสด ซึ่งประกอบด้วย Hev b1, 2, 3, 4, 6, 7b และ 7c กับ allergen Hev b5 ซึ่งเตรียมจากการทำ cloning ความเข้มข้นช่วง .001 ถึง .01 mg/ml ไปทดสอบโดยการทำ skin prick test เพื่อดูความความไว (sensitivity) กับบุคลากรทางการแพทย์ที่แพ้โปรตีนจากยางจำนวน 62 คน ปรากฏว่าได้ ความแม่นยำเพียง 91.9 % โดยพบความถี่ ของ IgE reactivity ต่อ allergen Hev b5 เท่ากับ 65% (สูงสุด), Hev b2 , 63%; Hev b3, 24% ; Hev b4, 39%, Hev b7, 45% และ Hev b1, 23% (ต่ำสุด) จากผลของค่า sensitivity ที่ได้ น่าจะชี้ให้เห็นว่ายังมี allergen ตัวสำคัญอื่นอีกที่ยังขาดอยู่และต้องค้นหาต่อไปเพื่อให้ได้ค่า sensitivity ที่สูงขึ้น

หากมองจากสภาพธรรมชาติของโมเลกุลของตัวโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ เราสามารถแบ่งโปรตีนดังกล่าวออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ละลายน้ำ หรือ ใช้น้ำล้างออกได้ กับ ชนิดที่ไม่ละลาย หรือ ใช้น้ำล้างไม่ออก จะเห็นว่าในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ยางของผู้ประกอบการจะสามารถกำจัดเฉพาะโปรตีนชนิดที่ละลายน้ำได้ เป็นส่วนใหญ่เท่านั้น จากความรู้พื้นฐานที่ได้ทำการศึกษาวิจัยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดการอุดตันของท่อน้ำยาง ผู้วิจัยและคณะฯ ได้พบว่าในน้ำยางพารามีโปรตีนอยู่กลุ่มหนึ่งที่ไม่ละลายน้ำ และเป็นส่วนประกอบของ rubber coagulum ซึ่งได้แก่กลุ่มเมมเบรนโปรตีนของอนุภาคยางและอนุภาคก้นหลอด (อนุภาคลูทอยด์)

ที่ทำหน้าที่เป็นก้อนอุดตันในท่อน้ำยาง (Wititsuwannakul et al 2008a, Appendix 1) โปรตีนดังกล่าวจะปนอยู่กับเนื้อยางหรือผลิตภัณฑ์ยาง และยากที่จะกำจัดออกโดยการล้างด้วยน้ำ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการค้นหาโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ตัวใหม่จากยางพาราจากกลุ่มของเมมเบรนโปรตีนที่เตรียมมาจากอนุภาคก้นหลอด (bottom fraction membrane, BFM)

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมเมมเบรนโปรตีนจากน้ำยางสด

นำน้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ๆ (โดยการใช้ภาชนะแช่น้ำแข็งช่วยในการเก็บน้ำยาง เพื่อป้องกันการแตกของอนุภาคลูทอยด์) ไปแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge (45,000g , 45 min) เพื่อแยกน้ำยางออกเป็นชั้นบนที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง ชั้นกลางหรือส่วนใสของ cytosol (C-serum) และ ชั้นก้นหลอด (bottom fraction, BF) นำชั้นก้นหลอดที่ประกอบไปด้วยอนุภาค (luotid และ Frey Wyssling) ที่มีเมมแบรนห่อหุ้ม ไปขจัดโปรตีนปนเปื้อนโดยการล้างด้วย isotonic buffer ทำการสลายอนุภาคของ BF ด้วยการ Freeze-thaw ซ้ำหลายครั้งที่อุณหภูมิ -20°C สลับกับอุณหภูมิห้อง ปั่นแยกส่วนของเหลวที่ได้ (B-serum) ออกจากส่วนของ BF membrane (BFM) ขจัดโปรตีนปนเปื้อนออกจาก BFM โดยการล้างด้วย isotonic buffer ทำการสกัดโปรตีนไม่ละลายน้ำออกจาก BFM ด้วย Tris-buffer ที่มี 0.2 % Triton X-100

b) การทำ allergen specific IgE และ IgG ELISA assay

นำละลายแอนตีเจนที่เป็นโปรตีน BMF (10 μg/ml)ปริมาตร 50 μl ไป coat ลงบนหลุม microplate ทำการอบ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการล้างแอนตีเจนส่วนที่ไม่จำกับหลุมหรือที่เหลือออกโดยการล้าง plate จำนวน 5 ครั้งด้วย บัปเฟอร์ล้าง PBS-T (0.05% tween 20/PBS, pH 7.2) ทำการ block microplate ด้วย 2% skim milk ที่ละลายใน PBS-T อบ ที่ 37 °C , 2 ชม และ ล้าง microplate 3 ครั้งด้วย PBS-T ต่อไปเติมตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจลงไปหลุมละ 50 μl (diluted 1:5 ด้วย 2% skim milk/PBS) โดยอบที่ 37 °C, 1 ชม. ตามด้วยการล้าง microplate 5 ครั้งด้วย PBS-T เติม HRP labeled antihuman IgE หรือ HRP labeled antihuman IgG แล้วแต่กรณี ทำการอบที่ 37 °C, 1 ชม. แล้วล้าง microplate 4 ครั้งด้วย PBS-T ตามด้วยการ substrate 3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine (TMB) แล้วอบในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วหยุด ปฏิกิริยาด้วยการเติม100 μl ของ 1N HCl และนำไปวัดสีที่เกิดขึ้นที่ 450 nm ด้วย เครื่อง microplate reader

c) การหา immunoreactive allergen โดยเทคนิค co-immunoprecipitation

การหา immunoreactive allergen จาก BFM โดยอาศัยเทคนิค co-immunoprecipitation สามารถเริ่มต้นโดยการติดฉลาก BFM ด้วย biotin หรือ การทำ biotinylation ของโปรตีน BFM เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอน co-immunoprecipitation ทำโดยการนำ BFM โปรตีนไปบ่มกับสารละลาย biotin reagent (10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin) ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยการแช่น้ำแข็ง ทำการกำจัด biotin reagent ส่วนเกินออกโดยการล้างด้วย

บัปเฟอร์ PBS-M pH 7.4 (0.14 M NaCl, 8 mM sodium phosphate, 2 mM potassium phosphate และ 0.01 M KCl)

การทำ co-immunoprecipitation ทำโดยใช้ Seize X Immunoprecipitation Kit (Pierce Biotechnology) นำ Seize X Protein A gel ไปเชื่อมกับ IgG_{2a} subclass monoclonal antibody (mAb) ต่อ human FcƐ (Biodesign International, Saco, ME) โดยอาศัย disuccinimidyl suberate (DSS) cross-linker โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการล้าง 5 ครั้ง หลังจากนั้นทำการเติมซีรั่ม (350 μl)ลงไปบน anti- human FcƐ mAb conjugated protein A bead ทำการล้าง 5 ครั้ง แล้วตามด้วยการเติมโปรตีนbiotylated BFM แล้วทำการบ่มด้วยการหมุนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ทำการล้าง 5 ครั้งแล้วทำการชะ immuno-preipitated proteins ออกจาก protein A bead โดยการใช้บัปเฟอร์ pH 2.8 แล้วนำไปแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE (15%) ถ่ายโปรตีนดังกล่าว ลงในแผ่นเมมเบรน PDVF แล้ว blocked บริเวณที่วางบนแผ่นเมมเบรนด้วย 5% skim milk/PBS ที่4°C ข้ามคืน แล้วนำบ่มกับ HRP-conjugated streptavidin เพื่อให้สามารถมองเห็น biotinylated BFM proteins ด้วยเทคนิค chemiluminescence ด้วยระบบ ECL western blotting analysis ตามด้วยการexposed กับ Kodak X-ray film

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

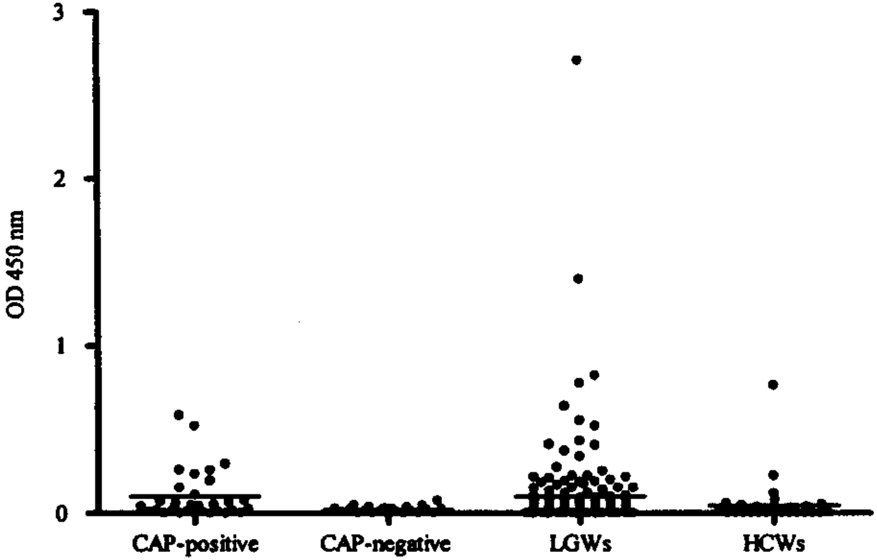
ค่า BFM specific IgE จากการใช้กลุ่มเลือดตัวอย่างจากคน 4 กลุ่ม (รูปที่ B.1) พบว่าค่าเฉลี่ย allergen specific IgE จากตัวอย่างซีรั่มเลือดคนงานโรงงานถุงมือยาง (Latex glove worker, LGW) จำนวน 170 คนเท่ากับ 0.10 ± 0.26 OD โดยมีคนงานเพียง 38 คนที่มีค่า BFM specific IgE สูงกว่าค่าเฉลี่ย สำหรับค่าเฉลี่ย BMF specific IgE ของเลือดตัวอย่างจากกลุ่ม CAP^+ พบว่ามีระดับใกล้เคียงกับกลุ่มคนงานโรงงานถุงมือยาง โดยมีคนในกลุ่ม CAP^+ จำนวน 9 คนที่มีค่า BFM specific IgE สูงกว่าค่าเฉลี่ยในขณะที่กลุ่ม CAP^- มี 11 จาก 22 คนที่มีค่า BMF specific IgE สูงกว่าค่าเฉลี่ย (0.02 ± 0.02 OD) และกลุ่มบุคลากรบริการด้านสุขภาพ (HCW) มี 7 จาก 35 คนที่มีค่า BFM specific IgE สูงกว่าค่าเฉลี่ย(0.04 ± 0.13 OD) หากใช้เกณฑ์ 0.06 OD ซึ่งได้มาจากค่าเฉลี่ย + 2 SD ของกลุ่ม CAP^- (0.02 + 0.07 = 0.09) ในการตัดสิน จำนวนตัวอย่างที่น่าจะให้ผลบวกหรือมี IgE ต่อ BMF allergen น่าจะมีจำนวน 56, 11, 1 และ 5 คน จากกลุ่ม LGW, CAP^+, CAP^- และ HCWs ตามลำดับ ค่า BFM specific IgE สูงสุด 3 อันดับแรกได้แก่ซีรั่มหมายเลข 4, 248 และ 253 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.71, 1.40 และ 0.78 OD ตามลำดับ นอกจากนั้นค่า BFM specific IgG จากการใช้กลุ่มเลือดตัวอย่างจากคน 4 กลุ่ม (รูปที่ B.2) พบว่ามีค่าเฉลี่ย BFM specific IgG ในกลุ่ม LGW, CAP^+, CAP^- และ HCWs เท่ากับ 0.20 ± 0.34, 0.09 ± 0.13, 0.02 ± 0.04 และ 0.03 ± 0.04 OD ตามลำดับ จำนวนตัวอย่างที่น่าจะให้ผลบวกหรือมี IgG ต่อ BMF น่าจะมีจำนวน 50, 9, 7 และ 15 คน จากกลุ่ม LGW, CAP^+, CAP^- และ HCWs ตามลำดับหากใช้เกณฑ์การตัดสินทำนองเดียวจากค่าเฉลี่ย SD ที่ได้จากกลุ่ม CAP^-

จะเห็นได้ว่าคนกลุ่ม LGW มี IgE และ IgG ต่อ BFM สูงกว่าคนกลุ่มอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลุ่ม LGW มีโอกาสสัมผัสกับ BFM ในน้ำยางและผลิตภัณฑ์ถุงมือยางที่ผลิตออกมาใหม่ๆ ได้มากกว่ากลุ่มอื่นๆ

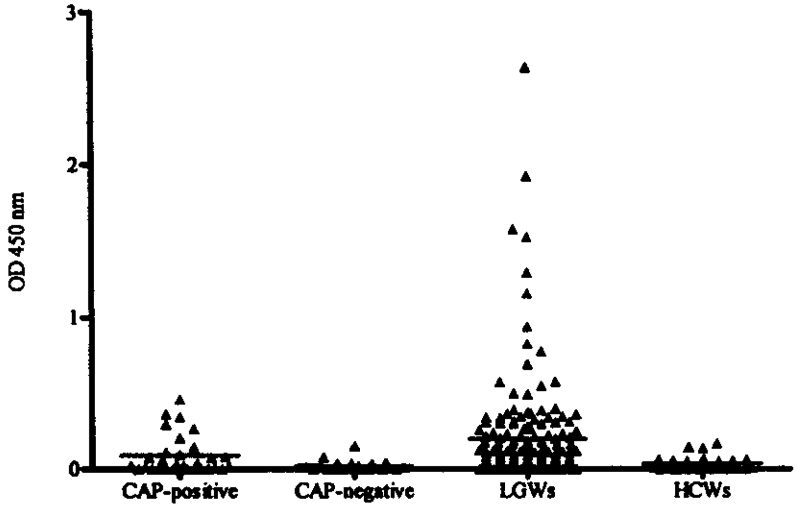
นอกจากนั้นจาก plot แบบ scatter format (รูปที่ B.3) พบว่าค่า correlation ระหว่าง BFM specific IgE และ IgG ระหว่างซีรั่มหมายเลข 4, 248 และ 253 มีระดับสูงสุด และโดยค่า OD สำหรับ specific IgG เท่ากับ 2.64, 1.16 และ 1.53 ตามลำดับ โดยที่ LGW หมายเลข 4 เท่านั้นที่พบว่ามีอาการแพ้โปรตีนจากยาง และผลจากการทำ skin prick test ก็เป็นลบทั้งหมด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าระดับ IgG มีอิทธิพลต่ออาการตอบสนองต่อการแพ้ หาก FcγRIIB ไปร่วมเกาะกลุ่มหรือ co-aggregated กับ FcεRI เนื่องจากการเกิด allergen cross-linking โดยอาศัย IgG และ IgE อาการที่เกี่ยวข้องกับ pro-allergenic signal ก็จะหมดไป

จากการหา immunoreactive allergen โดยใช้เทคนิค co-immunoprecipitation เป็นเทคนิคที่นิยมทำกันเพราะ สภาพธรรมชาติของ epitopes ของ allergen จะยังคงอยู่ทั้งหมด ซึ่งไม่เหมือนการทำ immunoblot ซึ่งจะมีการสูญเสียสภาพธรรมชาติของ epitopes ร่วมด้วย โดยเมื่อใช้ซีรั่มจาก LGW หมายเลข 4 พบว่า โปรตีน BFM ขนาด 55 kD เป็น IgE reactive allergen (รูปที่ B.4 A) โดยโปรตีน BFM ดังกล่าวมีปริมาณอยู่น้อยมากไม่สามารถย้อมหรือมองเห็นแถบโปรตีนได้จากการทำ SDS-PAGE (รูปที่ B.4 B) และเมื่อใช้ซีรั่มจาก CAP^+ หมายเลข P1396 ก็ไม่พบว่า BFMโปรตีน 55 kD เป็น immunoreative allergen ทั้งๆที่ซีรั่ม CAP^+ จะมีระดับ IgE ที่สูง (รูปที่ B.4 A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในชุดทดสอบ CAP ยังขาดโปรตีน 55 kD ซึ่งหากเพิ่มโปรตีนตัวนี้ลงไปด้วยในชุดทดสอบ ด้วยก็จะทำให้สามารถวินิจฉัยการแพ้โปรตีนจากยางพาราได้แม่นยำขึ้น

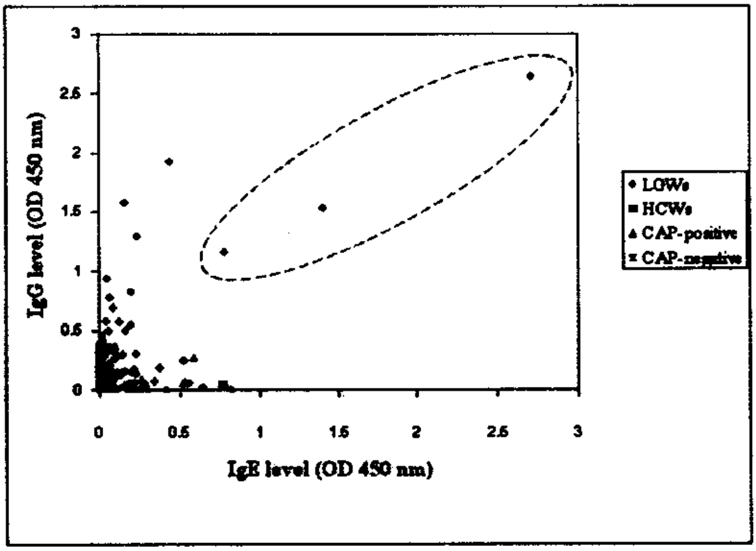
ถึงแม้โปรตีน BFM ขนาด 55 kD มีขนาดใกล้เคียงกับ Hev b 4 (50-57 kD) แต่ Hev b 4 เป็น latex allergen ชนิดที่ละลายน้ำได้ดีโดยอยู่ใน B-serum ดังนั้นโปรตีน BFM ขนาด 55 kD จึงน่าจะเป็นโปรตีนไม่ละลายน้ำชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดการแพ้ ซึ่งยังต้องทำการยืนยันโดยเทคนิคทางการโคลนนิ่งและแสดงออกต่อไป แต่เนื่องจากปริมาณโปรตีน 55 kD มีอยู่น้อยมากใน BFM ผู้วิจัยได้พยายามทำบริสุทธิ์โปรตีน 55 kD เพื่อนำไปหาลำดับกรดอมิโนเพื่อนำไปใช้สร้าง primer สำหรับโคลนนิ่ง แต่ก็ยังไม่สามารถทำได้สำเร็จ



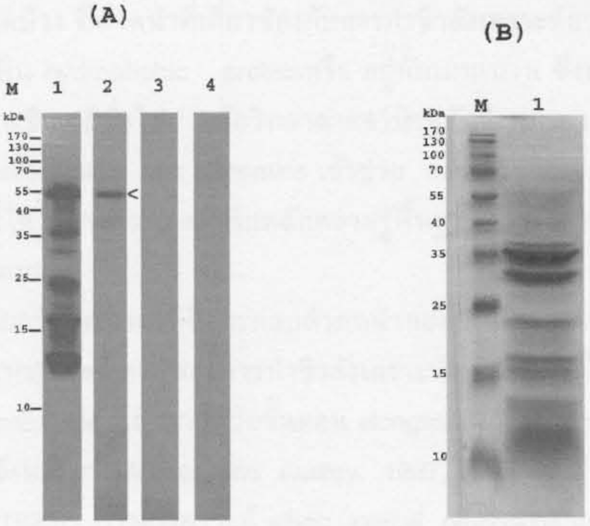
รูปที่ A.1 Relative comparison of specific IgE level from 31 CAP+, 22 CAP-, 170 LGW and 35 HCW samples by indirect ELISA. Each data point represents the specific IgE level in relation to the absorbance value at OD 450 nm. Solid horizontal lines represent the means of individual categories. These data are representative of three independent experiments. (Mengumpun et al, 2008, Appendix 2)



รูปที่ A.2 The IgG level from 31 CAP^{+}, 22 CAP^{-}, 170 LGW and 35 HCW samples was assayed by indirect ELISA. Solid horizontal lines represent the means of individual categories. These data are the representative of three independent experiments. (Mengumpun et al, 2008, Appendix 2)



รูปที่ A.3 Correlation of specific IgE and IgG levels obtained from indirect ELISA (Fig A.1 and A.2, respectively). Each data point represents an individual sample from 31 CAP^{+}, 22 CAP^{-}, 170 LGW and 35 HCW groups. LGWs no. 4, 248, 253 are shown in the ellipse area. (Mengumpun et al, 2008, Appendix 2)



รูปที่ A.4. Identification of immunoreactive allergen by co- immunoprecipitation assay (A). Protein mixtures of biotinylated BFM proteins are shown in lane 1. Fractions collected from incubation with LGW sample no. 4, CAP^{+} sample no. P1396 and CAP^{-} sample no. P2136 are shown in lanes 2, 3, and 4. Whole protein extract is shown by Coomassie Blue R250 staining in polyacrylamide gel under denaturing condition (B). BFM proteins were shown in lane. (Mengumpun et al, 2008, Appendix 2)

References:

Wititsuwannakul, R., Pasitkul, P., Jewtragoon, P., Wititsuwannakul, D. (2008a) *Hevea* latex lectin binding protein in C-serum as an anticoagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation. Phytochemistry 69, 656-662, Appendix1)

Mengumpun, K., Yayapiwatana, C., Hamilton, R.G., Sangsupawanich, P., Wititsuwannakul, R. (2008) Identification of a novel hydrophobic allergen from *Hevea brasiliensis* bottom fraction membrane. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology (final revision resubmitted, Appendix 2).