



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสารก่อภูมิแพ้ทั้งหมดจากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันที่
คนไทยแพ้ และการผลิตสารก่อภูมิแพ้สำคัญโดยพันธุวิศวกรรม

โดย ดร. (นาย) นิทัศน์ สุขรุ่ง

เดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2552

สัญญาเลขที่ MRG5080159

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสารก่อภูมิแพ้ทั้งหมดจากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันที่
คนไทยแพ้ และการผลิตสารก่อภูมิแพ้สำคัญโดยพันธวิศวรรม

ดร. (นาย) นิทัศน์ สุขรุ่ง
หน่วยเครื่องมือพิเศษเพื่อการวิจัย สถานส่งเสริมการวิจัย
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจาก ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา นักวิจัยที่ปรึกษา ซึ่งให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และสารเคมี รวมทั้งสละเวลาอันมีค่าเป็นที่ปรึกษาโครงการโดยตลอด ทำให้การวิจัยเป็นไปได้อย่างเรียบร้อย สมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง และขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. อัญชลี ตั้งตรงจิตร ที่ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกทั้งในด้านการเก็บตัวอย่างแมลงสาบ การติดต่อผู้ป่วย

ขอขอบคุณแพทย์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลศิริราชที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร

ขอขอบคุณอาสาสมัครทุกรายที่เข้าร่วมโครงการ ข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐาน และแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบในประเทศไทย

ขอขอบคุณหน่วยเครื่องมือพิเศษเพื่อการวิจัย สถานส่งเสริมการวิจัย และภาควิชาปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ เครื่องมือในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ซึ่งทำให้โครงการนี้เริ่มขึ้นได้และสำเร็จไปได้ด้วยดี

นิทัศน์ สุขรุ่ง

30 พฤศจิกายน 2552

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
บทนำ	3
วัตถุประสงค์	4
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)	4
วิธีการทดลองและผลการทดลอง	6
ขั้นตอนที่ 1 ค้นคว้าข้อมูล เก็บรวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้อง และดำเนินการ ขออนุมัติการทำ วิจัยในคน	6
ขั้นตอนที่ 2 เตรียม เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี	7
ขั้นตอนที่ 3 คัดเลือกผู้ป่วย และทำการเก็บซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและซีรัมของ คนปกติ	7
ขั้นตอนที่ 4 จับแมลงสาบและเลือกเฉพาะสายพันธุ์อเมริกันโดยหลักการกีฏวิทยา และ เตรียม crude extract โดยสกัดโปรตีนจากตัวแมลงสาบ พร้อมทั้งวัดปริมาณ โปรตีน	9
ขั้นตอนที่ 5 นำสารสกัดโปรตีนมาทำการแยกแบบสองมิติ (ทิศทาง) ด้วยวิธี Two Dimensional Gel Electrophoresis (2DE)	11
ขั้นตอนที่ 6 ทำการย้อมโปรตีนในเจลแผ่นแรกด้วยสีย้อมโปรตีน และขณะเดียวกันตรวจหา โปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ โดยวิธี 2 DE-IgE immunoblotting	13
ขั้นตอนที่ 7 ทำการ identify โปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วย ด้วยวิธี mass spectrometry และเปรียบเทียบ peptide mass maps ที่ generate ได้กับข้อมูล ใน database	15
ขั้นตอนที่ 8 ออกแบบ และสังเคราะห์ oligonucleotide primers สำหรับ amplify ยีนของสาร ก่อภูมิแพ้ที่สำคัญ	18
ขั้นตอนที่ 9 สกัด total RNA จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน และเตรียม first stand cDNA	18
ขั้นตอนที่ 10 ทำการเพิ่มปริมาณ gene(s) ด้วยวิธี PCR	18
ขั้นตอนที่ 11 ทำการ clone gene(s) เข้าสู่ cloning vector หลังจากตรวจสอบความถูกต้อง ของ gene sequence(s) แล้ว clone gene(s) ดังกล่าวเข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม	23

ขั้นตอนที่ 12 การเตรียม GST recombinant protein ของแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน	23
ขั้นตอนที่ 13 การเตรียม GST native protein จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน	26
ขั้นตอนที่ 14 ทำการตรวจสอบภาวะการเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ GST จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยวิธี IgE-immunoblotting	26
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	33
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและคณะกรรมการอุดมศึกษา	34
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	40

รายการรูปและตาราง

	หน้า
รูปที่ 1: Standard Curve of Bovine Serum Albumin (BSA) by using 2D Quant kit	10
รูปที่ 2: แสดงองค์ประกอบโปรตีนของ American cockroach extract ซึ่งแยกโปรตีนโดยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	12
รูปที่ 3: Proteomic pattern ของ American cockroach extract จากการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค two dimensional gel electrophoresis (2 DE) at non-linear pH 3-10	14
รูปที่ 4: แสดงผลการตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ โดยวิธี 2 DE-IgE immunoblotting	16
รูปที่ 5: PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ tropomyosin-coding sequence	19
รูปที่ 6: PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ tropomyosin-coding sequence	21
รูปที่ 7: แสดงลำดับ nucleotides และ deduced amino acid ของ GST ในการศึกษา	22
รูปที่ 8: PCR amplicons ของ full-length GST โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ GST sequences	24
รูปที่ 9: Recombinant plasmids ที่สกัดจาก transformed <i>E. coli</i> clones หลังตัดด้วย restriction endonucleases	25
รูปที่ 10: SDS-PAGE ของ affinity column purified-recombinant GST protein	27
รูปที่ 11: SDS-PAGE ของ affinity column purified-native GST protein	28
รูปที่ 12: แสดงการทดสอบ Enzymatic activities ของ native GST (nGST) และ recombinant GST (rGST) โปรตีน	29
รูปที่ 13: IgE-Immunoblot patterns ของ native GST (A) และ recombinant GST (B) หลังจากทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและคนปกติ	31

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบการแพ้แมลงสาบทางผิวหนัง (skin prick test) และ ตรวจค่า specific IgE ต่อสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันใน ซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและซีรัมของคนปกติ	8
ตารางที่ 2 แสดงชนิดของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วย ด้วยวิธี mass spectrometry และเปรียบเทียบ peptide mass maps ที่ generate ได้กับข้อมูลใน database	17

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5080159

ชื่อโครงการ: การศึกษาสารก่อภูมิแพ้ทั้งหมดจากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันที่คนไทยแพ้ และการผลิตสารก่อภูมิแพ้สำคัญโดยพันธุวิศวกรรม

ชื่อนักวิจัย: ดร. (นาย) นิทัศน์ สุขรุ่ง
หน่วยเครื่องมือพิเศษเพื่อการวิจัย สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล: sinsru@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

ปัจจุบันโรคภูมิแพ้และภาวะความเจ็บป่วยจากโรคภูมิแพ้เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญทั่วโลกสำหรับประเทศไทยประมาณร้อยละ 10 ของประชากร มีภาวะความเจ็บป่วยจากโรคภูมิแพ้ สาเหตุที่สำคัญในการก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้คือ ฝุ่นบ้าน ซึ่งส่วนประกอบที่สำคัญที่สามารถกระตุ้นให้เกิดโรคภูมิแพ้ได้คือสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบ ในประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบมากกว่าร้อยละ 50 ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ทั้งหมด ซึ่งเกิดจากการแพ้ต่อสารก่อภูมิแพ้ของแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน คือ *Periplaneta americana* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ชุกชุมที่สุดในประเทศไทย ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานเกี่ยวกับสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบยังมีน้อยมาก งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสารก่อภูมิแพ้ทั้งหมดจากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบที่ผู้ป่วยคนไทยแพ้ และทำการผลิตสารก่อภูมิแพ้มาตรฐานโดยวิธีพันธุวิศวกรรมสำหรับตรวจกรองผู้ป่วยจากการใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์พบว่ามีโปรตีนอย่างน้อย 12 ชนิดที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สามารถกระตุ้นให้ผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบให้สร้างไอจีอีต่อโปรตีนดังกล่าว จากการเตรียม native และ recombinant Glutathione-S-transferase (GST) allergen ซึ่งเป็น pan-insect allergen ด้วยวิธี affinity purification และ gene cloning ในการทดสอบความเป็นสารก่อภูมิแพ้โดยวิธี IgE-immunoblotting พบว่า IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบสามารถทำปฏิกิริยากับ native GST และ recombinant GST จำนวน 93.3 % และ 73.3 % ตามลำดับ และไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนปกติ ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีรายงานที่ GST ทั้งในรูปของ native และ recombinant โปรตีนของแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ

คำหลัก: แมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน สารก่อภูมิแพ้ โปรตีโอมิกส์ แอลเลอร์จีโนม ไอจีอี อิมมูโนบอตติง ยีนโคลนนิ่ง รีคอมบิแนนท์ โปรตีน

Abstract

Project Code: MRG5080159

Project Title: Allergenomics of American cockroach, *Periplaneta americana*, among Thais and production of recombinant major cockroach allergen

Investigator: Dr. (Mr.) Nitat Sookrung

Division of Instruments for Research, Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

E-mail Address: sinsru@mahidol.ac.th

Project Period: 2 Years

Allergy has become a major health problem worldwide. For Thailand approximately 10% of people have allergic diseases. Hypersensitivity to house dust has been recognized as an important cause of allergic rhinitis and asthma. As an indoor aeroallergen component of house dust, cockroach antigens can trigger allergies and asthma. In Thailand American cockroach (CR), *Periplaneta americana* is predominant CR species in the country. Cockroach allergy showed high percentage of incidence (>50%) among the allergic Thais. Basic information and research data are lacking in Thailand on several attributes about cockroaches. In this study, Proteomics and 2DE-immunomics have revealed at least 12 allergenic protein of American cockroach that bound to IgE in Thai allergic patients' sera. Glutathione-S-transferase (GST) enzyme was chosen for allergenic determination because it is the pan-insect allergen. GST was construction and purification in the form of native and recombinant proteins. Native and recombinant GST were found to bind to IgE in sera of 93% and 73% of CR allergic Thais who were positive by skin test to the CR crude extract, respectively by IgE-immunoblotting. Both GST preparations did not react to sera of non-allergic individuals. The *P. americana* GST is a novel allergen among the CR allergic Thais. The information is useful for screening, monitoring and developing intervention as well as immunotherapeutic measures for the allergic patients.

Keywords: *Periplaneta americana*, allergen, Proteomics, Allergenome, IgE-Immunoblotting, gene cloning, recombinant protein

บทนำ

ปัจจุบันโรคภูมิแพ้และภาวะความเจ็บป่วยจากโรคภูมิแพ้มีอุบัติการณ์ที่เพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย โรคภูมิแพ้เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุแต่พบว่าสารก่อภูมิแพ้ที่พบในบ้าน (indoor allergens) เป็นสาเหตุสำคัญที่สุด สารก่อภูมิแพ้เหล่านี้ได้แก่ สารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่น แมลงสาบ ฝุ่นบ้าน ขนและรังแคของสัตว์เลี้ยง ฝุ่นจากผ้าและหุ่น เป็นต้น ซึ่งสารก่อภูมิแพ้จากตัวแมลงสาบนับว่าเป็นสาเหตุสำคัญในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทย ข้อมูลที่มีในปัจจุบันบ่งชี้ว่า สารเหล่านี้มาจากส่วนต่างๆทั้งตัวแมลงสาบเอง จากสิ่งขับถ่าย และจากสารคัดหลั่งของแมลงสาบด้วย การสัมผัสและการถูกกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบเป็นสาเหตุให้เกิดอาการของโรคภูมิแพ้ในเวลาต่อมา ซึ่งอาการแพ้อาจมีเพียงเล็กน้อย เช่นคันที่ผิวหนัง คันคอ คันตา และจาม น้ำมูก-น้ำตาไหล ไปจนถึงอาการรุนแรงคือ หอบหืดและหายใจไม่ออก จนต้องไปโรงพยาบาลอย่างฉุกเฉิน หรือเข้ารับรักษาตัวในโรงพยาบาล ในบางรายอาการรุนแรงมากจนถึงเสียชีวิตก่อนไปถึงโรงพยาบาล โรคหอบหืดที่มีสาเหตุจากการแพ้แมลงสาบมักเกิดได้ตลอดปี และไม่เป็นที่ไปตามฤดูกาลเหมือนภูมิแพ้จากสาเหตุอื่นๆ เช่น การแพ้ละอองเกสรหญ้าและดอกไม้ โรคภูมิแพ้แมลงสาบมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมอย่างมาก เพราะนอกจากผู้ป่วยต้องได้รับการเยียวยาอย่างต่อเนื่องแล้ว ยังทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตลดลงและมีประสิทธิภาพในการทำกิจกรรมประจำวัน และการทำงาน หรือสมรรถภาพในการศึกษาต่ำกว่าคนปกติ

ในประเทศไทย พบว่ามีผู้ป่วยโรคภูมิแพ้เพิ่มขึ้นมากเช่นเดียวกับประเทศอื่นๆ โดยมีผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบมากกว่าร้อยละ 50 ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม แมลงสาบที่ชุกชุมที่สุดในประเทศไทยเป็นแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน คือ *Periplaneta americana* ซึ่งแตกต่างจากของประเทศในแถบตะวันตกและบางประเทศในเอเชียที่แมลงสาบส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์เยอรมัน คือ *Blattella germanica*

ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคภูมิแพ้แมลงสาบทำได้โดยการฉีดสารก่อภูมิแพ้เข้าผิวหนัง การตรวจสภาวะการแพ้ของผู้ป่วยและการฉีดสารก่อภูมิแพ้เข้าผิวหนังของผู้ป่วยที่ละน้อยเป็นเวลานานเพื่อการรักษา มักใช้สารสกัดหยาบ (crude extract) จากแมลงสาบ จึงขาดมาตรฐานทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของสารก่อภูมิแพ้ในแต่ละชุดที่เตรียมแต่ละครั้ง การตรวจวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้ในบ้านเรือนของผู้ป่วยซึ่งเป็นมาตรการสำคัญในการป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยสัมผัสสารก่อภูมิแพ้และเกิดอาการของโรค มักใช้ชุดตรวจสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศและมักมีความเฉพาะต่อแมลงสาบสายพันธุ์เยอรมัน จึงทำให้ขาดความแม่นยำ ยิ่งไปกว่านั้น ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานเกี่ยวกับสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบก็ยังมีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาถึงสารก่อภูมิแพ้ชนิดต่างๆ จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันจึงเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์มากในการป้องกันและดูแลรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ และการผลิตสารก่อภูมิแพ้มาตรฐานโดยวิธีพันธุวิศวกรรมสำหรับตรวจสอบผู้ป่วยก็ย่อมจะทำให้การตรวจสภาวะภูมิแพ้ในผู้ป่วยมีความเที่ยงตรงมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้คือ (1) การศึกษาสารก่อภูมิแพ้ทั้งหมดจากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยใช้เทคนิคโปรตีนอิมมูโนมิกซ์และอิมมูโนมิกซ์ เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบที่ผู้ป่วยคนไทยแพ้ (2) เมื่อทราบข้อมูลดังกล่าวแล้ว จะทำการผลิต recombinant allergen(s) ที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญด้วยเทคนิค Molecular cloning, Genetic engineering และ Gene expression technology เพื่อใช้เป็นสารก่อภูมิแพ้มาตรฐานที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบต่อไป

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

มีรายงานจากทั่วโลกในช่วง 30 ปีที่ผ่านมาพบว่า โรคภูมิแพ้และภาวะความเจ็บป่วยจากโรคภูมิแพ้มีอุบัติการณ์ที่เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา อัตราของผู้ป่วยภูมิแพ้สูงขึ้นทุกปี ถึงแม้ว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยน้อยกว่าเมื่อเทียบกับผู้ป่วยในประเทศทางตะวันตก⁽¹⁾ ในประเทศไทยอัตราความชุกของโรคหอบหืดพบเพียงร้อยละ 4.2 ของผู้ป่วยทั้งหมดในปีพ.ศ. 1992⁽²⁾ แต่ผลการศึกษาในปี 1998 โดยศึกษาตามมาตรฐานของ International Study for Asthma and Allergy in Children (ISAAC) พบว่าค่าความชุกแบบ cumulative และ period prevalence ของโรคหอบหืด (asthma) เป็นร้อยละ 18.3 และ 12.7 ตามลำดับ โรคภูมิแพ้ทางจมูก (allergic rhinitis) เป็นร้อยละ 44.2 และ 38.7 ตามลำดับ และโรคผื่นภูมิแพ้ทางผิวหนัง (allergic dermatitis; eczema) เป็นร้อยละ 15.4 และ 14 ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโรคภูมิแพ้ในประเทศไทยเป็นโรคที่พบได้บ่อยและมีแนวโน้มสูงมากขึ้นเรื่อยๆ⁽³⁾ โรคภูมิแพ้เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุแต่พบว่าสารก่อภูมิแพ้ที่พบในบ้าน (indoor allergens) เป็นสาเหตุสำคัญที่สุด สารก่อภูมิแพ้เหล่านี้ได้แก่ สารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่น แมลงสาบ ฝุ่นบ้าน ขนและรังแคของสัตว์เลี้ยง ฝุ่นจากผ้าและนุ่น เป็นต้น

ปัจจุบันพบว่าสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ที่สำคัญมากชนิดหนึ่ง มีรายงานมานานกว่า 30 ปีว่า ภาวะภูมิแพ้แมลงสาบก่อให้เกิดโรคหอบหืด allergic rhinitis และ eczema โดย Bernton และ Brown ได้ทำการศึกษาเป็นครั้งแรกที่คลินิกโรคภูมิแพ้ นครนิวยอร์ก ในผู้ป่วย 755 รายด้วยการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนัง (skin prick test) พบว่าร้อยละ 44 ให้ผลบวกต่อสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบ (cockroach allergen) และร้อยละ 13 ของผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะภูมิแพ้สามารถถูกกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบ จนทำให้เกิดการแพ้ได้⁽⁴⁾ ต่อมา Bernton และคณะได้ทดลองศึกษา bronchial challenge ในผู้ป่วย 10 ราย โดยให้สูดดมสารสกัดจากแมลงสาบ พบว่าทำให้เกิดภาวะหอบหืดเฉียบพลันและยังพบว่าภายใน 24-48 ชม. หลังการสูดดมจะพบเม็ดเลือดขาว eosinophil เพิ่มขึ้นในกระแสเลือด⁽⁵⁾ ในสหรัฐอเมริกาได้มีการศึกษาทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ในรัฐต่างๆ พบว่าอัตราการเกิดโรคภูมิแพ้ต่อสารแพ้แมลงสาบแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 17-60 โดยพบได้ทั้งในเขตชุมชนเมืองใหญ่ เขตชานเมืองและเขตชนบท⁽⁶⁻¹⁰⁾ ในปี ค.ศ. 1977 Rosensterith และคณะพบว่าเด็กที่แพ้ต่อสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบจะเกิดการตอบสนองแบบเฉียบพลันและรุนแรงกว่าการแพ้ต่อไรฝุ่น⁽¹¹⁾

Choovivathanavanich ได้ทำการศึกษาโรคภูมิแพ้แมลงสาบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2513 ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนังในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ทางจมูก พบว่าให้ผลบวกต่อสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบร้อยละ 77.5⁽¹²⁾ จนถึงใน พ.ศ. 2540 Kraissarin และคณะได้ศึกษาสารก่อภูมิแพ้ในอากาศ (aeroallergen) ในเด็กที่เป็นโรคหอบหืดพบว่าร้อยละ 18 มีปฏิกิริยาทางผิวหนังต่อสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบ⁽¹³⁾ ในขณะที่ Kongpanichkul and Vichyanond (1997) รายงานว่าร้อยละ 44 ของผู้ป่วยเด็กโรคหอบหืดมีปฏิกิริยาทางผิวหนังต่อสารสกัดแมลงสาบ (cockroach extract) ซึ่งพบมากเป็นอันดับสองรองจากการแพ้ไรฝุ่น⁽¹⁴⁾ เช่นเดียวกับที่พบในกรุงแมดริด ประเทศสเปน⁽¹⁵⁾

ในปี พ.ศ. 2524 Asahina และ Hasegawa (1981) ได้สำรวจแมลงสาบใน 5 หมู่บ้านของจังหวัดจันทบุรี พบแมลงสาบที่อาศัยอยู่ในบ้านและโรงเก็บพืชผลมี 8 ชนิด⁽¹⁶⁾ ต่อมา Asahina ได้ทำการสำรวจแมลงสาบในบ้านเรือนโดยการศึกษาตัวอย่างแมลงจากจังหวัดจันทบุรี และกรุงเทพฯ รายงานว่าแมลงสาบที่พบในประเทศไทยมี 10 สายพันธุ์⁽¹⁷⁾ ในปี พ.ศ. 2527 สุวัฒนา จีงวิวัฒนาภรณ์ ได้ศึกษานุกรมวิธานของแมลงสาบตามชุมชนในบางจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามีแมลงสาบ 9 สายพันธุ์⁽¹⁸⁾ โดยมีบางสายพันธุ์แตกต่างจากที่รายงานโดย Asahina

นิภา เบญจพงศ์และคณะได้ทำการสำรวจชนิดและความรุนแรงของแมลงสาบในโรงพยาบาล 4 แห่งในภาคกลางของประเทศไทย พบแมลงสาบ 5 ชนิด คือ *Periplaneta americana* ร้อยละ 44.9, *Blattella germanica* ร้อยละ 8.1, *P. brunnea* ร้อยละ 2.4, *Neostylopyga rhombifolia* ร้อยละ 0.5, *Nauphoeta cinerea* ร้อยละ 0.02 และตัวอ่อนแยกชนิดไม่ได้ร้อยละ 43.9 แหล่งที่พบมากที่สุด ในโรงพยาบาลคือ ร้านขายอาหาร โรงเก็บข้าวสารและห้องเก็บของ⁽¹⁹⁾ ซึ่งสอดคล้องกับผลการสำรวจโดยกองกีฏวิทยา กระทรวงสาธารณสุข ที่ทำการสำรวจในบ้านพักอาศัยทั่วไป 14 จังหวัดในประเทศไทย แมลงสาบชนิดที่พบสูงสุดคือ *P. americana* แตกต่างกับที่พบ *B. germanica* เพียงร้อยละ 0.6⁽²⁰⁾

ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานเกี่ยวกับสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบจากต่างประเทศ และในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมาก ในปี พ.ศ. 2546 นิทัศน์ สุขรุ่ง และคณะได้ทำการผลิต hybridoma clones ซึ่งสร้างและหลั่ง monoclonal antibody เฉพาะต่อสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันคือ clone 3C2 และ clone 38G6 หลังจากนั้นได้เตรียมสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบที่เฉพาะกับแอนติบอดีทั้งสองด้วยวิธี affinity chromatography แล้วนำไปทดสอบความเป็นสารก่อภูมิแพ้ด้วยวิธี P-K test พบว่าทั้งสองโมเลกุลเป็นสารก่อภูมิแพ้⁽²¹⁾

จากการศึกษาวิจัยโดยการสำรวจหาสายพันธุ์แมลงสาบและปริมาณสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบในบ้านผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ 60 หลังคาเรือนในเขตกรุงเทพมหานคร เพื่อหาความสัมพันธ์กับการเกิดโรคภูมิแพ้โดยการสัมภาษณ์ ดักเก็บแมลงสาบและตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบจากห้องนอน ห้องนั่งเล่น และห้องครัว พบว่าแมลงสาบที่ดักเก็บได้มีทั้งหมด 6 ชนิด คิดเป็นอัตราความชุกดังนี้ *Periplaneta americana* ร้อยละ 72.2, *Supella longipalpa*, ร้อยละ 2.8 และ *P. brunnea* ร้อยละ 0.8, *P. australasiae* ร้อยละ 0.8, *Neostylopyga*

rhombifolia 0.8, *B. germanica* ร้อยละ 0.4 และ nymph ร้อยละ 23.2 สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ *P. americana* และพบมากที่สุดในห้องครัว การตรวจวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบในฝุ่นบ้านผู้ป่วย โดยใช้ monoclonal antibodies จาก hybridoma clone 3C2 ที่มีความจำเพาะกับสารก่อภูมิแพ้ Per a1 พบว่าใช้ได้ผลดี และสามารถตรวจพบสารก่อภูมิแพ้จาก *P. americana* ได้ในทุกบ้าน แต่ตรวจไม่พบสารก่อภูมิแพ้จาก *B. germanica* เลย ปริมาณสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบในฝุ่นบ้านที่ตรวจพบได้ตั้งแต่ 0.40-162.00 µg per 1 g of dust และพบปริมาณค่าเฉลี่ยสารก่อภูมิแพ้สูงสุดในห้องครัว 59.16 µg และค่ามัธยฐาน 62.80 µg per 1 g of dust โดยพบค่ามัธยฐานของปริมาณสารก่อภูมิแพ้ในฝุ่นของห้องนอนเพียง 15.90 µg per 1 g of dust⁽²²⁾

พรพรรณ ตีระพัฒน์ และคณะ⁽²³⁾ ได้ทำการผลิตสารก่อภูมิแพ้สำคัญคือ Per a 1.0105 โดยใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม และพบว่า recombinant Per a 1.0105 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 124 ตัว มีขนาดโมเลกุล 13.8 KDa และมี isoelectric point 4.74 โดยผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบคนไทยที่นำมาทดสอบทุกรายแพ้ต่อสารก่อภูมิแพ้ชนิดนี้

ในปี พ.ศ. 2549 นิทัศน์ สุขรุ่ง และคณะ ได้ทำการศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยใช้เทคนิค peptide phage display และเทคนิคการแยกโปรตีนแบบสองมิติ (two dimensional gel electrophoresis; 2DE) ได้พบว่ามีโมโตป (mimotope) และเอพิโทป (epitope) ของ monoclonal antibody จาก hybridoma clone 38G6 ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันคือ โปรตีน arginine kinase ของแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน และโปรตีน arginine kinase นี้จับกับ IgE antibody ในซีรัมของผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นโรคภูมิแพ้แมลงสาบทุกรายที่นำมาทดสอบ แสดงว่าโปรตีน arginine kinase เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทย⁽²⁴⁾

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 ค้นหาข้อมูล เก็บรวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้อง และดำเนินการ ขออนุมัติการทำวิจัยในคน

การรวบรวมข้อมูลและการติดต่อประสานงาน

ทำการรวบรวมงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสารก่อภูมิแพ้ทั้งหมดจากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันที่คนไทยแพ้ และการผลิตสารก่อภูมิแพ้สำคัญโดยพันธุวิศวกรรม ติดต่อกับหน่วยตรวจโรคภูมิแพ้ภาควิชาโสต นาสิก ลาริงซ์วิทยา โรงพยาบาลศิริราช เพื่อขอความอนุเคราะห์เก็บซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและซีรัมของคนปกติ รวมทั้งทำการขออนุญาตคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เพื่อทำการเก็บตัวอย่างโลหิตจากอาสาสมัครที่เป็นโรคภูมิแพ้แมลงสาบ และคนปกติ จำนวน 20 ราย

การดำเนินการขออนุมัติการทำวิจัยในคน

ได้รับการพิจารณารับรองการทำวิจัยในคนจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ในวันที่ 11 มิถุนายน 2551 (เอกสารแนบหมายเลข 1) ซึ่ง

หลังจากที่ได้รับการอนุมัติแล้ว ได้ดำเนินการคัดเลือกผู้ป่วย และทำการเก็บซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและซีรัมของคนปกติ จากอาสาสมัครที่หน่วยตรวจโรคภูมิแพ้ภาควิชาโสต นาสิก ลาริงซ์ โรงพยาบาลศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

ขั้นตอนที่ 2 เตรียม เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

เริ่มจากผู้วิจัยได้เลือกและจัดซื้อวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ สำหรับการวิจัย เช่น วัสดุวิทยาศาสตร์และสารเคมี: น้ำยา และสารเคมีสำหรับการสกัดสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบ เช่น extraction buffer น้ำยา และสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Iso-electric focusing และ SDS-PAGE เช่น IPG strips pH 3-10 NL และ narrow pH, IPG buffer, Tris buffer, Acrylamide/Bis solution, Ammonium persulfate, TEMED, Coomassie Brilliant Blue dye, nitrocellulose membrane, Bradford reagent, 2D Quant kit, BSA น้ำยา และสารเคมีสำหรับใช้ในทางอณูชีววิทยา เช่น Taq และ pfu DNA polymerases, TAE buffer, agarose, cloning kits, bacterial culture media, RT-PCR kit, plasmids Corning 430052 centrifuge tubes ขนาด 50 และ 15 ml, PCR tips, PCR tubes, microcentrifuge tubes ต่างๆ disposable micropipette tips น้ำยาฆ่าเชื้อ detergent ถุงมือ masks แว่นตาสำหรับห้องปฏิบัติการ และ อื่นๆ วัสดุสำนักงาน เช่น กระดาษ A4 หมึกพิมพ์ floppy disks ปากกา สมุดบันทึกผลการทดลอง เทป กาว เทปใส และ อื่นๆ

ขั้นตอนที่ 3 คัดเลือกผู้ป่วย และทำการเก็บซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและซีรัมของคนปกติ

ดำเนินการเก็บซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบจำนวน 15 ราย และซีรัมของคนปกติ 5 ราย ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

ดำเนินการทดสอบการแพ้แมลงสาบทางผิวหนัง (skin prick test) และตรวจค่า specific IgE ต่อสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและซีรัมของคนปกติ

จากการทดสอบทางผิวหนังของผู้ป่วยที่คลินิกโรคภูมิแพ้ พบว่าผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบทุกรายมีผลการทดสอบเป็น positive และไม่พบอาการแพ้ในคนปกติ ดังแสดงใน ตารางที่ 1

จากการตรวจค่า specific IgE ต่อสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและซีรัมของคนปกติ โดย ImmunoCAP Specific IgE blood test พบว่าสามารถตรวจหาค่า specific IgE ต่อสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ได้ในช่วง $< 0.35 - 2.68$ KUA/L ซึ่งบางรายมีค่า specific IgE อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับคนปกติ ดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบการแพ้แมลงสาบทางผิวหนัง (skin prick test) และตรวจค่า specific IgE ต่อสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและซีรัมของคนปกติ

No.	Skin Prick Test (mm)	Specific IgE (หน่วย KUA/L)
S1	6 x 4 / 20 x 10	< 0.35
S2	3 x 3 / 30 x 20	< 0.35
S3	3 x 2 / 15 x 15	2.33
S4	6 x 4 / 20 x 25	2.59
S5	4 x 4 / 10 x 15	< 0.35
S6	3 x 3 / 13 x 15	< 0.35
S7	3 x 3 / 10 x 12	< 0.35
S8	2 x 2 / 10 x 15	< 0.35
S9	3 x 3 / 12 x 15	< 0.35
S10	3 x 3 / 15 x 20	< 0.35
S11	3 x 3 / 10 x 20	< 0.35
S12	2 x 3 / 20 x 20	0.72
S13	3 x 5 / 12 x 20	2.68
S14	5 x 7 / 20 x 27	< 0.35
S15	3 x 3 / 22 x 33	< 0.35
N1	-	< 0.35
N2	-	< 0.35
N3	-	< 0.35
N4	-	< 0.35
N5	-	< 0.35

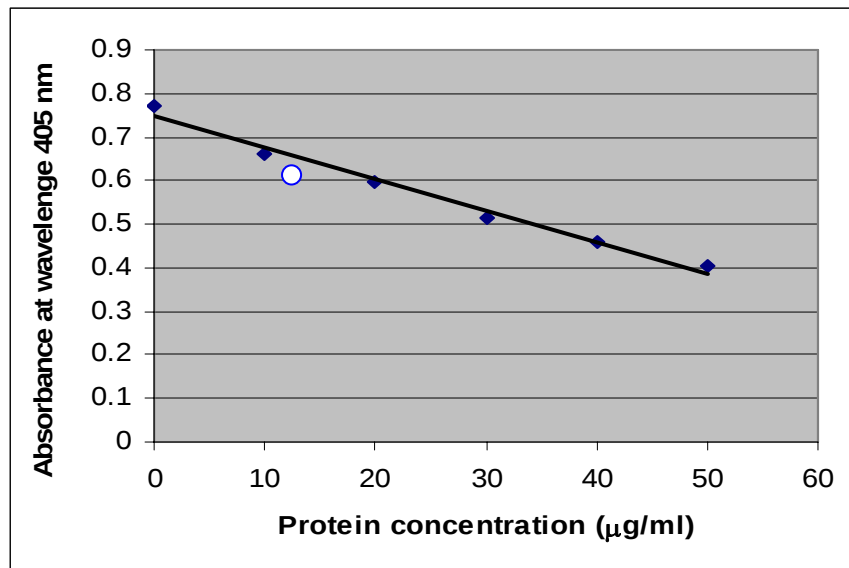
ขั้นตอนที่ 4 จับแมลงสาบและเลือกเฉพาะสายพันธุ์อเมริกันโดยหลักการกีฏวิทยา และเตรียม crude extract โดยสกัดโปรตีนจากตัวแมลงสาบ พร้อมทั้งวัดปริมาณโปรตีน

การสกัดโปรตีนจากตัวแมลงสาบ

ทำการจับแมลงสาบจากบ้านเรือนและเลือกเฉพาะสายพันธุ์อเมริกันระยะตัวเต็มวัย เพื่อนำมาเตรียม crude extract โดยสกัดโปรตีนทั้งหมดจากตัวแมลงสาบด้วยใช้ที่บดเนื้อเยื่อ (tissue grinder) บดตัวแมลงสาบในไนโตรเจนเหลว แล้ว solubilize โปรตีนต่าง ๆ ใน lysis buffer หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีน

เตรียม Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 mg/ml เพื่อทำ standard curve นำ cockroach extract ที่เตรียมไว้ มา dilute ที่ 1:20 แล้ววัดปริมาณโปรตีน BSA และ cockroach extract โดยใช้ 2D Quant kit (Amersham Biosciences, CA, USA) จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (GE Health Care, USA) ที่ความยาวคลื่น 405 nm ค่าความเข้มของการดูดกลืนแสงแปรผกผันกับความเข้มข้นของโปรตีน ซึ่งผลการวัดปริมาณโปรตีนทั้ง standard และสารสกัดแมลงสาบได้แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1: Standard Curve of Bovine Serum Albumin (BSA) by using 2D Quant kit

○ ปริมาณโปรตีนของ American cockroach extract คือ 6.29 mg/ml (total proteins ~31.45 mg/แมลงสาบ 1 ตัว)

ขั้นตอนที่ 5 นำสารสกัดโปรตีนมาทำการแยกแบบสองมิติ (ทิศทาง) ด้วยวิธี Two Dimensional Gel Electrophoresis (2DE)

การแยกองค์ประกอบโปรตีนด้วย one dimensional electrophoresis (1 DE) (SDS-PAGE)

นำ cockroach extract ปริมาณ 15 μ g ไปผสมกับ loading buffer ที่ประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) และ β -mercaptoethanol หลังจากนั้น incubated ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ปั่นส่วนผสมดังกล่าวที่ 12,000 x g, 4°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ละลายออกไป จากนั้นแยกโปรตีนใน 12% SDS-polyacrylamide gel ขนาด 8.0 x 7.3 cm โดยใช้ Mini PROTEAN® 3 Cell และ Basic™ PowerPac device (Bio-Rad, CA, USA) หลังจากนั้นย้อมโปรตีนบน gel ด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250

ผลการการแยกองค์ประกอบโปรตีนด้วย one dimensional electrophoresis (1 DE)

รูปที่ 2 แสดงผลการแยกโมเลกุลโปรตีนของ cockroach extract ด้วย SDS-PAGE พบว่าเมื่อแยกโปรตีนภายใต้ภาวะ reducing condition โมเลกุลโปรตีนมีมวล [relative molecular masses (Mr)] อยู่ระหว่าง ~6 ถึง >190 (lane A) และเป็นทั้ง discrete และ diffuse bands

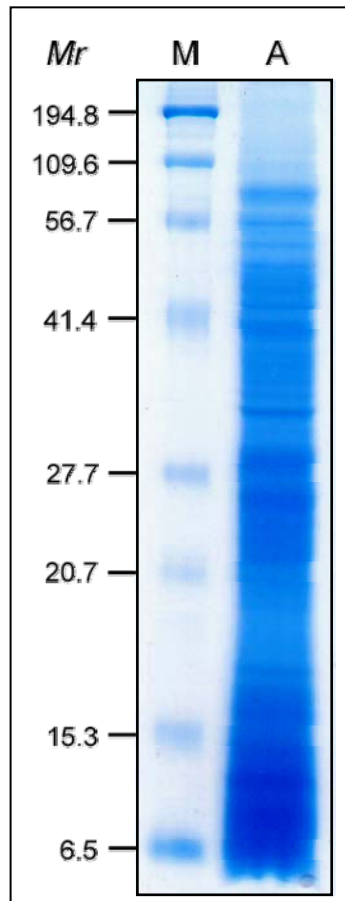
การแยกองค์ประกอบโปรตีนแบบสองมิติ

การเตรียม cockroach extract สำหรับ 2 DE

นำ cockroach extract ไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ละลายออกไป จากนั้นเตรียมโปรตีนใน cockroach extract ให้สะอาดโดยกำจัดเกลือต่าง ๆ โดยใช้ 2D Clean-Up kit (Amersham Biosciences, CA, USA) ซึ่งใช้หลักการตกตะกอนโปรตีน หลังจากนั้นนำตะกอนโปรตีนไปละลายใน DeStreak™ Rehydration solution (Amersham Biosciences) ซึ่งเป็น buffer สำหรับการทำให้ 2 DE โดยเฉพาะ โดยส่วนที่ไม่ละลายใน buffer ได้ถูกกำจัดออกไปด้วยการปั่นด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

การแยกองค์ประกอบโปรตีนด้วย 2 DE

ทำการแยกโปรตีนใน cockroach extract ในมิติแรก (first dimensional gel electrophoresis) ตามความแตกต่างของค่า pI ของโปรตีนต่าง ๆ ในสารสกัดจากแมลงสาบ โดยใช้ IPG strip (Amersham Biosciences) ชนิดสำหรับโปรตีนที่มี pI เท่ากับ 3 ถึง 10 (non-linear) ขนาดความยาวของ strip เท่ากับ 7 ซม. โดยใช้เครื่อง Ettan IPG Phor Electrofocusing System (Amersham Biosciences) โดยตั้งโปรแกรมตามคำแนะนำของผู้ผลิตเครื่อง



รูปที่ 2: แสดงองค์ประกอบโปรตีนของ American cockroach extract ซึ่งแยกโปรตีนโดยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Lane A; American cockroach extract

Lane M; Prestained Broad Range standard

การแยกโปรตีนในมิติที่สอง (second dimensional gel eletrophoresis) ตามความแตกต่างของ molecular sizes ด้วย SDS-PAGE โดยนำ IPG strip จากการแยกด้วยมิติแรกไป equilibrate ใน reduction buffer ที่ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30 % (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.002 % bromophenol blue และ 1% (w/v) dithiothreitol (DTT) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นได้ equilibrate IPG strip อีกครั้งใน alkylation buffer ที่ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30 % (v/v) glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0.002 % bromophenol blue และ 2.5% (w/v) iodoacetamide ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วแยกโปรตีนใน IPG strip ด้วย SDS-PAGE โดยใช้ 12 % polyacrylamide gel ขนาด 8.0 x 7.3 ซม. และย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250

ขั้นตอนที่ 6 ทำการย้อมโปรตีนในเจลแผ่นแรกด้วยสีย้อมโปรตีน และขณะเดียวกัน
ตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ โดยวิธี 2 DE-
IgE immunoblotting

ดำเนินการย้อมโปรตีนเจลภายหลังการแยกองค์ประกอบโปรตีนด้วย 2 DE โดยใช้สีย้อมโปรตีนCoomassie Brilliant Blue G-250 ทำการย้อมเจลข้ามคืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) หลังจากนั้นทำการ destain gel ด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่งพื้นหลัง (background) ของเจลใส และเห็นโปรตีนย้อมติดสีน้ำเงินม่วง

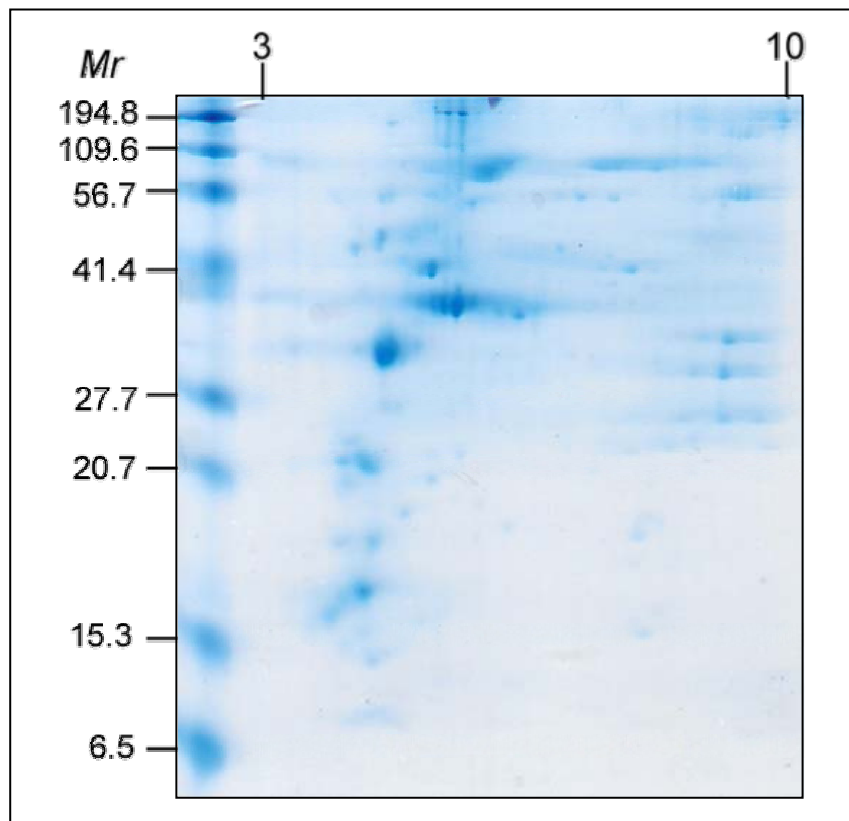
รูปที่ 3 แสดงผลการแยกโมเลกุลโปรตีนของ cockroach extract ด้วย 2 DE พบว่าโปรตีนต่าง ๆ มีมวล [relative molecular masses (*Mr*)] อยู่ระหว่าง ~6 ถึง >190 และ *pI* อยู่ในช่วง 3-10

การถ่ายโปรตีนจาก 2DE เจล ไปสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส

ดำเนินการถ่ายโปรตีนของ cockroach extract ลงแผ่นไนโตรเซลลูโลส (NC) ด้วยเครื่อง Mini-transblot tank (Bio-Rad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำแผ่น NC ที่มี cockroach extract ไปทำการตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ โดยวิธี 2DE-IgE immunoblotting

การตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ โดยวิธี 2DE-IgE immunoblotting

นำแผ่น NC ที่มี cockroach extract มา block ที่ว่างบน NC โดยจุ่ม NC ใน solution ของ 3% bovine serum albumin ใน TBS ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 3 ครั้งเติมซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ หรือซีรัมของคนปกติลงไป จนท่วมแผ่น NC ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน ล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง จุ่มแผ่น NC ลงในสารละลาย 1:1,000 diluted-mouse monoclonal anti-human IgE antibody ใน washing



รูปที่ 3: Proteomic pattern ของ American cockroach extract จากการแยกโปรตีนด้วย
เทคนิค two dimensional gel electrophoresis (2 DE) at non-linear pH 3-10

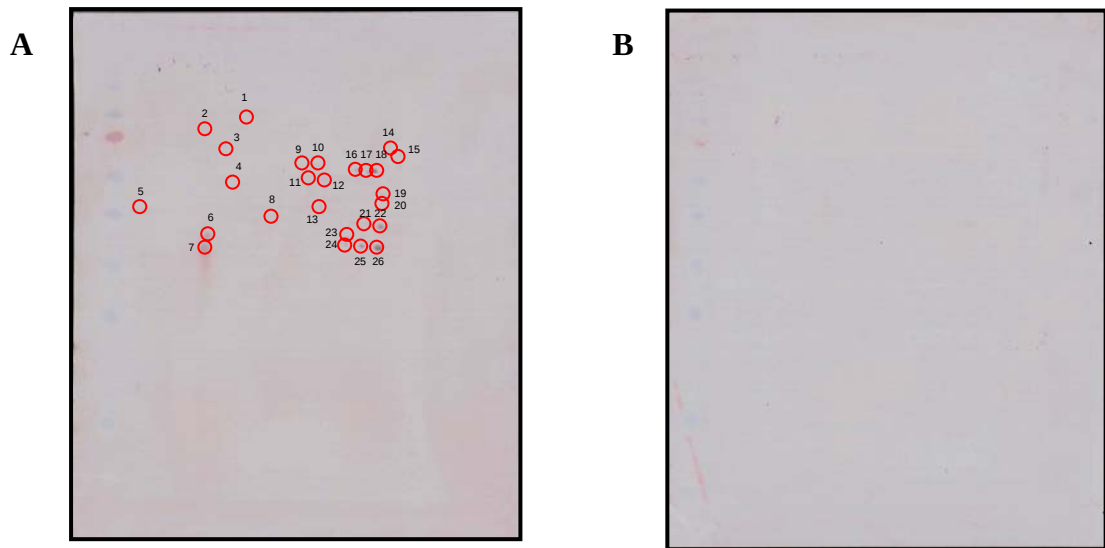
buffer ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง NC ด้วย washing buffer 3 ครั้ง จุ่มแผ่น NC ลงในสารละลาย 1:1,000 diluted-goat monoclonal anti-mouse antibody biotin conjugated ใน washing buffer ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง จุ่ม NC ที่มี 1:3,000 diluted-streptavidin-AP ใน washing buffer ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที ล้าง NC ด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติม BCIP/NBT solution ซึ่งเป็น substrate ของ AP เป็นเวลา 3-5 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น

การตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ โดยวิธี 2 DE-IgE immunoblotting

รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ โดยวิธี 2DE-IgE immunoblotting **รูป 4A** แสดงโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ (Pool patients sera) พบว่ากระจายอยู่ในช่วง relative molecular masses (*Mr*) ระหว่าง ~17 ถึง ~120 และ pI อยู่ในช่วง 3-10 ขณะที่ไม่มีจุดของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของคนปกติ (**รูป 4B**)

ขั้นตอนที่ 7 ทำการ **identify** โปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วย ด้วยวิธี **mass spectrometry** และเปรียบเทียบ **peptide mass maps** ที่ **generate** ได้กับข้อมูลใน **database**

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วย ด้วยวิธี mass spectrometry และเปรียบเทียบ peptide mass maps ที่ generate ได้กับข้อมูลใน database จากผลที่ได้สามารถ identify โปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยได้อย่างน้อย 12 ชนิด และไม่ match กับฐานข้อมูลใน database อีก 9 จุดโปรตีน จากจุดโปรตีนทั้งหมด 26 จุด ซึ่งโปรตีนที่พบนี้มีทั้งชนิดที่มีรายงานแล้วว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้ เช่น tropomyosin, troponin-T และ arginine kinase เป็นต้น ส่วนสารก่อภูมิแพ้ชนิดใหม่ที่ค้นพบคือ myosin heavy chain, troponin-I, agCP8922 (*Anopheles gambiae*), Actin, Myelin transcription factor-1-like transcription factor, Fructose-bisphosphate aldolase [*Enallagma aspersum*] และ Glucose-3-phosphate dehydrogenase [*Colias eurytheme*]



รูปที่ 4: แสดงผลการตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ
โดยวิธี 2 DE-IgE immunoblotting

รูป 4A แสดงโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ
(Pool patients sera)

รูป 4B แสดงโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของคนปกติ

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วย ด้วยวิธี mass spectrometry และเปรียบเทียบ peptide mass maps ที่ generate ได้กับข้อมูลใน database

Spot No.	Name of homolog
1	Myosin heavy chain
2	Troponin-T
3	Tropomyosin
4	Arginine kinase
5	Troponin-I
6	agCP8922 (<i>Anopheles gambiae</i>)
7	Actin-1 (<i>Dugesia polychroa</i>)
8	Actin
9, 10	Myosin heavy chain
11, 12	Arginine kinase
13	Myelin transcription factor-1-like transcription factor
14	Fructose-bisphosphate aldolase [<i>Enallagma aspersum</i>]
15	Glucose-3-phosphate dehydrogenase [<i>Colias eurytheme</i>]
16,17,18	No match
19	B Chain B, Porcine E-Trypsin (E.C.3.4.21.4)
20	ORF2 (<i>Drosophila miranda</i>)
21,22	No match
23	No match
24,25,26	No match

ขั้นตอนที่ 8 ออกแบบ และสังเคราะห์ oligonucleotide primers สำหรับ amplify ยีนของ สารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญ

ผู้วิจัยได้ออกแบบ Oligonucleotide primers สำหรับการเพิ่มจำนวน full-length glutathione-S-transferase genes ซึ่งเป็น pan-insect allergen ที่สำคัญ โดยใช้ข้อมูล sequences ที่มีอยู่ใน database และ คณะผู้วิจัยได้เพิ่มส่วนของ endonuclease restriction sequences (ขีดเส้นใต้ใน primer sequences) ลงไปใน primer sequences ด้วย เพื่อความสะดวก ในการ clone genes เข้าสู่ vectors

Oligonucleotide primers สำหรับการเพิ่มจำนวน full-length glutathione-S-transferase genes

GST EC5 CR(F): 5'-CCG GAT ATC ATG ACC ATC GAC TTC TAC-3'

GST HINd3 CR(R): 5'-CGA AAG CTT TCA CTT CTT GGC GAG GTT-3'

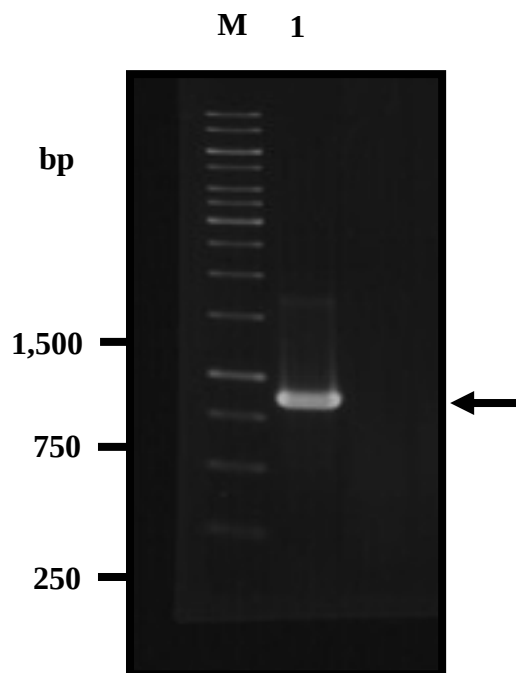
ขั้นตอนที่ 9 สกัด total RNA จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน และเตรียม first stand cDNA

ได้สกัด Total RNA จาก แมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน (*Periplaneta americana*) โดยใช้ TRIzol method ตามคำแนะนำในคู่มือที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา TRIzol[®] Regent เมื่อได้ total RNA แล้ว นำไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา Revert Aid[™] H Minus First Strand cDNA synthesis และ cDNA ที่ได้จากข้างต้นได้ถูกนำไปตรวจสอบคุณภาพโดยใช้เป็น template ใน PCR เพื่อ amplify DNA sequence ที่ encodes polypeptides ของ Per a 7 (tropomyosin) ซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้ของแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน และใช้ primers ที่จำเพาะต่อ tropomyosin gene (Sookrung N *et al.*, 2009) พบว่า cDNA ที่เตรียมได้มีคุณภาพดีดังแสดงผล PCR amplicon ของ tropomyosin sequence ใน รูปที่ 5

ขั้นตอนที่ 10 ทำการเพิ่มปริมาณ gene(s) ด้วยวิธี PCR

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของยีนที่ encodes glutathione-S-transferase (GST) โดย PCR

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ GST gene ผู้วิจัยได้ใช้ gradient PCR เพื่อหาอุณหภูมิสำหรับ annealing ที่เหมาะสมที่สุด ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ GST sequences ประกอบด้วยการเตรียม PCR mixture และ Thermal cycles ดังต่อไปนี้:



รูปที่ 5: PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ tropomyosin-coding sequence

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lane 1, tropomyosin amplicon วิเคราะห์โดย 1 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide (arrow)

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)

A. PCR mixture (25 μ l)

Ingredient	Volume (μl)	Final concentration
Sterile ultra-pure distilled water (UDW)	16.8	-
10 x 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 <i>F</i> (20 μM)	0.5	0.4 μM
Primer <i>R</i> (20 μM)	0.5	0.4 μM
cDNA	1.0	-
DNA polymerase (5 units/μl)	0.2	1 unit

B. Thermal cycles

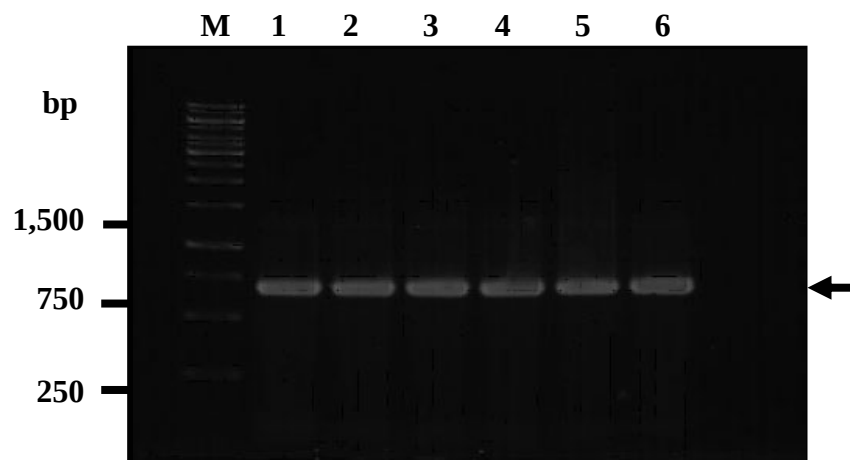
First Denaturation	at 94°C for 5 minutes
35 Cycles of Denaturation,	at 94°C for 30 seconds
Annealing,	at 50°C - 60°C for 30 seconds
and Extension	at 72°C for 40 seconds
Final Extension	at 72°C for 7 minutes

การ amplify GST gene ให้ได้ปริมาณมากพอ

ผู้วิจัยได้ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ Annealing ที่ให้ PCR amplicon มากที่สุด จากการทดสอบข้างต้นคือ 54.3°C เพื่อเพิ่มปริมาณ GST gene ดังแสดงผลใน **รูปที่ 6**

ตรวจสอบความถูกต้องของ gene sequences โดย DNA sequencing

ได้สกัด Recombinant plasmids ออกจาก transformed *E. coli* clones โดยวิธี alkaline lysis และตรวจลำดับ nucleotides ด้วยการทำ DNA sequencing ทั้งนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของ PCR amplified-DNA sequences ว่าเป็น sequences ของ GST gene จริง และได้ submit เข้าไป ในฐานข้อมูล genbank โดยได้ accession no. GU073456 **รูปที่ 7** แสดงลำดับ nucleotides และ deduced amino acids ของ GST ในการศึกษา



รูปที่ 6 : PCR product ที่ได้จากการใช้ cDNA เป็น template และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ GST-coding sequence ใน gradient PCR เพื่อหาอุณหภูมิสำหรับ annealing ที่เหมาะสมที่สุด

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lanes 1-6, GST amplicons เพิ่มจำนวนโดยใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing ที่ 50.3, 51.7, 54.3, 57.4, 59.3, 60 °C ตามลำดับ

วิเคราะห์โดย 1 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)

ลูกศรชี้ GST gene amplicons ที่ขนาด 646 bp

```

atgaccatcgacttctactacctgcccggcagcgcacccatgccggtcagctctcctggct
M T I D F Y Y L P G S A P C R S A L L A
gccaaggccatcggtgtggatctgaacctcaaagtgacgaacctcatggctggcgaaat
A K A I G V D L N L K V T N L M A G E H
ctcagcctgagtttcttaagatgaatcctcagcatatcgattccagccctaaacaacaac
L T P E F L K M N P Q H T I P A L N N N
gttagctatgttggtggaaagccgagccattctaagtaagctggctaaccgggtatggcaag
V S Y L W E S R A I L S K L A N R Y G K
gacgactcgctgtaccgcagtcacggcaaaaagcgagctcttgtgggacagagactgtact
D D S L Y R S T A K S E L L W D R D C T
tcgatattgttcccctgtaccattgatacggagaattcttttatgcaatttcatttagca
S I L F P C T I D T E N S F M Q F H L A
aagcaacctgtagatcatgaaaagataaaagcaactagagaagcccttcgagtttttgaat
K Q P V D H E K I K Q L E K P F E F L N
aagttcctggaatcgcaacagtttgtggcgagaaaataagctcaccattgcggacctggca
K F L E S Q Q F V A E N K L T I A D L A
attgtctcctctgtttccactgctgacatcataggctttgatgtaagcaaataactcaaac
I V S S V S T A D I I G F D V S K Y S N
gtcgccaaatgggttcgagaaatgcaagaagattgttccaggctatgaggaactgaatcac
V A K W F E K C K K I V P G Y E E L N H
tccggatgcttgaagttcaaggagatgtgcgataacctcgccaagaagtga
S G C L K F K E M C D N L A K K -

```

รูปที่ 7: แสดงลำดับ nucleotides และ deduced amino acid ของ GST ในการศึกษา

ขั้นตอนที่ 11 ทำการ clone gene(s) เข้าสู่ cloning vector หลังจากตรวจสอบความถูกต้องของ gene sequence(s) แล้ว clone gene(s) ดังกล่าวเข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม

ได้ clone amplified GST DNA เข้าสู่ cloning vector และ transformed เข้า *E. coli* host เพื่อเก็บเป็น gene stock

Amplified DNA ที่ได้จากขั้นตอนที่ 10 ถูกนำไปเชื่อมเข้ากับ cloning vector โดยใช้เอนไซม์ ligase และ incubated ที่ 4°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง ligation mixture ที่ได้ถูกนำไป transformed เข้าสู่ competent *E. coli* host cells โดยใช้วิธี heat-shock transformation จากนั้นนำ transformed *E. coli* preparation ไป spread บน selective agar plates และ incubated ที่ 37°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

Screened หา transformed *E. coli* clones ที่ carry recombinant plasmids ที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ GST gene พบว่า transformed *E. coli* ที่เลือกมามี GST gene ทุก clones ดังแสดงตัวอย่างใน รูปที่ 8

การตัด GST gene ออกจาก cloning vector ด้วย restriction endonucleases

ได้สกัด Recombinant plasmids ออกจาก transformed *E. coli* clones โดยวิธี alkaline lysis และตรวจลำดับ nucleotides ด้วยการทำ DNA sequencing ทั้งนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของ PCR amplified-DNA sequences ว่าเป็น sequences ของ GST gene จริง

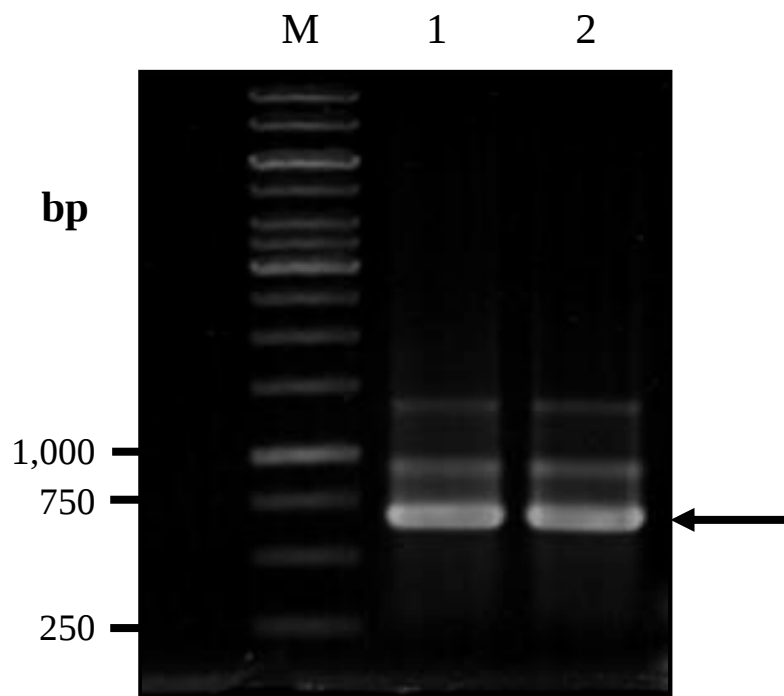
นำ Recombinant plasmids จาก transformed *E. coli* clones ที่เลือกได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะ (restriction endonucleases) เพื่อเตรียมสำหรับการ sub-clone เข้าสู่ protein expression vector ที่ทางคณะผู้วิจัยได้เลือกไว้ ดังแสดงผลใน รูปที่ 9

ขั้นตอนที่ 12 การเตรียม GST recombinant protein ของแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน

นำ *E. coli* clones ซึ่ง carry recombinant protein expression vector ซึ่งมี GST gene insert ไป grow ใน medium ที่เหมาะสมและ induced GST protein expression ดังนั้นนำ *E. coli* clones ซึ่ง carry recombinant protein expression vector ซึ่งมี GST gene insert ไป grow ใน medium ที่เหมาะสมซึ่งมียาปฏิชีวนะผสมอยู่แล้ว incubated with shaking ที่ 37°C จนได้ log phase ของ *E. coli* culture จากนั้นเติม IPTG ลงไปเพื่อกระตุ้น *E. coli* cells ให้เกิดการ express โปรตีนเป้าหมายที่ต้องการคือ GST ทำการเลี้ยง *E. coli* cells ต่อไปอีก 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ *E. coli* cells โดยการทำการปั่นที่ความเร็วรอบ 4,000 x g เป็นเวลา 20 นาที

สกัดโปรตีน (GST) เป้าหมายออกจาก whole cell homogenate ของ *E. coli* cells

นำ *E. coli* pellet ที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง ultrasonic disintegrator ซึ่งจะเรียก preparation ที่ได้ว่า *E. coli* homogenate จากนั้นนำ *E. coli* homogenate ไปปั่นที่



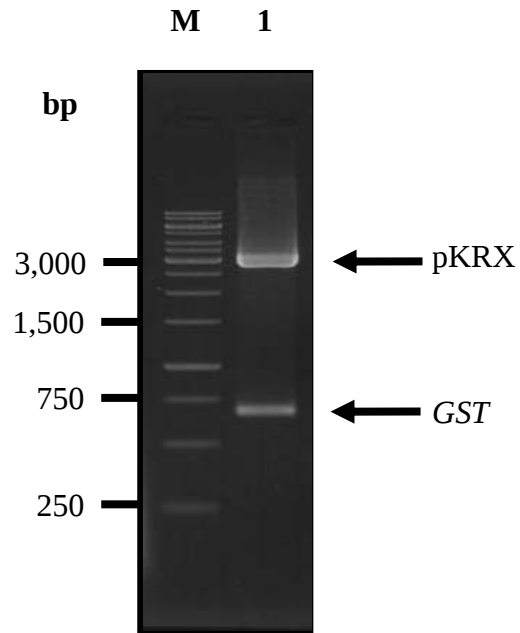
รูปที่ 8: PCR amplicons ของ full-length *GST* โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ *GST* sequences

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lanes 1 และ 2 *GST* amplicon ขนาดประมาณ 646 bp (arrow)

วิเคราะห์โดย 1 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)



รูปที่ 9: Recombinant plasmids ที่สกัดจาก transformed *E. coli* clones หลังตัดด้วย restriction endonucleases วิเคราะห์โดย run amplified products ใน 1 % agarose gel electrophoresis และ ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder

Lane 1, DNA ของ plasmid (band บน) และ GST gene insert (band ล่าง)

ตัวเลขด้านซ้ายมือแสดงขนาดของ DNA เป็นจำนวน base pairs (bp)

ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกโปรตีนส่วนเป็น soluble portion (supernatant) ออกจากส่วนที่เป็น insoluble portion (pellet) นำโปรตีนที่ได้ทั้งสองส่วนไปตรวจสอบหา GST recombinant protein โดยใช้วิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis

จากผลของ SDS-PAGE และ Western blot analysis ผู้วิจัยพบว่า GST recombinant protein อยู่ใน soluble portion จึงนำมาทำการ purify ในขั้นตอนต่อไป

การ purify recombinant GST protein ออกจาก *E. coli* homogenate โดยใช้ affinity column

ผู้วิจัยพบว่า *E. coli* cells ได้ express recombinant GST protein อยู่ใน soluble portion ของ *E. coli* homogenate ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำโปรตีนในส่วนดังกล่าวไปทำการ purify โดยใช้ affinity column และสามารถ purify recombinant GST protein ออกจากโปรตีนต่างๆ ของ *E. coli* ได้ ดังแสดงในรูปที่ 10

ขั้นตอนที่ 13 การเตรียม GST native protein จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน

เตรียม crude extract โดยสกัดโปรตีนจากตัวแมลงสาบโดยใช้ที่บดเนื้อเยื่อ บดตัวแมลงสาบในไนโตรเจนเหลว ต่อจากนั้น solubilize โปรตีนใน GST binding buffer หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีน

การ purify native GST protein จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยใช้ affinity column

ผู้วิจัยได้นำ crude extract ไปทำการ purify โดยใช้ GSTrap FF affinity column และสามารถ purify native GST protein ออกจากโปรตีนต่างๆ ของแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันได้ ดังแสดงในรูปที่ 11

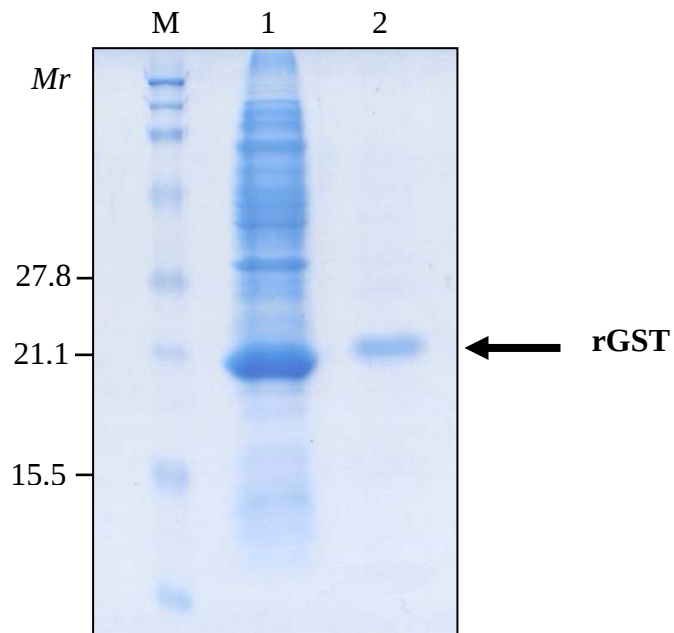
การทดสอบ Enzymatic activities ของ native GST และ recombinant GST โปรตีน

ทำการทดสอบ Enzymatic activities ของ native GST และ recombinant GST โปรตีน โดยใช้ CDNB เป็น substrate ตรวจสอบปริมาณ product ที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่า optimal density ที่ 340 nm จากการทดสอบพบว่า native GST มี Enzymatic activities สูงกว่า recombinant GST (รูปที่ 12) มากอาจเป็นเพราะว่า native GST มีหลาย isoforms กว่า recombinant GST

ขั้นตอนที่ 14 ทำการตรวจสอบการเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ GST จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยวิธี IgE-immunoblotting

การเตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มี native GST และ recombinant GST โปรตีน

นำ native GST และ recombinant GST โปรตีน ปริมาณ 20 µg ไปผสมกับ loading buffer ที่ประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) และ β-mercaptoethanol หลังจากนั้น



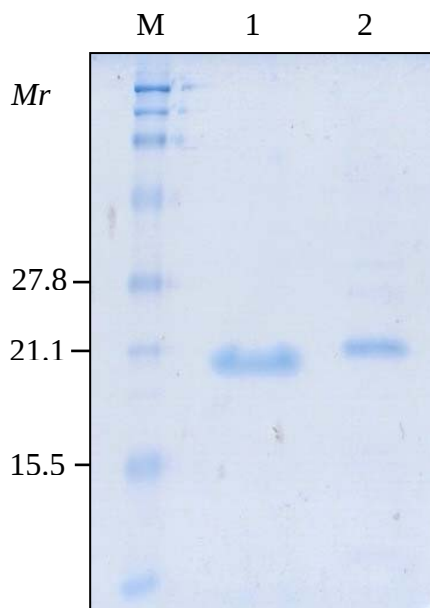
รูปที่ 10: SDS-PAGE ของ affinity column purified-recombinant GST protein ที่เตรียมจาก transformed *E. coli* วิเคราะห์โดย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250

Lane M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range

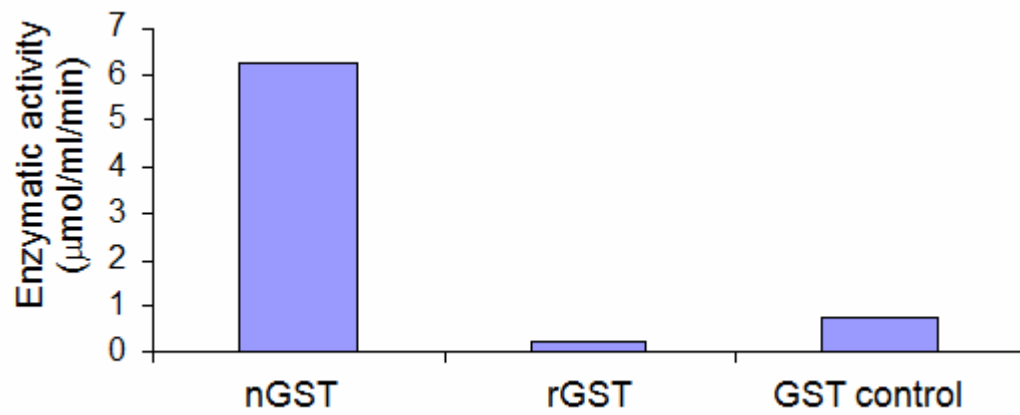
Lane 1, Crude cockroach extract

Lane 2, purified-recombinant GST protein (*Mr* ~ 23 kDa)

ตัวเลขด้านซ้ายมือคือ relative molecular masses (*Mr*)



รูปที่ 11: SDS-PAGE ของ affinity column purified-native GST protein ที่เตรียมจาก cockroach extract วิเคราะห์โดย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250
 Lane M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range
 Lane 1, purified-native GST protein ($Mr \sim 21$ kDa)
 Lane 2, purified-recombinant GST protein ($Mr \sim 23$ kDa)
 ตัวเลขด้านซ้ายมือคือ relative molecular masses (*Mr*)



รูปที่ 12: แสดงการทดสอบ Enzymatic activities ของ native GST (nGST) และ recombinant GST (rGST) โปรตีน โดยใช้ CDNB เป็น substrate

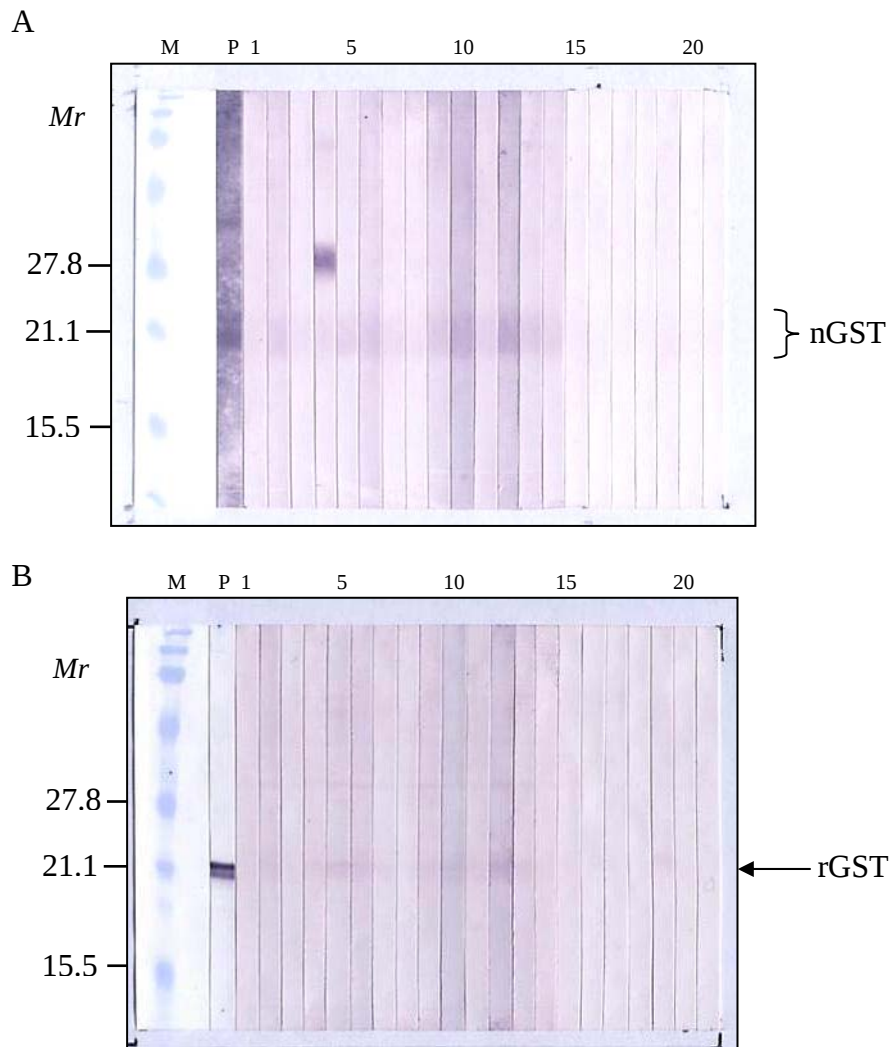
incubated ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ปั่นส่วนผสมดังกล่าวที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ละลายออกไป จากนั้นแยกโปรตีนใน 12% SDS-polyacrylamide gel ขนาด 8.0 x 7.3 cm โดยใช้ Mini PROTEAN® 3 Cell และ Basic™ PowerPac device (Bio-Rad, CA, USA) หลังจากนั้นนำโปรตีน gel ไปดำเนินการถ่าย native GST และ recombinant GST โปรตีน ลงแผ่น ไตรเซลูโลส (NC) ด้วยเครื่อง Mini-transblot tank (Bio-Rad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นไตรเซลูโลสที่มี native GST และ recombinant GST โปรตีน ไปทำการตรวจสอบการเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ GST จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยวิธี IgE-immunoblotting

การตรวจสอบการเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ GST จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยวิธี IgE-immunoblotting

นำแผ่น NC ที่มี native GST และ recombinant GST โปรตีนมา block ที่วางบน NC โดยจุ่ม NC ใน solution ของ 3% bovine serum albumin ใน TBS ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบหรือซีรัมของคนปกติลงไป จนท่วมแผ่น NC เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง จุ่มแผ่น NC ลงในสารละลาย 1:1,000 diluted-mouse monoclonal anti-human IgE antibody ใน washing buffer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง NC ด้วย washing buffer 3 ครั้ง จุ่มแผ่น NC ลงในสารละลาย 1:1,000 diluted-goat monoclonal anti-mouse antibody-biotin conjugated ใน washing buffer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง จุ่ม NC ที่มี 1:3,000 diluted-streptavidin-AP ใน washing buffer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้าง NC ด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติม BCIP/NBT solution ซึ่งเป็น substrate ของ AP เป็นเวลา 3-5 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้าง NC ด้วยน้ำกลั่น

ผลการตรวจสอบการเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ GST จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยวิธี IgE-immunoblotting

พบว่า IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบสามารถทำปฏิกิริยากับ native GST จำนวน 14 ราย จาก 15 ราย คิดเป็น 93.3 % และไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนปกติ (รูปที่ 13A) และ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบสามารถทำปฏิกิริยากับ recombinant GST จำนวน 11 ราย จาก 15 ราย คิดเป็น 73.3 % และไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนปกติเช่นกัน (รูปที่ 13B) จึงสามารถสรุปได้ว่า ทั้ง native และ recombinant Glutathione-S-transferase (GST) เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญ (Major Allergen) ในคนไทย



รูปที่ 13: IgE-Immunoblot patterns ของ native GST (A) และ recombinant GST (B) หลังจากทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบและคนปกติ

Lane M, Prestained protein marker

Lanes P ภาพ A, native GST ที่ทำปฏิกิริยากับ rabbit anti-American CR antibody

Lanes P ภาพ B, recombinant GST ที่ทำปฏิกิริยากับ Anti-His antibody

Lanes 1-15, GST หลังจากทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ no. 1-15 ตามลำดับ

Lanes 16-20, GST หลังจากทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของคนปกติ no. 1-5 ตามลำดับ

Lane 21, negative control (GST ทำปฏิกิริยากับ buffer)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันโรคภูมิแพ้และภาวะความเจ็บป่วยจากโรคภูมิแพ้มีอุบัติการณ์ที่เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย โรคภูมิแพ้เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ แต่พบว่าสารก่อภูมิแพ้ที่พบในอาคาร (indoor allergens) เป็นสาเหตุสำคัญที่สุด สารก่อภูมิแพ้เหล่านี้ ได้แก่ สารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่น แมลงสาบ ฝุ่นบ้าน ขนและรังแคของสัตว์เลี้ยง ฝุ่นจากผ้าและนุ่น เป็นต้น ในประเทศไทย พบว่ามีผู้ป่วยโรคภูมิแพ้เพิ่มขึ้นมากเช่นเดียวกับประเทศอื่นๆ โดยมีผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบมากกว่าร้อยละ 50 ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม แมลงสาบที่ชุกชุมที่สุดในประเทศไทยเป็นแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน คือ *Periplaneta americana* ซึ่งแตกต่างจากของประเทศในแถบตะวันตกและบางประเทศในเอเชียที่แมลงสาบส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์เยอรมัน คือ *Blattella germanica*

การวินิจฉัยโรคภูมิแพ้แมลงสาบทำได้โดยการฉีดสารก่อภูมิแพ้เข้าผิวหนัง การตรวจสถานะการแพ้ของผู้ป่วยและการฉีดสารก่อภูมิแพ้เข้าผิวหนังของผู้ป่วยที่ละน้อยเป็นเวลานานเพื่อการรักษา มักใช้สารสกัดหยาบ (crude extract) จากแมลงสาบ จึงขาดมาตรฐานทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของสารก่อภูมิแพ้ในแต่ละชุดที่เตรียมแต่ละครั้ง การตรวจวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้ในบ้านเรือนของผู้ป่วยซึ่งเป็นมาตรการสำคัญในการป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยสัมผัสสารก่อภูมิแพ้และเกิดอาการของโรค มักใช้ชุดตรวจสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศและมักมีความเฉพาะต่อแมลงสาบสายพันธุ์เยอรมัน จึงทำให้ขาดความแม่นยำ ยิ่งไปกว่านั้น ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานเกี่ยวกับสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบก็ยังมีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาถึงสารก่อภูมิแพ้ชนิดต่างๆ จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันจึงเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์มากในการป้องกันและดูแลรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ และการผลิตสารก่อภูมิแพ้มาตรฐานโดยวิธีพันธุวิศวกรรมสำหรับตรวจกรองผู้ป่วยก็ย่อมจะทำให้การตรวจสถานะภูมิแพ้ในผู้ป่วยมีความเที่ยงตรงมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นการศึกษาสารก่อภูมิแพ้ทั้งหมดจากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์ เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารก่อภูมิแพ้แมลงสาบที่ผู้ป่วยคนไทยแพ้จึงมีความสำคัญ โดยเมื่อทราบข้อมูลดังกล่าวแล้ว จะสามารถทำการผลิตสารก่อภูมิแพ้มาตรฐานโดยวิธีพันธุวิศวกรรมสำหรับตรวจกรองผู้ป่วย เพื่อใช้เป็นสารก่อภูมิแพ้มาตรฐานที่สามารถใช้ในการวินิจฉัย และรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบได้

จากผลการศึกษาสามารถแยกโมเลกุลโปรตีนของ cockroach extract ด้วย SDS-PAGE พบว่า เมื่อแยกโปรตีนภายใต้ภาวะ reducing condition โมเลกุลโปรตีนมีมวล [relative molecular masses (M_r)] อยู่ระหว่าง ~6 ถึง >190 หลังจากนั้นทำการแยกโมเลกุลโปรตีนของ cockroach extract ด้วย 2DE พบว่า เมื่อแยกโปรตีน โมเลกุลโปรตีนมีมวล อยู่ระหว่าง ~6 ถึง >190 และ pI อยู่ในช่วง 3-10 สามารถทราบตำแหน่งของ Proteome และ allergenome ทั้งหมดจากตัวแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน ซึ่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ (Pool patients sera) พบว่ากระจายอยู่ในช่วง relative molecular masses (M_r) ระหว่าง ~17 ถึง ~120 และ pI อยู่ในช่วง 3-10 ขณะที่ไม่มีจุดของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของคนปกติ

เมื่อทำการ identify โปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วย ด้วยวิธี mass spectrometry และเปรียบเทียบ peptide mass maps ที่ generate ได้กับข้อมูลใน database จากผลที่ได้สามารถ identify โปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยได้อย่างน้อย 12 ชนิด และไม่ match กับฐานข้อมูลใน database อีก 9 จุดโปรตีน จากจุดโปรตีนทั้งหมด 26 จุด ซึ่งโปรตีนที่พบนี้มีทั้งชนิดที่มีรายงานแล้วว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้ เช่น tropomyosin, troponin-T และ arginine kinase เป็นต้น และสารก่อภูมิแพ้ชนิดใหม่ เช่น myosin heavy chain, troponin-I เป็นต้น การทราบชนิดของสารก่อภูมิแพ้จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันจึงเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์มากในการป้องกันและดูแลรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบ

ในการสร้าง recombinant allergen ผู้วิจัยเลือกสารก่อภูมิแพ้ที่เป็น pan-insect allergen คือ Glutathione-S-transferase (GST) จากการทำ gene cloning สามารถสร้าง recombinant GST ได้โดยมีขนาดโมเลกุลที่ 23 kDa และสามารถทำหน้าที่ได้ แต่มี Enzymatic activities น้อยกว่าในรูปของ native protein อาจเป็นเพราะว่าใน native protein มี GST อยู่หลาย isoforms ซึ่งแต่ละ isoforms อาจให้ Enzymatic activities ในระดับที่ต่างกัน จากการทดสอบความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ GST จากแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกัน โดยวิธี IgE-immunoblotting พบว่า IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบสามารถทำปฏิกิริยากับ native GST จำนวน 14 ราย จาก 15 ราย คิดเป็น 93.3 % และไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนปกติ และ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบสามารถทำปฏิกิริยากับ recombinant GST จำนวน 11 ราย จาก 15 ราย คิดเป็น 73.3 % และไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนปกติเช่นกัน ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีรายงานว่า GST ทั้งในรูปของ native และ recombinant โปรตีนของแมลงสาบสายพันธุ์อเมริกันว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญ (major allergen) ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ ดังนั้นสารก่อภูมิแพ้มาตรฐานนี้สามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัย และรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบได้

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. การศึกษาความเป็นสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่น ๆ ที่ทราบจากการทำ Proteomics และ Allergenomics
2. ทดสอบความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ Glutathione-S-transferase ในมนุษย์
3. พัฒนา Therapeutic allergy vaccine โดยใช้ major allergens ที่ผู้ป่วยโรคภูมิแพ้แมลงสาบคนไทยแพ้ เป็นส่วนประกอบหลัก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และคณะกรรมการอุดมศึกษา

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. **Sookrung N**, Indrawattana N, Tungtrongchitr A, *et al.* A murine model of American cockroach, *Periplaneta americana*, allergy. Asian Pac J Allergy Immunol 2008 Jun-Sep;26(2-3):143-9. มีค่า impact factor 0.567 (เอกสารแนบหมายเลข 2)
2. **Sookrung N**, Indrawattana N, Tungtronchitr A, Chaicumap W. Allergenicity of recombinant tropomyosin (Per a 7) of American cockroach (*Periplaneta americana*) among allergic Thais. Asian Pac J Allergy Immunol 2009;27; 9-17. มีค่า impact factor 0.567 (เอกสารแนบหมายเลข 3)
3. Tungtrongchitr A, **Sookrung N**, Indrawattana N, Sae-Lim J, Pduang S, Pholrat B, Chaicumpa W. Seasonal Levels of Major American Cockroach Allergen, Per a 9 (Arginine Kinase), in Bangkok and their relevance to the severity of the allergic diseases Asian Pac J Allergy Immunol 2009;27; 1-7. มีค่า impact factor 0.567 (เอกสารแนบหมายเลข 4)
4. Kulkeaw K, Sakolvaree Y, Srimanote P, Tongtawe P, Maneewatch S, **Sookrung N**, Tungtrongchitr A, Tapchaisri P, Kurazono H, Chaicumpa W. Human monoclonal ScFv neutralize lethal Thai cobra, *Naja kaouthia*, neurotoxin. J Proteomics. 2009; 72: 270-82. (เอกสารแนบหมายเลข 5)

สิทธิบัตร

1. Patent application entitled "Test kit for detection and quantification of a major American cockroach allergen, Per a 9 (Arginine kinase)", submitted to The Department of Intellectual Property, Ministry of Commerce, on October 2008.

รางวัลที่ได้รับ

1. National Inventor Award, National Research Council of Thailand (as co-investigator), 2009
2. Star Award, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, 2009

ผลงานวิชาการอื่น ๆ

1. Nitaya Indrawattana, **Nitat Sookrung**, Anchalee Tungtrongchitr, Manus Chongsanguan, Phanchita Thangtawe, Wassana Mueanniem, and Wanpen Chaicumpa.

- Recombinant tropomyosin of American cockroach, *Periplaneta americana*. World Allergy Congress 2007, Queen Sirikit National Convention Center (QSNCC), Bangkok. Thailand. December 2-6, 2007. (เอกสารแนบหมายเลข 6)
2. **Nitat Sookrung**, Nitaya Indrawattana, Anchalee Tungtrongchitr, Pongsri Thongtawe, and Wanpen Chaicumpa. Development of novel cockroach allergy model. World Allergy Congress 2007, Queen Sirikit National Convention Center (QSNCC), Bangkok. Thailand. December 2-6, 2007. (เอกสารแนบหมายเลข 7)
 3. Nitaya Indrawattana, **Nitat Sookrung**, Kasem Kulkaew, Manus Chongsa-nguan, Wanpen Chaicumpa. Preparation of human monoclonal antibody that neutralizes tetanus toxin using phage display technology. Joint International Tropical A constructive relationship between young and senior researcher 2007, 11-13 October 2007, Ambassador city Jomthian Hotel Chonburee, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 8)
 4. Anchalee Tungtrongchitr, **Nitat Sookrung**, Wanpen Chaicumpa, Nitaya Indrawattana. Seasonal variation in the levels of major American Cockroach (*Periplaneta americana*) allergen in dust samples collected from different room types of houses of cockroach allergic Thais. Xth European Multicolloquium of Parasitology 2008. 24-28 August 2008, Paris. (เอกสารแนบหมายเลข 9)
 5. **Nitat Sookrung**, Nitaya Indrawattana, Anchalee Tungtrongchitr, Charan Karuhassuwan, Urai Chaisri and Wanpen Chaicumpa. A Murine model of allergy caused by American cockroach (CR), *Periplaneta americana*. The CHE-USDC Congress I, 5-7 September 2008, Ambassador city Jomthian Hotel Chonburi, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 10)
 6. Anchalee Tungtrongchitr, **Nitat Sookrung**, Nitaya Indrawattana, Sukanya Kwangsi, Darawan Wanachiwanawin, Wanpen Chaicumpa. *Giardia Duodenalis* in Thailand: Genotype Identification and Clinical Relevance According to Host Age. Joint International Tropical Medicine Meeting 2008, "Tropical Medicine in The-omics Era" 13-14 October 2008, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 11)
 7. Nitaya Indrawattana, **Nitat Sookrung**, Kasem Kulkaew, Manus Chongsa-nguan, Wanpen Chaicumpa. Preparation of human monoclonal antibody that neutralizes tetanus toxin using phage display technology. Joint International Tropical Medicine Meeting 2008, "Tropical Medicine in The-omics Era" 13-14 October 2008, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 12)

8. Thanaporn Nibaddhasobon, Nitaya Indrawattana, **Nitat Sookrung**, Manus Chongsa-nguan, Makino Sou-ichi, Wanpen Chaicumpa. Molecular Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolates From Dairy Product in Various Market. Joint International Tropical Medicine Meeting 2008, "Tropical Medicine in The-omics Era" 13-14 October 2008, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 13)
9. Anchalee Tungtrongchitr, **Nitat Sookrung**, Nitaya Indrawattana, Sukanya Kwangsi, Wanpen Chaicumpa. *Giardia Duodenalis* isolated from human subjects in Thailand: Genotype and Clinical Relevance. A constructive relationship between young and senior researcher 2008, 16-18 October 2008, Ambassador city Jomthian Hotel Chonburee, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 14)
10. **Nitat Sookrung**, Nitaya Indrawattana, Anchalee Tungtrongchitr, Sukanya Kwangsi, Wanpen Chaicumpa. Glutathione S-transferase: a novel *Periplaneta americana* allergen among Thais. A constructive relationship between young and senior researcher 2008, 16-18 October 2008, Ambassador city Jomthian Hotel Chonburee, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 15)
11. Nitaya Indrawattana, **Nitat Sookrung**, Kasem Kulkaew, Manus Chongsa-nguan, Wanpen Chaicumpa. Preparation of human monoclonal antibody that neutralizes tetanus toxin using phage display technology. Joint International Tropical A constructive relationship between young and senior researcher 2008, 16-18 October 2008, Ambassador city Jomthian Hotel Chonburee, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 16)
12. Rotjana Poolphol, **Nitat Sookrung**, Wanpen Chaicumpa, Nitaya Indrawattana, Anchalee Tungtrongchitr. Glutathione S-transferase of American Cockroach (*Periplaneta americana*): characterization og allergenicity. Joint Conference in Medical Sciences 2009, 22-24 June 2009, Centara Grand and Bangkok Convetional Center, Bangkok, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 17)
13. **Nitat Sookrung**, Rotjana Poolphol, Nitaya Indrawattana, Anchalee Tungtrongchitr, Sukanya Kwangsi, Nawanporn Zhalim, Wanpen Chaicumpa. Glutathione S-transferase (GST) of American cockroach (CR), *Periplaneta americana*, is allergenic among Thais. A constructive relationship between young and senior researcher 2009, 15-17 October 2009, Holiday In Resort Chaam Petchaburi, Thailand. (เอกสารแนบหมายเลข 18)

การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

1. เป็นวิทยากรบรรยายในภาคการประชุมกลุ่มเฉพาะเรื่องในงาน “การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2551 ”(Thailand Research Expo) ในวันที่ 14 กันยายน 2551 ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชัน เซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ
2. เป็นวิทยากรบรรยายในการประชุมประจำปี ราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย วันที่ 28 เมษายน 2552

เอกสารอ้างอิง

1. Arruda LK, Ferriani VP, Vailes LD, Pomes A, Chapmen MD. Cockroach allergens: environmental distribution and relationship to disease. Curr Allergy Asthma Rev 2001; 1: 466-73.
2. Boonyarittipong P, Tuchinda M, Balangura K, Visitsuntorn N, Vanaprapara N, Prevalences of allergic disease in Thai children. J Pedia Soc Thailand 1990; 29: 24-32
3. Vichyanond P, Jirapongsananuruk O, Visitsuntorn N, Tuchinda M. Prevalence of asthma, rhinitis and eczema in children from the Bangkok area using the ISAAC (International Study for Asthma and Allergy in Children) questionnaires. J Med Assoc Thai 1998; 81: 175-84.
4. Bernton HS, Brown H. Insect allergy-preliminary studies of the cockroach. Allergy 1964; 35: 506.
5. Bernton HS, Mc Mahorn T, Brown H. Cockroach asthma. Br J Dis Chest, 1972; 66: 61-6.
6. Mendoza J, Snyder FD. Cockroach sensitivity in children with bronchial asthma. Ann Allergy 1970; 28: 59-63.
7. Twarog FJ, Picone FJ, Strunk RS, SO J, Colten HR. Immediate hypersensitivity to cockroach: isolation and purification of the major antigens. J Allergy Clin Immunol 1976; 59:154-60
8. Morris EC, Smith TF, Kelly LB. Cockroach is a significant allergen for inner city children. J Allergy Clin Immunol 1986; 77: 206A.
9. Chapman MD. Cockroach allergens: a common cause of asthma in North American cities. Insights Allergy 1993; 8: 2-8.
10. Arruda LK, Vailes LD, Ferriani VPL, *et al.* Cockroach allergens and asthma. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 419-28.

11. Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, Baker D, *et al.* The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N Eng J Med* 1997; 336: 1356-63.
12. Choovivatthanavanich P, Suwanprateep P, Kanthavichitra N. Cockroach sensitivity in Allergic Thais. *Lancet* 1970; 26: 1362-3.
13. Kraissarin C, Direkwattanachai , Benjapongitak S, Sasisakulporn S. Aeroallergen in Thai Asthmatic Children. *Siriraj Hosp Gaz* 1997; 49: 449-53.
14. Kongpanichkul A, Vichyanond P, Visitsunthorn N, Tuchinda M. Allergen skin test reactivity among asthmatic Thai children. *J Med Assoc Thai* 1997; 80: 69-75.
15. Sastre J, Ibanez MD, Lombardero M, Laso MT, Lehere S. Allergy to cockroaches in patients with asthma and rhinitis in an urban area (Madrid). *Allergy* 1996; 51: 582-6.
16. Asahina S, Hasegawa M. A brief survey of domiciliary cockroaches in Chantaburi province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1981; 12: 124-5.
17. Asahina S. Handbook on domiciliary cockroach species in Thailand. Promotion of Provincial Health Services Project Series No. 5, 1983: 1-12.
18. สุวัฒนา จีงวิวัฒนาภรณ์ การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงสาบตามชุมชนในบางจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2527
19. Benjapong N, Chansaeng U, Srisurapat A, Phan U-rai P. A survey of species and density of cockroach in 4 hospitals in central Thailand. *Com Dis J* 1997; 23(2): 171-7.
20. Tawatsin A, Thavara U, Chompoosir J, Kong-ngamsuk W, Chansang C, Paosriwong S. Cockroach surveys in 14 provinces of Thailand. *J Vector Ecol* 2001; 26: 232-8.
21. Sookrung N, Diraphat P, Chaicumpa W, Tongtawe P, Sakolvaree Y, Tapchaisri P *et al.* 2003. Cockroach allergen detection and cockroach allergens of allergic Thai patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003; 21: 1-9.
22. Diraphat P, Sookrung N, Chaicumpa W, Pumhirun P, Vichyanond P, Tapchaisri P *et al.* 2003. Recombinant American cockroach component, Per a1, reactive to IgE of allergic Thai patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2004; 21:11-20.
23. Tungtrongchitr A, Sookrung N, Munkong N, Mahakittikun V, Chinabut P, Chaicumpa W *et al.* 2004. The levels of cockroach allergen in relation to cockroach species and allergic diseases in Thai patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 22:115-121.
24. Sookrung N, Chaicumpa W, Tungtrongchitr A, Vichyanond P, Ramasoota P, Tongtawe P, Sakolvaree Y, Tapchaisri P. *Periplaneta americana* Arginine Kinase As

a Major Cockroach (CR) Allergen Among CR Allergic Thai Patients. *Environ Health Perspect* 2006; 114:875-880.