
การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน *Mycobacterium tuberculosis* ชนิด Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ในหนูทดลอง

ปนัดดา เทพอัศคร อภิชัย ประชาสุภาพ ญัฐธัญญ์ ภิญโญสุชี รัตนาวดี วิชาจารณ์ ณรัตน์ชา ศรีเพ็ชร
รุจิราพร พิทักษ์สาลี อณิชา เลื่องชัยเชวง คชาภรณ์ เมฆชยาย นลินี แสงทอง สมปอง ทรัพย์สุทธิภาส
และ ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญี่ 11000

บทคัดย่อ วัณโรคยังคงปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก โดยมีวัคซิ่นบีซีจี (*Bacillus Calmette-Guérin*) เป็นวัคซิ่นป้องกันวัณโรคชนิดเดียว ซึ่งสามารถป้องกันวัณโรคชนิดรุนแรงในเด็กแต่พบว่ามีประสิทธิภาพลดลงในผู้ใหญ่ การวิจัยและพัฒนาวัคซิ่นวัณโรคชนิดใหม่ๆ จึงมีความสำคัญเพื่อการยุติวัณโรค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจนชนิดรีคอมบิแนนท์ของ *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ในหนูทดลอง จำนวน 3 ชนิด 4 รูปแบบ ประกอบด้วย Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ซึ่งมีรายงานว่าแอนติเจนทั้งในระยะติดเชื้อและระยะแฝง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการออกแบบและพัฒนาวัคซิ่นชนิด mRNA โดยการสร้างและผลิตโปรตีนแอนติเจนรีคอมบิแนนท์ใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ ClearColi™ BL21 (DE3) และนำไปฉีดในหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 จากนั้นทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด humoral immune response โดยวิธี Western blot และ ELISA และทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด cellular immune response โดยการตรวจ cytokine ได้แก่ IFN- γ , IL-2 และ TNF- α ด้วยวิธี Multiplex assay โดยการกระตุ้นซ้ำแบบ *ex vivo* จากการศึกษาพบว่า Ag85B, ESAT-6 และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด humoral immune response และ cellular immune response ส่วน Rv2660c ซึ่งเป็นแอนติเจนที่พบในระยะแฝงมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเฉพาะชนิด cellular immune response ดังนั้นแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด จึงมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซิ่นต่อไป

คำสำคัญ: Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนู

Corresponding author E-mail: panadda.d@dmsc.mail.go.th

Received: 20 March 2025

Revised: 25 March 2025

Accepted: 28 March 2025

บทนำ

วัณโรค หรือ tuberculosis (TB) เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ซึ่งเมื่อมีการติดเชื้อ Mtb สามารถแฝงอยู่ในร่างกายของมนุษย์โดยไม่แสดงอาการหรือเป็นวัณโรคระยะแฝง ซึ่งจะมีเพียงร้อยละ 5-10 ที่มีการดำเนินของโรคไปเป็นวัณโรคระยะแสดงอาการ (active TB) เนื่องจากร่างกายของผู้ติดเชื้อมีภูมิคุ้มกันต่ำลง ทำให้ไม่สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้ ส่งผลให้เชื้อลุกลามไปยังอวัยวะอื่นผ่านทางระบบน้ำเหลือง และมีการเจ็บป่วยตามมา⁽¹⁾

วัคซีน Bacillus Calmette-Guérin (BCG) เป็นวัคซีนวัณโรคเพียงชนิดเดียวที่ใช้ในปัจจุบันตั้งแต่ปี ค.ศ. 1921 ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live attenuated vaccine) ผลิตจากเชื้อ *Mycobacterium bovis* โดยสามารถป้องกันวัณโรคชนิดรุนแรงในเด็ก แต่ประสิทธิภาพในการป้องกันวัณโรคจะลดลงในผู้ใหญ่⁽²⁾ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวัคซีนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้สูงขึ้นกว่าเดิม โดยเฉพาะประเทศไทย ซึ่งมีปัญหาการแพร่ระบาดของวัณโรคสูงเป็นอันดับต้นของโลก ซึ่งสอดคล้องกับแผนยุทธศาสตร์ในการยุติวัณโรค เรื่อง การส่งเสริมการวิจัยและพัฒนานวัตกรรม การป้องกัน ดูแลรักษา และควบคุมวัณโรค โดยแนวโน้มในการพัฒนาวัคซีนวัณโรคในปัจจุบันมีการใช้แอนติเจนมากกว่า 1 ชนิด มาพัฒนาวัคซีนในรูปแบบต่างๆ อาทิ วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live attenuated vaccine), วัคซีนเชื้อตาย, viral vector vaccine, protein subunit และ DNA vaccine โดยผลการศึกษาพบว่าวัคซีนสามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง และมีชนิด subunit ที่อยู่ระหว่างการทดสอบในมนุษย์⁽³⁾

จากองค์ความรู้ในปัจจุบันทำให้ทราบกลไกการดำเนินของโรคในแต่ละระยะ ซึ่งเชื่อจะมีการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของ host ที่แตกต่างกัน ทำให้ปัจจุบันแนวโน้มการพัฒนาวัคซีนวัณโรคจะมีการออกแบบวัคซีนที่ประกอบด้วยแอนติเจนที่แสดงออกในระยะต้นของการติดเชื้อและระยะแฝง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการป้องกันวัณโรคในทุกๆ ระยะ คณะผู้วิจัยจึงมีเป้าหมายในการออกแบบวัคซีน

ป้องกันวัณโรคในรูปแบบวัคซีน mRNA โดยใช้แอนติเจน Ag85B (Rv1886c หรือ Mycolyl transferase 85B) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างผนังเซลล์ โดยจะทำหน้าที่เชื่อม mycolic acid กับ arabinogalactan ของผนังเซลล์ Mtb⁽⁴⁾ โดย Ag85B จะแสดงออกในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อและจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป Ag85B กระตุ้นได้ทั้ง humoral และ cell-mediated immune response ได้ทั้งในผู้ป่วยวัณโรคระยะแสดงอาการและระยะแฝง⁽⁵⁾ แอนติเจน ESAT-6 (Rv3875 หรือ Early Secreted Antigenic Target 6 kDa) ผลิตจากเชื้อ Mtb และหลั่งออกมานอกเซลล์ มีความสามารถในการกระตุ้น T-cell โดยการจับกับ TLR-2 receptor แล้วยับยั้ง Downstream Signal Transduction⁽⁶⁾ และมีการศึกษาว่าการยับยั้งโปรตีน ESAT-6 จะลดความรุนแรงของเชื้อ Mtb และกระตุ้นการหลั่ง IL-8 ของ epithelial cells บริเวณปอด ซึ่งเป็นแอนติเจนในไม่ที่ชนิดที่ Mtb แสดงออกอย่างต่อเนื่องในปริมาณที่สูงทุกระยะของการติดเชื้อ ดังนั้นจึงเป็นเป้าหมายในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยและวัคซีนป้องกันวัณโรค⁽⁷⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานที่พบว่าแอนติเจน Rv2660c ซึ่งเป็นโปรตีนแอนติเจนที่พบได้มากในระยะแฝง ทำหน้าที่กระตุ้น human macrophage ให้สร้าง Pro-inflammatory cytokine ผ่าน TLR-2 signal โดยมีการศึกษาพบว่า Rv2660c สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ในผู้ติดเชื้อระยะแฝงได้สูงกว่าผู้ติดเชื้อระยะแสดงอาการ ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนา Post-exposure TB vaccine⁽⁸⁾ โดยการศึกษาท่อนำหน้าได้มีการพัฒนาวัคซีน H56:IC31 ซึ่งเป็นชนิด subunit vaccine ที่ประกอบด้วยแอนติเจน 3 ชนิดดังกล่าว และมีการศึกษาในระดับ clinical phase โดยใช้ IC31 เป็น adjuvant ผลการศึกษาพบว่าวัคซีนมีความปลอดภัย และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี ซึ่งวัคซีนชนิดนี้มีการศึกษาถึงระยะ clinical phase 2b⁽⁹⁾

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c รูปแบบ fusion protein เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบและพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรครูปแบบ mRNA ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมแอนติเจน Mtb ในรูปแบบโปรตีนลูกผสมจากเซลล์ *Escherichia coli*

เตรียม Mtb antigen จำนวน 4 รูปแบบ ได้แก่ Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c รูปแบบ fusion protein โดยออกแบบและสังเคราะห์ยีนของเชื้อ Mtb ได้แก่ *Ag85B*, *ESAT-6*, *Rv2660c* และ *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* โดยยีน *Ag85B* และ *Rv2660c* สังเคราะห์ส่วน FLAG tag sequences เชื่อมต่อกับปลายด้าน 5' ส่วนยีน *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* สังเคราะห์ส่วน FLAG tag sequences เชื่อมต่อกับปลายด้าน 3' ในขณะที่ยีน *ESAT-6* ใช้ส่วน 6xHis tag sequence ที่อยู่บนพาหะพลาสมิด จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณยีนที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้เอนไซม์ Q5 DNA polymerase (New England Biolabs, USA) แล้วนำยีนที่ได้เชื่อมต่อกับพลาสมิด pET21a(+) (Merck Millipore, USA) ด้วยเอนไซม์ ligase (Promega, USA) ในตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* จากนั้น transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TG1 แล้วนำโคลนลูกผสมมาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่แทรกอยู่ในพลาสมิดด้วย BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ก่อนนำไป transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ ClearColi™ BL21 (DE3) (Biosearch Technologies, USA) เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสม โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนด้วย Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Thermo Scientific, Italy) โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม⁽¹⁰⁾ ดังนี้ สำหรับรีคอมบิแนนท์โคลน Ag85B เติม 0.04 mM IPTG เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง รีคอมบิแนนท์โคลน ESAT-6 และ Rv2660c เติม 0.4 mM IPTG เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และรีคอมบิแนนท์โคลน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion เติม 0.4 mM IPTG เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค affinity chromatography สำหรับโปรตีน Ag85B, Rv2660c

และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion protein ใช้ Anti-FLAG affinity column chromatography (Millipore, USA)⁽¹¹⁾ โปรตีน ESAT-6 ใช้ Anti-His affinity column chromatography (Novagen, USA)⁽¹²⁾ แล้ว dialyze ให้อยู่ในสารละลาย PBS pH 7.4 นำไปวิเคราะห์ปริมาณ endotoxin โดยใช้ชุดน้ำยา Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo Scientific, USA)⁽¹³⁾ ก่อนนำไปฉีดทดสอบกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองต่อไป

การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน Mtb ในรูปแบบโปรตีนลูกผสมในสัตว์ทดลอง

ทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ (Nomura Siam International Co., Ltd, Thailand) โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ฉีดด้วยแอนติเจนชนิดต่าง ๆ 4 กลุ่ม ได้แก่ Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) ซึ่งฉีดด้วยสารละลาย PBS (Cytiva, USA) ปริมาณ 5 ไมโครกรัม/dose ใช้ Aluminum hydroxide (OZBiosciences, USA) ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม เป็น adjuvant โดยฉีดส่วนผสม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/dose เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ของหนูจำนวน 2 ครั้ง ระยะเวลาห่างกัน 4 สัปดาห์ ทำการเจาะเก็บเลือด จำนวน 3 ครั้ง โดยเจาะเลือดจากข้างแก้มหนู จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 0.2 มิลลิลิตร ที่เวลา ก่อนฉีดครั้งที่ 1 และก่อนฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังฉีดกระตุ้นครบ 4 สัปดาห์ ทำการ Euthanasia หนู ด้วยยาสลบ Isofurane (Attane, USA) เก็บเลือดจากหัวใจ จำนวน 1 ครั้ง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเก็บม้าม นำเลือดไปปั่นแยกซีรัมเพื่อใช้ทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response และนำม้ามไปทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ cell mediated immune response

จริยธรรมการวิจัยในสัตว์

การศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองนี้ผ่านการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่ 012/2023 ลงวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2567 และ

ผ่านการพิจารณาความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตามหนังสือรับรองเลขที่ 030/2567 ลงวันที่ 19 เมษายน พ.ศ. 2567

การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response โดยวิธี Western blot

เพื่อศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นต่อโปรตีนแอนติเจน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion โดยวิธี Western blot เริ่มต้นด้วยการเตรียมโปรตีนที่บริสุทธิ์ในปริมาณ 3-5 ไมโครกรัม และเตรียม Polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 12-15% ทำการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ด้วยเครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Bio-Rad, USA) จากนั้นทำการย้ายโปรตีนจาก gel ไปยังแผ่น PVDF membrane (Bio-Rad, USA) โดยใช้ระบบการถ่ายโอนด้วยกระแสไฟฟ้า (transfer) ด้วยเครื่อง Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad, USA) จากนั้นทำการ block membrane ด้วยสารละลาย 5.0% skim milk (Millipore, USA) ในบัฟเฟอร์ TBST (Tris buffer saline pH 7.2, 0.05% Tween-20) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการจับแบบไม่จำเพาะ จากนั้นเติมซีรัมของหนูที่เจือจางในสารละลาย 1.0% skim milk ในบัฟเฟอร์ TBST ในอัตราส่วน 1:100 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้าง membrane ด้วยสารละลาย TBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที แล้วล้างอีกครั้งด้วยสารละลาย TBS (Tris buffer saline pH 7.2) เพื่อกำจัดซีรัมที่ไม่ได้จับกับโปรตีนบน membrane จากนั้นเติม goat anti-mouse-HRP (Dako, USA) ที่เจือจางใน TBST ในอัตราส่วน 1:1,000 และบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง membrane จำนวน 5 ครั้ง แล้วจึงเติมสารละลาย 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate (SeraCare, USA) ลงไปบน membrane เพื่อทำให้เกิดสีบนแถบโปรตีนและอ่านผลด้วยตาเปล่า

การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เพื่อศึกษาผลการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัมหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นต่อโปรตีนแอนติเจน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion โดยวิธี ELISA เริ่มต้นด้วยการเคลือบเพลท ELISA strip (Thermo Scientific, Denmark) ด้วยโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังนี้ Ag85B, ESAT-6, Rv2660c หรือ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ในปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อหลุม บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ทำการ block เพลทด้วยสารละลาย 5.0% skim milk ในสารละลาย PBST บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมที่เจือจางในสารละลาย 1.0% skim milk ในอัตราส่วน 1:100 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติม Rabbit anti mouse (DAKO, USA) ในอัตราส่วน 1:10,000 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBST จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติม TMB substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดจนแสง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 2.0 M sulfuric acid (Merck, Germany) ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Absorbance Microplate Reader Sunrise (TECAN, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 450/630 นาโนเมตร วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism V.9 (GraphPad, USA) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้สถิติ Two-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคู่ด้วยวิธี Bonferroni⁽¹⁴⁾

การกระตุ้นเซลล์ม้ามเพื่อทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cellular immune response

นำม้ามของหนูแต่ละตัวที่อยู่ในสารละลาย PBS เเทลงใน cell-strainer ขนาด 70 ไมครอน (SPL Life Sciences, Korea) กรองลง petri dish (Greiner

Bio-One, Thailand) และบด้ามด้วย syringe plunger (Terumo, Japan) จากนั้นนำเซลล์ใน petri dish ที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 700× g เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ cell pellet มาทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยใช้ ACK Lysis Buffer (Invitrogen, USA) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที โดยเขย่าเบาๆ เป็นระยะ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Complete RPMI Medium (Gibco, USA) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum, FBS (Gibco, USA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 700× g เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างเซลล์ splenocyte ที่ได้ด้วย Complete RPMI Medium อีก 1 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วย 5 มิลลิลิตร Complete RPMI Medium นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Zeiss, Germany) จากนั้นกระตุ้นเซลล์ splenocyte ที่ได้ด้วยสารกระตุ้นชนิดต่างๆ โดยกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6 และ RV2660c กระตุ้นเซลล์ด้วย 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Ag85B (Abcam, United Kingdom), ESAT-6 (Abcam, United Kingdom) และ Rv2660c ที่ผลิตขึ้นเอง ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion กระตุ้นเซลล์ด้วยโปรตีนทั้งสามชนิดพร้อมกันได้แก่ Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ที่ความเข้มข้นแต่ละชนิด 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS เป็นกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ในแต่ละกลุ่มที่ฉีดแอนติเจนมี negative control ที่ไม่กระตุ้นเซลล์ด้วยโปรตีนใดๆ ในหลอดทดลอง (unstimulated) และ positive control ที่กระตุ้นเซลล์ด้วย 25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร Phorbol myristate acetate, PMA (Sigma-Aldrich, USA) ร่วมกับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Ionomycin (Sigma-Aldrich, USA) และทุกการทดลองเติม co-stimulator ได้แก่ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร anti-CD28 antibody (Biolegend, Canada) และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร anti-CD49 antibody (Biolegend, Canada) เติม 5×10^5 splenocyte ใน complete RPMI medium ที่มี 10% FBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม 96-well plate (Thermo Scientific, Denmark) ผสมกับสารกระตุ้นปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติม Brefeldin A solution, BFA (Biolegend, Canada) ที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วบ่มเพลทต่ออีก 4 ชั่วโมง เพื่อหยุดการหลั่งของ cytokine ออกนอกเซลล์ ปั่นตกตะกอนที่ 500x g เวลา 5 นาที นำส่วนของ supernatant ไปทดสอบหาปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ด้วยเทคนิค multiplex assay

การวิเคราะห์ปริมาณ cytokine: IFN- γ , IL-2 และ TNF- α โดยวิธี Multiplex assay

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ splenocyte หลังการกระตุ้นมาทดสอบโดยใช้ชุดน้ำยา MILLIPLEX[®] Mouse High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay (Millipore, USA) โดยเตรียมสารมาตรฐาน ได้แก่ interferon gamma (IFN- γ) และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) ให้มีความเข้มข้น 0-2,000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร และ interleukin-2 (IL-2) ให้มีความเข้มข้น 0-4,000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ใน Assay Buffer ของชุดน้ำยาข้างต้น จากนั้นเตรียมเพลท 96 หลุมโดยเติม Wash Buffer ของชุดน้ำยา ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ต้องการทดสอบ เขย่าเพลท เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเท Wash Buffer ออก เติมหาสารมาตรฐาน 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่กำหนด จากนั้นเติม Assay Buffer 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบตัวอย่าง และเติมตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมเดียวกัน เขย่าขวด Magnetic Bead เพื่อป้องกันการตกตะกอน แล้วเติม Magnetic Bead ของชุดน้ำยาที่ติดฉลากด้วย Anti-mouse antiserum ชนิดต่างๆ ได้แก่ anti-IFN- γ , anti-IL-2 และ anti-TNF- α เติมโดยไม่เจือจาง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ปิดเพลทด้วยแผ่นฟิล์ม (plate sealer) จากนั้นห่อเพลทด้วยแผ่นฟอยล์เพื่อป้องกันแสง และนำเพลทไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หรือ 16-18 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย Wash Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม Detection Antibody ของชุดน้ำยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ปิดเพลท

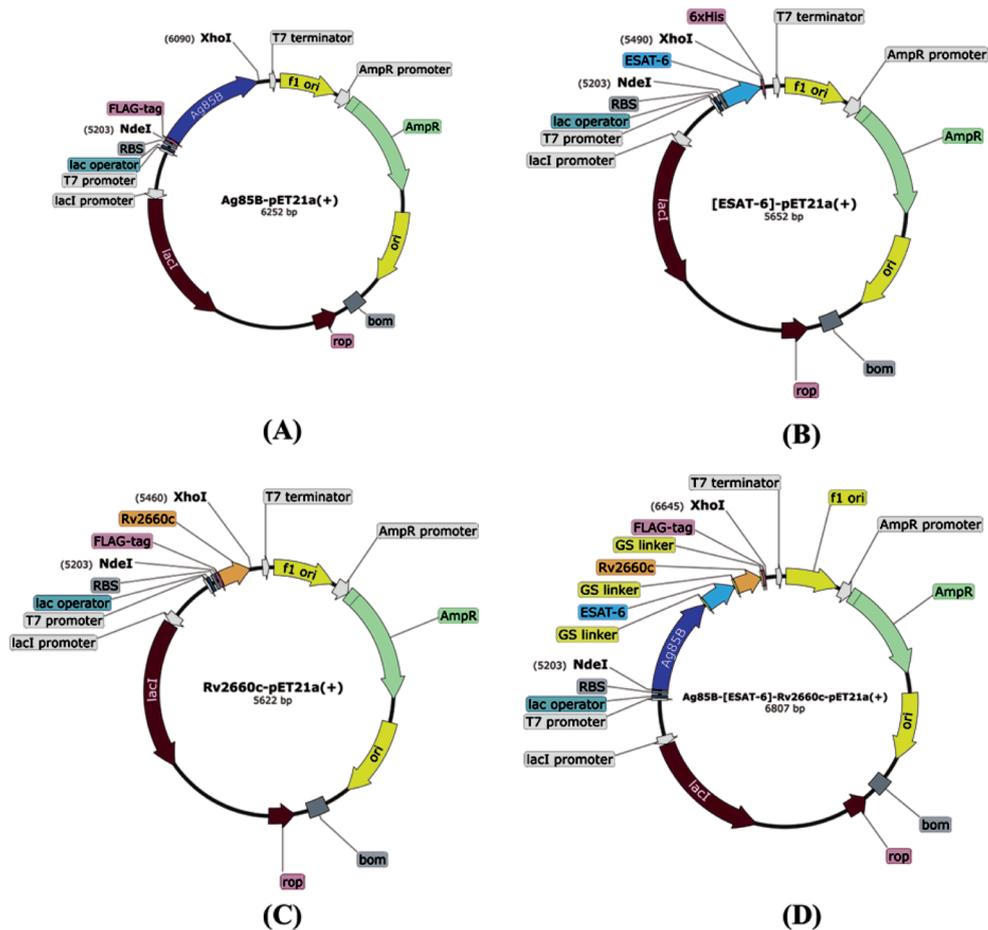
ด้วยแผ่นฟิล์ม และท่อเพลทด้วยแผ่นฟอยล์ เขย่าเพลทที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Streptavidin-Phycoerythrin ของชุดน้ำยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ปิดเพลทด้วยแผ่นฟิล์ม และท่อเพลทด้วยแผ่นฟอยล์ นำเพลทไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาดึงเพลทด้วย Wash Buffer จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม Sheath Fluid PLUS ของชุดน้ำยา ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทำการเขย่าเพลท เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง xMAP® INTELLIFLEX System (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยใช้โปรแกรม Belysa® Immunoassay curve fitting V.1.2.2 (Merck, Germany) จากนั้นนำผลที่อ่านได้มาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม

GraphPad Prism V.9 โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ด้วย Mann-Whitney Test

ผล

การเตรียมแอนติเจน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion จากเซลล์ *E. coli*

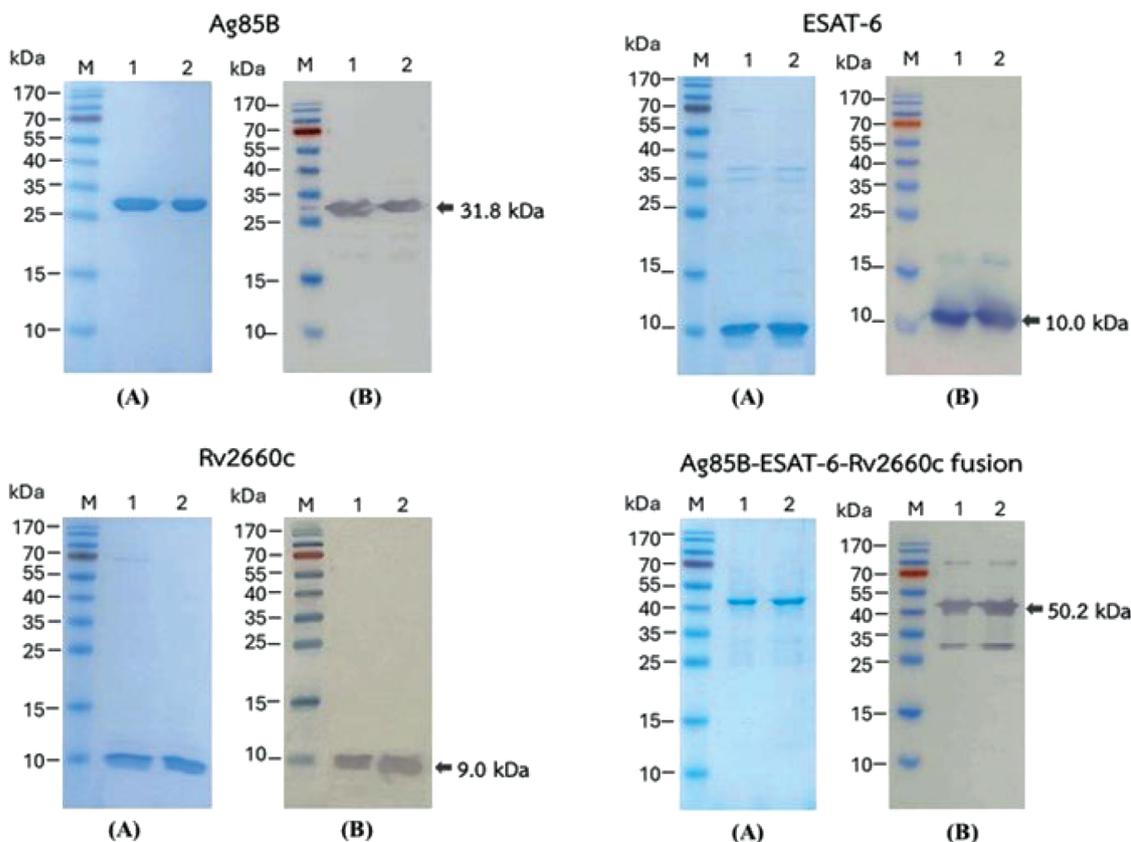
การโคลนยีน *Ag85B*, *Rv2660c* และ *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* เข้าสู่พลาสมิด pET21a(+) ซึ่งเติมส่วน FLAG tag sequences ส่วนยีน *ESAT-6* ถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิด pET21a(+) ซึ่งเติมส่วน ของ 6xHis tag sequence สำหรับใช้ในการติดตามการแสดงออกและแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนภาพของพาหะพลาสมิด ที่บรรจุชิ้นส่วนยีนที่ใช้ในการสร้างโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *Mtb* โดยการโคลนเข้าพาหะที่ตำแหน่งการตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* ตามลำดับ โดย (A) การโคลนยีน *Ag85B*, (B) การโคลนยีน *ESAT-6*, (C) การโคลนยีน *Rv2660c* และ (D) การโคลนยีน *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* เข้าสู่ pET21a(+) ตามลำดับ

เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาทำการวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และวิธี Western blot analysis พบแถบของโปรตีนที่ขนาดเดียวกันประมาณ 31.8, 10.0, 9.0, 50.2 kDa ของโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-

ESAT-6-Rv2660c fusion ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับขนาดโมเลกุลจากการคำนวณด้วยลำดับกรดอะมิโนดังแสดงในภาพที่ 2 และจากการตรวจหาปริมาณ Endotoxin ในโปรตีนตัวอย่างภายหลังการทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีความอยู่ระหว่าง 0.01184-0.02604 EU/ μ g



ภาพที่ 2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความจำเพาะของ Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion (A) SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie G-250 (B) Western blot analysis โดยโปรตีน Ag85B, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ใช้ anti-FLAG polyclonal antibody และโปรตีน ESAT-6 ใช้ anti-6xHis monoclonal antibody ในการตรวจสอบ โดย M: protein marker, 1-2: โปรตีนที่เตรียมได้ lot 1 และ 2 ตามลำดับ

การตรวจหาแอนติบอดีจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ด้วยวิธี Western blot

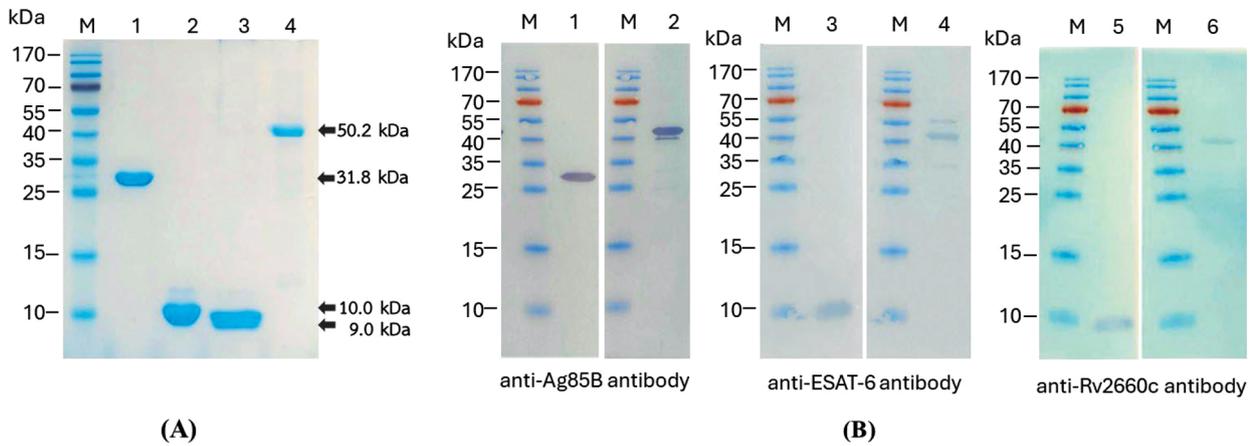
จากการตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ที่นำมาใช้ในการฉีดกระตุ้น โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะ ได้แก่ anti-ag85B rabbit polyclonal antibody (Abcam, UK), anti-ESAT-6 mouse monoclonal antibody (Alpha Diagnostic,

USA) และ anti-Rv2660c rabbit polyclonal antibody (GenScript, Republic of Korea) พบว่าแอนติบอดีดังกล่าวสามารถจับจำเพาะกับโปรตีนทั้งรูปแบบเดี่ยวและรูปแบบ fusion ได้โดยมีขนาดสอดคล้องกับแถบโปรตีนที่ย้อมด้วย Coomassie ดังแสดงในภาพที่ 3

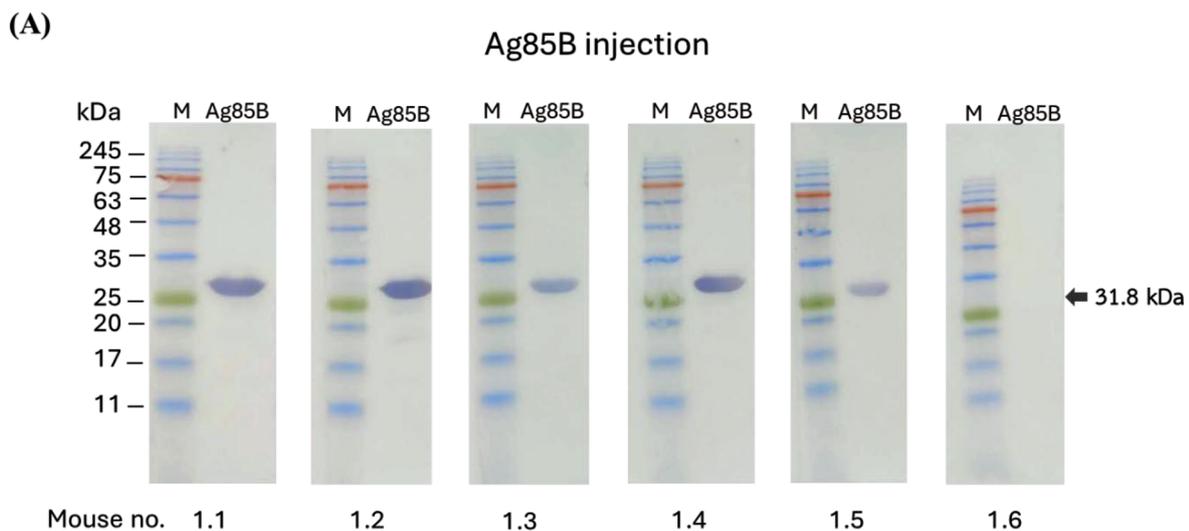
และจากการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแอนติบอดีในซีรัมหนูกลุ่มต่างๆ ด้วยวิธี Western blot โดยนำซีรัมหลังฉีดเข็มที่ 2 ที่ 28 วัน เจือจางในอัตราส่วน

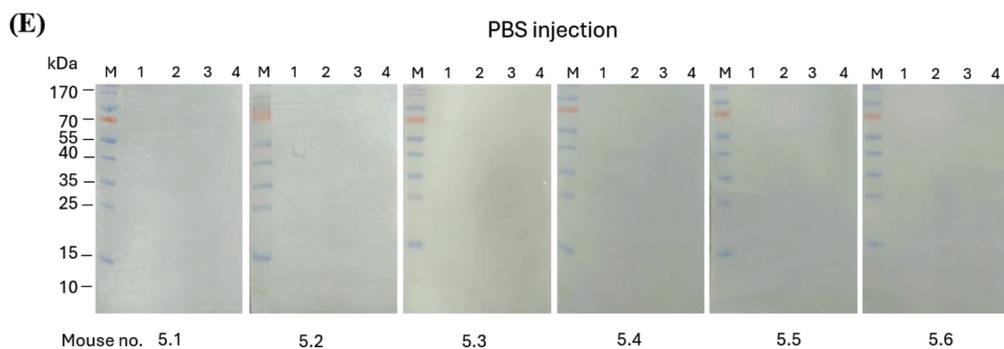
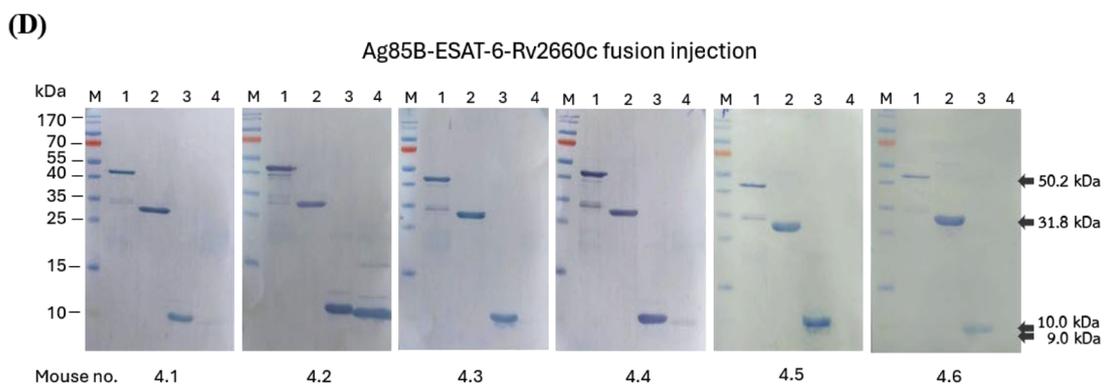
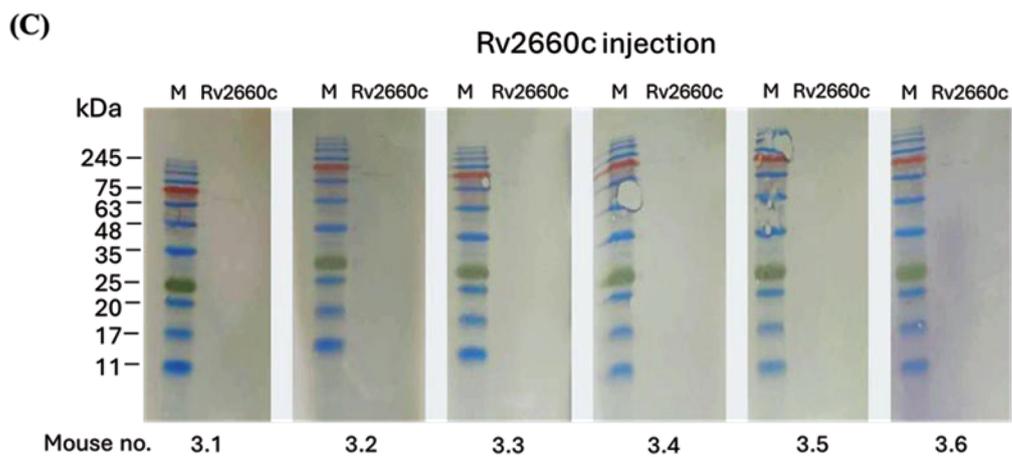
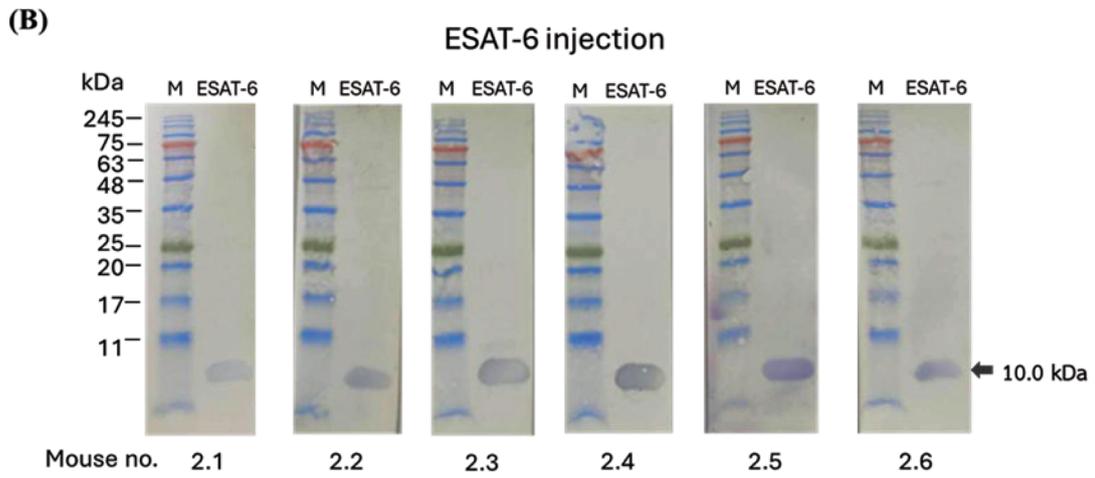
1:100 พบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B จำนวน 5 ใน 6 ตัว และหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 ทุกตัว มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน Ag85B และ ESAT-6 ตามลำดับ แต่ไม่พบการจับจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c สำหรับหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion เมื่อนำมาทดสอบการจับจำเพาะต่อโปรตีนทั้ง 4 ชนิด โดยพบว่าแอนติบอดีในซีรัมของหนู

กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion สามารถจับจำเพาะได้กับโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Ag85B และ ESAT-6 ได้ทั้งหมด แต่พบว่ามีเพียงซีรัมจากหนูตัวที่ 2 และ 4 ที่สามารถจับกับโปรตีน Rv2660c ได้ และไม่พบการจับจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูทุกตัวในกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS ต่อโปรตีนทุกชนิด ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 (A) SDS-PAGE แสดงขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ใน lane ที่ 1-4 ตามลำดับ (B) ผล Western blot แสดงการจับจำเพาะของแอนติบอดี anti-Ag85B rabbit polyclonal antibody, anti-ESAT-6 mouse monoclonal antibody และ anti-Rv2660c rabbit polyclonal antibody ใน lane ที่ 1, 3 และ 5 ตามลำดับ และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ใน lane ที่ 2, 4 และ 6 ตามลำดับ โดย M: protein marker





ภาพที่ 4 Western blot แสดงการจับจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูกับโปรตีนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้น (A) กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B (B) กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 (C) กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c (D) กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ต่อโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ใน lane ที่ 1-4 ตามลำดับ และ (E) กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS ต่อโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ใน lane ที่ 1-4 ตามลำดับ โดย M: protein marker

การตรวจหาแอนติบอดีจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ด้วยวิธี ELISA

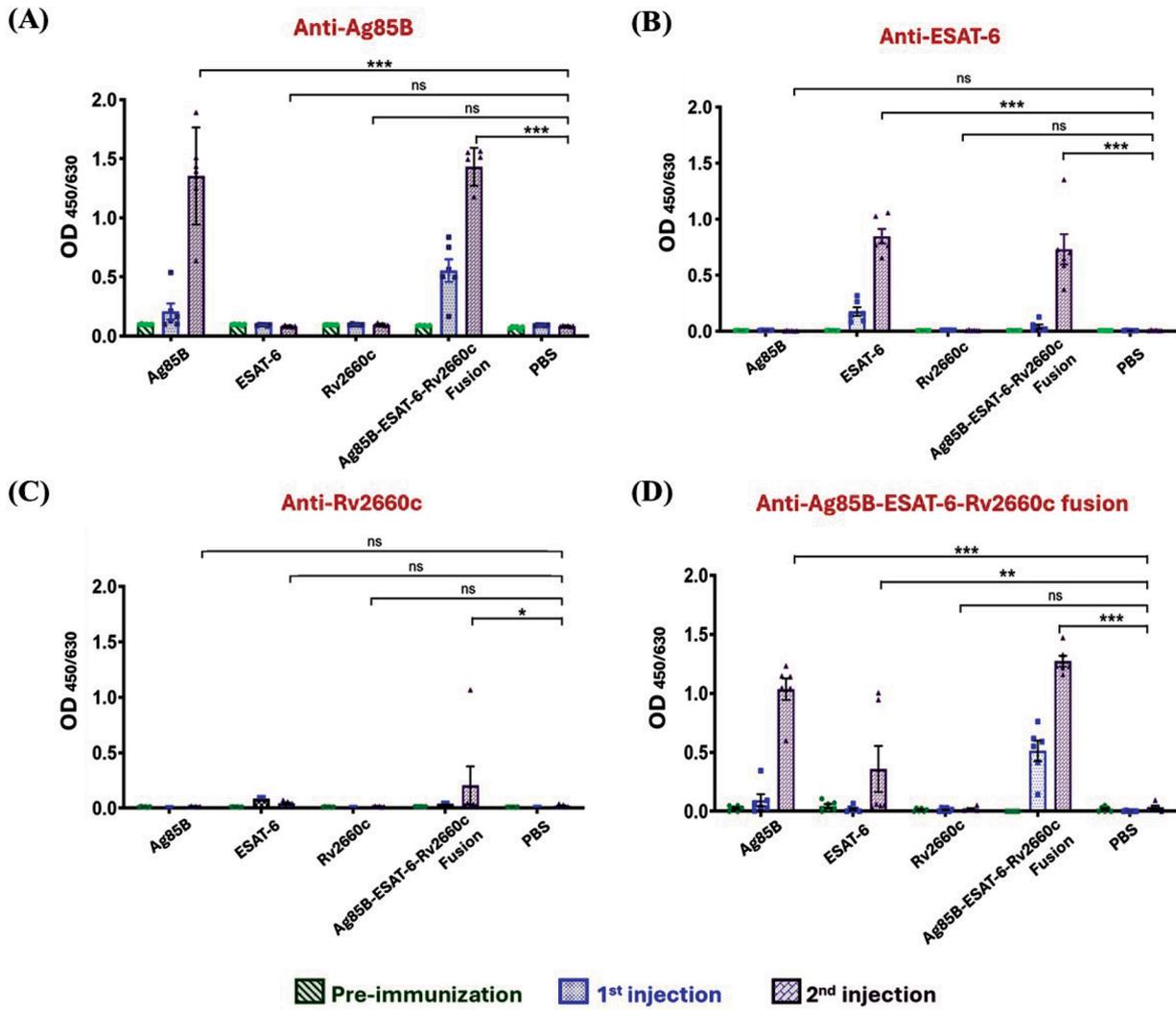
ผลการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแอนติบอดีในซีรัมหนูกลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี ELISA โดยนำซีรัมที่เก็บก่อนฉีดกระตุ้น ซีรัมหลังฉีดครั้งที่ 1 และซีรัมหลังฉีดครั้งที่ 2 ของหนูแต่ละตัว มาเจือจางในอัตราส่วน 1:100 และทดสอบการจับจำเพาะกับโปรตีนทุกตัวที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน โดยพบว่าหนูกลุ่มทดสอบที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS โดยพบว่าหนูกลุ่มควบคุม การตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีค่า OD_{450/630} ต่ำกว่า 0.1 หลังจากการฉีดทั้ง 2 ครั้ง

ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B พบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นหลังการฉีดครั้งที่ 1 และ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.213 และ 1.354 ตามลำดับ เช่นเดียวกับกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion พบว่าในการฉีดครั้งที่ 1 และ 2 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.553 และ 1.431 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 และกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c มีค่า OD_{450/630} ต่ำกว่า 0.1 ทุกช่วงการทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 5(A) ส่วนปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน ESAT-6 ในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นหลังการฉีดทดสอบครั้งที่ 1 และ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.159 และ 0.847 ตามลำดับ

และพบว่ากลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion หลังฉีดครั้งที่ 2 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.732 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B และกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c มีค่า OD_{450/630} ต่ำกว่า 0.1 ทุกช่วงการทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 5(B) และพบว่าปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน Rv2660c ในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion หลังฉีดครั้งที่ 2 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.204 โดยมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบการตอบสนองในกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ดังแสดงในภาพที่ 5(C) ปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ในหนูกลุ่มที่ฉีดครั้งที่ 2 ด้วยโปรตีน Ag85B และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.030 และ 1.272 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 พบว่าในการฉีดครั้งที่ 2 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.358 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c มีค่า OD_{450/630} ต่ำกว่า 0.1 ทุกช่วงการทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 5(D)

การวิเคราะห์ปริมาณ cytokine จากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cellular immune response ด้วยวิธี Multiplex assay

เพื่อศึกษาภูมิคุ้มกันชนิด cellular immune response ชนิด cytokine ที่เกิดจากการฉีดกระตุ้นหนู



ภาพที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกันของแอนติบอดีในซีรัมของหนูกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และ PBS ต่อโปรตีน (A) Ag85B, (B) ESAT-6, (C) Rv2660c และ (D) Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion โดยวิธี ELISA

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$

ด้วยโปรตีนแอนติเจนแต่ละชนิด โดยการคัดแยกเซลล์ splenocyte จากม้ามหนูและกระตุ้นซ้ำแบบ *ex vivo* ด้วยโปรตีนที่ใช้ฉีดกระตุ้น ผลการวิเคราะห์ปริมาณ cytokine ได้แก่ IFN- γ , IL-2 และ TNF- α ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte ของหนูทดลอง ด้วยเทคนิค Multiplex assay มีค่าเฉลี่ย (mean) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าปริมาณ IFN- γ ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของหนูกลุ่มที่ฉีดทดสอบด้วยโปรตีน Ag85B แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS และกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B อย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 256.74 และ 31.42 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณ IFN- γ ของหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีนชนิดเดียวกับที่ฉีดในหนู มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ IFN- γ เท่ากับ 16.46, 239.99 และ 501.65 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สูงกว่ากลุ่มที่ฉีดด้วย PBS แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS

มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ IFN- γ เท่ากับ 0.34, 0.51 และ 25.30 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6(A) และการวิเคราะห์ปริมาณ IL-2 ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นเซลล์ด้วยโปรตีนชนิดเดียวกับที่ฉีดในหนู มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ IL-2 เท่ากับ 4,187.63, 68.95, 1,048.22 และ 466.20 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS และกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ IL-2 เท่ากับ 28.26, 21.75, 40.22 และ 42.34 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6(B) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ TNF- α พบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 และ Rv2660c แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีนชนิดเดียวกัน มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ TNF- α เท่ากับ 63.80 และ 142.36 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ TNF- α เท่ากับ 31.67 และ 42.84 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย Ag85B และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีนชนิดเดียวกัน มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ TNF- α สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ splenocyte ที่ไม่ได้มีการกระตุ้น แต่พบว่าในกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ TNF- α สูงขึ้น

เมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B และโปรตีนรวม Ag85B+ESAT-6+Rv2660c ดังแสดงในภาพที่ 6(C) สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณ IFN- γ , IL-2 และ TNF- α ระหว่างกลุ่มที่ฉีดทดสอบด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และโปรตีนรวม Ag85B+ESAT-6+Rv2660c เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่าการกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6 และ Ag85B+ESAT-6+Rv2660c มีค่าเฉลี่ยปริมาณ IFN- γ สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณ IFN- γ เท่ากับ 638.39, 2.98 และ 501.65 พิโคกรัม/มิลลิลิตร และ 31.42, 0.34 และ 25.30 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7(A) และมีค่าเฉลี่ยปริมาณ IL-2 สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 302.44, 99.46 และ 466.20 พิโคกรัม/มิลลิลิตร และ 28.26, 21.75 และ 42.34 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยไม่พบการเพิ่มสูงขึ้นของ cytokine ทั้ง 2 ชนิด จากการกระตุ้นด้วยโปรตีน Rv2660c ดังแสดงในภาพที่ 7(B) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ TNF- α พบว่าเมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีค่าเฉลี่ยปริมาณ TNF- α สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 353.23 และ 189.39 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยปริมาณ TNF- α เมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B+ESAT-6+Rv2660c ดังแสดงในภาพที่ 7(C)

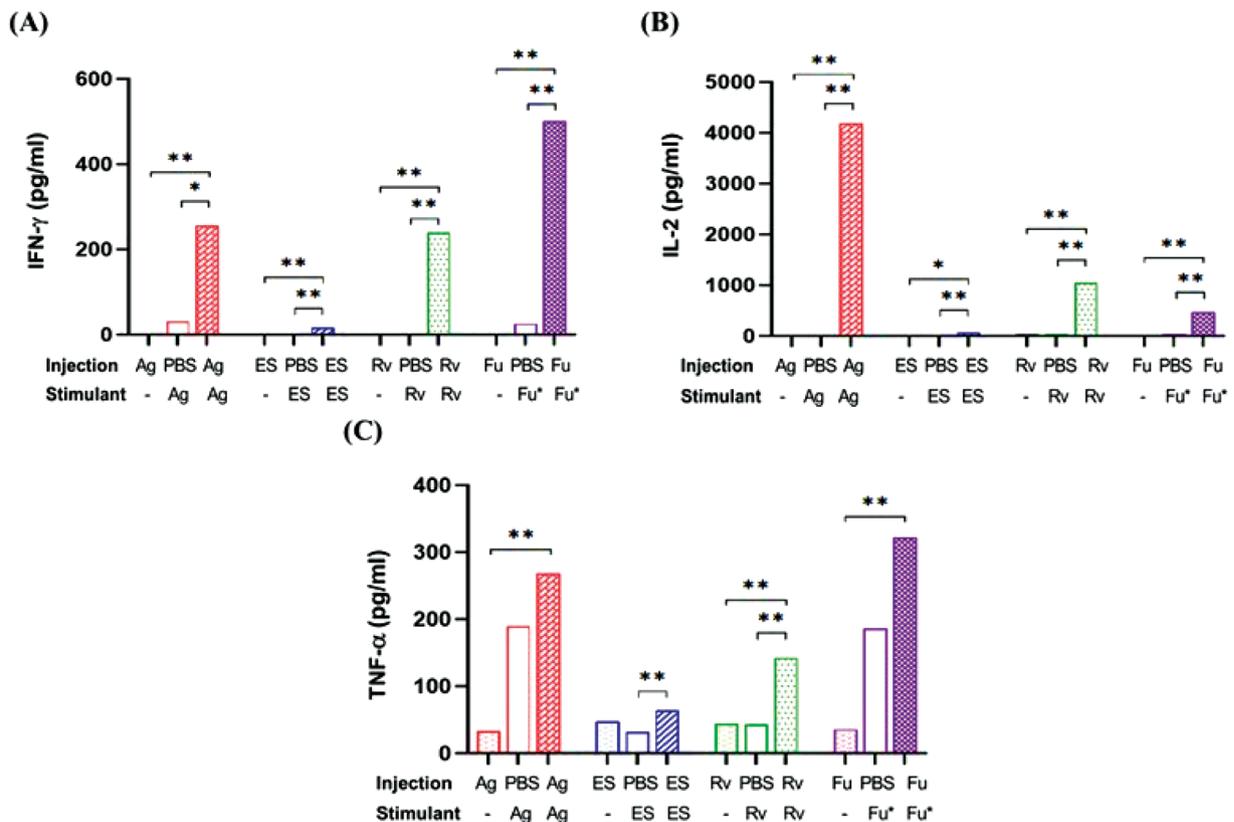
ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte ของหนูทดลองด้วยเทคนิค Multiplex assay

Injection	Stimulant	Concentration (pg/ml)		
		IFN- γ Mean (min-max)	IL-2 Mean (min-max)	TNF- α Mean (min-max)
PBS	unstimulated	0.41 (0.00-1.73)	19.92 (15.42-26.72)	35.13 (22.91-56.10)
PBS	Ag85B	31.42 (1.58-139.52)	28.26 (12.98-40.47)	189.39 (72.48-356.26)
Ag85B	unstimulated	0.67 (0.50-1.10)	26.41 (21.77-32.62)	33.28 (19.08-46.64)
Ag85B	Ag85B	256.74 (17.47-1,005.13)	4,187.63 (1,889.54-5,503.64)	268.50 (118.81-467.89)
PBS	ESAT-6	0.34 (0.00-0.82)	21.75 (8.93-36.29)	31.67 (18.23-43.20)
ESAT-6	unstimulated	0.77 (0.55-1.10)	30.18 (20.80-47.98)	47.27 (38.82-50.95)
ESAT-6	ESAT-6	16.46 (1.20-89.19)	68.95 (34.77-138.78)	63.80 (46.43-100.85)

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte ของหนูทดลองด้วยเทคนิค Multiplex assay (ต่อ)

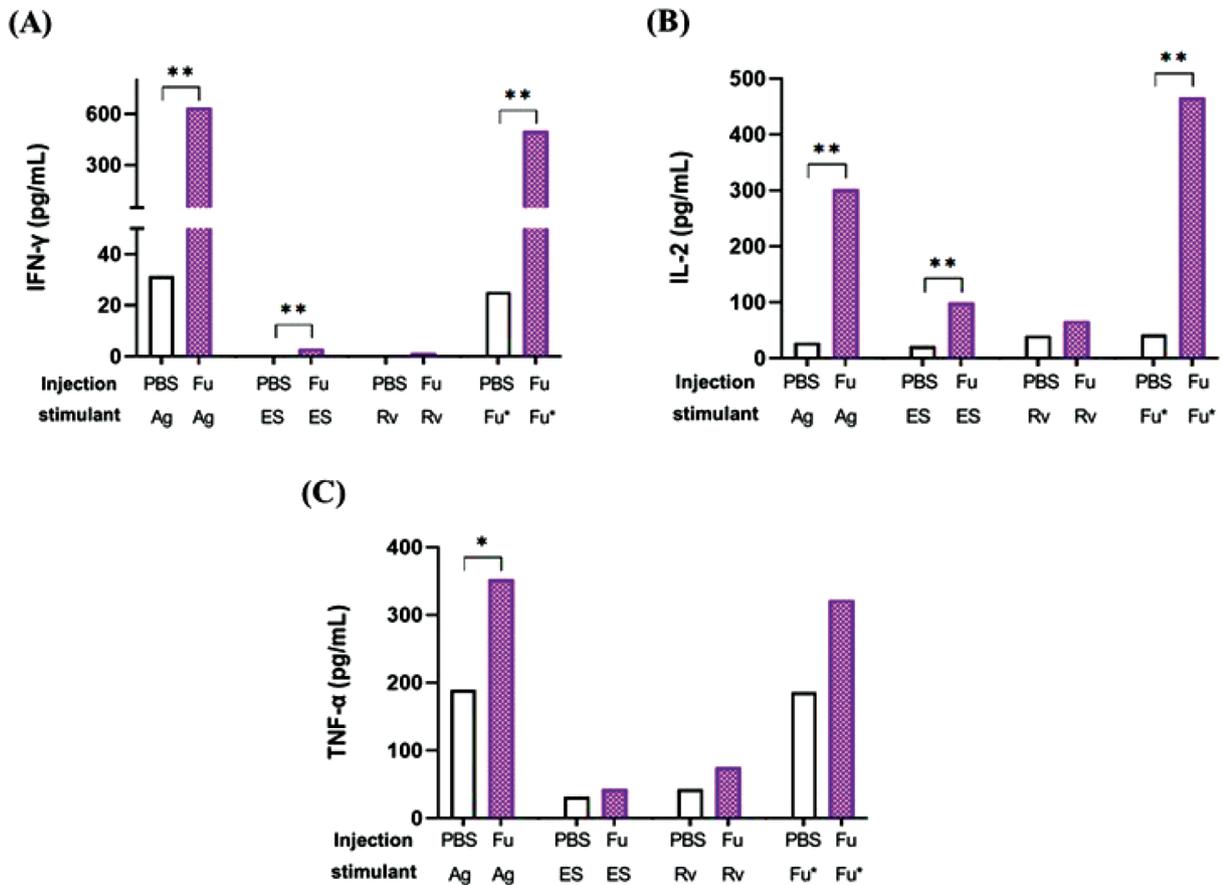
Injection	Stimulant	Concentration (pg/ml)		
		IFN- γ Mean (min-max)	IL-2 Mean (min-max)	TNF- α Mean (min-max)
PBS	Rv2660c	0.51 (0.00-1.43)	40.22 (25.28-68.39)	42.84 (24.40-56.80)
Rv2660c	unstimulated	1.10 (0.50-3.54)	41.86 (20.18-125.18)	44.13 (25.80-82.63)
Rv2660c	Rv2660c	239.99 (33.05-470.61)	1,048.22 (120.42-2,643.29)	104.36 (100.99-157.60)
PBS	Ag85B+ESAT-6 +Rv2660c	25.30 (0.88-88.07)	42.34 (25.16-58.22)	142.36 (71.32-304.84)
Fusion ¹	unstimulated	0.64 (0.28-1.08)	16.79 (9.49-24.17)	35.89 (22.34-58.64)
Fusion ¹	Ag85B+ESAT-6 +Rv2660c	501.65 (81.19-1,953.84),	466.20 (154.73-993.18)	322.11 (151.69-546.81)
Fusion ¹	Ag85B	638.39 (55.73-1,377.26)	302.44 (81.71-735.17)	353.23 (296.70-439.27)
Fusion ¹	ESAT-6	2.98 (0.80-5.06)	99.46 (43.41-149.65)	43.06 (26.70-61.87)
Fusion ¹	Rv2660c	9.24 (0.59-47.55)	66.82 (21.10-94.55)	74.97 (33.83-167.43)

หมายเหตุ: Fusion¹: Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion



Ag: Ag85B, ES: ESAT-6, Rv: Rv2660c, Fu: Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Fu*: Ag85B+ESAT-6+Rv2660c

ภาพที่ 6 แสดงปริมาณ cytokine ได้แก่ (A) IFN- γ และ (B) IL-2 ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte ภายหลังจากกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion โดยเปรียบเทียบระหว่างหนูกุ่มที่ฉีดทดสอบด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion กับหนูกุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ด้วย Mann-Whitney Test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



Ag: Ag85B, ES: ESAT-6, Rv: Rv2660c, Fu: Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Fu*: Ag85B+ESAT-6+Rv2660c

ภาพที่ 7 แสดงปริมาณ cytokine ได้แก่ (A) IFN-γ และ (B) IL-2 ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte โดยเปรียบเทียบระหว่างหนูกุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และหนูกุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ด้วย Mann-Whitney Test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

วิจารณ์

ประเทศไทยประสบปัญหาการแพร่ระบาดของ วัณโรคสูงเป็นอันดับต้นของโลก และกำหนดแผน ยุทธศาสตร์ในการยุติวัณโรคของประเทศภายในปี พ.ศ. 2578 ที่สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ขององค์การอนามัย โลก⁽¹⁵⁾ ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการ พัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral และ cellular immune response ต่อแอนติเจนจำเพาะของเชื้อ Mtb ที่ครอบคลุมในทุกระยะของการติดเชื้อ การศึกษานี้ได้ พัฒนาโปรตีนรีคอมบิแนนท์ ซึ่งเป็นแอนติเจนของเชื้อ Mtb 3 ชนิด จำนวน 4 รูปแบบ ได้แก่ Ag85B, ESAT-6,

Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion จากการทดลองพบว่าสามารถโคลนและสร้าง พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ของยีนแต่ละแอนติเจน และ ยีนรวมทั้งสามชนิด แล้วผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์จาก เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ClearColi™ BL21 (DE3) ซึ่งสามารถเตรียมโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์ ทั้งนี้ผลการ ตรวจสอบคุณสมบัติลักษณะของโปรตีนด้วยเทคนิค electrophoresis พบว่าโปรตีนมีขนาดสอดคล้องกับ ขนาดโมเลกุลจากการคำนวณด้วยลำดับกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม SnapGene และจากการตรวจสอบ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแต่ละชนิดด้วย เทคนิค Western blot นอกจากนี้พบว่าโปรตีนมี

ปริมาณ endotoxin ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์อยู่ระหว่าง 0.01184-0.02604 EU/ μ g ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนดสำหรับการฉีดทดสอบในหนูทดลองโดยมีค่าไม่เกิน 0.03 EU/ μ g⁽¹⁶⁾

ในการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองโดยฉีดทดสอบด้วยแอนติเจนในรูปแบบเดี่ยว ได้แก่ Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และรูปแบบผสม Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และใช้ aluminum hydroxide เป็นสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) จากผลทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ด้วยเทคนิค Western blot และ ELISA พบว่าโปรตีนแอนติเจน Ag85B, ESAT-6 และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีในหนูทดลอง โดยแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B มีปริมาณสูงกว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน ESAT-6 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ทดสอบผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองของวัคซินรูปแบบ DNA ที่สร้างโปรตีน Ag85B และ ESAT-6 โดยพบปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B สูงกว่าเช่นเดียวกันเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค ELISA⁽¹⁷⁾ ส่วนกลุ่มที่ฉีดด้วยแอนติเจน Rv2660c ไม่พบแอนติบอดีที่สามารถจับจำเพาะต่อโปรตีน Rv2660c ทั้งวิธี Western blot และ ELISA ซึ่งแตกต่างจากโปรตีนอื่น อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของโปรตีนแอนติเจน รูปแบบที่ฉีดและจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการฉีด รวมถึงปริมาณที่ฉีดเป็นต้น ซึ่งโปรตีน Rv2660c เป็นโปรตีนที่สร้างในระยะพักตัว (dormant stage) และมีรายงานการตรวจแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดนี้ในผู้ติดเชื้อระยะแฝง⁽¹⁸⁾ และพบรายงานการศึกษา B-cell epitope ของโปรตีน Mtb โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่าโปรตีน Rv2660c มีจำนวน B-cell epitope น้อยกว่าโปรตีน Ag85B และ ESAT-6⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้มีรายงานการฉีดหนูด้วย plasmid DNA ที่ผลิตโปรตีน Rv2660c ปริมาณ 50 ไมโครกรัม โดยฉีดกระตุ้นรวม 3 ครั้ง ซึ่งสามารถกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน Rv2660c⁽²⁰⁾ แต่ในการศึกษานี้ฉีดด้วยโปรตีนปริมาณ 5 ไมโครกรัม และฉีดจำนวน 2 ครั้ง อาจทำให้ไม่เกิดการสร้างแอนติบอดีเนื่องจากปริมาณแอนติเจนที่ฉีดน้อย

ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cellular immune response โดยการกระตุ้นเซลล์ splenocyte จากม้ามของหนูแบบ ex vivo stimulation ด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และรวมโปรตีนทั้ง 3 ชนิด Ag85B, ESAT-6, Rv2660c พร้อมกัน ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ด้วยเทคนิค Multiplex assay โดยการวัดปริมาณ IFN- γ , IL-2 และ TNF- α ซึ่งเป็น cytokine ในกลุ่ม Th1 เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด cellular immune response และมีบทบาทเกี่ยวข้องในการกำจัดเชื้อ Mtb โดยอาศัยการทำงานร่วมกันแบบ polyfunctional T cell ซึ่ง IFN- γ ทำหน้าที่ในการกระตุ้น macrophage และ CD4 helper T cell ส่วน IL-2 ทำหน้าที่กระตุ้น T cell ให้เกิด proliferation และ differentiation และสำหรับ TNF- α เกี่ยวข้องกับกระบวนการ proinflammatory effect โดยการชักนำ immune cell อื่น ๆ⁽²¹⁾ จากผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีการกระตุ้นให้หลั่ง cytokine ชนิด IFN- γ , IL-2 และ TNF- α สูงกว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6 และหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Rv2660c ซึ่งผลการทดลองในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีการกระตุ้นให้หลั่ง cytokine ทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าเมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6 หรือกระตุ้นด้วยโปรตีน Rv2660c แสดงว่าโปรตีน Ag85B มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่าโปรตีน ESAT-6 และ Rv2660c นอกจากนี้ยังพบว่าหนูที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีนรวม Ag85B+ESAT-6+Rv2660c มีการหลั่ง cytokine ทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าการกระตุ้นด้วยโปรตีนเดี่ยว Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ซึ่งผลการกระตุ้นการหลั่ง cytokine ที่สูงน่าจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของโปรตีน Ag85B⁽²²⁾ ได้แก่ ขนาดของโปรตีน Ag85B มีขนาด 31.8 kDa และจำนวน T cell epitope เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในหนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย

adjuvant แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B และโปรตีนรวม Ag85B+ESAT-6+Rv2660c ซึ่งมี Ag85B เป็นส่วนประกอบ พบว่ามีค่า TNF- α ที่หลั่งออกมาสูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโปรตีน Ag85B ที่ใช้ในการกระตุ้น มีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate โดยเซลล์ macrophage ผ่าน Toll-like receptor (TLR)⁽²³⁾ จากการศึกษาพบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Rv2660c มีการหลั่ง cytokine ทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าหนูที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6 แสดงว่าโปรตีน Rv2660c ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็ก 9.0 kDa ที่มีขนาดใกล้เคียงกันกับโปรตีน ESAT-6 ขนาด 10.0 kDa มีคุณสมบัติในการกระตุ้น cellular immune response ได้ดีกว่าโปรตีน ESAT-6 แต่ไม่กระตุ้น humoral immune response ในขณะที่โปรตีน ESAT-6 สามารถกระตุ้น humoral immune response ได้ดี แต่กระตุ้น cellular immune response ได้น้อยกว่า

จากผลการศึกษาพบว่ามีความสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า ที่กล่าวถึงความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโปรตีนแต่ละชนิด คือ โปรตีน Ag85B สามารถกระตุ้น Th1 cytokine ได้แก่ IFN- γ และ TNF- α และ Th2 cytokine ได้แก่ IL-4 และ IL-10 และการสร้างแอนติบอดีในหนูทดลอง⁽²²⁾ และสามารถกระตุ้น T-cell proliferation และการสร้าง IFN- γ ได้สูงในผู้สัมผัสเชื้อ *Mtb*⁽²⁴⁾ และเป็นแอนติเจนสำคัญที่มักนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับป้องกันวัณโรคชนิดใหม่⁽²⁵⁾ โปรตีน ESAT-6 สามารถกระตุ้น T cell รวมทั้งการสร้างแอนติบอดีในหนูทดลอง⁽²⁶⁾ และสามารถกระตุ้น Th1/Th2/Th17 และการสร้าง cytokine ในหนูทดลอง⁽²⁷⁾ และเป็นแอนติเจนสำคัญที่มักนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับป้องกันวัณโรคชนิดใหม่⁽²⁶⁾ เช่นเดียวกับโปรตีน Ag85B และโปรตีน Rv2660c สามารถกระตุ้นเซลล์ macrophage ของมนุษย์ให้หลั่ง proinflammatory cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง granuloma และการรักษาสภาพ ซึ่งได้แก่ IL-1 β , IL-8, TNF- α และ IL-12p70 โดยผ่าน Toll-like receptor 2 (TLR2)⁽⁸⁾

นอกจากนี้ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันยังขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารเสริมฤทธิ์หรือ adjuvant

โดยในการศึกษานี้ใช้ aluminum hydroxide ซึ่งเป็น adjuvant ที่ใช้ในวัคซีนที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในมนุษย์มานาน มีความปลอดภัยสูง มีคุณสมบัติเสริมการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนโดยสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral และ cellular ซึ่งมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate และ antigen presenting cell^(28,29) ด้วยเหตุนี้เมื่อฉีดโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ร่วมกับ adjuvant จึงสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองทั้งชนิด humoral immune response และ cellular immune response ซึ่งโปรตีนดังกล่าวมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนและศึกษาในขั้นต่อไป

สรุป

จากการศึกษานี้ สามารถสร้างและผลิตแอนติเจนของเชื้อ *Mtb* ชนิดรีคอมบิแนนท์ใน *E. coli* และสามารถทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน จำนวน 3 ชนิด 4 รูปแบบ ในหนูทดลอง ประกอบด้วย Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และจากผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral immune response และ cellular immune response พบว่า Ag85B, ESAT-6 และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด humoral immune response และ cellular immune response ส่วนโปรตีน Rv2660c ซึ่งเป็นแอนติเจนที่พบในระยะเวลาแฝงมีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันเฉพาะชนิด cellular immune response ดังนั้นแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด จึงมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันวัณโรคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในการสนับสนุนทุนวิจัยผ่านสถาบันวัคซีนแห่งชาติ ในการดำเนินโครงการวิจัยและพัฒนาวัคซีน Modified *Ag85B-ESAT6-Rv2660c* mRNA สำหรับป้องกันวัณโรค ภายใต้สัญญาเลขที่ 2566.1/22

เอกสารอ้างอิง

1. Kiazky S, Ball TB. Latent tuberculosis infection: an overview. *Can Commun Dis Rep* 2017; 43(3-4): 62-6.
2. Setiabudiawan TP, Reurink RK, Hill PC, Netea MG, van Crevel R, Koeken VA. Protection against tuberculosis by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination: a historical perspective. *Med* 2022; 3(1): 6-24.
3. Zhou F, Zhang D. Recent advance in the development of tuberculosis vaccines in clinical trials and virus-like particle-based vaccine candidates. *Front Immunol* 2023; 14: 1238649. (12 pages).
4. Huygen K. The immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-transferases of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis*. *Front Immunol* 2014; 5: 321. (11 pages).
5. Macedo GC, Bozzi A, Weinreich HR, Bafica A, Teixeira HC, Oliveira SC. Human T cell and antibody-mediated responses to the *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 85A, 85B, and ESAT-6 antigens. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 351573. (10 pages).
6. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol* 2007; 8(6): 610-8.
7. Boggaram V, Gottipati KR, Wang X, Samten B. Early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces interleukin-8 (IL-8) expression in lung epithelial cells via protein kinase signaling and reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2013; 288(35): 25500-11.
8. Yihao D, Hongyun H, Maodan T. Latency-associated protein Rv2660c of *Mycobacterium tuberculosis* augments expression of proinflammatory cytokines in human macrophages by interacting with TLR2. *Infect Dis (Lond)* 2015; 47(3): 168-77.
9. Jenum S, Tonby K, Rueegg CS, Rühwald M, Kristiansen MP, Bang P, et al. A Phase I/II randomized trial of H56:IC31 vaccination and adjunctive cyclooxygenase-2-inhibitor treatment in tuberculosis patients. *Nat Commun* 2021; 12(1): 6774. (13 pages).
10. Novagen. pET System Manual. 11th ed. [online]. 2005; [cited 2023 Apr 12]; [80 screens]. Available from: URL: https://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf.
11. Merck. ANTI-FLAG[®] M2 affinity gel. [online]. 2021; [cited 2023 Mar 10]; [8 screens]. Available from: URL: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/236/831/a2220bul-mk.pdf>.
12. Novagen. Ni-NTA His•Bind[®] Resins. [online]. 2023; [cited 2023 Mar 10]; [32 screens]. Available from: URL: https://www.merckmillipore.com/TH/en/product/Ni-NTA-Buffer-Kit,EMD_BIO-70899#anchor_BRO.
13. Thermo Fisher Scientific. Pierce[™] chromogenic endotoxin quant kit user guide. [online]. 2023; [cited 2023 Mar 10]; [6 screens]. Available from: URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017902_ChromogenicEndotoxinQuantKit_UG.pdf.
14. Zar JH. Biostatistical analysis. London: Pearson Education Limited; 2013.
15. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แผนปฏิบัติการระดับชาติ ด้านการต่อต้านวัณโรค ระยะที่ 2 (พ.ศ. 2566 - 2570). นนทบุรี: กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2566.
16. Brito LA, Singh M. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. *J Pharm Sci* 2011; 100(1): 34-7.
17. Wang P, Wang L, Zhang W, Bai Y, Kang J, Hao Y, et al. Immunotherapeutic efficacy

- of recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing Ag85B-ESAT6 fusion protein against persistent tuberculosis infection in mice. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(1): 150-8.
18. He H, Yang H, Deng Y. *Mycobacterium tuberculosis* dormancy-associated antigen of Rv2660c induces stronger immune response in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection than that in active tuberculosis in a Chinese population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34(6): 1103-9.
 19. Thangamariappan E, Mohan M, Sundar K. Computational prediction of B cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* – implications in vaccine design. *Mediterr J Infect Microbes Antimicrob* 2021; 10: 23. (6 pages).
 20. Kong H, Dong C, Xiong S. A novel vaccine p846 encoding Rv3615c, Mtb10.4, and Rv2660c elicits robust immune response and alleviates lung injury induced by *Mycobacterium* infection. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(2): 378-90.
 21. Ahmad F, Zubair S, Gupta P, Gupta UD, Patel R, Owais M. Evaluation of aggregated Ag85B antigen for its biophysical properties, immunogenicity, and vaccination potential in a murine model of tuberculosis infection. *Front Immunol* 2017; 8: 1608. (19 pages).
 22. Dong H, Jing W, Yingru X, Wenyang W, Ru C, Shengfa N, et al. Enhanced anti-tuberculosis immunity by a TAT-Ag85B protein vaccine in a murine tuberculosis model. *Pathog Glob Health* 2015; 109(8): 363-8.
 23. Zhou L, Luo L, Luo L, Luo H, Ding Y, Lu Z, et al. Ag85B-induced M1 macrophage polarization via the TLR4/TRAF6/NF- κ B axis leading to bronchial epithelial cell damage and TH17/Treg imbalance. *Curr Mol Med*. [online]. 2025; [cited 2025 Feb 1]; [16 screens]. Available from: URL: <https://www.eurekaselect.com/article/145790>.
 24. Launois P, Drowart A, Bourreau E, Couppie P, Farber CM, Van Vooren JP, et al. T cell reactivity against mycolyl transferase antigen 85 of *M. tuberculosis* in HIV-TB coinfecting subjects and in AIDS patients suffering from tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 640309. (10 pages).
 25. Komine-Aizawa S, Jiang J, Mizuno S, Hayakawa S, Matsuo K, Boyd LF, et al. MHC-restricted Ag85B-specific CD8(+) T cells are enhanced by recombinant BCG prime and DNA boost immunization in mice. *Eur J Immunol* 2019; 49(9): 1399-414.
 26. Passos BBS, Araujo-Pereira M, Vinhaes CL, Amaral EP, Andrade BB. The role of ESAT-6 in tuberculosis immunopathology. *Front Immunol* 2024; 15: 1383098. (11 pages).
 27. Ning H, Zhang W, Kang J, Ding T, Liang X, Lu Y, et al. Subunit vaccine ESAT-6:c-di-AMP delivered by intranasal route elicits immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11: 647220. (14 pages).
 28. Kooijman S, Vrieling H, Verhagen L, de Ridder J, de Haan A, van Riet E, et al. Aluminum hydroxide and aluminum phosphate adjuvants elicit a different innate immune response. *J Pharm Sci* 2022; 111(4): 982-90.
 29. OZ Biosciences. AlumVax hydroxide. [online]. [cited 2023 Jul 10]. Available from: URL: <https://ozbiosciences.com/aluminum-gels/79-alumvax-hydroxide.html>.

Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* Antigens: Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, and Ag85B-ESAT-6-Rv2660c Fusion in Mice

Panadda Dhepakson, Apichai Prachasuphap, Nadthanan Pinyosukhee, Rattanawadee Wichajarn, Naratcha Sripetch, Rujiraporn Pitaksalee, Anicha Luengchaichaweng, Kachaporn Mekkhayai, Nalinee Sangthong, Sompong Sapsutthipas, and Parnuphan Panyajai

Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Tuberculosis (TB) remains a major global public health concern. The Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine is currently the only available TB vaccine, offering protection against severe TB in children but showing limited efficacy in adults. Developing new TB vaccines is therefore essential for achieving TB eradication. This study aimed to evaluate the immunogenicity of four recombinant *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) antigens: Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, and Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion in mice, reported as active and latent infection stages to support the design and development of an mRNA-based TB vaccine. Recombinant proteins were designed and expressed in *Escherichia coli* ClearColi™ BL21(DE3) and used to immunize C57BL/6 mice. Subsequently, humoral immune responses were assessed using Western blot and ELISA, whereas cellular immune responses were analyzed through cytokine detection (IFN- γ , IL-2, and TNF- α) via a Multiplex assay following *ex vivo* restimulation. The results showed that Ag85B, ESAT-6, and Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion proteins induced both humoral and cellular immune responses, while Rv2660c, an antigen associated with latent TB infection, primarily stimulated a cellular immune response. These findings suggest the antigens enrolled are promising candidates for further TB vaccine development.

Keywords: Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, Immunogenicity in mice