

การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกซีโรทัยป์ 3
ในระบบของ *E. coli* และการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้
IMMOBILIZED METAL AFFINITY
CHROMATOGRAPHY

PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN OF DENGUE VIRUS SEROTYPE 3
IN *E. coli* SYSTEM AND PURIFICATION BY IMMOBILIZED
METAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย

เลขที่..... สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เลขทะเบียน..... 32900

กัน, เดือน, ปี..... 14 ส.ย. 2542

พ.ศ.2542

ISBN 974-622-418-2

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN OF DENGUE VIRUS SEROTYPE 3
IN *E. coli* SYSTEM AND PURIFICATION BY IMMOBILIZED
METAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ ISBN 974-622-418-2 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดก็ตาม ห้ามนำไปดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 1999

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกซีโรทัยปี 3 ในระบบของ <i>E. coli</i> และการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ immobilized metal affinity chromatography
นักศึกษา	นางสาว สุภา ศรีสะอาด
รหัสประจำตัว	39065200
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2542
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. ชัญญา พุทธิพันธ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ. อรไท สุขเจริญ

บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออก เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเด็งกีโดยมียุงลาย (*Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus*) เป็นพาหะนำโรค ไวรัสเด็งกีมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ล้อมรอบด้วยนิวคลีโอแคปซิด ประกอบด้วยยีนที่สังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างและโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง โดยมีลำดับการเรียงตัวของยีนดังนี้

5' C-preM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5 3'

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัสเด็งกี ระบบของเซลล์ *Escherichia coli* (*E. coli*) โดยการสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ที่มีการติดเชื้อไวรัสและเพิ่มจำนวน ยีนส่วนเปลือกหุ้มจากอาร์เอ็นเอโดยวิธี รีเวอร์สทรานสคริปชันและโพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (RT-PCR) พบว่าได้ชิ้นอาร์ที-พีซีอาร์โปรดักส์ ขนาด 1,264 นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยส่วนของยีนส่วนเปลือกหุ้ม (den3E) และลำดับเบสของเรสตริกชันเอนไซม์ที่ปลาย 5' และ 3' เพื่อใช้ในการทำโคลนนิ่ง ยีน den3E ประกอบด้วย 1,227 นิวคลีโอไทด์จากยีนส่วนเปลือกหุ้มทั้งหมด 1,479 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งครอบคลุมกรดอะมิโน 409 ตัว แต่ไม่รวมกรดอะมิโนที่ไม่ละลายน้ำ 84 ตัว จากปลายคาร์บอกซี นำพีซีอาร์โปรดักส์มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์คือ *Bam*HI และ *Eco*RI และทำการโคลนนิ่งเข้าในเวกเตอร์ pTrcHisA ซึ่งเป็นเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มในระบบ *Escherichia coli* โคลนที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด (pTrcHisA/den3E) สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนส่วนเปลือกหุ้มที่มีกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัวเป็นเปปไทด์พาหะ (6H-D3E) เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์ โดยโปรตีน 6H-D3E ที่ได้มีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตันอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ สามารถละลายได้ในบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของสารดีเนเจอร์แรนท์ที่รุนแรงคือ สารละลายกัวนิติน 6 โมลาร์ และถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ในสภาวะที่

โปรตีนถูกทำลายโครงสร้างธรรมชาติ (denaturing) โปรตีน 6H-D3E ที่บริสุทธิ์ถูกชะออกจากเรซินโดยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารละลายยูเรีย 8 โมลาร์ ในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 4.5) และสามารถกลับคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติของโปรตีน (Refolding) โดยการกำจัดยูเรียออกจากสารละลายโปรตีน 6H-D3E ด้วยวิธีไดอะไลซิสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ลดความเข้มข้นของยูเรียลงเป็นลำดับจนไม่มียูเรียเหลืออยู่ และเติมสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เข้าไปแทนที่ในบัฟเฟอร์สุดท้าย จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E ที่ได้พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของฟลาวิไวรัส คือ 4G2 แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 3 (10C10) จากการทดสอบโดยวิธี western blot พบโปรตีนปนเปื้อนจากเซลล์ *Escherichia coli* ขนาดประมาณ 90 กิโลดาลตัน ที่ถูกแยกมาพร้อมกับโปรตีน 6H-D3E และสามารถทำปฏิกิริยาต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกได้ แต่โปรตีนปนเปื้อนนี้ถูกกำจัดออกไปได้เมื่อทำการปรับปรุงขั้นตอนการทำให้โปรตีน 6H-D3E บริสุทธิ์ดังต่อไปนี้ 1) หลังขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิคแล้วล้างตะกอน 6H-D3E ด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย Triton X-100 ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2) เพิ่มปริมาณสารละลายยูเรีย 8 โมลาร์ พีเอช 8.0 เพื่อล้างโปรตีนที่ไม่จับกับเรซินก่อนขั้นตอนการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ โปรตีนบริสุทธิ์ 6H-D3E ที่ได้หลังขั้นตอนการคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก และไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติ โดยวิธี dot enzyme immunoassay (DEIA) ดังนั้นรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E ที่ผลิตได้นี้น่าจะมีศักยภาพที่สามารถนำไปใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก เพื่อพัฒนาการตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่อไป

Thesis title	Production of recombinant protein of dengue virus serotype 3 in <i>E. coli</i> system and purification by immobilized metal affinity chromatography
Student	Miss Supa Srisa-ard
Student ID.	39065200
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	1999
Thesis Advisor	Dr.Chunya Puttikhunt
Co-Advisor	Assistant Professor Oratai Sukcharoen

ABSTRACT

Dengue hemorrhagic fever is one of the important diseases in tropical area including Thailand. The disease is caused by dengue virus transmitted through mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*). Mature virions are composed of a single sense stranded RNA genome surrounded by nucleocapsid. The RNA genome encoded structural and non-structural proteins in the gene order :

5' C-preM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5 3'

The objective of this study is to produce a recombinant envelope (E) protein of dengue virus in *E.coli*. Genomic RNA of dengue virus serotype 3 strain H87 was extracted from the supernatant of dengue infected C6/36 cell culture. Amplification of E gene from extracted genomic RNA was performed by reverse-transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). The RT-PCR product, of 1264 nucleotides consisted of C terminal truncated envelope gene (den3E) and 5' and 3' flanking restriction sites for cloning purpose. The den3E gene contained 1,227 out of the full-length 1,479 nucleotides of envelope gene, encoding 409 amino acid residues, excluding 84 amino acid residues of the hydrophobic C terminus. The PCR product was digested by available restriction enzymes, *Bam*HI and *Eco*RI, and then cloned into commercial *E.coli* expression vector pTrcHisA. The *E.coli* clones containing recombinant plasmid, pTrcHisA/den3E, could produce the recombinant envelope protein with 6 histidine residues as a carrier peptide (6H-D3E) in the presence of 1 Mm IPTG. The 6H-D3E protein, approximately 55 kDa in size, was expressed in insoluble fraction which could be solubilized in lysis buffer containing strong denaturant, 6M guanidine.

Purification of the 6H-D3E protein could be obtained by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) under denaturing condition. The purified 6H-D3E was eluted by acidic buffer containing 8M urea (Ph 4.5). The 6H-D3E refolding was carried out by dialyzing the denatured protein solution in the buffer containing stepwise dilution of urea with the addition of 0.1% Triton X-100 in stead of urea to the last buffer. The purified 6H-D3E was reactive to pooled sera of dengue patients (PCS) and 4G2 monoclonal antibody specific to flavivirus but not 10C10 monoclonal antibody specific to dengue 3 envelope protein. The *E.coli* contaminated protein (approximately 90 kDa) was found to be copurified with the 6H-D3E by western blot analysis to pooled sera of dengue patients (PCS). To obtain the purer 6H-D3E, the purification of 6H-D3E was modified by 1) washing the 6H-D3E pellet after sonication with the buffer containing 0.5% Triton X-100 and 2) increasing the volume of 8M urea lysis buffer Ph 8.0 to wash the 6H-D3E-bound resin before protein elution. The purified 6H-D3E after refolding was reactive to PCS with no background to pooled normal human sera (PND) by dot enzyme immunoassay (DEIA). The recombinant 6H-D3E demonstrated its potential to be used as antigen in development of immunological diagnostic tests.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เพราะได้รับความเมตตากรุณาจากท่าน อาจารย์ น.พ. ปรีดา มาลาสิทธิ์ ดร.เพทหาย เย็นจิตรโสมนัส และ ดร.สง่า พัฒนกิจสกุล ที่ให้โอกาสข้าพเจ้าได้มาทำงานวิจัยอันมีคุณค่า และยังให้คำแนะนำที่มีค่ายิ่งแก่ข้าพเจ้า ตลอดระยะเวลาที่ได้มาทำวิทยานิพนธ์ที่หน่วยอนุชีววิทยาทางการแพทย์นี้

กราบขอบพระคุณ ดร.ชัญญา พุทธิพันธ์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้โอกาสในการเรียนรู้ คำแนะนำ ความรัก ความเข้าใจ อันมีค่ายิ่งต่อข้าพเจ้า

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนี ธนะบริพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอบพระคุณ ดร.ประพัฒน์ สุริยผล สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และความช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ๆ น้องๆ ทั้งหลายในหน่วยอนุชีววิทยาทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ให้ความช่วยเหลือและความร่วมมือในด้านต่างๆ

ขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับคุณ นวลพรรณ เข้มหนู ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่อข้าพเจ้าอย่างใกล้ชิดตลอดมา

ขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติและบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

และท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณทุกคนในครอบครัวของข้าพเจ้าที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ บัณฑิตใจ และความเสียสละในหลายๆด้านแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุภา ศรีสะอาด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญภาพ.....	X
รายการคำย่อ.....	XII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โครงสร้างไวรัสเด็งกี.....	4
2.2 โครงสร้างของโปรตีน.....	6
2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเด็งกี.....	9
2.4 การติดเชื้อจากไวรัสเด็งกี.....	11
2.5 เทคนิครีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ.....	17
บทที่ 3 เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์.....	22
3.1 เครื่องมือ.....	22
3.2 วัสดุภัณฑ์.....	23
3.3 จุลินทรีย์.....	23
3.4 แอนติบอดี.....	23
3.5 พรายเมอร์.....	23
3.6 เอนไซม์.....	24
3.7 ดีเอ็นเอและโปรตีนมาตรฐาน.....	24
3.8 เวกเตอร์เพื่อการแสดงออกในระบบ <i>E.coli</i>	24
3.9 สารเคมี.....	25

สารบัญ(ต่อ)

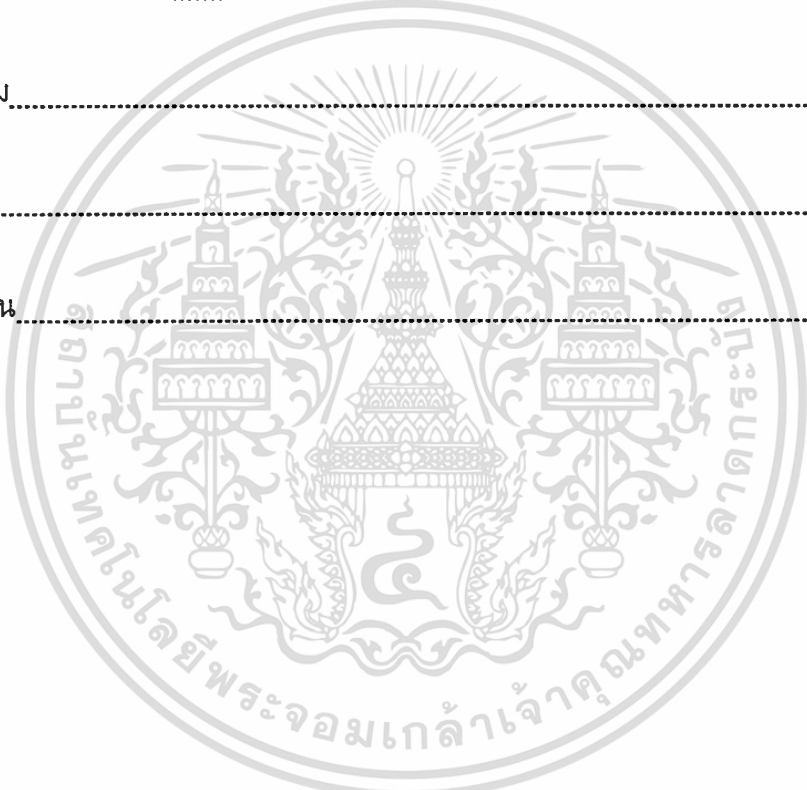
หน้า

บทที่ 4	วิธีการทดลอง	27
4.1	การเพิ่มจำนวนยีนส่วนเปลือกหุ้ม (ยีน E) ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 โดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction	27
4.2	การเตรียมดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTrcHisA จากเซลล์ <i>E.coli</i> โดยวิธีอัลคาไลน์	30
4.3	การทำโคลนนิ่งยีน den3E ของไวรัสเด็งกี ที่ได้จาก RT-PCR ในพลาสมิด pTrcHis A	31
4.4	การทำทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)	32
4.5	การคัดเลือกโคลน <i>E.coli</i> ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E	33
4.6	การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E จาก <i>E.coli</i> ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E โดยการเหนี่ยวนำด้วย Isopropyl- β -D-thiogalactoside	34
4.7	การแยกโปรตีน 6H-D3E ออกจากโปรตีนอื่นๆของ <i>E.coli</i>	35
4.8	การกำจัดยูเรียออกจากสารละลายของโปรตีนบริสุทธิ์	36
4.9	การวัดปริมาณโปรตีน	36
4.10	การวิเคราะห์รีคอมบิแนนต์โปรตีน	36
บทที่ 5	ผลการทดลอง	39
5.1	การเพิ่มจำนวนยีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87	39
5.2	การเตรียมยีนส่วนเปลือกหุ้มไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 และเวกเตอร์ pTrcHisA	42
5.3	การโคลนยีน den3E เข้าในเวกเตอร์ pTrcHis A	42
5.4	การคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม	44
5.5	การตรวจสอบการแสดงออกของพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E	47
5.6	การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)	51
5.7	การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนบริสุทธิ์ 6H-D3E โดยการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ชนิดต่างๆโดยวิธี Western blot	56
5.8	การปรับปรุงวิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์มากขึ้น	58
5.9	เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของโปรตีนชุดที่เตรียมโดยวิธีเดิมกับวิธีปรับปรุงใหม่	64

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

5.10	ตรวจหาปริมาณของโปรตีนบริสุทธ์ 6H-D3E ที่เหมาะสมในการทำ ปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกโดยวิธี Dot enzyme immunoassay.....	67
บทที่ 6	วิจารณ์ผลการทดลอง.....	68
บทที่ 7	สรุปผลการทดลอง.....	74
บรรณานุกรม	75
ภาคผนวก	82
ประวัติผู้เขียน	89



สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

2.1 แสดงจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกตั้งแต่ 1 มกราคม ถึง 22 ตุลาคม 2541.....17



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	โครงสร้างยีนโนมของกลุ่มฟลาวิไวรัส..... 5
2.2	แสดงไดอะแกรมโครงสร้างของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (E) TBE..... 10
2.3	การจำแนกอาการที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี..... 13
2.4	ส่วนประกอบของเวกเตอร์ pTrcHis 20
2.5	การจับกันของกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัวกับ Co^{2+} บนเรซิน 21
5.1	แสดงลำดับเบสของยีนส่วนเปลือกหุ้มไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87..... 40
5.2	ชิ้นส่วนของยีนส่วนเปลือกหุ้มที่ได้จากการทำ RT-PCR 41
5.3	ชิ้นส่วนของเวกเตอร์ pTrcHisA และยีนส่วนเปลือกหุ้มที่ถูกย่อยปลายด้วย เอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> RI 43
5.4	การคัดเลือกโคลน <i>E.coli</i> ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E โดยวิธีพีซีอาร์ 45
5.5	การคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E โดยการสกัดพลาสมิด ลูกผสม..... 46
5.6	การเหนี่ยวนำโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E โดยการเติม 1mM IPTG... 48
5.7	การแยกโปรตีนของ pTrcHis/den3E หลังจากการแตกเซลล์ด้วย sonication..... 49
5.8	ผล Western blot ของโปรตีนเมื่อเติม 1mM IPTG 1 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่ 1 ถึง 8 ชั่วโมง 50
5.9	กราฟแสดงโปรตีน 6H-D3E ของแต่ละหลอด โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 นาโนเมตร (OD280)..... 52
5.10	การทำ Dot enzyme immunoassay (DEIA) ของโปรตีน 6H-D3E จาก แต่ละขั้นตอนของการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบระหว่างการทำให้ ปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและซีรัมรวมของคนปกติ..... 53
5.11	10% SDS-PAGE แสดงขั้นตอนการแยกโปรตีน 6H-D3E จาก <i>E.coli</i> (pTrcHis/den3E) ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี IMAC และย้อมสีโครแมสซิบลู (ก) หรือวิธี Western blot ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (ข)..... 55
5.12	Western blot ของโปรตีนบริสุทธิ์ 6H-D3E ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี 6 ชนิดเทียบกับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก และ ซีรัมรวมของคนปกติ 57
5.13	แสดงการแยกโปรตีน 6H-D3E ใน 10% SDS-PAGE ย้อมด้วยสีโครแมสซิบลู(ก) และ Western blot (ข) ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก 59

สารบัญญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
5.14	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของโปรตีน 6H-D3E ที่ได้จากการชะออกจากเรซินด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 หลังจากปรับปรุงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 60
5.15	10%SDS-PAGE ของโปรตีน 6H-D3E ที่ผ่านการพัฒนาวิธีการแยกโปรตีน ให้บริสุทธิ์และย้อมด้วยสีโครแมสซีบลู..... 61
5.16	Western blot ของโปรตีน 6H-D3E ที่ผ่านการพัฒนาวิธีการแยกโปรตีนให้ บริสุทธิ์ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก(ก) และซีรัมรวมของ คนปกติ(ข)..... 62
5.17	การทำ Dot enzyme immunoassay (DEIA) ของโปรตีน 6H-D3E ที่ผ่านการพัฒนาวิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบระหว่างการทำ ปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและซีรัมรวมของคนปกติ 63
5.18	แสดงการแยกโปรตีน 6H-D3E จำนวน 1 ไมโครกรัม ใน 10%SDS-PAGE และย้อมด้วยสีโครแมสซีบลู..... 65
5.19	Western blot ของโปรตีน 6H-D3E ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วย ไข้เลือดออกและซีรัมรวมของคนปกติ 66
5.20	แสดงการเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของโปรตีน 6H-D3E ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ กันตั้งแต่ 500 ถึง 15.6 นาโนกรัมต่อจุดโดยวิธี DEIA..... 67

รายการคำย่อ

PCR	polymerase chain reaction
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
DEIA	Dot enzyme immunoassay
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
PrM	premembrane
C	Capsid
NS1	Nonstructural gene or protein 1
Den3E	envelope gene from dengue virus serotype 3
6H-D3E	recombinant dengue-3 envelope protein with 6 Histidine as carrier peptide
HI	Hemagglutination inhibition test
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ORI	Origin of replication
MCS	Multiple cloning site
Mab	Monoclonal antibody
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
BSA	Bovine serum albumin

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

โรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของประเทศไทย ตลอดจนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และในหลายพื้นที่ทั่วโลก โรคไข้เลือดออกเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี โดยมียุงลาย (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะสำคัญซึ่งพบการติดเชื้อในเด็กอายุประมาณ 5-9 ปี มากกว่าในผู้ใหญ่ และมีการระบาดในช่วงฤดูฝนของทุกปี ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อไวรัสจะมีอาการของโรคในระดับที่ไม่รุนแรงที่เรียกว่า ไข้เด็งกี (Dengue Fever หรือ DF) หรือมีอาการรุนแรงเป็นไข้เลือดออก (Dengue Hemorrhagic Fever หรือ DHF) และในบางรายอาจมีอาการรุนแรงจนถึงระดับที่มีอาการช็อคร่วมด้วย (Dengue Shock Syndrome หรือ DSS) ถ้าหากไม่ได้รับการดูแลอย่างถูกต้องและใกล้ชิดแล้ว อาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ปัจจุบันถึงแม้อัตราการตายจะน้อยลง แต่จำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกยังคงสูงเพิ่มขึ้นทุกปีในช่วงที่มีการระบาด ดังนั้นการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและแม่นยำ โดยเทคโนโลยีที่ทันสมัยจะเป็นเครื่องมือที่เพิ่มประสิทธิภาพให้แก่แพทย์ในการดูแลรักษาผู้ป่วย รวมทั้งอาจช่วยในการทำนายการระบาดของโรคได้ตั้งแต่เนิ่นๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเตรียมการป้องกัน หรือการทำลายพาหะของโรคในเขตพื้นที่นั้นๆ ก่อนที่จะมีการแพร่กระจายออกไป

จากการศึกษาทางอนุชีววิทยาพบว่า เชื้อไวรัสเด็งกีหรือไวรัสไข้เลือดออกเป็นไวรัสในกลุ่มของ Flaviviridae แบ่งออกได้เป็น 4 ซีโรทัยป์ คือ Den1, Den2, Den3 และ Den4 ไวรัสเด็งกีมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวมีความยาวประมาณ 11 กิโลเบส ประกอบไปด้วยส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนโครงสร้างของไวรัส (structural gene) 3 ชนิด ได้แก่ แคปซิด (Capsid:C) ปริเมินเบรน (preMembrane:prM) และโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (Envelope: E) และยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural gene) 7 ชนิด ได้แก่ NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อไวรัสเด็งกีจะมีการสร้างภูมิคุ้มกัน (antibody) ต่อตัวไวรัส โดยเฉพาะในส่วนของโปรตีน prM, E, NS1, NS3 และ NS5 และจากการศึกษาพบว่าโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (E) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักมีความจำเพาะ และสามารถจับกับสารที่เป็นตัวต่อรับบนผิวของเซลล์ (cellular receptor) ทำให้เชื้อสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ ในขณะเดียวกันเซลล์เจ้าบ้านจะมีกลไกทำลายเชื้อนั้น โดยการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นภายในร่างกาย (Rey et.al. 1995) นอกจากนั้นยังสร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็นฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin) ซึ่งจะทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์บางชนิดเกาะกลุ่ม (hemagglutination) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสได้

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกทางห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น 1) การแยกเชื้อไวรัสเด็งกีจากสิ่งส่งตรวจ (Virus isolation) ซึ่งทำได้โดยฉีดไวรัสเข้าสมองหนูแรกเกิด หรือการฉีดเข้าที่หัวของลูกน้ำหรือเข้าช่องอกของยุง *Toxorynchites* 2) การตรวจหาอาร์เอ็นเอของไวรัสเด็งกี โดยอาศัยเทคนิค RT-PCR (Yenchitsomanus 1996) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถแยกซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกีได้ด้วย แต่ทั้ง 2 วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดคือ ต้องเก็บตัวอย่างที่จะตรวจในช่วงแรกๆ คือ 2 ถึง 3 วันที่มีการติดเชื้อเท่านั้น มิฉะนั้นไวรัสจะถูกกำจัดไปโดยภูมิคุ้มกันที่มีในร่างกายทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ อีกวิธีหนึ่งคือ 3) การตรวจวัดภูมิคุ้มกันของร่างกายที่เกิดจากการติดเชื้อ ซึ่งมีหลายวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น การตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี hemagglutination inhibition test (HI) (Clarke and Casals 1958) จะมีการเจาะเลือด 2 ครั้ง โดยมีระยะเวลาที่ห่างกัน 1 ถึง 4 อาทิตย์ ถ้าระดับแอนติบอดีในเลือดเพิ่มขึ้น 4 เท่า หรือมากกว่าจะแสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีแน่นอน นอกจากนี้ยังมีการตรวจด้วยวิธี ELISA (Chungue et.al 1989; Cardosa et.al 1992) เพื่อวัดระดับ IgM และ IgG ของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเด็งกีและการตรวจระดับแอนติบอดี IgG ในซีรัมของผู้ป่วยโดยวิธี Dot enzyme immunoassay (DEIA) (Cardosa and Tio 1991) ซึ่งทำได้ง่ายบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นต้น วิธีการเตรียมไวรัสเด็งกีแอนติเจนเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธีต่างๆเหล่านี้ อาจทำได้โดยการเพิ่มจำนวนไวรัสในสมองลูกหนูแรกเกิด หรือในยุงยักซ์ *Toxorynchites* หรือในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะมีความยุ่งยากต้องอาศัยบุคลากรที่มีประสบการณ์และห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมเท่านั้น

ปัจจุบันเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม สามารถพัฒนาวิธีการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านได้หลายระบบ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ แบคคูลูไวรัส เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นต้น ในงานวิจัยนี้จะเป็นการพัฒนาวิธีการผลิตโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (E) ของไวรัสไข้เด็งกีซีโรทัยป์ 3 ในรูปของรีคอมบิแนนต์โปรตีนโดยใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อใช้เป็นแหล่งของแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยทดแทนไวรัสเด็งกี ซึ่งมีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง

1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อที่จะผลิตโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (E) ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 ในรูปของรีคอมบิแนนต์โปรตีนใน *Escherichia coli* (*E.coli*) โดยการโคลนยีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีเข้าไปในเวกเตอร์ pTrcHis A ซึ่งเป็นเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของเซลล์ *Escherichia coli* โปรตีนที่ได้จะอยู่ในรูปของโปรตีนลูกผสมที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัวต่อเชื่อมกับปลายกรดอะมิโน (N-terminal) ของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (6H-D3E) จากนั้นทำการแยกรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) โดยอาศัยคุณสมบัติของการจับกันระหว่างฮิสติดีนทั้ง 6 ตัวที่ทำหน้าที่เป็นไลแกนด์จำเพาะกับโคบอลต์เรซิน และนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและซีรัมรวมของคนปกติ

1.3 ขอบเขตของการทำวิจัย

1.3.1 เตรียมชิ้นส่วนของยีนส่วนเปลือกหุ้ม (envelope gene) หรือยีน den3E จากไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 โดยวิธี RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

1.3.2 โคลนนิ่งพีซีอาร์โปรดักส์ของยีนส่วนเปลือกหุ้ม (den3E) ที่ได้เข้าไปในเวกเตอร์ pTrcHis และคัดเลือกโคลน *Escherichia coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E เข้าไปโดยวิธีสกัดพลาสมิดมาตรวจสอบหรือใช้วิธีโคโลนีพีซีอาร์

1.3.3 เหนี่ยวนำโคลน *Escherichia coli* ที่ได้ให้มีการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (E)

1.3.4 แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Immobilized metal affinity chromatography

1.3.5 ตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้โดยทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อเชื้อไวรัสเด็งกี ซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) และซีรัมรวมของคนปกติ (PND)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

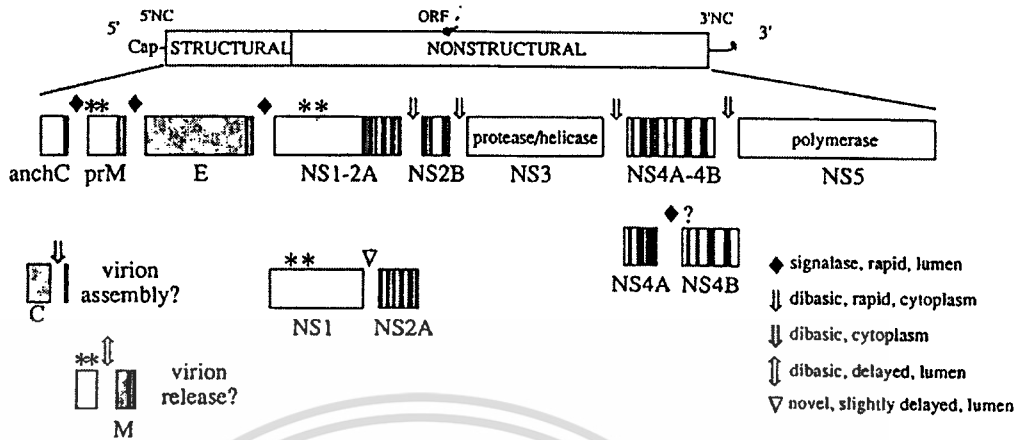
สามารถนำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้ไปใช้เพื่อเป็นแอนติเจน ทดแทนการใช้ไวรัสที่ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญสูงและห้องทดลองที่มีประสิทธิภาพในการจัดเตรียม เนื่องจากรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้จะผลิตจากเซลล์ *Escherichia coli* ที่สะดวกในการจัดเตรียมและมีค่าใช้จ่ายต่ำ สามารถเพิ่มจำนวนได้มากและนำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้ไปใช้ในการทดสอบผู้ป่วยไข้เลือดออกโดยวิธี Dot enzyme immunoassay (DEIA)

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างของไวรัสเด็งกี

ไวรัสเด็งกี (Dengue virus) จัดอยู่ในแฟมิลี ฟลาวิวิริดี (Flaviviridae) จีนัส ฟลาวิไวรัส (flavivirus) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งเป็นสายบวก (Positive single stranded RNA) ความยาว 10.5-11 กิโลเบส เมื่อมีการติดเชื้อในยุงหรือคน อาร์เอ็นเอของไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวน และถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนเพื่อสร้างเป็นตัวไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านได้ (Brinton 1988) อนุภาคของไวรัสเด็งกีมีขนาด 50 นาโนเมตร เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กที่สุดประกอบด้วยเมมเบรนที่มีชั้นไขมัน 2 ชั้น (lipid bilayer membrane) เชื้อไวรัสเด็งกี แบ่งเป็น 4 ซีโรทัยป์ คือ Den1, Den2, Den3 และ Den4 แต่ละซีโรทัยป์จะมีแอนติเจนร่วมกันบางชนิด ที่สามารถกระตุ้นการสร้างระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้านในการป้องกันการติดเชื้อข้ามซีโรทัยป์ได้ (cross protection) ในการติดเชื้อครั้งแรกร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันขึ้น และภูมิคุ้มกันนี้จะป้องกันการติดเชื้อซีโรทัยป์เดิมได้ตลอดชีวิต แต่ภูมิคุ้มกันต่อซีโรทัยป์อื่นอีก 3 ชนิด จะมีในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ยีนโนมของไวรัสที่ปลาย 5' มี methylated cap ช่วยในการถอดรหัส ส่วนที่ปลายด้าน 3' ไม่มี poly A ลักษณะยีนโนมของไวรัสจะทำหน้าที่เป็นอาร์เอ็นเอส่งข่าว (messenger RNA) โดยมีลำดับของยีนเรียงจากปลาย 5' ของยีนโนม คือ 5' C-preM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5 3' ประกอบด้วย 1 open reading frame (ORF) ซึ่งจะสามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ และจะถูกย่อยโดยอาศัยเอนไซม์โปรติเอสจากไวรัสเอง (viral protease) หรือเอนไซม์จากเซลล์เจ้าบ้าน (cellular protease) ได้เป็นโปรตีนชนิดต่างๆประกอบด้วยโปรตีนส่วนโครงสร้าง 3 ชนิดคือ โปรตีนที่ล้อมรอบสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ (nucleocapsid; C) โปรตีนส่วนเมมเบรน (membrane; M) และโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (envelope; E) และส่วนที่เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างอีก 7 ชนิดคือ NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b และ NS5 ดังที่แสดงในรูปที่ 2.1 (Chambers et.al. 1990b)



รูปที่ 2.1

แสดงโครงสร้างยีนโนมของกลุ่มฟลาวิไวรัส ประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง (C, prM, E) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b และ NS5) ที่จะถูกแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีน และถูกย่อยออกเป็นโปรตีนแต่ละส่วนโดยเอนไซม์โปรติเอสต่างชนิดกัน (Chambers et.al. 1990b)

*แสดงกลุ่มน้ำตาลที่ตำแหน่ง N ที่น่าจะเป็นไปได้สำหรับ prM และ NS1 ของไข้เหลือง (yellow fever)

การแปลรหัสไปเป็นโปรตีนของไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์จะพบที่ปลาย 5' เริ่มที่ตำแหน่ง AUG ส่วนซีโรทัยป์ 3 พบว่าลำดับเบสที่ปลายด้าน N ของโปรตีน C ของไวรัสจะมีลำดับเบส 2 ตำแหน่งที่ชี้ให้เห็นว่าอาจนำมาใช้ประโยชน์ในการแปลรหัสไปเป็นโปรตีนได้ทั้งอันดับที่ 1 และ 2 ของตำแหน่งเริ่มต้น ซึ่งจะมีประสิทธิภาพเท่ากันในการแปลรหัส (Osatomi and Sumiyoshi 1990)

2.2 โครงสร้างของโปรตีน

ไวรัสแดงที่ประกอบด้วย โปรตีนที่เป็นโครงสร้าง (structural protein) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (nonstructural protein) ดังต่อไปนี้

2.2.1 โปรตีนที่เป็นโครงสร้างมี 3 ชนิดได้แก่

2.2.1.1 โปรตีนในส่วนแคปซิด (C) เป็นโปรตีนขนาดเล็กประมาณ 9 ถึง 12 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 112 ถึง 127 เป็นโปรตีนที่มีประจุบวกอย่างสูง เนื่องจากมีจำนวนของกรดอะมิโนชนิดไลซีนและอาร์จินีนมาก และมีอัตราส่วนของกรดอะมิโนสูงจึงอาจทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกลางกับประจุลบกับโมเลกุลของอาร์เอ็นเอ (Rice et.al. 1985) ในระหว่างการแปลรหัสของอีโนมอาร์เอ็นเอ โปรตีนแคปซิดจะถูกสังเคราะห์ได้เป็นอันดับที่ 1

2.2.1.2 โปรตีนในส่วนเมมเบรน (M) มี 2 รูปแบบซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

- 1) โปรตีน prM จะพบอยู่ภายในเซลล์ของไวรัส (intracellular immature virions)
- 2) โปรตีน M จะพบอยู่ภายนอกเซลล์ของไวรัส (extracellular mature virions)

โปรตีน prM เป็นไกลโคโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 18.1-19.1 กิโลดาลตัน และเป็น glycosylated precursor คือการเติมน้ำตาลเข้าที่กรดอะมิโนบางตัวบนสายโพลีเปปไทด์ที่ภายหลังกระบวนการแปลรหัสโปรตีน prM ที่อยู่ภายในเซลล์จะผ่านกระบวนการย่อยแบบเอ็กโซไซโตซิส (exocytosis) ได้เป็นโปรตีน M มีน้ำหนักโมเลกุล 7-9 กิโลดาลตัน ที่พบอยู่ภายนอกเซลล์ ในบางครั้งอนุภาคที่อยู่ภายนอกเซลล์อาจมี prM ที่ยังไม่ได้ถูกย่อยปะปนออกไปด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน prM สามารถกระตุ้นให้ ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต้านต่อโปรตีน prM ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (neutralizing antibody) ได้ด้วย (สุวรรณ และ พิไลพันธ์ 2540)

2.2.1.3 โปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (E) เป็นไกลโคโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 53-54 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 494-501 ตัว เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักและเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของไวรัส โปรตีน E จะจับตัวกันเป็นไดเมอร์บนผิวของอนุภาคไวรัส และทำหน้าที่เป็นไลแกนในการจับกับสารที่เป็นตัวต่อรับบนผิวเซลล์ ถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการเ็นโดไซโตซิส (endocytosis) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เกี่ยวกับ membrane fusion เชื่อมเซลล์หลายเซลล์เข้าด้วยกัน เมื่อถูกพีเอชที่เป็นกรด (ต่ำกว่า 6.5) จะทำให้โครงสร้างของ E เปลี่ยนไป ก่อนที่ไวรัสจะเข้าสู่ส่วนไซโตพลาสซึม โปรตีน E ประกอบด้วยส่วนของตำแหน่ง (epitopes) ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย และยังเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) ด้วย (Henchal and Putnak

1990) ที่ปลายด้านคาร์บอกซีของโปรตีน E มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) แทรกอยู่ในชั้นไขมันของเปลือกหุ้ม ซึ่งส่วนที่ไม่ชอบน้ำนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการจัดแยกกระหว่างโปรตีน E กับ NS1 โดยเอนไซม์โปรทีเอส ส่วนปลายด้านอะมิโนซึ่งยื่นออกมาจากชั้นไขมันประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนจำนวนมาก ที่มีความสำคัญสำหรับการม้วนตัว (folding) ของโปรตีน นอกจากนี้ (Mandi 1989) ได้มีการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนยีนส่วนเปลือกหุ้มของฟลาวิไวรัส ซึ่งจะแบ่งออกได้เป็น 3 โดเมนแอนติเจน คือ โดเมน A, B และ C สอดคล้องกับโดเมน II, III, I ตามลำดับที่ได้จากการศึกษา X-ray crystallography เพื่อพิสูจน์โครงสร้างโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มจากไวรัส Tick borne encephalitis (TBE) ซึ่งเป็นไวรัสก่อโรคไขสมองอักเสบ (Rey et.al. 1995) ดังรูปที่ 2.2

เนื่องจากโปรตีน E เป็นเป้าหมายหลักของการเกิดภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นการตรวจหาแอนติเจนบนโปรตีน E จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยให้เข้าใจถึงการทำปฏิกิริยากันระหว่างภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อไวรัสเด็งกี และยังช่วยในการวางแผนการผลิตวัคซีนได้อีกด้วย

2.2.2 โปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Nonstructural protein)

โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างจะพบทั่วไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงโปรตีนและอนุภาคของไวรัส ในระหว่างที่เข้าไปเกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวของไวรัสเด็งกี

2.2.2.1 โปรตีน NS1 คือ โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างอันดับที่ 1 เป็นไกลโคโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42-50 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 353-354 ตัว ในกลุ่มของฟลาวิไวรัสทั้งหมดจะมีการเติมน้ำตาล (N-linked glycosylation) ที่ตำแหน่ง 208 หรือ 209 ของยีน NS1 ซึ่งเชื่อว่ามีผลต่อกระบวนการและการคัดหลั่ง (secreted) ของโปรตีน NS1 (Chambers et.al. 1990a ; Fan and Mason 1990) โปรตีน NS1 นอกจากจะพบที่บริเวณไซโตพลาสซึมแล้ว ยังพบบนผิวเซลล์ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นสำคัญให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายและมักอยู่ในรูปที่ชอบน้ำ (hydrophilic) จึงสามารถดึงดูดโมเลกุลของน้ำเข้ามาล้อมรอบทำให้มันละลายน้ำได้ดี ขณะนี้ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดของโปรตีน NS1 แต่สันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องในการจำลองรูปร่างของไวรัส (virus morphogenesis)

2.2.2.2 โปรตีน NS2a, NS2b, NS4a และ NS4b เป็นโปรตีนขนาดเล็กและมีลักษณะที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic)

1) โปรตีน NS2 ประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วน คือ NS2a และ NS2b ซึ่ง NS2a มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18-22 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 218-231 ตัว เป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มีโครงสร้างโมเลกุลต่อจาก NS1 ที่ปลายคาร์บอกซิลกรุป โปรตีน NS2a ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตัดย่อยสายโพลีโปรตีนของไวรัสเด็งกี (Falgout and Lai 1989) โปรตีน NS2b มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13-15 กิโลดาล

ต้น ประกอบด้วยกรดอะมิโน 130-132 กิโลดาลตันเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส NS2b-NS3 complex ซึ่งสร้างมาจากตัวไวรัสเอง (Lai et.al. 1994) และ NS2b ยังทำหน้าที่เป็นตัวเสริมปฏิกิริยาการตัดย่อยของโปรตีน NS3 ซึ่งกระบวนการตัดย่อยโปรตีนสายยาวนี้จะมีความสำคัญต่อการสร้างไวรัสที่สมบูรณ์

2) โปรตีน NS4a มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16-16.4 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 149-150 ตัว ส่วนโปรตีน NS4b มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27-28 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 248-256 ตัว เป็นโปรตีนที่แสดงคุณสมบัติชอบน้ำ โปรตีน NS4a และ NS4b เป็นส่วนที่มีความคล้ายกันของลำดับกรดอะมิโนน้อยมาก (poorly conserved) หน้าที่ของโปรตีนทั้งสองยังไม่ทราบชัดเจน แต่อาจมีความจำเป็นสำหรับการเชื่อมเมมเบรนของโปรตีน NS3 และโปรตีน NS5 ในระหว่างการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (Chamber et.al. 1990b)

3) โปรตีน NS3 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67-70 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 618-623 ตัว เป็นโปรตีนที่แสดงคุณสมบัติชอบน้ำ เป็นส่วนที่มีความคล้ายกันของลำดับกรดอะมิโนสูงมาก (highly conserved) Bazan and Fletterick (1989) อธิบายว่าโปรตีน NS3 ทำหน้าที่สำคัญ 2 อย่างที่สนับสนุนการจำลองตัวของไวรัสคือมีเอนไซม์ serine protease ซึ่งช่วยในการย่อยโปรตีนสายยาว (polyprotein) ให้เป็นโปรตีนแต่ละชนิดและเอนไซม์ helicase ทำหน้าที่ในการคลายเกลียวของสารพันธุกรรม และการสร้างสายพันธุกรรมอาร์เอ็นเอใหม่ ลำดับเบสที่ใกล้กับปลายด้าน N ของ NS3 จะมีการรวมเข้ากับ NS2B ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการย่อยโปรตีน (proteolytic) ที่ตำแหน่ง dibasic site ของโปรตีนหลายชนิด การแสดงออกที่ปลายคาร์บอกซีของยีน NS3 จากไวรัสก่อโรคไข้เหลืองในระบบ *Escherichia coli* มีการแสดงออกได้ดีเท่ากับโปรตีน NS3 ที่สมบูรณ์ซึ่งจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NTPase (Warrener et.al. 1993) ซึ่งเป็นเครื่องชี้ให้เห็นว่าปลายคาร์บอกซีของ NS3 อาจเกี่ยวข้องกับ capping และการเติมหมู่เมทิล (methylation) ของอาร์เอ็นเอ (Wengler and Wengler 1993)

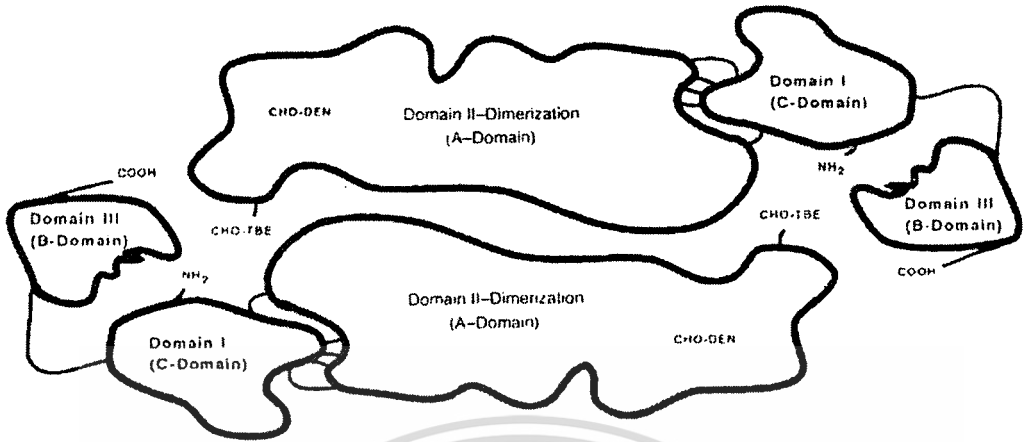
2.2.2.3 โปรตีน NS5 มีขนาดโมเลกุลใหญ่มาก ประมาณ 104-106 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 900-905 ตัว พบว่า 2 ใน 3 ของโปรตีน NS5 ทางด้านปลายคาร์บอกซีจะมีกรดอะมิโน Gly-Asp-Asp ที่เหมือนกับเอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสของไวรัสที่มีรหัสพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายบวก (positive-stranded RNA) ตัวอื่นๆ ดังนั้นโปรตีน NS5 อาจมีคุณสมบัติของเอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสด้วยเช่นกัน และมีการทำงานของเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase อยู่ภายในโดเมนนี้ด้วย โปรตีน NS5 ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 1 ในรูปของโปรตีนรีคอมบิแนนต์ สามารถแสดงการทำงานของเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ได้ซึ่งเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งการทำงานโดยแอนติบอดีต่อ NS5 (anti-NS5 antibody) (Tan et.al. 1996)

2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเด็งกี

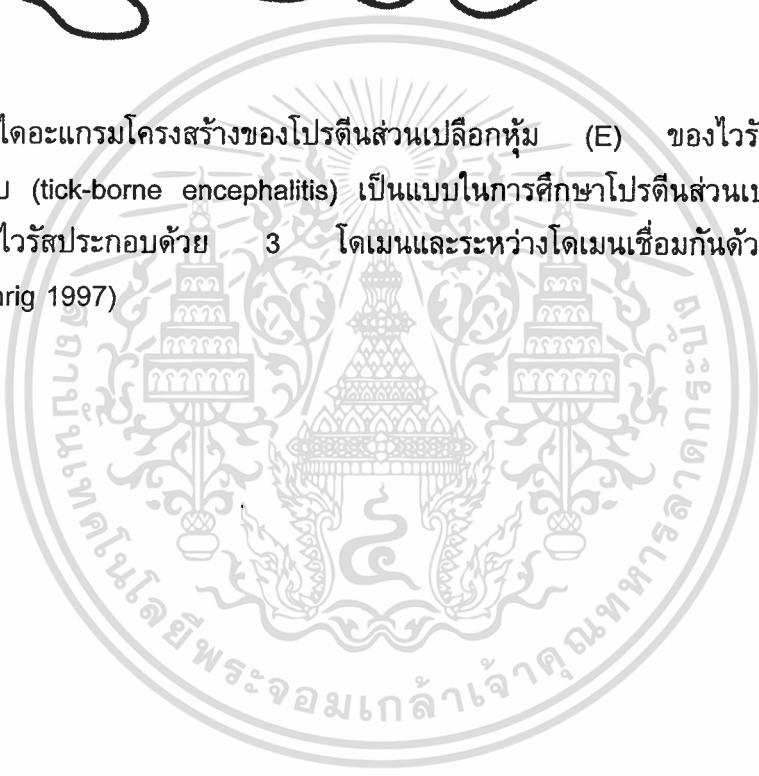
ถึงแม้ว่าไวรัสเด็งกีจะถูกแบ่งออกเป็น 4 ซีโรทัยป์ คือ Den1, Den2, Den3 และ Den4 แล้วก็ตาม แต่จากการศึกษาความหลากหลายของไวรัสเด็งกีในแต่ละซีโรทัยป์ก็ยังคงพบว่ามี ความแตกต่างอยู่เช่นกัน การศึกษาความหลากหลายของไวรัสนี้อาจบ่งบอกถึงวิวัฒนาการของไวรัส ซึ่งจะช่วยจำแนกแหล่งที่มาของไวรัสว่ามาจากภูมิภาคใดของโลก และอาจบ่งบอกถึงความรุนแรงของโรคได้ การตรวจสอบความหลากหลายของไวรัสทำได้หลายวิธี เช่น T1 fingerprints สามารถแบ่งไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 1 (Den1) ออกได้เป็นกลุ่มย่อย (topotype) ได้ 8 กลุ่ม Den2 จะถูกแบ่งได้ 10 กลุ่มย่อย ส่วน Den3 และ Den4 ถูกแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มย่อยโดยวิธีเดียวกัน (Trent et.al. 1990) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบความหลากหลายของไวรัสได้โดยวิธีอื่นๆ เช่น RNA-DNA hybridization (Kerschner et.al. 1986), Restriction enzyme mapping (Walker et.al. 1988 ; Vorndam et.al. 1994) การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนส่วนเปลือกหุ้ม (Lewis et.al. 1993) และการเปรียบเทียบลำดับเบสของช่วงต่อระหว่างยีน E และ NS1 (Rico-Hesse 1990) เป็นต้น

ในการตรวจสอบความหลากหลายของ Den3 พบว่า การทดสอบโดยวิธี neutralization test (Russell and McCown 1972) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไวรัสจากเปโอโตริโก และตาดิติกกับไวรัสจากเอเชียได้ นอกจากนี้การศึกษาส่วนของยีน E ที่ได้จาก RT-PCR ของ Den3 จำนวน 22 ตัว ซึ่งส่วนใหญ่มาจาก French Polynesia (Chungue et.al. 1993 และ Lanciotti et.al. (1994) พบว่ามีความแตกต่างของลำดับเบส 12 เบอ์เซ็นต์ และมีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน 9 เบอ์เซ็นต์ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 จีโนทัยป์ (genotypes) ได้ศึกษา Den3 จำนวน 18 ตัวในส่วนของยีน E ขนาด 1 กิโลเบส และศึกษาอีก 23 ตัว จากประเทศต่างๆที่ตำแหน่งของ prM กับ M และ E พบว่ามีความแตกต่างในระดับของยีน 7 เบอ์เซ็นต์ และแตกต่างในกรดอะมิโน 3 เบอ์เซ็นต์ จากทั้งหมด 41 ตัวสามารถแบ่งออกได้ เป็น 4 subtypes ซึ่งการแบ่งกลุ่มโดยวิธีของ Lanciotti et.al. (1994) นี้จะให้ผลเช่นเดียวกับการแบ่งโดยวิธี T1 fingerprintsของ Trend et.al. (1990) ความสัมพันธ์ทางโมเลกุลระหว่างแต่ละ ซีโรทัยป์ เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มทั้ง 4 ซีโรทัยป์ โดยใช้ไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 1 (สายพันธุ์ Nauru) ซีโรทัยป์ 2 (สายพันธุ์ Jamaica) ซีโรทัยป์ 3 (สายพันธุ์ H87) และซีโรทัยป์ 4 (สายพันธุ์ 814669) Westaway and Blok (1997) พบว่าไวรัสเด็งกี ซีโรทัยป์ 1 จะมีความคล้ายกับซีโรทัยป์ 3 มากกว่า 2 และ 4

ดังนั้นในการจำแนกกลุ่มย่อยของไวรัสในแต่ละซีโรทัยป์เพื่อศึกษาแหล่งที่มาหรือการกระจายของโรค อาจจำเป็นต้องใช้หลายวิธีร่วมกันเพื่อป้องกันความผิดพลาดในการแปลผล



รูปที่ 2.2 แสดงไดอะแกรมโครงสร้างของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (E) ของไวรัสก่อไข้สมองอักเสบ (tick-borne encephalitis) เป็นแบบในการศึกษาโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของฟลาวิไวรัสประกอบด้วย 3 โดเมนและระหว่างโดเมนเชื่อมกันด้วยกรดอะมิโน (Roehrig 1997)



2.4 การติดเชื้อจากไวรัสเด็งกี

เชื้อไวรัสเด็งกี สามารถระบาดจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้ โดยมียุงลายที่จัดว่าเป็นพาหะสำคัญคือ *Aedes aegypti* (นอกจากนี้ *Aedes albopictus* ก็เป็นพาหะสำคัญในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้) โดยยุงลายตัวเมียจะกัดและดูดเลือดซึ่งมีเชื้อไวรัสจากผู้ป่วยในระยะที่มีไข้สูงเข้าสู่ทางเดินอาหาร ไวรัสเด็งกีสามารถเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อทางเดินกระเพาะอาหารส่วนกลางสมองและต่อมน้ำลายยุง ระยะฟักตัวในยุงเรียกว่า extrinsic incubation period ซึ่งจะใช้เวลา 8-10 วัน ยุงจะมีเชื้อไวรัสอยู่ในตัวตลอดชีวิต (1-2 เดือน) โดยยุงจะไม่แสดงพยาธิสภาพใดๆ และสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสให้คนที่ถูกกัดได้ทุกครั้ง ระยะเวลาดังแต่คนได้รับเชื้อจนกระทั่งถึงเวลาที่เชื้อเพิ่มจำนวนปรากฏในกระแสเลือด เรียกว่า intrinsic incubation period และเมื่อคนถูกยุงที่มีเชื้อไวรัสกัดจะทำให้ไวรัสเข้าไปเพิ่มจำนวนในโมโนซัยท์และแมคโครฟาจ ที่อยู่ในเลือดและอวัยวะต่างๆของคนทำให้เกิดภาวะติดเชื้อ (viremia) โรคจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกีในคน มีระยะฟักตัวประมาณ 2-7 วัน

การติดเชื้อไวรัสเด็งกีส่วนใหญ่พบว่าประมาณ 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จะไม่แสดงอาการ (รูปที่ 2.3) ส่วนผู้ป่วยที่มีอาการ จะแบ่งกลุ่มโรคได้เป็น undifferentiated fever มักพบในทารกและเด็กเล็ก จะมีเพียงไข้ซึ่งแยกจากสาเหตุอื่นได้ยาก และบางครั้งมีผื่นขึ้น หรือกลุ่มที่มีเฉพาะอาการไข้เด็งกี (Dengue fever หรือ DF) ความรุนแรงมักขึ้นกับอายุผู้ป่วยในทารกและเด็กเล็กพบอาการไข้และมีผื่นแดง ในเด็กโตอาจมีเพียงไข้หรือมีอาการไข้เด็งกีที่ชัดเจนคือ ไข้สูงเฉียบพลัน (40 องศาเซลเซียส) ปวดศีรษะมาก ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ และอาจมีผื่นแบบเป็นจ้ำ อาการปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อและตามข้ออาจรุนแรงมากในผู้ใหญ่ บางรายอาจพบจุดเลือดออกที่ผิวหนังได้ผลทดสอบทูนิเกตต์เป็นบวก ส่วนใหญ่มักมีปริมาณเม็ดเลือดขาวต่ำ โดยทั่วไปผู้ป่วยจะมีอาการทุเลาได้เองภายใน 5 วัน แต่เมื่อหายแล้วยังมีอาการอ่อนเพลียอยู่นาน และกลุ่มที่มีอาการไข้เลือดออก (Dengue hemorrhagic fever หรือ DHF) มีอาการเช่นเดียวกับไข้เด็งกี แต่มีการสูญเสียพลาสมาออกจากหลอดเลือด (Plasma Leakage) ทำให้ความดันโลหิตต่ำ ในรายรุนแรงอาจมีภาวะช็อก (Dengue shock syndrome หรือ DSS) เนื่องจากระบบหมุนเวียนโลหิตล้มเหลวเกิดการรั่วของพลาสมา ตรวจพบได้จากการที่มีเลือดเข้มข้นมีน้ำในเยื่อหุ้มปอดและช่องท้อง ซึ่งผู้ป่วย 70 เปอร์เซ็นต์จะเสียชีวิตหากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที

ลักษณะที่แตกต่างระหว่าง DHF และ DF ที่ชัดเจนคือใน DHF จะมีเกล็ดเลือดต่ำ ค่าเลือดเข้มข้นเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์จากระดับเดิม มีน้ำในช่องปอด ท้องและมีอาการช็อกเกิดขึ้น การเกิดโรคแบบใหม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการที่สำคัญคือ อายุ ภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย และซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกี (สุจิตรา 2540 ; Rebecca and Lucy. 1997)

2.4.1 ลักษณะอาการทางคลินิกของโรคไขเลือดออก

อาการของโรคไขเลือดออกเริ่มด้วยการมีไข้สูงประมาณ 5-7 วัน พร้อมกับมีอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องบริเวณชายโครงขวา ตับโตกดเจ็บ อาจมีจุดเลือดออกเล็กๆ ตามตัว แขน ขา หรือมีเลือดกำเดาไหล และอาเจียนเป็นเลือด อุจจาระดำร่วมด้วย การทดสอบทูนิเกต์จะให้ผลบวกประมาณร้อยละ 85-90 ตั้งแต่วันที่ 2-3 ของโรค หลังจากที่ผู้ป่วยมีไข้ลอย 4-7 วันแล้ว ไข้จะลดลงอย่างรวดเร็ว พร้อมกับมีภาวะระบบการไหลเวียนล้มเหลวอย่างรุนแรง และแสดงอาการช็อคร่วมด้วย คือมีอาการกระสับกระส่าย มือเท้าเย็น เหงื่อออกมาก ชีพจรเบาเร็ว ความดันเลือดลดลงต่ำลงจนกระทั่งวัดไม่ได้ ในระยะนี้ผู้ป่วยอาจมีอาการเลือดออกมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีเลือดออกในระบบทางเดินอาหาร อาการช็อคและการที่มีเลือดออกมากนี้ ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องทันท่วงที่ผู้ป่วยจะถึงแก่ความตายได้ ถ้าผู้ป่วยไม่มีอาการช็อคหรือฟื้นจากช็อคแล้วจะผ่านเข้าสู่ระยะพักฟื้น ซึ่งผู้ป่วยจะหายจากอาการป่วยของโรคอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-3 วันเท่านั้น (สุวรรณ และ พิไลพันธ์ 2540)

2.4.2 หลักเกณฑ์ในการวินิจฉัย

การวินิจฉัยโรคไขเลือดออกตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกมีดังนี้

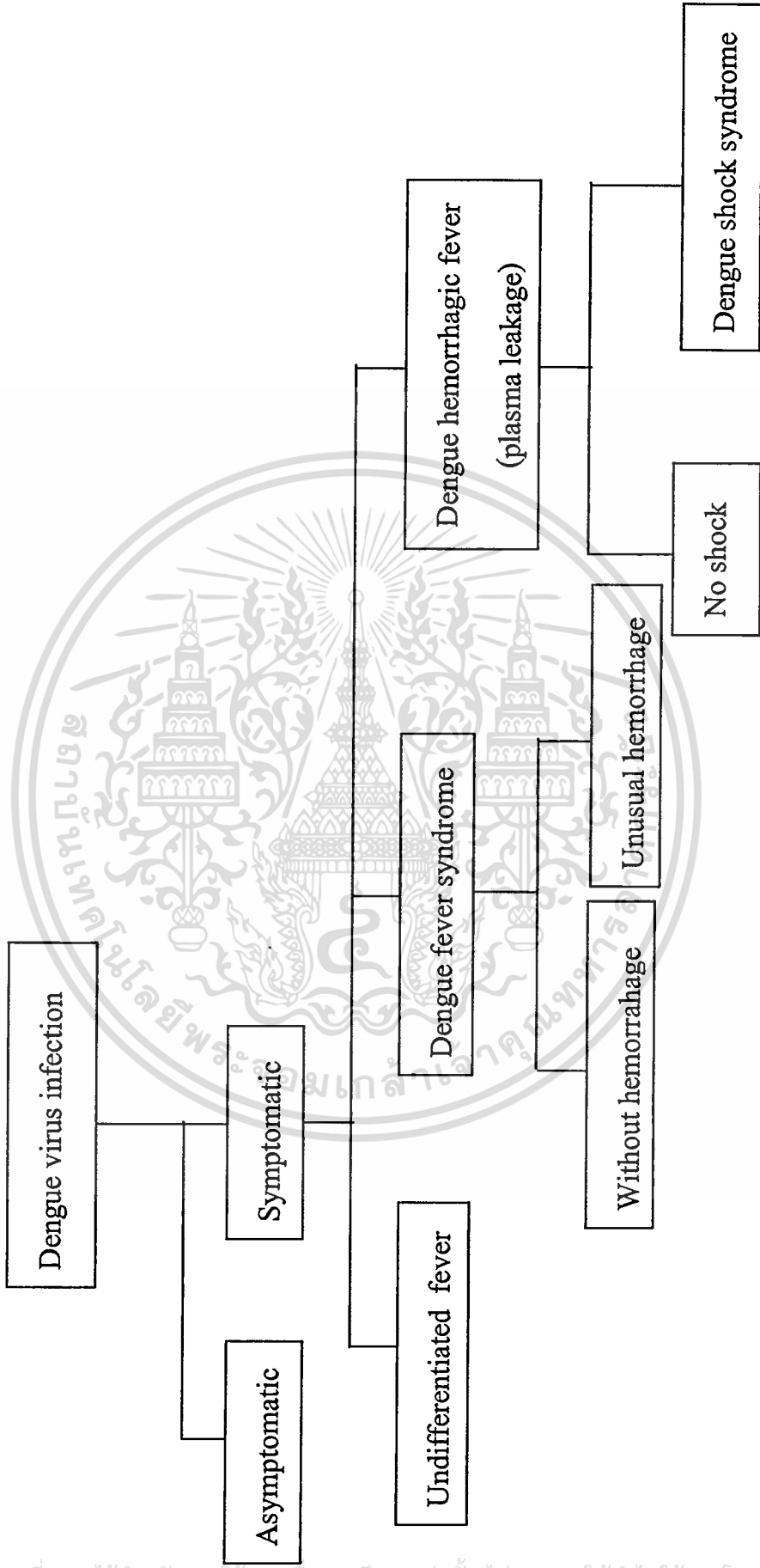
2.4.2.1 ไข้สูงอย่างเฉียบพลันนาน 2-7 วัน

2.4.2.2 มีภาวะเลือดออกรวมไปถึงการทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก ตรวจพบจุด

เลือดออก จ้ำเลือด จ้ำพรายย้า เลือดกำเดาไหล เลือดออกตามเหงือก อาเจียนเป็นเลือด ถ่ายเป็นเลือด

2.4.2.3 ตับโต

2.4.2.4 ช็อค



รูปที่ 2.3 แสดงการจำแนกอาการที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี (Rebecca และ Lucy 1997)

2.4.3 การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเด็งกีที่ทำการในปัจจุบันคือ

2.4.3.1 การตรวจแยกเชื้อไวรัสเด็งกี

เป็นวิธีที่ให้ผลการวินิจฉัยที่จำเพาะที่สุด แต่เป็นวิธีที่ค่อนข้างทำได้ยาก ตัวอย่างตรวจที่นำมาแยกเชื้อ คือ ซีรัม พลาสมา buffy coat ชิ้นเนื้อ เช่น ดับ ม้าม ต่อม้ำเหลือง ในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อซ้ำ จะทำให้โอกาสแยกเชื้อไวรัสได้จากเลือดมีน้อยมาก เพราะปริมาณไวรัสในกระแสเลือดมีระยะสั้น เนื่องจากร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาทำลายไวรัส ทำให้ปริมาณไวรัสที่มีในกระแสเลือดหมดไป ดังนั้นจึงควรเก็บตัวอย่างตรวจในระยะที่มีไวรัสในกระแสเลือดหรือในระยะไข้ คือ ภายในระยะ 3-5 วัน หลังแสดงอาการ

ตัวอย่างตรวจที่ได้จะนำมาทดสอบกับเซลล์เจ้าบ้าน (host) ที่นิยมใช้ คือ

1) ยุง โดยฉีดตัวอย่างตรวจเข้าช่องอกหรือหัวของยุง *Aedes albopictus* ตัวผู้ หลังจากนั้นเลี้ยงยุงเป็นเวลานาน 14 วัน เติดหัวยุงมาบับบนกระจกสไลด์ แล้วย้อมหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธีอิมมูโนเรืองแสง (Immunofluorescence) ในระยะต่อมาจึงฉีดเข้าช่องอกของยุงยักษ์ *Toxorhynchitis splendens* แล้วเลี้ยงยุงนี้เป็นเวลา 10-14 วัน ก่อนนำไปบีบหัวยุงบนกระจกสไลด์ เพื่อตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธีอิมมูโนเรืองแสง ถ้าได้ผลบวกแล้วจึงนำมาทำ typing ด้วยวิธี ELISA (enzyme linked immunosorbant assay)

2) ลูกน้ำยุง โดยใช้ลูกน้ำของยุง *Toxorhynchitis* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการเพาะเลี้ยงไวรัส โดยการฉีดตัวอย่างตรวจเข้าที่หัวของลูกน้ำ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ขยายในขณะที่ฉีดทำให้ลูกน้ำสลบโดยแช่ในน้ำแข็ง หลังจากฉีดแล้วเลี้ยงลูกน้ำไว้ราว 10 วัน ตรวจหาแอนติเจนโดยการนำส่วนหัวบดป้ายบนกระจกสไลด์ ตรวจหาแอนติเจนโดยการย้อมแอนติบอดีเรืองแสง ถ้าตรวจพบเชื้อในหัวลูกน้ำก็นำมาบดทำเป็นสารละลาย เพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

3) เซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์ที่ใช้ได้แก่ C6/36 ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องที่มีกำเนิดจากยุง *Aedes albopictus* หรือใช้เซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องที่มีกำเนิดมาจาก ไตลิง เช่น LLC-MK2 (Sukhavachana et.al. 1967) ตรวจหาเชื้อไวรัสโดยดู CPE หรือทำการทดสอบโดยดู plaques ในเซลล์ไตลิง หรือหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธีอิมมูโนเรืองแสง (Immunofluorescence)

4) ลูกหนูแรกเกิด โดยการฉีดตัวอย่างตรวจเข้าสมองของหนูแรกเกิด (suckling mouse) แล้วสังเกตอาการป่วยของหนูและตรวจหาแอนติเจนในเนื้อสมองโดยวิธีอิมมูโนเรืองแสง

2.4.3.2 การตรวจวัดภูมิคุ้มกันของร่างกายที่เกิดจากการติดเชื้อ

มีหลายวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น Hemagglutination inhibition test (HI) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของการตรวจหาแอนติบอดีที่เกิดจากการติดเชื้อ (Clarke and Casal 1958), วิธี IgM capture ELISA และ IgG ELISA (Chungue et.al. 1989 ; Cardoso et.al. 1992) และวิธี Neutralization test (Moren et.al. 1985) ซึ่งสามารถบอกซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกีได้ด้วย นอกจากนี้ยังมีวิธีที่พัฒนาให้ใช้ได้ง่าย มีราคาถูก และให้ผลรวดเร็วขึ้นคือ dot enzyme immunoassay (DEIA) (Cardosa and Tio 1991)

ตั้งแต่ร่างกายได้รับเชื้อไวรัสจะใช้เวลาฟักตัวประมาณ 4-5 วัน ดังนั้นในการติดเชื้อครั้งแรก (primary infection) ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีชนิด IgM ขึ้นในวันที่ 5 หลังมีอาการ ระดับ IgM จะสูงขึ้นในช่วง 1-3 สัปดาห์ และจะคงอยู่ในร่างกาย 30-60 วัน ขณะที่แอนติบอดี IgG จะปรากฏในวันที่ 14 หลังมีอาการและจะคงอยู่ตลอดชีวิต สำหรับการติดเชื้อครั้งที่สอง (secondary infection) ในผู้ป่วยบางรายอาจยังไม่สร้างแอนติบอดี IgM ในระดับที่พอตรวจได้จนกระทั่งวันที่ 20 หลังมีอาการไปแล้วหรือบางรายสามารถสร้างแอนติบอดี IgM ได้แต่ในระดับที่ต่ำกว่าที่สร้างในการติดเชื้อครั้งแรก ส่วนแอนติบอดี IgG นั้น จะถูกสร้างอย่างรวดเร็วในช่วง 1-2 วันหลังมีอาการและคงอยู่นานถึง 30-40 วัน หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลงมาถึงระดับที่พบในการติดเชื้อครั้งแรก

การตรวจโดยวิธี hemagglutination inhibition test (HI) ควรทำการเจาะเลือด 2 ครั้ง ครั้งแรกเมื่อเริ่มมีอาการป่วยและครั้งที่สองประมาณ 1-4 สัปดาห์ต่อมา โดยถือระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น 4 เท่าหรือมากกว่าแสดงถึงการติดเชื้อไวรัสเด็งกี ในการเจาะเลือดครั้งแรก ควรเจาะเร็วที่สุดหลังมีไข้ ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อซ้ำจะมีระดับ HI แอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปประมาณวันที่ 5-7 หลังเริ่มมีอาการจะมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นชัดเจน ดังนั้นการเจาะเลือดครั้งที่สองห่างจากครั้งแรก 3-5 วัน จะพบว่ามียกระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่าหรือมากกว่าได้แล้ว แต่ถ้าเจาะเลือดครั้งแรกหลังวันที่ 5 ของอาการใช้ระดับแอนติบอดีมักจะสูงขึ้นแล้วจึงอาจไม่พบการเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่าชัดเจน ส่วนในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเป็นครั้งแรกระดับแอนติบอดีจะเพิ่มช้ากว่า และระดับ HI จะไม่สูงเกิน 1 ต่อ 1,280 การเจาะเลือดครั้งที่ 2 จำเป็นจะต้องให้ห่างจากครั้งแรก 1-4 อาทิตย์ และจากระดับแอนติบอดีที่พบไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ใดได้ นอกจากนี้หากการตรวจเลือดครั้งแรกมีค่า HI มากกว่าหรือเท่ากับ 1 ต่อ 2560 ทาง WHO ให้สันนิษฐานว่าเป็นการติดเชื้อไวรัสเด็งกีซ้ำ

นอกจากวิธี HI แล้วยังมีวิธี ELISA ที่สามารถวัดระดับ IgM และ IgG ของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อของไวรัสเด็งกี โดยถือระดับ IgM ของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเด็งกีที่มีปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 40 หน่วย เป็นการกำหนดการติดเชื้อไวรัสเด็งกี วิธี ELISA มีข้อดีกว่าการตรวจโดยวิธี HI คือสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อว่าเป็นการติดเชื้อครั้งแรกหรือครั้งที่สอง ทั้งสองวิธีดังที่กล่าวมาแล้วนี้เป็นวิธีที่ใช้ในงานบริการผู้ป่วย นอกจากนี้ยังมี

วิธีที่พัฒนาให้ใช้ได้ง่าย มีราคาถูก และให้ผลรวดเร็วขึ้นคือ dot enzyme immunoassay (DEIA) (Cardosa et.al. 1988)

2.4.3.3 การตรวจหาอีโนมของไวรัสโดยวิธี RT-PCR

การตรวจหาอาร์เอ็นเอของไวรัสเด็กกี ในพลาสมาของผู้ป่วยในระยะเริ่มต้นที่มีไข้ (acute phase) โดยใช้วิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนอาร์เอ็นเอของไวรัส โดยมีการออกแบบไพรเมอร์จากตำแหน่งต่าง ๆ บนจีโนมของไวรัส ทำให้สามารถตรวจหาไวรัสได้อย่างแม่นยำ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและให้ผลเร็ว สามารถแยกซีโรทัยป์ของไวรัสได้ด้วย แต่การเก็บตัวอย่างต้องทำในช่วง 2-3 วันแรกที่มีอาการไข้ เพราะช่วงหลังจากนี้ปริมาณไวรัสจะหมดไป

2.4.4 ระบาดวิทยา

โรคไข้เลือดออกเด็กกีเป็นโรคไข้เลือดออกเพียงชนิดเดียวที่พบในประเทศไทย เริ่มระบาดเป็นครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2501 มีรายงานผู้ป่วยจากกรุงเทพมหานครเพียงแห่งเดียวเท่านั้น จำนวนทั้งสิ้น 2,148 ราย (ตาย 240 ราย) และจะพบผู้ป่วยเฉพาะในเขตเมืองเท่านั้น ในปัจจุบันนี้มีการระบาดของโรคทุกจังหวัด และมีรายงานโรคจากทั้งในเขตเมือง นอกเขตเมือง จากระดับอำเภอไปจนถึงหมู่บ้าน จำนวนผู้ป่วยในการระบาดแต่ละครั้งก็เพิ่มสูงมากขึ้นเรื่อยๆ จากจำนวน 80,070 ราย (ตาย 542 ราย) ในพ.ศ. 2528 ได้เพิ่มขึ้นจนถึง 174,285 ราย (ตาย 1,007 ราย) ในปีพ.ศ. 2530 ส่วนในปีพ.ศ. 2529 ที่ไม่นับว่ามีการระบาดเป็นจำนวนมาก ก็มีรายงานผู้ป่วยถึง 29,573 ราย (ตาย 272 ราย) ในปีพ.ศ. 2531-2533 แต่ละปีมีผู้ป่วย 26,926 ราย (ตาย 179 ราย), 66,441 ราย (ตาย 260 ราย) และ 115,291 รายตามลำดับ ส่วนใหญ่พบในเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปี ช่วงที่พบบ่อยอยู่ระหว่าง 2-8 ปี ในระยะหลังๆนี้พบในเด็กโตอายุ 5-9 ปี มากกว่าในช่วงอายุ 0-4 ปี (สุจิตรา 2540)

จากข้อมูลของกองระบาดวิทยา เมื่อวันที่ 22 ตุลาคม 2541 จำนวนผู้ป่วยตั้งแต่เดือน มกราคม-สิงหาคม 2541 สูงกว่าในช่วงเวลาเดียวกันของปี 2540 ถึง 2.00 เท่า และจำนวนผู้เสียชีวิตสูงกว่า 3.95 เท่า โดยมีรายละเอียดของสถานการณ์โรคไข้เลือดออก ปี พ.ศ. 2541 ดังนี้

ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2541 ถึงวันที่ 22 ตุลาคม 2541 กองระบาดวิทยาได้รับรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออก 113,639 ราย ตาย 399 ราย อัตราป่วยตายร้อยละ 0.35

ตารางที่ 2.1 แสดงจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกตั้งแต่ 1 มกราคม ถึง 22 ตุลาคม 2541 ข้อมูลจาก
กองระบาดวิทยา (วิทยุ 2541)

เดือน	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	ตาย (ราย)
มกราคม	6,773	24
กุมภาพันธ์	6,397	22
มีนาคม	9,761	27
เมษายน	7,694	34
พฤษภาคม	11,861	38
มิถุนายน	21,187	85
กรกฎาคม	22,730	87
สิงหาคม	18,087	59
กันยายน	8,579	19
ตุลาคม	570	4

2.5 เทคนิครีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ

ความก้าวหน้าในเทคนิคด้านรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอได้เจริญรุดหน้าไปอย่างมาก สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนใหม่ๆหลายชนิดในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม เช่น ในระบบโปรคาริโอต (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) และในระบบยูคาริโอต (ยีสต์, รา, mammalian cells) แต่การผลิตโปรตีนในระบบของ *Escherichia coli* เป็นระบบที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน ผลิตได้เป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายต่ำ (Marston 1986) มีประสิทธิภาพและสามารถควบคุมการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้อย่างดี จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้เกิดการทดลองขึ้นมากมาย ในการแสดงออกของยีนที่ต้องการและนำเอา *Escherichia coli* มาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนมากที่สุดแต่อย่างไรก็ตาม *Escherichia coli* ไม่มีกลไกการดัดแปลงของโปรตีนภายหลังการสังเคราะห์ (post-translational modification) กล่าวคือไม่สามารถเติมกลุ่มโมเลกุลต่างๆ ดังต่อไปนี้ให้กับโปรตีนได้ เช่น กลุ่มน้ำตาลที่ตำแหน่ง N และ O (N และ O-linked glycosylation), กลุ่มฟอสเฟต (Phosphorylation), กลุ่มอะเซททิล (Acetylation) และกลุ่มพาลมิเตต (Palmitation) นอกจากนี้ยังไม่สามารถกำจัดเมทไทโอนีนที่ปลายด้าน N ของโปรตีน (N-Terminal methionine) อีกด้วย และไม่สามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfhydryl bridge) ทำให้โปรตีนซึ่งต้องการพันธะดังกล่าวในการม้วนตัว (folding) ไม่มีโครงสร้างดังที่ควรจะมีซึ่งอาจทำให้โปรตีนรีคอมบิแนนต์จาก *Escherichia coli* มีคุณสมบัติผิดไปจากโปรตีนธรรมชาติ (วิลาศ 2536)

2.5.1 เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีน

ในการคัดเลือกชนิดของเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกของโปรตีนที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนในระบบ *Escherichia coli* ควรมีส่วนประกอบพื้นฐานดังต่อไปนี้ คือ จุดตั้งต้นการจำลองตัว (origin of replication) ซึ่งเรียกกย่อว่า "ORI" อยู่บนโมเลกุล เพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเอง มีโปรโมเตอร์และลำดับเบสซึ่งช่วยส่งเสริมการผลิตโปรตีน และตำแหน่งที่ใช้ตัดต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไป (Multiple Cloning Site; MCS) เพื่อให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการ คุณสมบัติเด่นอีกประการหนึ่งคือ มียีนที่ควบคุมลักษณะกรรมพันธุ์ (phenotype) สำคัญอยู่ด้วย เช่น ความต้านทานยาปฏิชีวนะ และนอกจากจะคำนึงถึงปริมาณที่สามารถผลิตโปรตีนได้สูงแล้ว ยังต้องคำนึงถึงขั้นตอนในการแยกโปรตีนที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย โดยควรเป็นขั้นตอนที่ทำได้ง่ายและควรมีจำนวนขั้นตอนน้อยที่สุด เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต ในการผลิตโปรตีนในรูปของโปรตีนลูกผสม (fusion protein) โดยมีโปรตีนพาหะเชื่อมกับโปรตีนที่ต้องการผลิต มีประโยชน์ในแง่ของความเสถียรของโปรตีนบางชนิดที่ถูกผลิตใน *Escherichia coli* และยังช่วยในขั้นตอนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติของความจำเพาะระหว่างโปรตีนพาหะกับชนิดของเรซินที่ใช้

ในปัจจุบันนี้มีหลายระบบ ที่ใช้ในการทำให้รีคอมบิแนนต์โปรตีนบริสุทธิ์ วิธีหนึ่งที่ทำได้ง่ายและรวดเร็วคือการใช้ Immobilized metal affinity chromatography เพียงขั้นตอนเดียว จึงมีการพัฒนาให้รีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้มีเปปไทด์พาหะติดอยู่ที่ปลายด้านอะมิโน (N) หรือปลายด้านคาร์บอกซี (C) ในบางระบบตัวอย่างเช่น เวกเตอร์ pGEX-3X โปรตีนที่ได้จะแสดงออกในรูป Glutathione-S-Transferase (GST) เป็นโปรตีนพาหะสามารถจับกับ glutathione sepharose bead ทำให้สะดวกในขั้นตอนการทำให้รีคอมบิแนนต์โปรตีนบริสุทธิ์ (Smith and Johnson 1988) หรือ เวกเตอร์ pMAL-c2 จะให้โปรตีนที่สามารถจับกับมอลโตส (Maltose binding domain: MBP) เป็นโปรตีนพาหะต่อเชื่อมกับโปรตีนที่สนใจ และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้โดยใช้อะไมโรสเรซิน (Maina et.al. 1988) และนอกจากนี้ยังมีการใช้ hexahistidine (6His) เป็น เปปไทด์พาหะซึ่งจะจับกับโลหะที่มีประจุบวกเช่น Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ของเรซิน

ในช่วงแรกของการศึกษาการผลิตโปรตีน den2E จากไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 2 ในระบบ *Escherichia coli* ได้มีผู้ทำการทดลองดังต่อไปนี้ Jarumanokul (1996) ได้ทดลองใช้เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีน คือ pGEX-3X สำหรับการแสดงออกของยีน den2E ผลการทดลองพบว่าโปรตีน GST-D2E ที่ได้อยู่ในรูปของตะกอนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion bodies) ที่ละลายได้ด้วยสารละลาย sarcosyl 0.4 เปอร์เซ็นต์ แต่โปรตีน GST-D2E นี้ไม่สามารถจับกับ glutathione beads ในขั้นตอนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ต่อมา Pongthinthong-ngarm (1997) ใช้เวกเตอร์ pMAL-c2 ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนส่วนโดเมน B ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีพบว่าโปรตีน MBP-D2B ที่ผลิตได้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้มากขึ้น แต่เมื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ MBP-D2B มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก โดยวิธี Dot enzyme immuneassay พบว่าโปรตีนพาหะ MBP

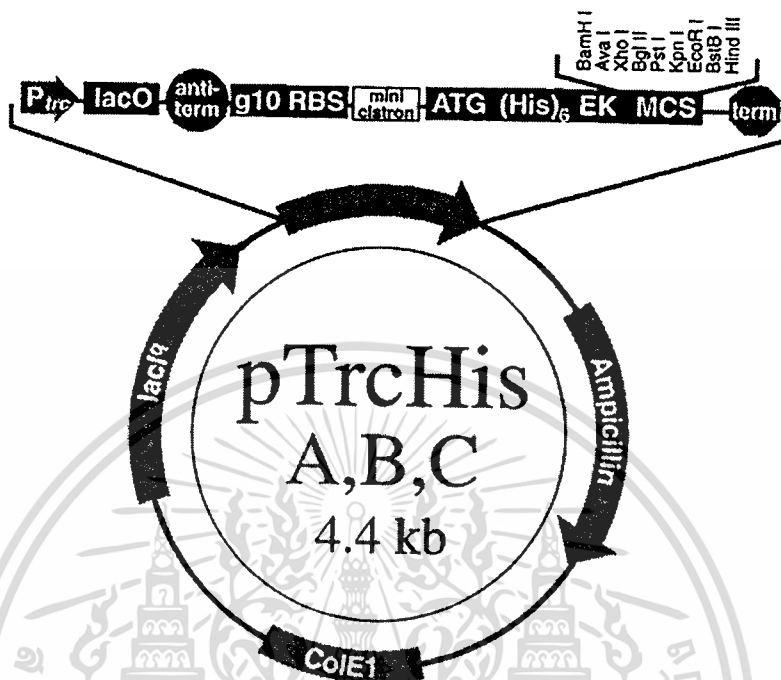
สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนทั่วไป จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก และ Nuangplee (1997) ได้ทดลองใช้เวกเตอร์ pTrcHis ซึ่งมีเปปไทด์พาหะคือกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัวแทนและพบว่าโปรตีน 6H-D2E ที่ผลิตได้อยู่ในรูปตะกอนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งทำให้ละลายได้ด้วยสารละลาย 6M guanidine hydrochloride และเมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้โคมอลท์เรซิน (Co^{2+} resin) พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์ 6H-D2E สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและทำปฏิกิริยาได้ดีมากกับซีรัมของคนปกติที่มีค่า HI titer น้อยกว่า 20

จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้เลือกใช้ เวกเตอร์ pTrcHis (ดังรูปที่ 2.4) เป็นเวกเตอร์สำหรับการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนในระบบ *Escherichia coli* เนื่องจากโปรตีนที่ได้จะมีกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัวติดอยู่ที่ปลายด้าน N (N-terminal) ของโปรตีนที่ต้องการผลิต ซึ่งจะช่วยในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ Immobilize metal affinity chromatography (IMAC) โดยอาศัยคุณสมบัติของการจับกันของกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัวที่มีประจุลบกับโลหะที่มีประจุบวก เช่น Co^{2+} บนเรซิน (Porath 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 โปรตีนพาหะ 6His-tagged จะมีข้อได้เปรียบกว่าโปรตีนพาหะตัวอื่น คือ มีขนาดเล็ก ทำให้ไม่มีผลในการบัง antigenic site หรือ active site ของโปรตีนที่ต้องการผลิต นอกจากนี้ metal immobilized resin ที่ใช้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ยังสามารถใช้ได้ทั้งสภาวะโปรตีนธรรมชาติ (native) และสภาวะที่โปรตีนถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (denaturing) ซึ่งทนทานต่อสารดีเนเจอร์ (denaturant) ที่รุนแรง เช่น สารละลาย 6M guanidine hydrochloride หรือสารละลาย 8M urea ละลายตะกอนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำในกรณีโปรตีนรีคอมบิแนนต์ถูกผลิตออกมาในรูปที่ไม่ละลายน้ำ

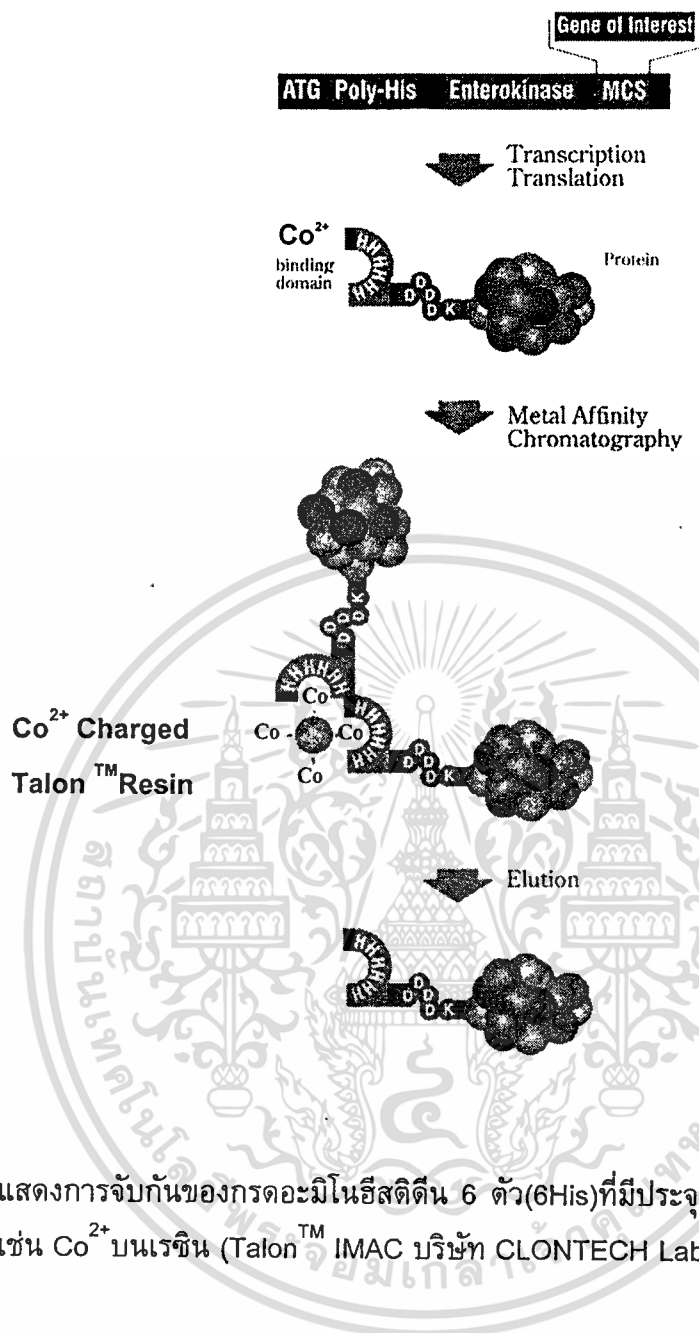
2.5.2 เวกเตอร์ pTrcHis

เวกเตอร์ pTrcHis เป็นอนุพันธ์ของเวกเตอร์ pUC ถูกออกแบบโดยบริษัท Invitrogen Corporation ให้มีประสิทธิภาพในการแสดงออกของโปรตีน และทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายในขั้นตอนเดียว ยีนที่โคลนเข้าไปในเวกเตอร์ pTrcHis ที่ตำแหน่งที่ใช้ตัดต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไป (Multiple Cloning Site) จะมีการแสดงออกของยีนนั้นในระดับสูง (high expression) มีตัวที่ควบคุมการทำงานคือโปรโมเตอร์ Trc และ rrnB anti-terminator ซึ่งโปรโมเตอร์ Trc ประกอบด้วย -35 region ของโปรโมเตอร์ Trp ต่อเข้ากับ -10 region ของโปรโมเตอร์ lac ยีน lacI^q บนเวกเตอร์จะทำหน้าที่ผลิต lac repressor protein ซึ่งมีประสิทธิภาพกวดการถอดรหัสโปรตีนของยีนที่ใส่เข้าไปใน *Escherichia coli* โดยไม่คำนึงถึงว่าเป็นสายพันธุ์ lacI^q หรือ lacI⁺ มีประโยชน์คือสามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีนได้ เมื่อต้องการให้เชื้อมีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* ให้เจริญจนถึงระยะกลางของการเจริญเติบโตของเชื้อ (mid-log phase) การแปลรหัสจะเริ่มต้นที่ตำแหน่ง ATG ผ่านกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัว ไปจนถึงปลาย 3' หรือตำแหน่งหยุด (stop codon) ยีนที่โคลนเข้าไปทำให้ได้

เป็นโปรตีนลูกผสมที่มีส่วนฮีสติดีน 6 ตัวเป็นเปปไทด์พาหะ ซึ่งมีความจำเพาะในการจับกับ metal immobilized resin ช่วยในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ง่าย



รูปที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบของเวกเตอร์ pTrcHis ขนาด 4.4 กิโลเบส เป็นเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของโปรตีนในระบบของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสของกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัวติดกัน ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นไลแกนด์ที่จำเพาะต่อไอออนของโลหะบวก เช่น โคบอลต์ (บริษัท Invitrogen Corporation, USA.)



รูปที่ 2.5 แสดงการจับกันของกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัว(6His)ที่มีประจุลบกับโลหะที่มีประจุบวก เช่น Co^{2+} บนเรซิน (Talon™ IMAC บริษัท CLONTECH Laboratories, Inc., USA)

บทที่ 3

เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์

3.1 เครื่องมือ

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก (High speed refrigerated microcentrifuge)

แบบ MTX-150 บริษัท Tomy Seiko Co.,Ltd. Japan

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Superspeed centrifuge) แบบ J2-MC
บริษัท Backman Instrument Inc., U.S.A.

เครื่องทำพีซีอาร์ (DNA Thermal Cycler) บริษัท Perkin Elmer Cetus, U.S.A.

เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) แบบ Orion 520 A, U.S.A.

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath) แบบ Julabo SW-20C

เครื่องผสมสาร (vortex-mixer) แบบ vortex Gene 2 บริษัท Scientific Industries Inc.,
U.S.A.

เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) แบบ TVC 312A Spectrolines
กล้องโพรารอยด์ (Polaroid Camera) แบบ Fotodyne

ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) แบบ Pipetman P2, P20, P100, P200 และ P1000
บริษัท Gilson medical Electronics S.A., France

อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel eletrophoresis) ประกอบด้วย horizontal
electrophoresis unit และ power supply แบบ Ec 135 บริษัท Advance Co.,Ltd., U.S.A.

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer hot plate) บริษัท Stuart Scientific, UK.

เครื่องแยกเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค (Sonicator) แบบ W-380 บริษัท Heat systems
ultrasonic, inc., U.S.A.

อุปกรณ์แยกขนาดโปรตีน (polyacrylamide gel eletrophoresis) ประกอบด้วย Mini
Protean II cell และ power supply บริษัท Biorad, U.S.A.

อุปกรณ์ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (protein purification) ประกอบด้วย TALON spin Column
และ TALON Metal Affinity Resin บริษัท CLONTECH Laboratories, Inc., U.S.A.

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Sterilizer autoclave) แบบ MLS - 300 บริษัท Sanyo, Japan

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) แบบ WV-160A บริษัท
Shimadzu, Japan

3.2 วัสดุภัณฑ์

ถุงไดอะไลซิส (cellulose dialysis bag) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.5 เซ็นติเมตร บริษัท Scientific Instrument Center LTD , UK.

กระดาษไนโตรเซลลูโลส แบบ Reinforced NCขนาด 0.45 ไมครอน บริษัท Schleicher & Schuell

ฟิล์มถ่ายภาพขาวดำ แบบ Poraloid 667, England

ชุด QIA quick PCR Purification Kit บริษัท QIAGEN Inc., UK.

3.3 จุลินทรีย์

Escherichia coli สายพันธุ์ DH5 α : Sup E44, Δ Lac U169 (\emptyset 80 Lac Z Δ M 15) hsd R17, rec A1, end A1, gyr A69, thi -1, rel A1

ไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 จากแผนกไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายสหรัฐ โรงพยาบาลพระมงกุฎ กรุงเทพมหานคร

3.4 แอนติบอดี

Rabbit anti-mouse immunoglobulin P260., Dakopatts, Denmark.

Rabbit anti-human immunoglobulin G (γ chains). P214., Dakopatts, Denmark.

Pooled convalescent dengue sera (PCS) ซึ่งรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกอย่างน้อย 30 คนที่มีค่า HI titer ต่อทั้ง 4 ซีโรทัยปีมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ต่อ 10,240

Pooled negative dengue sera (PND), ซึ่งรวมของคนปกติ 6 คนที่ให้ผลลบในการทดสอบ Dot enzyme immunoassay.

3.5 พรายเมอร์

พรายเมอร์ den3E (L) :

5' CG ^{BamHI} GGA TCC ^{NheI} GCT AGC ATG AGA TGT GTG GGA GTA GGA 3'

พรายเมอร์ den3E (R) :

5' CG ^{SalI} GTC GAC ^{EcoRI} GAA TTC ^{Apal} GGG CCC ^{stop} TTA GCG CCT TGC ACC TCT GGC 3'

พรายเมอร์เหล่านี้ถูกออกแบบตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วนเปลือกหุ้ม (E) ของไวรัส เด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 21 สำหรับ den3E(L) และ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1,210 ถึง 1,227 สำหรับ den3E(R) และมีการเติมเรสทริกชันเอนไซม์ คือ *Bam*HI และ *Eco*RI ที่ปลาย 5' ของ den3E(L) และ den3E(R) ตามลำดับ เพื่อช่วยในการโคลนพีซีอาร์โปรดักส์เข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก (expression vector) ทำการสังเคราะห์พรายเมอร์โดยหน่วยบริการชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประเทศไทย

3.6 เอนไซม์

เรสทริกชันเอนไซม์ (Restriction endonuclease enzymes)

เอนไซม์ *Eco*RI บริษัท Boehringer Mannheim,

เอนไซม์ *Bam*HI บริษัท Boehringer Mannheim,

เอนไซม์ Deoxyribonuclease I (DNase I) บริษัท Sigma, U.S.A.

เอนไซม์ Ribonuclease A (RNase A) บริษัท Sigma, U.S.A.

เอนไซม์ ไลโซไซม์ (Lysozyme) บริษัท Sigma Chemical Company, USA.

เอนไซม์ Ribonuclease inhibitor (RNasin) บริษัท Promega, U.S.A.

เอนไซม์ Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV-RT) บริษัท Promega, U.S.A.

เอนไซม์ Tag DNA polymerase บริษัท Perkin Elmer, U.S.A.

เอนไซม์ Elongase บริษัท Gibco BRL

เอนไซม์ T4 DNA ligase บริษัท Amersham, UK

3.7 ดีเอ็นเอและโปรตีนมาตรฐาน

ดีเอ็นเอของ λ -DNA ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III บริษัท New England Biolabs, U.S.A.

ดีเอ็นเอของ ϕ x174 RF ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Ha*eIII บริษัท Promega, U.S.A.

โปรตีนมาตรฐาน (Mid-range protein molecular weight markers) น้ำหนักโมเลกุล 14.4 ถึง 97.4 กิโลดาลตัน บริษัท Promega, U.S.A.

3.8 เวกเตอร์เพื่อการแสดงออกในระบบ *Escherichia coli*

pTrcHis A expression vector บริษัท Invitrogen Corporation, USA.

3.9 สารเคมี

สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	ที่มา
Absolute ethanol (C ₂ H ₅ OH)	46.07	E.Merck
Absolute methanol (CH ₃ OH)	32.04	E.Merck
Acetic acid, glacial (CH ₃ COOH)	60.05	E.Merck
Acrylamide (C ₃ H ₅ NO)	71.08	Sigma
Agarose type I : low EEO (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n		Sigma
Ammonium persulphate (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	228.20	Sigma
Ampicillin (C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ SNa)	371.4	Sigma
Bacto agar		Gibco
Benzamidine-HCl	156.62	E.Merck
Bromophenol blue (C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa)	670.0	Sigma
1-Butanol [CH ₃ (CH ₂) ₃ OH]	74.12	E.Merck
Calcium chloride (CaCl ₂)	147.02	BDH
Cesium chloride (CsCl)	168.36	WAKO
Chloroform (CHCl ₃)	119.38	E.Merck
Coomassie brilliant blue R 250		Fluka
3'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate หรือ dATP		Pharmacia
3'-Deoxycytosine 5'-triphosphate หรือ dCTP		Pharmacia
3'-Deoxyguanosine 5'-triphosphate หรือ dGTP		Pharmacia
3'-Deoxythymidine 5'-triphosphate หรือ dTTP		Pharmacia
3,3 Diamino benzidine หรือ DAB	360.1	Sigma
Diethyl pyrocarbonate หรือ DEPC	162.1	Sigma
Ethidium bromide (C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br)	394.31	Sigma
Ethylene diamine tetra-acetic acid tetrasodium salt หรือ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O)	372.24	E.Merck
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180.6	E.Merck
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	92.09	Sigma
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	75.07	Sigma
Guanidine thiocyanate (CH ₅ N ₃ .CHNS)	118.16	Fluka
Hydrochloric acid (HCl)	36.50	E.Merck
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	34.0	Thailand
Isoamyl alcohol (C ₅ H ₁₁ OH)	88.15	E.Merck

สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	ที่มา
Isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$)	60.10	E.Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside หรือ IPTG ($\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$)	238.3	Sigma
Magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	203.08	E.Merck
Magnesium sulphate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	246.48	E.Merck
Maganese chloride ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	197.92	Sigma
2-Mercaptoethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)	78.13	Fluka
N,N'-Metthyl-bis-acrylamide ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$)	154.20	Sigma
2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid หรือ MES ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$)	195.2	Sigma
Peptone		Gibco
Phenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)	94.11	E.Merck
Potassium chloride (KCl)	74.56	E.Merck
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	136.09	E.Merck
Potassium hydroxide (KOH)	56.11	Sigma
Skim milk		
Sodium acetate trihydrate ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	136.08	Sigma
Sodium azide (NaN_3)	65.01	E.Merck
Sodium chloride (NaCl)	58.44	E.Merck
Sodium dodecyl sulphate หรือ SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$)	288.38	Sigma
Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	137.99	E.Merck
Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	141.96	E.Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	40.00	E.Merck
N,N,N',N'-Tetramethyl aminomethane หรือ TEMED	166.21	Bio-Rad
Tris (Hydroxymethyl aminomethane) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	121.1	Sigma
Trizol		Gibco
Yeast extract		Gibco

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 การเพิ่มจำนวนยีนส่วนเปลือกหุ้ม (ยีน E) ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 โดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1.1 การออกแบบและสังเคราะห์พรายเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน E

โดยใช้ลำดับเบสของยีน E ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 จากฐานข้อมูลเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ทำการออกแบบพรายเมอร์ทางด้านซ้าย:den3E(L) (sense strand) ที่มีลำดับเบสเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 21 ของยีน E และพรายเมอร์ทางด้านขวา den3E(R) (anti-sense strand) ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกัน (complementary) กับนิวคลีโอไทด์ที่ 1,210 ถึง 1,227 ของยีน E ซึ่งครอบคลุมส่วนของยีน E ที่แปลรหัสเป็นโปรตีน E ตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 1 ถึง 409 (ไม่รวมส่วนปลายของกรดอะมิโน 84 ตัวที่เป็นส่วนของ hydrophobic region) และเติมลำดับเบสของเรสทริคชันเอนไซม์ คือ *Bam*HI และ *Nhe*I ทางด้านปลายด้าน 5' ของพรายเมอร์ den3E(L) และ *Sa*II, *Eco*RI และ *Apa*I ทางด้านปลาย 5' ของพรายเมอร์ den3E(R) เพื่อใช้ในการตัดต่อชิ้นยีนที่ได้จากพีซีอาร์โปรดักส์ เข้ากับ เวกเตอร์สำหรับการแสดงออก

พรายเมอร์ den3E(L) :

5' CG ^{*Bam*HI} GGA TCC ^{*Nhe*I} GCT AGC ATG AGA TGT GTG GGA GTA GGA 3'

พรายเมอร์ den3E(R) :

5' CG ^{*Sa*II} GTC GAC ^{*Eco*RI} GAA TTC ^{*Apa*I} GGG CCC TTA GCG CCT TGC ACC TCT GGC 3'

4.1.2 การสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 จากน้ำเลี้ยงเซลล์ไวรัส

การสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสจากน้ำเลี้ยงเซลล์ เป็นการสกัดโปรตีนและสารอื่นๆ ออกจากอาร์เอ็นเอด้วยสารที่มีส่วนผสมของกรดกัวนิดีนไทโอไซยาเนต-ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform) ดัดแปลงจากวิธีซึ่งรายงานโดย Chomczynski and Sacchi (1987) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ใส่น้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติก (Eppendorf tube) ขนาด 1.5 ไมโครลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำละลาย Trizol[®] (บริษัท Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) 1 มิลลิลิตร เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอออกจากเซลล์ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมน้ำละลายคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันโดยการพลิกกลับหลอดหลายๆครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำหลอดไปปั่นในเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนบนซึ่งเป็นส่วนน้ำที่มีอาร์เอ็นเอใส่ลงในหลอดพลาสติกใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตรลงในหลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำหลอดไปปั่นเพื่อเก็บตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 20 นาที และดูดสารละลายทิ้งเติมสารละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน บั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 12,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาทีแล้วดูดสารละลายเอทานอลทิ้ง ทำตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งโดยเปิดฝาทิ้งไว้ 5-10 นาที แล้วละลายตะกอนในน้ำที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase แล้ว (DEPC-H₂O) 5 ไมโครลิตร

4.1.3 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA) โดยวิธี Reverse transcription (RT)

นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากไวรัส มาทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอในน้ำยาที่ประกอบด้วยพรายเมอร์ den3E(R) สารละลายบัฟเฟอร์ 10xbufferII แมกนีเซียมคลอไรด์ และสารละลาย dNTP เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายซีดีเอ็นเอต่อจากพรายเมอร์ในทิศทางจาก 5' ไป 3' มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ดูดสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากที่ได้จากข้อ 4.1.2 ใส่หลอดพลาสติกขนาด 500 ไมโครลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมพรายเมอร์ den3E(R) (antisense primer) ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 10xbufferII (ประกอบด้วย สารละลาย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.3, สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 500 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย dNTP 10 มิลลิโมลาร์ (ประกอบด้วยสารละลาย dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ 2 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้พรายเมอร์จับกันกับสายอาร์เอ็นเอในตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมกัน จากนั้นแช่หลอดทดลองในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย RNasin 40 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Reverse Transcriptase 25 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.48 ไมโครลิตร แล้วจึงนำหลอดไปแช่ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

4.1.4 การทำพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction , PCR)

4.1.4.1 ใช้เอนไซม์ Elongase

ใช้ซีดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาในข้อ 4.1.3 จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมกับพรายเมอร์ den3E(L) และ den3E(R) ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร อย่างละ 2 ไมโครลิตร และสารละลาย dNTP 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมน้ำที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 ไมโครลิตร นำมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 5xbufferB 20 ไมโครลิตร และกระตุ้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ Elongase 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หยดน้ำมัน (mineral oil) 50 ไมโครลิตร เพื่อปกคลุมผิวหน้าของสารละลาย ป้องกันการระเหยของน้ำในหลอดทดลอง หลักการของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ ประกอบด้วย

ขั้นตอนในการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส, ขั้นตอนการจับของพรายเมอร์บนสายดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, ขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่โดยการต่อพรายเมอร์ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ใส่หลอดที่มีส่วนผสมของสารปฏิกิริยาทั้งหมดในเครื่องทำพีซีอาร์ (Thermal cycle) โดยตั้งเครื่องให้ทำงานจรของอุณหภูมิและเวลาดังนี้

94°C 5 นาที, 50°C 1 นาที, 72°C 1 นาที จำนวน 1 รอบ

94°C 1 นาที, 50°C 1 นาที, 72°C 1 นาที จำนวน 38 รอบ

94°C 5 นาที, 50°C 1 นาที, 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ

4.1.4.2 ใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase

ใช้ซีดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาในข้อ 4.1.3 จำนวน 10.98 ไมโครลิตร ผสมกับพรายเมอร์ den3E(L) และ den3E(R) ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร อย่างละ 1 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เติมน้ำที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase (DEPC-H₂O) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร นำมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 10xPCR buffer II 4 ไมโครลิตร และกระตุ้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase จำนวน 0.25 ไมโครลิตร หยดน้ำมัน 50 ไมโครลิตร เพื่อปกคลุมผิวหน้าของสารละลาย ใส่หลอดทดลองในเครื่องทำพีซีอาร์ (Thermal cycle) โดยตั้งเครื่องให้ทำงานจรของอุณหภูมิและเวลาตามที่กำหนดเหมือนข้อ 4.1.4.1

4.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนวุ้นอะกาโรส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ หลอมอะกาโรสเจลในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ด้วยเครื่องไมโครเวฟ ปล่อยให้วุ้นอุ่นและเทลงในภาชนะที่มีหิวเสียบอยู่ทางด้านบนเพื่อทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยการพลิกหลอดแล้วแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที เติมสารละลาย Solution III (โพแทสเซียมอะซิเตต 3 โมลาร์ พีเอช 4.8) ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร พลิกหลอดให้เข้ากันจนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ แช่หลอดในน้ำแข็ง 10 นาที ปั่นแยกสารละลายดีเอ็นเอที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที และนำมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม 1 ครั้ง ดูดเฉพาะสารละลายส่วนบนออกมาใส่ในหลอดใหม่ และเติมสารละลายไอโซโพรพานอลปริมาตรเท่ากัน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอพลิกหลอดให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นเก็บตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที ละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE 3 มิลลิลิตร เติมสารละลายลิเทียมคลอไรด์ 5 โมลาร์จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 15-30 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนทิ้งไปที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นำเฉพาะส่วนน้ำใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล 6 มิลลิลิตรโดยแช่ที่ -70 องศาเซลเซียส 15 นาที ปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งทำตะกอนให้แห้ง แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ และทำการย่อยอาร์เอ็นเอด้วยสารละลาย RNase ที่ความเข้มข้น 20-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยฟีนอลและคลอโรฟอร์มอีก 1 ครั้ง ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต 3 โมลาร์จำนวน 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลายผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายเอทานอลแช่เย็น 2 เท่าของสารละลายทั้งหมด ปล่อยให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่ -70 องศาเซลเซียส 15 นาที ปั่นเก็บตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เวกเตอร์ pTrcHisA ที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการโคลนนิ่งต่อไป

4.3 การทำโคลนนิ่งยีน den3E ของไวรัสแดงที่ ที่ได้จาก RT-PCR ในพลาสมิด pTrcHis A

4.3.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ den3E สำหรับโคลนนิ่ง

นำชิ้นดีเอ็นเอ den3E ที่ได้จากขั้นตอนการทำ RT-PCR และผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาแล้วในข้อ 4.1.6 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ประมาณ 0.5 ถึง 1 ไมโครกรัม) มาย่อยปลาย 5' และ 3' อย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI ตามลำดับ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายฟีนอลและคลอโรฟอร์ม อย่างละ 25 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ปั่นให้สารละลายแยกชั้นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วดูดเฉพาะสารละลายส่วนบน (aqueous phase) มาใส่ในหลอดใหม่และตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต 3 โมลาร์จำนวน 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลายผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายเอทานอลแช่เย็น 2 เท่าของสารละลายทั้งหมดปล่อยให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่ -70 องศาเซลเซียส 15 นาที ปั่นเก็บตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้

ให้แห้งและละลายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ TE 20 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดและปริมาณของซิงตีเอ็นเอที่เตรียมได้เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานโดย วิธือกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.3.2 การเตรียมดีเอ็นเอของพลาสมิดเวคเตอร์ pTrcHis A เพื่อใช้ในการโคลนนิ่ง

ตัดดีเอ็นเอของพลาสมิด pTrcHis A ที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 จำนวน 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกซ์เอ็นไซม์ *EcoRI* และ *BamHI* อย่างละ 2.5 หน่วยต่อไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายฟีนอลและคลอโรฟอร์มอย่างละ 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บั่นให้สารละลายแยกชั้นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วดูเฉพาะสารละลายส่วนบน (aqueous phase) มาใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตด 3 โมลาร์ 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลายผสมให้เข้ากันแล้วเติมเอทานอลแอมโซลูท 2 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมด ทิ้งให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที บั่นเก็บตะกอนและละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เวกเตอร์ pTrcHisA ที่ได้จะอยู่ในรูปของพลาสมิดปลายเปิด (linear formed) ที่มีปลายทั้ง 2 ข้างเป็น *EcoRI* และ *BamHI* ตามลำดับ ตรวจสอบขนาดและปริมาณของเวคเตอร์ pTrcHisA โดยวิธือกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.3.3 การเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (Ligation)

นำซิงตีเอ็นเอ den3E ที่เตรียมได้จากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ *BamHI* และ *EcoRI* จากข้อ 4.3.1 และดีเอ็นเอของพลาสมิด pTrcHis A ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *BamHI* และ *EcoRI* เช่นกันจากข้อ 4.3.2 มาเชื่อมต่อกันในอัตราส่วนของ pTrcHisA ต่อ den3E เท่ากับ 1 ต่อ 2 ของปริมาณดีเอ็นเอมีหน่วยเป็นนาโนกรัม ดัดแปลงวิธีจาก Maniatis (1982) ในสารละลายปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยเอ็นไซม์ T4 DNA ligase จำนวน 0.5 ไมโครลิตร (3 หน่วยต่อไมโครลิตร) สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอ็นไซม์ T4 DNA ligase (10x) 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปทำทรานสฟอร์มเมชัน

4.4 การทำทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation)

ตามวิธีที่เสนอโดย Mandel and Higa (1970) และ Cohen et.al. 1972) เพื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของ *Escherichia coli* ประกอบด้วย

4.4.1 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านให้มีความพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอได้ง่าย (Competent Cell)

เลี้ยงเซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ในอาหารเหลวสูตร LB 5 มิลลิลิตรในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น ดูดเซลล์ตั้งต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในอาหารเหลว LB 200 มิลลิลิตร เลี้ยงด้วยการเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนเมตร(A600) ได้ประมาณ 0.6 แซ่ขวดที่เลี้ยงเชื้อในน้ำแข็งนาน 30 นาที ถ่ายใส่หลอดปั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ บั่นเก็บเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แขนวลอยเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ที่แซ่เย็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แซ่หลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บั่นเก็บเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และนำเซลล์มาแขวนลอยใน 5 มิลลิลิตรของสารละลายแซ่เย็นแคลเซียมคลอไรด์ที่มีกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแบ่งออกใส่ในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และแช่อยู่ในน้ำแข็งหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทำทรานสเฟอร์เมชันต่อไป

4.4.2 การทำทรานสเฟอร์เมชัน

นำส่วนผสมของสารปฏิภิกิริยาที่ทำการต่อเชื่อมระหว่างพลาสมิด pTrcHisA และซันติเอ็นเอ den3E ที่ได้จากข้อ 4.3.3 เดิมลงในเซลล์ *Escherichia coli* ที่ถูกทำให้ผนังเซลล์มีความพร้อมในการรับดีเอ็นเอได้ง่าย (competent cells) 100 ไมโครลิตร(จากข้อ 4.4.1) แช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทันทที่เป็นเวลา 1 นาที ก่อนจะแล้วนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งอีก 5 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลวสูตร LB 900 ไมโครลิตรบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง บั่นให้เซลล์ตกตะกอนและแขวนลอยเซลล์ใน 100 ไมโครลิตร LB จากนั้นจึงนำไปเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เสริมด้วยยาแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

4.5 การคัดเลือกโคลน *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E ทำได้ 2 วิธีคือ

4.5.1 การคัดเลือกโคลนโดยวิธี โคลนพีซีอาร์ (Colony PCR)

นำ *Escherichia coli* แต่ละโคลนที่ได้จากข้อ 4.4.2 ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร ไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที ก่อนนำไปบ่มที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสขึ้นมา 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบใส่ลงไปในหลอดใหม่ เดิมส่วนผสมของสารละลาย 23 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย น้ำกลั่น 17.4 ไมโครลิตร, สารละลายบัฟเฟอร์ 10x buffer II 2.5 ไมโครลิตร, สารละลาย dNTP 10 มิลลิโมลาร์ 0.5 ไมโครลิตร, สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ 1.5 ไมโครลิตร, พรายเมอร์ den3E(R) 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, พรายเมอร์ den3E(L) 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ Tag DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร และหยดน้ำมัน 20 ไมโครลิตร เพื่อปกคลุมผิวหน้าของสารละลาย ใส่หลอดทดลองในเครื่องทำพีซีอาร์ โดยตั้งเครื่องให้ทำงานของอุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในขั้นตอนของการทำ RT-PCR (ข้อ 4.1.4) จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เพื่อตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้เทียบกับขนาดของยีน E

4.5.2 การคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม (pTrcHisA/den3E) จาก *Escherichia coli* โดยการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อย (Minipreparation) และย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมเพื่อดูขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* ที่ได้จากข้อ 4.4.2 แต่ละโคโลนีลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มียาแอมพิซิลิน 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 12-18 ชั่วโมง บั่นเก็บเซลล์ *Escherichia coli* ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ถ่ายตะกอนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมสารละลาย Solution I ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที เติมสารละลาย Solution II ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆโดยการพลิกหลอดอย่างช้าๆ แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที และเติมสารละลาย Solution III ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดให้เข้ากันจนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที บั่นทิ้งตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนน้ำใสมาเก็บไว้ในหลอดใหม่ และสกัดด้วยสารละลายฟีนอลและคลอโรฟอร์ม 1 ครั้ง ก่อนที่จะตกตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย สารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และละลายดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ TE หรือน้ำกลั่น

จากนั้นตัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนนิ่งคือ *Bam*HI และ *Eco*RI แยกชิ้นดีเอ็นเอของ den3E ขนาด 1.2 กิโลเบส และเวกเตอร์ pTrcHis ขนาด 4.4 กิโลเบส ออกจากกันโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E จะต้องมีแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ชิ้นอยู่ในหลุมเดียวกัน ขณะที่โคลนซึ่งมีแต่เวกเตอร์ pTrcHisA จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 4.4 กิโลเบสเท่านั้น

4.6 การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E จาก *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม (pTrcHis/den3E) โดยการเหนี่ยวนำด้วย Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)

เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม (pTrcHisA /den3E) ในอาหารเหลว LB ที่มียาแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจาง 1 ใน 10 เท่าของเชื้อเริ่มต้น ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่เติมยาแอมพิซิลิน เลี้ยงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนวัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A600) ให้ได้ค่าประมาณ 0.6 ถึง 0.8 เติมสารละลาย IPTG จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ 6H-D3E และเลี้ยงเชื้อต่อไปอีก 3 ชั่วโมง ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์หนึ่งครั้งด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) และแขวนลอยเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS 1 ใน 50 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การแยกโปรตีน 6H-D3E ออกจากโปรตีนอื่นๆของ *Escherichia coli*

4.7.1 การแยกโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำจากเซลล์ *Escherichia coli*

นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 4.6 มาทำให้เซลล์แตกโดยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) จากนั้นปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 20 นาที แยกเก็บส่วนตะกอน (pellet) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein) นำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 6M guanidine lysis buffer พีเอช 8.0 (NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, guanidine-HCl 6 โมลาร์, NaCl 100 มิลลิโมลาร์) จำนวน 1 ใน 50 เท่าของปริมาณเริ่มต้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที บั่นแยกเศษตะกอนปนเปื้อนออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส สารละลายโปรตีนที่ได้นี้เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี immobilized metal affinity chromatography เพื่อแยกโปรตีนรีคอมบิแนนต์ 6H-D3E ออกจากโปรตีนอื่นๆของเซลล์ *Escherichia coli*

4.7.2 การแยกรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

รีคอมบิแนนต์โปรตีนจะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินที่จับกับโลหะโคบอลต์ (cobalt immobilized resin) (TALONTM จากบริษัท CLONTECH Laboratories, Inc., USA.) โดยอาศัยคุณสมบัติในการจับกันอย่างจำเพาะของกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัวทางปลายด้านอะมิโนของโปรตีน 6H-D3E กับโลหะโคบอลต์ (Co^{2+}) บนเรซิน ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีดังต่อไปนี้

นำเรซินที่แขวนลอยในสารละลายเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บั่นที่ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และดูดเอาส่วนน้ำใส่ทิ้งไป จะได้ปริมาณเรซินประมาณ 1 มิลลิลิตร เติม 5 มิลลิลิตรของสารละลาย 6M guanidine lysis buffer พีเอช 8.0 (NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, guanidine-HCl 6 โมลาร์, NaCl 100 มิลลิโมลาร์) ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที บั่นเอาเฉพาะเรซินและนำมาผสมกับสารละลายโปรตีนที่ได้จากข้อ 4.7.1 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเพื่อให้โปรตีนจับกับเรซินทิ้งไว้ 30 นาที นำไปบั่นที่สภาวะเดียวกัน ล้างเรซินด้วย 5 มิลลิลิตรของสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 (NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, urea 8 โมลาร์, NaCl 100 มิลลิโมลาร์) นาน 5 นาที 2 ครั้ง นำเรซินที่ได้ไปบรรจุในคอลัมน์ขนาด 2 มิลลิลิตรที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร และล้างเรซินในคอลัมน์ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 จำนวน 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 8M urea wash buffer พีเอช 7.0 (NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์, urea 8 โมลาร์, NaCl 100 มิลลิโมลาร์) จากนั้นชะโปรตีน 6H-D3E ที่จับอยู่กับเรซินออกด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 (NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์, urea 8 โมลาร์, NaCl 100 มิลลิโมลาร์, MES 20 มิลลิโมลาร์) เก็บสารละลายที่ได้จากการชะหลอดละ 10 หยดหรือประมาณ 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่

280 นาโนเมตร ของโปรตีนแต่ละหลอดที่เก็บได้ และนำไปแยกใน SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน 6H-D3E

4.8 การกำจัดยูเรียออกจากสารละลายของโปรตีนบริสุทธิ์

รวมสารละลายโปรตีนในหลอดที่มีปริมาณโปรตีนสูงเข้าด้วยกัน และทำการไดอะไลซ์เพื่อกำจัดยูเรียออกจากสารละลายโปรตีน โดยใช้สารละลายโปรตีนลงในถุงไดอะไลซิสมัดให้แน่น แล้วแช่ถุงในสารละลายบัฟเฟอร์ 500 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วย urea 5 โมลาร์, NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์, NaCl 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เปลี่ยนบัฟเฟอร์ใหม่ที่มีความเข้มข้นของสารละลายยูเรียลดลงเหลือ 2.5 โมลาร์ จำนวน 1 ลิตร แช่ทิ้งไว้อีก 1 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่มียูเรียเลยจำนวน 1 ลิตร แต่เติมสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ 12-16 ชั่วโมง โดยทุกขั้นตอนจะทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมสารละลายกลีเซอรอลลงในโปรตีนที่ผ่านการไดอะไลซ์แล้ว โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ในอุณหภูมิ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.9 การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้โดยใช้ Protein Assay Dye Reagent Concentrate (บริษัท Bio-Rad, USA) โดยเจือจางสารละลายสี (dye reagent) 1 ส่วนในน้ำกลั่น 4 ส่วน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผสมสารละลายตัวอย่างที่จะต้องการวัดปริมาณโปรตีน 50 ไมโครลิตรกับสารละลายสีเจือจาง 2.5 มิลลิลิตรให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 0.2 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นโปรตีนมาตรฐาน

4.10 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนต์โปรตีน

4.10.1 การศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนต์โปรตีนโดยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การศึกษาขนาดโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ใช้ polyacrylamide gel ที่ประกอบด้วย Resolving gel 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวกข้อ 6.7) และ Stacking gel 3.85 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวกข้อ 6.8) นำตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทดสอบใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสี 4xRSB (Tris-HCl 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.8, sodium dodecyl sulphate 8 เปอร์เซ็นต์, เมอร์แคปโตเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์, กลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์, โบรโมฟินอลบลู 0.02 เปอร์เซ็นต์) แล้วต้มให้เดือดนาน 5 นาที นำตัวอย่างที่ได้หยอดลงในแต่ละหลุมละ 10 ไมโครลิตร ตั้งเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสในแนวตั้ง เติมสารละลาย 1xrunning buffer และเปิดกระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไป

ในเครื่อง 150 โวลต์ จนกว่าสีโบรโมฟีนอลบลูจะตกลงไปยังด้านล่างของเจล จึงปิดเครื่องแล้ว
แกะแผ่นเจลออกนำเจลที่ได้ไปย้อมโปรตีน โดยวิธีโครแมสซิบลู หรือ Western blot

4.10.2 ย้อมโปรตีนโดยสีโครแมสซิบลู

นำเจลที่ผ่านอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วจากขั้นตอนในข้อ 4.10.1 ตัดส่วน stacking gel ทิ้ง
และนำ resolving gel ย้อมด้วยน้ำยาย้อมสีโครแมสซิบลูประกอบด้วย Coomassie Brilliant Blue
R-250 เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์, กรดซिटริก 10 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายเมทานอล 45
เปอร์เซ็นต์ นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างสีออกหลายๆครั้งด้วยน้ำยา destain (กรดแอสซิติค
10 เปอร์เซ็นต์ และ สารละลายเมทานอล 30 เปอร์เซ็นต์) จนกระทั่งเจลสะอาดจะเห็นแถบ
โปรตีนปรากฏขึ้น

4.10.3 การย้อมโปรตีนโดยวิธี Western blot

หลังจากผ่านขั้นตอนอิเล็กโทรโฟรีซิส ในข้อ 4.10.1 แล้ว ย้ายโปรตีนจากเจลลงบนแผ่น
ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน โดยใช้เครื่อง Semi-dry blotter ผ่านกระแส
ไฟฟ้าลงไปในเครื่อง 0.8 มิลลิแอมป์ต่อตารางเซนติเมตร นาน 1 ชั่วโมง ตัดเมมเบรนบริเวณที่
เป็นแถบโปรตีนมาตรฐานย้อมด้วยสารละลาย destain ที่ใช้แล้ว 5 นาที แล้วล้างออกด้วย
สารละลาย destain ใหม่ ส่วนเมมเบรนที่เหลือแช่ลงในสารละลาย blocking buffer (นมพร่องมัน
เนย 5 กรัม ในสารละลาย PBS 100 มิลลิลิตร) นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยสาร
ละลาย PBS แต่ละครั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วย้อมเมมเบรนในสารละลายแอนติบอดีจำเพาะ (first
antibody) ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อยีนส่วนเปลือกหุ้ม (Mab) หรือ ซีรัมรวมของผู้ป่วย
ใช้เลือดออก(PCS) เจือจาง 1 ต่อ 1000 ในสารละลาย blocking buffer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12
ถึง 16 ชั่วโมงสำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี และ 1 ถึง 2 ชั่วโมงสำหรับซีรัมรวมของผู้ป่วยใช้
เลือดออก หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย PBS โดยแต่ละครั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นแช่
เมมเบรนต่อในสารละลายเจือจาง 1:1000 ของ rabbit anti-mouse immunoglobulin ที่ติดฉลาก
ด้วย HRP สำหรับ first antibody ที่เป็นโมโนโคลนอล หรือ rabbit anti-human
immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วย HRP สำหรับ first antibody ที่เป็นซีรัมรวมของผู้ป่วยใช้เลือด
ออก เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้าง 3 ครั้งตามวิธีด้านบน แช่เมมเบรนลงในสารละลาย
สับสเตรทที่ประกอบด้วย 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) ต่อ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ต่อ สาร
ละลายนิเกิลคลอไรด์ 8 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อ 2 ไมโครลิตร ต่อ 5 ไมโครลิตร
ตามลำดับ เป็นเวลา 5 นาที ในที่มืดแล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น โปรตีนที่จำเพาะกับแอนติบอดี
จะปรากฏเป็นแถบสีดำขึ้นมา

4.10.4 การย้อมโปรตีนโดยวิธี Dot enzyme immunoassay (DEIA)

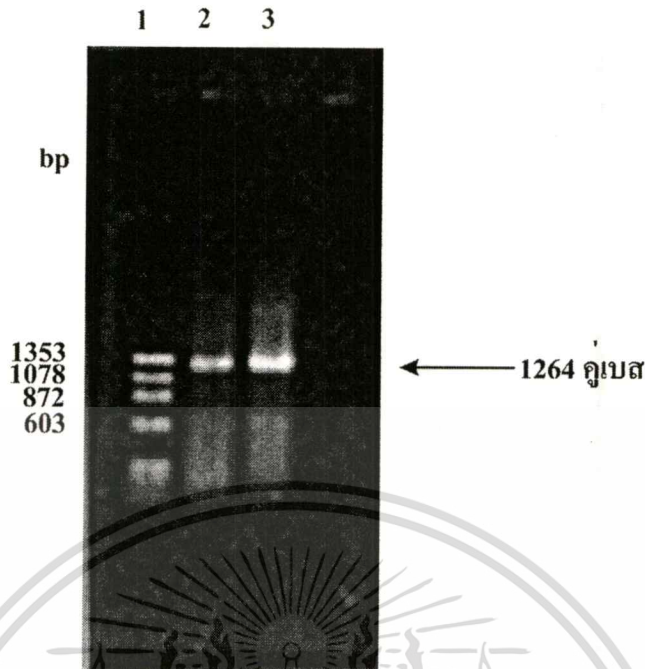
ทำการเจือจางปริมาณโปรตีน 6H-D3E ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆกันด้วยน้ำกลั่น และหยด (dot) ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 2 ไมโครลิตรต่อ 1 หยด เริ่มตั้งแต่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 นาโนกรัม ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วแช่ลงในสารละลาย blocking buffer นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย PBS แต่ละครั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วย้อมเมมเบรนในซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกหรือ ซีรัมรวมของคนปกติที่เจือจาง 1 ต่อ 1000 ในสารละลาย blocking buffer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ถึง 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย PBS โดยแต่ละครั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นแช่เมมเบรนต่อในสารละลาย rabbit anti-human immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วย HRP เจือจาง 1ต่อ1000 ในสารละลาย blocking buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้าง 3 ครั้งตามวิธีด้านบนแช่เมมเบรนลงในสารละลาย สับสเตอร์ท ที่ประกอบด้วย 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) ต่อ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ต่อ สารละลายนิเกิลคลอไรด์ 8 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อ 2 ไมโครลิตร ต่อ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 5 นาที ในที่มีดแล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบความเข้มของจุดโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆเทียบกับระหว่าง ซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและซีรัมรวมของคนปกติ

บทที่ 5

ผลการทดลอง

5.1 การเพิ่มจำนวนยีนส่วนเปลือกหุ้ม (den3E) ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87

ได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 จากน้ำเลี้ยงเซลล์ไวรัส เพื่อใช้เป็นอาร์เอ็นเอต้นแบบในการเตรียมชิ้นส่วนของยีนส่วนเปลือกหุ้ม (den3E) โดยวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ พรายเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนส่วนเปลือกหุ้มคือ พรายเมอร์ den3E(L) ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับนิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 21 และ den3E(R) ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับเบสคู่สมที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1210 ถึง 1228 ของยีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกี 3 สายพันธุ์ H87 ดังแสดงในรูปที่ 5.1 เมื่อทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยวิธี RT-PCR จะได้พีซีอาร์โปรดักส์ คือ den3E ซึ่งครอบคลุมส่วนของยีนส่วนเปลือกหุ้มตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 1227 (กรดอะมิโนที่ 1-409) จากการตรวจสอบขนาดของพีซีอาร์โปรดักส์ den3E เปรียบเทียบกับชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ผลดังรูปที่ 5.2 พบว่ายีน den3E ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเอนไซม์ Elongase มีขนาดเท่ากับ den3E ที่ได้จาก Taq DNA polymerase คือ ประมาณ 1.2 กิโลเบส (แถวที่ 2 และ 3) ประกอบด้วยส่วนของยีนส่วนเปลือกหุ้ม 1,227 คู่เบส ซึ่งจะรวมส่วนของเรสตรિકชันเอนไซม์ (restriction site) ที่ปลาย 5' และ 3' ของพีซีอาร์โปรดักส์ 37 คู่เบสด้วย (รวมทั้งหมดเท่ากับ 1,264 คู่เบส) จากนั้นทำการแยกพีซีอาร์โปรดักส์ den3E ที่ได้จากเอนไซม์ Elongase ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป (QIA quick PCR purification kit) เพื่อนำมาเตรียมโคลนนิ่งเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก (pTrcHisA) ต่อไป



รูปที่ 5.2

แสดงชิ้นส่วนของยีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 (den3E) ขนาด 1,264 คู่เบสที่ได้จากการทำ RT-PCR แยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบนวุ้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยสีเอทิดียมโบรไมด์

แถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ϕ x174 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hae*III (ϕ x174/*Hae*III)

แถวที่ 2 คือ ชิ้นส่วนของยีน den3E ที่ถูกเพิ่มจำนวนโดยเอนไซม์ Taq DNA polymerase

แถวที่ 3 คือ ชิ้นส่วนของยีน den3E ที่ถูกเพิ่มจำนวนโดยเอนไซม์ *Elongase*

5.2 การเตรียมยีนส่วนเปลือกหุ้มไวรัสตั้งที่ซีโรทัยป์ 3 และเวกเตอร์ pTrcHisA

ในการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ den3E (ที่ได้จากการทำ RT-PCR โดยเอนไซม์ Elongase) ก่อนนำไปโคลนเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีน (pTrcHisA) ได้ทำการย่อยปลาย 5' และ 3' ของยีน den3E เพื่อให้เป็นดีเอ็นเอปลายเหนียว (cohesive end) พร้อมทั้งจะไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ดีเอ็นเอ pTrcHisA ได้ ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ตัว คือ *Bam*HI และ *Eco*RI จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยปลายดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์คือ ดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ต่อเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI อย่างละ 2.5 หน่วย บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง รูปที่ 5.3 แสดงการตรวจสอบขนาดของยีน den3E หลังจากการย่อยปลายด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนวุ้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส (แถวที่ 3) เท่ากับยีน den3E ซึ่งเป็นพีซีอาร์โปรดักส์ก่อนนำมาย่อย แสดงให้เห็นว่าภายในยีน den3E ไม่มีลำดับเบสของ *Bam*HI และ *Eco*RI และเอนไซม์ทั้ง 2 นี้จะย่อยเฉพาะปลายของพีซีอาร์โปรดักส์เท่านั้นแต่ไม่ได้เข้าไปย่อยภายในยีน den3E ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยปลายนี้ จะถูกเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะคือ pTrcHisA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI เช่นกันซึ่งมีขนาด 4.4 กิโลเบส (แถวที่ 2)

5.3 การโคลนยีน den3E เข้าในเวกเตอร์ pTrcHis A

ในการเชื่อมต่อยีน den3E และเวกเตอร์ pTrcHisA ที่ตำแหน่งของ *Bam*HI และ *Eco*RI เปรียบเทียบกับการต่อเชื่อมเฉพาะเวกเตอร์ pTrcHisA อย่างเดียวที่ตำแหน่ง *Bam*HI และ *Eco*RI ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ดังมีรายละเอียดของวิธีการในบทที่ 4 ข้อ 4.3.3 และ ทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมนั้นเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α (competent cells) จากการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง LB ที่เสริมด้วยยาแอมพิซิลินแล้วพบว่าจานเลี้ยงเชื้อ (plate) ที่มีเวกเตอร์ pTrcHisA/den3E จะพบโคโลนีสีขาวมากกว่า 400 โคโลนี ส่วนจานเลี้ยงเชื้อที่มีแต่เวกเตอร์ pTrcHisA อย่างเดียว ซึ่งใช้เป็นการทดลองทรานสฟอร์มเมชันชุดควบคุม จะพบโคโลนีสีขาวประมาณ 100 โคโลนี แสดงว่าในการทำทรานสฟอร์มเมชันจะมีทั้งทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีพลาสมิด pTrcHis/den3E และเวกเตอร์ pTrcHis ปนกันอยู่ในจานเลี้ยงเชื้ออย่างน้อยในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 หลังจากนั้นทำการสุ่มดีเอ็นเอที่ได้จากจานเลี้ยงเชื้อที่มีเวกเตอร์ pTrcHisA/den3E เพื่อทำการคัดเลือกเฉพาะโคลน *Escherichia coli* (pTrcHis/den3E)



รูปที่ 5.3

แสดงชิ้นส่วนของเวกเตอร์ pTrcHisA และชิ้นส่วนเปลือกหุ้มไวรัสแดงที่ซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 (den3E) ที่ถูกย่อยปลายด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI

แถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ phage ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hind*III (λ -DNA/*Hind*III)

แถวที่ 2 คือ เวกเตอร์ pTrcHisA ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI และ *Eco*RI ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 4.4 กิโลเบส

แถวที่ 3 คือ ชิ้นส่วนของยีน den3E ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI และ *Eco*RI มีขนาด ประมาณ 1.2 กิโลเบส

แถวที่ 4 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ϕ x174 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hae*III (ϕ x174/*Hae*III)

ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานในหน่วยของคู่เบสแสดงไว้ทางด้านซ้ายสุดและขวาสุดของรูป

5.4 การคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม

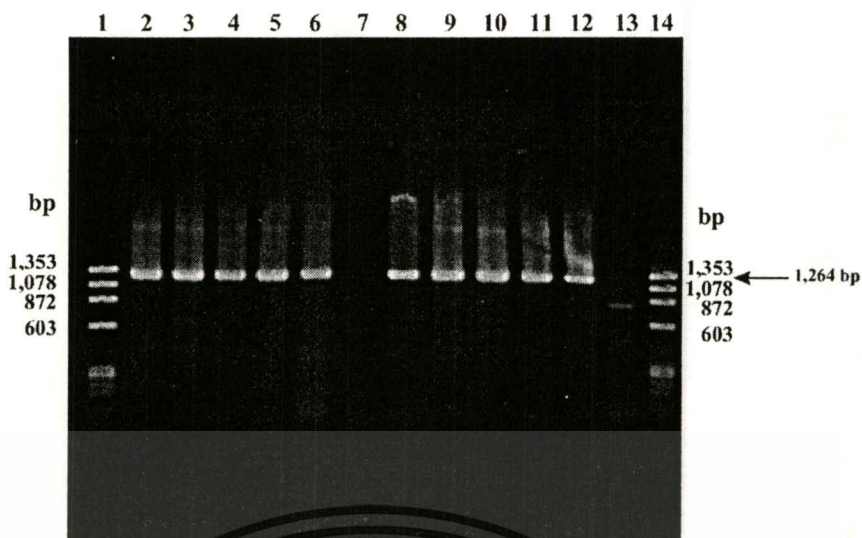
เนื่องจากโคลน *Escherichia coli* ในจานเลี้ยงเชื้อของ pTrcHis/den3E อาจจะมีบางโคลนที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอของ den3E แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTrcHis แต่มีการเชื่อมต่อกันเองของเวกเตอร์ pTrcHis ที่มีการตัดปลายข้างใดข้างหนึ่งซึ่งไม่สมบูรณ์ เมื่อใส่สารปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ T4 DNA ligase จึงต้องทำการคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E ซึ่งทำได้ 2 วิธีดังนี้

5.4.1 การคัดเลือกโคลนโดยวิธีพีซีอาร์

ในการคัดเลือกโคลน *Escherichia coli* ที่ได้จากการทำทรานสฟอร์มเมชันจำนวน 10 โคลน เพื่อให้ได้เฉพาะ *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHisA/den3E โดยวิธีโคลนพีซีอาร์ ดังมีรายละเอียดของวิธีในบทที่ 4 ข้อ 4.5.1 ให้ผลดังรูปที่ 5.4 โดยมี *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิด pGEM-T/den3E เป็น positive control (แถวที่ 2) และ *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิด pTrcHisA เป็น negative control (แถวที่ 13) พบว่ามี *Escherichia coli* จำนวน 9 โคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHisA/den3E โดยจะให้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส (แถวที่ 3 ถึง 6 และ 8 ถึง 12) ซึ่งเป็นยีน den3E เช่นเดียวกับ positive control และมี 1 โคลนที่ไม่มี pTrcHisA/den3E (แถวที่ 7)

5.4.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อยและทำการย่อยเพื่อศึกษาแถบดีเอ็นเอ

นำทรานสฟอร์มเม้นท์ที่ให้ผลบวกจากการคัดเลือกโดยวิธีพีซีอาร์ มาทำการยืนยันผลซ้ำโดยการนำทรานสฟอร์มเม้นท์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอลูกผสม ด้วยวิธีสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อย (Miniprep) ในบทที่ 4 ข้อ 4.5.2 และทำการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการโคลนยีน den3E เข้าในเวกเตอร์ pTrcHisA พบว่าโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E จะมีแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้นคือ ดีเอ็นเอ den3E ขนาด 1.2 กิโลเบส และเวกเตอร์ pTrcHisA ขนาด 4.4 กิโลเบสอยู่ในแถวเดียวกันดังรูปที่ 5.5 (โคลนที่ 6, 9, 17, 70, 74, 72, 77, 79) ขณะที่โคลนที่มีแต่เวกเตอร์ pTrcHisA จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 4.4 กิโลเบสเท่านั้น (โคลนที่ 7, 8, 10, 16, 18, 69, 71, 73, 75, 76, 78, 80)



รูปที่ 5.4

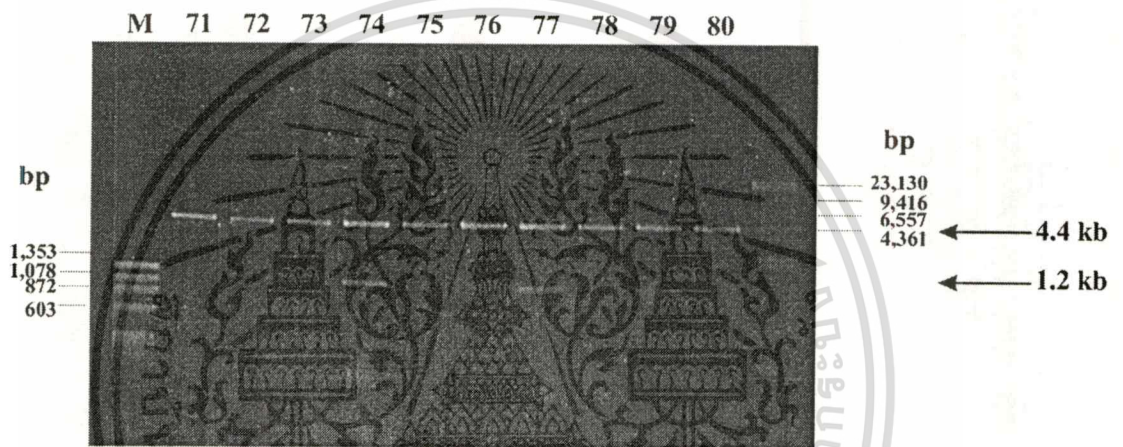
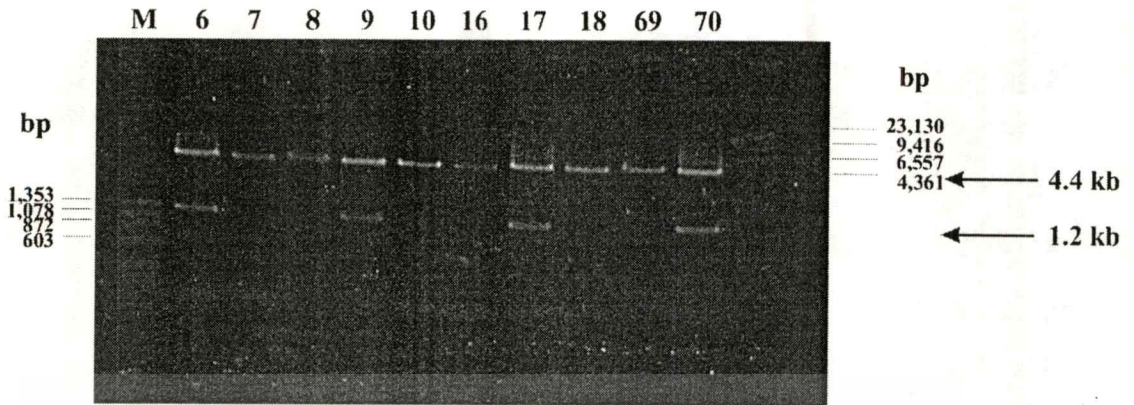
แสดงตัวอย่างการคัดเลือกโคลน *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E โดยวิธีพีซีอาร์ด้วยพรายเมอร์ den3E(L) และ den3E(R) โดยจะได้พีซีอาร์โปรดักส์คือ den3E ขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส แยกดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 2 เปอร์เซ็นต์ วันอะกาโรสแล้วย้อมสีด้วยเอทิดีเอ็มโบรไมด์

แถวที่ 1 และ 14 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ϕ x174 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ HaeIII (ϕ x174/HaeIII)

แถวที่ 2 คือ ปฏิกริยาพีซีอาร์ที่ได้จาก *E.coli* ที่มีพลาสมิด pGEM/den3E

แถวที่ 3 ถึง 12 คือ ปฏิกริยาพีซีอาร์ที่ได้จาก *E.coli* โคลนที่ 1 ถึง 11 ที่ได้จากการทำทรานสฟอร์มเมชัน

แถวที่ 13 คือ ปฏิกริยาพีซีอาร์ที่ได้จาก *E.coli* ที่มีพลาสมิด pTrcHisA



รูปที่ 5.5

แสดงตัวอย่างการคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E โดยการสกัดพลาสมิดลูกผสม และทำการตัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาแถบดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *BamHI* ได้ชิ้นเวกเตอร์ขนาด 4.4 กิโลเบสและยีน den3E ขนาด 1.2 กิโลเบส

แถว M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ϕ x174 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *HaeIII* (ϕ x174/*HaeIII*)

ตัวเลขด้านบนแสดงหมายเลขของโคลน *E.coli* ที่นำมาตรวจสอบ

5.5 การตรวจสอบการแสดงออกของพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E

5.5.1 การเหนี่ยวนำให้ *Escherichia coli* (pTrcHis/den3E) สร้างโปรตีน 6H-D3E

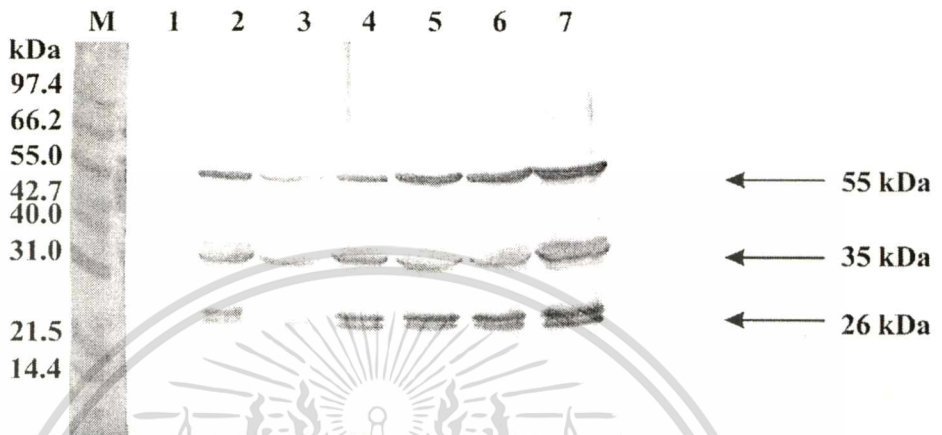
จากการนำโคลนที่คัดเลือกว่ามีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E มาเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อเจริญถึงระยะ mid log phase หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้ ประมาณ 0.6 ถึง 1 แล้วจึงเติมสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์ ได้ผลดังรูปที่ 5.6 (แถวที่ 2, 4, 5, 6, 7) เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้เติมสารละลาย IPTG (แถวที่ 1 และ 3) และเลี้ยงต่อไปอีก 3 ชั่วโมงจึงเก็บเซลล์นำมาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าใน SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นด้วยการวิเคราะห์ Western blot โดยการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกที่ได้ทำการดูดซับแอนติบอดีต่อ *Escherichia coli* มาแล้ว (*E.coli* absorbed PCS) พบว่าสารละลาย IPTG สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E ขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน ใน *Escherichia coli* ทุกโคลนที่นำมาตรวจสอบ สำหรับโปรตีนขนาดเล็ก (35 และ 26 กิโลดาลตัน) ที่ตรวจพบอาจเกิดจากกระบวนการย่อยโปรตีนขนาดใหญ่ด้วย เอนไซม์โปรติเอสบางชนิดจาก *Escherichia coli* เอง

5.5.2 การตรวจสอบคุณสมบัติการละลายน้ำของรีคอมบิแนนต์โปรตีน

จากการนำโคลนที่คัดเลือกว่ามีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E จำนวน 3 โคลน (หมายเลข 6, 9 และ 72) มาเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อเจริญถึงระยะ mid log phase หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้ ประมาณ 0.6 ถึง 1 แล้วจึงเติมสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E และเลี้ยงต่อไปอีก 3 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเซลล์และแยกโปรตีนของ *Escherichia coli* ด้วยกระแสไฟฟ้าใน SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโคลนทั้ง 3 สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E ที่มีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน ได้ดังรูปที่ 5.7 (แถวที่ 3, 6 และ 9) จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงอัลตราโซนิก (ultrasonicator) และปั่นแยกสารละลายโปรตีนจากเซลล์เป็นส่วนน้ำใสและส่วนตะกอนแล้วนำโปรตีนแต่ละส่วนมาแยกใน SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 5.7 (ก) หรือทำ Western blot รูปที่ 5.7 (ข) จากการทดลองที่ได้พบว่าโปรตีน 6H-D3E ส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของตะกอน (pellet) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein หรือ inclusion bodies) (แถวที่ 2, 5 และ 8) มากกว่าในส่วนน้ำใส (supernate) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำ (แถวที่ 1, 4 และ 7) จากการตรวจสอบโปรตีนโดยวิธี Western blot ในรูปที่ 5.7 (ข) จะพบว่าโปรตีน 6H-D3E จากโคลนที่ 9 และ 72 จะอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำมากกว่าโปรตีนที่ละลายน้ำ (แถวที่ 5 เทียบกับ 4 และแถวที่ 8 เทียบกับ 7) ขณะที่ในโคลนที่ 6 จะมีปริมาณของโปรตีน 6H-D3E ที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble) ใกล้เคียงกับโปรตีน 6H-D3E ที่ละลายน้ำ (soluble) (แถวที่ 2 เทียบกับ 1) สังเกตว่าในรูปที่ 5.7 (ก) แถวที่ 8 ปริมาณของ 6H-D3E ขนาด 55 กิโลดาลตัน ในส่วนของตะกอนโปรตีน (pellet) มีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยมากเมื่อเทียบกับโคลนอื่นๆเมื่อย้อมด้วยสีโครแมสซีบลู อาจเกิดเนื่องจากโปรตีนถูกย่อยสลายไประหว่างขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง แต่ขณะเดียวกันเมื่อนำมาทำ Western blot จะเห็นแถบโปรตีนขนาด 55 กิโลดาลตันได้ชัดเจน ดังรูปที่ 5.7 (ข) แถวที่ 8



รูปที่ 5.6

แสดงตัวอย่างการเหนี่ยวนำโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E โดยการเติมสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์ให้มีการสร้างโปรตีน และตรวจสอบโดยวิธี Western blot ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีการดูดซับแอนติบอดีต่อ *E.coli* (*E.coli* absorbed PCS)

แถวที่ 1 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 9 ไม่ได้เติมสารละลาย IPTG

แถวที่ 2 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 9 ที่เติมสารละลาย IPTG

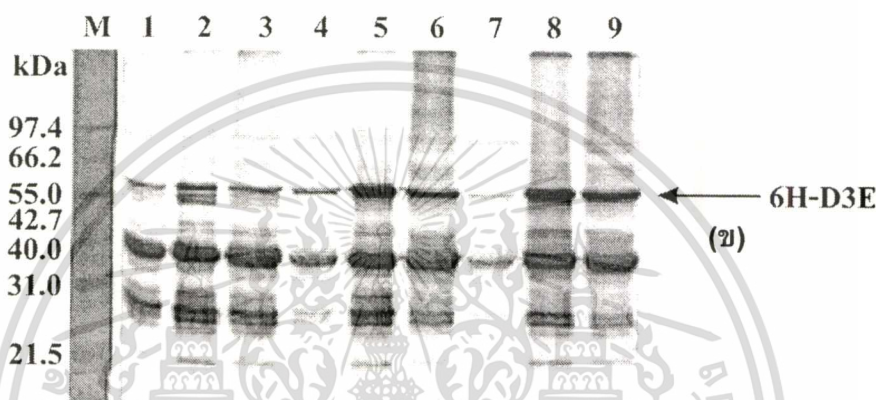
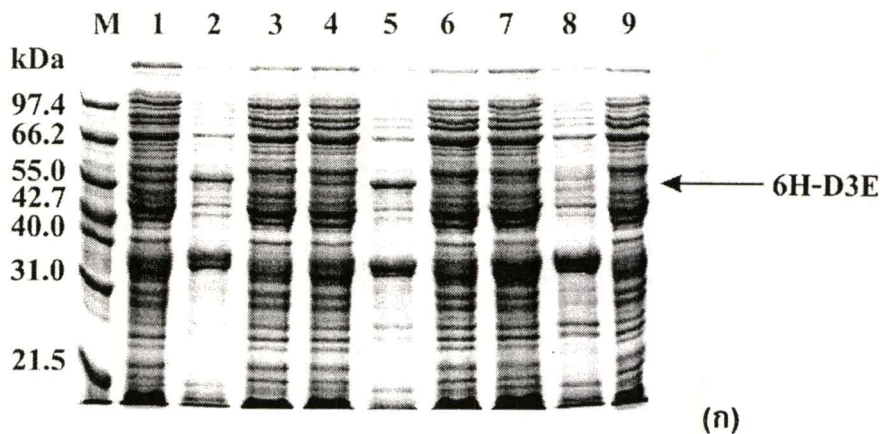
แถวที่ 3 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 6 ไม่ได้เติมสารละลาย IPTG

แถวที่ 4 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 6 ที่เติมสารละลาย IPTG

แถวที่ 5 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 9 ที่เติมสารละลาย IPTG

แถวที่ 6 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 72 ที่เติมสารละลาย IPTG

แถวที่ 7 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 79 ที่เติมสารละลาย IPTG



รูปที่ 5.7

แสดงการแยกโปรตีนของ *Escherichia coli* (pTrcHis/den3E) ที่มีการเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีน 6H-D3E ด้วยสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์และเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีน 6H-D3E ที่อยู่ในส่วนน้ำใส (supernatant) และส่วนตะกอน (pellet) หลังจากการแตกเซลล์ด้วย sonication

(ก) คือ การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์และย้อมสีโครมาตซีบลู

(ข) คือ การตรวจสอบโปรตีนด้วย Western blot โดยการทำให้ปฏิกิริยากับซีรัมรวมผู้ป่วยไข้เลือดออกที่ถูกดูดซับแอนติบอดีต่อ *E.coli*

แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน

แถวที่ 1 คือ โปรตีนส่วนน้ำใสหลังจากทำให้เซลล์ *E.coli* โคลนที่ 6 แตก

แถวที่ 2 คือ โปรตีนส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์ *E.coli* โคลนที่ 6 แตก

แถวที่ 3 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 6 ก่อนทำการแตกเซลล์

แถวที่ 4 คือ โปรตีนส่วนน้ำใสหลังจากทำให้เซลล์ *E.coli* โคลนที่ 9 แตก

แถวที่ 5 คือ โปรตีนส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์ *E.coli* โคลนที่ 9 แตก

แถวที่ 6 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 9 ก่อนทำการแตกเซลล์

แถวที่ 7 คือ โปรตีนส่วนน้ำใสหลังจากทำให้เซลล์ *E.coli* โคลนที่ 72 แตก

แถวที่ 8 คือ โปรตีนส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์ *E.coli* โคลนที่ 72 แตก

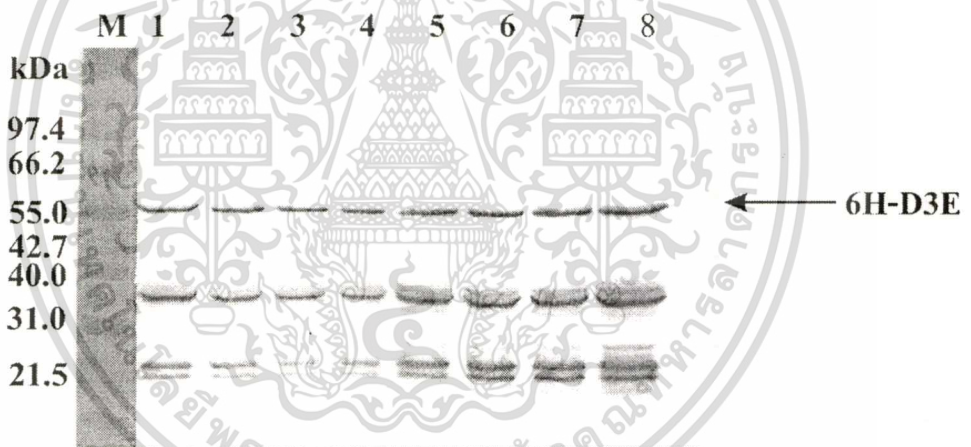
แถวที่ 9 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* โคลนที่ 72 ก่อนทำการแตกเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน 6H-D3E

หลังจากที่ทำการเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* (pTrcHis/den3E) โคลนที่ 72 ที่ 37 องศาเซลเซียสจนมีการเจริญถึงระยะ mid log phase เติมสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน จากนั้นทำการเลี้ยงต่อที่ 37 องศาเซลเซียส และเก็บเซลล์ทุกๆ ชั่วโมงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-8 นำโปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์โดยวิธี Western blot ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกที่ถูกดูดซับแอนติบอดีต่อ *Escherichia coli* มาก่อนแล้ว (*E.coli* absorbed PCS) ดังแสดงในรูปที่ 5.8 ผลการทดลองพบว่าโปรตีน 6H-D3E ที่ถูกผลิตออกมาในแต่ละช่วงเวลาหลังจากการเหนี่ยวนำจะมีปริมาณใกล้เคียงกัน ถึงแม้ว่าในช่วงชั่วโมงท้ายๆ อาจมีโปรตีนมากกว่าในช่วงต้นๆ แต่ก็ได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งถ้าคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในระหว่างการผลิตโปรตีนในระดับขยายขนาดแล้ว การเลี้ยงที่จำนวนชั่วโมงน้อยๆ ควรจะประหยัดและให้ผลผลิตต่อหน่วยที่ดีกว่า จึงได้เลือกระยะเวลาในการเก็บเซลล์ *Escherichia coli* ที่ 3 ชั่วโมง หลังจากเติมสารละลาย IPTG สำหรับการทดลองขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 5.8 โปรตีนจากเซลล์ *E.coli* (pTrcHis/den3E) ที่ได้จากการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วยสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมง และนำมาทำ Western blot ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกที่ถูกดูดซับแอนติบอดีต่อ *E.coli* (*E.coli* absorbed PCS) เจือจาง 1000 เท่า
 แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน
 แถวที่ 1 ถึง 8 คือ โปรตีน 6H-D3E ที่ได้หลังจากการเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึง 8 ตามลำดับ

5.6 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

จากการคัดเลือกโคลน *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E โดยวิธีการทำโคลนฟีซีอาร์ หรือการสกัดพลาสมิดมาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ซึ่งเป็นการตรวจหายีน den3E ใน *Escherichia coli* และการตรวจวิเคราะห์โปรตีน 6H-D3E ใน *Escherichia coli* เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG ซึ่งเป็นการตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีนพบว่าทุกโคลน *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E จะสามารถผลิตโปรตีน 6H-D3E ได้เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG แต่โปรตีน 6H-D3E จากแต่ละโคลนอาจมีปริมาณไม่เท่ากัน ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกโคลนหมายเลข 9 ซึ่งมีการผลิตโปรตีน 6H-D3E ได้มากกว่าโคลนอื่น ๆ มาใช้ในการศึกษาวิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ต่อไป

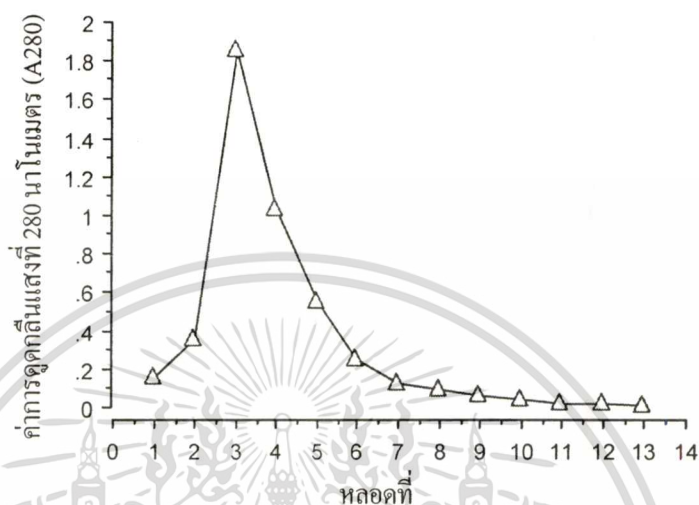
5.6.1 การแยกโปรตีน 6H-D3E ออกจากโปรตีนอื่น ๆ ที่ผลิตจาก *Escherichia coli*

เมื่อนำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่อยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 250 มิลลิลิตรมาละลายในสารละลาย 6M guanidine lysis buffer พีเอช 8.0 และผสมกับเรซิน TALON™ 1 มิลลิลิตรซึ่งเป็นโคบอลต์เรซิน (Co^{2+}) จะทำให้มีการจับกันระหว่างกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว ที่ปลายด้าน N ของรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D3E กับ Co^{2+} บนเรซิน ส่วนโปรตีนอื่นที่ไม่จำเพาะจะถูกชะออกในขั้นตอนการล้างด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 และเมื่อบรรจุเรซินที่มีโปรตีน 6H-D3E จับอยู่ลงในคอลัมน์แล้ว จะชะล้างเรซินอีกครั้งด้วยสารละลาย 8M urea wash buffer พีเอช 7.0 เพื่อกำจัดโปรตีนปนเปื้อนบางตัวที่จับอยู่กับเรซินออกไปให้ได้มากที่สุด จากนั้นโปรตีน 6H-D3E จะถูกชะออกด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 สารละลายโปรตีนที่ได้จากการชะล้างจะถูกแยกและเก็บไว้ในหลอด ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 11 หลอด และนำไปวัดปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรได้ผลดังรูปที่ 5.9 พบว่ามีโปรตีนที่ถูกชะออกมาในช่วงหลอดที่ 2 ถึง 6 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน 6H-D3E นำโปรตีนที่ได้จากแต่ละหลอดมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (2 ไมโครลิตรต่อหยด) และนำไปทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) ความเข้มข้น 1 ต่อ 1000 โดยวิธี Dot enzyme immunoassay เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีน 6H-D3E ที่บริสุทธิ์แล้วแต่ยังอยู่ในสภาวะที่โปรตีนถูกทำลายโครงสร้างธรรมชาติ (เนื่องจากยังอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของ ยูเรีย 8 โมลาร์) ให้ผลดังรูปที่ 5.10 (จุดที่ 10 ถึง 20) พบว่าในทุกหลอดที่นำมาทดสอบมีการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกได้ดีโดยเฉพาะหลอดที่ 2 ถึง 6 (จุดที่ 11 ถึง 15) ซึ่งจะมีการทำปฏิกิริยาให้สีเข้มมากที่สุด แสดงว่ามีปริมาณโปรตีนมากที่สุด และผลที่ได้นี้สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวัดที่ค่าความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (รูปที่ 5.9) ขณะเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติ (PND) ที่เจือจางเท่ากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกพบว่าโปรตีนจากแต่ละหลอดจะทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติได้น้อยมาก สังเกตว่าในจุดที่ 1 ถึง 7 ซึ่งเป็นโปรตีนตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมโปรตีนเพื่อแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

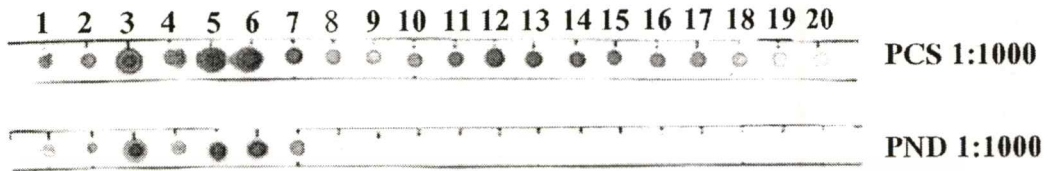
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะทำปฏิกิริยาได้ทั้งซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและซีรัมรวมของคนปกติ เนื่องจากโปรตีนเหล่านี้ยังมีส่วนของโปรตีนจาก *Escherichia coli* ปนอยู่ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติได้



รูปที่ 5.9

กราฟแสดงปริมาณโปรตีน 6H-D3E ของแต่ละหลอดที่ได้จากการชะออกจากเรซินด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 และนำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร



รูปที่ 5.10 การทำ Dot enzyme immunoassay (DEIA) ของโปรตีน 6H-D3E จากแต่ละขั้นตอนของการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบระหว่างการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) และซีรัมรวมของคนปกติ (PND) ที่เจือจาง 1000 เท่า

จุดที่ 1 เซลล์ *E.coli* (pTrcHis/den3E) ไม่ได้เติมสารละลาย IPTG

จุดที่ 2 เซลล์ *E.coli* (pTrcHis/den3E) ที่เติมสารละลาย IPTG

จุดที่ 3 ส่วนน้ำใส (supernant)

จุดที่ 4 ส่วนตะกอน (pellet)

จุดที่ 5 โปรตีนที่ไม่จับกับเรซิน (unbound protein)

จุดที่ 6 โปรตีนก่อนจับกับเรซิน

จุดที่ 7 ล้างเรซินครั้งที่ 1 ด้วยสารละลาย 8M urea wash buffer พีเอช 8.0

จุดที่ 8 ล้างเรซินครั้งที่ 2 ด้วยสารละลาย 8M urea wash buffer พีเอช 8.0

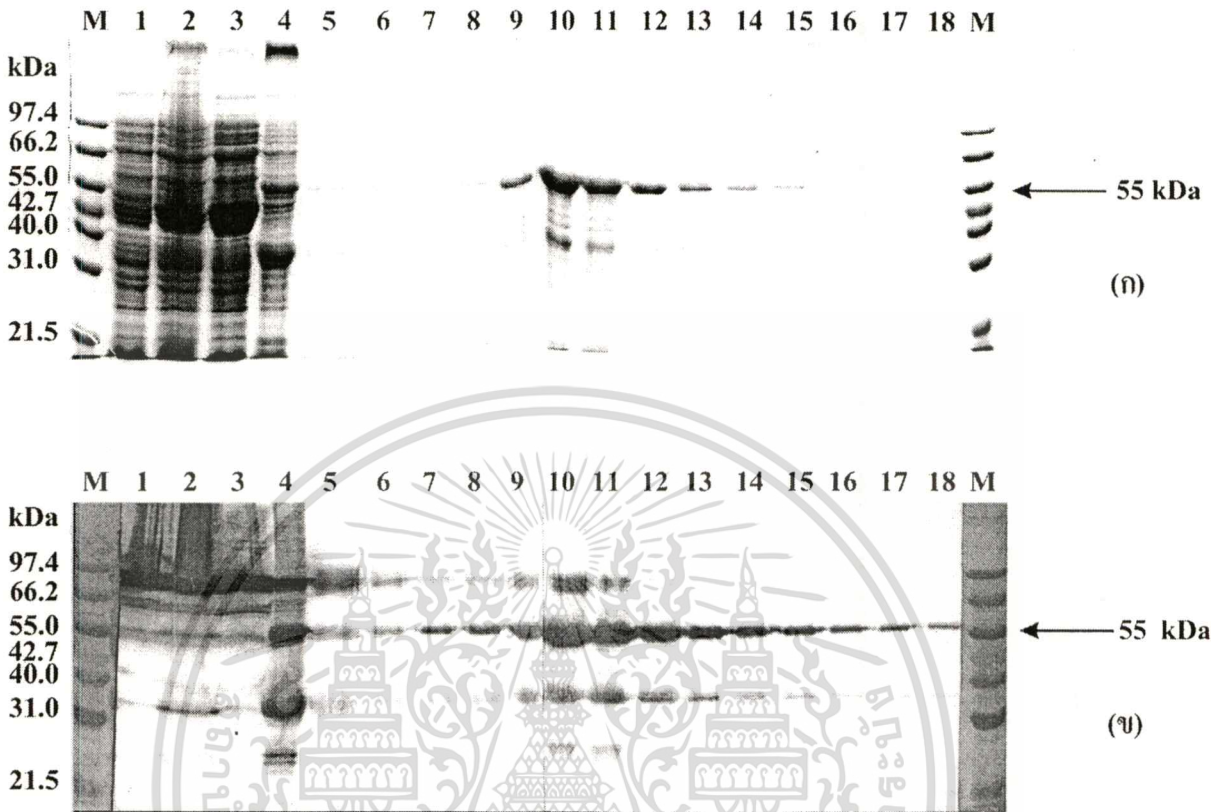
จุดที่ 9 ล้างเรซินครั้งที่ 3 ด้วยสารละลาย 8M urea wash buffer พีเอช 7.0

จุดที่ 10 ถึง 20 โปรตีนที่ถูกชะออกจากเรซินด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 หลอดที่ 1 ถึง 11

การตรวจสอบการแยกโปรตีน 6H-D3E ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Immobilized metal affinity chromatography ในขั้นตอนต่างๆโดยการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสีโครแมสซีบลู จากผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.11 (ก) พบว่าโปรตีนส่วนหนึ่งที่ไม่มีความจำเพาะกับโคบอลต์เรซินจะถูกกำจัดออกไปในขั้นตอนของการล้าง (แถวที่ 5, 6 และ 7) และโปรตีนที่ได้จากการชะด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 จะพบมากในหลอดที่ 2 ถึง 6 ซึ่งแสดงได้ในแถวที่ 9 ถึง 13 ของรูปที่ 5.11 (ก) จากรูปจะพบว่าโปรตีนขนาด 55 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน 6H-D3E และโปรตีนขนาดเล็กประมาณ 35 กิโลดาลตัน ซึ่งน่าจะเป็นส่วนของโปรตีน 6H-D3E ที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์บางอย่างในเซลล์ *Escherichia coli* (degraded 6H-D3E) หรืออาจเป็นโปรตีนปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ก็ได้เช่นกัน แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยวิธี Western blot ตามรูปที่ 5.11 (ข) พบว่าโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก คือโปรตีนขนาด 55 กิโลดาลตัน ซึ่งควรจะเป็นโปรตีน 6H-D3E และโปรตีนขนาดเล็กคือ 35 กิโลดาลตันและ 28 กิโลดาลตัน ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกได้เช่นกันซึ่งอาจเป็นโปรตีน 6H-D3E ที่ถูกย่อยซึ่งสอดคล้องกับรูปที่ 5.11 (ก) แต่จะพบว่ามีโปรตีนขนาดใหญ่ประมาณ 90 กิโลดาลตัน ซึ่งพบเฉพาะใน Western blot รูปที่ 5.11 (ข) แต่ไม่พบในการวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสีโครแมสซีบลู ซึ่งคาดว่าอาจเป็นโปรตีนปนเปื้อนจาก *Escherichia coli* ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาได้กับซีรัมของคนทั่วไป

5.6.2 การกำจัดยูเรียออกจากโปรตีน 6H-D3E และการวัดปริมาณโปรตีนบริสุทธิ์

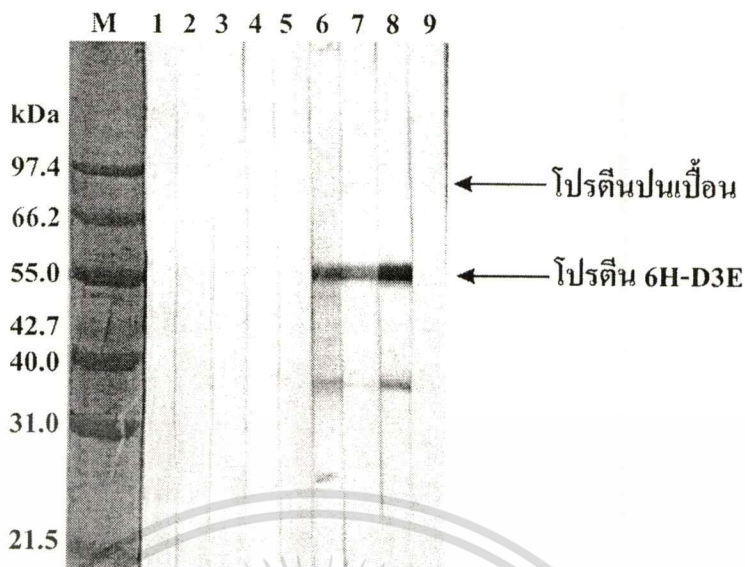
จากการรวมโปรตีนที่มีปริมาณโปรตีน 6H-D3E สูงเข้าด้วยกันหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 6 แล้วนำมาไดอะไลซ์เพื่อกำจัดเอายูเรียออกจากสารละลายโปรตีน เพื่อทำการคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติของโปรตีน (refolding) โดยจะค่อยๆลดปริมาณสารละลายยูเรียในบัฟเฟอร์ลงเป็นลำดับ จนกระทั่งไม่มีสารละลายยูเรียเหลืออยู่เลยและเติมสารละลาย TritonX-100 ความเข้มข้น 0.1% เข้าไปแทนในบัฟเฟอร์สุดท้ายของการไดอะไลซ์ ผลการทดลองพบว่าโปรตีน 6H-D3E ที่ได้หลังขั้นตอนไดอะไลซ์จะยังคงละลายได้ดีในสภาวะที่ไม่มียูเรีย โปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมได้ จะเก็บไว้ในสารละลายกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันการตกตะกอนและแช่แข็งที่ -30 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยชุดวัดโปรตีนสำเร็จรูป (Protein Assay Dye Reagent Concentrate : บริษัท Bio-Rad, USA) จะได้โปรตีนที่มีความเข้มข้น 0.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายโปรตีนทั้งหมดประมาณ 2.5 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้โปรตีนบริสุทธิ์ 6H-D3E เท่ากับ 1.575 มิลลิกรัมต่อการเลี้ยงเชื้อ 250 มิลลิลิตร หรือจะสามารถผลิตโปรตีน 6H-D3E ได้เท่ากับ 6.3 มิลลิกรัมต่อการเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร



รูปที่ 5.11 SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงขั้นตอนการแยกโปรตีน 6H-D3E จาก *E.coli* (pTrcHis/den3E) ให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธี IMAC และย้อมสีโครมาตซีบลู (ก) หรือวิธี Western blot ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกความเข้มข้น 1 ต่อ 1000 (ข) โดยการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน 6H-D3E ก่อน (แถวที่ 1) และหลังการเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์ (แถวที่ 2) เมื่อทำให้เซลล์แตกแล้วปั่นแยกเซลล์ได้เป็นส่วนน้ำใส (แถวที่ 3) และส่วนตะกอน (แถวที่ 4) หลังจากนั้นนำโปรตีนมาผสมกับเรซินแล้วทำการล้างด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 จำนวน 2 ครั้ง (แถวที่ 5 ถึง 6) ล้างซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลาย 8M urea wash buffer 8 โมลาร์ พีเอช 7.0 (แถวที่ 7) ก่อนที่จะบรรจุเรซินลงในคอลัมน์และชะโปรตีน 6H-D3E ด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 เก็บโปรตีนหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 11 หลอด (แถวที่ 8 ถึง 18)

5.7 การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนบริสุทธิ์ 6H-D3E โดยการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Western blot

จากการนำโปรตีนรีคอมบิแนนต์ 6H-D3E ที่ผ่านการกำจัดยูเรียออกแล้วมาทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 5 ชนิดที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็กที่แต่ละซีโรทัยป์ คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 1F1, 3H5, 10C10, 1H10 ซึ่งจำเพาะต่อซีโรทัยป์ 1 ถึง 4 ตามลำดับและโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4G2 ซึ่งจำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของฟลาวีไวรัส และโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 ซึ่งจำเพาะต่อโปรตีน NS1 ของไวรัสเด็กที่ เทียบกับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) ซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีการดูดซับแอนติบอดีต่อ *Escherichia coli* ก่อนนำมาใช้ (*E.coli* absorbed PCS) และซีรัมรวมของคนปกติ (PND) โดยวิธี Western blot ให้ผลดังรูปที่ 5.12 จากผลการทดลองพบว่าโปรตีน 6H-D3E จะไม่ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของทุกซีโรทัยป์แม่แต่ซีโรทัยป์ 3 เอง (แถวที่ 1-4) และไม่ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อยีนส่วน NS1 ด้วย (แถวที่ 5) แต่พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับ 4G2 ซึ่งเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อยีนส่วนเปลือกหุ้มในกลุ่มฟลาวีไวรัสได้อย่างชัดเจน (แถวที่ 6) ที่ขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตันเมื่อเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมชนิดต่างๆ พบว่าซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและซีรัมรวมของ ผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีการดูดซับแอนติบอดีต่อ *Escherichia coli* ก่อนนำมาใช้ จะทำปฏิกิริยาได้ดีกับโปรตีน 6H-D3E (แถวที่ 7, 8) ที่ขนาด 55 กิโลดาลตันเช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4G2 (แถวที่ 6) และไม่พบแถบโปรตีนขนาด 55 กิโลดาลตันของโปรตีน 6H-D3E ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติ (แถวที่ 9) จะสังเกตได้ว่ามีแถบโปรตีนขนาด 90 กิโลดาลตันปรากฏอยู่จากการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก และซีรัมรวมของคนปกติแต่แถบโปรตีนนี้จะหายไปเมื่อใช้ซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีการดูดซับแอนติบอดีต่อ *Escherichia coli* ก่อนนำมาใช้ (แถวที่ 8) ซึ่งอาจสรุปได้ว่า แถบโปรตีนขนาด 90 กิโลดาลตันนี้เป็นโปรตีนปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ที่ถูกแยกออกมาพร้อมกับโปรตีน 6H-D3E ในกระบวนการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี Immobilized metal affinity chromatography ซึ่งโปรตีนนี้สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีบางอย่างในซีรัมของคนทั่วไปได้



รูปที่ 5.12 Western blot ของโปรตีนบริสุทธิ์ 6H-D3E ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) 6 ชนิด เทียบกับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก และซีรัมรวมของคนปกติ

แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน

แถวที่ 1 คือ โมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อยีน E ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 1 (1F1)

แถวที่ 2 คือ โมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อยีน E ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 (3H5)

แถวที่ 3 คือ โมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อยีน E ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 3 (10C10)

แถวที่ 4 คือ โมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อยีน E ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 4 (1H10)

แถวที่ 5 คือ โมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อยีน NS1 ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 (1B2)

แถวที่ 6 คือ โมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อยีน E ของกลุ่มฟลาวิไวรัส (4G2)

แถวที่ 7 คือ ซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) ความเข้มข้น 1:1000

แถวที่ 8 คือ ซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีการดูดซับแอนติบอดีต่อ *E.coli* (*E.coli* absorbed PCS) ความเข้มข้น 1:1000

แถวที่ 9 คือ ซีรัมรวมของคนปกติ (PND) ความเข้มข้น 1:1000

5.8 การปรับปรุงวิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์มากขึ้น

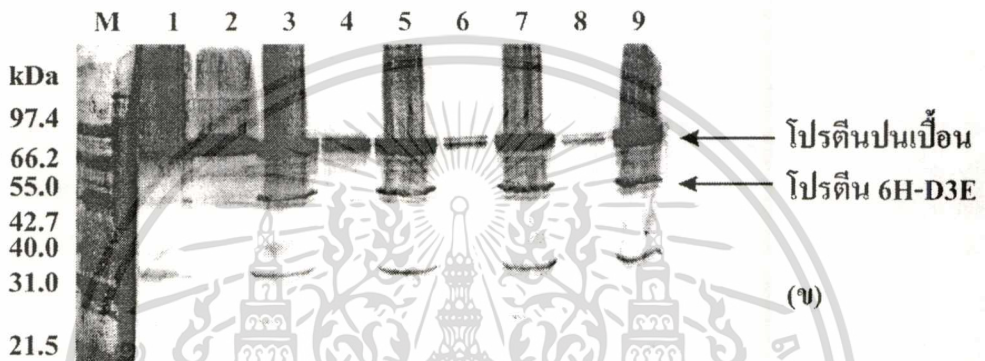
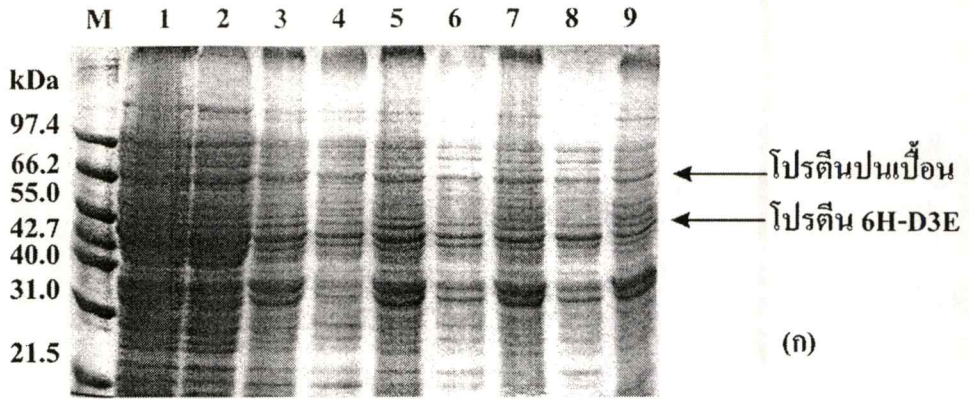
เนื่องจากโปรตีน 6H-D3E ยังมีการปนเปื้อนของโปรตีน *Escherichia coli* ขนาดประมาณ 90 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี Western blot โดยทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและซีรัมรวมของคนปกติจึงได้ศึกษาวิธีการกำจัดการปนเปื้อนในแต่ละขั้นตอนของการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้น โดยวิธีที่ปรับปรุงมีขั้นตอนมีขั้นตอนดังนี้

5.8.1 การเตรียมเซลล์ *Escherichia coli* ที่มีโปรตีน 6H-D3E ก่อนละลายในสารละลายดีเนเจอแรนท์

หลังจากที่ได้ปั่นเก็บเซลล์ *Escherichia coli* (pTrcHis/den3E) ที่เหนียวทำให้มีการสร้างโปรตีนแล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้ง และละลายตะกอนในสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ส่วนใน 50 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น นำไปทำให้เซลล์แตกโดยเครื่องแยกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง และปั่นแยกเอาส่วนของตะกอนที่มีโปรตีน 6H-D3E มาล้างโดยใช้สารละลาย lysis buffer ที่ประกอบด้วยสารละลาย Tris-HCl 0.1 โมลาร์ พีเอช 8, สารละลาย EDTA 1 มิลลิโมลาร์, สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์, TritonX-100 ความเข้มข้น 0.5% จำนวน 1 ใน 100 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเขย่าเบาๆ 10 นาที แล้วปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 4 ครั้ง เพื่อกำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ให้ได้มากที่สุด ตัวอย่างที่ได้จากการล้างในแต่ละขั้นตอนได้นำมาทำการแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก ดังที่แสดงในรูปที่ 5.13 ซึ่งจะเห็นว่าโปรตีนขนาด 90 กิโลดาลตันที่เป็นโปรตีนปนเปื้อนจะถูกกำจัดออกไปได้บางส่วน โดยจะปรากฏอยู่ที่ส่วนน้ำใส (supernatant) แทน เมื่อตรวจสอบโดยวิธี Western blot

5.8.2 การเพิ่มปริมาณของสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 เพื่อล้างโปรตีนปนเปื้อนออกจากเรซินที่จับกับโปรตีน 6H-D3E แล้ว ก่อนการชะโปรตีนออกจากเรซิน

หลังจากล้างตะกอนโปรตีนตามวิธีข้างต้นแล้ว ได้ละลายโปรตีน 6H-D3E ด้วยสารละลาย 6M guanidine HCl พีเอช 8.0 แล้วนำโปรตีนมาผสมกับโคบอลด์เรซิน (TALON™) ล้างโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ (non-specific protein) ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 ในปริมาตรที่มากกว่าเดิมคือ จาก 10 เท่าของเรซินเป็น 50 เท่าของเรซินโดยแบ่งล้างเป็น 5 ครั้ง เมื่อบรรจุเรซินลงในคอลัมน์แล้วล้างอีกครั้งด้วยสารละลาย urea lysis buffer 8 โมลาร์ พีเอช 8.0 และ 7.0 อย่างละ 1 เท่าของเรซินก่อนแล้วชะโปรตีนออกจากเรซินด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 โดยทำการแยกเก็บสารละลายโปรตีนหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และวัดปริมาณโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ได้ผลดังรูปที่ 5.14



รูปที่ 5.13

แสดงการแยกโปรตีน 6H-D3E ใน SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย สีนอร์แมสซิบลู (ก) และ Western blot (ข) ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก เจือจาง 1000 เท่า โปรตีนส่วนตะกอนของ *Escherichia coli* (pTrcHis/den3E) ได้ จากการแตกเซลล์โดยวิธี sonication และล้างส่วนตะกอนที่มีโปรตีน 6H-D3E ด้วยสารละลาย 0.5% TritonX-100 lysis buffer จำนวน 4 ครั้ง แต่ครั้งนํามานับ แยกส่วนน้ำใส และส่วนที่เป็นตะกอนจะเห็นว่า มีโปรตีนปนเปื้อนที่มีขนาด 90 กิโลดาลตันออกมาทุกขั้นตอนการล้าง

แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน

แถวที่ 1 คือ เซลล์ *E.coli* (pTrcHis/den3E) ก่อนการแตกเซลล์ด้วย sonication

แถวที่ 2 คือ ส่วนน้ำใส (supernate) ที่แยกได้หลังจากการแตกเซลล์

แถวที่ 3 คือ ส่วนที่เป็นตะกอนหลังจากการแตกเซลล์ละลายอยู่ใน lysis buffer

แถวที่ 4 คือ ส่วนที่เป็นน้ำใสหลังจากผ่านการล้างครั้งแรก

แถวที่ 5 คือ ส่วนที่เป็นตะกอนหลังจากผ่านการล้างครั้งแรกละลายใน lysis buffer

แถวที่ 6 คือ ส่วนที่เป็นน้ำใสหลังจากผ่านการล้างครั้งที่สอง

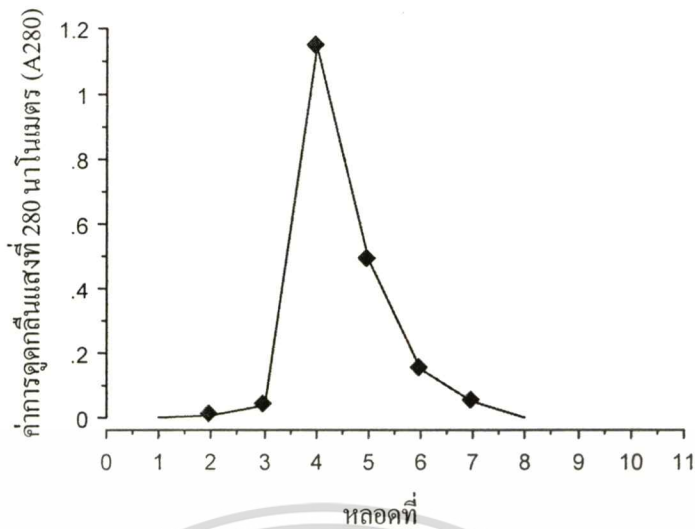
แถวที่ 7 คือ ส่วนที่เป็นตะกอนหลังจากผ่านการล้างครั้งที่สองละลายใน lysis buffer

แถวที่ 8 คือ ส่วนที่เป็นน้ำใสหลังจากผ่านการล้างครั้งที่สาม

แถวที่ 9 คือ ส่วนที่เป็นตะกอนหลังจากผ่านการล้างครั้งที่สามละลายใน lysis buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

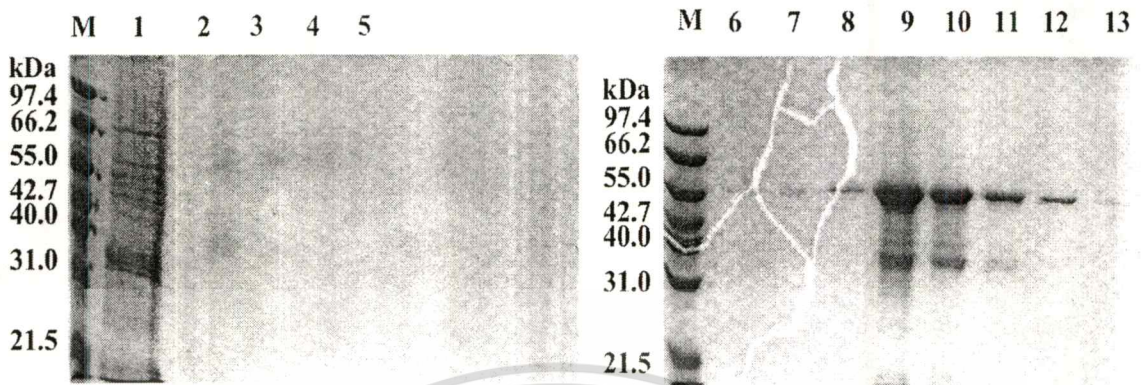


รูปที่ 5.14 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของโปรตีน 6H-D3E ที่ได้จากการชะออกจากเรซินด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 หลังจากปรับปรุงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

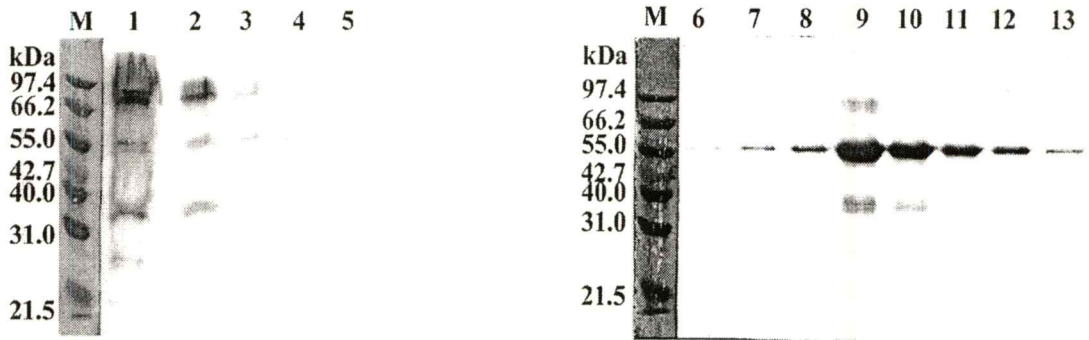
5.8.3 การตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนบริสุทธิ์ 6H-D3E ในสภาวะที่มียูเรีย

จากการนำโปรตีน 6H-D3E แต่ละหลอดที่ได้จากการชะด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยสีโครแมสซิบลู (รูปที่ 5.15) เปรียบเทียบกับ Western blot ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก และซีรัมรวมของคนปกติ (รูปที่ 5.16) และวิธี Dot enzyme immunoassay ต่อซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและซีรัมรวมของคนปกติ (รูปที่ 5.17) พบว่าได้โปรตีน 6H-D3E ขนาด 55 กิโลดาลตันและโปรตีนที่ถูกย่อยขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตันในหลอดที่ 2 ถึง 5 (แถวที่ 9 ถึง 12) ของการชะด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 เช่นเดียวกับการวัดโปรตีนด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (รูปที่ 5.14) จากการทำ Western blot ของโปรตีนแต่ละหลอดที่ผ่านการชะด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 ด้วยซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกพบว่าโปรตีน 6H-D3E ในหลอดที่ 2 ถึง 5 ทำปฏิกิริยาได้ติดตั้งรูปที่ 5.16 (ก) แถวที่ 9 ถึง 12 โดยมีโปรตีนปนเปื้อนขนาด 90 กิโลดาลตันเหลืออยู่น้อยมาก เมื่อเทียบกับการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีเดิมที่ยังไม่ได้มีการปรับปรุง รูปที่ 5.11 (ข) และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติจะไม่พบการทำปฏิกิริยากับโปรตีนใด ๆ บนแผ่นเมนเบรนเลย รูปที่ 5.16 (ข)

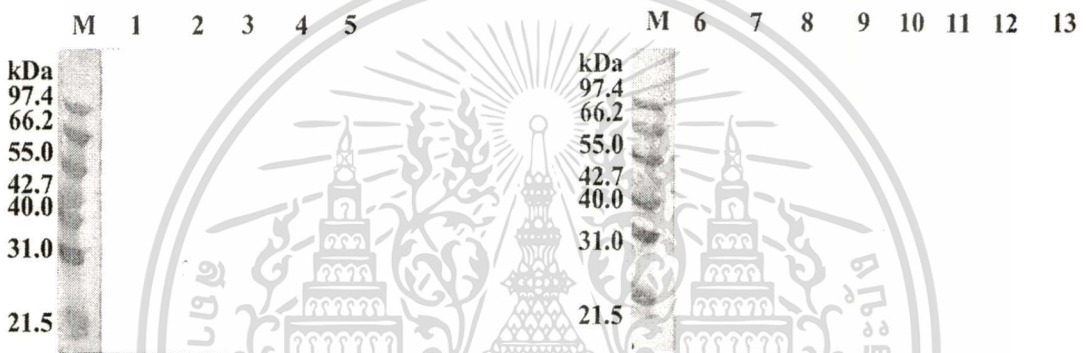
เมื่อนำโปรตีนชุดนี้มาทดสอบโดยวิธี Dot enzyme immunoassay พบว่าจะให้ผลเช่นเดียวกับ Western blot คือ โปรตีน 6H-D3E ที่ได้จากการชะปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อจุดสามารถทำปฏิกิริยาได้ชัดเจนกับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก และทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติได้น้อยมากหรือแทบไม่มีเลย (รูปที่ 5.17 จุดที่ 8 ถึง 13)



รูปที่ 5.15 การวิเคราะห์ SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีน 6H-D3E ที่ผ่านการพัฒนาวิธี
การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์และย่อยด้วยสี่โครมาตอกราฟี
แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน
แถวที่ 1 คือ โปรตีนที่ไม่จับกับเรซิน (unbound protein)
แถวที่ 2 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 1 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0
แถวที่ 3 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 2 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0
แถวที่ 4 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 3 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0
แถวที่ 5 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 4 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0
แถวที่ 6 คือ ล้างเรซินด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 (ในคอลัมน์)
แถวที่ 7 คือ ล้างเรซินด้วยสารละลาย 8M urea wash buffer พีเอช 7.0
แถวที่ 8 ถึง 13 คือ โปรตีนที่ถูกชะด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช
4.5 หลอดที่ 1 ถึง 6



ก)



ข)

รูปที่ 5.16 การวิเคราะห์ Western blot ของโปรตีน 6H-D3E ที่ผ่านการปรับปรุงวิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (ก) และซีรัมรวมของคนปกติ (ข) ความเข้มข้น 1 ต่อ 1000

แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน

แถวที่ 1 คือ โปรตีนที่ไม่จับกับเรซิน (unbound protein)

แถวที่ 2 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 1 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0

แถวที่ 3 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 2 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0

แถวที่ 4 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 3 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0

แถวที่ 5 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 4 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0

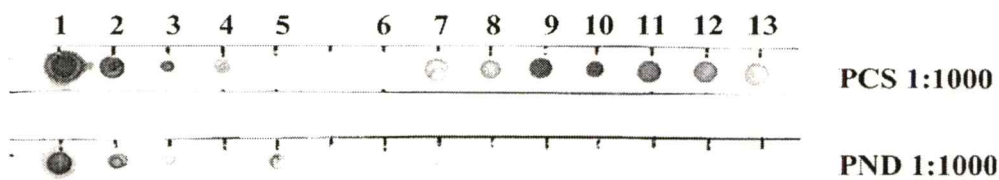
แถวที่ 6 คือ ล้างเรซินด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0

(ในคอลัมน์)

แถวที่ 7 คือ ล้างเรซินด้วยสารละลาย 8M urea wash buffer พีเอช 7.0

แถวที่ 8 ถึง 13 คือ โปรตีนที่ถูกชะด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer

พีเอช 4.5 หลอดที่ 1 ถึง 6



รูปที่ 5.17 การทำ Dot enzyme immunoassay (DEIA) ของโปรตีน 6H-D3E ที่ผ่านการพัฒนาวิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบระหว่างการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) และซีรัมรวมของคนปกติ (PND) ที่เจือจาง 1000 เท่า

จุดที่ 1 คือ โปรตีนที่ไม่จับกับเรซิน (unbound protein)

จุดที่ 2 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 1 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0

จุดที่ 3 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 2 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0

จุดที่ 4 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 3 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0

จุดที่ 5 คือ ล้างเรซินครั้งที่ 4 ด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0

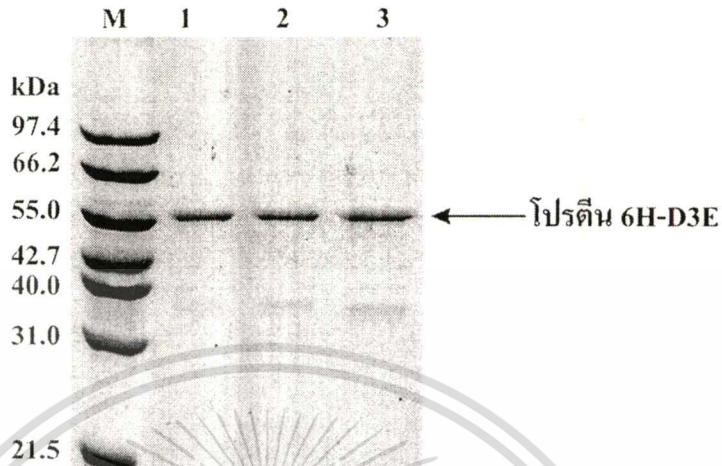
จุดที่ 6 คือ ล้างเรซินด้วยสารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 (ในคอลัมน์)

จุดที่ 7 คือ ล้างเรซินด้วยสารละลาย 8M urea wash buffer พีเอช 7.0

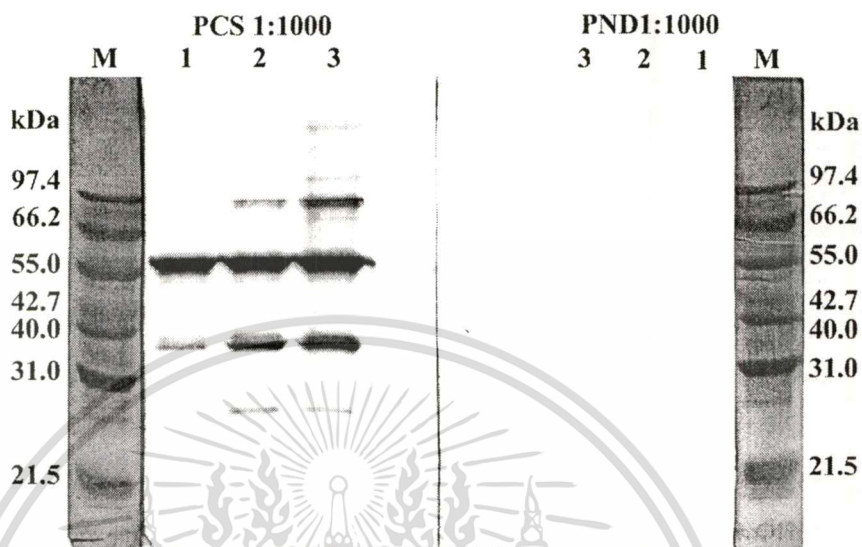
จุดที่ 8 ถึง 13 คือ โปรตีนหลุดที่ 1 ถึง 6 ที่ได้จากการชะด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5

5.9 เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของโปรตีนชุดที่เตรียมโดยวิธีเดิมกับวิธีปรับปรุงใหม่

หลังจากที่รวมโปรตีน 6H-D3E จากหลอดที่มีปริมาณโปรตีนสูง (หลอดที่ 2 ถึง 5) เข้าด้วยกัน และนำไปไตอะไลซ์เพื่อกำจัดยูเรียออกตั้งวิธีการทดลอง บทที่ 4 ข้อ 4.8 พบว่าได้สารละลายโปรตีนที่ไม่มีการตกตะกอน และเติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ลงในสารละลายโปรตีนเพื่อป้องกันการตกตะกอน ซึ่งเมื่อนำมาวัดปริมาณโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้โดยชุดวัดโปรตีนสำเร็จรูป (Protein Assay Dye Reagent Concentrate : บริษัท Bio-Rad, USA) จะได้โปรตีนที่มีความเข้มข้น 0.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายโปรตีนทั้งหมด 2 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้โปรตีนบริสุทธิ์ 0.66 มิลลิกรัมจากการเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* จำนวน 250 มิลลิลิตร นั่นคือสามารถผลิตโปรตีนบริสุทธิ์ได้เท่ากับ 2.64 มิลลิกรัมจากการเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำโปรตีนบริสุทธิ์โดยวิธีการที่ปรับปรุงซึ่งผ่านการกำจัดยูเรียออกแล้วจำนวน 1 ไมโครกรัมมาแยกใน SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์และย้อมด้วยสีโครแมสซีบลูเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ดังรูปที่ 5.18 แถวที่ 1 เปรียบเทียบกับโปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมบริสุทธิ์โดยวิธีเดิม (รูปที่ 5.18 แถวที่ 2) และโปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมบริสุทธิ์โดยวิธีเดิมแต่เก็บไว้ที่ -30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 เดือน (รูปที่ 5.18 แถวที่ 3) พบว่าจะเห็นแถบของโปรตีนขนาด 55 กิโลดาลตันและโปรตีนที่ถูกย่อยขนาด 35 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกันทั้ง 3 ชุด แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ Western blot จะให้ผลดังรูปที่ 5.19 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน 6H-D3E ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีเดิม (แถวที่ 2, 3) จะมีโปรตีนส่วนที่มีขนาด 35 กิโลดาลตันมากกว่าโปรตีน 6H-D3E ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีที่ปรับปรุงแล้ว (แถวที่ 1) และเป็นที่น่าสนใจว่าโปรตีนขนาด 90 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนปนเปื้อนจาก *Escherichia coli* ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกได้จะมีปริมาณน้อยลงจนแทบไม่เห็นเลยในโปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมใหม่ (แถวที่ 1) เมื่อเทียบกับโปรตีน 6H-D3E เดิมในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน (แถวที่ 2 และ 3) และไม่มี background ของ 6H-D3E ในการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติด้วย



รูปที่ 5.18 แสดงการแยกโปรตีน 6H-D3E จำนวน 1 ไมโครกรัม ใน SDS-PAGE 10 เปอร์เซ็นต์และย้อมด้วยสีโครแมสซีบลู
 แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน
 แถวที่ 1 คือ โปรตีน 6H-D3E บริสุทธิ์ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีที่ปรับปรุงแล้ว
 แถวที่ 2 คือ โปรตีน 6H-D3E บริสุทธิ์ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีเดิมที่ยังไม่ได้ปรับปรุง
 แถวที่ 3 คือ โปรตีน 6H-D3E บริสุทธิ์ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีเดิมที่ยังไม่ได้ปรับปรุงและเก็บไว้ที่ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน



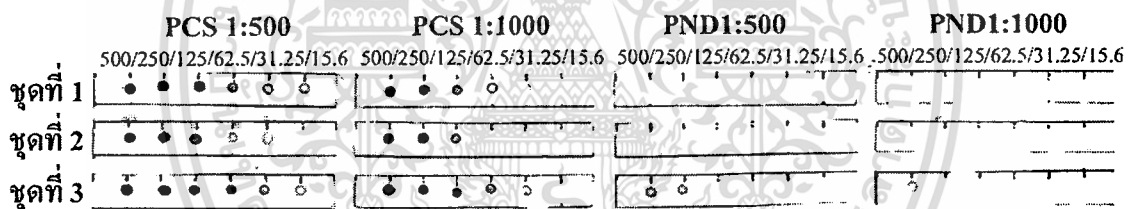
รูปที่ 5.19

การวิเคราะห์ Western blot ของโปรตีน 6H-D3E ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) และซีรัมรวมของคนปกติ (PND) ที่เจือจาง 1000 เท่า แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน แถวที่ 1 คือ โปรตีน 6H-D3E บริสุทธิ์ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีที่ปรับปรุงแล้ว แถวที่ 2 คือ โปรตีน 6H-D3E บริสุทธิ์ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีเดิมที่ยังไม่ได้ปรับปรุง
แถวที่ 3 คือ โปรตีน 6H-D3E บริสุทธิ์ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีเดิมที่ยังไม่ได้ปรับปรุงและเก็บไว้ที่ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

5.10 การตรวจหาปริมาณของโปรตีนบริสุทรี 6H-D3E ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกโดยวิธี

Dot enzyme immunoassay (DEIA)

เมื่อตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของโปรตีน 6H-D3E ทั้ง 3 ชุด เปรียบเทียบกันโดยวิธี Dot enzyme immunoassay โดยใช้ปริมาณโปรตีน 6H-D3E ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ 500 ถึง 15.6 นาโนกรัมต่อจุด และนำไปทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกและซีรัมรวมของคนปกติที่เจือจาง 500 เท่าและ 1000 เท่า ให้ผลดังรูปที่ 5.20 พบว่าโปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมได้จากวิธีที่ปรับปรุงแล้ว (ชุดที่ 1) จะไม่มี background กับซีรัมรวมของคนปกติ เมื่อเทียบกับโปรตีน 6H-D3E จากชุดเดิมที่เตรียมและเก็บไว้ที่ -30 องศาเซลเซียส (ชุดที่ 2 และ 3) นอกจากนี้โปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมได้จากวิธีที่ปรับปรุงแล้วที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดคือ 15.6 นาโนกรัมต่อจุด ยังเห็นการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (ความเข้มข้น 1 ต่อ 500) ได้ชัดเจนกว่าโปรตีน 6H-D3E ที่ความเข้มข้นเดียวกันซึ่งเตรียมโดยวิธีเดิม (ชุดที่ 2) แสดงว่าโปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมโดยวิธีที่ปรับปรุงใหม่นี้ น่าจะมีคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน และมีความบริสุทธิ์พอที่จะใช้เป็นแอนติเจนทดแทนการใช้ไวรัสตั้งกึ่งในชุดตรวจวินิจฉัยได้



รูปที่ 5.20 แสดงการเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของโปรตีน 6H-D3E ที่ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 500 ถึง 15.6 นาโนกรัมต่อจุดกับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) และซีรัมรวมของคนปกติ (PND) ที่เจือจาง 500 และ 1000 เท่า ปริมาณโปรตีน 500/ 250/ 125/ 62.5/ 31.3/ 15.6 นาโนกรัมต่อจุด โดยวิธี Dot enzyme immunoassay

ชุดที่ 1 โปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมได้จากการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีที่ปรับปรุงแล้ว

ชุดที่ 2 โปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมได้จากการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีเดิม

ก่อนปรับปรุง

ชุดที่ 3 โปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมได้จากการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีเดิม

ก่อนปรับปรุงและเก็บไว้ที่ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

บทที่ 6

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 ในรูปของรีคอมบิแนนต์โปรตีนจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อนำไปใช้เป็นโปรตีนแอนติเจนทดแทนไวรัสเด็งกีในชุดตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก วิธีการศึกษาประกอบไปด้วย

1. การเพิ่มจำนวนยีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกี ซีโรทัยปี 3 (den3E) โดยวิธี RT-PCR
2. การโคลนยีนส่วนเปลือกหุ้มที่ได้ (den3E) เข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของ *Escherichia coli* คือ pTrcHisA
3. การคัดเลือกโคลน *Escherichia coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E
4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน den3E ในรูปของโปรตีนลูกผสม 6H-D3E ที่มีเปปไทด์พาหะเป็นกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว ติดอยู่ที่ปลาย N ของโปรตีน E
5. การแยกโปรตีน 6H-D3E ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Immobilized metal affinity chromatography
6. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน และการศึกษาคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ ได้แก่ ซีรัมของผู้ป่วยไข้เลือดออก และโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ในการศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกี ซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 จากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 ถึง 409 โดยไม่รวมกรดอะมิโนที่ไม่ละลายน้ำที่ปลายคาร์บอกซี 84 ตัว จากไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 ที่มีรหัสพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ โดยวิธี RT-PCR ได้ทำการเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 2 ชนิดในการเพิ่มจำนวนยีนโดยวิธีพีซีอาร์ คือเอนไซม์ Taq DNA polymerase และ Elongase ซึ่งยีน den3E ที่ได้จะมีขนาดเท่ากันเมื่อเปรียบเทียบใน 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แต่ในขั้นตอนโคลนนิ่งได้เลือกเฉพาะยีน den3E ที่ได้จากเอนไซม์ Elongase เนื่องจากเอนไซม์ Elongase มีส่วนผสมของ Taq DNA polymerase และ Pyrococcus species GB-D thermostable DNA polymerase มีคุณสมบัติในการตรวจสอบ (proofreading) ลำดับเบสที่ต่อเข้าไปในดีเอ็นเอสายใหม่ที่กำลังสร้างขึ้นว่ามีความผิดพลาดไปจากดีเอ็นเอต้นแบบหรือไม่ ถ้ามีการเติมลำดับเบสผิดไปเอนไซม์ก็จะทำหน้าที่ตัดเบสที่ผิดพลาดนั้นออกไปโดยอาศัยคุณสมบัติ 3' ไปยัง 5' exonuclease ของเอนไซม์ Elongase และเติมเบสที่ถูกต้องต่อไปซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่มีใน Taq DNA polymerase (Barnes 1994 ; Tindall et.al. 1988 ; Innis et.al. 1988) ดังนั้นจึงมีความมั่นใจว่ายีน den3E ที่

ได้จากพีซีอาร์โดยเอนไซม์ *Elongase* ไม่ควรจะมีความผิดพลาดของลำดับเบส แม้ว่าจะไม่ได้มีการยืนยันลำดับเบสที่ถูกต้องโดยวิธี *DNA sequencing* ก็ตาม

ในการโคลนนิ่งยีน *den3E* เข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก เพื่อให้มีการผลิตโปรตีนในระบบ *Escherichia coli* ควรจะต้องคำนึงถึงกรอบ (*frame*) ของการแปลรหัสของเวกเตอร์ที่เลือกใช้ด้วย เนื่องจากกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะประกอบด้วย การแปลรหัสจากลำดับเบส 3 ตัวที่แตกต่างกัน เรียกว่า *triple codon* และสามารถแปลลำดับเบสได้เป็น 3 *frame* ขึ้นกับว่าจะเริ่มต้นตำแหน่งที่ *frame 1, 2* หรือ *3* เวกเตอร์ *pTrcHis A, B* และ *C* มีความแตกต่างกันของ *frame* ของตำแหน่งที่ใช้ในการตัดต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไป (*multiple cloning site*) ถ้าเลือกเวกเตอร์เพื่อทำการเชื่อมต่อกับยีน *den3E* ได้ถูกกรอบ (*inframe*) จะทำให้มีการแปลรหัสเริ่มจากกรดอะมิโนตัวแรก (*translational start site*) จนถึงกรดอะมิโนตัวสุดท้าย (*stop codon*) ได้เป็นสายเปปไทด์ขนาดยาวซึ่งประกอบด้วยซิสตีดิน 6 ตัว (ใช้เป็นไลแกเนสสำหรับจับกับไอออนของโลหะบนเรซิน), เปปไทด์ที่จำเพาะสำหรับการย่อยโดยเอนไซม์ *enterokinase* (ช่วยในการแยกส่วนของเปปไทด์พาหะออกจากโปรตีนที่สนใจ) และโปรตีน *den3E* ถ้าเลือกเวกเตอร์ผิดจะทำให้การแปลรหัสของยีนผิดกรอบไป และอาจไปทำให้พบตำแหน่งหยุด (*stop codon*) ซึ่งทำให้หยุดการแปลรหัสได้ก่อนที่จะถึงส่วนปลายสุดของยีนที่สนใจ และทำให้ไม่ได้สายของเปปไทด์ในขนาดที่ควรจะเป็น

ในการโคลนนิ่ง *den3E* ได้ทำการตัดปลาย 5' และ 3' ของยีน *den3E* ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *EcoRI* และ *BamHI* เพื่อเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ *pTrcHisA* ที่ตำแหน่งเดียวกัน แล้วทำการทรานสฟอร์มเข้าในเซลล์ *Escherichia coli* โดยปล่อยให้ทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้เจริญอยู่บนอาหารแข็งที่มียาแอมพิซิลิน เพื่อทำการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ *Escherichia coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม (*pTrcHis/den3E*) หรือเวกเตอร์ *pTrcHis* เท่านั้น (จากคุณสมบัติของยีนดื้อยาแอมพิซิลิน (*Amp^r gene*) ที่อยู่บนเวกเตอร์) โดยจะมีการทดสอบควบคุม คือการเชื่อมเวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลนโดยไม่มียีน *den3E* และทำการทรานสฟอร์มเข้าใน *Escherichia coli* โดยวิธีเดียวกัน ปริมาณของทรานสฟอร์มแมนท์ที่เกิดขึ้นจะบอกถึงคุณภาพของเวกเตอร์ว่ามีการย่อยปลายด้วย *EcoRI* และ *BamHI* ได้อย่างสมบูรณ์หรือไม่ ถ้ามีการเตรียมเวกเตอร์ได้ดีจะมีทรานสฟอร์มแมนท์ขึ้นมาน้อยมากหรือไม่มีเลย แต่ถ้าเตรียมไม่ดีเวกเตอร์จะกลับมาเชื่อมเป็นวงทำให้เกิดการทรานสฟอร์มได้ง่ายและมีทรานสฟอร์มแมนท์เกิดขึ้นมาก ดังนั้นในปริมาณเวกเตอร์เท่ากัน จำนวนของทรานสฟอร์มแมนท์ที่เกิดขึ้นในการทดลองที่มีทั้งเวกเตอร์และยีน *den3E* ควรมากกว่าในชุดควบคุมซึ่งมีแต่เวกเตอร์อย่างเดียว จากผลการทดลองที่ได้พบว่าจำนวนของทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้จากการโคลนนิ่ง *den3E* มากกว่าชุดควบคุมอยู่ 4 เท่า ซึ่งนับว่ามีความแตกต่างกันไม่มากนัก แสดงว่าเวกเตอร์ที่เตรียมได้อาจถูกย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งไม่สมบูรณ์ แต่ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจบอกได้ว่าน่าจะมีทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับพลาสมิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกผสมปนอยู่กับกลุ่มที่มีแต่เวกเตอร์อย่างเดียวในอัตราส่วนอย่างน้อย 3 ต่อ 1 ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกเฉพาะโคลน *Escherichia coli* (pTrcHis/den3E) อีกครั้งหนึ่งโดยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ (colony PCR) หรือการสกัดพลาสมิดและย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนนิ่งเพื่อยืนยันว่ามียีน den3E อยู่

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน den3E ในเซลล์ *Escherichia coli* พบว่ามีการผลิตโปรตีน 6H-D3E ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำหรือ inclusion bodies ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปเมื่อมีการผลิตโปรตีนจากเซลล์สัตว์ชั้นสูงหลายชนิดในรูปของรีคอมบิแนนต์โปรตีนในเซลล์ *Escherichia coli* เช่น somatostatin (Itakura et.al. 1977), Insulin A&B chain (Goeddel et.al. 1979), Myoglobin (Varadarajan et.al. 1985), Bovine growth hormone (Seeburg et.al. 1978) เป็นต้น สำหรับโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 2 ที่มีการผลิตเป็นโปรตีนลูกผสมกับเบปไตด์พาหะชนิดต่างๆ ก็พบว่าอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำในในระบบของเซลล์ *Escherichia coli* เช่นเดียวกันได้แก่โปรตีน 6H-D2E (Nuangplee 1997), โปรตีน trpE-DenE (Mason et.al. 1990), โปรตีน MBP-E (Simmons et.al. 1998) และโปรตีน GST-D2E (Jarumanokul 1996) แต่อย่างไรก็ตามสภาวะในการเลี้ยงเซลล์ *Escherichia coli* อาจมีผลในการทำให้โปรตีนผลิตออกมาในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ขึ้นกับชนิดของโปรตีนเช่น โปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 1 ที่ถูกผลิตในรูปของ GST-E จะอยู่ในรูปของโปรตีนละลายน้ำเมื่อเลี้ยงเซลล์ *Escherichia coli* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากเติมสาร IPTG แล้ว (Sugrue et.al. 1997)

ถึงแม้ว่าโปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่ผลิตโดย *Escherichia coli* จะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำก็ตาม แต่ก็มีประโยชน์ในแง่ของความคงตัว (stability) ของโปรตีนที่จะถูกทำลายโดยเอนไซม์โปรติเอสของ *Escherichia coli* ได้ยากขึ้น นอกจากนี้ในแง่ของการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ จะสามารถปั่นแยก inclusion bodies ออกจากโปรตีนละลายน้ำอื่นๆของ *Escherichia coli* ได้ง่ายโดยการปั่นแยกที่ความเร็วต่ำ แต่โดยทั่วไปจะปั่นแยกที่ความเร็ว 5,000-12,000 g (George et.al. 1985) ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ต่อไป โปรตีน 6H-D3E ที่ผลิตออกมาในรูปของ inclusion bodies สามารถละลายได้ดีในสารละลายดีเนเจอแรนท์เข้มข้นได้แก่สารละลาย 6M guanidine-HCl หรือสารละลาย 8M urea โดยทั่วไปสารละลาย 6M guanidine จะมีความสามารถในการละลายตะกอนโปรตีนในช่วงเริ่มต้นได้ดีกว่าสารละลาย 8M urea เนื่องจากมีความแรงกว่า และสารไอโซไซยาเนตที่เกิดจากการแตกตัวของยูเรีย จะทำให้เกิดกระบวนการ carbamylate ที่กลุ่มอะมิโนอิสระ ทำให้ประสิทธิภาพในการทำละลายของยูเรียลดลง (Hagel et.al. 1971) แต่หลังจากที่ละลายโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์แล้วโปรตีนจะยังคงสภาพการละลายได้ดีต่อไปแม้ว่าจะเปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็นสารละลาย 8M urea ก็ตาม นอกจากสารดีเนเจอแรนท์ที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีสารดีเทอร์เจนบางตัวที่สามารถละลายโปรตีนได้ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TritonX-100, Sodium dodecyl sulfate หรือ sarkosyl แต่บางครั้งพบว่าสารดีเทอร์เจนอาจจับกับโปรตีนอย่างรุนแรง ทำให้มีผลยับยั้งการคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติของโปรตีน (refolding) ได้ (David 1990)

โปรตีน 6H-D3E อยู่ในรูปของโปรตีนที่มีเปปไทด์พาทะ (6 histidine) ติดอยู่ที่ปลายอะมิโน (N-terminal) สามารถแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี immobilized metal affinity chromatography โดยอาศัยคุณสมบัติการจับกันของกรดอะมิโนฮีสทีดีน 6 ตัวกับไอออนของโลหะประจุบวก (Co^{2+} หรือ Ni^{2+}) ที่ฝังตัวอยู่กับเรซิน โคบอลต์เรซินที่เลือกใช้ (TALON™) มีความทนทานต่อสารดีเนเจอร์แรงที่รุนแรง เช่น สารละลาย 6M guanidine-HCl หรือสารละลาย 8M urea ที่ใช้ในการละลาย inclusion bodies ในกรณีที่รีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ จึงสามารถใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ในสภาวะที่โปรตีนถูกทำลายโครงสร้างธรรมชาติ (denaturing condition) ได้ นอกจากนี้เกิลเรซินก็สามารถใช้ในวัตฤประสงค์เดียวกันได้ แต่จากรายงานของ (Nuangplee 1997) พบว่าการแยกโปรตีน 6H-D2E ให้บริสุทธิ์โดยใช้เกิลเรซิน (Ni-NTA) จะได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์น้อยกว่าโคบอลต์เรซิน ภายใต้สภาวะที่โปรตีนถูกทำลายโครงสร้างธรรมชาติเช่นเดียวกันซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนที่ไม่จำเพาะ (non-6His protein) จับกับนิเกิลไอออนได้แน่นกว่าโคบอลต์ไอออน ดังนั้นในขั้นตอนของการชะโปรตีนออกจากเรซิน จึงมีโปรตีนปนเปื้อนออกมามากกว่า ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้โคบอลต์เรซินในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี Immobilized metal affinity chromatography ภายใต้สภาวะที่โปรตีนถูกทำลายโครงสร้างธรรมชาติ ในครั้งแรกจะได้โปรตีน 6H-D3E ที่ไม่ค่อยบริสุทธิ์มากนัก เนื่องจากเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกโดยวิธี western blot แล้วพบว่านอกจากจะมีแถบโปรตีนขนาด 55 กิโลดาลตันของโปรตีน 6H-D3E และโปรตีนขนาดเล็กกว่าซึ่งเป็นโปรตีนที่ถูกย่อยแล้ว ยังคงมีแถบโปรตีนขนาดประมาณ 90 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนของ *Escherichia coli* ปนเปื้อนอยู่ (ไม่พบแถบโปรตีนนี้เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีการดูดซับแอนติบอดีต่อ *Escherichia coli*) จึงได้ทำการปรับปรุงวิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยการล้างตะกอน inclusion bodies ที่ได้หลังจากการแตกเซลล์ด้วยเครื่องเสียงความถี่สูง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี Triton X-100 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะช่วยให้ละลายโปรตีนปนเปื้อนออกไปได้บางส่วน สอดคล้องกับรายงานของ Marston et.al. (1986) นอกจากนี้การใช้สารละลายยูเรียที่ความเข้มข้นต่ำ ก็ช่วยละลายโปรตีนปนเปื้อนออกไปได้บางส่วนเช่นกัน หลังจากที่ละลายตะกอนโปรตีนในสารละลาย 6M guanidine และปล่อยให้จับกับโคบอลต์เรซินแล้ว ขั้นตอนของการล้างเรซินที่มีโปรตีน 6H-D3E จับอยู่ เพื่อกำจัดโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อน (non-specific proteins) บนเรซินนั้นก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยปกติจะทำการล้างเรซินนี้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ยูเรีย ปริมาณ 10 เท่าของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรซินเท่านั้น แต่ในขั้นตอนของการปรับปรุงวิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ได้เพิ่มปริมาณของบัฟเฟอร์เป็น 50 เท่าและพบว่าโปรตีนที่ได้หลังการชะออกจากเรซินมีความบริสุทธิ์มากขึ้นกว่าเดิม เปรียบเทียบจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีน 6H-D3E ที่เตรียมโดยวิธีปกติและวิธีที่ปรับปรุงแล้วกับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกโดยวิธี western blot (รูปที่ 5.19) แสดงว่าการกำจัดโปรตีนปนเปื้อนของเซลล์ *Escherichia coli* ออกให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ในแต่ละขั้นตอนของการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ จะมีส่วนช่วยทำให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามความบริสุทธิ์ของโปรตีน ก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำโปรตีนนั้นๆ ไปใช้ด้วย

โปรตีน 6H-D3E ที่ผ่านการชะออกจากเรซินแล้ว ยังคงละลายอยู่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ยูเรีย ซึ่งเป็นสภาวะของโปรตีนถูกทำลายโครงสร้างธรรมชาติ (denature protein) การเก็บโปรตีนในลักษณะนี้เป็นเวลานาน อาจทำให้คุณสมบัติของโปรตีนเปลี่ยนไปโดยทั่วไป จะต้องทำการกำจัดสารละลายยูเรียออกจากโปรตีน เพื่อให้โปรตีนมีการม้วนงอตัวใหม่และมีลักษณะใกล้เคียงธรรมชาติมากที่สุด โดยที่โปรตีนจะไม่กลับมามากตตะกอนอีกเมื่อเอายูเรียออกไปแล้ว วิธีการไดอะไลซิสเอาสารละลายยูเรียออกจากโปรตีน 6H-D3E ในบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณยูเรียลดลงตามลำดับจนไม่มียูเรียเหลือเลยเป็นวิธีที่ใช้ได้กับโปรตีนทั่วไป การคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติของโปรตีน 6H-D2E ใช้วิธีนี้เช่นเดียวกัน (Nuangplee 1997) แต่หลังจากที่เก็บสารละลายโปรตีน 6H-D2E ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน โปรตีนจะตกตะกอนเมื่อนำออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง การเติมสารละลาย TritonX-100[®] เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์สุดท้ายของการไดอะไลซิสโปรตีน 6H-D3E แทนยูเรีย และการเก็บสารละลายโปรตีนในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยทำให้โปรตีน 6H-D3E คงสภาพการละลายไว้ได้ดี เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือนขึ้นไป และโปรตีน 6H-D3E ยังคงคงคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนได้ดี

รีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-D2B (หรือ โดเมน III ของโปรตีน E ของไวรัสเด็งกี ซีโรทัยป์ 2) ซึ่งมีการคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติ โดยปรับพีเอชของโปรตีนให้เป็นต่างกันในสภาวะที่มีสารละลาย DTT และไดอะไลซิสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีไกลซีน พีเอช 10.5 ไกลซีนจะช่วยเพิ่มการละลายของโปรตีนได้ดี ขณะที่สารละลาย DTT จะช่วยให้การจับกันของพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสายของโปรตีนเกิดได้น้อยลง (Takacs et.al. 1991) ทำให้ได้โปรตีน 6H-D2B ที่มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน (antigenicity) มากกว่าการคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติ โดยการไดอะไลซิสโปรตีนในบัฟเฟอร์ที่มียูเรียลดลงเป็นลำดับ (Nuangplee 1997) นอกจากนี้ยังสามารถทำการคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติ ขณะที่โปรตีนเกาะอยู่กับเรซินชนิดต่างๆ เช่น metal affinity resin (Holzinger et.al. 1996 ; Shi et.al. 1997), ion-exchange resin (Creighton 1985), hydrophobic interaction resin (Geng and Chang 1992), nickel affinity resin (Sinha et.al. 1994) และ affinity column ชนิดอื่นๆ (Stempfer et.al. 1996) แล้วจึงชะโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกมาในสภาพธรรมชาติ (native condition) ซึ่งจะทำให้ได้โปรตีนที่มี activity เช่นเดียวกับโปรตีนธรรมชาติ (native protein) และทำให้โปรตีนบางชนิดมีการม้วนงอได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติของโปรตีนแต่ละชนิด อาจประสบความสำเร็จด้วยวิธีการที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน และคุณสมบัติของโปรตีนที่ต้องการหลังจากคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติแล้ว

โปรตีนที่อยู่ในรูปของโปรตีนลูกผสม (fusion protein) ซึ่งมีส่วนของเปปไทด์หรือโปรตีนพาหะติดอยู่ทางด้านปลาย N หรือ ปลาย C ของโปรตีนที่สนใจ นอกจากจะมีส่วนช่วยในความคงตัว (stable) ของโปรตีน (Lee et.al. 1984) และช่วยในการละลายของโปรตีนบางชนิด (Monaco et al 1987, Nilsson et al 1985) แล้ว ยังมีประโยชน์ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติของการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างโปรตีนพาหะกับ affinity resin เช่น 6-His กับ โคบอลต์เรซิน, MBP กับ amylose resin และ GST กับ glutathion agarose resin เป็นต้น ในการใช้ 6His เป็นเปปไทด์พาหะมีข้อดีคือ เป็น affinity tag ที่มีขนาดเล็กมากที่สุดเมื่อเทียบกับโปรตีนพาหะตัวอื่นๆ ทำให้ไม่มีผลในการบัง active site ของโปรตีนที่ต้องการผลิต และในการนำมาใช้เป็นแอนติเจน ก็ไม่จำเป็นต้องตัดส่วนของ 6-His นี้ออกไป เพราะจากการทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนปกติ (PND) โดยวิธี Dot enzyme immunoassay ไม่พบว่ามีสิ่งปนเปื้อน (background) ใดๆเกิดขึ้น เปรียบเทียบกับการใช้โปรตีนพาหะเป็น MBP ที่จะมีสิ่งปนเปื้อนกับการทำปฏิกิริยาของซีรัมคนปกติ

โปรตีน 6H-D3E ที่ได้ไม่ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกี ซีโรทัยป์ 3 (รูปที่ 5.12) แสดงว่าโปรตีนรีคอมบิแนนต์จาก *Escherichia coli* มีการพับงอ (conformation) ผิดไปจากโปรตีนธรรมชาติของไวรัส โดยทั่วไปโปรตีนที่ถูกผลิตโดย *Escherichia coli* จะไม่มีขบวนการดัดแปลงของโปรตีนภายหลังการสังเคราะห์ (post-translational modification) เช่นการเติมน้ำตาลเข้าที่กรดอะมิโนบางตัวบนสายโพลีเปปไทด์ (glycosylation) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้รูปร่างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปได้ แต่อย่างไรก็ตามน่าจะยังมีบางตำแหน่ง (epitopes) ที่ยังคงสภาพธรรมชาติอยู่ เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับ 4G2 ซึ่งเป็นโมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อเยื่อส่วนเปลือกหุ้มของฟลาวีไวรัส และ ซีรัมผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) โดยไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนปกติ (PND) เหมาะที่จะใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกโดยวิธี Dot enzyme immunoassay

บทที่ 7

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 สายพันธุ์ H87 ในระบบ *Escherichia coli* โดยการประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ผู้วิจัยสามารถเพิ่มจำนวนยีน den3E ขนาด 1,264 คู่เบส ซึ่งครอบคลุมส่วนของยีนตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 1 ถึง 409 จากสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอของไวรัสเด็งกี โดยวิธี RT-PCR ยีน den3E ที่ได้จากพีซีอาร์นี้ถูกเชื่อมต่อเข้าไปในเวกเตอร์เพื่อแสดงออกสำหรับ *Escherichia coli* คือ เวกเตอร์ pTrcHisA ที่ตำแหน่ง BamHI และ EcoRI และทรานส์ฟอร์มเข้าไปใน *Escherichia coli* โคลน *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/den3E จะถูกคัดเลือกโดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์และตรวจสอบการผลิตโปรตีน 6H-D3E เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์ โปรตีน 6H-D3E ถูกผลิตออกมาในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein) และสามารถแยกให้บริสุทธิ์จากโปรตีนอื่นๆของ *Escherichia coli* โดยวิธี Immobilized metal affinity chromatography ซึ่งอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะของโคบอลต์ไอออนบนเรซิน (TALON™) กับ 6-His ที่ปลายด้าน N ของโปรตีน 6H-D3E แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นตอนของการล้างตะกอน (pellet) ที่ได้หลังจากการแยกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง โดยการใช้บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ Triton X-100 ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และการเพิ่มปริมาณของบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างเรซินที่จับกับโปรตีน 6H-D3E (6H-D3E-bound resin) เป็น 50 เท่ามีส่วนช่วยให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์มากขึ้นหลังจากที่ได้ทำการคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติของโปรตีน (refolding protein) โดยการกำจัดยูเรียออกหมดแล้ว จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนรีคอมบิแนนต์ 6H-D3E พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ 4G2 ที่เป็นโมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อยีนส่วนเปลือกหุ้มของฟลาวีไวรัส แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ 10C10 ที่เป็นโมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อยีนส่วนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีซีโรทัยปี 3 และโมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อซีโรทัยปีอื่นๆด้วยแสดงว่ามีบางตำแหน่ง (epitope) เปลี่ยนแปลงไป แต่โปรตีนที่ได้จะทำปฏิกิริยาได้ดีกับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) โดยไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติ (PND) โดยวิธี western blot analysis และ dot enzyme immunoassay (DEIA) สรุปได้ว่าโปรตีน 6H-D3E ที่ผลิตได้จาก *Escherichia coli* นี้เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนที่ดี และน่าจะใช้ทดแทนแอนติเจนจากธรรมชาติคือไวรัสเด็งกีได้ในชุดตรวจวินิจฉัย Dot enzyme immunoassay สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกโดยวิธีอื่นเช่น ELISA ควรจะต้องมีการทดลองนำโปรตีน 6H-D3E มาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อเปรียบเทียบกับไวรัสจากธรรมชาติด้วยเช่นกัน

บรรณานุกรม

- วิลาศ นรินทร์สุขศิริ. “เวกเตอร์สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ.” หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม พิมพ์ครั้งแรก. นครปฐม : โรงพิมพ์สาธาณสุขมูลฐานเอเซียเน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา. 2536.
- วิฑูรย์ อารยะพิพัฒน์กุล. “รายงานการวิจัย เรื่อง เทคนิคใหม่การตรวจวิเคราะห์.” Thai Medical technology letter. ปีที่ 9, ฉบับเดือนตุลาคม-ธันวาคม, 2541.
- สุวรรณหา ไวกนอมสัตว์ และพิไลพันธ์ พุชวิวัฒน์. ไวรัสก่อโรคไข้เลือดออก. ใน: พิไลพันธ์ พุชวิวัฒน์, บรรณาธิการ. ไวรัสวิทยา. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ: อักษรสมัย. 2540. หน้า 21.1-21.12.
- สุจิตรา นิมนานนิตย์. ไข้เลือดออก. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ดีไซน์. 2540.
- Barnes M. “PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates”. Proc.Natl.Acad.Sci, vol. 91,1994. pp. 2216-2220.
- Bazan JF., Fletterick RJ. “Detection of trypsin-like protease in flaviviruses and pestiviruses.” Virology, vol 171, 1989. pp. 637-639.
- Bimboin HC., Doly J. “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.” Nucleic Acid Res, vol 7, 1979. pp. 1513-23.
- Brinton MA. “Replication of flaviviruses.” In: The Togaviridae and Flaviviridae Schlesinger, S.A. and Schlesinger, M.J., (Eds). Plenum Press., 1988. pp. 327-74.
- Cardosa MJ., Hooi TP., Shaari NS. “Development of a dot enzyme immunoassay for dengue 3: a sensitive method for the detection of antidengue antibodies.” J Virol Methods, vol. 22, no.1, 1988. pp. 81-8.
- Cardosa MJ and Tio PH. “Dot enzyme immunoassay: an alternative diagnostic aid for dengue fever and dengue haemorrhagic fever.” Bull World Health Organ, vol. 69, no. 6, 1991. pp. 741-5.
- Cardosa MJ., Tio PH., Nimmanitya S., Nisalak A., Innis B. “IgM capture ELISA for detection of IgM antibodies to dengue virus: comparison of 2 formats using hemagglutinins and cell culture derived antigens.” Southeast Asian J Trop Med Public Health, vol. 23, no. 4, 1992. pp. 726-9.
- Chambers TJ., McCourt DW., Rice CM. “Production of yellow fever virus protein infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera.” Virology, vol.177, 1990a. pp. 159-174.

- Chambers TJ., Hahn C., Galler R., Rice CM. "Flavivirus genome organization, expression , and replication." *Ann Revi of Micro*, vol. 44, 1990b. pp. 649-688.
- Chomczynski P., Sacchi N. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem*, vol. 162, 1987. pp.156.
- Chungue E., Marche G., Plichart R., Boutin JP., Roux J. "Comparison of immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and haemagglutination inhibition (HI) test for the detection of dengue antibodies prevalence of dengue IgG-ELISA antibodies in Tahiti." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, vol. 83, no. 5, 1989. pp. 708-11.
- Chungue E., Duebel V., Cassar O., Laille M., Martin PMV. "Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia." *J of Gen Virol*, vol. 74, 1993. pp. 2765-2770.
- Clark DH., Casal J. "Techniques for haemagglutination and haemagglutination inhibition with arthropod borne virus." *Am J Trop Med Hyg*, vol. 7, 1958. pp. 561-573.
- Creighton TE. "Folding of proteins adsorbed reversibly to ion-exchange resins." *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol*, vol. 39, 1985. pp. 249-258.
- Cohen SN., Chang ACY., Hsu L. "Nonchromosomal antibiotic resistances in bacteria : Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." *Proc Natl Acad Sci*, vol.69, 1972. pp. 2110.
- David V and others. *Gene expression technology. Methods in Enzymology: California, U.S.A. : Academic press*, vol.185, 1990.
- Falgout B., Lai CJ. "Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a." *J Virol*, vol.63, 1989. pp. 1852-60.
- Fan W., Mason PW. "Member association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1 cDNA." *Virology*, vol.177, 1990. pp. 470-76.
- Geng X., X Chang. "High-performance hydrophobic interaction chromatography as a tool for protein refolding." *J. Chromatogr*, vol. 599, 1992. pp. 185-194.
- George HJ., L'Italien JJ., Pilacinski WP., Glassman DL., Krzyzek RA. "High-level expression in *Escherichia coli* of biologically active bovine growth hormone." *DNA*, vol. 4, no. 4, 1985. pp. 273-81.

- Goeddel DV., Kleid DG., Bolivar F., Heyneker HL and other. "Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin." Proc Natl Acad Sci, vol. 76, 1979. pp. 106-10.
- Hagel P., Gerding JJ., Fieggen W., Bloemendal H. "Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH." Biochim Biophys Acta, vol. 243, no. 3, 1971. pp. 366-73.
- Henchal EA., Putnak JR. "The dengue viruses." Clinical Microbiology Reviews, vol. 3, 1990. pp. 376-396.
- Holzinger A., Phillips KS., Weaver TE. "Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B." Biotechniques, vol. 20, no. 5, 1996. pp. 804-6.
- Innis A., Myambo B., Gelfand H., Brow D. "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA." Proc Natl Acad Sci, vol. 85, 1988. pp. 9436-9440.
- Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs AD., Heyneker HL., Bolivar F., Boyer HW., "Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin." Science, vol. 198, 1977. pp. 1056-63.
- Jarumanokul R. "Cloning and expression of dengue virus envelope protein gene iv *Escherichia coli*." [Master degree in Microbiology. Faculty of Medicine, Siriraj Hospital.] : Mahidol University, 1996. pp. 66-7.
- Kerschner JA., Vorndam AV., Monath TP., Trent DW. "Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes." Journal of General Virology, vol. 67, 1986. pp. 2645-2661.
- Lai CJ., Pethel M., Jan LR., Hawano H., Cahour A., Falgout B. "Processing of dengue type 4 and other flavivirus nonstructural proteins." Archives of Virology, vol. 9, 1994. pp. 359-368.
- Lanciotti RS., Lewis JG., Gubler DJ., Trent DW. "Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses." Journal of General Virology, vol. 75, 1994. pp. 65-75.
- Lee N., Cozzitorto J., Wainwright N., Testa D. "Cloning with tandem gene systems for high level gene expression." Nucleic Acids Res, vol. 12, no. 17, 1984. pp. 6797-812.

- Lewis JA., Chang G-J., Lanciotti RS., Kinney RM., Mayer LW., Trent DW. "Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses." *Virology*, vol. 197, 1993. pp. 216-224.
- Mandl CW., Guirakhoo F., Holzmann H., Heinz FX., Kunz C. "Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model." *Journal of Virology*, vol. 63, no. 2, 1989. pp. 564-71.
- Maina CV., riggs PD., Gradea III AG. "An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein." *Gene*, vol.74, 1988. pp. 365-373.
- Mandel M., Higa A. "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." *J Mol Biol*, vol. 53, 1970. pp. 159.
- Manitis T., Sambrook J., Fritsch EF. "Molecular cloning a laboratory Manual." New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982.
- Marston FAO. "The purification of eukaryote polypeptide synthesized in *Escherichia coli*." *Biochem J*, vol. 240, 1986. pp. 1-12.
- Mason PW., Zugel MU., Semproni AR., Fournier MJ., Mason TL. "The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*." *J Gen Virol*, vol. 71, 1990. pp. 2107-14.
- Monaco L., Bond HM., Howell KE., Cortese R. "A recombinant apoA-1-protein A hybrid reproduces the binding parameters of HDL to its receptor." *EMBO J*, vol.6, no. 11, 1987. pp. 3253-60.
- Morens DM., Halstead SB., Repik PM., Putivatana R., Raybourne N. "Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells : comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization." *J Clin Microbiol*, vol. 22, no. 2, 1985. pp. 250-254.
- Nilsson B., Abrahmsen L., Uhlen M. "Immobilization and purification of enzymes with staphylococcal protein A gene fusion vectors." *EMBO J*, vol. 4, no.4, 1985. pp. 1075-80.
- Nuangplee S. "Cloning and expression of dengue virus proteins in a prokaryotic system: an expression using polyhistidine as carrier peptide." [Master degree in Microbiology. Faculty of Medicine, Siriraj Hospital.]: Mahidol University, 1997.
- Osatomi K., Sumiyoshi H. "Complete nucleotide sequence of dengue 3 virus genome RNA." *Virology*, vol. 176, 1990. pp. 643-647.

- Pongtintong-ngarm S. "Cloning of dengue virus envelope protein gene fragments and expression of peptide domains as fusion proteins in *Escherichia coli*." [Master degree in Microbiology. Faculty of Medicine, Siriraj Hospital.]: Mahidol University, 1997.
- Porath J. "Immobilized metal ion affinity chromatography." *Prot Express & Purif*, vol. 3, 1992. pp. 263-81.
- Rebecca G., Lucy CS. "Clinical spectrum of dengue infection." In Gubler DJ and Kuno G, *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, London, United Kingdom. 1997. pp 89-113.
- Roehrig JT. "Clinical spectrum of dengue infection." In Gubler DJ and Kuno G, *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, London, United Kingdom. 1997. pp. 199-219.
- Rey FA., Heinz FX., Mandie C., Kunz C., Harrison SC. "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution." *Nature*, vol. 375, 1995. pp. 291-8.
- Rice CM., Lenches EM., Eddy SR., Shin SJ., Sheets RL., Strauss JH. "Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution." *Science*, vol. 229, 1985. pp. 726-735.
- Rico-Hesse R. "Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature." *Virology*, vol. 174, 1990. pp. 479-493.
- Roehrig JT. "Immunochemistry of dengue viruses." In Gubler DJ and Kuno G, *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, London, United Kingdom. 1997. pp. 199-216.
- Russell PK., McCown JM. "Comparison of dengue-2 and dengue-3 strains by neutralization tests and identification of a subtype of dengue-3." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.21, 1972. pp. 97-99.
- Seeburg PH., Shine J., Martial JA., Ivarie RD and other. Synthesis of growth hormone by bacteria. *Nature*, vol. 276, 1978. pp. 795-8.
- Shi PY., Maizels N., Weiner AM. "Recovery of soluble, active recombinant protein from inclusion bodies." *Biotechniques*, vol. 23, no. 6, 1997. pp. 1036-8.
- Simmons M., Nelson WM., Wu SJ., Hayes CG. "Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice." *Am J Trop Med Hyg*, vol. 58, no. 5, 1998. pp. 655-62.

- Simmons M., Nelson WM., Wu SJ., Hayes CG. "Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice." *Am J Trop Med Hyg*, vol. 58, no. 5, 1998. pp. 655-62.
- Sinha D., Bakhshi M., Vora R. "Ligand binding assays with recombinant proteins refolded on an affinity matrix." *Biotechniques*, vol.17, no.3, 1994. pp. 509-12, 514.
- Smith DB., Johnson KS. "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli*." *Gene*, vol.67, no.1, 1988. pp. 31.
- Stempfer G., Holl-Neugebauer B., Kopetzki E., Rudolph R. "A fusion protein designed for noncovalent immobilization: stability, enzymatic activity, and use in an enzyme reactor." *Nat Biotechnol*, vol. 14, no. 4, 1996. pp. 481-4.
- Sugrue RJ., Cui T., Xu Q., Fu J., Chan YC. "The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*." *J Virol Methods*, vol. 69(1-2), 1997. pp. 159-69.
- Sukhavachana P., Yuill TM., Russell PK. "Assay of arbovirus neutralizing antibody by micromethods." *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, vol. 63, 1967. pp. 446-55.
- Takacs BJ., Girard MF. "Preparation of clinical grade proteins produced by recombinant DNA technologies." *J Immunol Methods*, vol. 143, 1991. pp. 231-40.
- Tan BH., Fu J., Sugrue RJ., Yap EH., Chan YC., Tan YH. "Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity." *Virology*, vol. 216, 1996. pp. 317-325.
- Tindall R., Kunkel A. "Fidelity of DNA Synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA Polymerase." *Biochemistry*, vol. 27, 1988. pp. 6008-6013.
- Trent DW., Manske CL., Fox GE., Chu MC., Kliks SC., Monayh TP. "The molecular epidemiology of dengue viruses: genetic variation and microevaluation." *Applied Virology Research*, vol. 2, 1990. pp. 293-315.
- Varadarajan R., Szabo A., Boxer SG. "Cloning, expression in *Escherichia coli*, and reconstitution of human myoglobin." *Proc Natl Acad Sci*, vol. 82, 1985. pp. 5681-4.
- Vorndam V., Nogueira RM., Trent DW. "Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses." *Archives of Virology*, vol. 136, pp. 191-196.
- Walker PJ., Henschal EA., Blok J., Repik PM., Henschal LS., Burke DS., Robbbins SJ., Gorman BM. "Variation in dengue type 2 viruses isolated in Bangkok during 1980." *Journal of General Virology*, vol. 69, 1988. pp. 591-602.

- Warrener P., Tamura JK., Collett MS. "RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria." *Journal of Virology*, vol. 67, 1993. pp. 989-996.
- Wengler G and Wengler G. "The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity" vol. 197, 1993. pp. 265-273.
- Westaway EG and Blok J. "Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses." In Gubler DJ and Kuno G, *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, London, United Kingdom.1997. pp. 147-173.
- Yenchitsomanus PT., Srirachoen P., Jaruthasana J., Pathanakitsakul S., Nitayaphan S., Mongkolsapaya J., Malasit P. "Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR)." *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, vol. 27, 1996. pp. 228-36.



ภาคผนวก

1 สารละลายที่ใช้ทำ RT-PCR

- 1.1 น้ำที่ปราศจากเอนไซม์ทำลายอาร์เอ็นเอหรือ DEPC-H₂O 0.1 เปอร์เซ็นต์
Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 97% 1.0 มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตรและบ่มไว้ตลอดทั้งคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
แล้วทำการฆ่าเชื้อ
- 1.2 สารละลาย Trizol (บริษัท Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)
- 1.3 สารละลาย 10x buffer II ประกอบด้วย
โพแทสเซียมคลอไรด์ 500 มิลลิโมลาร์
Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.3
- 1.4 สารละลาย dNTP 10 มิลลิโมลาร์ ประกอบด้วย
dATP 10 มิลลิโมลาร์ dCTP 10 มิลลิโมลาร์ dGTP 10 มิลลิโมลาร์ dTTP 10
มิลลิโมลาร์
- 1.5 สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์
- 1.6 2-ไอโซโพรพานอล
- 1.7 สารละลายคลอโรฟอร์ม
- 1.8 สารละลาย RNAsin 40 หน่วยต่อไมโครลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* สูตร LB (Luria-Bertani medium

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท Rich medium หรือ Chemically undefined medium อาหารนี้มีสารอาหารจำพวกกรดอะมิโน เพปไทด์ ฟอสเฟต วิตามิน และอื่น ๆ ครบถ้วน แหล่งอาหารเหล่านี้ได้มาจากสารสกัดธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากยีสต์ ที่ให้สารอาหารทุกอย่างครบ ทริปโตเนตได้จากการใช้เอนไซม์ย่อยนมซึ่งจะให้กรดอะมิโนครบทุกตัว อัตราการเจริญเติบโตของ *E. coli* จะเจริญได้เร็วมากเพราะเซลล์ไม่สูญเสียพลังงานในการสร้างสารอาหารที่จำเป็น เตรียมได้จาก

ทริปโตเนต	10.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม

ปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง
ความดัน

3 สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดด้วยวิธีอัลคาไลน์ (Alkaline extraction)

3.1 สารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8.0

Tris-HCl 1 โมลาร์พีเอช 8.0 5.0 มิลลิลิตร

EDTA 0.5 โมลาร์พีเอช 8.0 1.0 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

3.2 สารละลาย Solution I (Lysis buffer) : น้ำตาลกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์,

Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ พีเอช8.0, EDTA 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0

เตรียมได้จาก

น้ำตาลกลูโคส 0.9 กรัม

Tris-HCl 1 โมลาร์พีเอช 8.0 2.5 มิลลิลิตร

EDTA 0.5 โมลาร์พีเอช 8.0 2.0 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.3 สารละลาย Solution II : 0.2 M NaOH. 1% SDS เตรียมได้จาก

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ 4.0 มิลลิลิตร

sodium dodecyl sulphate 10 เปอร์เซ็นต์ 10.0 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.4 สารละลาย Solution III : โพแทสเซียมอะซิเตต 3 โมลาร์ พีเอช 4.8

โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK) 29.4 กรัม

กรดอะซิติก 40.0 มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 4.8 ด้วยกรดอะซิติก

3.5 สารละลายฟีนอล : สารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวในน้ำ

4. สารละลายสำหรับวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.1 สารละลายบัฟเฟอร์ TAE (Tris-acetate) (50X)

Tris base	242 กรัม
Glacial acetic acid	57.1 มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

4.2 สารละลาย 6x gel loading buffer

1% bromophenol blue	2.5 มิลลิลิตร
1% xylene cyanol	2.5 มิลลิลิตร
glycerol	3.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.0 มิลลิลิตร

4.3 1% agarose

Agarose	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร



5 สารละลายในขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยวิธี Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

5.1 สารละลาย 8M Guanidine-HCl lysis buffer พีเอช 8.0 : NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์

Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ guanidine-HCl 6 โมลาร์ NaCl 100 มิลลิโมลาร์

NaH_2PO_4 2 โมลาร์ 1.25 มิลลิลิตร

Tris-HCl 1 โมลาร์ พีเอช8.0 0.5 มิลลิลิตร

Guanidine hydrochloride 28.68 กรัม

NaCl 4 โมลาร์ 1.25 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเป็น 8.0

5.2 สารละลาย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 : NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl

10 มิลลิโมลาร์, urea 8 โมลาร์, NaCl 100 มิลลิโมลาร์

NaH_2PO_4 2 โมลาร์ 1.25 มิลลิลิตร

Tris-HCl 1 โมลาร์ พีเอช8.0 0.5 มิลลิลิตร

urea 24.05 กรัม

NaCl 4 โมลาร์ 1.25 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเป็น 8.0

5.3 สารละลาย 8M wash buffer พีเอช 7.0: NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์ urea 8 โมลาร์

NaCl 100 มิลลิโมลาร์

NaH_2PO_4 2 โมลาร์ 5.0 มิลลิลิตร

Urea 24.05 กรัม

NaCl 4 โมลาร์ 1.25 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเป็น 7.0

5.3 สารละลาย 8M elution buffer พีเอช 4.5 : NaH_2PO_4 50 มิลลิโมลาร์ urea 8

โมลาร์ NaCl 100 มิลลิโมลาร์ MES 20 มิลลิโมลาร์

NaH_2PO_4 2 โมลาร์ 10.0 มิลลิลิตร

Urea 24.05 กรัม

NaCl 4 โมลาร์ 1.25 มิลลิลิตร

MES 1 โมลาร์ 1.0 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเป็น 4.5

6 สารละลายสำหรับ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

- 6.1 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์
 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต(Sigma) 1.0 กรัม
 ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
- 6.2 สารละลาย Resolving gel buffer พีเอช 8.8: Tris-HCl 3 โมลาร์ พีเอช 8.8
 Tris(Sigma) 36.3 กรัม
 ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์
 และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศา
 เซลเซียส
- 6.3 สารละลาย Stacking gel buffer พีเอช 6.8 : Tris-HCl 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8
 Tris (Sigma) 6.0 กรัม
 ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับให้ได้พีเอช 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์
 และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศา
 เซลเซียส
- 6.4 สารละลาย Polyacrylamide-bisacrylamide 30.8 เปอร์เซ็นต์
 Polyacrylamide 30 เปอร์เซ็นต์ 30.0 กรัม
 Bis-acrylamide 0.8 เปอร์เซ็นต์ 0.8 กรัม
- 6.5 สารละลาย Sodium dodecyl sulphate 10 เปอร์เซ็นต์ (10% SDS)
 Sodium dodecyl sulphate 10.0 กรัม
 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
- 6.6 TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethlenediamine)
- 6.7 การเตรียม Resolving gel 10 เปอร์เซ็นต์
 Acrylamide-bisacrylamide 30.8 เปอร์เซ็นต์ 3.3 มิลลิลิตร
 น้ำกลั่น 5.2 มิลลิลิตร
 สารละลาย Resolving gel buffer. 25 มิลลิลิตร
 10% SDS 100 ไมโครลิตร
 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ 75 ไมโครลิตร
 TEMED 5 ไมโครลิตร
- 6.8 การเตรียม Stacking gel 3.85 เปอร์เซ็นต์
 Acrylamide-bisacrylamide 30.8 เปอร์เซ็นต์ 0.50 มิลลิลิตร
 น้ำกลั่น 2.43 มิลลิลิตร
 Stacking gel buffer 1.0 มิลลิลิตร
 10% SDS 40 ไมโครลิตร
 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ 30 ไมโครลิตร

TEMED

3 ไมโครลิตร

6.9 10x Running buffer พีเอช 8.3 : Tris-HCl 0.25 โมลาร์ Glycine 1.92 โมลาร์
SDS 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช8.3

Tris 0.25 โมลาร์ 30.3 กรัม

Glycine 1.92 โมลาร์ 144.0 กรัม

SDS 1 เปอร์เซ็นต์ 10.0 กรัม

ละลายและปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

6.10 4xReducing sample buffer (4xRSB): Tris-HCl 0.0625 โมลาร์ พีเอช 6.8
SDS 8 เปอร์เซ็นต์ (w/v) glycerol 40 เปอร์เซ็นต์ Bromophenol blue 0.005
เปอร์เซ็นต์

SDS 8 เปอร์เซ็นต์ 0.8 กรัม

กลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ 4.0 มิลลิลิตร

Tris-HCl 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.8 5.0 มิลลิลิตร

Bromophenol blue 0.5 มิลลิกรัม

ละลายและปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

เวลาใช้ใส่ 2-mercaptoethanol (2-ME) 1 มิลลิลิตรเติมด้วย 4xsample buffer 9
มิลลิลิตร

7 สารละลายสำหรับการย้อมเจลด้วยวิธี Coomassie blue staining

7.1 น้ำยาย้อมสี Coomassie brilliant blue

Coomassie brilliant blue 0.25 กรัม

เมทานอล 45.0 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 45.0 มิลลิลิตร

กรดแอสซิติก 10.0 มิลลิลิตร

7.2 น้ำยา Destain

กรดแอสซิติก 100 มิลลิลิตร

เมทานอล 300 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร

8 สารละลายสำหรับการทำ Western blot

8.1 สารละลาย Transfer buffer : Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช8.3, Glycine 150 มิลลิโมลาร์, เมทานอล 20 เปอร์เซ็นต์

Tris 3.0 โมลาร์ 1.211 กรัม

Glycine 5.63 กรัม

ละลายและปรับปริมาตรให้ได้ 400 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและเติม สารละลาย เมทานอล 100 มิลลิลิตร

8.2 สารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) พีเอช7.4

โพแตสเซียมคลอไรด์ 0.20 กรัม

แมกนีเซียมคลอไรด์ 8.00 กรัม

KH_2PO_4 40.24 กรัม

Na_2HPO_4 41.44 กรัม

น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

8.3 สารละลาย Blotting buffer : นมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ละลายในสารละลาย phosphate buffer saline พีเอช7.4

นมพร่องมันเนย 5.0 กรัม

ละลายในสารละลาย PBS pH 7.4 และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

8.4 Chromogenic substrate

3,3' Diaminobenzamide (Sigma) 20.0 มิลลิกรัม

ละลายใน 50 มิลลิลิตร สารละลาย PBS พีเอช 7.4 และใส่สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุภา ศรีสะอาด เกิดเมื่อวันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2516 ที่โรงพยาบาลเด็ก กรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยรังสิต ปีการศึกษา 2537

ได้รับทุนการศึกษาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติในการศึกษาปริญญาโทที่คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเป็นระยะเวลา 2 ปี

เสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการของสมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วทท.) ประจำปี 2540 ครั้งที่ 23 ได้แก่

Puttikhunt P, Srisa-ard S, Pattanakitsakul S, Yenchitsomanus P and Malasit P (1997) Expression and purification of dengue viral envelope protein in *E.coli*. 23rd Congress on Science and Technology of Thailand. pp. 718-719.

