

การแสดงออกของโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง NS1 ของไวรัสเด็งกีใน
E. coli

EXPRESSION OF DENGUE VIRUS NON-STRUCTURAL PROTEIN (NS1)
GENE FRAGMENTS IN E. coli



วิทยานิพนธ์นี้เป็นลิขสิทธิ์ของโรงพยาบาลต๋อนพรอม อนุญาตให้นำไปใช้เพื่อการศึกษาได้โดยไม่เสียค่าลิขสิทธิ์

ต๋อนพรอม โรงพยาบาลต๋อนพรอม

ต๋อนพรอม

ต๋อนพรอม โรงพยาบาลต๋อนพรอม

พ.ศ. ๒๕๕๕

ISBN 974-000-141-8

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การแสดงออกของโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง NS1 ของไวรัสเด็งกีใน
E.coli

EXPRESSION OF DENGUE VIRUS NON-STRUCTURAL PROTEIN (NS1)
GENE FRAGMENTS IN *E.coli*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2544

ISBN 974-648-142-8

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน... 39623
วัน, เดือน, ปี... 8 ส.ย. 2544

.b.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EXPRESSION OF DENGUE VIRUS NON-STRUCTURAL PROTEIN (NS1)
GENE FRAGMENTS IN *E.coli*



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

2001

ISBN 974-648-142-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2001

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

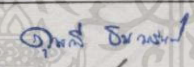
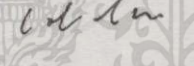
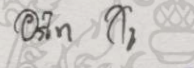
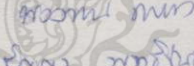
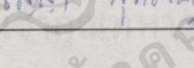
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง NS1 ของไวรัสเด็งกี
 ใน *E.coli*
 EXPRESSION OF DENGUE VIRUS NON-STRUCTURAL PROTEIN
 (NS1) GENE FRAGMENTS IN *E.coli*

ชื่อนักศึกษา นางสาวชนพรพรณ พร้อมมูล
รหัสประจำตัว 39065212
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ดร.ชัชญา พุทธิจันทร์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.เนาวรัตน์ ปานเข้ม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.คุณฉวี	ชนะบริพัฒน์	
ผศ.เนาวรัตน์	ปานเข้ม	
ผศ.อรไท	สุขเจริญ	
ผศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	
ดร.ชัชญา	พุทธิจันทร์	

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 22 กุมภาพันธ์ 2544 เวลา 13.30 น. เป็นต้นไป
สถานที่สอบ ณ ห้อง 424 ห้องประชุม-สัมมนา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

 (รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัครฐ)
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง NS1 ของไวรัสเด็งกีใน <i>E.coli</i>
นักศึกษา	นางสาว ธนพรรณ พร้อมมูล
รหัสประจำตัว	39065212
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2544
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร.ชัญญา พุทธิพันธ์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม

บทคัดย่อ

ทำการสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 ที่มีส่วนของชิ้นยีน NS1 ขนาดเล็กที่มีเฉพาะส่วนปลายอะมิโนขนาด 814 คู่เบส (ตัดยีนขนาด 214 คู่เบสที่ปลายคาร์บอกซีออก) ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ New Guinea C (NGC) ในเวกเตอร์ pTrcHis ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกใน *E.coli* เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG เชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 ที่มีกรดอะมิโนต่อโปรตีน NS1 จำนวน 271 ตัว และมีกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัวเป็นเปปไทด์พาสเจอร์อยู่ปลายอะมิโน ซึ่งยังคงแสดงออกอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ การแยกโปรตีน 6H- Δ NS1 ให้บริสุทธิ์ทำได้โดยวิธี Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) ในสภาวะที่โปรตีนถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (denaturing condition) โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตันเพียงขนาดเดียวเท่านั้นจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western blot ถึงแม้จะพบว่ามีโปรตีนขนาดเล็กอื่นๆ ที่ทำปฏิกิริยาได้กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน NS1 (1B2) ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ก็ตาม

จากการคืนสภาพธรรมชาติ (refolding) ของโปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 ทั้ง 3 วิธี พบว่าการเพิ่มพีเอช พร้อมกับการเติมสารละลาย DTT ก่อนการไดอะไลซ์โปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติในไกลซีนบัฟเฟอร์เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการคืนสภาพธรรมชาติของโปรตีน เพราะสามารถกำจัดสารดีเนเจอร์แรนททั้งหมดออกจากสารละลายโปรตีนได้ แต่จะต้องใช้โปรตีนเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นต่ำ (ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่วิธีการไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ที่มียูเรียน้อยไปจนถึงไม่มียูเรียอยู่เลย พบว่าโปรตีน 6H- Δ NS1 ยังคงต้องการยูเรียอย่างน้อย 2.5 โมลาร์ เพื่อรักษาสภาพการละลาย ส่วนวิธีการเจือจางโปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 ลงในบัฟเฟอร์ที่มี L-arginine ร่วมกับ oxidized/reduced glutathiones เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าวิธีอื่นๆ เพราะโปรตีนส่วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตกตะกอนเกือบทั้งหมดระหว่างการ refolding โปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 สามารถทำปฏิกิริยากับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน NS1 และซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก ดังนั้นรีคอม บิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 จึงน่าจะมีศักยภาพที่จะใช้เป็นแอนติเจนในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย ไข้เลือดออกต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Expression of Dengue Virus Non-structural Protein (NS1) Gene Fragments in <i>E.coli</i>
Student	Miss Tanapan Prommool
Student ID	39065212
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2001
Thesis Advisor	Dr.Chunya Puttikhunt
Thesis Co-Advisor	Assist Prof Nawarat Panyam

ABSTRACT

The 5' end of 814-bp-NS1 gene fragment (lacking 241 bp at the 3' end) of dengue virus serotype 2 (strain NGC) was subcloned into pTrcHis expression vector and transformed into *E.coli*. The *E.coli* containing recombinant plasmid pTrcHis/ Δ NS1 were selected by restriction digestion of extracted plasmid DNA. Under IPTG induction, *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) could produce recombinant protein 6H- Δ NS1 containing N-terminal hexahistidine fusion tag and 271 amino residues of C-terminal truncated NS1. The 6H- Δ NS1 protein was expressed as inclusion body. Purification of the truncated NS1 was performed by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) under denaturing condition. The purified protein appeared as a single band at 35 kDa by SDS-PAGE and Western blot analysis, although a few smaller bands were reacted to specific NS1 monoclonal antibody (1B2) prior to purification.

Refolding of the purified 6H- Δ NS1 has been done by three methods. The increment of pH as well as the addition of dithiothreitol (DTT) prior to dialyze the denatured protein in glycine buffer was the best refolding method to remove all denaturants out of protein solution. However, the lower initial protein concentration (less than 0.2 mg/ml) was preferable. Dialysis of the denatured purified protein in the buffer

containing stepwise reduction of urea demonstrated that the 6H- Δ NS1 protein still required at least 2.5 M urea for its solubilization. Dilution of the denatured 6H- Δ NS1 in refolding buffer containing L-arginine and oxidized /reduced glutathiones was less efficiently than other refolding methods since the protein almost aggregated during refolding process. The purified protein could react to the specific NS1 monoclonal antibody and pooled sera from dengue patients. The recombinant truncated NS1 has, therefore, a potential to be developed into a dengue diagnostic kit.



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ปรีดา มาลาสิทธิ์ ผศ.ดร. เพทาย เย็นจิตรโสมนัส และ ผศ.ดร. สง่า พัฒนากิจสกุล ที่ให้โอกาสข้าพเจ้ามาทำงานวิจัยที่มีคุณค่า รวมทั้งให้คำแนะนำที่มีค่า ช่วยแก้ไขปัญหา และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาที่ข้าพเจ้าได้มาทำวิทยานิพนธ์ที่หน่วยอนุชีววิทยาการแพทย์แห่งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ชัญญา พุทธิพันธ์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็น อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำ สั่งสอน และโอกาสในการเรียนรู้สิ่งใหม่ๆ รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำปรึกษาและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ดุชนิ ธนะบริพัฒน์ ผศ.ดร.นवलพรรณ ณ ระนอง และ ผศ.อรไท สุขเจริญ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ น้องๆ ทุกคน ในหน่วยอนุชีววิทยาการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ให้ความช่วยเหลือและความร่วมมือในด้านต่างๆ อย่างใกล้ชิดตลอดมา

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติและบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และน้องๆทุกคนในครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้ความรัก คำแนะนำ สั่งสอน กำลังใจที่มีค่ายิ่งกับข้าพเจ้าและสนับสนุนปัจจัยต่างๆในการเรียนตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ข้าพเจ้าขอมอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ธนพรรณ พร่อมมูล

สารบัญ

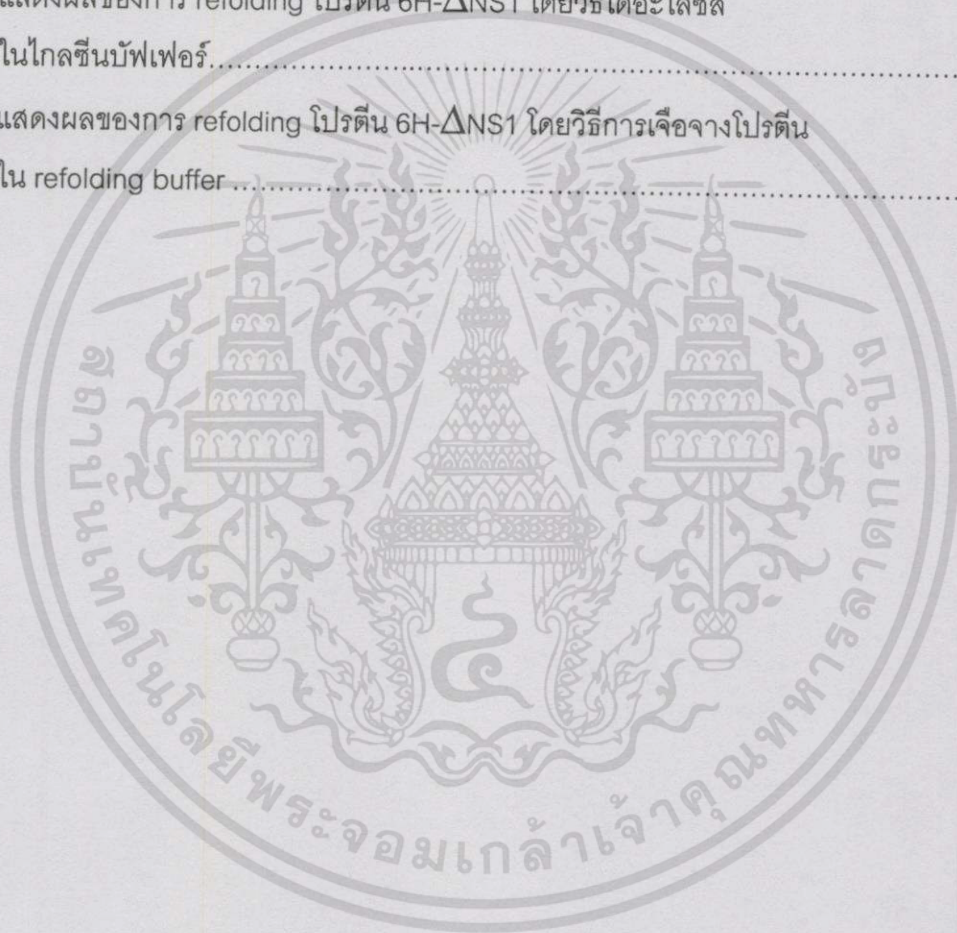
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญรูป.....	X
รายการคำย่อ.....	XI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์.....	5
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	6
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 โครงสร้างของไวรัสเด็งกี.....	7
2.2 ลักษณะโปรตีนของไวรัสเด็งกี.....	10
2.3 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม.....	14
2.4 การแยกรีคอมบิแนนต์โปรตีน จาก <i>E.coli</i> ในรูปของ inclusion body.....	17
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนของไวรัสเด็งกีใน <i>E.coli</i>	19
บทที่ 3 เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์.....	21
3.1 เครื่องมือ.....	21
3.2 วัสดุภัณฑ์.....	22
3.3 จุลินทรีย์.....	22
3.4 แอนติบอดี.....	23
3.5 เอนไซม์.....	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6 ดีเอ็นเอและโปรตีนมาตรฐาน.....	23
3.7 เวกเตอร์เพื่อการแสดงออกในระบบ <i>E.coli</i>	23
3.8 สารเคมี.....	24
บทที่ 4 วิธีการทดลอง.....	27
4.1 การเตรียมพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1.....	27
4.2 การตรวจสอบทรานสเฟอร์แมนที่ที่รับดีเอ็นเอสายผสม pTrcHis/ Δ NS1.....	30
4.3 วิธีการเหนี่ยวนำให้ <i>E.coli</i> ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/ Δ NS1 สร้างโปรตีน 6H- Δ NS1.....	31
4.4 การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของรีคอมบิแนนต์โปรตีน.....	31
4.5 การตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนโดยวิธี Dot Enzyme Immunoassay (DEIA).....	33
4.6 การแยกรีคอมบิแนนต์โปรตีนให้บริสุทธิ์.....	33
4.7 การคืนสภาพธรรมชาติของรีคอมบิแนนต์โปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1.....	35
4.8 วิธีการหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยชุดวัดโปรตีนสำเร็จรูป.....	36
บทที่ 5 ผลการทดลอง.....	37
5.1 การสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1.....	37
5.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1.....	40
5.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน.....	42
5.4 การตรวจสอบคุณสมบัติการละลายน้ำของรีคอมบิแนนต์โปรตีน.....	48
5.5 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC).....	50
5.6 การกำจัดยูเรียออกจากสารละลายโปรตีน 6 H- Δ NS1 บริสุทธิ์.....	55
บทที่ 6 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	59

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงขนาดของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ ของเด็กที่ไวรัส ซีโรทัยป์ 2.....	9
5.1 แสดงผลของการ refolding โปรตีน 6H- Δ NS1 โดยวิธีไดอะไลซิสด้วย การลดปริมาณยูเรียลงเป็นลำดับ.....	55
5.2 แสดงผลของการ refolding โปรตีน 6H- Δ NS1 โดยวิธีไดอะไลซิส ในไกลซีนบัฟเฟอร์.....	56
5.3 แสดงผลของการ refolding โปรตีน 6H- Δ NS1 โดยวิธีการเจือจางโปรตีน ใน refolding buffer.....	57



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โปรตีนส่วนต่างๆของอนุภาคที่ครบสมบูรณ์ของ <i>Flavivirus</i>	8
2.2 ส่วนประกอบของเวกเตอร์ pTrcHis A, B, C.....	16
4.1 การสร้างพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 โดยการตัดยีน NS1 จากพลาสมิดpTrcHis/NS1 ด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ <i>HindIII</i>	28
5.1 การย่อยพลาสมิด pTrcHis/NS1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>HindIII</i> บนวุ้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์.....	38
5.2 การคัดเลือกโคลน <i>E.coli</i> ที่มีพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 โดยการสกัด พลาสมิดดีเอ็นเอจาก <i>E.coli</i> โคลนต่างๆ.....	39
5.3 การวิเคราะห์ Western blot ของโปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำโคลน <i>E.coli</i> (pTrcHis/ Δ NS1) ด้วย 1 mM IPTG.....	41
5.4 การแยกโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ <i>E.coli</i> (pTrcHis/ Δ NS1) สายพันธุ์ต่างๆ.....	43
5.5 การแยกโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ <i>E.coli</i> (pTrcHis/ Δ NS1) ด้วยสาร ละลาย IPTG ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.5 มิลลิโมลาร์.....	45
5.6 การแยกโปรตีนจากการเหนี่ยวนำเซลล์ <i>E.coli</i> (pTrcHis/ Δ NS1) ด้วย 0.2 mM IPTG ตั้งแต่ช่วง เวลาที่ 1 ถึง 7.....	47
5.7 การแยกโปรตีนจากเซลล์ <i>E.coli</i> (pTrcHis/ Δ NS1) หลังการทำให้เซลล์แตก	49
5.8 กราฟแสดงปริมาณโปรตีน 6H- Δ NS1 ของแต่ละหลอดที่ได้จากการชะออกจากคอลัมน์ IMAC โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (OD280).....	51
5.9 การทำ Dot Enzyme Immunoassay (DEIA) ของโปรตีน 6H- Δ NS1 จากแต่ละขั้นตอนของการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์.....	52
5.10 การแยกโปรตีน 6H- Δ NS1 จาก <i>E.coli</i> (pTrcHis/ Δ NS1) ที่ผ่านการ ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี IMAC.....	54
5.11 แสดงการแยกโปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ด้วยวิธี Western blot analysis โดยทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน NS1 (1B2).....	58

รายการคำย่อ

6H- Δ NS1	recombinant dengue-2 nonstructural 1 truncated protein with 6 histidine as carrier peptide
aa	amino acid
BSA	Bovine serum albumin
DEIA	Dot Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
MCS	Multiple Cloning Site
Mab	Monoclonal Antibody
MBP	Maltose Binding Protein
nt	Nucleotide
ORI	Origin of Replication
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
bp	basepair
PBS	Phosphate buffer saline

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

โรคไข้เลือดออกเด็งกี (Dengue Hemorrhagic Fever, DHF) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของประเทศไทยและประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งแต่ละปีจะมีผู้ป่วยจำนวนมาก โรคไข้เลือดออกเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นใหม่ (emerging disease) พบเมื่อ 46 ปีที่แล้ว โดยพบระบาดครั้งแรก ที่ประเทศฟิลิปปินส์เมื่อ พ.ศ. 2497 หลังจากนั้นก็พบว่ามีการะบาดของหนักๆ ใน 3 ทวีป ได้แก่ ทวีปเอเชีย แอฟริกา และ อเมริกาเหนือ (Rush 1789 ; Hirsch 1883 ; Pepper 1941 ; Howe 1977) ปัจจุบันพบการะบาดของโรคนี้ไปทั่วโลกแล้ว สำหรับในประเทศไทยมีการระบาดของโรคไข้เลือดออกครั้งแรกในปี 2501 มีผู้ป่วย 2,158 คน คิดเป็นอัตราป่วยเท่ากับ 8.8 ต่อประชากรแสนคน มีอัตราป่วยตายร้อยละ 13.90 โดยมีรายงานสูงสุดในปี พ.ศ. 2530 คือ 174,285 ราย มีอัตราป่วยตายร้อยละ 0.5 ในปี 2541 มีรายงานผู้ป่วย 127,189 ราย คิดเป็นอัตราป่วยร้อยละ 209.14 ต่อประชากรแสนคน และมีอัตราป่วยตายร้อยละ 0.34 (กระทรวงสาธารณสุข 2542) สังเกตได้ว่าจำนวนผู้ป่วยมีแนวโน้มสูงมาตลอด แต่อัตราป่วยตายลดลงอย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากแพทย์มีความรู้และเข้าใจในอาการของโรคไข้เลือดออก รวมถึงวิธีการวินิจฉัยโรค และการดำเนินการรักษาอย่างถูกต้องมากขึ้นทำให้สามารถลดอัตราการตายลงได้ แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังพบการะบาดของโรคอย่างกว้างขวาง โดยจะพบผู้ป่วยในทุกจังหวัดและทุกภาคของประเทศไทย

โรคไข้เลือดออกเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี (dengue virus) ซึ่งมี 4 ซีโรทัยป์ (serotype) เป็นไวรัสที่อยู่ในตระกูล Flaviviridae และอยู่ในสกุล *Flavivirus* การแพร่กระจายของโรคไข้เลือดออกจะมียุงลาย *Aedes aegypti* เป็นตัวพาหะที่สำคัญ โดยยุงตัวเมียจะกัดและดูดเลือดซึ่งมีไวรัสเด็งกีจากผู้ป่วยในระยะที่มีไข้สูง เชื้อไวรัสจะเข้าไปฟักตัวเพิ่มจำนวนในยุงภายในระยะ 8-10 วัน หลังจากนั้นยุงจะมีเชื้อไวรัสอยู่ในตัวตลอดอายุของมัน (ประมาณ 1-2 เดือน) และสามารถถ่ายทอดเชื้อให้คนที่ถูกกัดได้ทุกครั้ง ไข้เลือดออกจะมีการระบาดมากในเด็กอายุประมาณ 5-9 ปี และมีการระบาดในช่วงฤดูฝนของทุกปี การติดเชื้อเด็งกีส่วนใหญ่ (80-90%) จะไม่มีอาการ แต่ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อไวรัสแล้วมีอาการของโรคจากการติดเชื้อจะแบ่งอาการของโรค ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่มอาการของไข้เด็งกี (dengue fever, DF) ส่วนใหญ่พบในเด็กโตและผู้ใหญ่ ผู้ป่วยมีไข้สูง ปวดศีรษะมาก ปวดกระบอกตา ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อและข้อ มีผื่นผิวหนัง ความรุนแรงของโรคไม่ทำให้ถึงกับเสียชีวิต และอาจมีอาการเป็นไข้ที่มีลักษณะแยกจากโรคซึ่งเกิดจากสาเหตุอื่นได้ยาก (undifferentiated febrile illness) และอีกกลุ่มหนึ่งคือ ไข้เลือดออก (dengue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hemorrhagic fever, DHF) ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีอาการเช่นเดียวกับผู้ป่วยกลุ่มแรก แต่ DHF จะมีความรุนแรงกว่าเนื่องจากมีอาการรั่วของพลาสมาออกนอกหลอดเลือด (plasma leakage) ทำให้ความดันโลหิตต่ำ การตรวจวิเคราะห์ทางคลินิกจะพบว่ามีการเลือดต่ำกว่า 100,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร และมีความเข้มข้นของเลือด (Haematocrit) เพิ่มขึ้นร้อยละ 20 หรือมากกว่า (กระทรวงสาธารณสุข 2542) ถ้ามีอาการช็อกร่วมด้วย เรียกว่า Dengue Shock Syndrome (DSS) หากไม่ได้รับการดูแลอย่างถูกต้องและใกล้ชิดอาจทำให้เสียชีวิตได้ ปัจจุบันถึงแม้อัตราการตายจะน้อยลง แต่จำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกยังคงสูงเพิ่มขึ้นทุกปีในช่วงที่มีการระบาด โรคนี้จึงนับเป็นสาเหตุสำคัญของการป่วยและการตายในเด็กอย่างน้อย 8 ประเทศของทวีปเอเชียที่มีโรคนี้ชุกชุม ส่วนใหญ่ผู้ป่วยในกลุ่มไข้เลือดออกนั้นจะเป็นผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อซ้ำ (Secondary Infection) โดยที่การติดเชื้อไวรัสครั้งที่ 2 จะเป็นไวรัสที่ต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์กับการติดเชื้อครั้งแรก (Gubler 1988) เนื่องจากไวรัสเด็งกี ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีลักษณะแอนติเจนบางชนิดร่วมกันจึงทำให้มีปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กล่าวคือเมื่อมีการติดเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นครั้งแรก (primary infection) จะไม่ทำให้เกิดโรคที่รุนแรง และทำให้เกิดภูมิคุ้มกันตลอดชีวิตสำหรับสายพันธุ์นั้นๆ อย่างถาวร ซึ่งจะป้องกันโรคจากการติดเชื้อซ้ำได้ แต่ถ้ามีการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสเด็งกีชนิดที่ต่างจากการติดเชื้อครั้งแรก จะเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญเพราะจะทำให้เกิดโรคที่รุนแรงขึ้นกว่าเดิมจนเป็นไข้เลือดออก (DHF) และมีอาการช็อก (DSS) ได้ เนื่องจากสมมติฐานที่ว่าภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อครั้งแรกได้ลดระดับต่ำลงจนคุ้มกันโรคข้ามชนิดไม่ได้ แต่กลับไปมีผลตรงข้ามคือ ทำให้ไวรัสเด็งกีเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ดีขึ้น เรียกปฏิกิริยาเช่นนี้ว่า antibody-dependent enhancement (ADE) (Brandt et al. 1982 ; Halstead and O'Rourke 1977 ; Moren et al. 1987) การที่แพทย์สามารถทำการตรวจวินิจฉัยโรคนี้ได้อย่างแม่นยำและรวดเร็วจะทำให้สามารถแยกกลุ่มผู้ป่วยไข้เด็งกี หรือ ไข้เลือดออก ออกจากผู้ป่วยที่มีภาวะไข้เนื่องจากเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่อาจมีอาการใกล้เคียงกัน เช่น ไข้มาเลเรีย ไข้ไทฟอยด์ ไข้หวัดใหญ่ หรือโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และสามารถให้การดูแลรักษาอย่างถูกต้องตั้งแต่ระยะแรกของโรค . ซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้ ซึ่งจะช่วยลดจำนวนของผู้ป่วยที่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลโดยรวม และลดอัตราการเสียชีวิตได้

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเด็งกีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. การตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกีจากสิ่งส่งตรวจ (Virus Isolation) โดยการนำตัวอย่างซีรัม พลาสมา หรือชิ้นเนื้อ มาแยกหาเชื้อไวรัสเด็งกีจากนั้นนำไปฉีดเข้าในสมองลูกหนูแรกเกิด (suckling mouse brain) (Meiklejohn et al. 1952) หรือในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือตัวยุง หรือลูกน้ำของยุง ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยงที่นิยมใช้ได้แก่ เซลล์ยุง เช่น C6/36 (*Aedes albopictus* larvae) (Igarashi 1978 ; Tesh 1979), AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*) (Varma et al. 1974 ;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Herbert *et al.* 1980 ; Thongcharoen *et al.* 1993) ,Tra-84 (*Toxorhynchites amboinensis*) (Kuno *et al.* 1985) หรือใช้เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น LLC-MK2 (monkey kidney cell line) (Guzman *et al.* 1984 ; Yuill *et al.* 1968), Vero (monkey kidney cell) (Hotta and Evan 1956) และ BHK 21 (baby hamster kidnet) (Diercks 1959 ; Miles and Austin 1963 ; Rosen and Gubber 1974) ส่วนยุงอาจใช้ลูกน้ำของยุงหรือตัวยุง *Aedes albopictus* (Gubber and Rosen 1976) หรือยุงยักษ์ *Toxorhynchites splendens* (Win 1982) เมื่อเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสได้แล้วสามารถนำมาตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัส (virus identification) ด้วยวิธีอิมมูโนเรืองแสง (Immuno-Fluorescence Assay, IFA) (Gubler and Sather 1988 ; Rosen and Gubler 1974) หรือการทดสอบ Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) (Russell *et al.* 1967) การแยกเชื้อไวรัสนี้เป็นการวินิจฉัยที่มีความจำเพาะสูงที่สุด แต่ทำได้ยาก และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ นอกจากนี้ตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อควรได้มาขณะผู้ป่วยยังมีชีวิตอยู่ เนื่องจากปริมาณของไวรัสจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากไข้ลดลงแล้ว (Vaughn *et al.* 1997)

2. การตรวจหาสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสเด็งกี โดยวิธี Dot Blot nucleic acid hybridization test (Henchal *et al.* 1987) หรือ เทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (Yenchitsomanus *et al.* 1996 ; Chang *et al.* 1994 ; Chow *et al.* 1993 ; Chungue *et al.* 1993 ; Lanciott *et al.* 1992 ; Finstone *et al.* 1991 ; Duebel *et al.* 1990) ทั้งสองวิธีทำได้รวดเร็ว ง่าย และสามารถบอกชี้โรทัยปของเชื้อไวรัสเด็งกีได้อย่างแม่นยำ ให้ผลเร็วกว่าการแยกเชื้อในยุง และสามารถแยกชี้โรทัยปของไวรัสได้ด้วย (Liu 1995) แต่ข้อจำกัดของการตรวจหาแอนติเจนหรือตัวเชื้อไวรัสคือ การเก็บส่งตรวจ (specimens) ต้องทำในช่วง 2-3 วันแรกที่มีอาการไข้ ซึ่งจะเป็นช่วงที่พบไวรัสได้มากที่สุด เพราะหลังจากนี้แอนติบอดีจะถูกสร้างขึ้น เพื่อทำลายไวรัส

3. การตรวจวัดภูมิคุ้มกันของร่างกาย (แอนติบอดี) ที่เกิดจากการติดเชื้อ (Serological Diagnosis) เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับคามนิยมและใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจวัดการติดเชื้อไวรัสเด็งกี สามารถตรวจได้ในซีรัมของผู้ป่วย หลังจากที่มีอาการไข้มาแล้วอย่างน้อย 2-3 วัน มีหลายวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น Hemagglutination Inhibition (HI) Test (Clarke and Casal 1958) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของการตรวจหาแอนติบอดีที่เกิดจากการติดเชื้อ วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ทั้งที่เป็นชนิด IgM Capture ELISA และชนิด IgG Capture ELISA (Dittmar *et al.* 1979 ; Chungue *et al.* 1989 ; Cardosa *et al.* 1992 ; Tadeu *et al.* 1989 ; Tio and Malasit 1995) วิธี Dot Enzyme Immunoassay (DEIA) (Cardosa *et al.* 1988) และวิธี Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) (Moren *et al.* 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจวินิจฉัยโดยใช้วิธีทาง Serology นี้ต้องการโปรตีนแอนติเจนของไวรัสเด็กที่เตรียมได้จากการเพิ่มจำนวนไวรัสในสมองลูกหนูหรือโดยการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งวิธีการเหล่านี้ต้องอาศัยห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมทั้งเครื่องมือและบุคลากรที่มีความชำนาญ รวมทั้งยังมีต้นทุนสูง ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการผลิตโปรตีนแอนติเจนของไวรัสเด็ก โดยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายกว่า สามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากในเวลาสั้น และมีต้นทุนต่ำเพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยต่อไป

จากการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา พบว่าเชื้อไวรัสเด็กซึ่งเป็นต้นเหตุของโรคไข้เลือดออกมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ประกอบด้วยส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนโครงสร้างของไวรัส (Structural gene) 3 ชนิด คือ capsid (C), pre-membrane (prM), Envelope (E) และยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Non-Structural gene) 7 ชนิด คือ NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b และ NS5 ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อเด็กจะมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแอนติเจนส่วนต่างๆของไวรัส โดยเฉพาะในส่วน capsid (C), Envelope (E) และ Non-Structural protein (NS1, NS3 และ NS5) (Churdboonchart *et al.* 1991)

โปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (Envelope protein) หรือโปรตีน E ของเด็กที่ซีโรทัยป์ 2 ได้ถูกนำมาผลิตในรูปของรีคอมบิแนนต์โปรตีนเพื่อใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัย ทั้งในรูปที่เป็นโปรตีน E ทั้งหมด (Hahn 1990 ; Roehring 1998) และบางส่วนของโปรตีน E (domain B) (Simmons 1998) ในขณะที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ (คช) ร่วมกับหน่วยอนุชีววิทยาทางการแพทย์ศิริราช ได้ทำการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน E ของเด็กทั้ง 4 ซีโรทัยป์ จาก *E.coli* ซึ่งในขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการทดลองใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยไข้เลือดออกโดยวิธี DEIA ในขณะเดียวกันทางหน่วยอนุชีววิทยาทางการแพทย์ ได้มีโครงการที่จะผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน NS1 จาก ไวรัสเด็กทั้ง 4 ซีโรทัยป์ เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติที่เป็นแอนติเจนเมื่อนำมาใช้ในชุดตรวจวินิจฉัยด้วย จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าทางหน่วยอนุชีววิทยาทางการแพทย์สามารถโคลนยีน NS1 จากไวรัสเด็กที่ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ New Guinea C (NGC) เข้าไปในเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก (expression vector) pMAL-C2 ได้เป็นพลาสมิด pMAL/NS1 และผลิตโปรตีนลูกผสม MBP-NS1 ที่ทำปฏิกิริยาได้ดีกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ NS1 แต่เมื่อนำมาใช้กับซีรัมของผู้ป่วยไข้เลือดออก พบว่าส่วนของโปรตีน MBP จะทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนปกติได้เช่นกัน จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในชุดตรวจวินิจฉัย ดังนั้นจึงได้ทำการตัดต่อยีน NS1 จากเวกเตอร์ pMAL/NS1 มาเข้าในเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก (expression vector) ชนิดใหม่คือ pTrcHis ได้เป็นพลาสมิด pTrcHis/NS1 ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนลูกผสม 6H-NS1 โดยมีส่วนของกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว ติดอยู่ทางปลายด้านปลายอะมิโน ของโปรตีน NS1 ช่วยในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนเดียว ด้วยวิธี Immobilized Metal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Affinity Chromatography (IMAC) และเนื่องจากกรดอะมิโนฮิสติดีนทั้ง 6 ตัวมีขนาดเล็กมาก จึงไม่มีผลรบกวนต่อการทำปฏิกิริยาในซีรัมผู้ป่วย โปรตีนรีคอมบิแนนต์ NS1 ถูกผลิตขึ้นใน *E.coli* ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble หรือ inclusion bodies) และสามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้โดย Metal Affinity Chromatography ในสภาวะที่เป็น Denaturing condition โดยรีคอมบิแนนต์โปรตีน NS1 จะถูกละลายในสารดีแนเจอร์แรนท์เข้มข้น เช่น 6M Guanidine หรือ 8M Urea โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน NS1 แต่เมื่อมีการคืนสภาพธรรมชาติของโปรตีน (renature) หรือการไดอะไลซ์ (dialyse) เพื่อเอาสารดีแนเจอร์แรนท์ออก โปรตีนจะกลับมามากตะกอนทุกครั้ง ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำรีคอมบิแนนต์โปรตีน NS1 มาใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัย การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่มีขนาดเล็กลง โดยยังคงคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนไว้ได้ อาจมีส่วนช่วยในการแสดงออกของโปรตีนให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้มากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตโปรตีน NS1 ของไวรัสเด็งกีเฉพาะส่วนปลายอะมิโน (N-terminal) ในรูปของรีคอมบิแนนต์โปรตีนซึ่งจะสามารถเพิ่มจำนวนได้มากใน *E.coli* โดยยังคงส่วนที่เป็น antigenic domain (aa 57-126) (Mason 1990) เอาไว้ โดยการตัดปลาย 3' ของยีน NS1 จากพลาสมิด pTrcHis/NS1 ซึ่งจะทำให้ได้โปรตีนรีคอมบิแนนต์ NS1 ขนาดเล็กลง คือ 6H- Δ NS1 ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนของโปรตีน NS1 จำนวน 271 ตัว (ตำแหน่งที่ 1-271) จากเดิมที่มีขนาดกรดอะมิโน 352 ตัว เพื่อทำการศึกษาคูณสมบัติของโปรตีน รวมทั้งการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Immobilized Metal Affinity Chromatography แล้วนำมาตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนที่ได้โดยการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีน NS1 และซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) ต่อไป

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 สร้างพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 โดยการตัดปลาย 3' ของยีน NS1 จากพลาสมิด pTrcHis/NS1 (ขนาดประมาณ 5.5 กิโลเบส) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (nt) 814 ของยีน NS1 และที่ MCS ของพลาสมิดเวกเตอร์ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 5.2 กิโลเบส ซึ่งประกอบด้วยส่วนของเวกเตอร์และส่วนของยีน NS1 814 นิวคลีโอไทด์ ทำการเชื่อมต่อพลาสมิด (religate) ก่อนนำไปทรานสฟอร์มเข้าในเซลล์ *E.coli*
- 1.3.2 คัดเลือกโคลน *E.coli* ที่ได้รับพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1
- 1.3.3 ศึกษาปัจจัยในการเหนี่ยวนำโคลน *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ให้สร้างโปรตีนรีคอมบิแนนต์ 6H- Δ NS1 ที่ประกอบด้วย aa 1-271 ของโปรตีน NS1 และตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตได้โดยวิธี SDS-PAGE หรือ Western blot analysis
- 1.3.4 แยกโปรตีน 6H- Δ NS1 ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Immobilized Metal Affinity chromatography (IMAC)
- 1.3.5 ตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของโปรตีนที่ได้ เช่น ความจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1 และการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้ไปใช้เพื่อเป็นโปรตีนแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยไข้เลือดออก ทดแทนการใช้การใส่โปรตีนแอนติเจนจากไวรัสธรรมชาติที่ต้องใช้ระยะเวลานาน ผู้ปฏิบัติการที่มีความชำนาญสูง และห้องทดลองที่มีประสิทธิภาพ รีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้จะผลิตจากเซลล์ *E.coli* ที่สะดวกในการเตรียม สามารถเพิ่มจำนวนได้มากในระยะเวลาสั้น และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่า

บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1. โครงสร้างของไวรัสเด็งกี

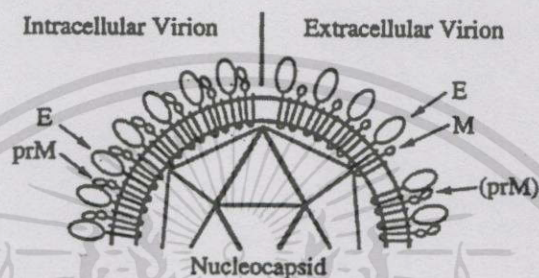
ไวรัสเด็งกีเป็นสมาชิกของวงศ์ (Family) Flaviviridae และอยู่ในสกุล (genus) *Flavivirus* ซึ่งมีทั้งหมด 4 ซีโรทัยป์ (serotype) ได้แก่ DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 (Westaway and Block 1997) อนุภาคของไวรัสมีรูปร่างกลม (Spherical) ประกอบด้วยเมมเบรนที่มีชั้นไขมัน (lipid bilayer membrane) ภายในมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (Single-Stranded RNA genome) ชนิดสายบวก (Positive Sense RNA) ซึ่งถูกล้อมรอบด้วยนิวคลีโอแคพซิด ชนิด icosahedral เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 นาโนเมตร บนชั้นเมมเบรนของไวรัสประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือโปรตีน M ซึ่งอยู่ใกล้กับส่วนเมมเบรน (Membrane associated protein) และโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มชั้นนอกหรือโปรตีน E ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน (envelope glycoprotein) (รูปที่ 1) อนุภาคที่สมบูรณ์ของไวรัส (virion) จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40-50 นาโนเมตร

สารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ (RNA) ของไวรัสเด็งกีมีความยาวประมาณ 11,000 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยส่วนปลาย 5' ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (5' Untranslated region, UTR) ชนิด Type-I Cap (m^7Gppp) ตามด้วยนิวคลีโอไทด์ AG และส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีนทุกชนิดของไวรัสเด็งกี (single open reading frame) รวมทั้งปลาย 3' ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (3' Untranslated region ; UTR) และไม่มี poly A แต่จะพบโครงสร้างที่เป็น loop stem ที่อาจช่วยให้ RNA มีความเสถียรขึ้น (Wengler and Wengler 1981 ; Brinton *et al.* 1986 ; Brinton and Disposito 1988) ส่วนของสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอที่กำหนดการสร้างโปรตีนของไวรัสประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ ตามลำดับดังนี้

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

หลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัส (translation) ของสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอแล้ว จะได้โปรตีนสายยาว (polyprotein) ที่มีเพียง 1 open reading frame (ORF) ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 3390 ตัว สำหรับไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ (Zhao *et al.* 1986) โปรตีนสายยาวนี้จะถูกตัดออกเป็นโปรตีนส่วนต่างๆที่เป็นส่วนประกอบของไวรัสเด็งกี โดยเอนไซม์โปรติเอสของไวรัสเอง ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจากเซลล์เจ้าบ้าน (Heinz 1990 ; Rice 1996) และประกอบกันขึ้นมาเป็นอนุภาคของไวรัสเด็งกีดังรูปที่ 2.1 โปรตีนของไวรัสเด็งกีแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ โปรตีนส่วนโครงสร้าง (structural proteins) ประกอบด้วย แคพซิด (capsid, C) พรีเมมเบรน

(premembrane, prM) โปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (envelope, E) และโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (nonstructural proteins) ได้แก่ NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b และ NS5 ขนาดของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ และขนาดของโปรตีนของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 แสดงดังตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงโปรตีนส่วนต่างๆของอนุภาคที่ครบสมบูรณ์ของ *Flavivirus* ขณะที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular virion) และขณะที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular virion) (Chamber *et al.* 1990)

ตารางที่ 2.1 แสดงขนาดของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2

ชนิดของโปรตีน	ชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน	ตำแหน่งของยีนบนสาย RNA ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน (nt)	ขนาดของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน (nt)	ตำแหน่งของกรดอะมิโนบนสายโพลีโปรตีน (aa)	ขนาดของโปรตีน (aa)
Capsid (C)	C	100-438	339	1-113	113
Premembrane (PrM)	prM	439-936	498	114-279	166
Envelope (E)	E	937-2421	1485	280-774	495
Non-structural protein 1 (NS1)	NS1	2422-3477	1056	775-1126	352
Non-structural protein 2a (NS2a)	NS2a	3478-4131	654	1127-1344	218
Non-structural protein 2b (NS2b)	NS2b	4132-4521	390	1345-1474	130
Non-structural protein 3 (NS3)	NS3	4522-6375	1854	1475-2092	618
Non-structural protein 4a (NS4a)	NS4a	6376-6825	450	2093-2242	150
Non-structural protein 4b (NS4b)	NS4b	6826-7569	744	2242-2490	248
Non-structural protein 5 (NS5)	NS5	7570-10269	2700	2491-3390	900

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2. ลักษณะโปรตีนของไวรัสเด็งกี

ไวรัสเด็งกีประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง (structural proteins) และ โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (nonstructural proteins) ดังนี้

2.2.1 โปรตีนโครงสร้าง (structural proteins)

2.2.1.1 โปรตีน C (Core หรือ capsid protein) เป็นโพลีเปปไทด์แรกที่สังเคราะห์ขึ้นระหว่างการแปลรหัส (Translation) จากสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ (RNA genome) การสังเคราะห์โปรตีน C เกิดจากไรโบโซมซึ่งอยู่เป็นอิสระในไซโตพลาสซึมของเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม โปรตีน C เป็นโปรตีนขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12-14 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 112-127 ตัว และมีประจุบวกสูงที่สุด เพราะมีปริมาณกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) สูงมากถึง 25 เปอร์เซ็นต์ คุณสมบัติดังกล่าวทำให้โปรตีน C สามารถทำปฏิกิริยากับประจุลบของอาร์เอ็นเอของอนุภาคไวรัส และทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอแคพซิด (nucleocapsid) ห่อหุ้มสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอไว้ ส่วนสารต้นกำเนิด (precursor) ของโปรตีน C ที่เรียกว่า "anchored C" ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 20 ตัว และไม่พบในอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (Mature virion)

2.2.1.2 โปรตีน M (Membrane-associated Protein) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่อยู่บนอนุภาคของไวรัส มี 2 รูปแบบขึ้นอยู่กับอายุของไวรัสคือ

2.2.1.2.1 โปรตีน prM พบอยู่ในอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular immature virion) จัดเป็นไกลโคโปรตีน (คือโปรตีนที่มีโมเลกุลของน้ำตาลเกาะอยู่) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22 กิโลดาลตัน และเป็นสารต้นกำเนิด (precursor) ซึ่งจะถูกลดขนาดไปเป็นโปรตีน M และ ส่วนของโปรตีน pr (ส่วนปลายอะมิโนของโปรตีน prM) โปรตีน prM มีคุณสมบัติในการจับกับโปรตีน E แบบ heterodimer ซึ่งจำเป็นต่อการงอพับ (folding) และความคงตัวของโปรตีน E นอกจากนี้โปรตีน prM ยังช่วยป้องกันโปรตีน E ไม่ให้เสียคุณสมบัติไประหว่างที่ผ่าน secretory pathway ซึ่งมีสถานะเป็นกรดอ่อน ทำให้อนุภาคไวรัสมีความสมบูรณ์ (Wengler and Wengler 1989 ; Chambers *et al.* 1990 ; Guirakhoo *et al.* 1992 ; Heinz *et al.* 1994)

2.2.1.2.2 โปรตีน M พบอยู่บนอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Extra-cellular mature virion) โปรตีน M มีน้ำหนักโมเลกุล 8 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 75 ตัว ที่ไม่มีหมู่น้ำตาลบนโปรตีน (no glycosylation) เป็นโปรตีนที่แยกตัวมาจากโปรตีน prM การแยกตัวนี้อาจเกิดขึ้นหลังจากไวรัสผ่าน golgi vesicle ซึ่งจะเกิดก่อนการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสที่ครบสมบูรณ์ออกมาจากเซลล์ คาดว่าโปรตีน M ที่จับกับโปรตีน E บนอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์นี้ จะมี

ส่วนช่วยให้ไวรัสมีความสามารถในการติด (infection) เข้าไปในเซลล์ใหม่ได้ดีกว่าไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ (ยังมีโปรตีน prM อยู่บนอนุภาคไวรัส) (Wang *et al.* 1999)

2.2.1.3 โปรตีน E (Envelope protein) เป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 51-60 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 494-501 ตัว โปรตีน E เป็นโปรตีนหลักบนผิวของไวรัส จับกันในรูปของโดเมอร์ และสามารถเกาะกับตัวด้อยรับบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน (cellular receptor binding) ซึ่งจะทำให้เกิด endocytosis และดึงเอาไวรัสเข้าไปใน endosome จากนั้นโปรตีน E จะรวมตัวกับเมมเบรน (membrane fusion) ในสภาวะที่เป็นกรด และปล่อยสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอเข้าสู่ไซโตพลาสซึม เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวน และสร้างไวรัสใหม่เพิ่มขึ้น (viral replication) โดยโปรตีน E จะเป็นโปรตีนโครงสร้างสำคัญที่ช่วยให้ไวรัสมีการรวมเป็นอนุภาคที่ครบสมบูรณ์ (virus assembly) (Heinz 1990) นอกจากนี้โปรตีน E ยังมีตำแหน่ง (epitopes) ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี (Innis 1989 ; Churdboonchart *et al.* 1991 ; Huang *et al.* 1997) และสามารถกระตุ้นให้เกิด neutralizing antibody ในสัตว์ทดลองและป้องกันหนูจากการติดเชื้อไวรัสได้ (Srivastava 1995. ; Staropoli 1997. ; Simmons 1998a) โปรตีน E มีส่วนประกอบที่เป็นสารฮีโมแอกกลูตินินซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิดเกิดการเกาะกลุ่มกันได้ (hemagglutination) จึงสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีโดยวิธี Hemeagglutination inhibition test (HI) ได้ (Sweet and sabin 1954) เนื่องจากความสำคัญของโปรตีน E ดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ ตำแหน่งที่ใช้จับกับแอนติเจน (antigenic epitopes) ของโปรตีน E กันอย่างกว้างขวาง (Innis 1989 ; Mason 1990 ; Megret *et al.* 1992) รวมทั้งโครงสร้างของโปรตีน E (Rey *et al.* 1995) เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค และการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรค

2.2.2 โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Non-Structural proteins) โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างของไวรัสจะถูกสร้างขึ้นในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส แบ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ 3 ตัวคือ NS1, NS3 และ NS5 และโปรตีนขนาดเล็ก 4 ตัว คือ NS2a, NS2b, NS4a และ NS4b

2.2.2.1 NS1 คือ โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างตัวที่ 1 เป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 48 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 352 ตัว โดยมีตำแหน่งที่ถูกเติมน้ำตาล(N-linked glycosylation) 2 ตำแหน่งคือ Asn-130 และ Asn-207 และประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนถึง 12 ตำแหน่ง (Chambers *et al.* 1990) หน้าที่ของโปรตีน NS1 ยังไม่ทราบแน่ชัด โปรตีน NS1 ที่พบบนผิวเซลล์ที่มีการติดเชื้อและส่วนที่มีการหลั่งออกนอกเซลล์จะอยู่ในรูปของโดเมอร์ (Winkler *et al.* 1988) ซึ่งเชื่อว่าเป็นรูปแบบที่ทำให้โปรตีนทำงานได้ดี และจะพบ NS1 ในรูปที่เป็นโมโนเมอร์เฉพาะภายในเซลล์ขณะที่มีการสังเคราะห์โปรตีนในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ

เท่านั้น (rough endoplasmic reticulum) โปรตีน NS1 ที่ถูกห่อหุ้มออกมานอกเซลล์เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ และอาจอยู่ในรูปที่เกาะกันมากกว่าไดเมอร์ (Crooks *et al.* 1994) เมื่อเร็ว ๆ นี้ Flamand *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาพบว่าโปรตีน NS1 ที่ถูกห่อหุ้มออกมานอกเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอยู่ในรูปที่เป็น hexamer และ Jacobs *et al.* (2000) พบว่าโปรตีน NS1 เกาะอยู่บนผิวเซลล์ด้วย glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) linkage ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษากลไกการทำงานของโปรตีน NS1 ในเซลล์ติดเชื้อ โปรตีน NS1 ยังมีคุณสมบัติในการจับกับสารคอมพลีเมนต์ (complement-fixing antigen) และสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างภูมิคุ้มกัน (protective immunity) ในสัตว์ทดลองได้ทั้งโดยทางตรง และโดยอ้อม (Schlesinger *et al.* 1985, 1986 ; Henchal *et al.* 1988) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในซีรัมผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อซ้ำ (Secondary infection) จะพบแอนติบอดีต่อโปรตีน NS1 (Churdboonchart *et al.* 1991 ; Kuno *et al.* 1990) และพบโปรตีน NS1 ในซีรัมแรกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อซ้ำด้วยเช่นกัน (Young *et al.* 2000) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน NS1 อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคถึงแม้ว่าในปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปได้ก็ตาม

2.2.2.2 NS3 เป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปที่ชอบน้ำ (hydrophilic) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 618-623 ตัว โปรตีน NS3 มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันมาก (conserved) ในระหว่างไวรัสในกลุ่ม Flavivirus ด้วยกัน โปรตีน NS3 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัสคือ ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์โปรตีเอส (ร่วมกับเอนไซม์จากเซลล์เจ้าบ้าน) เพื่อย่อยสลายโพลีโปรตีนให้ได้เป็นโปรตีนส่วนต่างๆ ประกอบกันเป็นตัวไวรัสที่สมบูรณ์ โดยพบว่าบริเวณใกล้เคียงกับปลายอะมิโน (N-terminal domain) ของโปรตีน NS3 จะมีลำดับเบสและโครงสร้างที่เหมือนกับ active domain ของ serine protease (Bazan and Fletterik 1989) ที่ใช้ย่อยโปรตีนในไวรัสหลายตัว โดยทำงานร่วมกับโปรตีน NS2b นอกจากนี้ทางปลายคาร์บอกซี (C-terminal domain) ยังทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ helicase โดยมีลำดับเบสคล้ายกับ superfamily RNA helicase ซึ่งประกอบด้วย purine nucleotide binding motif (Gorbalenya *et al.* 1989) และเกี่ยวข้องกับ NTPase activity เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) (Wengler and Wengler 1991 ; Warrenner 1993 ; Bazan and Fletteric 1989) และอาจเกี่ยวข้องกับการสร้าง cap structure ที่ปลาย 5' ของสายอาร์เอ็นเอ และการเกิดเมทธิเลชัน (methylation) ในอาร์เอ็นเอของไวรัสด้วย (Wengler and Wengler 1993)

2.2.2.3 NS5 เป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ที่สุดของไวรัส มีขนาดประมาณ 104-106 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 900-905 ตัว เป็นโปรตีนที่มีความเหมือนกันมาก (highly conserved) ในระหว่าง Flavivirus ด้วยกัน พบว่าสองในสามส่วนทางปลายด้านคาร์บอกซี (C-terminal) ของ NS5 จะประกอบด้วยกรดอะมิโน Gly-Asp-Asp (GDD motif) เหมือนกับที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบในอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase ชนิด RNA-dependent) ในไวรัสชนิดอื่นๆที่เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิดสายบวกด้วยกัน ดังนั้น NS5 อาจมีคุณสมบัติของเอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส ด้วยเช่นกัน Tan *et al.* (1996) แสดงให้เห็นว่า โปรตีนรีคอมบิแนนต์ NS5 ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 1 สามารถทำหน้าที่ของอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (ชนิด RNA dependent) ได้ และสามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้เมื่อมี anti-NS5 นอกจากนี้ NS5 อาจเกี่ยวข้องกับการเกิด capping ของอาร์เอ็นเอของไวรัส และการเพิ่มจำนวนของอาร์เอ็นเอ (RNA replication) ด้วย (Bartholomeusz and Wright 1993)

2.2.2.4 NS2a NS2b NS4a และ NS4b เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างขนาดเล็ก มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic)

2.2.2.4.1 NS2a มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18-20 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 218-231 ตัว มีโครงสร้างโมเลกุลต่อจาก NS1 ที่ปลายคาร์บอกซี มีความจำเป็นสำหรับกระบวนการย่อยโปรตีน NS1 (Falgout *et al.* 1989) และปลายอะมิโนของ NS2a อาจทำหน้าที่เป็นแกน (anchored) ที่ช่วยให้ NS1 อยู่บนผิวเซลล์ด้วย GPI linkage ได้ (Jacobs *et al.* 2000)

2.2.2.4.2 NS2b มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13-15 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 130-132 ตัว พบว่ามีบทบาทต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของโปรตีนเชิงซ้อน NS2b-NS3 แม้ว่าจะไม่มีคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสเองโดยตรง แต่จำเป็นสำหรับการย่อยโปรตีนที่บริเวณรอยต่อระหว่าง NS2a/NS2b, NS2b/NS3, NS3/NS4a และ NS4b/NS5 โดยจะมีการทำงานร่วมกับ Protease domain ของโปรตีน NS3 (Falgout *et al.* 1991 ; Cahour *et al.* 1992) และพบว่ากรดอะมิโนประมาณ 40 ตัวที่บริเวณ hydrophilic domain ของ NS2b มีความจำเป็นสำหรับการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสของโปรตีน NS3 (Falgout *et al.* 1993) โดยสันนิษฐานว่าเป็นส่วนที่ทำปฏิกิริยา (charged-charged interaction) กับโปรตีน NS3 ทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นเชิงซ้อน (NS2b-NS3-complex) (Lai *et al.* 1994)

2.2.2.4.3 NS4a และ NS4b โปรตีน NS4a มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16-16.4 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 149-150 ตัว และโปรตีน NS4b มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 248-256 ตัว โปรตีนทั้งสองชนิดเป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันน้อยที่สุด (low conserved) ในกลุ่ม *Flavivirus* ด้วยกัน ประกอบด้วย membrane-spanning region หลายแห่ง หน้าที่ของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่นอน แต่เชื่อว่าโปรตีน NS4b น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในระหว่างการรวมเป็นอนุภาคที่ครบสมบูรณ์ของไวรัส โดยจะช่วยให้โปรตีน NS3 และโปรตีน NS5 มาที่ผนังเซลล์โดย protein-protein interaction (Chambers *et al.* 1990b ; Wengler *et al.* 1990) และสันนิษฐานว่าอาจทำหน้าที่เป็นโปรตีนร่วม

(cofactor) ในการจำลองตัวของอาร์เอ็นเอ หรืออาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase (Henchal and Putnak 1990)

2.3 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

2.3.1 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ในแบคทีเรีย *E.coli*

จากความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรม และการตัดต่อยีนที่ก้าวหน้าไปอย่างมากในช่วงเวลาที่ผ่านมานี้ ทำให้มีความสามารถในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์หลายชนิด จากเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา เซลล์แมลง และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นต้น เพื่อทดแทนโปรตีนจากธรรมชาติที่มีความสำคัญในด้านต่างๆ เช่นทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตร ซึ่งปกติจะมีอยู่น้อย และเตรียมได้ยาก ให้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้งานได้ และมีราคาถูก การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ทำได้โดยการโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดนั้นๆ เข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก และควบคุมให้มีการสร้างโปรตีนที่ต้องการในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม เซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับความนิยมใช้กันแพร่หลายมากที่สุดในระบบโปรคาริโอต ได้แก่ *E.coli* เนื่องจากโตเร็ว เลี้ยงง่าย อาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาไม่แพง และมีความสามารถในการผลิตโปรตีนได้สูงในเวลาสั้น (Marston 1986) แต่ในขณะเดียวกันก็มีข้อเสียคือโปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่ได้จะมีคุณสมบัติไม่เหมือนกับโปรตีนธรรมชาติ เพราะไม่มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงโปรตีนหลังจากการแปลรหัส (Post-translation modification) เช่น การเติมหมู่น้ำตาล ซึ่งต่างจากโปรตีนที่ได้จากเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นยูคาริโอต เช่น ยีสต์ รา เซลล์แมลง และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่ผลิตได้จาก *E.coli* มักจะอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ หรือ inclusion body ซึ่งในบางครั้งทำให้ได้โปรตีนที่ไม่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ (inactive)

2.3.2 คุณสมบัติของเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์

หลักการเบื้องต้นของการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ใน *E. coli* คือการตัดต่อยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนนั้นๆ เข้าในเวกเตอร์ดีเอ็นเอพาหะสำหรับการแสดงออก (expression vector) เวกเตอร์พาหะจะประกอบไปด้วยส่วนต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่

1. Origin of replication (ColE1 ori) คือลำดับเบสที่กำหนดให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของพลาสมิดดีเอ็นเอใน *E. coli*
2. Transcriptional promoter เช่น lac, trp, tac คือส่วนลำดับเบสจำเพาะที่ควบคุมให้มีการถอดรหัสของยีนที่สนใจเมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยตัวเหนี่ยวนำ (inducer) เพื่อให้เป็น mRNA และ โปรตีนได้

3. Translational control sequence คือส่วนที่ควบคุมการแปลรหัส mRNA ให้เป็นโปรตีนที่ต้องการ เช่น ribosome-binding site (RSB) และ codon แรกสำหรับการแปลรหัส : ATG

4. Multiple cloning site คือส่วนที่ใช้ในการโคลนยีนที่ต้องการเข้าไปในเวกเตอร์ประกอบไปด้วย restriction sites หลายตำแหน่ง เพื่อให้สะดวกกับการเลือกโคลนนิ่ง

5. Selectable marker เป็นส่วนที่ใช้ในการคัดเลือก เช่น *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่มีส่วนของ Ampicillin gene resistant เข้าไปจะมีความทนต่อยาแอมพิซิลลิน

ในปัจจุบันนี้มีเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก (expression vector) ของ *E. coli* จำนวนมาก ที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนในรูปของโปรตีนลูกผสม (fusion protein) ซึ่งจะประกอบไปด้วยลำดับเบสที่แปลรหัสสำหรับโปรตีนหรือเปปไทด์พาหะ เช่น maltose binding protein (MBP), glutathione s-transferase (GST) หรือ hexahistidine peptide (6-His) อยู่ทีบริเวณก่อน (upstream) หรือ หลัง (downstream) ตำแหน่งที่จะใช้ในการโคลนยีนที่สนใจ (multiple cloning site) โปรตีนที่ได้จากการแสดงออกของเวกเตอร์เหล่านี้ จะเป็นโปรตีนลูกผสมระหว่างโปรตีนที่สนใจกับโปรตีนหรือเปปไทด์พาหะที่ปลายอะมิโนหรือปลายคาร์บอกซิลขึ้นกับชนิดของเวกเตอร์ โปรตีนหรือเปปไทด์พาหะเหล่านี้มีประโยชน์ในการแยกโปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่ต้องการให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติของการจับกันระหว่างไลแกนด์ที่จำเพาะกับโปรตีนพาหะที่เชื่อมติดกับโปรตีนรีคอมบิแนนต์นั้น ทำให้การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์สามารถทำได้ในขั้นตอนเดียว โดยวิธี affinity chromatography เช่น โปรตีนซึ่งถูกแสดงออกในรูปโปรตีนลูกผสม GST จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ glutathione-sepharose (Smith and Johnson 1988) หรือวิธีการใช้ maltose ในการแยกโปรตีนลูกผสมของ maltose binding protein (MBP) (Maina et al. 1988) ส่วนโปรตีนที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัวติดกัน (6-His) เป็นเปปไทด์พาหะจะทำหน้าที่เป็นไลแกนด์จำเพาะต่อไอออนของโลหะประจุบวกเช่น โคบอลท์หรือนิกเกิล ที่เชื่อมติดกับเรซิน (Houchuli et al. 1987.; Houchuli 1988)

2.3.3 การผลิตโปรตีนลูกผสมที่มี 6-Histidine เป็นเปปไทด์พาหะ

2.3.3.1 เวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก (Expression vectors) ; pTrcHis

เวกเตอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ pTrcHis ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเวกเตอร์ pUC (รูปที่ 2.2) การแสดงออกของโปรตีนจะถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ Trc (Trc promoter) เวกเตอร์ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสของกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัวติดต่อกัน (6-His) ที่บริเวณก่อน (upstream) ตำแหน่งของ multiple cloning site (MCS) โดยมีลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเปปไทด์ซึ่งมีความจำเพาะต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ enterokinase (EK) ค้นอยู่ระหว่างกลางยีนที่สนใจจะถูกนำมาโคลนเข้าที่ตำแหน่ง MCS (เพื่อให้มีการแปลรหัสของยีนเป็นโปรตีนสายยาวอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ start codon ATG ผ่าน 6-His, EK จนถึงยีนที่โคลนเข้าไป) *E. coli* ซึ่ง

มีพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีนด้วยสารละลาย IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) ทำให้ได้โปรตีนลูกผสมที่มีกรดอะมิโน 6-His ติดอยู่ทางด้านปลายอะมิโน ข้อดีของ 6-His คือมีขนาดเล็ก ไม่รบกวนคุณสมบัติทางชีวภาพ (biological activity) ของโปรตีนที่สนใจ และทำหน้าที่เป็นไลแกนด์จำเพาะต่อไอออนของโลหะประจุบวก เช่น โคบอลต์ หรือ นิกเกิล ที่เชื่อมติดกับเรซิน เพื่อประโยชน์ในการแยกให้บริสุทธิ์ได้ง่าย



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของเวกเตอร์ pTrcHis A,B,C เพื่อใช้สำหรับการแสดงออกของ โปรตีนที่สนใจในระบบของแบคทีเรีย *E.coli* (บริษัท Invitrogen Coporation, USA.)

2.3.3.2 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยวิธี Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)

การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยวิธีนี้ ใช้ได้กับโปรตีนลูกผสม (fusion protein) ที่มีเปปไทด์พาหะเป็น 6-His หลักการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ทำได้โดยการจับกันระหว่างอิเล็กตรอนที่ตำแหน่งไนโตรเจนบนวงอิมิดาไซลของกรดอะมิโนฮิสติดีนของโปรตีนลูกผสม กับประจุบวกของโลหะไอออน เช่น โคบอลต์ นิกเกิล คอปเปอร์ และ สังกะสี ที่ถูกยึดติดกับเรซินด้วย tetradentate chelator สำหรับการชะโปรตีนออกจากเรซิน อาจทำได้โดยใช้สารละลายอิมิดาไซลที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อไปแย่งจับกับฮิสติดีน หรือ บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่ำกว่า 6.0 เพื่อทำให้ฮิสติดีนมีประจุเป็นบวก และแยกตัวหลุดออกจากไอออนของโลหะที่ยึดติดอยู่ ซึ่งจะช่วยในการแยกโปรตีนลูกผสมให้บริสุทธิ์ได้

2.4 การแยกรีคอมบิแนนต์โปรตีนจาก *E. coli* ในรูปของ Inclusion body

วิธีการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ชนิดต่างๆ จากแบคทีเรีย *E. coli* เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางไม่ว่าจะเป็นทางด้านการแพทย์ งานวิจัย หรือ ทางด้านอุตสาหกรรมก็ตาม เนื่องจากกระบวนการผลิตสามารถทำได้เร็ว ให้ผลผลิตที่สูง และมีต้นทุนต่ำ แต่ปัญหาที่พบคือ โปรตีนส่วนใหญ่ที่ผลิตออกมา มักจะอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ หรือ inclusion bodies ซึ่งจะทำให้เป็นปัญหาต่อเนื่องไปในกระบวนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ที่ต้องการละลายโปรตีนด้วยสารดีแนเจอร์แรนท์ที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นการทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนนั้น (denaturation) และต้องมีการคืนสภาพธรรมชาติของโปรตีน (renaturation or refolding) เพื่อกำจัดสารดีแนเจอร์แรนท์ และทำให้โปรตีนอยู่ในสภาวะที่ละลายน้ำได้โดยไม่ตกตะกอน และยังมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ก่อนที่จะนำไปใช้งานได้ โดยทั่วไปการที่จะทำได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ และมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ หรือใกล้เคียงโปรตีนจากธรรมชาติมากที่สุด ประกอบด้วย 3 หลักใหญ่ คือ

2.4.1 การแยก inclusion bodies และการล้างเพื่อกำจัดโปรตีนปนเปื้อนอื่นให้ได้มากที่สุด

คือการทำให้เซลล์ *E. coli* แตก อาจทำได้โดยการใช้แรงกล (mechanical forces) เช่น การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) และ french press เป็นต้น หรือ การใช้เอนไซม์ lysozyme ในการย่อยผนังเซลล์ หรือ ใช้ทั้งสองอย่างร่วมกัน ซึ่งจะทำให้โปรตีนภายในเซลล์ที่ละลายน้ำได้หลังออกมาข้างนอก และสามารถแยกส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion bodies) ได้โดยการปั่นแยก ส่วนของตะกอน inclusion ที่ได้จะถูกนำมาล้างด้วยสารจำพวก cheotropic agents เช่น Guanidinium chloride, urea เป็นต้น หรือ detergent เช่น Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (Cardamone *et al.* 1995 ; Cowley and Mackin, 1997) เพื่อกำจัดโปรตีนบางตัวที่ปนเปื้อนมากับ inclusion bodies ซึ่งอาจมีผลรบกวนในขั้นตอนของการคืนสภาพธรรมชาติของโปรตีน (refolding)

2.4.2 การละลายตะกอนโปรตีน (denaturation)

เนื่องจากโปรตีนที่อยู่ในรูปของตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ จะไม่สามารถผ่านกระบวนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการละลายตะกอน inclusions ของโปรตีนก่อน โดยใช้สารดีแนเจอร์แรนท์เข้มข้น เช่น Urea, Guanidinium chloride หรือ thiocyanate salts หรือ ตัวช่วยละลายอื่นๆ ได้แก่ detergents เช่น SDS, sarkosyl หรือ reducing agents เช่น β -mercapto-ethanol, dithiotheitol เป็นต้น แต่ทั้งนี้ก็จะทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ และรูปร่างไป ซึ่งโปรตีนนั้นจะต้องถูกนำมาคืนสภาพธรรมชาติก่อนที่จะนำไปใช้งานได้จริง

2.4.3 การคืนสภาพธรรมชาติให้กับโปรตีน (renaturation or refolding)

โดยทั่วไป ถ้าโปรตีนมีการพับงอตัวอย่างถูกต้อง (correct folding) ก็จะทำให้โปรตีนนั้นมีความเสถียร และสามารถละลายน้ำได้ ถึงแม้ว่าจะไม่มีตัวช่วยละลายก็ตาม แต่ถ้ารูปแบบของการพับงอของโปรตีนไม่ถูกต้อง ก็อาจทำให้เกิดการจับกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนผิดไป จะทำให้โปรตีนไม่อยู่ในสภาวะที่เสถียร และตกตะกอน (aggregation) ลงมาได้ หลักการของการคืนสภาพธรรมชาติ (refolding) ของโปรตีนคือการกำจัดสารจำพวกดีแนเจอร์แรนทออกออกจากสารละลายโปรตีนนั้นโดยที่ยังคงคุณสมบัติการละลายของโปรตีนนั้นไว้ได้ และยังคงต้องมี activity ของโปรตีนนั้นอยู่ด้วย โปรตีนแต่ละชนิดอาจมีวิธีการ refolding แตกต่างกันไป (Clark 1998 ; Lilie *et al.* 1998) จากรายงานที่ผ่านมามีวิธีที่ได้เป็นหลักการใหญ่ๆ 3 แบบคือ

2.4.3.1 **วิธีไดอะไลซิส (dialysis)** โดยอาศัยหลักของการแพร่ (diffuse) ของสารโมเลกุลเล็ก และ ไอออนที่มีความเข้มข้นสูงไปยังที่ต่ำกว่าผ่านแผ่นเมมเบรน หรือถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) สารละลายโปรตีนตัวอย่างที่มียูเรียความเข้มข้นสูงจะถูกบรรจุไว้ในถุงไดอะไลซิส และปล่อยให้ไดอะไลซ์ (dialyse) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มียูเรียความเข้มข้นของน้อยกว่าโปรตีนตัวอย่าง โดยจะค่อยๆลดปริมาณยูเรียในบัฟเฟอร์ลงเรื่อยๆจนไม่มียูเรียเหลืออยู่เลย ทำให้ยูเรียในสารละลายโปรตีนถูกกำจัดออกไปได้ โดยที่โปรตีนยังสามารถละลายอยู่

2.4.3.2 **วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography)** ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้ ion-exchange chromatography (Creighton 1985) หรือ affinity chromatography (Holzinger *et al.* 1996 ; Shi *et al.* 1997 ; Sinha *et al.* 1994 ; Stempfer *et al.* 1996) โดยหลักการคือ การจับโปรตีนที่ต้องการทำ refolding ไว้บนเมตริกซ์ (matrix) หรือเรซินที่จำเพาะเอาไว้ก่อน ทำให้โปรตีนไม่เข้าไปจับกันเองและลดการเกิดตะกอน จากนั้นจึงผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ (refolding buffer) เข้าไป เพื่อให้โปรตีนมีการพับงออย่างถูกต้องขึ้น แล้วจึงทำการชะเอาโปรตีนนั้นออกมาที่หลัง โดยวิธีนี้จะมีประโยชน์ทั้งในแง่ของการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ และการคืนสภาพธรรมชาติของโปรตีนไปพร้อมกัน

2.4.3.3 **วิธีการเจือจางโปรตีน (dilution)** โดยอาศัยหลักการของการแยกแต่ละโมเลกุลของโปรตีนให้อยู่ห่างกัน ซึ่งจะทำให้มีโอกาสในการพับงอตัวได้อย่างถูกต้อง โดยไม่มีการทำปฏิกิริยากันระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ทำให้ลดการเกิดตะกอนได้ มีรายงานพบว่า การทำการคืนสภาพธรรมชาติของโปรตีนโดยไม่ทำให้เกิดการตกตะกอนเลย จะเกิดขึ้นได้เมื่อปล่อยให้โปรตีนมีความเข้มข้นต่ำมากๆ ในช่วง 10-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Huth *et al.* 1994 ; Rudolph and Lilie 1996) การเจือจางสารละลายโปรตีนตัวอย่างใน refolding buffer ที่ประกอบด้วย redox agent (เช่น reduced/oxidized glutathione หรือ cysteine/cystine) (Ahmed *et al.* 1975 ; Hevehan and Clark 1997) และสารช่วยในการละลายอื่นๆ เช่น L-arginine

(Hevehan and Clark 1997) ; SDS (Stockel *et al.* 1997) ; Triton X-100 (Cardamone *et al.* 1995 ; Cowley and Mackin 1997) เป็นต้น จะมีส่วนช่วยให้โปรตีนมีความเสถียรมากขึ้น นอกจากนี้สารละลายโปรตีนเจือจางที่ได้จากทำให้เข้มข้นขึ้นโดยกระบวนการ ultrafiltration ต่อไป

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนของไวรัสเด็งกีใน

E.coli

มีรายงานการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์หลายชนิดของไวรัสเด็งกีในระบบ *E.coli* ในรูปของโปรตีนลูกผสม เพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่และคุณสมบัติของโปรตีนเหล่านั้น ตัวอย่างเช่น

Mason *et al.* (1990) ได้ทำการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนต์ของโปรตีน E และ NS1 ในรูปของโปรตีนลูกผสมที่มี TrpE เป็นโปรตีนพาหะ และให้มีการแสดงออกใน *E.coli* เพื่อศึกษาโครงสร้าง antigenic ของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (E) และ โปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (NS1) ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 1 จากผลการศึกษาพบว่าโปรตีน E ประกอบด้วย 2 antigenic domains คือโดเมน 1 (ตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 76-93) และโดเมน 2 (ตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 293-402) ขณะที่ antigenic domain ของโปรตีน NS1 อยู่ที่บริเวณปลายอะมิโน (ตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 57-126) นอกจากนี้รีคอมบิแนนต์โปรตีน E และ NS1 ยังสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างภูมิคุ้มกัน (immunogenic) ในหนูได้

Megret *et al.* (1992) ได้ทำการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน E ในรูปของโปรตีนลูกผสม TrpE-E และนำมาทำปฏิกิริยากับชุดโมโนโคลนอลแอนติบอดีของไวรัสเด็งกี โดยวิธีอิมมูโนบลอต (immunoblot) เพื่อหาตำแหน่ง (epitope) ที่สำคัญต่อการเกิด neutralization และ protection บนโปรตีน E และพบว่า neutralizing epitopes ขึ้นอยู่กับการพับงอตัวของโปรตีน (conformational epitope) และเกี่ยวข้องกับพันธะไดซัลไฟด์

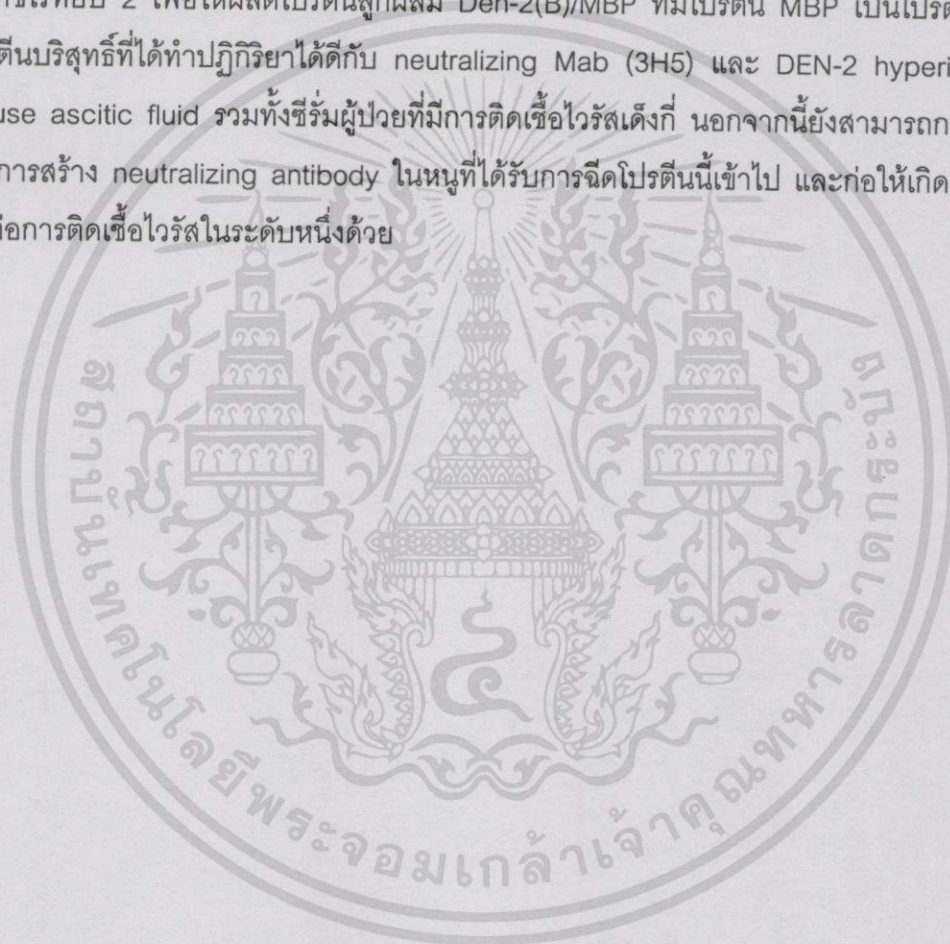
Srivastava *et al.* (1995) ได้ทำการโคลนส่วนต่อระหว่างยีน E และยีน NS1 จากส่วนปลายคาร์บอกซีของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้ม (E) (กรดอะมิโน 204 ตัว) ไปจนถึงส่วนปลายอะมิโนของโปรตีน NS1 (กรดอะมิโน 65 ตัว) ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 เพื่อนำมาแสดงออกใน *E.coli* โดยอยู่ในรูปของโปรตีนลูกผสมที่มี Staphylococcal protein A เป็นโปรตีนพาหะ โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 ทั้งโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี หนูที่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนลูกผสมนี้ก็สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเด็งกีได้ และสามารถป้องกันหนูจากการติดเชื้อไวรัสได้เช่นกัน

Sugrue *et al.* (1997) ได้ทำการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน E ของไวรัสเด็งกีในรูปของโปรตีนลูกผสม GST-E ใน *E.coli* และในยีสต์ *Pichia pastoris* โปรตีน GST-E ใน *E.coli* อยู่ในรูปของ

โปรตีนที่ละลายน้ำ และสามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็งกี เมื่อฉีดหนูด้วยโปรตีน E ที่เตรียมได้

Simmons *et al.* (1998a) ได้ทำการโคลนยีนส่วนโดเมนบี (domain B) จากโปรตีน E ของไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ เพื่อให้ผลิตโปรตีนลูกผสม trpE-DEN ที่มี trpE เป็นเปปไทด์พานะ และนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีโดยวิธี indirect ELISA

Simmons *et al.* (1998b) ทำการโคลนยีนส่วนโดเมนบี (domain B) จากโปรตีน E ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 เพื่อให้ผลิตโปรตีนลูกผสม Den-2(B)/MBP ที่มีโปรตีน MBP เป็นโปรตีนพานะ โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ทำปฏิกิริยาได้ดีกับ neutralizing Mab (3H5) และ DEN-2 hyperimmune mouse ascitic fluid รวมทั้งซีรัมผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง neutralizing antibody ในหนูที่ได้รับการฉีดโปรตีนนี้เข้าไป และก่อให้เกิดการป้องกันต่อการติดเชื้อไวรัสในระดับหนึ่งด้วย



บทที่ 3

เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์

3.1 เครื่องมือ

- 3.1.1. ตู้เย็น (Biofreezer) (-70°C), Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA.
- 3.1.2. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก (High speed refrigerated microcentrifuge) แบบ MTX-150 บริษัท Tomy Sciko Co.,Ltd. Japan
- 3.1.3. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Superspeed centrifuge) แบบ J2-MC บริษัท Beckman Instrument Inc., U.S.A.
- 3.1.4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) แบบ Orion 520 A , U.S.A.
- 3.1.5. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) แบบ Ehret
- 3.1.6. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath) แบบ Julabo SW-20C
- 3.1.7. เครื่องผสมสาร (vortex-mixer) แบบ vortex Gene 2 บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
- 3.1.8. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) แบบ TVC 312A Spectrolines
- 3.1.9. กล้องโพลาไรออยด์ (Polaroid Camera) แบบ Fotodyne
- 3.1.10. ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette) แบบ Pipetman P2 , P20, P100, P200 และ P1000 บริษัท Gilson medical Electronics S.A., France
- 3.1.11. อุปกรณ์อิเล็กโตโฟรีซิส (agarose gel eletrophoresis) ประกอบด้วย horizontal electrophoresis unit และ power supply แบบ Ec 135, U.S.A.
- 3.1.12. เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer hot plate) บริษัท Stuart Scientific, UK.
- 3.1.13. เครื่องแยกเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค (Sonicator) แบบ W-380 บริษัท Heat systems-ultrasonic , Inc., U.S.A.
- 3.1.14. อุปกรณ์แยกขนาดโปรตีน (polyacrylamide gel eletrophoresis) ประกอบด้วย Mini Protean II cell และ power supply บริษัท Biorad, U.S.A. หรือ SE 250 Mighty small II slab gel electrophoresis unit บริษัท Hoefer

- 3.1.15. อุปกรณ์ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (protein purification) ประกอบด้วย TALON spin Column และ TALON Metal Affinity Resin บริษัท CLONTECH Laboratories, Inc., U.S.A.
- 3.1.16. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Sterilizer autoclave) แบบ MLS - 300 บริษัท Sanyo, Japan
- 3.1.17. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV - Visible Spectrophotometer) แบบ WV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
- 3.1.18. อุปกรณ์ทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์ (QIAquick Gel Extraction kit) ประกอบด้วย QIAquick spin Column บริษัท QIAGEN Inc Germany
- 3.1.19. Red rocker PR55, Hofer, San Francisco, USA
- 3.1.20. Magnetic stirrer hot plate, Stuart Scientific, UK
- 3.1.21. Slab gel dryer, E-C Apparatus EC 355, USA.
- 3.1.22. Semi-dry blot apparatus, Germany.

3.2 วัสดุภัณฑ์

- 3.2.1. ถุงเซลลูโลสไดอะไลซิส (cellulose dialysis bag) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.5 เซนติเมตร บริษัท Scientific Instrument Center LTD, UK.
- 3.2.2. ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แบบ Reinforced NC ขนาด 0.45 ไมครอน บริษัท Schleicher & Schuell
- 3.2.3. फिल्मถ่ายภาพขาวดำ แบบ Poraloid 667, England

3.3 จุลินทรีย์

- 3.3.1 *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α : F', ϕ 80d, Lac Z Δ M15, *end* A1, *rec* A1, *hsdR*17(r_k^- , m_x^+), *Sup* E44, *thi* -1, *d'*, *gyr* A69, Δ (*LacZYA-argF*), U169
- 3.3.2 *E.coli* สายพันธุ์ K12 ER2508 : *lon* :: Tn 10 D 16 D 17 D (*malB*)zkb :: Tn5D (*arg* F-*lac*) U169 D (*mcrC-mrr*) 20 *ara* - 14 *galK2 rpsL20 xyl-5 mt/1 supE44 leuB6 fhuA2*
- 3.3.3 *E.coli* สายพันธุ์ K12 TB1 : *ara* Δ (*lac proAB*) *rpsL thi* [80 ϕ *d**lac*^f Δ (*lacZ*) M15] *hsdR* ($r_x^- m_x^+$)

3.4 แอนติบอดี

- 3.4.1. Rabbit anti-mouse immunoglobulin conjugated with horseradish peroxidase P0260., Dakopatts, Denmark.
- 3.4.2. Rabbit anti human immunoglobulin conjugated with horseradish peroxidase P0214., Dakopatts, Denmark
- 3.4.3. Monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ NS1 คือ 1B2
- 3.4.4. Pooled convalescent dengue sera (PCS), ซึ่งรวบรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกอย่างน้อย 30 คน ที่มีค่า HI titer ต่อทั้ง 4 ซีโรทัยป์มากกว่าหรือเท่ากับ 1 : 10,240
- 3.4.5. Pooled negative dengue sera (PND), ซึ่งรวบรวมของคนปกติ 6 คน ที่ให้ผลลบในการทดสอบ Dot Enzyme Immunoassay

3.5 เอนไซม์

- 3.5.1 เรสทริกชันเอนไซม์ (Restriction endonuclease enzymes)
*Bam*HI บริษัท Boehringer Mannheim,
*Hind*III บริษัท Boehringer Mannheim,
- 3.5.2. เอนไซม์ T4 DNA ligase ของบริษัท Promega U.S.A

3.6 ดีเอ็นเอและโปรตีนมาตรฐาน

- 3.6.1. ดีเอ็นเอของ λ -DNA ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind* III บริษัท New England Biolabs, U.S.A.
- 3.6.2 ดีเอ็นเอของ ϕ x174 ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hae* III บริษัท Promega, U.S.A.
- 3.6.3 โปรตีนมาตรฐาน (Mid-range protein molecular weight markers), น้ำหนักโมเลกุล 14.4-97.4 กิโลดาลตัน บริษัท Promega, U.S.A.

3.7 เวกเตอร์เพื่อการแสดงออกในระบบ *E.coli*

pTrcHis A expression vector บริษัท Invitrogen corporation, USA.

3.8 สารเคมี

สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
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
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
Chloroform (CHCl ₃)	119.38	E.Merck
Coomassie brilliant blue R 250		Fluka
3,3 Diamino benzidine or DAB	360.1	Sigma
Dithiothetitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	154.3	Promega
Ethidium bromide (C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br)	394.31	Sigma
Ethylene diamine tetra-acetic acid tetrasodium salt (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 hydrochloride (CH ₅ N ₃ •HCl)	95.53	Sigma
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
Isopropanol (CH ₃ CHOHCH ₃)	60.10	E.Merck
Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) (C ₉ H ₁₈ O ₅ S)	238.3	Sigma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
L-arginine monohydrochloride ($C_6H_{15}ClN_4O_2$)	210.86	E.Merck
Magnesium chloride ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	203.08	E.Merck
Magnesium sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	246.48	E.Merck
Maganese chloride ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	197.92	Sigma
2-Mercaptoethanol (C_2H_6OS)	78.13	Fluka
N,N'-Metthyl-bis-acrylamide ($C_7H_{10}N_2O_2$)	154.20	Sigma
2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid or MES ($C_6H_{13}NO_4S$)	195.2	Sigma
Nickle chloride hexahydrate ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	237.7	Sigma
Oxidized glutathione ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$)	612.6	Sigma
Polyethylene glycol (PEG ₈₀₀₀) $HOCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n \cdot OH$	7,000-9,000	Promega
Peptone		Gibco
Phenol (C_6H_5OH)	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
Reduced glutathione	307.3	Sigma
Skim milk		
Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)	136.08	Sigma
Sodium chloride (NaCl)	58.44	E.Merck
Sodium dodecyl sulphate (SDS) ($C_{12}H_{25}O_4SNa$)	288.38	Sigma
Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	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 (TEMED)	166.21	Bio-Rad
Tris (Hydroxymethyl aminomethane) ($C_4H_{11}NO_3$)	21.1	Sigma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
TritonX-100 (alkylphenylpolyethylenglykol)		Fluka
Urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)	60.06	Fluka
Yeast extract		Difco



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 การเตรียมพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1

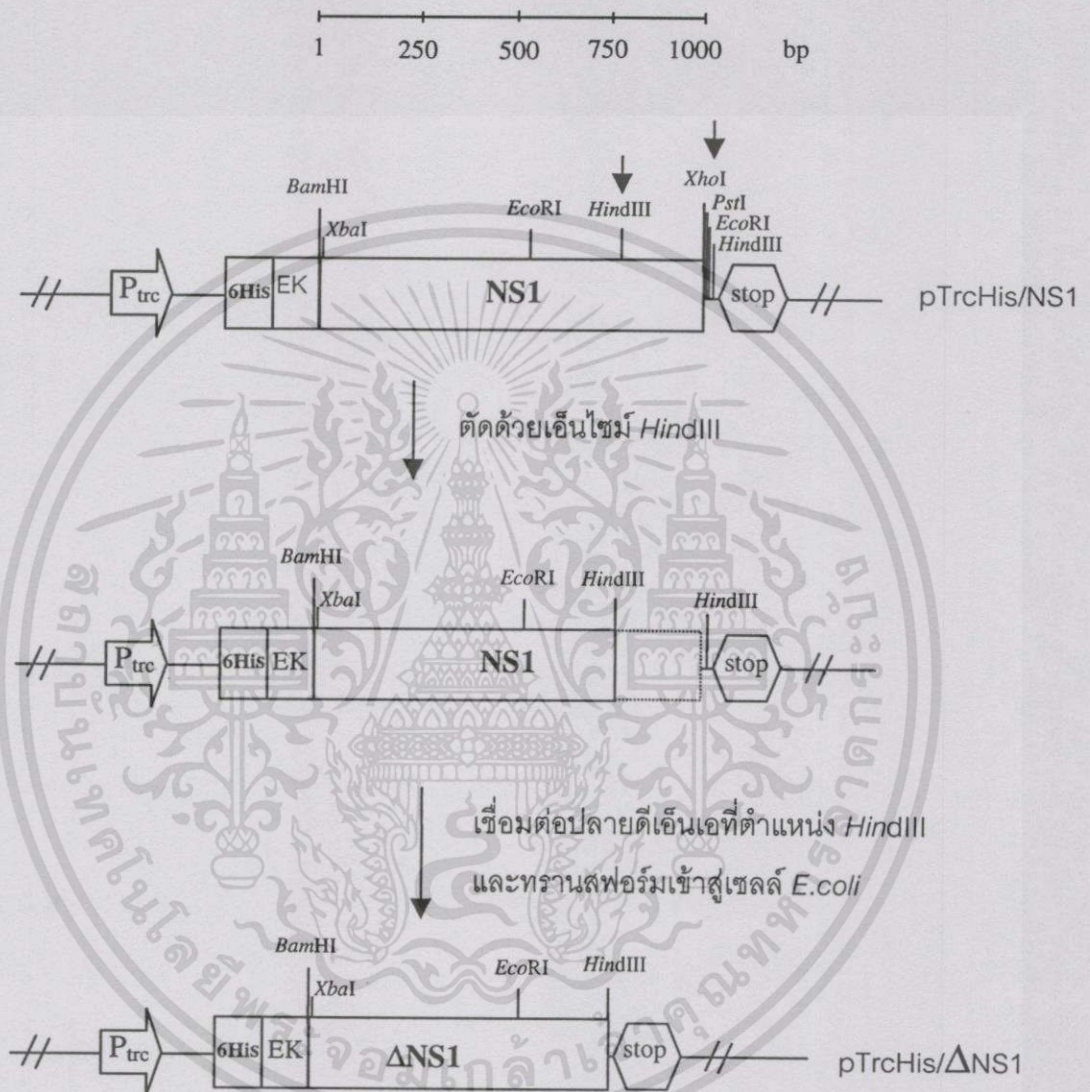
4.1.1 การตัดปลาย 3' ของยีน NS1 จากพลาสมิด pTrcHis/NS1 ด้วยเอนไซม์ *HindIII*

ทำการย่อย (digest) พลาสมิด pTrcHis/NS1 ด้วยเอนไซม์ *HindIII* ซึ่งจะตัดพลาสมิด 2 ตำแหน่งคือ นิวคลีโอไทด์ (nt) ตำแหน่งที่ 814 ของยีน NS1 และ *HindIII* site ในเวกเตอร์ ดังรูปที่ 4.1 จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.2 กิโลเบส และ 0.2 กิโลเบส ออกจากกันด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) นำแผ่นวุ้นมาย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide) ประมาณ 15 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนวุ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นจึงตัดวุ้นที่บริเวณแถบดีเอ็นเอขนาด 5.2 กิโลเบส และสกัดดีเอ็นเอออกจากวุ้นโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (บริษัท QIAGEN, Germany) ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากวุ้นอะกาโรสแล้วละลายในบัฟเฟอร์ QG นำไปปั่นที่ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารตัวอย่างทั้งหมดลงในคอลัมน์ QIAquick ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ทั้งส่วนน้ำใส จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอในคอลัมน์โดยใช้บัฟเฟอร์ PE โดยการปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที แล้วจึงชะดีเอ็นเอบริสุทธิ์ออกโดยใช้ 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8.5 หรือน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เก็บดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้นี้เรียกว่า pTrcHis/ Δ NS1

4.1.2 การเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (Religation)

นำชิ้นดีเอ็นเอ pTrcHis/ Δ NS1 ที่ได้จากข้อ 4.1.1 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายตรง (Linear DNA) และมีปลายทั้งสองด้านที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* เดียวกัน คือ *HindIII* มาเชื่อมต่อกันเพื่อให้ปลายปิดและเป็นวง (Circular form) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ในสารละลายปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอ pTrcHis/ Δ NS1 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร), สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ T4 DNA Ligase (10X) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, เอนไซม์ T4 DNA Ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ปรับ

ปริมาณเป็น 20 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 16-18 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E.coli* ด้วยวิธีทรานสฟอร์มเมชัน



รูปที่ 4.1 แสดงการสร้างพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 โดยการตัดยีน NS1 จากพลาสมิด pTrcHis/NS1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *HindIII* (สเกลด้านบนแสดงขนาดความยาวของยีน NS1 มีหน่วยเป็นเป็นคู่เบส (bp))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การทำทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)

หมายถึง วิธีการนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E.coli* และสามารถเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอ็นเอนั้นในเซลล์ *E.coli* ได้ ตามวิธีที่เสนอโดย Mandel and Higa (1970) และ Cohen *et al.* (1970) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

4.1.3.1 การเตรียมเซลล์ *E.coli* ให้มีความพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอได้ง่าย (Competent Cells)

เลี้ยงเซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ DH 5 α , K12 ER2508 และ K12 TB1 ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ด้วยการเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง จนได้ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.6 แซ่ขวดที่เลี้ยงเชื้อในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที ถ่ายใส่หลอดปั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ปั่นเก็บเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แขนวลอยเซลล์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที) ที่แช่เย็นจำนวน 100 มิลลิลิตร และแช่ในน้ำแข็งต่ออีก 60 นาที ปั่นเก็บเซลล์อีกครั้งก่อนกระจายเซลล์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์แช่เย็นที่มีกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 5 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายแขวนลอยที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลอดเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

4.1.3.2 การทำทรานสฟอร์เมชันโดยวิธี Heat Shock

นำเซลล์ *E. coli* ที่เตรียมไว้ จากข้อ 4.1.3.1 มาแช่ในน้ำแข็งจนละลาย (thawing) เขย่าให้เซลล์กระจายตัวทั่วกันและแบ่งออกมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation mixture) จากข้อ 4.1.2 จำนวน 10 ไมโครลิตร และแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสทันที เป็นเวลา 1 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็งต่ออีก 5 นาที เติมหอาหารเหลวสูตร LB จำนวน 900 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีดูดส่วนน้ำใสทิ้ง แขนวลอยเซลล์ในอาหารเหลวสูตร LB 200 ไมโครลิตร และแบ่ง 100 ไมโครลิตรไปเกลี่ยบนจานอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 จาน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนและทำการคัดเลือกโคโลนีหรือทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม pTrcHis/ Δ NS1 ต่อไป

4.2 การตรวจสอบทรานสเฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม pTrcHis/ Δ NS1

ทรานสเฟอร์แมนท์หมายถึง *E.coli* ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลิน หลังจากการทำทรานสเฟอร์เมชัน

4.2.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากทรานสเฟอร์แมนท์

เลี้ยงเชื้อ *E.coli* แต่ละโคลนนี้ที่ได้จากการทำทรานสเฟอร์เมชัน ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ประมาณ 12-18 ชั่วโมง) บั่นเก็บตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เติมนสารละลายบัฟเฟอร์ Solution I (ภาคผนวกที่ 2.2) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมนสารละลาย Solution II (ภาคผนวกที่ 2.3) จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยการพลิกหลอดอย่างช้าๆ แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมนสารละลาย Solution III (ภาคผนวกที่ 2.4) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เซยาให้เข้ากันจนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที บั่นทิ้งตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เติมน RNase A (DNase free) เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นสกัดโปรตีนของเซลล์ออกด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวกที่ 2.5) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เซยาแรงๆ ให้เข้ากัน นำไปบั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอที่อยู่ชั้นบนมาใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมนสารละลายคลอโรฟอร์ม 400 ไมโครลิตร เซยาและบั่นแยกส่วนน้ำใสด้านบน จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอทั้งหมดจากส่วนน้ำใสที่สกัดได้โดยการเติมนไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร นำไปบั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 32 ไมโครลิตร จากนั้นตกตะกอน พลาสมิดดีเอ็นเออีกครั้งโดยการเติม 4 ไมลาร์โซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวกที่ 2.7) 8 ไมโครลิตร และ 13 เปอร์เซ็นต์ PEG (ภาคผนวกที่ 2.6) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็งนาน 20 นาที แล้วบั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วหรือบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวกที่ 2.1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.2.2 การตรวจหาขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 4.2.1 มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมเพื่อตรวจหาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ NS1 โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) ในการตรวจหาพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/ Δ NS1 จะย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้เอนไซม์ *Bam*HI/*Hind*III เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ NS1 ที่ได้กับพลาสมิด

ควบคุมคือ pTrcHis/NS1 หรือ pTrcHis A ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เดียวกัน คัดเลือกโคลน *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/ Δ NS1 เพื่อนำไปตรวจสอบการผลิตโปรตีนต่อไป

4.3. วิธีการเหนี่ยวนำให้ *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/ Δ NS1 สร้างโปรตีน 6H- Δ NS1

เลี้ยงเชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 ที่ต้องการในอาหารเหลว LB ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ที่เติมยาแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสประมาณ 12-18 ชั่วโมง นำมาเจือจาง 1/10 ของเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมงจนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร (OD600) ประมาณ 0.6-0.8 จากนั้นเติมสารละลาย Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ 6H- Δ NS1 จากเซลล์ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) และเลี้ยงเชื้อต่อไปอีก 3 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และนำไปวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนที่ผลิตได้ด้วยการทำ SDS-PAGE และการทำ Western-blot analysis.

4.4 การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของรีคอมบิแนนต์โปรตีน

4.4.1 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ศึกษาขนาดของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE โดยการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ประกอบด้วยโพลีอะคริลาไมด์ 12 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Resolving gel (ภาคผนวกที่ 4.6) และ 3.85 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Stacking gel (ภาคผนวกที่ 4.7) ในชุดเตรียมเจลของ Mini-protean II electrophoresis cell system (BioRad) หรือ SE 250 Mighty small II slab gel electrophoresis unit (Hofer) นำตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทดสอบผสมกับบัฟเฟอร์ 4xRSB (reducing sample buffer) (ดูในภาคผนวกที่ 4.9) ในอัตราส่วน 3 : 1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้หยอดลงในแต่ละช่องตัวอย่างช่องละ 10 ไมโครลิตร โดยให้มีโปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาด (molecular weight marker) หยอดลงในช่องตัวอย่างอย่างน้อย 1 ช่องเสมอ เติมสารละลาย 1x Running buffer (ดูในภาคผนวกที่ 4.8) ในถังบัฟเฟอร์ด้านในให้ท่วมช่องตัวอย่าง และเติมในถัง

บัฟเฟอร์ด้านนอกประมาณครึ่งถัง เปิดกระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไปในเครื่อง 150 โวลต์ ประมาณ 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าสีจะตกลงไปยังด้านล่างของเจลจึงปิดเครื่องแล้วนำแผ่นเจลออก นำเจลที่ได้ไปตรวจสอบ โดยวิธี Coomassie blue staining หรือ Western blot ต่อไป

4.4.2 การย้อมแถบโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจลด้วยสารละลายย้อมสีโคแมสซี (Coomassie blue staining)

นำเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโตรไฟรีซิสแล้วจากข้อ 4.4.1 แช่น้ำย้อมสีโคแมสซี (ดูในภาคผนวกที่ 5.1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเทน้ำย้อมสีออก และล้างสีหลายๆครั้งด้วยน้ำยา destain (ดูในภาคผนวกที่ 5.2) เขย่าเบาที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนปรากฏขึ้น

4.4.3 การย้อมแถบโปรตีนโดยวิธี Western Blot

ทำการย้ายโปรตีนจากเจลโพลีอะครีลาไมด์ที่ผ่านการทำอิเล็กโตรไฟรีซิสแล้วจากข้อ 4.4.1 ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน ที่ชุ่มด้วย blotting buffer (ดูในภาคผนวกที่ 6.1) โดยใช้เครื่อง Semi-dry blotter ด้วยกระแสไฟฟ้า 0.8 มิลลิแอมป์ต่อตารางเซนติเมตรหรือ 50 มิลลิแอมป์ต่อ 1 แผ่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัดแผ่นเมมเบรนบริเวณที่เป็นแถบโปรตีนมาตรฐานย้อมด้วยน้ำยา destain ที่ใช้แล้วนาน 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำยา destain ใหม่หลายๆครั้ง ส่วนเมมเบรนที่เหลือแช่ลงในสารละลาย blocking buffer (ดูในภาคผนวกที่ 6.3) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนให้สะอาดด้วยบัฟเฟอร์ PBS จากนั้นแช่เมมเบรนในสารละลายแอนติบอดีจำเพาะ (first antibody) ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) ที่จำเพาะต่อโปรตีน NS1 หรือ ซีรัมรวมของผู้ป่วยใช้เลือดออก (PCS) เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย blocking buffer เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือแช่ค้างคืน หลังจากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย PBS 3 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำเมมเบรนมาแช่ต่อในสารละลายแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP (anti-mouse Igs-HRP สำหรับเมมเบรนที่เคยแช่ในโมโนโคลนอลแอนติบอดี และ anti-human IgG-HRP สำหรับเมมเบรนที่เคยแช่ในซีรัมผู้ป่วย) โดยเจือจาง 1:1000 ในสารละลาย blocking buffer และแช่ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด ล้างแผ่นเมมเบรน 3 ครั้ง ด้วยวิธีเดียวกันกับข้างต้น จากนั้นนำเมมเบรนมาแช่ในสารละลายสับสเตรท (ประกอบด้วย 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) : ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ : สารละลาย 8 เปอร์เซ็นต์นิเกิลคลอไรด์ ในอัตราส่วน 1มิลลิลิตร ต่อ 2 ไมโครลิตร ต่อ 5 ไมโครลิตร) เป็นเวลา 5 นาทีในที่มืด แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น โปรตีนที่จำเพาะกับแอนติบอดีจะปรากฏเป็นแถบสีน้ำตาลเข้มขึ้นมา

4.5 การตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนโดยวิธี Dot Enzyme Immunoassay (DEIA)

นำโปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 ที่ต้องการทดสอบหาค่า (dot) ลงบนไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน 2 ไมโครลิตรต่อหยด ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วแชลงในสารละลาย blocking buffer นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS 3 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วย้อมแผ่นเมมเบรนในสารละลายแอนติบอดีจำเพาะ โดยวิธีการเช่นเดียวกับการทำ Western blot analysis ในข้อ 4.4.3 โปรตีนที่จำเพาะกับแอนติบอดีจะปรากฏเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มขึ้นมา

4.6 การแยกricoอมบิแนนต์โปรตีนให้บริสุทธิ์

4.6.1 การทำเซลล์ *E.coli* ให้แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonication)

นำเซลล์ *E.coli* ที่เหนียวทำให้มีการสร้างโปรตีน 6H- Δ NS1 ด้วยสารละลาย IPTG มาปั่นแยกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และแขวนลอยเซลล์ที่ได้ใน Lysis บัฟเฟอร์ (ภาคผนวกที่ 7.5) 1 ส่วนต่อ 50 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นโดยปริมาตร เช่นเติม บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตรในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonopuls แบบ W-380, บริษัท Heat systems-ultrasonic, Inc., U.S.A) โดยแช่ภาชนะที่บรรจุสารละลายแขวนลอยเซลล์ *E.coli* ในน้ำแข็งตลอดเวลา จุ่ม probe ลงในสารละลายแล้วตั้งเวลาให้คลื่นเสียงความถี่สูงทำงานทุกๆ 10 วินาทีหลายๆ ครั้ง โดยพัก 5 วินาทีในแต่ละครั้งจนเซลล์แตกหมด ปั่นเก็บตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อแยกโปรตีนส่วนน้ำใสที่ละลายน้ำได้ (soluble protein) ออกจากโปรตีนส่วนตะกอนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (insoluble protein)

4.6.2 การล้างตะกอนโปรตีน inclusion ของ *E.coli*

นำตะกอนที่มีโปรตีน 6H- Δ NS1 มาล้างด้วยสารละลาย lysis บัฟเฟอร์ที่เติม Triton X-100 ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวกที่ 7.6) 1 ส่วนต่อ 100 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ เริ่มต้นโดยปริมาตร กระจายโปรตีนให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเขย่าเบาๆ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ทำซ้ำ 4 ครั้ง

4.6.3 การละลายตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายดีแวนเจอร์แรนท์

นำตะกอนของโปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผ่านการล้างแล้วมาละลายในสารละลาย บัฟเฟอร์ 6M guanidine-HCl ทีเอช 8.0 (ภาคผนวกที่ 7.1) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นโดยปริมาตร (เช่น ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *E.coli* 1 ลิตร ด้วย

บัฟเฟอร์ 20 มิลลิลิตร) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที บั่นแยกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นสารละลายโปรตีน 6H- Δ NS1 ซึ่งจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธี Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)

4.6.4 การแยกรีคอมบิแนนต์โปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

เป็นวิธีการแยกโปรตีน 6H- Δ NS1 ที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัวทางปลายอะมิโน (N-terminal) ของโปรตีน 6H- Δ NS1 ด้วยเรซินที่มีโคบอลต์ไอออนฝังอยู่โดยรอบ (Cobalt immobilized resin) ในการศึกษานี้ได้ใช้เรซิน TALON (บริษัท CLONTECH Laboratories, Inc., USA.) ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

เตรียมเรซินที่จะใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยแบ่งเรซินที่ต้องการใช้ออกมา บั่นเบาๆ ที่ 1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที (เพื่อเป็นการแยกเรซินออกจากสารละลายเอทานอลที่แขวนลอยอยู่ และจะใช้ความเร็วรอบนี้ในการบั่นแยกเรซินตลอดการทดลอง) ดูดสารละลายเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ที่ใช้แขวนลอยเรซินออกไป ล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 5 เท่า ของปริมาตรเรซิน เติมสารละลาย 6M guanidine-HCl พีเอช 8.0 (ภาคผนวกที่ 7.1) จำนวน 5 มิลลิลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน จะสังเกตเห็นเรซินเป็นสีชมพูเข้มขึ้น ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที บั่นแยกเรซินแล้ว นำมาผสมกับสารละลายโปรตีนที่ได้จากข้อ 4.6.3 ในอัตราส่วนของเรซิน 1 มิลลิลิตร ต่อ สารละลายโปรตีน 5 มิลลิลิตร (หรือเท่ากับ 250 มิลลิลิตรของการเลี้ยงเชื้อ *E.coli*) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อให้โปรตีน 6H- Δ NS1 จับกับโคบอลต์ไอออน (Co^{2+}) บนเรซิน จากนั้น บั่นแยกส่วนของสารละลายโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ได้จับกับเรซินออกจากเรซินที่มีโปรตีน 6H- Δ NS1 และล้างโปรตีนบนเบื่อนอื่นที่อาจเกาะอยู่บนเรซิน ด้วยสารละลาย 8 M urea lysis buffer พีเอช 8.0 (ภาคผนวกที่ 7.2) จำนวน 10 เท่าของเรซินโดยปริมาตร ทำซ้ำ 5 ครั้ง และนำเรซินที่ได้ไปบรรจุลงคอลัมน์ขนาด 2 มิลลิลิตรที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ล้างเรซินซ้ำด้วยสารละลาย 8 M urea lysis buffer พีเอช 8.0 จำนวน 2 เท่าของเรซินโดยปริมาตร ตามด้วยสารละลาย 8 M urea wash buffer พีเอช 7.0 (ภาคผนวกที่ 7.3) จำนวน 1 เท่าของเรซินโดยปริมาตร จากนั้นจึงชะโปรตีน 6H- Δ NS1 ออกจากเรซินด้วยสารละลาย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 (ภาคผนวกที่ 7.4) จำนวนอย่างน้อย 5 เท่าของเรซินโดยปริมาตร โดยแยกเก็บสารละลายโปรตีนจากคอลัมน์หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A280) เพื่อตรวจหาปริมาณโปรตีนจากแต่ละหลอด

4.7 การคืนสภาพธรรมชาติของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1

4.7.1 การไดอะไลซ์โดยการลดปริมาณยูเรียลงเป็นลำดับ (Stepwise removal of urea)

นำโปรตีน 6H- Δ NS1 บริสุทธิ์ที่อยู่ใน 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 ใส่ถุงไดอะไลซิส แล้วนำไปไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ A ที่มียูเรีย 5 โมลาร์ (ภาคผนวกที่ 8.1.1) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนใส่ในบัฟเฟอร์ A ที่มียูเรีย 2.5 โมลาร์ (ภาคผนวกที่ 8.1.2) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอีก 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนใส่ในบัฟเฟอร์ A ที่เติม TritonX-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวกที่ 8.1.3) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เก็บโปรตีนที่ผ่านการคืนสภาพธรรมชาติแล้วออกจากถุงไดอะไลซิส เติมน้ำสารละลายกลีเซอรอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.7.2 การไดอะไลซ์ในไกลซีนบัฟเฟอร์

นำโปรตีน 6H- Δ NS1 บริสุทธิ์ใน 8 M elution buffer พีเอช 4.5 มาปรับพีเอช ของโปรตีนเริ่มต้นให้มีความเป็นด่างแก่ที่ พีเอช 10.5 ด้วย NaOH เข้มข้น แล้วเติมน้ำสารละลาย Dithiothreitol (DTT) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของไกลซีนร่วมกับ EDTA พีเอช 10.5 (ภาคผนวกที่ 8.2.1) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนมาเป็นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวกที่ 8.2.2) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 3 ครั้ง โดยเติม TritonX-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ลงในบัฟเฟอร์สุดท้ายของการไดอะไลซ์ (ภาคผนวกที่ 8.2.3)

4.7.3 วิธีการ Dilution (Dilution method)

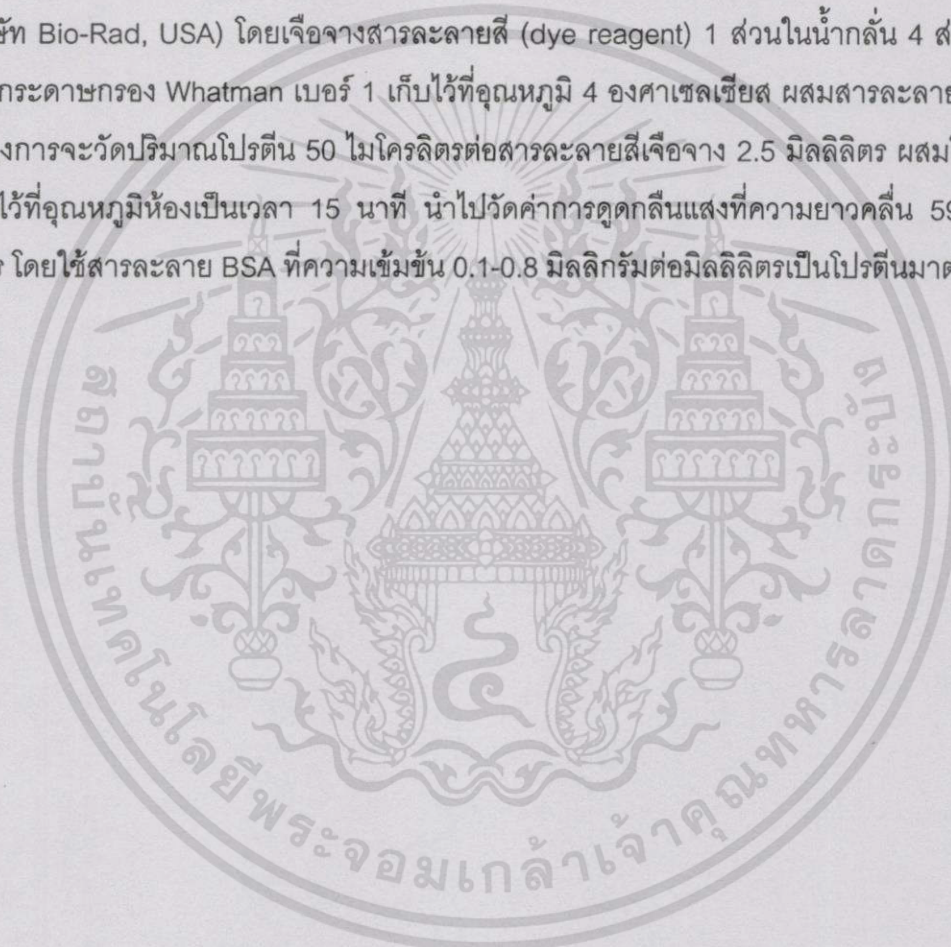
นำสารละลายโปรตีน 6H- Δ NS1 บริสุทธิ์ใน 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 ค่อยๆหยอดอย่างช้าๆลงใน L-arginine Refolding buffer (ดูในภาคผนวกที่ 8.3) ปริมาตร 500 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วกวนเบาๆแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ปั่นตกตะกอนที่อาจเกิดขึ้นที่ 12,000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนน้ำใสที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยใช้ Stir-cell Ultrafiltration (Amicon) โปรตีน 6H- Δ NS1 ใน refolding buffer จำนวน 500 มิลลิลิตร จะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการใช้แก๊สไนโตรเจนดันสารละลายใน Stir-cell container ผ่านเมมเบรนที่มี cut off เท่ากับ 30,000 MW (PM 30, Amicon) เนื่องจากโปรตีน 6H- Δ NS1 มีขนาด 35 กิโลดาลตัน จะไม่สามารถผ่านเมมเบรนออกไปได้ จะมีแต่สารละลายบัฟเฟอร์เท่านั้นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถูกดันออกมาและจะทำให้ปริมาตรของสารละลายโปรตีนใน container ลดลงในขณะที่เดียวกันก็จะทำให้มีความเข้มข้นของโปรตีนสูงขึ้น โปรตีนจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นปริมาณ 50 เท่า (ปริมาตรหลังจากผ่าน Ultrafiltration แล้วจะอยู่ในช่วง 5-10 มิลลิลิตร)

4.8 วิธีการหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยชุดวัดโปรตีนสำเร็จรูป

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้โดยใช้ Protein Assay Dye Reagent Concentrated (บริษัท Bio-Rad, USA) โดยเจือจางสารละลายสี (dye reagent) 1 ส่วนในน้ำกลั่น 4 ส่วน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผสมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการจะวัดปริมาณโปรตีน 50 ไมโครลิตรต่อสารละลายสีเจือจาง 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตีทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 0.1-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นโปรตีนมาตรฐาน.

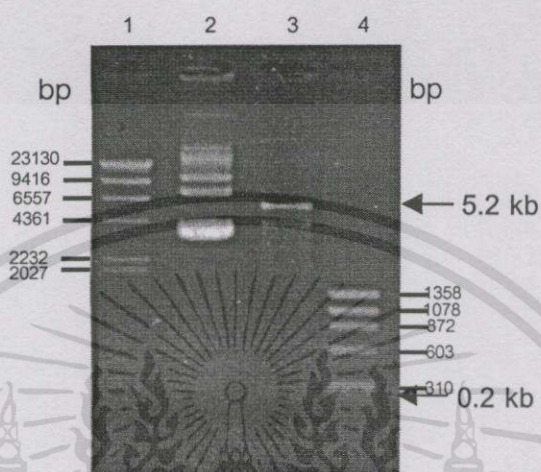


บทที่ 5

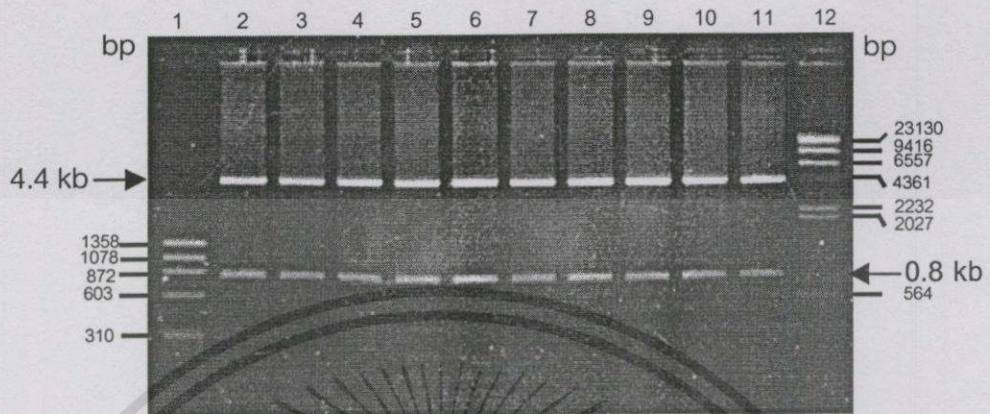
ผลการทดลอง

5.1 การสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1

จากการตัดพลาสมิด pTrcHis/NS1 ซึ่งมีขนาด 5.4 กิโลเบส ด้วยเอนไซม์ *Hind*III (ดังวิธีการทดลองที่ 4.1.1) จะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอ (DNA fragment) ขนาด 5.2 กิโลเบส และขนาด 0.24 กิโลเบส เมื่อนำมาแยกบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1%) (ดังรูปที่ 5.1) ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.2 กิโลเบส ประกอบด้วยเวกเตอร์ pTrcHis ขนาด 4.4 กิโลเบสรวมกับยีน NS1 ส่วนปลาย 5' ของตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1-814 ขนาด 0.8 กิโลเบส ส่วนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.24 กิโลเบสนั้นเป็นยีน NS1 ในส่วนปลาย 3' นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 815-1056 ทำการสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.2 กิโลเบสออกจากอะกาโรสเจล (ดังวิธีการทดลองที่ 4.1.1) ได้เป็นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่เรียกว่า pTrcHis/ Δ NS1 จากนั้นนำมาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (religation) ให้ส่วนปลายที่มี *Hind*III site มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (ดังวิธีการทดลองในข้อ 4.1.2) แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α (ดังวิธีการทดลองที่ 4.1.3.2) จากการทดลองพบว่ามีการสเฟอรแมนท์ที่ทนต่อยาปฏิชีวนะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB เป็นโคโลนีสีขาวทั้งหมดประมาณ 100 โคโลนี ทำการสุ่มเลือกจำนวน 10 โคโลนี เพื่อคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการโดยวิธีการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ดังวิธีการทดลองที่ 4.2.1) แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III (ดังวิธีการทดลองในข้อ 4.2.2) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการโคลนยีน NS1 เข้าไปในเวกเตอร์ pTrcHis เพื่อยืนยันว่ามียีน NS1 อยู่ พบว่าโคโลนีที่สุ่มเลือกมาทั้ง 10 โคโลนีมีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/ Δ NS1 โดยมีแถบของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกแยกบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 ชิ้นคือ ส่วนของเวกเตอร์ pTrcHis ขนาด 4.4 กิโลเบส และยีน NS1 ขนาด 0.8 กิโลเบส (ดังรูปที่ 5.2 แถวที่ 2-10) เทียบกับ pTrcHis/NS1 ซึ่งจะมีขนาดของ NS1 เท่ากับ 1.0 กิโลเบส และเวกเตอร์ pTrcHis ขนาด 4.4 กิโลเบส



รูปที่ 5.1 แสดงการย่อยพลาสมิด pTrcHis/NS1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III บนวุ้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.2 กิโลเบส และ 0.2 กิโลเบส (ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานในหน่วยคู่เบสแสดงไว้ทางด้านซ้ายสุดและด้านขวาสุดของรูป)
 แถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Φ X174 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III (Φ X174/*Hae*III)
 แถวที่ 2 คือ พลาสมิด pTrcHis/NS1 ก่อนถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III
 แถวที่ 3 คือ พลาสมิด pTrcHis/NS1 ที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III
 แถวที่ 4 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ phage ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III (λ -DNA/*Hind*III)



รูปที่ 5.2 แสดงการคัดเลือกโคลน *E. coli* ที่มีพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 โดยการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *E. coli* โคลนต่างๆ แล้วย่อยพลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI/*Hind*III ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนวุ้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานในหน่วยคู่เบสแสดงไว้ทางด้านซ้ายสุดและด้านขวาสุดของรูป)

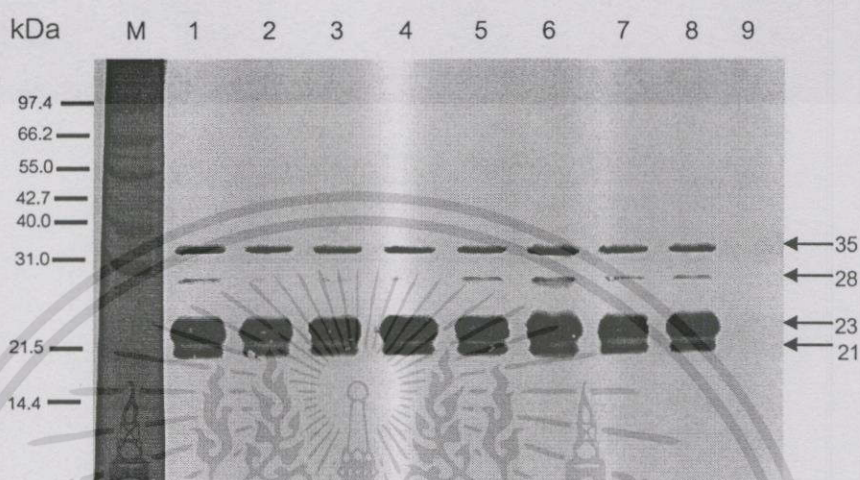
แถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Φ X174 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III (Φ X174/*Hae*III)

แถวที่ 2-11 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดจาก *E. coli* โคลนที่ 1-10

แถวที่ 12 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ phage ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III (λ -DNA/*Hind*III)

5.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1

โคลน *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/ Δ NS1 ที่ได้รับการคัดเลือกแล้ว ถูกเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 ซึ่งเป็นส่วนปลายอะมิโน (N-terminal) ของโปรตีน NS1 ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 271 ตัว ด้วยสารละลาย Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ดังวิธีการทดลองที่ 4.3) หลังจากเก็บเซลล์ 3 ชั่วโมงแล้วนำเซลล์ *E.coli* ที่ได้มาตรวจสอบการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 โดยการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบน 12 % SDS-PAGE (ดังวิธีการทดลองที่ 4.4.1) ตรวจสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นด้วยวิธี Western blot (ดังวิธีการทดลองที่ 4.4.3) โดยการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1 (1B2) พบว่าทุกโคลนสามารถผลิตโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ 1B2 ได้ ประกอบด้วยโปรตีน 4 ขนาดคือ 35 กิโลดาลตัน, 28 กิโลดาลตัน, 23 กิโลดาลตัน และ 21 กิโลดาลตัน แต่โปรตีนที่ควรจะเป็น 6H- Δ NS1 น่าจะมีขนาด 35 กิโลดาลตัน (เทียบกับการคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนโดยใช้ลำดับกรดอะมิโน) โปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าอาจจะเป็นโปรตีนที่ถูกย่อยจากเอนไซม์บางชนิดใน *E.coli* เอง (รูปที่ 5.3 แถวที่ 1-8) ส่วนใน *E.coli* โคลนที่ 1 ที่ไม่ได้มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG จะไม่มีการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ออกมา (รูปที่ 5.3 แถวที่ 9)



รูปที่ 5.3 แสดงการวิเคราะห์ Western blot ของโปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำโคลน *E.coli* (pTrcHis/ΔNS1) ด้วย 1 mM IPTG โดยทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอล แอนติบอดี 1B2 ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1

แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาด มีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (ดังแสดงทางด้านซ้าย)

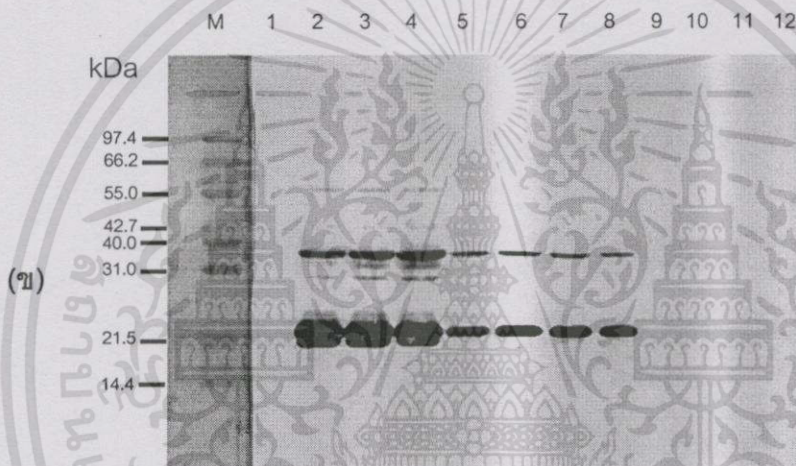
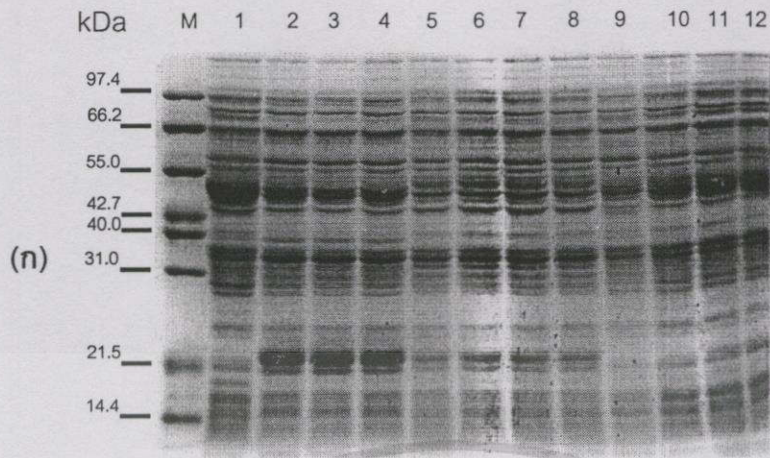
แถวที่ 1-8 คือ โปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ΔNS1) โคลนที่ 1-8 ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างด้วย IPTG

แถวที่ 9 คือ โปรตีนรีคอมบิแนนต์ที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ΔNS1) โคลนที่ 1 ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG

5.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน

5.3.1 สายพันธุ์ของ *E.coli*

เพื่อต้องการตรวจสอบว่าสายพันธุ์ของ *E.coli* มีผลต่อการแสดงออกหรือการผลิตโปรตีน 6H- Δ NS1หรือไม่ จึงได้ทำการทรานสฟอร์มพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 เข้าใน *E.coli* (ดังวิธีการทดลองที่ 4.1.3.2) สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ DH5 α , K12 ER 2508 และ K12 TB1 และ สุ่มเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ 3 โคโลนี จาก *E.coli* แต่ละสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 ด้วยสารละลาย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ดังวิธีการทดลองที่ 4.3) ทำการเก็บเซลล์ 3 ชั่วโมงหลังจากนั้นแล้ว นำเซลล์ *E.coli* ที่ได้มาตรวจสอบการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 โดยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีโคแมสซิบลู (ดังวิธีการทดลองที่ 4.4.2) (ดังรูป 5.4ก) และตรวจสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นด้วยการวิเคราะห์ Western Blot โดยการทำให้ปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1 (1B2) (ดังวิธีการทดลองที่ 4.4.3) (ดังรูป 5.4ข) พบว่าปริมาณรีคอมบิแนนต์โปรตีนซึ่งแสดงออกใน *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α (แถวที่ 2-4) มีปริมาณสูงกว่า *E.coli* สายพันธุ์ K12 ER2508 (แถวที่ 6-8) ในขณะที่ไม่พบรีคอมบิแนนต์โปรตีนใน *E.coli* สายพันธุ์ K12 TB1 (แถวที่ 10-12) จึงเลือกใช้ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α มาใช้ในการหาปัจจัยอื่นที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนต่อไป



รูปที่ 5.4 แสดงการแยกโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) สายพันธุ์ต่างๆ

(ก) ด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสีโคแมสตีบลู

(ข) Western blot analysis โดยทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1

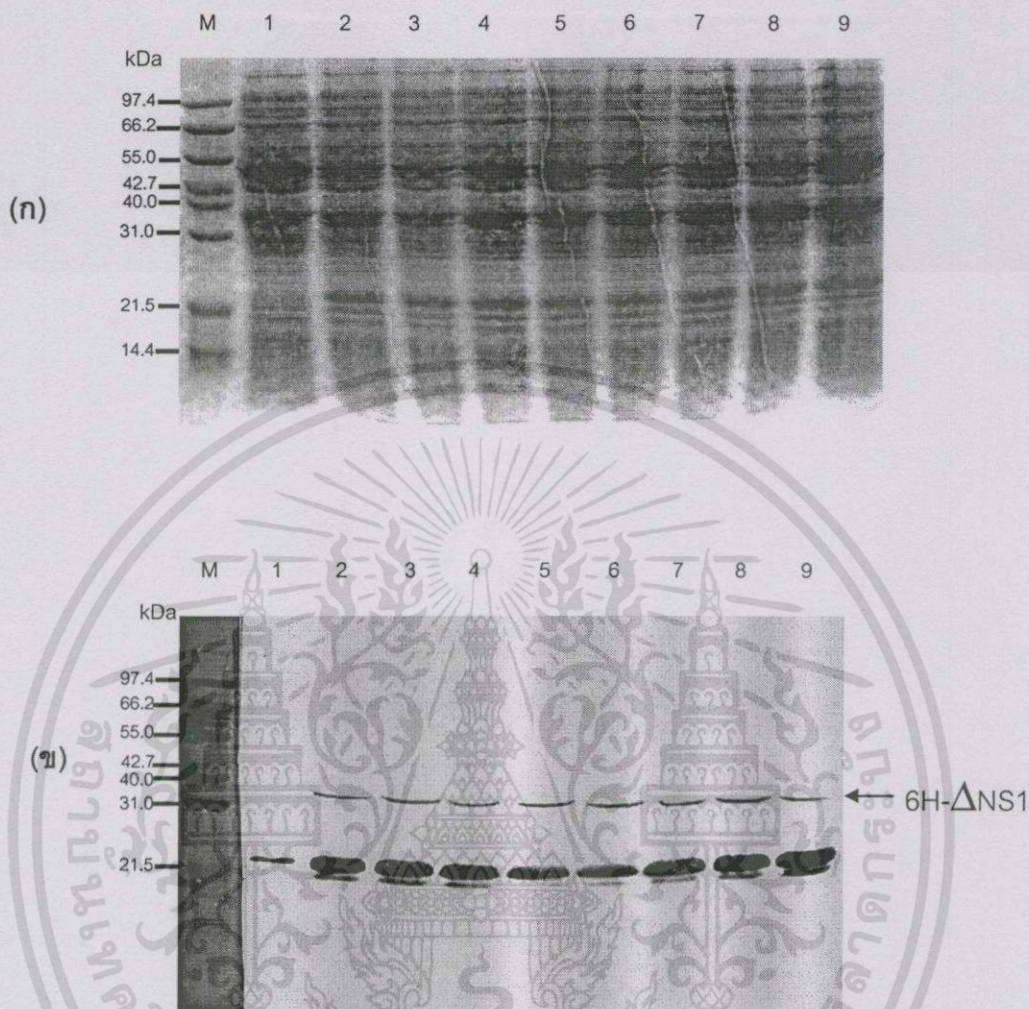
- แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa)
- แถวที่ 1 คือ โปรตีนที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) สายพันธุ์ DH5 α โคลนที่ 1 ที่ไม่ได้เติมสารละลาย IPTG
- แถวที่ 2-4 คือ โปรตีนที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) สายพันธุ์ DH5 α โคลนที่ 1-3 ที่มีการเติมสารละลาย IPTG
- แถวที่ 5 คือ โปรตีนที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) สายพันธุ์ K12 ER2508 โคลนที่ 1 ที่ไม่ได้เติมสารละลาย IPTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- แถวที่ 6-8 คือ โปรตีนที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) สายพันธุ์ K12 ER2508 โคลนที่ 1-3 ที่มีการเติมสารละลาย IPTG
- แถวที่ 9 คือ โปรตีนที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) สายพันธุ์ K12 TB1 โคลนที่ 1 ที่ไม่ได้เติมสารละลาย IPTG
- แถวที่ 10-12 คือ โปรตีนที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) สายพันธุ์ K12 TB1 โคลนที่ 1-3 ที่มีการเติมสารละลาย IPTG

5.3.2 ความเข้มข้นของ Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)

เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน 6H- Δ NS1 ได้ดีที่สุดจึงได้ทำการเหนี่ยวนำ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) สายพันธุ์ DH5 α โคลนที่ 1 (จากผลการทดลองที่ 5.3.1) ด้วยสารละลาย Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-1.5 มิลลิโมลาร์ (ดังวิธีการทดลองที่ 4.3) นำเซลล์ *E.coli* ที่ได้มาตรวจสอบการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ใน 12% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีโคแมสซึบลู (รูปที่ 5.5n) และตรวจสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นด้วยการวิเคราะห์ Western Blot โดยการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (1B2) (รูปที่ 5.5ข) พบว่าสารละลาย IPTG สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 ขนาด 35 กิโลดาลตันใน *E.coli* ทุกโคลนที่มีการเติม IPTG จากผลการทดลองไม่พบความแตกต่างในระดับของการแสดงออกของโปรตีนที่ทุกความเข้มข้นของ IPTG ตั้งแต่ 0.1-1.5 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าความเข้มข้นของ IPTG ไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือก IPTG ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ แทนการใช้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในการเหนี่ยวนำให้ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต



รูปที่ 5.5 แสดงการแยกโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ด้วยสารละลาย IPTG ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.5 มิลลิโมลาร์

(ก) ด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสีโคแมสซึบลู

(ข) Western blot analysis โดยทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1

แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน

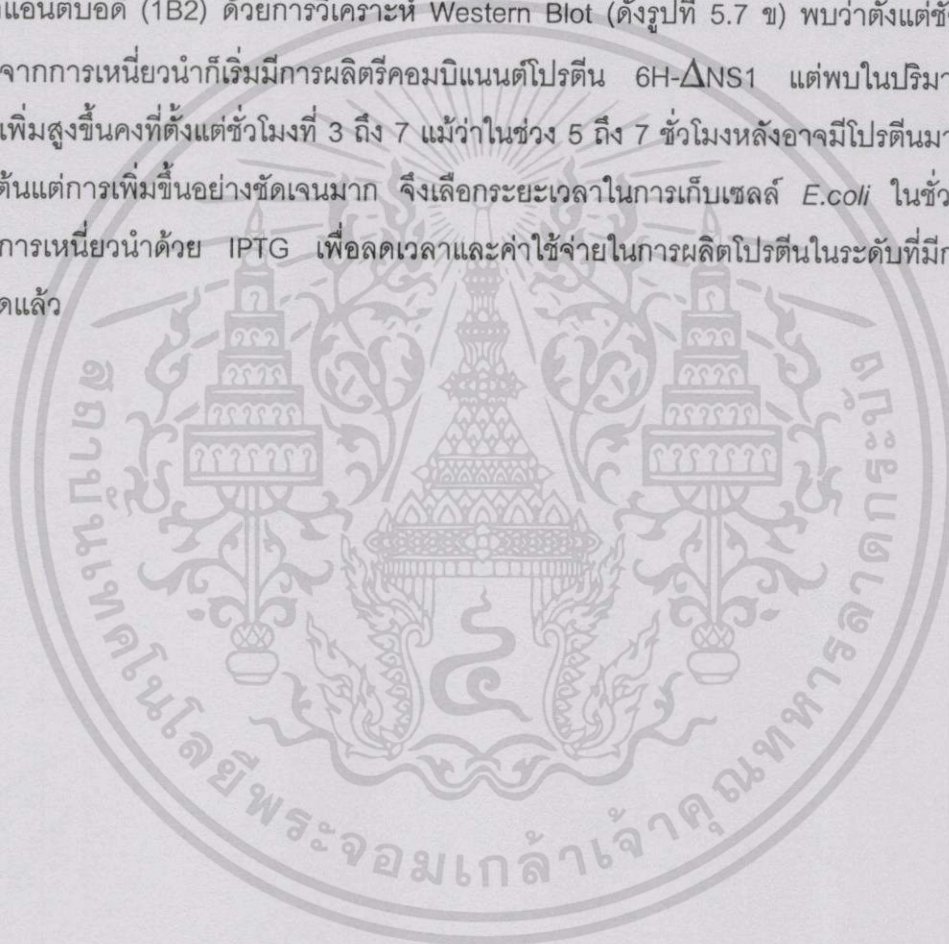
แถวที่ 1 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ที่ไม่ได้เติมสารละลาย IPTG

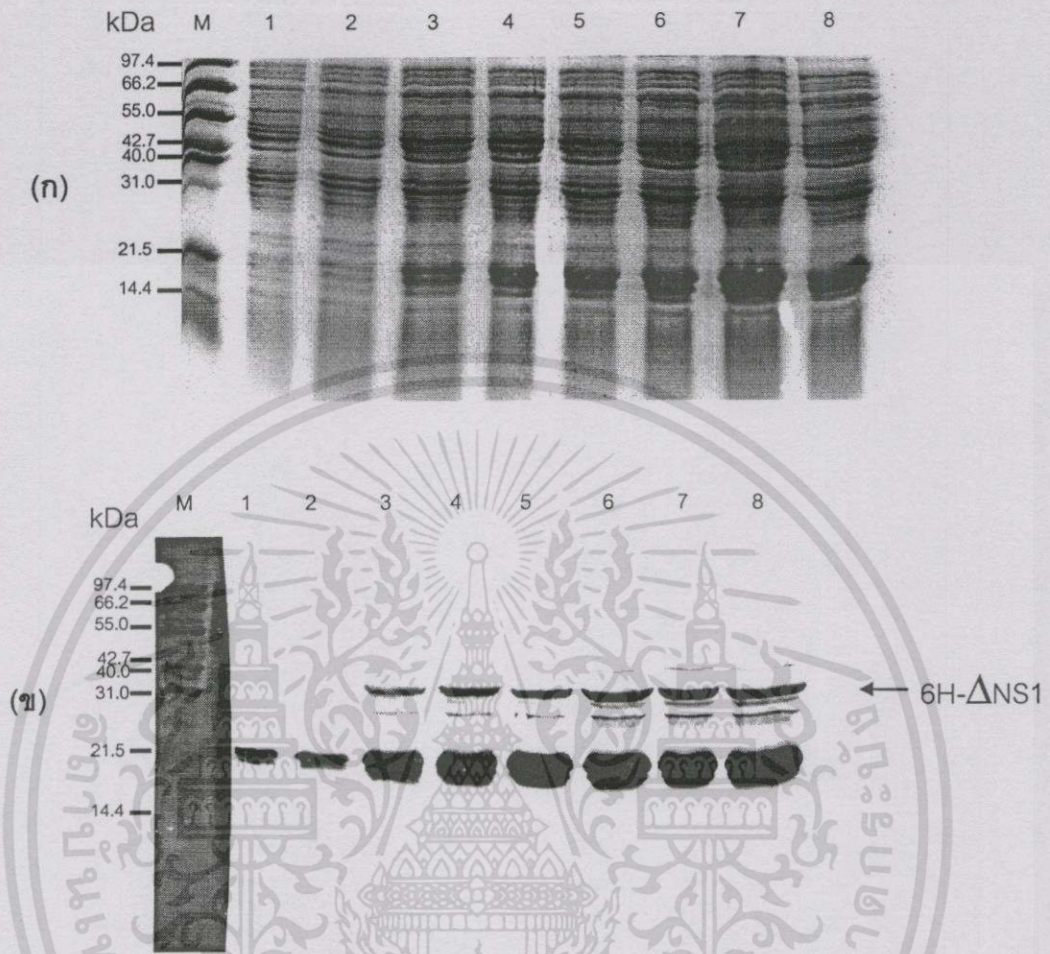
แถวที่ 2-9 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ที่เติมสารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้ *E.coli* สร้างโปรตีน

เพื่อต้องการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้ *E.coli* ที่มีพลาสมิด pTrcHis/ Δ NS1 มีการสร้างโปรตีน 6H- Δ NS1 ได้มากที่สุด จึงได้มีการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน (ดังวิธีการทดลองที่ 4.3) ด้วยสารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และทำการเก็บเซลล์ทุกชั่วโมงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 จนถึงชั่วโมงที่ 7 นำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนด้วยการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าใน 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสีโคแมสซึบลู (ดังรูปที่ 5.6 ก) และตรวจสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นโดยการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (1B2) ด้วยการวิเคราะห์ Western Blot (ดังรูปที่ 5.7 ข) พบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 หลังจากการเหนี่ยวนำก็เริ่มมีการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 แต่พบในปริมาณที่น้อยและเพิ่มสูงขึ้นคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ถึง 7 แม้ว่าในช่วง 5 ถึง 7 ชั่วโมงหลังอาจมีโปรตีนมากกว่าในช่วงต้นแต่การเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนมาก จึงเลือกระยะเวลาในการเก็บเซลล์ *E.coli* ในชั่วโมงที่ 3 หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เพื่อลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการผลิตโปรตีนในระดับที่มีการขยายขนาดแล้ว





รูปที่ 5.6 แสดงการแยกโปรตีนจากการเหนี่ยวนำเซลล์ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ด้วย 0.2 mM IPTG ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึง 7

(ก) ด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสีโคแมสซีบลู

(ข) Western blot analysis โดยทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1

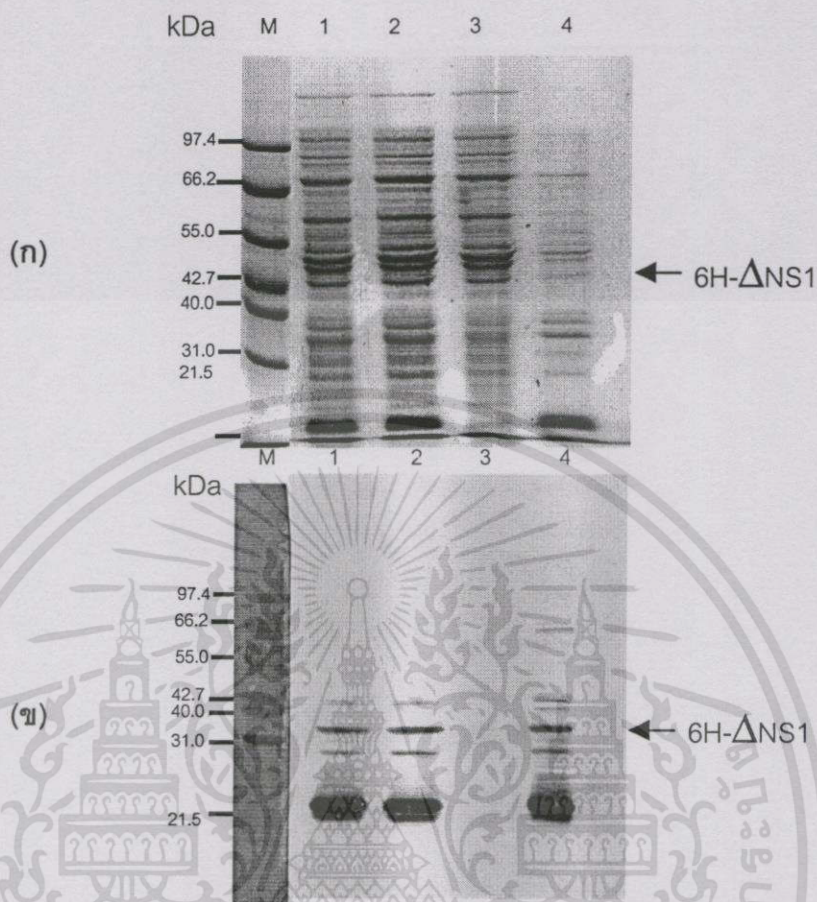
แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน

แถวที่ 1 คือ โปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ที่ไม่ได้เติมสารละลาย IPTG

แถวที่ 2-8 คือ โปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ที่ได้หลังจากการเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-7 ตามลำดับ

5.4 การตรวจสอบคุณสมบัติการละลายน้ำของรีคอมบิแนนต์โปรตีน

เพื่อต้องการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรตีนที่ผลิตจาก *E.coli* ว่าอยู่ในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำ (soluble protein) หรือเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion body) ซึ่งจะนำไปสู่การวางแผนสำหรับแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนถัดไป จึงได้ทำการเหนี่ยวนำ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ให้มีการสร้างโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ดังวิธีการทดลองที่ 4.6.1) บั่นแยกโปรตีนให้ได้เป็น supernatant และส่วนตะกอน (pellet) เติมน้ำล้างด้วย PBS ลงในส่วนตะกอนให้มีปริมาณเท่ากับโปรตีนในส่วนน้ำใสเพื่อขจัดโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายน้ำ นำโปรตีนที่ได้แต่ละส่วนมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 12% SDS-PAGE (ดังรูปที่ 5.7 ก) แล้วย้อมด้วยสีโคแมสซึบลู และตรวจสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นด้วยการวิเคราะห์ Western Blot โดยการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1 (1B2) (ดังรูปที่ 5.7 ข) จากการทดลองพบว่าโปรตีน 6H- Δ NS1 อยู่ในส่วนของตะกอน โดยไม่พบว่ามีโปรตีนอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำใสเลย (ดังรูปที่ 5.7 ข แถวที่ 3) แสดงว่าโปรตีน 6H- Δ NS1 ส่วนใหญ่หรือทั้งหมดอยู่ในรูปของ inclusion body หรือโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ



รูปที่ 5.7 แสดงการแยกโปรตีนจากเซลล์ *E. coli* (pTrcHis/ Δ NS1) หลังการทำให้เซลล์แตก

(ก) ด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสีโคแมสซึบลู

(ข) Western blot analysis โดยทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1

แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน

แถวที่ 1 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E. coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ก่อนการทำให้เซลล์แตก

แถวที่ 2 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E. coli* (pTrcHis/ Δ NS1) หลังการทำให้เซลล์แตก

แถวที่ 3 คือ โปรตีนส่วนน้ำใสหลังจากการทำให้เซลล์ *E. coli* (pTrcHis/ Δ NS1) แตก

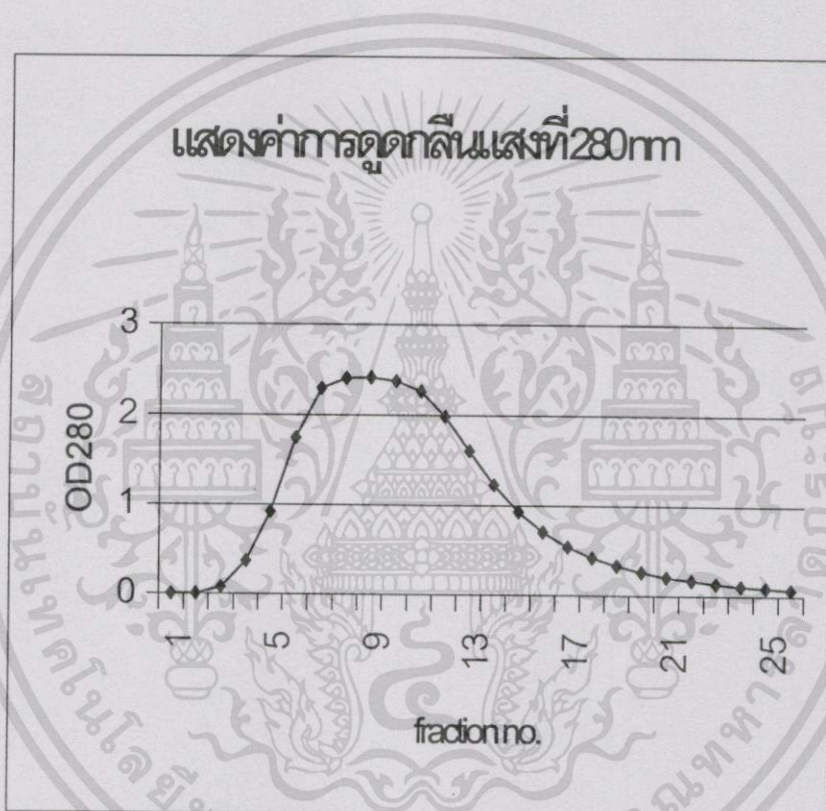
แถวที่ 4 คือ โปรตีนส่วนตะกอนหลังจากการทำให้เซลล์ *E. coli* (pTrcHis/ Δ NS1) แตก

5.5 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)

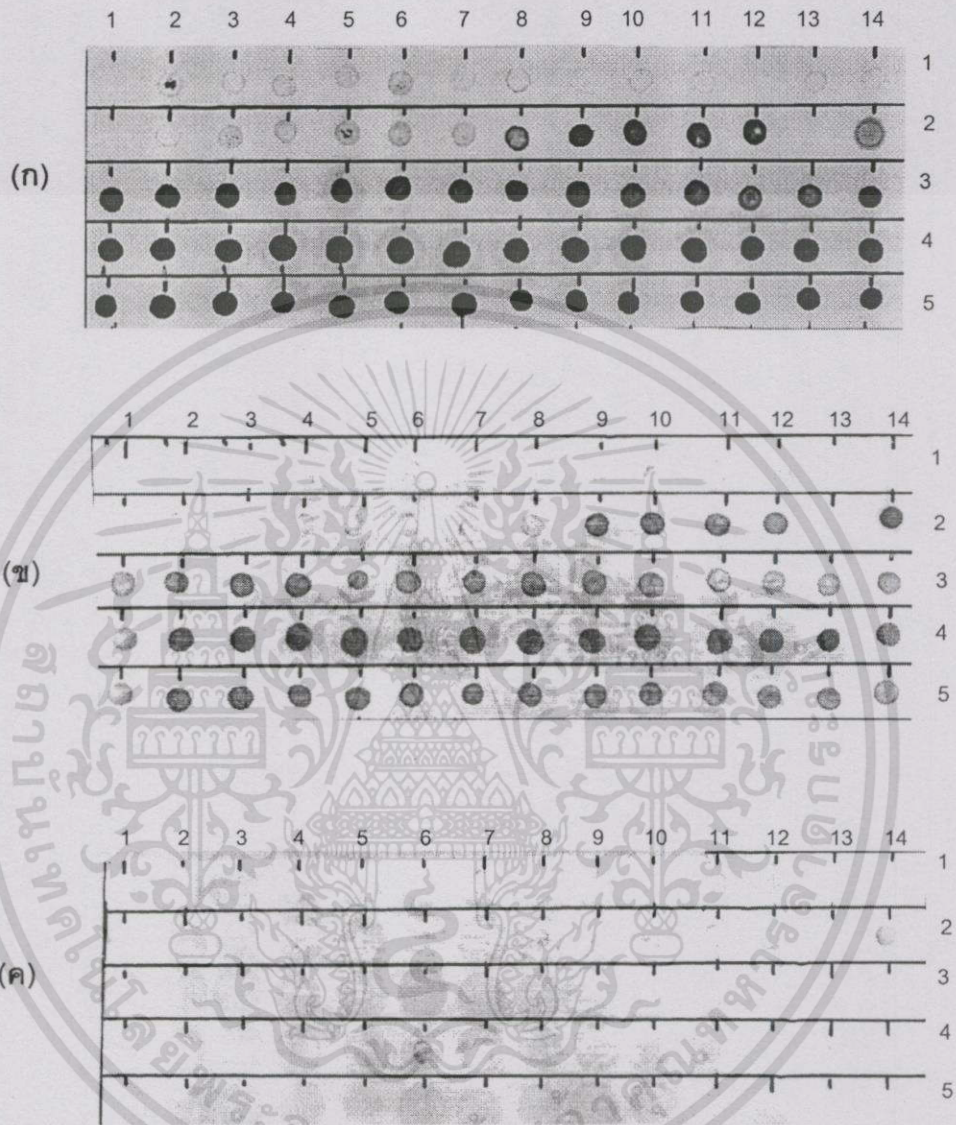
เพื่อทำการแยกโปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผลิตได้จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ให้อยู่ในรูปของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ไม่มีโปรตีนอื่นของ *E.coli* ปนเปื้อน ก่อนที่จะนำไปใช้งานต่อไป จึงเลือกใช้ immobilized Co^{2+} affinity resin ที่มีความสามารถในการจับจำเพาะกับส่วนกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว ที่ปลายอะมิโนของรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 โปรตีนส่วนที่ไม่จับกับเรซินจะถูกแยกออกไปก่อน จากนั้นจึงทำการชะเอาโปรตีน 6H- Δ NS1 ออกจากเรซิน เนื่องจากโปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผลิตใน *E.coli* อยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ก่อนทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ affinity resin จึงต้องทำการละลายโปรตีนในสารละลายดีแนเจอร์แรนท์เข้มข้น คือ 6M guanidine-HCl ก่อน (ดังวิธีการทดลองที่ 4.6.3) ซึ่งจะทำให้โปรตีนอยู่ในรูปที่เสียสภาพธรรมชาติไป (denatured form) กระบวนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Immobilized Metal Affinity Chromatography จึงต้องทำภายใต้สภาวะที่เป็น denaturing condition จนถึงขั้นตอนของการชะโปรตีนออก (ดังวิธีการทดลองที่ 4.6) โปรตีน 6H- Δ NS1 จะถูกชะออกจากเรซินโดย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 และแยกเก็บสารละลายโปรตีนที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (OD280) ได้ผลดังรูป 5.8 พบว่าโปรตีนจะออกมา ในช่วงตั้งแต่หลอดที่ 5-13 โปรตีนที่ได้จากคอลัมน์ซึ่งยังอยู่ในรูปที่เสียสภาพธรรมชาติในยูเรีย (denatured form) ได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะโดยการหยด 2 ไมโครลิตรของสารละลายโปรตีนจากแต่ละหลอดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน NS1 (1B2), ซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกเฉื่อยฉาง 1000 เท่า (PCS) และซีรัมรวมของคนปกติเฉื่อยฉาง 1000 เท่า (PND) โดยวิธี Dot Enzyme Immunoassay (DEIA) (วิธีการทดลองที่ 4.5) เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ ผลการทดลองพบว่าโปรตีนจากทุกหลอดทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีน NS1 (1B2) และ PCS ได้ทั้งหมด (ดังรูปที่ 5.9 ก และ ข) โดยจะมีความเข้มของจุดมากในช่วง peak ที่มีปริมาณโปรตีนสูงเทียบกับรูปที่ 5.8 แต่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 ได้ดีกว่าซีรัมรวมของคนป่วยไข้เลือดออก (PCS) (ดังรูปที่ 5.9 ข) ในขณะที่เกือบจะไม่พบการทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติ (PND) (ดังรูปที่ 5.9 ค) ส่วนตัวอย่างที่ได้จากการล้างเรซินด้วย 8M urea lysis buffer พีเอช 8.0 และ 8M urea wash buffer พีเอช 7.0 ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมทั้งกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน NS1 และซีรัมรวมของ

คนปวยไข้เลือดออก (PCS) ได้บ้างก็เนื่องจากอาจมีโปรตีน 6H- Δ NS1 บางส่วนหลุดออกจากคอลัมน์เมื่อมีการปรับพีเอชของบัฟเฟอร์ แต่โปรตีนส่วนใหญ่ยังคงเกาะอยู่

นอกจากการตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีน 6H- Δ NS1 ด้วยวิธี DEIA แล้ว ได้ทำการวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของ 6H- Δ NS1 ด้วยวิธี SDS-PAGE และวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ผลการทดลองพบว่าโปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์แล้วจะมีขนาด 35 กิโลดาลตันเพียงขนาดเดียวเท่านั้น (รูปที่ 5.10)



รูปที่ 5.8 กราฟแสดงปริมาณโปรตีน 6H- Δ NS1 ของแต่ละหลอดที่ได้จากการชะออกจากคอลัมน์ IMAC โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (OD280)



รูปที่ 5.9 แสดงการทำ Dot Enzyme Immunoassay (DEIA) ของโปรตีน 6H- Δ NS1 จากแต่ละชั้นตอนของการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

- (ก) ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 ที่มีความจำเพาะกับโปรตีน NS1
- (ข) ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกเฉื่อยจาง 1000 เท่า (PCS)
- (ค) ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติที่เฉื่อยจาง 1000 เท่า (PND)

รูปที่ 5.9 (ต่อ)

แถวที่ 1 จุดที่ 1-11 คือ โปรตีนจากคอลัมน์ที่ผ่านการล้างด้วย 8M urea pH 8.0 หลอดที่ 1-11 ตามลำดับ

จุดที่ 12-14 คือ โปรตีนจากคอลัมน์ที่ผ่านการล้างด้วย 8M urea pH 7.0 หลอดที่ 1-3 ตามลำดับ

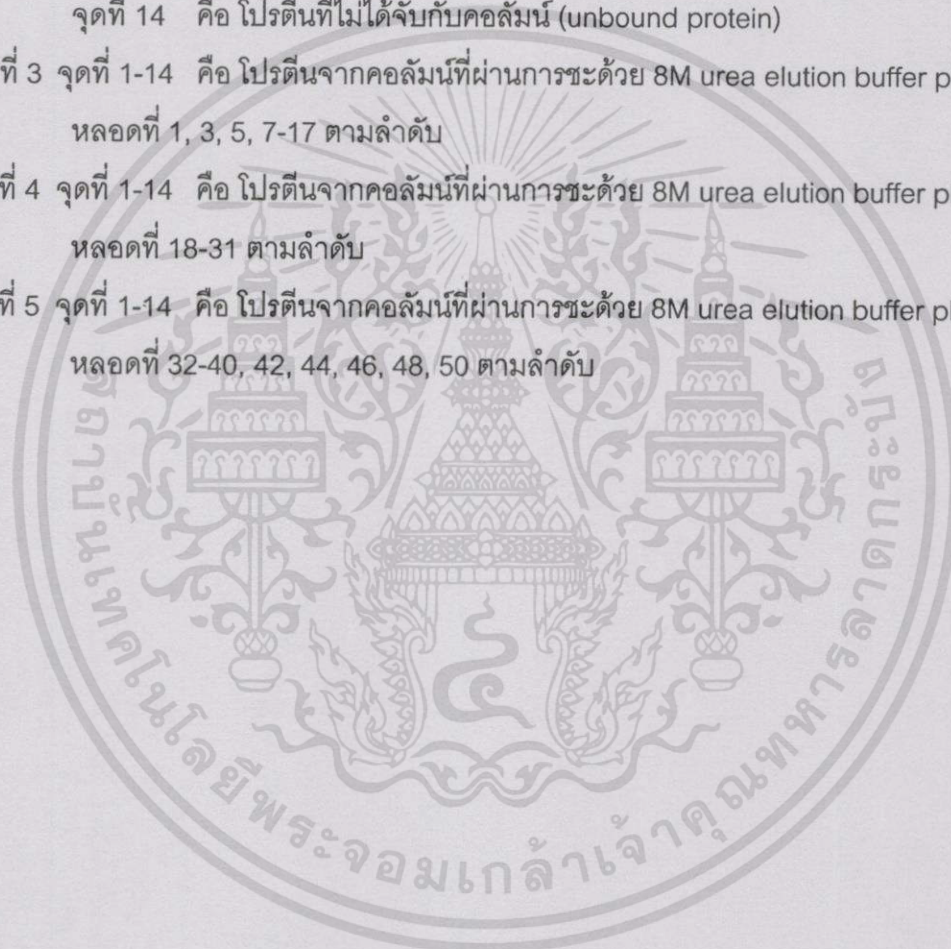
แถวที่ 2 จุดที่ 1-12 คือ โปรตีนจากคอลัมน์ที่ผ่านการล้างด้วย 8M urea pH 7.0 หลอดที่ 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ตามลำดับ

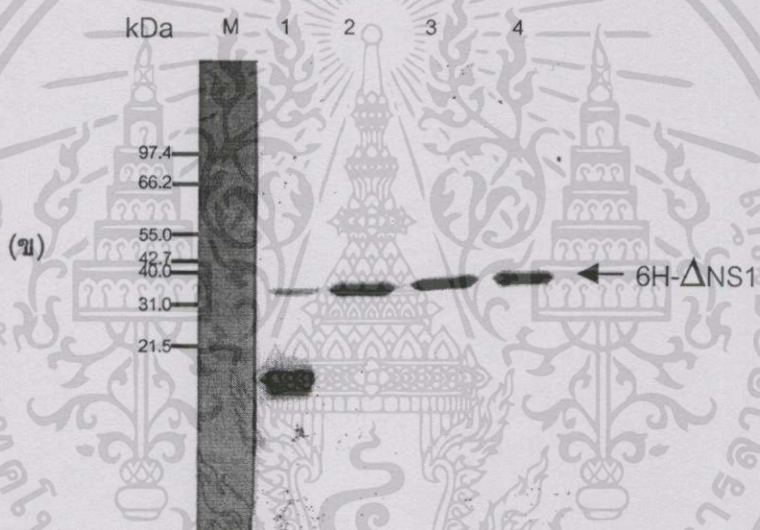
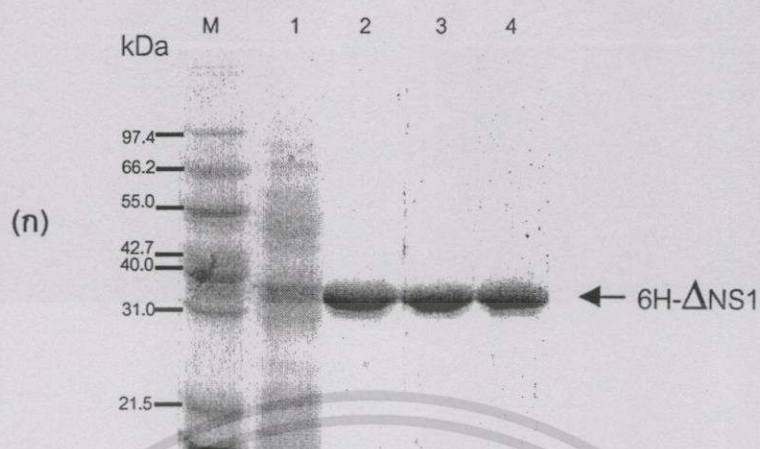
จุดที่ 14 คือ โปรตีนที่ไม่ได้จับกับคอลัมน์ (unbound protein)

แถวที่ 3 จุดที่ 1-14 คือ โปรตีนจากคอลัมน์ที่ผ่านการชะด้วย 8M urea elution buffer pH 4.5 หลอดที่ 1, 3, 5, 7-17 ตามลำดับ

แถวที่ 4 จุดที่ 1-14 คือ โปรตีนจากคอลัมน์ที่ผ่านการชะด้วย 8M urea elution buffer pH 4.5 หลอดที่ 18-31 ตามลำดับ

แถวที่ 5 จุดที่ 1-14 คือ โปรตีนจากคอลัมน์ที่ผ่านการชะด้วย 8M urea elution buffer pH 4.5 หลอดที่ 32-40, 42, 44, 46, 48, 50 ตามลำดับ





รูปที่ 5.10 แสดงการแยกโปรตีน 6H- Δ NS1 จาก *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี IMAC

(ก) ด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสีโคแมสซึบลู

(ข) Western blot analysis โดยทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1

แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน

แถวที่ 1 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ก่อนการทำให้บริสุทธิ์

แถวที่ 2-4 คือ โปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ IMAC ด้วย 8M urea elution buffer พีเอช 4.5 หลอดที่ 5, 6, 7 ตามลำดับ (จากคอลัมน์ที่มีเรซิน ขนาด 1 มิลลิลิตร)

5.6 การกำจัดยูเรียออกจากสารละลายโปรตีน 6H- Δ NS1 บริสุทธิ์

หลังจากได้รีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 บริสุทธิ์แล้ว ได้ทำการรวมโปรตีนจากหลอดต่างๆที่มี reactivity เข้าด้วยกันแล้วนำมาวัดความเข้มข้นของโปรตีน โดยใช้ชุดวัดโปรตีนสำเร็จรูป (Protein Assay Dye Reagent Concentrate : บริษัท BioRad, USA.) (ดังวิธีการทดลองที่ 4.8) จะได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 2.67 มิลลิกรัมต่อการเลี้ยงเชื้อ *E.coli* 1 ลิตร ซึ่งโปรตีนบริสุทธิ์ที่รวมกันนี้จะนำไปใช้ศึกษาการคืนสภาพโครงสร้างธรรมชาติของโปรตีน (refolding) ตามวิธีดังนี้

5.6.1 การไดอะไลซ์โดยการลดปริมาณยูเรียลงเป็นลำดับ (Stepwise removal of urea)

นำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ทราบความเข้มข้นแล้วมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.7, 0.5, 0.3 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่ถุงไดอะไลซิสแล้วนำไปไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ที่ค่อยๆลดปริมาณยูเรียลงตามลำดับ (stepwise) จนกระทั่งไม่มียูเรียเหลืออยู่เลยแต่เติมสารละลาย Triton X-100 ให้มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์สุดท้ายของการไดอะไลซ์ (ดังวิธีการทดลองที่ 4.7.1) จากผลการทดลองพบว่าโปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ทุกปริมาณความเข้มข้นตกตะกอนทั้งหมดในสถานะที่ไม่มียูเรีย แต่สามารถละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของยูเรียต่ำที่สุดคือ 2.5 โมลาร์ หลังการไดอะไลซ์แล้ววัดปริมาณโปรตีนได้ 0.5, 0.4, 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 5.1) จากเปอร์เซ็นต์การ recovery ที่ได้ แสดงว่าเราสามารถเก็บโปรตีนหลังจากการ refolding โดยวิธีไดอะไลซิสได้ดีที่สุดเมื่อเก็บโปรตีนที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นก่อนไดอะไลซิสค่อนข้างต่ำ (ได้ 99% recovery จากความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ 78% จากความเข้มข้นเริ่มต้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จึงเก็บโปรตีน 6H- Δ NS1 ดังกล่าวซึ่งอยู่ในสารละลายยูเรีย 2.5 โมลาร์ร่วมกับกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ที่ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 5.1 แสดงผลของการ refolding โปรตีน 6H- Δ NS1 โดยวิธีไดอะไลซิสด้วยการลดปริมาณยูเรียลงเป็นลำดับ

ชุดที่	ความเข้มข้นของโปรตีนตั้งต้น (mg/ml)	ปริมาตรโปรตีนที่นำมาไดอะไลซ์ (ml)	ปริมาณโปรตีนรวมเริ่มต้น (mg)	ความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากการ refolding (mg/ml)	ปริมาตรของโปรตีนที่ได้จากการ refolding (ml)	ปริมาณโปรตีนรวมหลังการ refolding (mg)	% recovery
1	0.7	1	0.7	0.55	1	0.55	78.6
2	0.5	1	0.5	0.42	1	0.42	84.0
3	0.3	1	0.3	0.27	1	0.27	90.0
4	0.1	1	0.1	0.09	1	0.09	90.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.6.2 การไดอะไลซ์ในไกลซีนบัฟเฟอร์

จากการที่โปรตีน 6H- Δ NS1 ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะที่ไม่มียูเรีย จึงได้ใช้วิธีดัดแปลงของ Takacs (1991) ในการกำจัดสารละลายยูเรีย โดยทำการเจือจางสารละลายโปรตีนให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.3-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วนำไปไดอะไลซ์ในไกลซีนบัฟเฟอร์ (ดังวิธีการในข้อ 4.6.2) จากการทดลองพบว่าที่ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนจะตกตะกอนหลังไดอะไลซ์ไปประมาณ 40 นาทีเท่านั้น แต่เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถรักษาสถานภาพของการละลายน้ำของโปรตีนไว้ได้จนเสร็จสิ้นขั้นตอนของการไดอะไลซ์ หลังการไดอะไลซ์แล้ววัดปริมาณโปรตีนได้ 0.147 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5.2) จึงเก็บโปรตีน 6H- Δ NS1 ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์เพื่อป้องกันการตกตะกอนของโปรตีน ที่ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 5.2 แสดงผลของการ refolding โปรตีน 6H- Δ NS1 โดยวิธีไดอะไลซิสในไกลซีนบัฟเฟอร์

ชุดที่	ความเข้มข้นของโปรตีนตั้งต้น (mg/ml)	ปริมาตรโปรตีนที่นำมาไดอะไลซ์ (ml)	ปริมาณโปรตีนรวมเริ่มต้น (mg)	ความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากการ refolding (mg/ml)	ปริมาตรของโปรตีนที่ได้จากการ refolding (ml)	ปริมาณโปรตีนรวมหลังการ refolding (mg)	% recovery
1	0.32	7.0	2.24	0	0	0	0
2	0.18	8.5	1.54	0.147	8.66	1.27	83.2

5.6.3 วิธีการเจือจางโปรตีนใน refolding buffer (Dilution method)

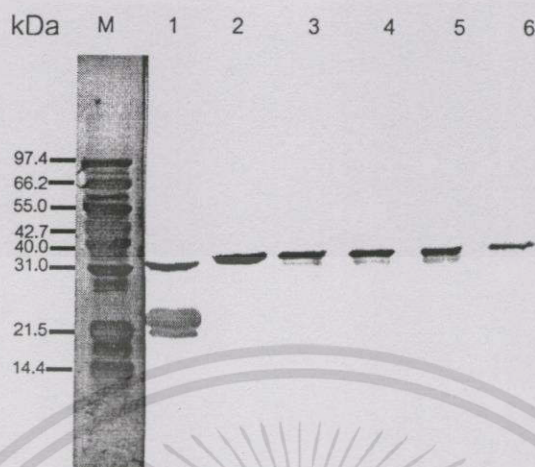
นำสารละลายโปรตีน 6H- Δ NS1 ซึ่งละลายอยู่ใน 8M urea elution buffer pH 4.5 ซึ่งเป็นโปรตีนบริสุทธิ์ที่ทราบความเข้มข้นแล้วมาค่อยๆ หยดอย่างช้าๆ ลงใน L-arginine refolding buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วกวนเบาๆ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ ultrafiltration (Amicon) (ดังวิธีการทดลองที่ 4.6.3) จากการทดลองพบว่าโปรตีน 6H- Δ NS1 มีการตกตะกอนค่อนข้างมากใน refolding buffer แต่อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านการ refolding แล้วสามารถเก็บโปรตีนที่ละลายได้ดีในบัฟเฟอร์ PBS ถึงแม้ว่าความเข้มข้นจะไม่สูงมากนัก นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณโปรตีนเริ่มต้นค่อนข้างต่ำจะทำให้การ refolding เกิดขึ้นได้ดีกว่าปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่สูง (ตารางที่ 5.3)

ตารางที่ 5.3 แสดงผลของการ refolding โปรตีน 6H- Δ NS1 โดยวิธีการเจือจางโปรตีนใน refolding buffer

ชุดที่	ความเข้มข้น ของโปรตีน ตั้งต้น (mg/ml)	ปริมาตร โปรตีนที่นำ มาเจือจาง (ml)	ปริมาณ โปรตีนรวม เริ่มต้น (mg)	ความเข้มข้น ของโปรตีนที่ ได้จากการ refolding (mg/ml)	ปริมาตรของ โปรตีนที่ได้ จากการ refolding (ml)	ปริมาณ โปรตีนรวม หลังการ refolding (mg)	% recovery
1	0.42	17	7.18	0.23	6	1.37	19.14
2	0.08	28	2.32	0.22	6	1.35	58.09

5.6.4 การตรวจคุณสมบัติของโปรตีนหลังการ refolding

โปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผ่านการ refolding ตามวิธีการต่างๆถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง และได้มีการนำมาตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนว่ายังคงมี reactivity อยู่หรือไม่ โดยการนำมาทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีน NS1 (1B2) โดยวิธี Western blot analysis (ดังรูปที่ 5.11) ผลการทดลองพบว่าโปรตีนทั้งหมดในปริมาณที่เท่ากันหลังการ refolding ยังคงทำปฏิกิริยาได้ดีกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 แต่โปรตีนที่ได้จากการไดอะไลซ์ในไกลซีนบัฟเฟอร์ (รูปที่ 5.11 แถวที่ 6) จะมี reactivity ต่ำกว่าแบบอื่นๆ



รูปที่ 5.11 แสดงการแยกโปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 ปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยวิธี Western blot analysis โดยทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน NS1 (1B2)

- แถวที่ M คือ โปรตีนมาตรฐานที่มีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน
- แถวที่ 1 คือ โปรตีนทั้งหมดของ *E.coli* (pTrcHis/ Δ NS1) ก่อนทำให้บริสุทธิ์
- แถวที่ 2 คือ โปรตีน 6H- Δ NS1 บริสุทธิ์ใน 8M urea elution buffer พีเอช 4.5
- แถวที่ 3 คือ โปรตีน 6H- Δ NS1 ใน 2.5 M urea ที่ผ่านการ refolding โดยวิธีไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ที่มียูเรียลดลงเป็นลำดับ (จากข้อ 5.6.1)
- แถวที่ 4 คือ โปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผ่านการ refolding โดยวิธีเจือจางโปรตีนใน refolding buffer (จากข้อ 5.6.3)
- แถวที่ 5 คือ โปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผ่านการ refolding โดยวิธีเจือจางโปรตีนใน refolding buffer และเปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็น PBS (จากข้อ 5.6.3)
- แถวที่ 6 คือ โปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผ่านการ refolding โดยวิธีไดอะไลซิสในไกลซีนบัฟเฟอร์ (จากข้อ 5.6.2)

บทที่ 6

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการผลิตโปรตีน NS1 ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 ในรูปของรีคอมบิแนนต์โปรตีนจาก *E. coli* เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก คณะผู้วิจัยของหน่วยอนุชีววิทยาการแพทย์ รพ. ศิริราช ได้เคยทำการโคลนยีน NS1 จากไวรัสเด็งกี (Den2 strain NGC) เข้าในเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pTrcHis และสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างรีคอมบิแนนต์โปรตีน NS1 ได้ใน *E. coli* ในรูปของ inclusion body หรือโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ แต่หลังจากที่ได้มีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ภายใต้สภาวะที่โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ (denaturing condition) แล้ว พบว่าไม่สามารถทำการ refold โปรตีนเพื่อให้ออกมาอยู่ในสภาพธรรมชาติที่ละลายน้ำได้ ซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการนำไปใช้ในชุดตรวจวินิจฉัย ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ออกแบบให้มีการผลิตโปรตีน NS1 ในขนาดที่เล็กลง โดยหวังว่าอาจทำให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงการทำ denature และ renature ของโปรตีนระหว่างกระบวนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

ในการเตรียมชิ้นยีน NS1 ให้มีขนาดเล็กลง โดยการย่อยเวกเตอร์ pTrcHis/NS1 ด้วยเอนไซม์ HindIII เพื่อกำจัดปลายคาร์บอกซี (C-terminal) ของยีน NS1 (aa 272-352) ทำให้ได้พลาสมิดเวกเตอร์ pTrcHis/ Δ NS1 ซึ่งประกอบด้วยยีน NS1 ที่สามารถแปลและถอดรหัสได้เป็นโปรตีน NS1 ขนาดเล็กลง (Δ NS1) จากเดิม 352 aa เหลือเพียง 271 aa โดย โปรตีน Δ NS1 นี้ยังคงมีส่วนของ aa 57-126 ซึ่งเป็น antigenic domain อยู่ (Mason 1990) เมื่อมีการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีนด้วย IPTG จะได้รีคอมบิแนนต์โปรตีนลูกผสมที่มีเปปไทด์พานะที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัวติดอยู่ที่ปลายอะมิโน (N-terminal) ของโปรตีน Δ NS1 (เรียกว่า 6H- Δ NS1) จากการคำนวณขนาดของโปรตีน 6H- Δ NS1 (จากลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Macvector) โปรตีนที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน แต่ผลการทดลองพบว่านอกจากรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 ขนาด 35 กิโลดาลตันแล้ว ยังมีโปรตีนขนาดเล็กอีก 3 ขนาด คือ 28, 23 และ 21 กิโลดาลตัน ที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีน NS1 (1B2) โดยการวิเคราะห์ Western blot ได้อีกด้วย ซึ่งโปรตีนเหล่านี้น่าจะเป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปที่ถูกย่อย (degraded form) ของโปรตีน 6H- Δ NS1 ที่เกิดจากเอนไซม์โปรติเอสบางชนิดใน *E. coli* สังเกตว่าโปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตัน จะมีปริมาณมากกว่าโปรตีนขนาดอื่น แสดงว่าโปรตีนส่วนใหญ่อาจถูกตัดให้มีขนาดเล็กลงมาในระหว่างการผลิตในเซลล์ *E. coli* โดยที่โปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตันนี้มีความเสถียรมากกว่าโปรตีนขนาดอื่น แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการ

ผลิตโปรตีนใน *E.coli* สายพันธุ์อื่นที่เป็น protease deficiency ก็ยังไม่ช่วยให้ได้โปรตีนขนาด 35 กิโลดาลตันมากขึ้น แต่กลับไปลดปริมาณโปรตีนโดยรวมที่ถูกผลิตออกมาอีกด้วย แสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสอาจไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการย่อยของโปรตีน แต่อาจมีปัจจัยอื่นที่ไม่ทราบซึ่งมีผลเสริมการย่อยของโปรตีนร่วมอยู่ด้วย การเลี้ยงเซลล์ *E.coli* ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส อาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์ที่มีผลต่อการย่อยโปรตีน ซึ่งอาจช่วยทำให้ *E.coli* ผลิตโปรตีนที่มีความเสถียรได้ดีขึ้น

ในการศึกษาพบว่าโปรตีน 6H- Δ NS1 ยังคงถูกผลิตออกมาใน *E.coli* ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำเช่นเดียวกับ 6H-NS1 แสดงว่าสมมุติฐานที่คาดว่าโปรตีนอาจละลายได้ดีขึ้นเมื่อมีขนาดเล็กไม่เป็นจริง ซึ่งต่างจากโปรตีน E ของไวรัสเด็งกีที่พบว่าแสดงออกในรูปของ inclusion เมื่อผลิตใน *E.coli* แต่เมื่อโคลนยีนเฉพาะส่วนโดเมนบีของโปรตีน E ที่มีขนาดเล็กจะสามารถผลิตโปรตีน E (โดเมนบี) ออกมาในรูปที่ละลายน้ำได้ดีขึ้น (Pongtintong-ngarm 1997) จากรายงานทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ใน *E.coli* ขนาดของโปรตีนไม่ได้เป็นตัวกำหนดว่าโปรตีนจะถูกผลิตออกมาในรูปใด เช่น โปรตีน Urokinase ที่มีขนาด 54 kDa (Winkler *et al.* 1985) จะอยู่ในรูปของ inclusion body เช่นเดียวกับ โปรตีน Growth hormone (bovine) ขนาด 22 kDa (George *et al.* 1985) ในขณะที่โปรตีน Myoglobin ขนาด 17 kDa (Varadarajan *et al.* 1985) ก็อาจแสดงออกในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำได้เช่นเดียวกับ โปรตีน Triosephosphate isomerase ขนาด 53 kDa (Straus and Gilbert 1985) จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีหลักการที่แน่ชัดในการอธิบายว่า กลไกใดมีส่วนในการกำหนดการเกิด inclusion body ของโปรตีนรีคอมบิแนนต์จาก *E.coli* แต่มักพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่แสดงออกใน *E.coli* จะเป็น inclusion form (Marston 1986) ในปัจจุบันได้มีความพยายามในการสร้างเวกเตอร์เพื่อการแสดงออกให้มี fusion tag ที่จะช่วยให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำได้มากขึ้น โดยการแสดงออกในรูปของโปรตีนลูกผสม ซึ่งบาง fusion tag จะมีคุณสมบัติช่วยให้โปรตีนแสดงออกมาในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำ เช่น Maltose binding protein (MBP) (Guan *et al.* 1988), Thioredoxin (LaVallie *et al.* 1993) แต่อย่างไรก็ตามเวกเตอร์เหล่านี้ก็ไม่ได้ให้ผลเช่นเดียวกันในทุกโปรตีน ซึ่งแสดงว่าอาจขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะตัวของโปรตีนนั้นๆ เอง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เวกเตอร์ pTrcHis ในการผลิตโปรตีนลูกผสม 6H- Δ NS1 จากคุณสมบัติของ 6 Histidine tag ที่มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับ fusion peptide อื่นๆ เช่น MBP (42 kDa จากเวกเตอร์ pMal-C2) หรือ GST (27 kDa จากเวกเตอร์ pGEX-3X) จึงทำให้มีผลน้อยมากในการบัง epitope หรือ domain ที่สำคัญของโปรตีนที่ต้องการศึกษา และไม่จำเป็นต้องตัด 6-His tag ออกจาก 6H- Δ NS1 ก็ได้เปรียบเทียบกับ MBP fusion peptide ขนาดประมาณ 42 kDa ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าโปรตีนที่ต้องการศึกษา จึงอาจมีผลไปบัง activity domain ของโปรตีนนั้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MBP สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมของคนปกติได้ (Pongtintong-ngarm 1997) ดังนั้นถ้านำมาใช้เป็น fusion tag ของโปรตีน NS1 ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการผลิตเพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยจะทำให้ระบบการแปลผลได้ ในกรณีนี้จำเป็นต้องตัดส่วนของ MBP ออกจากโปรตีนที่ต้องการ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มขึ้นตอนและต้นทุนของการผลิต ถึงแม้ว่าโปรตีนรีคอมบิแนนต์ 6H- Δ NS1 จะอยู่ในรูปของ inclusion body แต่ก็ยังมีข้อดีคือ สามารถแยกออกจากโปรตีนส่วนใหญ่ของ *E.coli* ที่เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ง่ายโดยเฉพาะเมื่อมีการแสดงออกของโปรตีนค่อนข้างต่ำ และทำให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงแม้ว่าจะทำการแยกให้บริสุทธิ์เพียงขั้นตอนเดียว

ในกระบวนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี IMAC ต้องทำการละลายโปรตีนจาก inclusion ก่อน สารที่ช่วยในการละลายมีหลายประเภท เช่น สารดีเนเจอร์ที่มีความเข้มข้นสูง (strong denaturants) ได้แก่ urea, guanidine หรือ สารดีเทอร์เจนบางชนิด (detergents) เช่น SDS (Stockel *et al.* 1997), sarkosyl (Burgess 1996) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ 6M Guanidine-HCl เป็นตัวทำละลาย ซึ่งจะทำให้โปรตีนสูญเสียโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (secondary structure) และระดับตติยภูมิ (tertiary structure) (Ausubel *et al.* 1991) โปรตีนที่ได้จะอยู่ในรูปที่เสียสภาพธรรมชาติไป สารละลาย 6M Guanidine-HCl มีความแรงในการทำละลายได้ดีกว่ายูเรีย จึงเลือกใช้เป็นตัวเริ่มต้นในการละลาย inclusion สำหรับ 8M urea จะใช้สำหรับคงสภาพ denaturation ของโปรตีนระหว่างที่ทำการแยกให้บริสุทธิ์ผ่าน affinity resin เนื่องจากยูเรียไม่รบกวนขั้นตอนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนผ่าน SDS-PAGE (ในขณะที่ Guanidine-HCl จะต้องถูกไดอะไลซ์ออกก่อนที่จะมาแยกโปรตีนบน SDS-PAGE)

ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดของการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะ denaturing condition คือการ refolding เพื่อให้โปรตีนกลับมาอยู่ในสภาพธรรมชาติให้เหมือนเดิมมากที่สุด โดยที่ยังคง reactivity ไว้เช่นเดียวกับโปรตีนในธรรมชาติ การ refolding ที่ไม่สมบูรณ์อาจทำให้โปรตีนไม่เสถียร และแยกตัวตกตะกอน (aggregate) ออกมาระหว่างการ refolding หรือหลังจากการเก็บไว้ในระยะเวลาหนึ่ง วิธีการ refolding สามารถทำได้หลายวิธี โดยมีจุดประสงค์เพื่อเอายูเรียออกและปล่อยให้โปรตีนละลายอยู่ได้ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มีตัวทำละลายเหล่านี้ วิธีการ refolding ที่มีรายงาน เช่น 1) การไดอะไลซ์โปรตีนในบัฟเฟอร์ที่มีการลดปริมาณยูเรียลงเรื่อยๆ จนไม่มียูเรียเหลืออยู่ วิธีนี้จะช่วยในการดึงยูเรียออกจากโปรตีนที่ละลาย และปล่อยให้โปรตีนค่อยๆ เกิดการ refolding ตัวอย่าง เช่น โปรตีน E ของไวรัสเด็กกีโรทาบิ 3 (สุภา 2542) หรือ 2) การไดอะไลซ์โปรตีนในไกลซินบัฟเฟอร์ โดยการปรับพีเอชเริ่มต้นของโปรตีน (denatured) ให้เป็นต่างกันในสภาวะที่มีสาร thiol reagent ได้แก่ dithiothreitol (DTT) เพื่อละลายตะกอนและกำจัดพันธะไดซัลไฟด์ที่มีอาจมีอยู่ในโปรตีน ก่อนที่จะนำไปไดอะไลซ์ในไกลซินบัฟเฟอร์ พีเอช 10.5 ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดตะกอนของโปรตีนได้ (Hansson, 1968, 1970) ตัวอย่างของโปรตีนที่สามารถ refolding ได้ด้วยวิธีนี้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แก่ รีคอมบิแนนต์โปรตีน circumsporozoite (CSP) จากเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่ผลิตใน *E.coli* เพื่อนำไปใช้เป็นวัคซีนสำหรับด้านโรคมาลาเรีย (Takacs and Girard 1991) หรือ 3) การ เจือจางโปรตีนลงในบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณมาก โดยมีจุดประสงค์เพื่อให้โปรตีนเกิดการ refolding ได้อย่างอิสระโดยไม่เกิดการจับกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนที่อาจเป็นตัวชักนำให้เกิดการตกตะกอนได้ บัฟเฟอร์ที่ใช้ประกอบด้วย L-arginine ซึ่งมีรายงานว่า เป็นสารที่ช่วยให้มีการคืนสภาพธรรมชาติของโปรตีนหลายชนิดได้ดีขึ้น เช่น Plasminogen activator (Fischer *et al.* 2000), F_{ab}-fragment (Buchner and Rudolph 1991), casein kinase II (Lin and Traugh 1993) และ fish growth hormone (Hsieh *et al.* 1997) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของสาร reduced และ oxidized glutathione ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนให้อยู่ในสภาวะที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติได้มากที่สุด (Ahmed *et al.* 1975 ; Wetlaufer *et al.* 1987) แต่อย่างไรก็ตาม สัดส่วนระหว่างสารทั้งสองที่เติมลงในบัฟเฟอร์อาจมีความเหมาะสมแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน โดยทั่วไปจะใช้สัดส่วนระหว่าง reduced form : oxidized form = 1:1 ถึง 5:1 หลังจาก refolding แล้วโปรตีนจะถูกนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ ultrafiltration

จากผลการศึกษาการ refolding ของโปรตีน 6H-ΔNS1 พบว่าวิธีการไดอะไลซิสในไกลซีนบัฟเฟอร์ จะได้ผลดีที่สุด ในแง่ของการกำจัดสารดีแนเจอร์แรนท์ทั้งหมดออกจากสารละลายโปรตีนสังเกตว่าโปรตีนเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นต่ำจะสามารถ refolding ได้ดีกว่า (ตารางที่ 5.2 บทที่ 5) เปอร์เซ็นต์การ recovery ของโปรตีนที่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นสูงเกิดจากการตกตะกอนระหว่างการไดอะไลซิส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่พบว่าโปรตีนความเข้มข้นในช่วง 0.01-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะถูก refolded ได้ดีกว่าโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง (Lilie *et al.* 1998) นอกจากนี้การเติมสาร DTT ลงในสารละลายโปรตีนอาจมีส่วนช่วยในการแตกพันธะไดซัลไฟด์ทั้งหมดที่อาจมีอยู่ทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลของโปรตีน 6H-ΔNS1 (เนื่องจากโปรตีน 6H-ΔNS1 ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cys) ถึง 6 ตำแหน่ง) เพื่อให้โปรตีนอยู่ในสภาวะ denature อย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการ refolding ของโปรตีนในขั้นตอนต่อไปได้ดีขึ้น เมื่อเทียบกับการ refolding โดยวิธีการเจือจางโปรตีนในบัฟเฟอร์จำนวนมากๆ พบว่าโปรตีนตกตะกอนเกือบทั้งหมดในระหว่างการ refolding เมื่อโปรตีนมีความเข้มข้นเริ่มต้นค่อนข้างสูง อาจเป็นเพราะโปรตีนก่อนการ refolding ยังไม่ถูกทำให้เสียสภาพโดยสมบูรณ์ (ไม่ได้มีการเติม DTT) ดังนั้นโอกาสที่โปรตีนจะมีการพับงอตัวให้คล้ายธรรมชาติมากที่สุดในระหว่างการ refolding จึงมีน้อยกว่า และอาจเกิดการจับกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ทำให้โปรตีนมีการพับงอตัวผิดธรรมชาติไปถึงแม้ว่าในบัฟเฟอร์จะมีส่วนประกอบของ L-arginine และ reduced/oxidized glutathione ก็ตาม แต่พบว่าเมื่อลดความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นลงให้ต่ำมากๆ (น้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จะทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การ recovery สูงขึ้นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม การตกตะกอนของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างการ refolding อาจเกิดจากสัดส่วนระหว่าง glutathione ในรูปของ reduced และ oxidized ไม่เหมาะสม ซึ่งควรจะหาสัดส่วนที่พอเหมาะเพื่อให้สามารถ refolding ได้ดีขึ้น

สำหรับการ refolding โดยวิธีไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ที่มียูเรียน้อยไปจนถึงไม่มียูเรียเลย พบว่าโปรตีน 6H- Δ NS1 จะตกตะกอนทั้งหมดไม่ว่าความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นจะมากหรือน้อยก็ตาม เทียบกับการ refolding ของโปรตีน 6H-D2E ที่พบว่าโปรตีนที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำได้ดีโดยไม่มีการตกตะกอน แต่จะเกิดการตกตะกอนหลังจากการเก็บไว้ที่ -20°C องศาเซลเซียส ในระยะเวลาหนึ่ง (แม้ว่าจะมีการเติมกลีเซอรอล หรือ Triton X-100 เพื่อช่วยในการละลายก็ตาม) ในขณะที่โปรตีนที่ความเข้มข้นต่ำ จะไม่พบปัญหาของการตกตะกอนเกิดขึ้น สาเหตุหนึ่งของการตกตะกอนระหว่างการไดอะไลซิสโปรตีน 6H- Δ NS1 ไม่ว่าจะเป็นที่ความเข้มข้นสูงหรือต่ำก็ตาม อาจมาจากพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน ที่ไม่ได้ถูกกำจัดออกไปอย่างสมบูรณ์ (ไม่ได้เติม DTT) แต่พบว่าโปรตีนจะสามารถรักษาสภาพการละลายไว้ได้ดีที่สุดเมื่อมียูเรียอย่างน้อย 2.5 โมลาร์อยู่ในบัฟเฟอร์ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบว่าสารดีแนเจอร์แรนท์ที่ความเข้มข้นต่ำ หรือสารดีเทอร์เจน และ สารเคลือบผิว (surfactants) บางชนิด สามารถป้องกันการเกิด hydrophobic interaction ระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งมีส่วนช่วยในการยับยั้งการตกตะกอนโปรตีนได้ (Clark 1998) มีรายงานการศึกษาพบว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีนบางชนิดสามารถถูกเก็บไว้ได้ในยูเรียปริมาณต่ำ เช่น lysozyme (Maeda *et al.* 1996), Porcine growth hormone (Carrdamone *et al.* 1995), Hen egg white lysozyme (Maeda 1996), Interferon- β -polypeptide (Dorin *et al.* 1996) และ IGF-I (Buiders 1995) แต่อย่างไรก็ตามการเก็บโปรตีนในสภาวะที่มียูเรีย อาจเป็นข้อจำกัดในการนำโปรตีนไปพัฒนาในรูปแบบอื่นเพื่อการวินิจฉัยโรค (เช่น การติดฉลากโปรตีนด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ) นอกเหนือจากการนำไปใช้เป็นแอนติเจนโดยตรง ซึ่งโปรตีนในรูปแบบนี้อาจไม่เหมาะต่อการนำไปพัฒนาต่อในระดับสูงขึ้นไป

โปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะมีขนาด 35 กิโลดาลตันเท่านั้น แสดงว่าโปรตีนขนาดเล็กอื่นๆ ได้แก่ 28, 23 และ 21 กิโลดาลตัน ไม่มีส่วนของ 6-His tag ติดอยู่ที่ปลายของโปรตีนนั้น จึงทำให้โปรตีนไม่จับกับ metal resin และหลุดออกไประหว่างกระบวนการแยกให้บริสุทธิ์ ในกรณีที่ต้องการโปรตีนขนาด 23 kDa ซึ่งมีปริมาณมากที่สุด และ reactive อาจเปลี่ยนวิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์เป็นวิธีอื่นแทน เช่น Gel filtration หรือ Ion-exchange chromatography เป็นต้น โปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 (ขนาด 35 kDa) นี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1B2 ทั้งโดยวิธีวิเคราะห์ Western blot และ DEIA แต่จะทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออกได้น้อยกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนรีคอมบิแนนต์มีโครงสร้างบางส่วนที่แตกต่างไปจากโปรตีน NS1 ของไวรัสเด็งกีและมีขนาดเล็กกว่าโปรตีน NS1 ด้วย ทำให้การเกิดปฏิกิริยากับซีรัมได้ไม่ดีนัก หรืออาจเนื่องจากในซีรัมผู้ป่วยนั้นมีปริมาณของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอนติบอดีต่อโปรตีน E ของไวรัสเด็งกีเป็นส่วนใหญ่ และมีแอนติบอดีต่อโปรตีน NS1 เพียงส่วนน้อยเท่านั้น ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มความจำเพาะของการตรวจสอบอาจทำได้โดยเพิ่มปริมาณของโปรตีนที่ใช้ในการทดสอบให้มากขึ้น แต่ต้องอยู่ในระดับที่จะไม่ทำให้เกิด background ในซีรัมของคนปกติ มีรายงานว่า anti-NS1 ชนิด IgM ในซีรัม สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี และ ไวรัส JE ที่เป็นไวรัสในกลุ่มเดียวกัน และมีอาการของโรคเบื้องต้นเหมือนกันได้ (Shu *et al.* 2000) ดังนั้นการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน NS1 เพื่อเป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีต่อ NS1 ในซีรัมผู้ป่วย จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคใช้เลือดออกในอนาคตได้



บทที่ 7

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ของโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้างอันดับ 1 (NS1) ของไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ New Guinea C (NGC) เฉพาะส่วนปลายอะมิโน 814 bp (จากทั้งหมด 1056 bp) ในระบบของ *E.coli* เพื่อให้โปรตีน NS1 มีขนาดเล็กลง โดยการตัดปลายคาร์บอกซีของยีน NS1 จากพลาสมิด pTrcHis/NS1 ด้วยเอนไซม์ *HindIII* ทำการเชื่อมต่อพลาสมิด และทรานสฟอร์มเข้าใน *E. coli* โคลน *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/ Δ NS1 ได้ถูกคัดเลือกโดยการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และตรวจสอบรูปแบบของการย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *HindIII* จากนั้นจึงเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG เพื่อตรวจสอบการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ 6H- Δ NS1 จากผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 (ประกอบด้วยกรดอะมิโน 38+271 ตัว)¹ ยังคงถูกผลิตออกมาอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เช่นเดียวกับรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-NS1 (ประกอบด้วยกรดอะมิโน 38+352 ตัว)² การแสดงออกของโคลน *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pTrcHis/ Δ NS1 ได้โปรตีนหลายขนาดคือ 35, 28, 23 และ 21 กิโลดาลตัน ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ NS1 (1B2) โปรตีน 6H- Δ NS1 ควรจะมีขนาด 35 กิโลดาลตัน (ได้จากการคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนโดยใช้ลำดับกรดอะมิโน) ในขณะที่โปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดคือขนาด 23 กิโลดาลตัน จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน 6H- Δ NS1 ใน *E. coli* พบว่าประกอบด้วยการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีนใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยสารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกโปรตีน 6H- Δ NS1 ให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) ซึ่งอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะของโคบอลต์ไอออนบนเรซิน (TALONTM) กับ 6-His ที่ปลายอะมิโนของโปรตีน 6H- Δ NS1 เนื่องจากโปรตีนอยู่ในสภาวะที่ไม่ละลายน้ำ จึงต้องทำการละลายด้วยสารดีเนเจอร์ที่เข้มข้น คือ 6M Guanidine-HCl ซึ่งจะทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ก่อนที่จะทำการแยกโปรตีนด้วยโคบอลต์เรซิน (TALON) โปรตีน 6H- Δ NS1 ถูกชะออกจากเรซินโดย 8M urea elution buffer pH 4.5 โดยโปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 จะมีขนาด 35 กิโลดาลตันเพียงขนาดเดียวเท่านั้น

¹ ขนาดของรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 ประกอบด้วย 6 His tag จำนวน 38 aa และ โปรตีน Δ NS1 จำนวน 271 aa

² ขนาดของรีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H-NS1 ประกอบด้วย 6 His tag จำนวน 38 aa และ โปรตีน NS1 จำนวน 352 aa

ในการศึกษาการคืนสภาพธรรมชาติ (renaturation or refolding) ของโปรตีนบริสุทธิ์ 6H- Δ NS1 เพื่อให้โปรตีนสามารถละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มีสารดีแนเจอร์แรนท์ (guanidine หรือ urea) ประกอบด้วย 3 วิธีคือ

1. การไดอะไลซ์โดยการลดปริมาณยูเรียลงเป็นลำดับ โดยวิธีนี้พบว่าโปรตีนจะสามารถรักษาสภาพการละลายไว้ได้ดีที่สุดเมื่อมียูเรียอย่างน้อย 2.5 M อยู่ในบัฟเฟอร์
2. การไดอะไลซ์ในไกลซีนบัฟเฟอร์ โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของโปรตีนให้ต่ำกว่า 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและปรับพีเอชของสารละลายโปรตีนให้สูงร่วมกับการเติมสารละลาย DTT ก่อนการไดอะไลซ์ พบว่าวิธีนี้จะให้ผลดีที่สุดในแง่ของการกำจัดสารดีแนเจอร์แรนท์ทั้งหมดออกจากสารละลายโปรตีน และโปรตีนสามารถละลายได้ดีใน 0.9% NaCl
3. การเจือจางโปรตีนลงในบัฟเฟอร์จำนวนมากๆ โดยที่มี L-arginine และ oxidized/reduced glutathione ในบัฟเฟอร์ โดยวิธีนี้พบว่าโปรตีนตกตะกอนลงมากเกือบทั้งหมดระหว่างการทำ refolding แต่ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นก่อนการ refolding ต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีส่วนช่วยให้ความสามารถในการ refold ดีขึ้น

โปรตีนที่ผ่านการ refolding โดยวิธีต่างๆ และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาหนึ่ง ยังคงมี reactivity ต่อแอนติบอดีจำเพาะเทียบเท่ากับ ในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน

จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนรีคอมบิแนนต์ 6H- Δ NS1 พบว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน NS1 ได้ดีกว่าซีรัมรวมของผู้ป่วยไข้เลือดออก (PCS) ในขณะที่ไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติ (PND) ทั้งโดยวิธี Western blot analysis และ Dot Enzyme Immunoassay (DEIA) สรุปได้ว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีน 6H- Δ NS1 ที่ผลิตได้จาก *E.coli* นี้มีแนวโน้มที่จะใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยไข้เลือดออกที่สามารถพัฒนาต่อไปได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

- กระทรวงสาธารณสุข. 2542. แนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรคไข้เลือดออกเด็งกี. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ.
- สุภา ศรีสอาด. 2542 "การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกซีโรทัยป์ 3 ในระบบของ *E.coli* และการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Immobilized Metal Affinity Chromatography." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Ahmed, A.K., Schaffer, S.W. and Wetlaufer, D.B. 1975. "Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers." *J Biol Chem.* 250 : 8477-8482.
- Ausubel, F.M., Brent, R. and Kingston, R.E. 1991. *Current protocol in molecular biology.* New York : Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Bartholomeusz, A.I. and Wright, P.J. 1993. "Synthesis of dengue virus RNA *in vitro* : initiation and involvement of protein NS3 and NS5". *Archives of Virology.* 128 : 111-121.
- BaZan, J.F. and Fletteric, R.J. 1989. "Detection of a trypsin-like serine protease domain in *Flaviviruses* and *Pestiviruses*". *Virology.* 171 : 637-639.
- Brandt, W.E., McCown, J.M., Gentry, M.K. and Russell, P.K. 1982. "Infection enhancement of dengue type 2 virus in the U-937 human monocyte cell line by antibodies to *Flavivirus* cross-reactive determinants". *Infect Immun.* 36(3) : 1306-41.
- Brinton, M.A., Fernandez, A.V. and Amato, J. 1986. "The 3'-nucleotides of *Flavivirus* genome RNA from 9 Conserved Secondary Structure". *Virology.* 153 : 113-121.
- Brinton, M.A. and Dispoto, J.H. 1988. "Sequenced and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of *Flavivirus* genome RNA". *Virology.* 162 : 290-299.
- Buchner, J. and Rudolph, R. 1991. "Renaturation purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*". *Biotechnology.* 9(2) : 157-162.

- Burgess, R.R. 1996. "Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase α factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl." *Methods Enzymol.* 273 : 145-149.
- Builder, .S., Hart, R., Lester, P. and Reifsnnyder, D. Refolding of misfolded insulin-like growth factor-I. U.S Patent no.5 663 304,1997.
- Cahour, A., Falgout, B. and Lai, C.J. 1992. "Cleavage of the dengue virus polyprotein at the NS3/NS4A and NS4B/NS5 junctions is mediated by viral protease NS2B-NS3, whereas NS4A/NS4B may be processed by a cellular protease". *J Virol.* 66 : 1535-1542.
- Cardamone, M., Puri, N.K. and Brandon, M.R. 1995. "Comparing the refolding and reoxidation of recombinant porcine growth hormone from a urea denatured state and from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biochemistry.* 34 : 5773-5794.
- Cardosa, M.J., Phaik, T. and Sham, N. 1988. "Development of dot enzyme immunoassay for dengue3 : a sensitive method for the detection of anti-dengue antibodies". *J Virol Methods.* 22 : 81-88.
- Cardosa, M.J., Tio, P.H., Nimmannitya, S., Nisalak, A. and Innis, B. 1992. "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.* 23 (4) : 726-729.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. and Rice, C.M. 1990. "*Flavivirus* genome organization, expression, and replication". *Ann Rev of Micro.* 44 : 649-688.
- Chan, S.Y., Kautner, I.M. and Lam, S.K. 1994. "The influence of antibody levels in dengue diagnosis by Polymerase Chain Reaction". *J Virol Methods.* 49(3) : 315-322.
- Chow, V.T.K., Seah, C.L.K. and Chan, Y.C. 1993. "Use of NS3 consensus primers for the Polymerase Chain Reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other flaviviruses". *Arch.Virol.* 133 : 157-170.
- Chungue, E., Marche, G., Plichart, R., Boutin, J.P. and Roux, J. 1989. "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.* 83(5) : 708-11.
- Chungue, E., Roche, C., Lefevre, M.F., Barbazan P. and Chanteau, S. 1993. "Ultra-rapid, simple sensitive and economical silica method for extraction of dengue viral RNA from clinical specimens and mosquitoes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction". *J Med Virol.* 40(2) : 142-145.
- Churdboonchart, V., Bhamarapravati, N., Peampramprecha, S. and Sirinavin, S. 1991. "Antobodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever". *Am J Trop Med Hyg.* 44(5) : 481-493.
- Clarke, D.H. and Casals, J. 1958. "Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses". *J Virol Methods.* 14 : 133-140.
- Clark, E.D.B. 1998. "Refolding of recombinant proteins". *Curr Opin Biotechnol.* 9 : 157-163.
- Cowley, D.J. and Mackin, R.B. 1997. "Expression purification and characterization of recombinant human proinsulin". *FEBS Lett.* 402 : 124-130.
- Creighton, T.E. 1985. "Folding of proteins adsorbed reversibly to ion-exchange resins". *UCLA Symp Mol Cell Biol.* 39 : 249-258.
- Crooks, A.J., Lee, J.M., Easterbrook, L.M., Timofeev, A.V. and Stephenson, J.R. 1994. "The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell". *J Gen Virol.* 75(12) : 3453-3460.
- Deubel, V., Laille, M., Hugnot, J.P., Chungue, E., Guesdon, J.L., Drouet, M.T., Bassot, S. and Chevrier, D. 1990. "Identification of dengue sequences by genomic amplification : rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood". *J Virol Methods.* 30 : 41-54.
- Diercks, F.H. 1959. "Isolation of a type 2 dengue virus by use of hamster kidney cell culture". *Am J Trop Med Hyg.* 8 : 488-491.
- Dittmar, D., Cleary, J. and Castro, A. 1979. "Immunoglobulin G –and M-specific enzyme –linked immunosorbent assay for detection of dengue antibodies". *J Clin Microbiol.* 9 : 498-502.

- Dorin, G., McAlary, P. and Wong, K. Baterial production of hydrophobic polypeptides. World(WO) Patent. no.39523.1996.
- Falgout, B., Chanock, R. and Lai, C.J. 1989. "Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a". *J Virol.* 63(5) : 1852-1860.
- Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y.M. and Lai, C.J. 1991. "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins." *J Virol.* 65(5) : 2467-2475.
- Falgout, B., Miller, R.H. and Lai, C.J. 1993. "Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity." *J Virol.* 67(4) : 2034-2042.
- Fischer, M.B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H.P. and Aguzzi, A. 2000. "Binding of disease-associated prion protein to plasminogen." *Nature.* 408(6811) : 479-483.
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F.A. and Deubel, V. 1999. "Dengue virus type1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion." *J Virol.* 73(7) : 6104-6110.
- Feinstone, S.M., Levitan, H.L., Gibbs, J.C. and Gajdusek, D.C. 1991. "Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction." *J Med Virol.* 33 : 260-267.
- George, H.J., L'Italien, J.J., Pilacinski, W.P., Glassman, D.L. and Krzyzek, R.A. 1985. "High-level expression in *Escherichia coli* of biologically active bovine growth hormone." *DNA.* 4(4) : 273-281.
- Guan, C., Li, P., Riggs, P.D. and Inouye, H. 1988. "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein." *Gene.* 67(1) : 21-30.
- Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Koonin, E.V. and Blinov, V.M. 1989. "N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be Serine Protease." *Nuc Acids Res.* 17 : 3889-3897.

- Gubber, D. and Rosen, L. 1976. "A simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts." *Am J Trop Med Hyg.* 25 : 146-150.
- Gubler, D.J. 1988. "Dengue" p.223-260. *In* T.P. Monath (ed) *Epidemiology of Arthropod Borne Viral Disease* CRC Press.
- Gubler, D.J. and Sather, G.E. 1988. "Laboratory Diagnosis of Dengue and Dengue hemorrhagic fever", p.291-322. *In* A.Homma and J.F.Cunha (ed), *Proceeding of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue.*
- Guirakhoo, F., Bolin, R.A. and Roehring, J.T. 1992. "The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein." *Virology.* 191(2) : 921-931.
- Guzman, M.G., Kouri, G., Morier, L., Soler, M. and Fernandez, A. 1981. "A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba 1981" *Bull Pan Am Health Organ.* 18 : 213-220.
- Hahn, Y.S., Lenches, E.M., Galler, R., Rice, C.M., Dalrymple, J. and Strauss, J.H. 1990. "Expression of the structural proteins of dengue 2 virus and yellow fever virus by recombinant vaccinia viruses." *Arch Virol.* 115(3-4) : 251-265.
- Halstead, S.B. and O'Rourke, E.J. 1977. "Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody." *J Exp Med.* 146(1) : 201-17.
- Hansson, U.B. 1968. "Inhibition and reversal of aggregation of immunoglobulin G by freezing." *Acta Chem Scand.* 22(2) : 490-496.
- Hansson, U.B. 1970. "Effect of straight chain aliphatic amino acids, amines and carboxylic acids on the aggregation of IgG on freezing." *Acta Chem Scand.* 24(5) : 1585-1589.
- Heinz, F.X. and Roehring, J.T. 1990. "Flaviviruses".p.289-305. *In* M.H.V. van Regenmortel, and A.R. Neurath (ed.), *Immunochemistry of viruses.II. The basis for serodiagnosis and vaccines.*
- Heinz, F.X., Stiasny, K., Puschner, Auer, G., Holzmann, H., Allison, S.L., Mandl, C.W. and Kunz, C. 1994. "Structural changes and functional control of the tick-borne

- encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM." *Virology*. 198(1) : 109-117.
- Henchal, E.A., Narupiti, S., Feighny, R., Padmanabhan, R. and Vakharia V. 1987. "Detection of dengue virus RNA using nucleic acid hybridization." *J Virol Methods*. 15 : 187-200.
- Henchal, E.A., Henchal, L.S. and Schlesinger, J.J. 1988. "Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus." *J Gen Virol*. 69(8) : 2101-2107.
- Henchal, E.A. and Putnak, J.R. 1990. "The dengue virus." *Clin Micro rev*. 3(4) : 376-396.
- Herbert, S.J., Bowman, K.A., Rudnick, A. and Burton, J.J.S. 1980. "A rapid method for the isolation and identification of dengue viruses employing a single system." *Malaysian J Pathol*. 3 : 67-68.
- Hevehan, D. and De Bernardez, Clark, E. 1997. "Oxidative renaturation of lysozyme at high concentration." *Biotechnol Bioeng*. 54 : 221-230.
- Hirsch, A. 1983. "Dengue, a Comparatively New Disease : its Syntoms." ,p. 55-81. *In Handbook of Geographical and Historical Pathology, Vol1*. Synndenham Socieyt, London, U.K.
- Hochuli, E., Dobeli, H. and Schacher, A. 1987. "New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues." *J Chromatogr*. 411(18) : 177-184.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R. and Stuber, D. 1988. "Genetic approach to facilitated purification of novel recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent." *Bio/Technology*. 6 : 1321-1325.
- Holzinger, A., Phillips, K.S. and Weaver, T.E. 1996. "Single-step purification/solubilization of recombinant proteins : application to surfactant protein B." *Biotechniques*. 20 : 804-6,808.
- Hotta, S. and Evan, C.A. 1956. "Cultivation of mouse-adapted dengue virus (type1) in rhesus monkey tissue culture." *J Infect Dis*. 98 : 88-97.

- Hsieh, M.H., Kuo, J.C. and Tsai, H.J. 1997. "Optimization of the solubilization and renaturation of fish growth hormone produced by *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol.* 48(1) : 66-72.
- Huang, X., Feng, Y. and Huang, Z. 1997. "Complications of laparoscopic cholecystectomy in China : an analysis of 39,238 cases." *Chin Med J.* 110(9) : 704-706.
- Huth, J.R., Norton, S.E., Lockridge, O., Shikone, T., Hsueh, A.J. and Ruddon, R.W. 1994. "Bacterial expression and in vitro folding of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin (hCG beta) and functional assembly of recombinant hCG beta with hCG alpha." *Endocrinology.* 135(3) : 911-918.
- Igarashi, A. 1978. "Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya virus." *J Gen Virol.* 40 : 531-544.
- Innis, B.L., Thirawuth, V. and Hemachudha, C. 1989. "Identification of continuous epitopes of the envelope glycoprotein of dengue type 2 virus." *Am J Trop Med Hyg.* 40(6) : 676-687.
- Jacobs, M.G., Robinson, P.J., Bletchly, C., Mackenzie, J.M. and Young, P.R. 2000. "Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction." *FASEB J.* 14(11) : 1603-1610.
- Kuno, G., Gubler, D.J., Velez, M. and Oliver, A. 1985. "Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses." *Bull World Health Organ.* 63(2) : 279-286.
- Kuno, G., Vorndam, A.V., Gubler, D.J. and Gomez, I. 1990. "Study of anti-dengue NS1 antibody by Western blot." *J Med Virol.* 32(2) : 102-108.
- Lai, C.J., Pethel, M., Jan, L.R., Kawano, H., Cahour, A. and Falgout, B. 1994. "Processing of dengue type 4 and other *Flavivirus* nonstructural proteins." *Arch Virol Suppl.* 9 : 359-368.
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J. and Vorndam, A.V. 1992. "Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol.* 30(3) : 545-551.

- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J.M. 1993. "A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm." *Biotechnology*. 11(2) : 187-193.
- Lilie, H., Schwarz, E. and Rudolph, R. 1998. "Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*." *Curr Opin Biotechnol*. 9(5) : 497-501.
- Lin, W.J. and Traugh, J.A. 1993. "Renaturation of casein kinase II from recombinant subunits produced in *Escherichia coli*: purification and characterization of the reconstituted holoenzyme." *Protein Expr Purif*. 4(3) : 256-264.
- Liu, H.S., Tzeng, H.C. and Chen, C.C. 1995. "Monitoring the cDNA synthesis of dengue-2 virus by RT-PCR." *J Virol Methods*. 51(1) : 55-59.
- Maeda, Y., Yamada, H., Ueda, T. and Imono, T. 1996. "Effect of addition on the renaturation of reduced lysozyme in the presence of 4M Urea." *Protein Eng*. 9 : 461-465.
- Maina, C.V., Riggs, P.D., Grandea, A.G., Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., McReynolds, L.A. and Guan, C.D. 1988. "An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein." *Gene*. 74(2) : 365-373.
- Mason, P.W., Zugel, M.U., Semproni, A.R., Fournier, M.J. and Mason, T.L. 1990. "The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*." *J Gen Virol*. 71(9) : 2107-2114.
- Marston, F.A.O. 1986. "The Purification of Eukaryotic Polypeptides Synthesized in *Escherichia coli*." *Biochem J*. 240 : 1-12.
- Megret, F., Hugnot, J.P., Falconar, A., Gentry, M.K., Morens, D.M., Murray, J.M., Schlesinger, J.J., Wright, P.J., Young, P. and Van Regenmortel, M.H. 1992. "Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein." *Virology*. 187(2) : 480-491.
- Miles, J.A. and Austin, F.A. 1963. "Growth of arboviruses in BHK21 cells." *J Sci*. 25 : 466.
- Morens, D.M., Halstead, S.B., Repik, P.M., Putvatana, R. and Raybourne, N. 1985. "Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

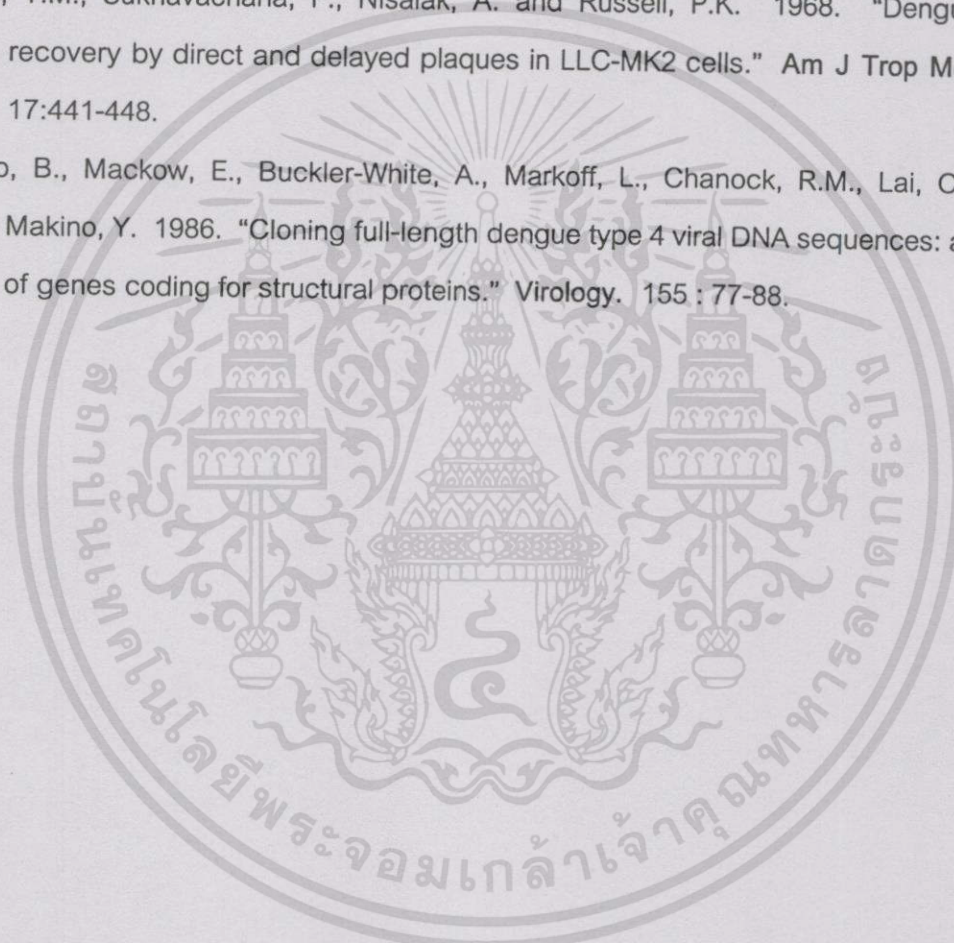
- methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization." *J Clin Microbiol.* 22(2) : 250-254.
- Morens, D.M., Venkateshan, C.N. and Halstead, S.B. 1987. "Dengue 4 virus monoclonal antibodies identify epitopes that mediate immune infection enhancement of dengue 2 viruses." *J Gen Virol.* 68 (1) : 91-98.
- Pepper, O.H.P. 1941. "A note on David Byion and Dengue." *Ann Med.His.3rd ser.* 3 : 363-368.
- Pongtintong-ngarm, S. 1997. "Cloning of Dengue Virus Envelope Protein Gene Fragments and Expression of Peptide Domains as Fusion Protein in *Escherichia coli*." Master degree in Microbiology. Faculty of Medicine, Siriraj Hospital. : Mahidol University.
- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandle, C., Kunz, C. and Harrison, S.C. 1995., "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A resolution." *Nature.* 375 : 291-298.
- Rice, C.M. 1996. "Flaviviridae: the viruses and their application.",p.931-959. *In* B.N.Field., D.M.Kripe and P.M.Howley (ed).Fields virology.Vol1.
- Roehring, J.T., Bolin, R.A. and Kelly, R.G. 1998. "Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica." *Virology.* 246(2) : 317-328.
- Rosen, L. and Gubler, D. 1974. "The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses." *Am J Trop Med Hyg.* 21 : 1153-1160.
- Rudolph, R. and Lilie, H. 1996. "*In vitro* folding of inclusion body proteins." *FASEB J.* 10 : 49-56.
- Rush, A.B. 1789. "An Account of The Bilious Remitting Fever, as it Appeared" p.104-117 *In* Philadelphia in the Summer and Authum of the Year 1780. Medical Enquires and Observations. Pri chard and Hall Philadelphia,Pa.
- Russell, P.K. and Nisalak, A. 1967. "Dengue virus identification by plaque reduction neutralization test." *J Immunol.* 99 : 291-296.
- Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W. and Walsh, E.E. 1985. "Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48." *J Immunol.* 135 : 2805-2809.

- Shi, P.Y., Maizels, N. and Weiner, A.M. 1997. "Recovery of soluble, active recombinant protein from inclusion bodies." *Biotechniques*. 23 : 1036-1038.
- Shu, P.Y., Chen, L.K., Chang, S.F., Yueh, Y.Y., Chow, L., Chien, L.J., Chin, C., Lin, T.H. and Huang, J.H. 2000. "Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever." *J Med Virol*. 62(2) : 224-232.
- Simmons, M., Porter, K.R., Escamilla, J., Graham, R., Watts, D.M., Eckels, K.H. and Hayes, C.G. 1998a. "Evaluation of recombinant dengue viral envelope B domain protein antigens for the detection of dengue complex-specific antibodies." *Am J Trop Med Hyg*. 58(2) : 144-151.
- Simmons, M., Nelson, W.M., Wu, S.J. and Hayes, C.G. 1998b. "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*. 58(5) : 655-662.
- Sinha, D., Bakhshi, M. and Vora, R. 1994. "Ligand binding assays with recombinant proteins refolded on an affinity matrix." *Biotechniques*. 17 : 509-12, 514.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S. 1988. "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." *Gene*. 67 (1) : 31-40.
- Srivastava, A.K., Putnak, J.R., Warren, R.L. and Hoke, C.H. 1995. "Mice immunized with dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection." *Vaccine*. 13 : 1251-1258.
- Staropoli, I., Frenkiel, M.P., Megret, F. and Deubel, V. 1997. "Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice." *Vaccine*. 15(17-18) : 1946-1954.
- Straus, D. and Gilbert, W. 1985. "Genetic engineering in the Precambrian: structure of the chicken triosephosphate isomerase gene." *Mol Cell Biol*. 5(12) : 3497-3506.
- Stempfer, G., Holl-Neugebauer, B. and Rudolph, R. 1996. "Improved refolding of an immobilized fusion protein." *Nat Biotechnol*. 14 : 329-334.
- Stockel, J., Doring K., Malotka, J., Jahnig, F. and Dornmair, K. 1997. "Pathway of detergent-mediated and peptide ligand-mediated refolding of heterodimer classII

- major histocompatibility complex (MHC) modules." *Eur J Biochem.* 248 : 684-691.
- Sugrue, R.J., Cui, T., Xu, Q., Fu, J. And Chan, Y.C. 1997. "The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J Virol Methods.* 69(1-2) : 159-169.
- Sweet, B.H. and Sabin, A.B. 1954. "Properties and antigenic relationships of hemagglutinins associated with dengue viruses." *J Immunol.* 73 : 363-373.
- Tadeu, L., Costa, M. and Baeta, S.M. 1989. "Enzyme immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using mosquito cells as antigen." *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 83 : 702-707.
- Tan, B.H., Fu, J., Sugrue, R.J., Yap, E.H., Chan, Y.C. and Tan, Y. H. 1996. "Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity." *Virology.* 216(2) : 317-325.
- Takacs, B.J. and Girard, M.F. 1991. "Preparation of clinical grade proteins produced by recombinant DNA technologies." *J. Immunol.Methods.* 143 : 231-240.
- Tesh, R.B. 1979. "A method for the isolation and identification of dengue viruses using mosquito cell cultures." *Am J Trop Med Hyg.* 28 : 1053-1059.
- Thongcharoen, P., Wasi, C. and Puthavathana, P. 1993. "Dengue viruses Monograph on dengue/dengue hemorrhagic fever". Prasert Thongcharoen.(ed) World Health Organization. New Delhi, India.
- Tio, P.H., Malasit, P. 1995. "Anti-dengue IgG detection by an indirect ELISA." *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 26 : 673-676.
- Varma, M.G., Pudney, M. and Leake, C.J. 1974. "Cell lines from larvae of *Aedes (Stegomyia) malayensis* Colless and *Aedes (S) pseudoscutellaris* (Theobald) and their infection with some arboviruses." *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 68 : 374-382.
- Varadarajan, R., Szabo, A. and Boxer, S.G. 1985. "Cloning, expression in *Escherichia coli*, and reconstitution of human myoglobin." *Proc Natl Acad Sci.* 82(17) : 5681-5684.
- Vaughn, D.E., Milburn, C.M., Penny, D.M., Martin, W.L., Johnson, J.L. and Bjorkman, P.J. 1997. "Identification of critical IgG binding epitopes on the neonatal Fc receptor." *J Mol Biol.* 274(4) : 597-607.

- Wang, S., He, R. and Robert, A. 1999. "prM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein." *J Virol.* 73(3) : 2547-2551.
- Warrener, P., Tamura, J.K. and Collett, M.S. 1993. "RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria." *J Virol.* 67 (2) : 989-996.
- Wengler, G. and Wengler, G. 1981. "Terminal sequences of the genome and replication from RNA of the *Flavivirus*, West Nile virus, absence of poly (A) and possible role in RNA replication." *Virology.* 113 : 544-594.
- Wengler, G. And Wengler, G. 1989. "Cell-associated West Nile *Flavivirus* is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release." *J Virol.* 63(6) : 2521-2526.
- Wengler, G., Wengler, G., Nowak, T. and Castle, E. 1990. "Description of a procedure which allows isolation of viral nonstructural proteins from BHK vertebrate cells infected with the West Nile *Flavivirus* in a state which allows their direct chemical characterization." *Virology.* 177(2) : 795-801.
- Wengler, G. and Wengler, G. 1991. "The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile *Flavivirus* can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase." *Virology.* 184(2) : 707-715.
- Wengler, G. and Wengler, G. 1993. "The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity." *Virology.* 197(1) : 265-273.
- Westaway, E.G. and Block, J. 1997. "Taxonomy and Evolutionary Relationships of Flaviviruses.", p.147-173. *In* D.J. Gubler and G.Kuno (ed) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* CAB International, London, U.K.
- Wetlaufer, D.B., Branca, P.A. and Chen, G.X. 1987. "The oxidative folding of proteins by disulphide plus thiol does not correlate with redox potential." *Protein Eng.* 1 (2) : 141-146.
- Win, T. 1982. "Detection of dengue viruses by immunofluorescence of the intracerebral inoculation of mosquitoes." *Lancet.* I : 57-64.
- Winkler, G., Randolph, V.B., Cleaves, G.R., Ryan, T.E. and Stollar, V. 1988. "Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer." *Virology.* 162 : 187-196.

- Yenchitsomanus, P., Sricharoen, T., Jaruthasana, P., Pathanakitsakul, S., Nitayaphan S. and Mongkolsapaya, J. 1996. "Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR)." *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 27 : 228-236.
- Young, P.R., Hilditch, P.A., Bletchly, C. and Halloran, W. 2000. "An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients." *J Clin Microbiol*. 38(3) : 1053-1057.
- Yuill, T.M., Sukhavachana, P., Nisalak, A. and Russell, P.K. 1968. "Dengue virus recovery by direct and delayed plaques in LLC-MK2 cells." *Am J Trop Med Hyg*. 17:441-448.
- Zhao, B., Mackow, E., Buckler-White, A., Markoff, L., Chanock, R.M., Lai, C.J. and Makino, Y. 1986. "Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequences: analysis of genes coding for structural proteins." *Virology*. 155 : 77-88.



ภาคผนวก

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

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท Rich medium หรือ Chemically undefined medium อาหารนี้มีสารอาหารจำพวกกรดอะมิโนเพียวรีน ไพริมิดีน ไรโบส และวิตามินและอื่นๆครบถ้วน แหล่งอาหารเหล่านี้ได้มาจากสารสกัดธรรมชาติเช่น สารสกัดจากยีสต์ที่ให้สารอาหารทุกอย่างครบ ทริปโตเฟนได้จากการใช้เอนไซม์ย่อยนมซึ่งจะให้กรดอะมิโนครบทุกตัว อัตราการเจริญเติบโตของ *E.coli* จะเจริญได้เร็วมากเพราะเซลล์ไม่สูญเสียพลังงานในการสร้างสารอาหารที่จำเป็น เตรียมได้จาก

Tryptone	10.00	กรัม
NaCl	10.00	กรัม
Yeast extract	5.00	กรัม

ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

2. สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดด้วยวิธี Mini alkaline-lysis / PEG precipitation

2.1) TE พีเอช 8.0

1 M Tris-HCl พีเอช 8.0	5.0	มิลลิลิตร
0.5M EDTA พีเอช 8.0	1.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

2.2) Solution I (GTE buffer) : 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl พีเอช 8.0, 10 mM EDTA พีเอช 8.0

Glucose	0.9	กรัม
1 M Tris-HCl พีเอช 8.0	2.5	มิลลิลิตร
0.5M EDTA พีเอช 8.0	2.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.3) Solution II : 0.2 M NaOH. 1% SDS

5 M NaOH	4.0	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

10% SDS	10.0	มิลลิลิตร
---------	------	-----------

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.4) Solution III : 3 M Potassium Acetate พีเอช 4.8

Potassium acetate (CH_3COOK)	29.4	กรัม
--	------	------

Glacial acetic acid	40.0	มิลลิลิตร
---------------------	------	-----------

ปรับพีเอชให้เป็น 4.8 ด้วย glacial acetic acid.

2.5) สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม : สารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวในน้ำผสมกับคลอโรฟอร์มอัตราส่วน 24:1

2.6) สารละลาย PEG 13 เปอร์เซนต์

PEG ₈₀₀₀	13	กรัม
---------------------	----	------

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

2.7) 4 M NaCl

NaCl	2.38	กรัม
------	------	------

ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายสำหรับวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.1) สารละลายบัฟเฟอร์ TAE (Tris-acetate) 50x

Tris base	242	กรัม
-----------	-----	------

Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
---------------------	------	-----------

0.5 M EDTA พีเอช 8.0	100	มิลลิลิตร
----------------------	-----	-----------

ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.2) สารละลาย 6X gel loading buffer

1% bromophenol blue	2.5	มิลลิลิตร
---------------------	-----	-----------

1% Xylene cyanol	2.5	มิลลิลิตร
------------------	-----	-----------

Glycreol	3.0	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

น้ำกลั่น	2.0	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

3.3) อะกาโรส 1 เปอร์เซนต์

อะกาโรส	1.0	กรัม
---------	-----	------

1xTAE	100	มิลลิลิตร
-------	-----	-----------

4. สารละลายสำหรับ SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

4.1) 10% (w/v) Ammonium persulfate

Ammonium persulfate (Sigma) 1.0 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร.

4.2) Resolving gel buffer พีเอช 8.8 : 3 M Tris-HCl

Tris (Sigma) 36.3 กรัม

1M HCl 48 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วย 1 M HCl

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3) Stacking gel buffer พีเอช 6.8 : 0.5 M Tris-HCl

Tris (Sigma) 6.0 กรัม

1M HCl 48 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย 1 M HCl

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4) 30.8% (w/v) Acrylamide-bisacrylamide

Acrylamide (Sigma) 30.0 กรัม

Bis-acrylamide (Sigma) 0.8 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง

Whatman no.1

4.5) 10% (w/v) Sodium dodecylsulphate

Sodium dodecylsulphate (Sigma) 10.0 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.6) การเตรียม resolving gel 12%

30.8% (W/V) Acrylamide-bisacrylamide 2.0 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 2.29 มิลลิลิตร

Resolving gel buffer 0.63 มิลลิลิตร

10% SDS 50 ไมโครลิตร

10% Ammonium persulfate 38 ไมโครลิตร

TEMED 2.5 ไมโครลิตร

4.7) การเตรียม Stacking gel 3.85%

30.8% (W/V) Acrylamide-bisacrylamide	0.25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.22	มิลลิลิตร
Stacking gel buffer	0.50	มิลลิลิตร
10% SDS	20	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	15	ไมโครลิตร
TEMED	1.5	ไมโครลิตร

4.8) 10x Running buffer พีเอช 8.3: 0.25 M Tris-HCl, 1.92 M Glycine , 1% (w/v) SDS

Tris	30.3	กรัม
Glycine	144.0	กรัม
SDS	10.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

4.9) 4X Reducing Sample buffer (4xRSB) : 0.0625 M Tris-HCl พีเอช 6.8, 8% (w/v) SDS 40% (v/v) glycerol and 0.005% Bromophenol blue

SDS	0.8	กรัม
Glycerol	4.0	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-Cl พีเอช 6.8	5.0	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.5	มิลลิกรัม
2- mercaptoethanol (2-ME)	1.0	มิลลิลิตร

5. สารละลายสำหรับการย้อมสีด้วยวิธี Coomassie blue staining

5.1) น้ำยาย้อมสี Coomassie blue Staining solution

Coomassie brilliant blue R250	0.25	กรัม
Methanol	45.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	45.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.00	มิลลิลิตร

5.2) น้ำยา Destaining solution

Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
Methanol	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

6. สารละลายสำหรับการทำ Western blot

6.1) Blotting buffer : 20m M Tris-HCl พีเอช 8.3, 150 mM Glycine, 20% (v/v) methanol

3 M Tris (Sigma)	3.335	มิลลิลิตร
Glycine	5.78	กรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 8.3 แล้วเติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตรแล้วตามด้วยเมทานอล 100 มิลลิลิตร

6.2) Phosphate buffer saline (PBS) พีเอช 7.4

KCl	0.20	กรัม
NaCl	8.00	กรัม
KH_2PO_4	0.24	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.44	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

6.3). Blocking buffer : 5% skimmed milk (w/v) in PBS พีเอช 7.4

นมพร่องมันเนย	5.0	กรัม
---------------	-----	------

ละลายใน PBS พีเอช 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร.

6.4) Chromogenic substrate

3,3' Diaminobenzamide (Sigma)	30.0	มิลลิกรัม
-------------------------------	------	-----------

ละลายใน PBS พีเอช 7.4 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร

7. สารละลายในขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)

7.1) สารละลาย 6M Guanidine-HCl lysis buffer พีเอช 8.0 : 50 mM Na_2HPO_4 พีเอช 8.0 10 mM Tris-HCl, 6M guanidine-HCl, 100 mM NaCl.

2 M Na_2HPO_4	1.25	มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl พีเอช 8.0	0.50	มิลลิลิตร
Guanidine hydrochloride	28.08	กรัม
4 M NaCl	1.25	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 8.0 และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7.2) สารละลาย 8M Urea lysis buffer พีเอช 8.0 : 50 mM NaH₂PO₄ พีเอช 8.0, 10 mM Tris-HCl พีเอช 8.0, 8 M urea, 100 mM NaCl.

2.0 M NaH ₂ PO ₄	1.25	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl พีเอช 8.0	0.5	มิลลิลิตร
Urea	24.05	กรัม
4 M NaCl	1.25	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50°C ถึง 60°C ปรับพีเอชให้เป็น 8.0 ทิ้งให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

7.3) สารละลาย 8 M Wash buffer พีเอช 7.0 : 50 mM NaH₂PO₄, 8 M urea, 100 mM NaCl.

2.0 M NaH ₂ PO ₄	1.25	มิลลิลิตร
Urea	24.05	กรัม
4 M NaCl	1.25	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50°C ถึง 60°C ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ทิ้งให้เย็นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

7.4) สารละลาย 8M Elution buffer พีเอช 4.5 : 50 mM NaH₂PO₄, 8 M urea, 100 mM NaCl, 20 mM MES.

2.0 M NaH ₂ PO ₄	1.25	มิลลิลิตร
Urea	24.05	กรัม
4 M NaCl	1.25	มิลลิลิตร
1 M MES	1.0	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50°C ถึง 60°C ปรับพีเอชให้เป็น 4.5 ทิ้งให้เย็นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

7.5) Lysis buffer (100 mM NaCl ,1mM EDTA , 100 mM Tris-Cl)

4 M NaCl	2.5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA พีเอช 8.0	0.2	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl พีเอช 8.0	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7.6) Triton lysis buffer (100 mM NaCl ,1mM EDTA , 100 mM Tris-Cl ,0.5 % TritonX-100)

Triton X-100	0.5	มิลลิลิตร
--------------	-----	-----------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 M NaCl	2.5	มิลลิลิตร
0.5M EDTA พีเอช 8.0	0.2	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl พีเอช 8.0	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

8. สารละลายที่ใช้ในการคืนสภาพธรรมชาติของโปรตีน

8.1) โดยวิธีไดอะไลซิส (stepwise removal of urea)

8.1.1) 5 M urea, 50mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl

2 M NaH ₂ PO ₄	1.25	มิลลิลิตร
4 M NaCl	1.25	มิลลิลิตร
Urea	15.02	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50°C ถึง 60°C ปรับพีเอชให้เป็น 7.5 ที่ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

8.1.2) 2.5M urea, 50mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl

2M NaH ₂ PO ₄	1.25	มิลลิลิตร
4M NaCl	1.25	มิลลิลิตร
Urea	7.51	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50°C ถึง 60°C ปรับพีเอชให้เป็น 7.5 ที่ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

8.1.3) 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 1% TritonX-100

2 M NaH ₂ PO ₄	1.25	มิลลิลิตร
4 M NaCl	1.25	มิลลิลิตร
TritonX-100	0.05	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50°C ถึง 60°C ปรับพีเอชให้เป็น 7.5 ที่ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

8.2) วิธีการไดอะไลซิสในไกลซีนบัฟเฟอร์

8.2.1) Glycine buffer : 50 mM ,5 mM EDTA, พีเอช 10.5

2 M Glycine	12.5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	5.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับพีเอชให้เป็น 10.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.2.2) 0.9% NaCl

NaCl	0.9	กรัม
------	-----	------

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

8.2.3) 0.9% NaCl, 0.1% TritonX-100

NaCl	0.9	กรัม
TritonX-100	0.01	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

8.3) วิธีการ Dilution (Refolding buffer : 50 mM Tris-HCl พีเอช 8.0 , 1 mM EDTA พีเอช 8.0 , 244.5 mM L-arginine monohydrochloride , 0.25 mM Reducing glutathione , 2.5 mM Oxidized glutathione)

1 M Tris-HCl	50	มิลลิลิตร
--------------	----	-----------

0.5 M EDTA	1.0	มิลลิลิตร
------------	-----	-----------

ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วก่อนใช้จึงเติม

L-arginine monohydrochloride	50	กรัม
------------------------------	----	------

Reducing glutathione	0.77	กรัม
----------------------	------	------

Oxidized glutathione	0.15	กรัม
----------------------	------	------

ประวัติผู้เขียน

นางสาวธนพรรณ พร้อมมูล เกิดเมื่อวันที่ 24 กันยายน 2516 ที่อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (เกษตรศาสตร์) จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2538

เสนอมผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์ในงานประชุมประจำปีครั้งที่ 12 ของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ประจำปี 2543 ได้แก่

Prommool, T., Puttikhunt, C., Malasit, P. 2000. "Expression of C-terminal truncated NS1 protein of dengue virus in *E.coli*." The 12nd annual meeting of the Thai Society for Biotechnology, pp.130. 1-3 Nov 2000, Felix Hotel Kanchanaburi.

